

Fundación Juan March

Serie Universitaria



211

Juan Alfonso Ayala Serrano

**Mecanismo de expresión de
la PBP-3 de *E. coli*:
Obtención de una cepa
hiperproductora de la
proteína**



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 435 42 40
Madrid-6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de España, 1981, individual*

**PLAN DE BIOLOGIA MOLECULAR
Y SUS APLICACIONES**

*Centro de trabajo: Instituto de Bioquímica de
Macromoléculas del Centro de
Biología Molecular, Madrid.*

Los Textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por los
propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M-5970-1984

I.S.B.N. : 84-7075-292-8

Impresión: Ediciones Peninsular. Tomelloso, 37. Madrid-26

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	5
RESULTADOS	6
1. Ensayo de afinidad y selectividad del antibiótico VA13 por las distintas PBP's (1)	6
2. Clonaje de fragmentos de DNA de E. coli conteniendo el gen que codifica la PBP-3	6
2.1. Elección del vector	7
2.2. Método de selección	8
2.3. Análisis de los lisógenos obtenidos	8
3. Fijación de ¹²⁵ I-Amp a membranas de las estirpes lisogénicas	9
4. Capacidad de fijación de ¹²⁵ I-Amp en diferentes estirpes de E. Coli	10
5. Comparación de las PBPs en las membranas de los diferentes lisógenos.	10
6. Purificación del DNA de los distintos fagos	11
7. Análisis por enzimas de restricción de los DNA de λ 32 y λ 34	12
8. Análisis de moléculas heterodúplex	14
9. Análisis de una nueva fuente del gen estructural de la PBP-3	15
10. Estudio de la expresión de los dobles lisógenos Ax655/ λ^+ , λ sep ⁺ 46 y Ax655/ λ^+ , λ sep ⁺ 82	15
11. Subclonaje del gen estructural para la PBP-3	16
CONCLUSIONES Y DISCUSION	18
REFERENCIAS	38

MECANISMO DE EXPRESION DE LA PBP-3 DE E. COLI: OBTENCION DE UNA CEPA HIPERPRODUCTORA DE LA PROTEINA

INTRODUCCION

Se había realizado en nuestro laboratorio la síntesis de varios derivados de Ampicilina, de todos ellos, hubo uno (VAL3)(1), que presentó una gran afinidad y especificidad por la PBP-3 de E. coli. Dado el carácter de di-Ampicilina del nuevo derivado, podía pensarse en su unión específica a dos moléculas diferentes y por lo tanto realizar crosslinking entre ellas. La PBP-3 es una proteína de la membrana citoplásmica, que está implicada en la etapa final del proceso de división celular durante la formación del septum. Estas características la hacen muy interesante tanto por su función como por el estudio del entorno de la membrana donde está ubicada. No obstante, en E. coli sólo existen 50 copias de esta proteína por célula, lo cual dificulta cualquier estudio de tipo bioquímico. Por tanto iniciamos el clonaje molecular de esta proteína en un bacteriofago λ_{540} , para posteriormente subclonar el gen estructural en un plásmido bacteriano, con la idea de amplificarlo y obtener cantidades importantes de PBP-3 para realizar su purificación y los estudios de crosslinking en la membrana. Así pues, nos dedicamos a la obtención de una cepa hiperproductora de PBP-3. Mediante técnicas de ingeniería genética clonamos el DNA de una estirpe salvaje de E. coli en un fago vector. Obtuvimos cinco presuntos lisógenos que complementaban la mutación en el gen de la PBP-3. Llevamos a cabo un estudio exhaustivo de estos lisógenos mediante análisis detallado de los puntos de corte por enzimas de restricción, un estudio de moléculas heteroduplex por microscopía electrónica y el análisis de la fisiología de los diferentes lisógenos.

Dos de estos lisógenos contenían los fagos λ_{34} y λ_{35} cuyo inserto de 8 kbp podría contener el gen para la PBP 3, sin embargo ninguno de ellos produjo más PBP-3 de la que produce la cepa salvaje a juzgar por la fijación de ^{125}I -Amp. Estos resultados nos llevaron a buscar otra fuente para obtener el gen estructural para esta proteína y clonarlo en un plásmido multicopia.

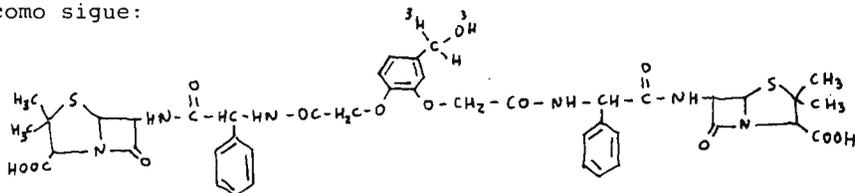
Elegimos las estirpes de Walker que contienen un fago λ da en el que se insertó un fragmento del DNA de E. coli de ≈ 10 kbp correspondiente al cluster de genes de división Leu A-env A.

El análisis a nivel molecular de estos fagos nos ratificó la presencia del gen pbpB en un fragmento de restricción Xma I-Eco RI, así como la hiperproducción de la proteína cuando se indujo el profago. La última parte del proyecto ha sido el clonaje del fragmento Xma I-Eco RI en un plásmido conteniendo el promotor del gen Lac Z y el análisis de los transformantes.

RESULTADOS

1.- Ensayo de afinidad y selectividad del antibiótico VAL3 por las distintas PBP's (1)

Se realizaron ensayos de fijación del antibiótico a membranas de E. coli W-7. La experiencia se realizó por fijación directa del derivado tritiado. La estructura de este compuesto es - como sigue:



El método de ensayo se describe en la figura 1. El antibiótico se fija a las PBP 3 y 8 a bajas concentraciones presentando por tanto una alta selectividad para estas dos proteínas. No obstante, la afinidad por la PBP-3 es la máxima que se consigue ya a $0.8 \mu\text{g/ml}$, mientras que la afinidad por la PBP-8 es baja ya que aumenta la fijación a altas concentraciones.

2.- Clonaje de fragmentos de DNA de E. coli conteniendo el gen que codifica la PBP-3

La proteína PBP-3 tiene un peso molecular de 60.000 dalton y está presente en la membrana citoplásmica de E. coli en unas 50

copias por célula (2). Cephalexina, un miembro del grupo de los antibióticos β -lactámicos, inhibe la septación de E. coli sin producir lisis inmediata.

La fijación de cephalexina a las membranas de E. coli seguido de la adición de penicilina G marcada indica que la PBP-3 parece unir cephalexina específicamente. Además un mutante, resistente a cephalexina es carente de esta proteína. Por todo ello se le ha asignado a la PBP-3 una implicación en la síntesis del sáculo específico del septum (3).

No obstante, no se ha demostrado inequívocamente ninguna actividad enzimática para la proteína in vivo.

Así pues, el poseer un antibiótico (VA13), que presenta una alta selectividad, así como una buena afinidad para esta proteína y que permite la posibilidad de realizar crosslinking al ser un antibiótico de brazo largo, nos indujo a fabricar un clon hiperproductor de esta proteína.

2.1.- Elección del vector

Elegimos como vehículo de clonaje el bacteriophago λ que ha sido modificado in vitro (4) para obtener un DNA, que presente un sólo sitio de corte por el enzima de restricción Hind III.

Un esquema del vector, se muestra en la figura 2. Este vector denominado λ_{540} presenta una delección del 21% respecto a λ salvaje y por tanto permite insertar fragmentos de DNA de 10-15 Kbp en el único sitio de corte por Hind III.

En el Laboratorio del Dr. Miguel Vicente se disponía de una banca del genoma de E. coli (5) preparada de la siguiente forma:

El DNA de E. coli W 3110, se purificó y se digirió completamente con el enzima de restricción Hind III. El DNA de λ_{540} previamente purificado fué cortado igualmente por Hind III. Ambos di-

geridos se mezclaron en presencia del enzima T_4 DNA ligasa. Este enzima es capaz de ligar fragmentos de DNA que presentan extremos cohesivos, dando lugar a nuevos fagos que contienen insertos fragmentos del DNA de E. coli de diferentes tallas. Así pues, utilizamos - esta banca de W3110 en λ_{540} , para infectar al mutante termosensible JE 10730.

2.2.- Método de selección

Disponíamos en el Laboratorio de una colección de mutantes de E. coli para las diferentes PBP's, procedentes de Y. Hirota (6) entre ellos el denominado JE 10730, el cual tiene el alelo $ftsI_{730}$ (termosensible) cuyo fenotipo es la carencia total de PBP-3 cuando se crece a 42°C , y por tanto presenta una morfología filamentosa, al no producirse la septación. Esta estirpe presenta por tanto un crecimiento termosensible.

Así pues el método de selección fué: preparar diluciones - del mutante después de la transfección, plaquear y seleccionar aque- llas colonias capaces de crecer a 42°C , potenciales lisógenos.

