

## Tesis de Posgrado

# Estudio de mutantes de envoltura en *Salmonella Typhimurium*

De Micheli, Ana Teresa

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

De Micheli, Ana Teresa. (1983). Estudio de mutantes de envoltura en *Salmonella Typhimurium*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1767\\_DeMicheli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1767_DeMicheli.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

De Micheli, Ana Teresa. "Estudio de mutantes de envoltura en *Salmonella Typhimurium*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1767\\_DeMicheli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1767_DeMicheli.pdf)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIO DE MUTANTES DE ENVOLTURA EN SALMONELLA TYPHIMURIUM

Lic. Ana Teresa De Micheli

DIRECTOR: Dra. Dora N. Antón

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1983

A mis padres y hermanos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento

a la Dra. Dora N. Antón, por la dedicación brindada a mi formación profesional, su apoyo y permanente orientación

al Dr. Luis V. Orce, por haber puesto a mi entera disposición las instalaciones del Dpto. de Radiobiología

a todos los compañeros de la Div. de Radiomicrobiología por la camaradería y amistad con que me rodearon, y muy especialmente a M. Elena Bertuzzi, Lidia Ghiotti y Felisa M. de Dursi, por la invaluable colaboración prestada.

## I N D I C E

	PAG.
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	
1. Cepas y Bacteriófagos.	8
2. Medios y Drogas.	8
3. Transducciones y Conjugaciones.	12
4. Obtención de mutantes.	12
5. Autólisis.	13
6. Pruebas de Sensibilidad.	13
7. Shock osmótico.	14
8. Ensayos enzimáticos.	15
9. Recuento de células totales.	16
10. Síntesis de ADN y de proteínas.	16
11. Detección de las proteínas captadoras de penicilina	17
CAPITULO III. RESULTADOS	
1. Análisis de la termosensibilidad de DA138.	21
1.1. Mapeo de la mutación responsable de esa alteración.	21
1.2. Propiedades de un transductante <u>fts-131</u> .	22
1.3. Comportamiento de una cepa <u>fts-131</u> a 42°C.	24

1.4.	Recuperación de la división celular por disminución de la temperatura. Efecto de distintos antibióticos.	27
1.5.	Recuperación de la división celular por aumento de la presión osmótica del medio. Efecto de distintos antibióticos.	32
1.6.	Comportamiento de una cepa <u>fts-131</u> frente al shock osmótico.	35
2.	Análisis de la alteración morfológica de DA138, DA139 y DA140.	37
2.1.	Mapeo de la mutación responsable de esa alteración.	37
2.2.	Estudio de las proteínas captadoras de penicilina (PBPs) en una cepa <u>rod-1</u> .	43
2.3.	Propiedades de una cepa <u>rod-1</u>	43
2.4.	Comportamiento de una cepa <u>rod-1</u> frente al shock osmótico.	45
3.	Efecto de <u>fts-131</u> y <u>rod-1</u> sobre las manifestaciones de la desrepresión del operón histidina.	49
3.1.	Efecto de <u>fts-131</u> y <u>rod-1</u> sobre la inhibición de la división celular en cepas constitutivas.	49
3.2.	Efecto de <u>fts-131</u> sobre la falta de viabi-	

lidad de las cepas hipersensibles.

CAPITULO IV. DISCUSION

CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA

## C A P I T U L O I

### I N T R O D U C C I O N

La envoltura celular de las bacterias gram-negativas es una estructura muy compleja que protege a la célula de daños físicos y químicos y que, además, está involucrada en diversos procesos fisiológicos tales como la incorporación de nutrientes, la excreción de los productos del metabolismo celular, la producción de compuestos ricos en energía, la síntesis de algunos de sus propios constituyentes y la división celular.

La mayor parte de los conocimientos que se tienen sobre la organización y el funcionamiento de este tipo de envoltura ha sido adquirida en las últimas dos décadas gracias al aporte de varias disciplinas científicas y al empleo de mutantes alterados en alguna de las muchas funciones controladas por ella.

A grandes rasgos, la envoltura celular está formada por tres capas superpuestas y estrechamente asociadas que difieren en su composición química y propiedades; la capa interna es la membrana citoplasmática, le sigue una capa rígida y en último término se encuentra la membrana externa.

Al igual que otras membranas biológicas conocidas en procariontes y eucariontes, la membrana interna está formada por una bicapa de fosfolípidos y proteínas (Ames, 1968; Schnaitman, 1970) y su estructura se ajusta al modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson (1972). Los lípidos están orientados con sus grupos no polares dirigidos hacia el interior de la bicapa



y con sus zonas hidrofílicas hacia el exterior en tanto que las proteínas están insertadas en la bicapa atravesándola o bien localizándose en una de las dos caras de la misma.