De entre ellas se eligieron cinco, denominadas JE 10730 (λ_{31}), JE 10730 (λ_{32}), JE 10730 (λ_{33}), JE 10730 (λ_{34}) y - JE 10730 (λ_{35}), todas ellas con crecimiento normal a 42°C .

Un esquema global del proceso se muestra en la figura.3.

2.3.- Análisis de los lisógenos obtenidos

Los cinco lisógenos obtenidos se analizaron mediante dos técnicas:

a) Inmunidad a la infección con un fago homoinmune.

Todas las especies lisogénicas resultaron inmunes a la infección por λ_{540} , indicativo de la existencia en todas ellas de - un profago con inmunidad 21, pero se infectan con λ_{CI} y lisan.

b) Desplazamiento del profago con λ b2

Cuando se superinfecta con el fago λ b2, que es incapaz de formar lisógenos, se desplaza el profago y las estirpes recobran su fenotipo anormal (carencia de PBP-3 y crecimiento termosensible). Este tipo de ensayo sólo se realizó con JE 10730 (λ 34) y JE 10730 (λ 35).

La presencia de PBP-3 normal en estas estirpes se ha demostrado mediante binding de ^{125}I -Amp a las membranas aisladas y análisis de los geles obtenidos en PAGE al 8%.

3.- Fijación de ^{125}I -Amp a membranas de las estirpes lisogénicas

Las membranas del mutante PBP-3 (ts) y de los dos lisógenos crecidos a 30°C se prepararon por sonicación. En la figura 4 se describe el método de fijación y se muestra una autoradiografía con las diferentes PBPs. El patrón de bandas obtenido es el típico para una estirpe de E. coli K-12, con tres diferentes PBP-1B.

El mutante fts I₇₃₀ no presenta fijación de ^{125}I -Amp para la banda PBP-3 incluso cuando se incubaba a 30°C. No obstante, el crecimiento y la morfología de la estirpe a 30°C es normal, lo cual implicó que la capacidad de fijación de ^{125}I -Amp se pierde antes que la funcionalidad para la PBP-3.

En cualquier caso a 30°C aparece una ligerísima sombra en la zona correspondiente a la PBP-3, que no se detecta a 42°C. Por tanto, la misma proteína (obtenida de células crecidas a 30°C) que es funcionalmente activa a 30°C, dejaría de serlo a 42°C, ya que su capacidad de fijación aumenta normalmente a 42°C y en este caso se pierde por completo.

Los dos lisógenos que hemos obtenido, presentan una banda normal para la PBP-3, aumentando la fijación de ^{125}I -Amp a 42°C. Aparece además en los dos casos una nueva banda por debajo de la PBP 6 que no hemos identificado. Por otra parte la banda PBP-3 pre-

senta un desdoblamiento, que ya habíamos detectado en otras estirpes, pero que en este caso es más acusado.

4.- Capacidad de fijación de ^{125}I -Amp en diferentes estirpes de E. coli

Estudiamos la fijación de ^{125}I -Amp a las membranas de diferentes estirpes de E. coli K12, crecidas a tres temperaturas distintas (30, 37 y 42°C) con objeto de obtener datos comparativos que nos sirvieran para analizar las cepas lisogénicas que habíamos obtenido. Los resultados se resumen en la Tabla I como porcentajes de la fijación total. Este antibiótico radiactivo se fija preferencialmente a las PBPs 1A; 1B, 3 y 6. PBP-3 fija del 40 al 60% del total y las PBP 1B y 6 varían entre 3-7% y 20-30% respectivamente.

Así pues, hemos escogido para comparar la fijación las PBPs 1B y 6, además de la PBP-3 objeto de nuestro trabajo. En primer lugar, por que son proteínas que tienen un importante papel "in vivo" en diferentes etapas del ciclo celular, y, en segundo, porque son fácilmente analizables con este β -lactámico radiactivo.

5.- Comparación de las PBPs en las membranas de los diferentes lisógenos

Las membranas de la estirpe donadora (W3110), de la receptora (JE 10730) y de los diferentes lisógenos crecidos a 30°C y 42°C se prepararon por sonicación.

La fijación de ^{125}I -Amp a estas membranas se ensayó a 37°C en todos los casos. Los datos obtenidos en comparación con las estirpes donadora y receptora se resumen en las Tablas II, III y IV. Se presentan solamente dos lisógenos que son representativos de los cinco obtenidos. El comportamiento de λ 32 es análogo al de λ 31 y λ 33, y el de λ 34 es análogo para λ 35.

La tabla II muestra el porcentaje de fijación de la PBP-3 durante el ciclo de crecimiento comparado con el que fija en membranas obtenidas de células en crecimiento exponencial a 30°C. La

Tabla III muestra el porcentaje del total de fijación en cada estado de crecimiento para las tres PBP's escogidas y la tabla IV resume la relación de fijación de ^{125}I -Amp entre estas PBP's en diferentes estados del ciclo celular. Asumiendo que los cambios de fijación son debidos a cambio en la cantidad de proteína, la PBP 1B aumenta durante la fase estacionaria en la estirpe donadora y en los lisógenos, pero decrece en el receptor.

La PBP-3 presenta un comportamiento paralelo en el donador y en el lisógeno $\lambda 32$, pero decrece más lentamente en la cepa JE10730 ($\lambda 34$) y obviamente está ausente en el mutante receptor.

La PBP-6 presenta el mismo patrón de fijación para las cuatro estirpes en todos los estados del crecimiento, pero con ligeras diferencias en porcentajes de fijación.

Se ensayó la expresión de la proteína en un sistema "in vitro" utilizando los fagos $\lambda 31$ y $\lambda 35$ y la maquinaria biosintética de la estirpe de E. Coli 159 en presencia de ^{35}S -metionina. No se detectó ninguna proteína de la talla molecular de la PBP-3.

Estos datos en unión a los análisis por enzimas de restricción y de heteroduplex nos confirman en la idea que estos fagos no contienen el gen estructural para la proteína PBP-3 sino que modifican la expresión del gen mutante presente en el lisógeno.

6.- Purificación del DNA de los distintos fagos

Los lisógenos JE 10730 ($\lambda 31$) y JE 10730 ($\lambda 35$) se crecieron en medio LB y se indujeron con una dosis de 500 ergios/mm^2 de radiación ultravioleta. Los fagos se separaron de los desechos celulares por centrifugación a 10.000 rpm. durante 10 min. El lisado claro obtenido dió títulos de 10^{11} - 10^{12} pfu/ml.

El precipitado de poly-etilenglycol 6000 se resuspendió en tampón de fagos y se separaron los fagos en un gradiente discontinuo de cloruro de Cesio.

El DNA se obtuvo a partir de los fagos mediante extracción con fenol y precipitación con etanol/Acetato sódico.

Una comprobación por microscopía electrónica de la preparación de fagos mostró una buena limpieza de la misma. Así mismo, la integridad de los fagos era mayor del 95% para λ 31 y del \approx 80% para el fago λ 35. No obstante el DNA obtenido presentaba una gran proporción de rotura en una sola cadena lo que dificulta el estudio para heteroduplex, pero no afecta al análisis por enzimas de restricción. La relación de absorbancia entre 260 y 280 nm fué de 2:1 y las preparaciones no mostraron absorción a 320 nm, lo cual indica una preparación no particulada.

Con estas preparaciones hemos llevado a cabo los análisis que se describen en los apartados siguientes:

7.- Análisis por enzimas de restricción de los DNA de λ 32 y λ 34

El DNA de los diferentes lisógenos purificado como se describe en el apartado 6 se dirigió con cuatro diferentes enzimas de restricción: EcoRI, HindIII, Bam HI y Sali.

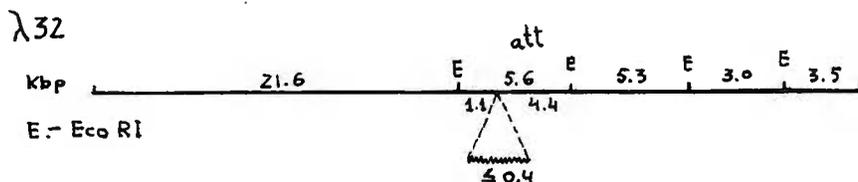
La figura 5 muestra una foto de los distintos fragmentos obtenidos al ser separados en un gel de agarosa al 0.8% y teñidos con Bromuro de Ethidio.

El DNA fágico de λ 540 (fago utilizado para el clonaje) tiene cuatro sitios de corte para EcoRI, un solo sitio para HindIII, dos sitios para BamHI y dos sitios para Sali.

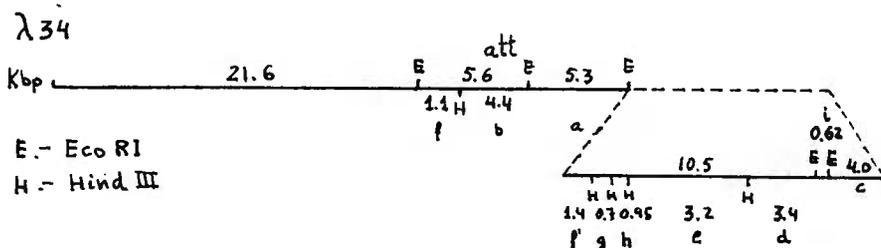
Hemos encontrado una similitud en el corte por enzimas de restricción (Eco RI, Hind III, Bam HI, Sal I) entre los DNAs de λ 31, λ 32, y λ 33 por una parte y entre los de λ 34 y λ 35 por otra. Por tanto hemos analizado con más detalle dos de estos DNAs (uno de cada tipo) mediante el corte con dos enzimas simultáneamente. En la figura 9 se representa el patrón de bandas obtenido para λ 32 y λ 34. Se observa que λ 32 tiene un fragmento menor de 0.4 kbp que está in

serto en el sitio de Hind III, mientras que λ 34 tiene una región modificada presentando un aumento de talla de ≈ 8 kbp comparada con λ 540. Se observan tres nuevas bandas de 10.5, 4.0 y 0,62 kbp en la digestión con EcoRI, indicativas de dos nuevos sitios de corte para esta enzima. Aparecen bandas de 11.4, 8.5, 3.0, 0.95 y 0,70 kbp cuando se corta con Hind III indicando la presencia de cuatro nuevos sitios de corte para este enzima.

El análisis mediante doble restricción con Hind III y Eco RI nos muestra el patrón que se detalla en la figura 6 y nos induce al siguiente esquema para cada uno de los fagos:



El esquema para λ 32 es el esperado, según el método de construcción del fago, es decir, un fragmento de DNA de E. coli se inserta en el sitio de restricción del enzima con el cual se cortó el DNA de λ 540 (Hind III). No obstante, el fragmento insertado es muy pequeño y no es capaz de contener el gen estructural para la PBP-3.



Este esquema para λ 34 implica algún tipo de recombinación entre el DNA del fago y el DNA bacteriano que ha tenido lugar fuera del sitio normal de unión del fago (att) lo cual no es fácilmente explicable, ya que el fago tiene la región de unión (att) al cromosoma y no debe tener ninguna otra homología. También existe la posibilidad de que la zona a la derecha del sitio att sea un fragmento de excisión errónea que ha tenido lugar en el sitio normal de unión

8.- Análisis de moléculas heteroduplex

Hemos utilizado la técnica de desnaturalización descrita por R.W. Davis et al (7), y un 50% de formamida para la renaturalización de la cadena heteroduplex.

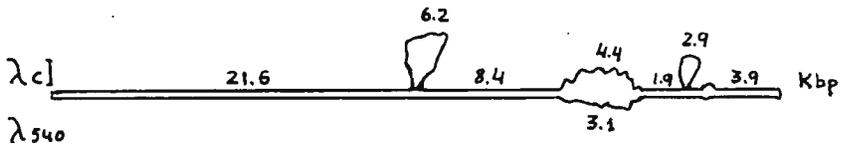
El método utilizado para la extensión del DNA en las rejillas de microscopía es el descrito por Kleinschmidt(8).

Hemos utilizado los DNAs de λ_{31} , λ_{35} y $\lambda_{cI_{857}}$. Este último es el DNA de un fago λ , que presenta todas las características de λ salvaje, pero tiene una mutación en la región de inmunidad que hace termosensible su inducción.

Hemos realizado ensayos de heteroduplex utilizando las parejas de DNA $\lambda_{31}/\lambda_{cI}$, $\lambda_{35}/\lambda_{cI}$ y $\lambda_{540}/\lambda_{cI}$, y diferentes condiciones de desnaturalización y renaturalización del DNA.

Utilizamos DNA de λ_{cI} para hibridar con las DNAs de nuestros lisógenos por que con él obteníamos el mayor número de regiones de cadena lineal, lo que facilita el análisis.

Un esquema del heteroduplex esperado es como sigue:



La Figura 7 muestra una micrográfica de una molécula heteroduplex entre los DNA de λ_{31} y λ_{cI} . En ella podemos observar las dos cadenas sencillas de la región de inmunidad.

En la Figura 8 se muestran los esquemas de los heteroduplex obtenidos entre los fagos λ_{31} y λ_{35} con λ_{cI} , así como la carta de

restricción para los enzimas EcoRI, Hind III, Bam HI y Sal I. Estos esquemas muestran una inserción de ≈ 0.4 kbp en el sitio de Hind III para λ 33 sin ningún punto de corte interno para los cuatro enzimas ensayados. El fragmento de 8 kbp para λ 34 no está inserto en el sitio Hind III y contiene 2 sitios para Eco RI, 4 sitios para Hind III, ningún sitio para Bam HI y 1 sólo sitio para Sal I.

El análisis por heteroduplex confirma completamente estos resultados, ya que λ 31 da un patrón análogo a λ 540 al ser muy pequeño el fragmento insertado no se puede detectar como cadena sencilla independiente; y λ 35 presenta una región de cadena sencilla en la zona derecha del fago correspondiente al fragmento de 8 kbp insertado.

9.- Análisis de una nueva fuente del gen estructural de la PBP-3

Dados los resultados vistos anteriormente nos propusimos buscar otra fuente para obtener el gen estructural para la PBP-3. Revisamos la literatura y encontramos los fagos transductores descritos por Walker (9), estos fagos se denominan λ sep⁺⁴⁶ y λ sep⁺⁸², los cuales contienen un fragmento del DNA de E. coli de 20 y 10 kbp respectivamente, correspondiente al cluster de división comprendido entre leuA y envA. Las estirpes fueron amablemente cedidas por el Dr. Miguel Vicente. Los fagos fueron purificados por la técnica descrita en la Figura 9 y se analizaron mediante corte con enzimas de restricción. El patrón de bandas obtenido coincide completamente con el que ha sido descrito por Hirota (10) para esta región del cromosoma de E. coli.

10.- Estudio de la expresión de los dobles lisógenos Ax655/ λ ⁺, λ sep⁺⁴⁶ y Ax655/ λ ⁺, λ sep⁺⁸²

Los fagos descritos por Walker están bajo la forma de dobles lisógenos λ ⁺; λ sep⁺, ya que estos fagos son defectivos y ne

cesitan la ayuda de un fago "helper" para producir partículas infecciosas. La estirpe Ax655 tiene la mutación sep 2158 TS que produce filamentos a 42°C. Cuando los fagos están presentes -en los dobles lisógenos- la mutación se revierte y el crecimiento a 42°C es normal, incluso las células son un poco más pequeñas que la misma cepa crecida a 30°C (11). La fijación de ^{125}I -Amp a las membranas aisladas de estas estirpes crecidas a 30°C y 42°C se muestra en la figura 10. La estirpe que contiene el fago $\lambda_{\text{sep}}^{+46}$, no presenta fijación para la PBP-3 en las membranas cuando se crecieron a 30°C ó 42°C, pero se expresa unas 50 veces más cuando se induce la expresión del fago mediante radiación ultravioleta y temperatura. - Por otra parte la estirpe que contiene el fago $\lambda_{\text{sep}}^{+82}$ presenta un comportamiento análogo a nuestros lisógenos, es decir, expresa la proteína a niveles análogos a una cepa salvaje, pero en este caso se hiperproduce, cuando está inducida la producción del fago, unas 50 veces. (11)

Resultados análogos han sido encontrados por Spratt (12) - para expresión de las PBPs 2 y 5. Estos datos en unión al análisis por enzimas de restricción nos indican la presencia del gen estructural para la PBP-3 al menos en el fago $\lambda_{\text{sep}}^{+82}$, a la vez que nos proporciona la estirpe hiperproductora que buscábamos, cuando se induce el profago que contiene.

11.- Subclonaje del gen estructural para la PBP-3

En la figura 11 se muestra un esquema del método que hemos seguido para subclonar el gen estructural de la PBP-3 en un plásmido que nos permita expresarla utilizando el promotor del operón de la lactosa de E. coli.

El procedimiento consiste en introducir el fragmento de restricción más pequeño posible en un plásmido que contiene el promotor, operador y un fragmento del gen que codifica para la β -galactosidasa. Este fragmento da lugar a un péptido que produce α -complementación con la β -galactosidasa producida por una muta

ción M-15 que la hace inactiva. Además en la región amino terminal presenta una inserción de 33 bp con diferentes sitios de corte para distintas enzimas de restricción que no se repiten en la secuencia. Esto hace fácil la inserción de fragmentos obtenidos con diferentes enzimas. Así pues, cuando el plásmido no contiene ninguna inserción expresa el peptido que complementa la mutación M-15 de la β -galactosidasa, y la estirpe en la que está inserto produce colonias azules en presencia de un cromógeno (X-gal) que puede ser degradado por el enzima dando color azul. Cuando el plásmido contiene un inserto, el peptido producido no produce la α -complementación y las colonias aparecen blancas al no poder ser degradado el cromógeno. Además el plásmido codifica para la resistencia a Ampicilina, lo que nos proporciona un criterio para determinar la presencia del plásmido en la estirpe.