Las proteínas que componen esta membrana presentan una gran diversidad (Osborn y col., 1972 a) y muchas de ellas tienen propiedades específicas que son vitales para el metabolismo celular. Algunas están involucradas en la producción de compuestos ricos en energía porque participan en el ciclo del ácido tricarboxílico o en la cadena de la fosforilación oxidativa (Osborn y col., 1972 a). Otras tienen función enzimática y catalizan la síntesis de constituyentes de las otras capas de la envoltura tales como los fosfolípidos, lipopolisacáridos, monómeros de mureína y la lipoproteína de Braun (White y col., 1971; Bell y col., 1971; Osborn y col., 1972 b; Ghuyssen y Shockman, 1973; Kanazawa y Wu, 1979). Se han identificado, además, por lo menos siete proteínas capaces de captar específicamente penicilina y que, en su mayoría, tienen actividades enzimáticas para el ensamblaje de los monómeros de mureína in vitro; estas proteínas han sido denominadas PBPs y podrían estar relacionadas con la síntesis de mureína in vivo (Iwaya y Strominger, 1977; Matsushashi y col., 1979; Nishimura y col., 1980; Ishino y col., 1980; Ishino y Matsushashi, 1981; Nakagawa y Matsushashi, 1982).

También en esta membrana se encuentran las distintas proteínas que integran los sistemas de transporte activo (permeasas y proteínas transportadoras) y por lo menos uno de los componentes proteicos del sistema de fosfotransferasas descrito por Kundig y colaboradores (1964), los cuales permiten la incorporación de nutrientes a la célula y controlan el mantenimiento de la presión osmótica y el equilibrio ácido-base intracelular (Kaback, 1972; Kundig y Rose-

man, 1971).

El segundo componente de la envoltura, la capa rígida, está constituida por una enorme macromolécula de trama muy abierta formada por largas cadenas de hidratos de carbono entrecruzadas por cortos puentes peptídicos y denominada mureína. Esta capa, que parece ser uno de los principales determinantes de la forma celular (Weidel y Pelzer, 1964), proporciona a la célula la estabilidad osmótica que la caracteriza porque impide que variaciones en la osmolaridad del medio produzcan cambios en el volumen celular incompatibles con la limitada elasticidad de la membrana interna.

La mureína lleva unidas covalentemente moléculas de una lipoproteína (lipoproteína de Braun) que se proyectan hacia el exterior y sumergen su extremo lipídico en la zona no polar de la tercer capa de la envoltura (Inouye, 1974). Por medio de esta asociación, la capa rígida no sólo actúa como soporte de la membrana externa sino que además contribuye a su normal funcionamiento (Yem y Wu, 1978; Fung y col., 1978).

La membrana externa es también una bicapa lipoproteica, pero se diferencia de la membrana interna por el limitado número de proteínas que la componen (Lugtenberg y col., 1975), porque prácticamente ninguna de ellas tiene actividad enzimática (Osborn y col., 1972 a) y por la presencia de una gran cantidad de moléculas de lipopolisacárido (Smit y col., 1975). Este último compuesto está formado por un lípido complejo que se encuentra embebido en la zona no polar de la membrana y por cadenas cortas de hidratos de carbono; las cadenas hidrocarbonadas se proyectan hacia el exterior cubriendo gran parte de la superficie bacteriana y participan directamente en conferirle a la cé-

lula su serotipo y antigenicidad (Schmidt y col., 1976).

La membrana externa constituye una importante barrera para el pasaje de solutos ya que sólo permite el paso de moléculas de peso molecular inferior a 900 daltons (Nakae y Nikaido, 1975) los cuales difunden a través de poros formados fundamentalmente por proteínas (Lutkenhaus, 1977; van Alphen y col., 1978). Aunque las moléculas más pesadas no pueden atravesar esta capa, existen ciertos compuestos de elevado peso molecular necesarios para el metabolismo celular (vitamina B12 y complejos férricos) que son captados por algunas de las proteínas que integran esta membrana y posteriormente translocados hacia el interior (Konisky, 1979).

Esta membrana está, además, involucrada en el mantenimiento del contacto célula-célula durante el proceso de reproducción sexual (conjugación) (Manning y Reeves, 1976; Manning y Achtman, 1979; Sanderson y col., 1981), lleva los receptores para bacteriófagos y colicinas (Picken y Beachman, 1977, Konisky, 1979), participa en la adherencia bacteriana a otras células y a partículas del medio (Duguid y col., 1966) y lleva los flagelos cuyo movimiento rotacional produce el desplazamiento celular (Berg y Anderson, 1973; Brown y Berg, 1974; Coulton y Murray, 1978).

La membrana externa está unida a la membrana interna en aproximadamente 200 puntos denominados sitios de adhesión que parecen ser los lugares por los cuales se produce la translocación de los componentes de la envoltura sintetizados en la membrana interna y por donde pasa el ADN de los bacteriófagos (Bayer, 1979).

Entre ambas membranas queda delimitado un espacio (periplasma) cuyo

volumen relativo varía en función de la presión osmótica del medio externo (Stock y col., 1977). En este espacio se acumulan diversas proteínas captadoras de metabolitos y gran cantidad de enzimas hidrolíticas (Neu y Heppel, 1965; Rosen y Heppel, 1973) las cuales son sintetizadas en los ribosomas próximos a la membrana citoplasmática y secretadas al periplasma (Piovant y col., 1978).

A lo largo del ciclo celular la bacteria aumenta de tamaño y la envoltura crece en forma coordinada debido a la incorporación de nuevo material a las tres capas que la componen; para algunos autores, la inserción de los nuevos elementos se produce en forma difusa sobre toda la superficie, mientras que para otros, aquella ocurre en una zona definida de la bacteria (Cole, 1965; Lin y col., 1971; Begg y Donachie, 1977).

Dado que el cromosoma bacteriano está unido a la envoltura a través de varios puntos (Rosemberg y Cavalieri, 1968), se ha postulado que el crecimiento de la cubierta facilita la separación de las cromátidas hermanas a medida que éstas se sintetizan garantizando así la distribución equitativa del material genético entre las células hijas resultantes de la división celular (Ryter y col., 1968).

Una vez que la célula ha alcanzado un volumen determinado, que se ha completado la duplicación del cromosoma y que se ha acumulado una proteína aún no identificada, se desencadena el proceso de división celular (Smith y Pardee, 1970; Dix y Helmstetter, 1973; Jones y Donachie, 1973). El tabique comienza a formarse en la zona ecuatorial con la invaginación de la membrana citoplasmática y el crecimiento de una doble capa de mureína (Burdett y Mu-

rray, 1974); cuando el septo se ha completado y ambas células comienzan a separarse, presumiblemente por la acción de hidrolasas que separan la doble capa de mureína (Wolf-Watz y Normark, 1976), la membrana externa se incorpora al tabique recién formado y las células hijas se independizan (Burdett y Murray, 1974).

Al comienzo de esta Introducción se ha mencionado la utilidad que han tenido los mutantes de envoltura en las investigaciones tendientes a dilucidar la composición y funcionamiento de esa estructura celular. La obtención de ese tipo de mutantes, muchos de los cuales son de tipo condicional debido al carácter vital de las funciones que tienen alteradas, se ha basado en métodos tan variados como la resistencia a antibióticos (Matsubishi y col., 1974; Kamiryo y Strominger, 1974) o a detergentes (Clark y Beard, 1979), la dependencia de sacarosa (Mangiarotti y col., 1966), la tolerancia a glicina (Wijsman y Pafort, 1974), el aumento en la permeabilidad a azúcares (Lazdunski y Shapiro, 1972), el incremento en la liberación de enzimas periplásmicas (Weigand y Rothfield, 1976) y el crecimiento termosensible (van de Putte y col., 1964; Hirota y col., 1968).

En Salmonella typhimurium se ha descrito un método efectivo para la selección de mutantes de envoltura basado en la hipersensibilidad que ciertas cepas presentan frente a altos niveles de desrepresión del operón histidina (Antón, 1979). La desrepresión de ese operón produce la inhibición de la división celular a 37°C en medios con 2% de azúcar fermentable. Murray y Hartman (1972) han demostrado que ese efecto se debe al exceso de dos de las proteínas codificadas por ese operón (hisH e hisF) y han sugerido que esas pro-

teínas podrían interactuar con la envoltura produciendo la inhibición de la división celular.

Entre las diversas mutaciones que producen la expresión constitutiva del operón histidina se encuentra la mutación de operador hisO1242 cuya presencia determina niveles muy altos de desrepresión (aproximadamente 15 veces mayor que el de las cepas reprimidas). Este elevado nivel de síntesis de las proteínas hisH e hisF no afecta la viabilidad de la mayor parte de las cepas, pero sí la de tres cepas denominadas hipersensibles en las que la introducción de la mutación hisO1242 produce una drástica disminución en la sobrevivencia (Savic, 1972; Ely y col., 1974; Antón, 1979).

A pesar de ello, Antón (1979) logró obtener 41 derivados viables reaislando repetidas veces los transductantes hisO1242 de una de esas cepas hipersensibles (DA78). En muchos de esos derivados se detectaron alteraciones de envoltura entre las que cabe mencionar el aumento en la sensibilidad a antibióticos, detergentes y colorantes, la modificación de la forma celular, el incremento en el nivel autolítico, anomalías en la fermentación de ciertos azúcares y el crecimiento termosensible.