Hemos utilizado tres combinaciones de enzimas de restricción, una de ellas -Xma I y EcoRI- que da un fragmento de 5700b.p. flanqueado por extremos cohesivos para XmaI por el extremo 5' y para EcoRI por el extremo 3'. La segunda combinación HgiAI-HgiAI produce un fragmento de 2287 b.p. flanqueado en ambos laterales por extremos cohesivos pertenecientes a HgiAI (análogo a PstI). Una tercera combinación -BclI y EcoRI que da un fragmento de 5450 b.p. con extremo 5' para BclI y para EcoRI el extremo 3'. Estos fragmentos han sido insertados en el plásmido puc9 (que presenta las características descritas anteriormente) cortado previamente con XmaI y EcoRI - en el primer caso, con PstI en el segundo y con BamHI y EcoRI en el tercero.

El plásmido religado in vitro usando la T_4 DNA ligasa se ha utilizado para transformar la estirpe JM83 que presenta la delección del operón lactosa cromosómico y tiene introducido un profago con el gen de la β -galactosidasa conteniendo la mutación M-15.

Mediante análisis de color hemos aislado transformantes con inserto de cada una de las combinaciones. La eficacia de ligación fué buena en todos los casos. Actualmente estamos analizando

los plásmidos contenidos en los distintos transformantes.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

Como consecuencia de la búsqueda de nuevos antibióticos β -lactámicos marcados con Tritio llegamos a obtener en nuestro laboratorio un derivado de Ampicilina, que presenta dos grupos - β -lactámicos unidos por una cadena intermediaria. La estructura de este compuesto se muestra en el punto 1.

Este nuevo antibiótico presentó una alta selectividad y afinidad por la PBP-3 de E. coli, este derivado presentó además la posibilidad de realizar crosslinking entre dos moléculas que -fijen antibiótico dado la longitud de su brazo. Todos estos resultados hacían de este compuesto un auxiliar magnífico para estudiar la función y el entorno de la proteína. Para ello iniciamos una vía de abordaje genético con el fin de obtener una cepa hiperproductora en la cual estudiar el crosslinking de la proteína. Esta cepa sería igualmente útil en el estudio de los aspectos genético y bioquímico de la expresión de la proteína y su ensamblaje en la membrana, así como su entorno, a lo largo del ciclo celular.

Comenzamos el clonaje del gen que codifica para la proteína mediante la inserción de fragmentos de DNA de E. coli en cepas mutantes que no presentan la proteína. Para ello hemos utilizado un fago vector (λ_{540}) capaz de insertar fragmentos de hasta -15 kbp. Hemos comprobado que la cepa mutante recupera su fenotipo normal cuando tiene inserto el profago y que vuelve al fenotipo mutante cuando se desplaza el profago. Disponíamos por tanto de cinco cepas lisogénicas que tenían insertados distintos fragmentos de DNA, todas ellas conteniendo aparentemente el gen de la proteína PBP-3.

El análisis por enzimas de restricción de estos DNAs -mostró una similitud estructural para λ_{31} , λ_{32} y λ_{33} de una parte, y para λ_{34} y λ_{35} de otra. Un análisis más detallado de

λ_{32} nos mostró una inserción de DNA de E. coli de ≈ 0.4 kbp en el sitio de Hind III de λ_{540} . Para λ_{34} encontramos una región del fago, a la derecha del sitio (att) de unión al cromosoma, de difícil interpretación por este único criterio de dobles digestiones. No obstante existen varias posibilidades:

- 1.- Unión al cromosoma por el sitio att de un fago que contenía el gen estructural de la PBP-3 y sucesiva excisión - errónea, dando lugar a una zona derecha compuesta de dos regiones distintas del cromosoma unidas artificialmente.
- 2.- Unión al cromosoma del fago conteniendo el gen estructural de la PBP-3 en la región de PBP-3 del cromosoma (min. 2) por analogía estructural y sucesiva excisión ganando una parte de esa región del cromosoma.
- 3.- La posibilidad anterior, pero dando lugar a un fago defectivo ayudado por un "helper" unido en la región att del cromosoma.

De todas ellas la que nos pareció más explicada es la primera ya que el corte por Hind III nos da una región entre el 82 y el 90% del DNA de λ_{540} que podría corresponder a los puntos de corte descritos para el gen estructural de la PBP-3 por Hirota-(10).

Posteriormente llevamos a cabo un estudio fisiológico comparativo de la fijación de ^{125}I -Amp a las membranas de todos los lisógenos obtenidas de células crecidas a 30 y 42°C.

Podemos observar en la Tabla III que la PBP-3 está presente en todos los lisógenos con un comportamiento paralelo al de la estirpe donadora (58.9%, ex, 30°C y 45.0%, ex, 42°C). Aunque en el caso de JE 10730 (λ_{34}) la fijación es menor, (menor producción o pérdida de afinidad de la proteína), se mantiene la relación entre 30 y 42°C. La desaparición de la proteína al pasar a fase estacionaria es en todos los lisógenos idéntica a la estir

pe donadora, excepto en el caso de JE 10730 (λ 34) que desaparece mucho más lentamente.

Además los niveles de la proteína de células crecidas a 42°C comparados con los de 30°C son más altos en los lisógenos (Tabla II, ex).

Los datos de comparación de las PBPs 1B y 6 no pueden ser analizados con igual rigor, ya que el faltar la PBP-3 (que fija 50%) en el receptor, los porcentajes son muy diferentes. De todos modos si es significativo el porcentaje de fijación para la PBP-6 (Tabla III: 20.3% , ex, 30°C ; $34,2\%$, ex, 42°C) muy próximo al donador W3110, que incluso llega a invertir la relación PBP 3/6 (Tabla IV: 2.0 , ex, 30°C ; 0.9 , ex, 42°C) en el lisógeno JE 10730 (λ 34).

Así pues, una vez analizados todos los lisógenos nos ratificamos en las conclusiones que previamente habíamos encontrado para λ 31 y λ 35. Los fagos (con insertos de diferentes longitudes) que complementan la mutación termosensible en JE 10730, aumentan los niveles de la PBP-3 hasta niveles análogos al donador, aunque los fagos con un inserto mayor dan lugar a menor fijación en la PBP-3 en sus lisógenos crecidos a 30°C ó a 42°C . El comportamiento de otra proteína fijadora de penicilina, la PBP-6 es muy parecido al de la estirpe donadora, así pues estos fagos modifican de alguna manera la expresión de esta proteína. En cualquier caso es difícil hacer comparaciones en cuanto al mecanismo regulador de la expresión, ya que las diferencias de fijación pueden estar determinadas por disminución de la cantidad de proteína o de su afinidad por el β -lactámico. Puntos estos que no somos capaces de diferenciar.

Así pues, podemos pensar que el fragmento clonado en λ 31 puede representar un elemento supresor de la mutación termosensible $ftsI_{730}$, o bien, es un fragmento capaz de complementar dicha mutación. Esto haría que la proteína presentase el mecanismo regulador de la estirpe receptora.

Por otra parte el fragmento de λ_{35} que podría codificar para la proteína y su región reguladora, también parece presentar el mismo mecanismo regulador de la estirpe receptora.

Así pues, los fagos obtenidos a partir de λ_{540} con inserciones de distintos tamaños no contenían el gen estructural para la PBP-3. Uno de ellos contiene un fragmento muy pequeño, aunque está insertado en el sitio esperado (sitio único de corte para Hind III en λ_{540}) y el otro presenta una inserción de ≈ 8 kbp que se detecta en el extremo derecho del genoma de lambda y que ha debido producirse mediante la unión al cromosoma por el sitio att de un fago que tenía un inserto en el sitio de Hind III y sucesiva excisión errónea dando lugar a una zona derecha compuesta de dos regiones distintas del cromosoma unidas artificialmente.

La consecuencia de todo ello es que los fagos obtenidos producen la proteína y complementan la mutación termosensible por un mecanismo que no implica la presencia del gen estructural en su genoma. Por tanto, estos fagos no nos sirven como fuente del gen para la PBP-3 y por tanto nos procuramos otra fuente a partir de la cual obtener el gen estructural. Hemos purificado los fagos λ_{sep}^{+46} y λ_{sep}^{+82} a partir de sus lisógenos. El análisis por enzimas de restricción nos ratificó la presencia del gen estructural que buscamos. Además, el estudio de la fijación de β -lactámico radiactivo a las membranas de las estirpes portadoras nos mostró una amplificación de la proteína de unas 50 veces. Todos los datos acumulados hasta el momento nos indican que el mecanismo de regulación de la expresión de la PBP-3 es realmente complejo y resulta de un gran interés. Por tanto el objetivo inicial que nos planteamos en este proyecto de investigación se ha diversificado con varios nuevos aspectos. Uno de los aspectos era la consecuencia de una cepa hiperproductora con el objeto de llevar a cabo en ella los estudios de crosslinking de la PBP-3 con su entorno molecular en la membrana, y el otro es el estudio de la regulación de la expresión de esta proteína. Por lo que a los logros se refiere podemos decir que hemos encontrado la estirpe hiperproductora

(Ax655/ λ^+ , λ sep⁺82 inducida por U.V. y temperatura).