Este trabajo se realizó con el propósito de estudiar dos alteraciones de envoltura detectadas en una familia de tres cepas provenientes del mismo transductante hisO1242 de DA78. Ambas alteraciones fueron estudiadas en sus aspectos genéticos y fisiológicos y se investigaron sus efectos sobre la inhibición de la división celular causada por el exceso de las proteínas hisH e hisF y sobre la letalidad que esas mismas proteínas producen en las cepas hipersensibles.

## C A P I T U L O    I I

### M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S

#### 1. Cepas y Bacteriófagos.

Todas las cepas de Salmonella typhimurium usadas en este trabajo derivan de la cepa LT2; sus orígenes y características principales se detallan en la Tabla I; la ubicación de los marcadores genéticos mencionados se muestra en la Fig. 1. Los bacteriófagos utilizados en las transducciones fueron KB1 y P22.

#### 2. Medios y Drogas.

Se utilizaron como medios completos el caldo nutritivo (C) que contiene 5 gr de peptona, 3 gr de extracto de carne y 5 gr de NaCl por litro de agua y el caldo triptona (CT) compuesto por 10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura y 5 gr de NaCl en un litro de agua. Los medios mínimos fueron el medio F (Vogel y Bonner, 1956) adicionado con 2% de glucosa y el medio M9 (Ariams, 1959) suplementado con 0,2% de azúcar. Los medios sólidos se obtuvieron agregando 15 gr de agar (Difco) por litro de los respectivos medios líquidos. La fermentación de azúcares se estudió sobre medio EMB agar (Difco) adicionado con 1% del hidrato de carbono adecuado.

Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con aminoácidos (20-50 µg/ml), vitaminas (2-20 µg/ml) o estreptomina (0,75 mg/ml). Los antibióticos mecilinam, cefalotina y piperacilina fueron obsequiados por los

TABLA I: Origen y características principales de las cepas utilizadas en este trabajo.

CEPA	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
DA37	<u>hisW1824</u> , <u>hisU1206</u> , <u>leu-1251</u>	D. N. Antón
DA78	<u>hisW1824</u> , <u>his-203</u> , <u>rpsL</u>	
DA138	<u>hisW1824</u> , <u>hisO1242</u> , <u>fts-131</u> , <u>rod-1</u> , <u>rpsL</u>	
DA139	<u>hisW1824</u> , <u>hisO1242</u> , <u>rod-1</u> , <u>rpsL</u>	
DA140	<u>hisW1824</u> , <u>hisO1242</u> , <u>rod-1</u> , <u>uvrA</u> , <u>rpsL</u>	
DA419	<u>hisW1824</u> , <u>hisO1242</u> , <u>fts-131</u> , <u>rod-1</u> , <u>leu-1261</u> , <u>met-1059</u> , <u>rpsL</u>	Mutagénesis de DA138
DA457	<u>aroG</u> , <u>leu-1262</u>	Mutagénesis de AroG
DA470	<u>aroG</u> , <u>fts-131</u>	DA457 x fago DA138
DA471	<u>aroG</u>	
DA499	<u>hisW1824</u> , <u>hisU1206</u> , <u>fts-131</u>	DA37 x fago DA138
DA500	<u>hisW1824</u> , <u>hisU1206</u>	
DA526	<u>hisW1824</u> , <u>hisO1242</u> , <u>rod-1</u> , <u>his-6879</u> <u>pro-853</u> , <u>rpsL</u>	Mutagénesis de DA535
DA527	<u>hisW1824</u> , <u>hisO1242</u> , <u>rod-1</u> , <u>pro-853</u> , <u>rpsL</u> , F <sup>+</sup>	DA526 x cepa dadora F <sup>+</sup>
DA535	<u>hisW1824</u> , <u>hisO1242</u> , <u>rod-1</u> , <u>his-6879</u> , <u>rpsL</u>	Mut. espontánea de DA139
DA567	<u>ara-9</u> , <u>rod-1</u>	SA342 x fago DA139
DA538	<u>ara-9</u>	



TABLA I (continuación)

CEPA	CARACTERISTICAS	ORIGEN
DA599	<u>ara-9</u> , <u>lip-2</u> , <u>his-6880</u>	Mutagénesis de SA342
DA636	<u>hisF3031</u> , <u>hisO1242</u> , <u>trpA3</u> , <u>leu-1263</u>	Mutagénesis de SB2299
DA676	<u>ara-9</u> , <u>lip-2</u> , <u>hisO1832</u>	DA599 x fago hisO1832
DA678	<u>ara-9</u> , <u>hisO1832</u>	DA676 x fago DA139
DA679	<u>ara-9</u> , <u>hisO1832</u> , <u>rod-1</u>	
Ara-9	<u>ara-9</u>	P. E. Hartman
ArcG	<u>aroG</u>	D. B. Sprinson
SA342	<u>ara-9</u> , <u>lip-2</u>	J. M. Calvo
SA534	<u>serA13</u> <u>rfa-3058</u> , Hfr K4	K. E. Sanderson
CV356	<u>ara-9</u> , <u>leuS3</u> , <u>leu-702</u> , <u>gal-205</u>	J. M. Calvo
SB2299	<u>hisF3031</u> , <u>hisO1242</u> , <u>trpA3</u>	P. E. Hartman
SJ268	<u>nadA13</u> , <u>metA22</u> , <u>trpC2</u> , <u>tyr-40</u>	K. E. Sanderson
Cepa de <u>E. coli</u> :		
ORF4/KL251	<u>leuB6</u> , <u>proC32</u> , <u>purE42</u> , <u>trpE38</u> ,	B. J. Bachmann
(CGSC 4282)	<u>recA1</u> , <u>metE70</u> , <u>thi-1</u> , <u>ara-14</u> <u>lacZ36</u> , <u>xyl-5</u> , <u>mtl-1</u> , <u>azi-6</u> , <u>rpsL109</u> <u>tonA23</u> , <u>tsx-67</u> , <u>supE44</u> / F' <u>lac<sup>+</sup></u> <u>lip<sup>+</sup></u>	

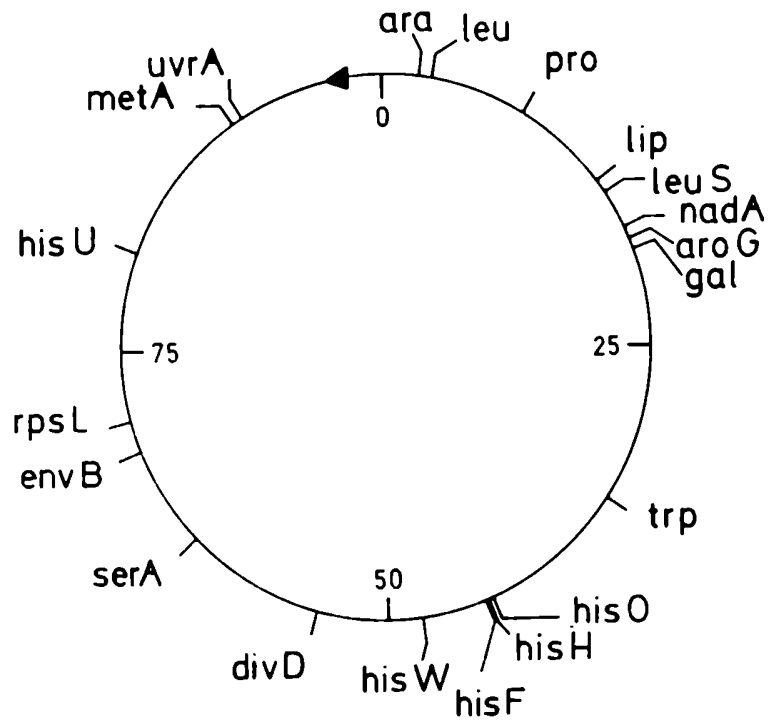


Fig. 1: Esquema del mapa genético de *Salmonella typhimurium* mostrando la ubicación de los distintos marcadores mencionados en este trabajo; se especifica además el origen y el sentido de transferencia de la cepa Hfr SA534 (flecha).

laboratorios Roche, Lilly y Lederle respectivamente; el resto de las drogas fue adquirido comercialmente.

### 3. Transducciones y Conjugaciones.

Las transducciones se realizaron siguiendo el método descrito por Roth y col. (1966) que consiste en esparcir 0,1 ml de un cultivo de la bacteria en fase estacionaria junto con 0,1-0,2 ml de una suspensión del fago ( $10^9$ - $10^{10}$  unidades formadoras de placas por ml) sobre cajas de medio selectivo e incubar las cajas durante 48 horas a 37°C.

Las conjugaciones se efectuaron variando ligeramente una de las técnicas descritas por Sanderson y col. (1972). A 5 ml de un cultivo exponencial de la cepa dadora ( $10^8$  células/ml) se le agregaron 2 ml de un cultivo en fase estacionaria de la cepa receptora y la mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas sin agitación. Las células fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas en medio mínimo y luego se sembraron distintas diluciones de esa suspensión sobre cajas que contenían el medio selectivo adecuado; la incubación se realizó a 37°C durante 48 horas.

### 4. Obtención de mutantes.

La mutagénesis se llevó a cabo agregando una gota de dietilsulfato (DES) a 5 ml de un cultivo en fase estacionaria de la cepa a mutagenizar e incubando la mezcla durante 30 minutos a 37°C sin agitación.