Paralelamente estamos transduciendo la mutación $ftsI_{730}$ a una estirpe (JM 83) capaz de aceptar el plásmido pUC8, que además de ser amplificable, presenta la ventaja de ser fácilmente secuenciable. Esta estirpe además de permitirnos estudiar el cross-linking de la proteína, nos facilitará el análisis de los mecanismos de regulación de la síntesis y la secuenciación de los fragmentos de DNA clonados.

Por otra parte hemos iniciado el subclonaje del gen en plásmidos que contengan distintos promotores con la intención de estudiar el mecanismo de expresión. Hemos comenzado con un plásmido que contiene el promotor del operon lactosa y que presenta la ventaja de la fácil identificación de los transformantes por análisis del color de las colonias (ver punto 11). La elección de este promotor viene sugerida por su conocida potencia para unir la RNA polimerasa y su regulación por cAMP; y la utilización de un plásmido con el replicón ColEI por ser fácilmente amplificable.

Dado que la secuencia de nucleótidos para el gen estructural de la proteína es conocida, hemos realizado el análisis de los posibles cortes con enzimas de restricción que nos dieran lugar a un fragmento que contuviese el gen estructural sin su región reguladora, mediante un programa de computador con 83 enzimas de restricción. Encontramos dos posibles fragmentos BclI-EcoRI de aproximadamente 5500 b.p. y HgiAI-HgiAI de 2287 b.p., ambos contienen el gen estructural y no presentan el promotor que parece estar situado en el fragmento XmaI-BclI de 248 b.p. Hemos realizado el clonaje de estos fragmentos, además del XmaI-EcoRI, en el plásmido pUC9 que contiene el promotor del gen LacZ. Estos transformantes nos permitirán estudiar la expresión de la proteína utilizando un promotor diferente del suyo propio y su mecanismo de inserción en membrana.

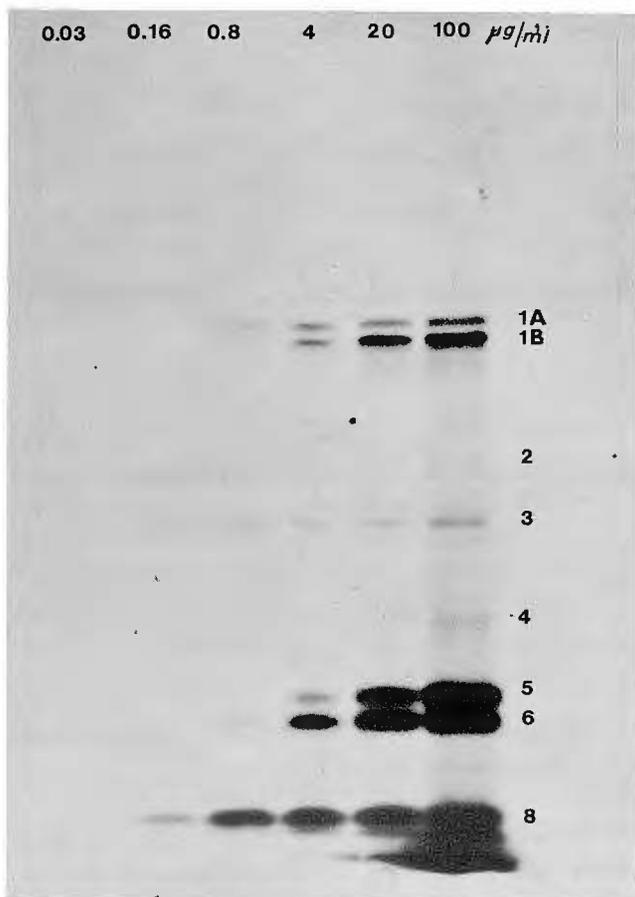


Figura 1.- Fijación del antibiótico VA13 a membrana de E. Coli - W-7 (1).

Se incubaron 1.700 μg de membranas con diferentes concentraciones del antibiótico, durante 10 minutos a 37°C. Se paró la reacción por adición de un exceso de Ampicilina, se añadió Sarkosyl 1% (final). Se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 rpm, 20 minutos. Al sobrenadante se añadió SDS 2% (final). Se hirvió (100°C) durante 3 minutos y se aplicó en gel de acrilamida al 8%. El gel secado se expuso contra un film para autoradiografía. La figura muestra una fotografía de la película. Las concentraciones de antibiótico utilizadas fueron 100, 20, 4, 0.8, 0.16 y 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

λ_{540} λ (srI λ 1-2), shn λ 3⁺, att⁺, imm 21, ninR, shn λ 6°

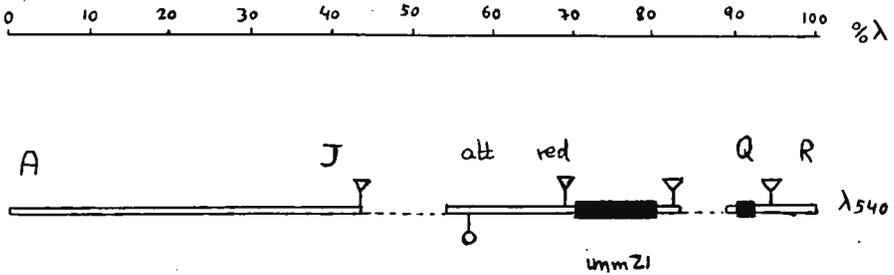


Figura 2.- Representación esquemática del bacteriophago λ_{540} utilizado para el clonaje.

Este bacteriophago construido in vitro (6) presenta una delección entre las dianas 1 y 2 para el enzima Eco RI, tiene la inmunidad 21, tiene delectada la región de nin. y han sido anuladas todas las dianas para el enzima Hind III excepto la número 3. Presenta además el sitio de fijación normal al cromosoma de E. coli. La delección total supone un 21% del total de λ salvaje y por tanto es capaz de insertar fragmentos de hasta 15 kbp.

○ Diana Hind III

△ Diana Eco RI

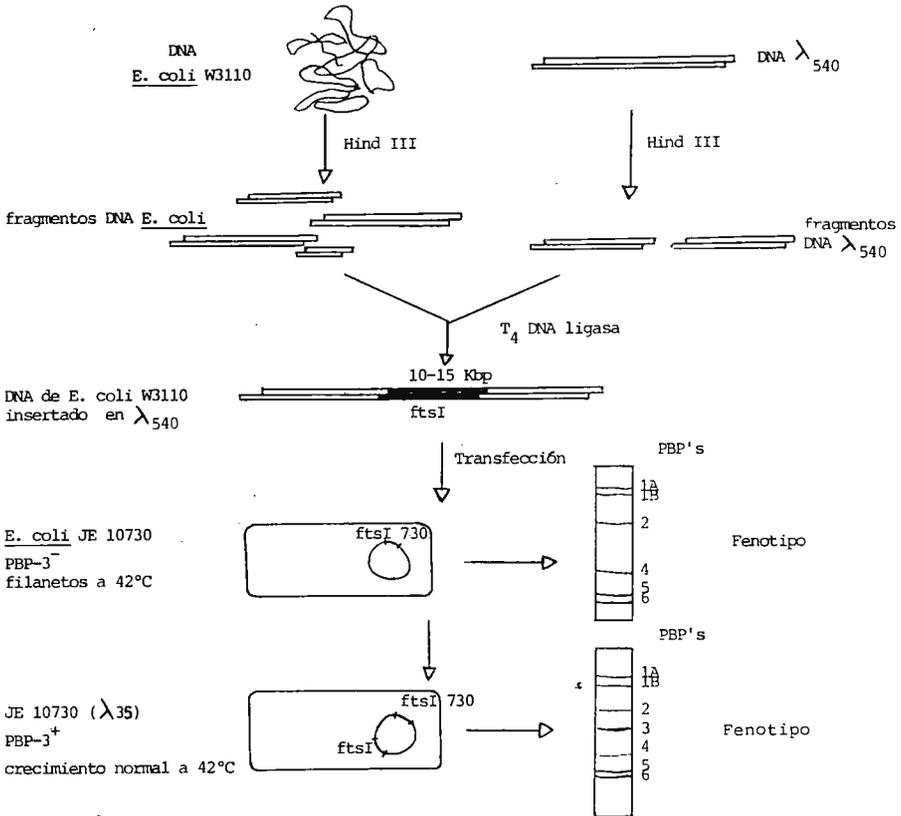


Figura 3.- Esquema general utilizado para el clonaje de fragmentos de DNA, conteniendo el gen de la PBP-3.