El cultivo mutagenizado fue repicado en caldo nutritivo y crecido durante toda la noche con el objeto de permitir la expresión de las mutaciones inducidas. Al día siguiente, las células fueron cosechadas por centrifugación, resuspendidas en medio mínimo E y repicadas en el mismo medio pero su-

plementado con los requerimientos de la cepa (medio ER). Ese cultivo fue crecido durante 3 horas para agotar los nutrientes intracelulares y luego fue diluido repetidas veces en medio ER adicionado con penicilina (200 U/ml). Las distintas diluciones fueron mantenidas a 37°C durante 10-20 horas sin agitación a fin de enriquecerlas en mutantes auxotróficos y luego se sembraron 0,05 ml de cada una de ellas sobre cajas de medio ER enriquecido con caldo nutritivo (1,25% v/v); a las 72 horas se picaron las colonias pequeñas (presuntos mutantes auxotróficos) y se analizaron sus requerimientos nutritivos.

#### 5. Autólisis.

El nivel de autólisis definido por Antón y Orce (1976) expresa el porcentaje de disminución de la densidad óptica de un cultivo resuspendido en HCl-Tris 0,05 M (pH 8,5) durante 2 horas a 37°C. Los cultivos fueron crecidos en 10 ml de caldo triptona hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1 (650 nm) y luego las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 4 ml de agua destilada. A 3 ml de esa suspensión se le agregaron 3 ml de HCl-Tris 0,1 M (pH 8,5) e inmediatamente se midió la densidad óptica de la mezcla (650 nm); después de incubar durante 2 horas a 37°C sin agitación se volvió a medir la densidad óptica de la mezcla, y en base a los valores obtenidos se calculó el porcentaje de disminución de la misma respecto al momento de la resuspensión.

#### 6. Pruebas de Sensibilidad.

La respuesta a cicloserina y anaranjado de acridina se analizó con la técnica usada previamente por Antón (1979). Se colocó 0,1 ml de un cultivo exponencial de la cepa crecida en medio completo ( $10^7$  células/ml aproxima-

damente) en tubos que contenían 0,9 ml del mismo medio adicionado con la cantidad apropiada de la droga y se los incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se leyó la densidad óptica de los cultivos (650 nm) y se consideró a la falta de crecimiento como sinónimo de sensibilidad. Cuando la droga probada fue anaranjado de acridina, el medio usado fue el caldo nutritivo, y en el caso de cicloserina se usó caldo triptona.

La sensibilidad a desoxicolato se analizó esparciendo 0,02 ml de un cultivo de la cepa sobre cajas de agar nutritivo adicionado con el detergente y observando el crecimiento a las 24 horas.

Para calcular la fracción de sobrevivientes frente a mecilnam se esparcieron distintas diluciones de la cepa sobre cajas de agar triptona y agar triptona adicionado con el antibiótico y a las 48-72 horas se contaron las colonias aparecidas.

#### 7. Shock osmótico.

El shock osmótico se realizó modificando ligeramente el método de Neu y Heppel (1965). Las cepas a tratar fueron crecidas en 30 ml de medio E hasta alcanzar un título de aproximadamente  $10^9$  células/ml y luego las células fueron centrifugadas, lavadas dos veces con HCl-Tris 0,1 M (pH 7,3) y resuspendidas en 3 ml de HCl-Tris 0,1 M (pH 7,3) - sacarosa 20% (v/v) - EDTA 5 mM. Después de agitar durante 10 minutos (etapa de sensibilización) se tomaron dos alícuotas de 1,4 ml de esa suspensión, se centrifugaron y las células se resuspendieron en 1,4 ml de una solución fría de  $MgCl_2$  1 mM - ditiotreitól (DTT) 1 mM (tratamiento de shock) y en 1,4 ml de la misma solución pero suplementada con 0,9% de NaCl (tratamiento control) respectivamente. Ambas suspensiones

fueron mantenidas en hielo durante 10 minutos y luego fueron centrifugadas; en los sobrenadantes resultantes (medio hipotónico S y medio isotónico C) se midió la actividad de enzimas citoplásmicas y periplásmicas.

Las actividades enzimáticas medidas en ambos medios se expresaron como el porcentaje de la actividad celular total que fue calculada sumando la actividad medida en el medio S proveniente del shock osmótico con la hallada en el sonicado de las células remanentes de dicho tratamiento. Este último valor se obtuvo resuspendiendo las células previamente sometidas al shock osmótico en 1,4 ml de una solución de  $MgCl_2$  1 mM - DTT 1 mM - NaCl 0,9%, sonicando la suspensión, separando el sobrenadante por centrifugación y midiendo en él la actividad de las distintas enzimas.