Los fragmentos de DNA de *E. coli* W3110 previamente cortados con el enzima de restricción Hind III se ligan a los dos brazos de λ_{540} obtenidos por corte con el mismo enzima.

El fago así obtenido se utiliza para transfectar el mutante para la proteína PBP-3 (JE 10730) y de este modo se recupera el fenotipo normal al expresarse el alelo *ftsI* salvaje introducido en el genoma como profago.

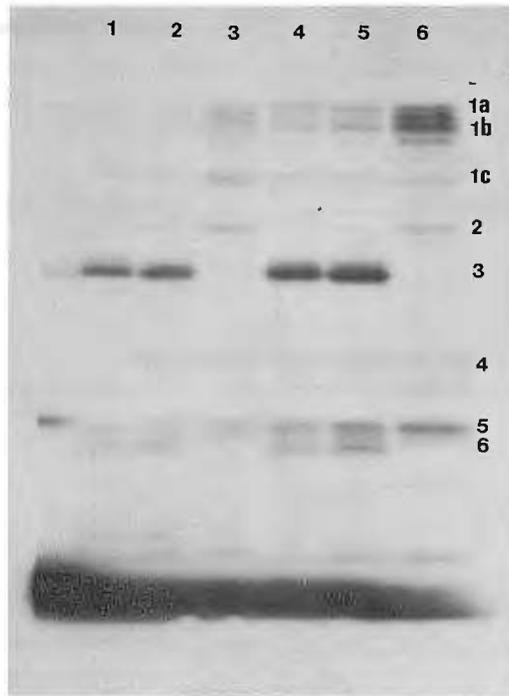


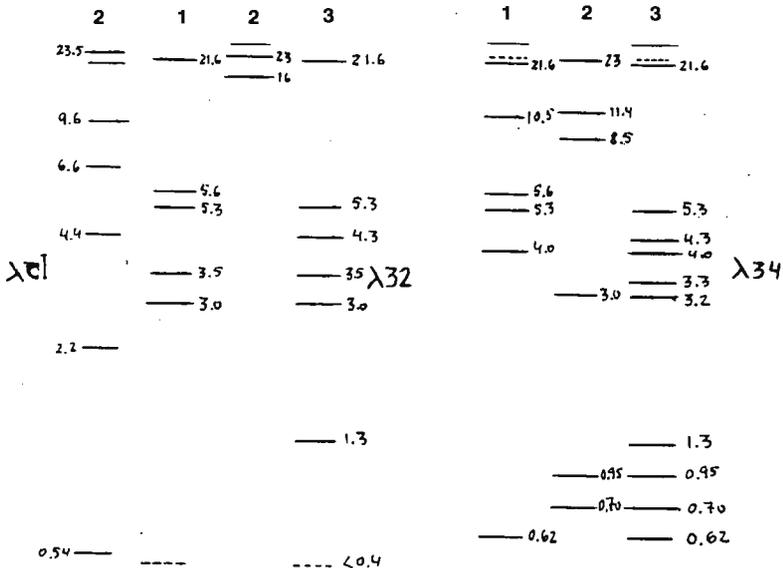
Figura 4.- Fijación de ^{125}I -Amp a las membranas obtenidas de las estirpes JE 10730, JE 10730 (λ 31) y JE 10730 (λ 35).

Las membranas (1700 μg) se incubaron en presencia de ^{125}I -Amp (10 μCi) durante 10 min. a 30°C o 42°C. La reacción se paró por adición de 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ampicilina y 1% Sarkosyl. Se incubaron 30 min. a temperatura ambiente, se centrifugaron 20 min. a 13.000 rpm. El sobrenadante se hirvió 5 min. en presencia de 1% SDS. Se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 8%. La foto muestra el patrón de bandas obtenido en una autoradiografía del gel.

1 y 4.- JE 10730 (λ 31) a 30°C y 42°C; 2 y 5.- JE 10730 (λ 35) a 30°C y 42°C; 3 y 6.- JE 10730 a 30°C y 42°C.

Figura 6.-

Patrón de bandas de restricción de los DNA obtenidos de los distintos fagos



El DNA (2-3 µg) purificado como se describió en el apartado sexto, se incubó durante 2 horas a 37°C con 5 Unidades de las diferentes enzimas.

La reacción se paró por adición de EDTA 20 mM y calentamiento a 65°C durante 5 min. Se aplicó en gel de agarosa al 0,8% y se corrió a 45 V. durante 16 h. El gel teñido con Bromuro de Ethidio se fotografió con luz U.V. El gráfico muestra el patrón de bandas obtenido.

- 1.- EcoRI
- 2.- Hind III
- 3.- EcoRI + Hind III

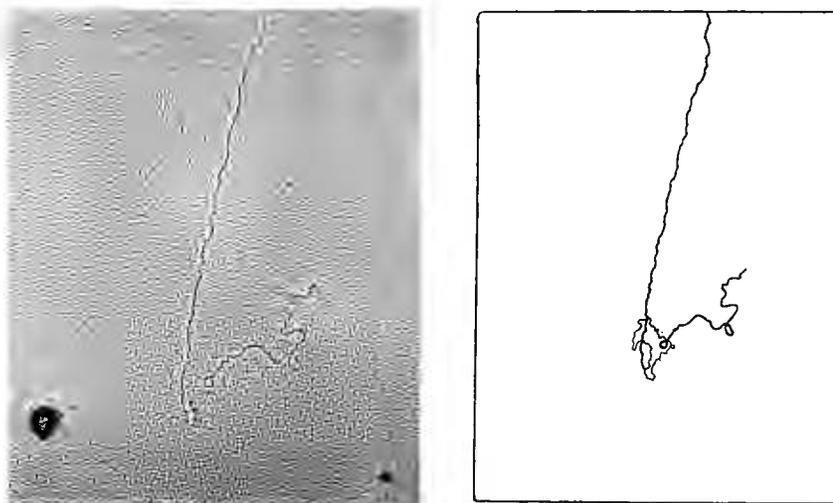


Figura 7.- Micrografía electrónica de una molécula heteroduplex de DNA de λ_{31} y λ_{cI} .

El DNA de λ_{31} y λ_{cI} se desnaturizó con NaOH 0.1 M, EDTA 0.02 M, durante 10 min a 27°C. Se renaturalizó durante 2 h. a 27°C. en presencia de 50% formamida.

El DNA se extendió en rejillas por la técnica de Kleinschmidt (8), se tiñó con acetato de uranilo y se sombreó con Platino. El gráfico muestra una reproducción de la fotografía. Detalles en el texto.

Tabla 1.- Capacidad de fijación de ^{125}I -Amp a las membranas de diferentes estirpes de E. coli K12.

PBP	Porcentaje del total de fijación									
	Estirpe	MC6 37°C	KNI26 37°C	AB1157 37°C	W3110 30°C	W3110 42°C	JEL0730 30°C	JEL0730 30°C	JEL0730 42°C	JEL0730 42°C
1A		9.5	6.1	5.0	6.3	4.8	19.5	11.5	11.5	11.5
1B		6.6	4.6	3.3	3.3	3.3	18.5	11.3	11.3	11.3
1C		3.4	4.0	3.9	2.2	1.6	16.0	9.2	9.2	9.2
2		3.9	2.0	3.0	2.2	1.5	--	11.5	11.5	11.5
3		41.8	47.6	47.9	58.9	45.0	--	--	--	--
4		1.9	1.4	2.0	2.0	2.4	7.0	7.0	7.0	7.0
5		6.7	4.8	8.4	5.3	6.6	20.3	28.1	28.1	28.1
6		26.2	29.5	26.4	19.9	35.0	18.7	21.3	21.3	21.3

Las membranas (1700 μg) se incubaron en presencia de ^{125}I -Amp (10 μCi) durante 10 min. a 37°C. La reacción se paró por adición de 120 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina y 1% Sarkosyl. Se incubaron 30 min. a temperatura ambiente, se centrifugaron 20 min. a 13000 rpm. El sobrenadante se hirvió 5 min. en presencia de 1% SDS. Las proteínas fueron separadas en PAGE al 8%. El gel seco se expuso para autoradiografía. Las bandas obtenidas fueron analizadas por microdensitometría del film.

Tabla 2.- Porcentaje de fijación de 125 I-Amp a la PBP 3 de E.coli en diferentes estados de crecimiento.

<u>Estirpe</u>	<u>T (°C)</u>	<u>ex</u>	<u>12</u>	<u>21</u>	<u>36</u>
W 3110	30	100	75	53	32
	42	68	0	0	0
JE 10730	30	--	-	-	--
	42	--	--	--	--
JE 10730	30	100	70	50	37
λ 32	42	106	0	0	0
JE 10730	30	100	99	73	55
λ 34	42	92	0	0	0
MC 6	37	100	18	3	0

Los datos son el porcentaje de fijación respecto al de la proteína de células creciendo exponencialmente a 30°C . (ex): Fase exponencial, (12),(21),(36): 12, 21 y 36 horas en fase estacionaria.