#### 8. Ensayos enzimáticos.

La técnica para medir la actividad de la fosfodiesterasa cíclica fue descrita por Neu y Heppel (1965). La mezcla de incubación compuesta por 0,5  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ , 0,1  $\mu$ moles de  $CoCl_2$ , 5  $\mu$ moles de acetato de sodio (pH 5,8), 0,1 mg de bis-p-nitrofenil fosfato y enzima en un volumen de 0,1 ml fue incubada a 37°C durante 40 minutos. La reacción se detuvo agregando 1 ml de NaOH 0,1 M y el color desarrollado se leyó a 410 nm.

La mezcla de incubación para medir la actividad de la treonina desaminasa (Burns, 1971) que contenía 100  $\mu$ moles de  $NH_4Cl$ , 100  $\mu$ moles de HCl-Tris (pH 8), 80  $\mu$ moles de L-treonina y enzima en un volumen de 1 ml fue incubada durante 30 minutos a 36°C. La reacción se detuvo agregando 3 ml de una solución de 2-4 dinitrofenil hidracina (25 mg por 100 ml de HCl 0,5 M); luego se agregó 1 ml de agua destilada, se mantuvo la mezcla a temperatura am-

biente durante 15 minutos y finalmente se agregó 1 ml de NaOH 40%. El color desarrollado se leyó a 600 nm.

La mezcla para medir la actividad de la ornitina transcarbamilasa (Prescott y Jones, 1969) compuesta por 100  $\mu$ moles de HCl-Tris (pH 8,6), 2,5  $\mu$ moles de carbamil fosfato de litio, 10  $\mu$ moles de L-ornitina y enzima en un volumen final de 1 ml fue incubada a 37°C durante 20 minutos. La reacción se detuvo con el agregado de 1 ml de una mezcla formada por dos partes de una solución de antipirina (5 gr por litro de ácido sulfúrico 50%) y una parte de una solución de 2-3 butanodiona monoxima (0,8 gr en 100 ml de ácido acético 5%). Los tubos se mantuvieron durante 15 horas en oscuridad completa y luego se calentaron a 45°C durante 70 minutos; posteriormente se enfriaron rápidamente en hielo y se leyó el color desarrollado a 460 nm.

#### 9. Recuento de células totales.

El número de células totales se estableció mediante el uso de cámaras para recuento de glóbulos rojos. Los cultivos fueron diluidos en formaldehído 0,1% hasta obtener títulos de aproximadamente  $10^7$  células/ml y con esas diluciones se cargaron las cámaras. Antes de la lectura, las cámaras se dejaron reposar durante 30 minutos con el objeto de que las células se depositaran en el fondo de las mismas. En cada determinación se contaron entre 150 y 200 células.

#### 10. Síntesis de ADN y de proteínas.

La síntesis de ADN y de proteínas se midió en cultivos exponenciales crecidos en caldo nutritivo; a uno de ellos se le agregó 10  $\mu$ Ci/ml de

$^3\text{H}$ -Timidina (47 Ci/mmol) y 100  $\mu\text{g/ml}$  de adenosina para medir la síntesis de ADN y al otro 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{14}\text{C}$ -Leucina (2 mCi/mg) para medir la síntesis de proteínas. A intervalos regulares se tomaron muestras de 0,1 ml con las que se impregnaron discos de papel de filtro de 25 mm de diámetro; los discos fueron sumergidos en ácido tricloroacético (TCA) 10%, lavados dos veces con TCA 5%, secados y finalmente se leyó la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido Beckman.

#### 11. Detección de las proteínas captadoras de penicilina.

El método para detectar las proteínas captadoras de penicilina (PBP) fue descrito por Spratt y Pardee (1975). Las cepas fueron crecidas en 1 litro de caldo triptona hasta alcanzar una densidad de aproximadamente 1 (650nm) y luego las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en 40 ml de solución tampón fosfato 0,1 M (pH 7) adicionada con 0,4 ml de mercapto-etanol. Después de pasar esa suspensión por una prensa de French, las células enteras fueron separadas por centrifugación a 6.000 g durante 20 minutos y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 100.000 g durante 45 minutos con el objeto de recolectar la fracción de membranas. El precipitado obtenido fue resuspendido en la misma solución tampón y vuelto a centrifugar a 100.000 g dos veces y finalmente fue resuspendido en 0,4 ml de HCl-Tris 50 mM (pH 7).

A 100  $\mu\text{l}$  de esa suspensión de membranas se le agregaron 10  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -Bencil penicilina (53 mCi/mmol; 100  $\mu\text{Ci/ml}$ ) y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 30°C; la reacción se detuvo con el agregado de 5  $\mu\text{l}$  de penicilina no radioactiva (120 mg/ml) y 5  $\mu\text{l}$  de Sarcosyl NL-97 20% (p/v) que es un detergente que solubiliza selectivamente las proteínas de la membrana in-



terna y las desnaturaliza previniendo la liberación de la penicilina radioactiva unida. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se centrifugó a 100.000 g durante 45 minutos, quedando en el sobrenadante las proteínas solubilizadas por el detergente.