Tabla 3.- Porcentaje de fijación de ^{125}I -Amp a las PBPs 1B, 3 y 6 de E.coli en diferentes estados del crecimiento.

PBP	1B		3		6	
	30°C	42°C	30°C	42°C	30°C	42°C
Estirpe	12	36	12	36	12	36
	ex	ex	ex	ex	ex	ex
W 3110	3.3	4.3	6.5	8.2	3.3	58.9
			58.9	48.7	37.7	45.0
			19.9	18.5	19.1	22.3
						35.0
JE10730	18.5	23.0	19.2	15.3	11.3	--
			--	--	--	18.7
						21.1
						23.3
						27.4
						21.3
JE10730	4.4	7.8	13.7	17.7	4.3	55.3
λ_{32}			51.8	37.7	25.5	45.3
			10.9	10.3	10.5	6.3
						19.5
JE10730	7.9	12.8	14.5	17.1	6.2	40.5
λ_{34}			35.2	35.0	26.2	32.2
			20.3	20.8	21.2	21.8
						34.2

Los datos son el porcentaje de la fijación total de ^{125}I -Amp en diferentes estados del crecimiento. (ex): Fase exponencial. (12), (21), (36): 12, 21 y 36 horas en fase estacionaria.

Tabla 4.- Relación de fijación de ¹²⁵I-Åmp entre diferentes PBPs en distintos estados del crecimiento de E.coli.

	PBPs		3/LB		3/6		6/LB								
	ex	12	21	36	30°C	42°C	30°C	42°C							
Estirpe															
	ex	12	21	36	ex	12	21	36							
W 3110	17.8	13.7	7.5	4.6	13.6	3.0	3.2	2.5	1.7	1.3	6.0	4.3	2.9	2.7	10.6
JE10730	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1.0	0.9	1.2	1.8	1.9
JE10730 λ ₃₂	12.6	6.6	2.8	1.4	10.5	5.1	5.0	3.6	4.0	2.3	2.5	1.3	0.8	0.4	4.5
JE10730 λ ₃₄	5.1	2.8	2.4	1.5	5.2	2.0	1.7	1.7	1.2	0.9	2.6	1.6	1.5	1.3	5.5

Los datos son la relación entre la fijación de ¹²⁵I-Åmp de cada PBP indicada en diferentes estados del crecimiento. (ex): Fase exponencial. (12), (21), (36): 12, 21 y 36 horas en fase estacionaria.

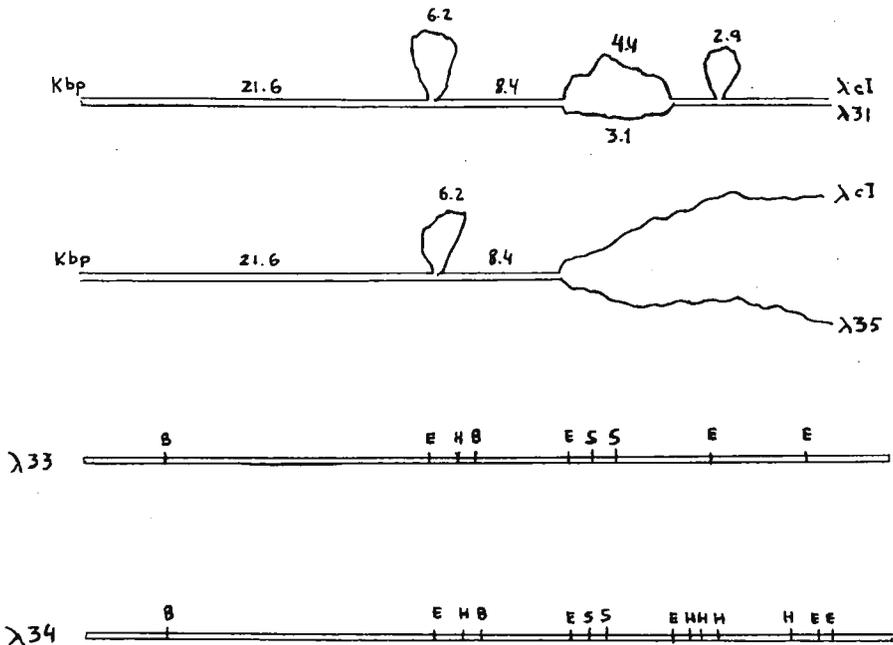


Figura 8.- Esquema representativo de los heteroduplex obtenidos - entre λ 31, λ 35 y λ CI y carta de restricción de λ 33 y λ 34 para cuatro diferentes enzimas de restricción.

El DNA se desnaturalizó con NaOH 1M durante 30 min. a temperatura ambiente y se dejó renaturalizar durante 3 horas a 30°C en presencia de 60% formamida. El DNA se extendió en rejillas de microscopía electrónica mediante la técnica de Davis (7) con ligeras modificaciones. El esquema muestra una representación de las moléculas híbridas obtenidas formadas por una cadena de DNA de un fago y la complementaria del otro.

En la carta de restricción las letras indican sitios de corte por los siguientes enzimas:

H.- Hind III; E.- Eco RI; B.- Bam HI; S. Sal I.

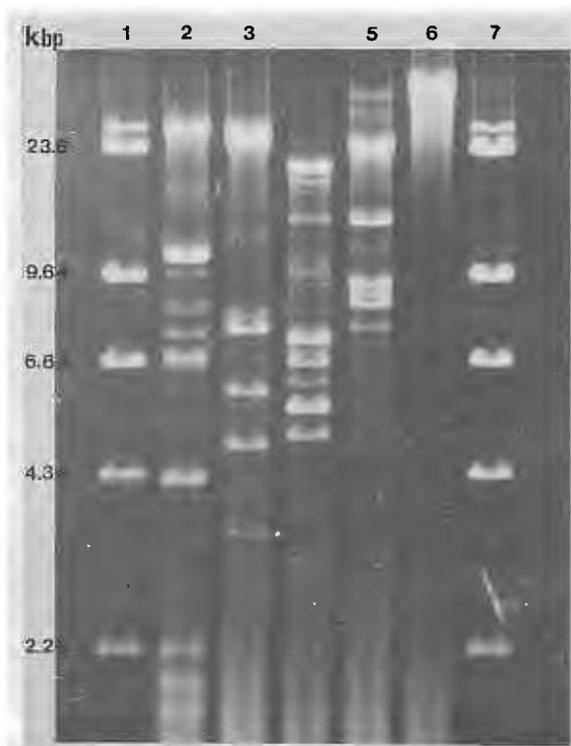


Figura 9.- Patrón electroforético de bandas de restricción para el DNA de λ_{sep}^{+82} .

El profago presente en la estirpe Ax655 se indujo secuencialmente mediante irradiación U.V. durante 90 s. y mantenimiento durante 30 min. a 42°C. Los fagos se purificaron mediante precipitación con PEG 6000 y centrifugación en gradiente de Cloruro de Cesio. El DNA purificado mediante extracción fenólica y precipitación con Etanol, se cortó con distintos enzimas de restricción y se corrió en gel de agarosa al 0,6%. El gel teñido con -Bromuro de Ethidio se fotografió bajo luz ultravioleta. La figura muestra la foto del gel: carriles 1,7: patrones de peso molecular; carril 2: Hind III; carril 3: Eco RI; carril 4: BamHI; carril 5: Sal I y carril 6; DNA sin cortar.

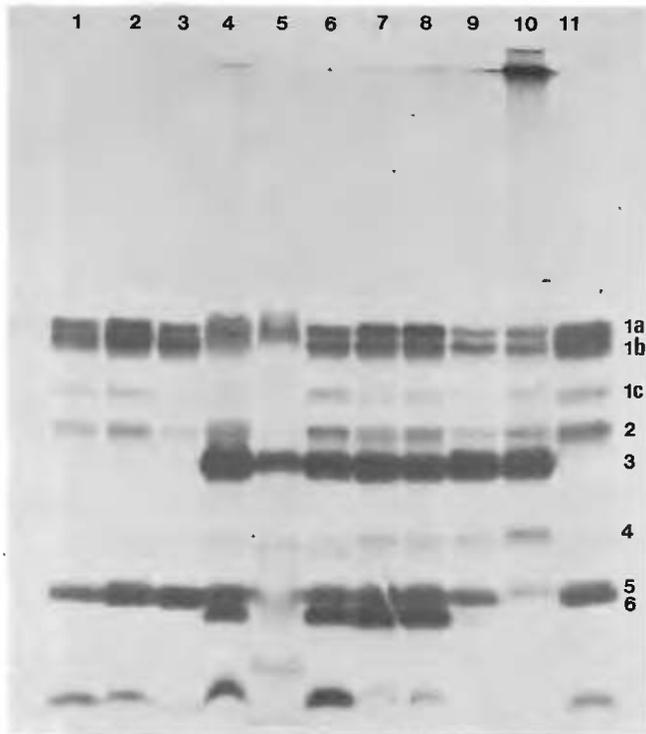


Figura 10.- Fijación de ^{125}I -Amp a las membranas de las estirpes Ax655/ λ^+ ; Ax655/ λ^+ , $\lambda_{\text{sep}}^{+46}$ y Ax655/ λ^+ , $\lambda_{\text{sep}}^{+82}$.

Las membranas se obtuvieron por sonicación de células creciendo exponencialmente a 30°C y 42°C. La fijación se realizó durante 10 min. a 37°C y las proteínas de la membrana interna se extrajeron con Sarkosyl 1%. Se corrieron en PAGE al 8%. El gel seco se sometió a autoradiografía. El esquema muestra una fotografía del film. Los carriles corresponden a las membranas obtenidas: 1,2,6 y 11.- 30°C; 3 y 7.- 42°C; 4 y 8.- 30°C y pasadas a 42°C durante varias generaciones; 5 y 9.- por inducción del profago; 10.- por inducción del profago y purificación en gradiente de Cloruro de Cesio. Carriles 1 y 11: Ax655/ λ^+ ; 2,3, 4 y 5: Ax655/ λ^+ , $\lambda_{\text{sep}}^{+46}$; 6,7,8,9 y 10: Ax655/ λ^+ , $\lambda_{\text{sep}}^{+82}$.

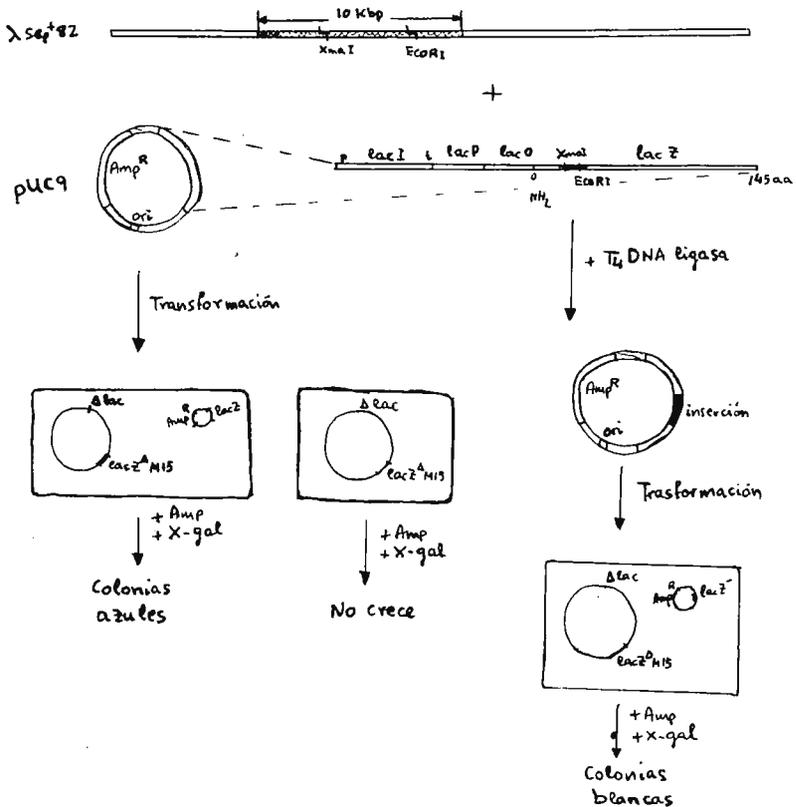


Figura 11.- Esquema del método de subclonaje para el gen estructural de la PBP-3.

REFERENCIAS

- 1.- A. Rodríguez Tebar, V. Arán y D. Vázquez.
The Target of Penicillin (R. Hakenbeck, J.V. Holtje and H. Labischinski, Ed.) Walter de Gruyter, Berlín (1983) p.433-438.
- 2.- B.G. Spratt, (1977) Eur. J. Biochem., 72, 341-352.
- 3.- B.G. Spratt, (1975) Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 2999-3003.
- 4.- K. Murray and N.E. Murray, (1975) J. Molec. Biol., 98, 551-564.
- 5.- M. Vicente, A.G. de la Campa y E. Martínez-Salas.
II Congreso Luso-Español de Bioquímica. Barcelona 1983. Libro de Resúmenes, Pag. 164. Comunicación 601.
- 6.- H. Suzuki, Y. Nishimura and Y. Hirota, (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 664-668.
- 7.- R.W. Davis, M. Simon and N. Davidson, (1971) Methods in Enzymology (L. Grossman and K. Moldave, eds.) Vol. XXI, pg.413 Academic Press, New York.
- 8.- A.K. Kleinschmidt, (1968) Methods in Enzymology (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds.) Vol XII B, pg. 125 Academic Press, New York.
- 9.- G. Fletcher, C.A. Irwin, J.M. Henson, C. Filligim, M.A. Malone and J.R. Walker, (1978) J. Bacteriology, 133, (1),91-100
- 10.- Y. Takeda, A. Nishimura, Y. Nishimura, M. Yamada.
S. Yasuda, H. Suzuki and Y. Hirota. (1981). Plasmid, 6,86-98
- 11.- J.A. Ayala, M.A. de Pedro y D. Vázquez.
The Target of Penicillin. (R. Hakenbeck, J.V. Holtje and H. Labischinski, Ed.) Walter de Gruyter, Berlín (1983) p. 475-480.
- 12.- B.G. Spratt, A. Boyd and N. Stoker, J. Bacteriology 143(2)569-581.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- | | | | |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 | Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua. | 28 | Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real. |
| 4 | Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados. | 29 | Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias. |
| 5 | Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura. | 30 | Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas. |
| 7 | Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental. | 39 | Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. |
| 8 | Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos. | 44 | Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae. |
| 11 | Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular. | 45 | Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual. |
| 19 | Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética. | 47 | García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular. |
| 20 | Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos. | 48 | García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina. |
| 22 | Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información. | 49 | Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados. |
| 25 | I Semana de Biología:
Neurobiología. | 50 | Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados. |
| 26 | I Semana de Biología:
Genética. | 51 | Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora. |
| 27 | I Semana de Biología:
Genética. | | |

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Alfonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de $T\lambda$ en el $4He$ líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.^a D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkensteller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Galián Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.^a:
Detección precoz del hiporitoidismo congénito.

- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótopa.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J., A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleóticos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del cailleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoragoneses.
- 150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna.
- 151 González López, J.:
La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.
- 152 Calle García, C.:
Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.
- 154 Alberdi Alonso, M.^a T.:
Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).
- 156 Gella Tomás, F. J.:
Estudio de la fosforilasa quinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.
- 157 Margalef Mir, R.:
Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.
- 158 Álvarez Fernández-Represa, J.:
Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.
- 161 Tomás Ferré, J. M.^a:
Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.
- 163 Ferrándiz Leal, J. M.:
Estudio analítico del movimiento de rotación lunar.

- 164 Rubió Lois, M.; Uriz Lespe, M.^a J., y Bibiloni Rotger, M.^a A.:
Contribución a la fauna de esponjas del litoral catalán. Esponjas córneas.
- 165 Velasco Rodríguez, V. R.:
Propiedades dinámicas y termodinámicas de superficies de sólidos.
- 166 Moreno Castillo, I.:
Ciclo anual de zooplancton costero de Gijón.
- 168 Durán García, S.:
Receptores insulínicos en hipotálamo de rata: localización subcelular y mecanismo(s) de regulación.
- 169 Martínez Pardo, R.:
Estudio del mecanismo secretor de hormona juvenil en oncopeltus fasciatus.
- 171 García Jiménez, J.:
Fusariosis del gladiolo: un estudio preliminar.
- 173 Fernández Aláez, C.:
Análisis estructural en sabinares de la provincia de León.
- 174 Furio Egea, J.:
Citokinas en agrrios. Actividades endógenas, efectos fisiológicos y aplicaciones.
- 180 Moreno Rodríguez, J. M.:
Estudios ecológicos en jarales (cistus laurofolii): Variación anual de algunos factores del entorno y manifestaciones fenológicas.
- 182 Pons Vallés, M.:
Estudios espectroscópicos de fosfolípidos polimerizables.
- 183 Herrero Ruiz de Loizaga, V. J.:
Estudio de reacciones químicas por haces moleculares. Aplicación a la reacción $C_2H_5Br + K \quad Brk + C_2H_6$.
- 193 Martín García, V. S.:
Utilización sintética en química orgánica de metales pesados como catalizadores. Oxidación asimétrica.
- 195 Badía Sancho, A.:
Receptores presinápticos en el conducto deferente de rata.
- 196 Estévez Toranzo, A.:
Supervivencia de patógenos bacterianos y virales de peces en sistemas de cultivo.
- 197 Lizarbe Iracheta, M.^a A.:
Caracterización molecular de las estructuras de colágeno.
- 203 López Calderón, I.:
Clonación de genes de «Saccharomyces cerevisiae» implicados en la reparación y la recombinación.