Se mezclaron 100 µl de ese sobrenadante con 20 µl de mercaptoetanol y 50 µl de una solución de muestra compuesta por HCl-Tris 0,2 M (pH 6,8), glicerol 30%, lauril sulfato de sodio (SDS) 3% y azul de bromofenol 0,004 M y la mezcla se calentó a baño maría durante 3 minutos antes de sembrarla en las placas de electroforesis.

El gel separador se preparó con acrilamida 9,5%, bis-acrilamida 0,18%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,12% y N-N-N'-N'-tetrametil-etildiamina (TEMED) 0,1% en HCl-Tris 0,376 M (pH 8,8). El gel apilador fue semejante al separador excepto en la concentración de acrilamida (3%), en la de bis-acrilamida (0,08%) y en la solución tampón, que fue HCl-Tris 0,125 M (pH 6,8). La solución de electrodo fue HCl-Tris 0,025 M - glicina 0,192 M - SDS 0,1%.

La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente de 25 mA por placa lo que determinó un tiempo de corrida de aproximadamente 4 horas. Los geles fueron fijados con una mezcla de metanol 25% - ácido acético 10%, lavados con agua y sumergidos en dimetilsulfóxido (DMS) durante 30 minutos por dos veces y en DMS adicionado con 22,2% de 2-5 difeniloxazol (PPO) durante 3 horas; luego se los volvió a lavar con agua durante 30 minutos y se los secó.

La lectura de los geles se realizó siguiendo la técnica de Laskey y Mills (1975). Para ello, se los adosó a una película X-Omat AR de Kodak pre-

viamente sensibilizada con un destello luminoso (fondo de absorbancia a 540 nm de 0,1-0,2) y se los mantuvo en estrecho contacto durante 2 meses a 70°C bajo cero. La película fue revelada con un revelador para películas de rayos X.

## CAPITULO III

## RESULTADOS

La familia de cepas integrada por DA138, DA139 y DA140 fue obtenida por Antón (1979) a través de sucesivos reaislamientos de un transductante his01242 de DA78, una cepa hipersensible al exceso de las proteínas hisH e hisF (Fig. 2).

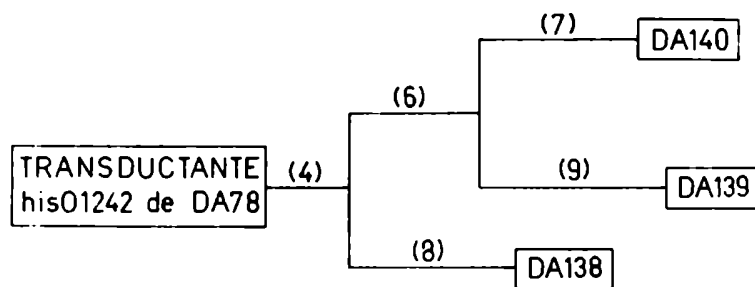


Fig. 2: Origen de DA138, DA139 y DA140 a partir de un transductante his01242 de DA78. Entre paréntesis se indica el número de reaislamientos realizados en cada una de las etapas de la selección de este grupo de cepas.

Las tres cepas comparten diversas alteraciones tales como la forma celular redonda, el aumento del nivel autolítico, el incremento de la sensi-

bilidad a cicloserina y desoxicolato y la fermentación anormal de maltosa. Además de esas anomalías comunes a los tres miembros de la familia, DA138 es incapaz de formar colonias en medio sólido a 42°C, DA140 es altamente sensible a la radiación ultravioleta y DA139 acumula mutaciones polares his<sup>-</sup> (Antón, 1979).

En este trabajo se encaró el análisis genético y fisiológico de la alteración morfológica de DA138, DA139 v DA140 y del crecimiento termosensible detectado en DA138.

## 1. ANALISIS DE LA TERMOSENSIBILIDAD DE DA138.

### 1.1. Mapeo de la mutación responsable de esa alteración.

El mapeo inicial de la mutación responsable de la termosensibilidad de DA138, a la que se denominó fts-131, se realizó cruzando distintas cepas Hfr fts<sup>+</sup> con DA419, un derivado leu<sup>-</sup> met<sup>-</sup> de DA138, y analizando el crecimiento a 42°C de los recombinantes seleccionados. En esos cruzamientos se observó que el 97,5% de los derivados leu<sup>+</sup> ser<sup>+</sup> rpsL obtenidos con la cepa Hfr SA534 era termoresistente lo que permitió ubicar a la mutación fts-131 en las proximidades de la unidad 3 del cromosoma de S. typhimurium (Fig. 1).

Con el objeto de localizar con más precisión a fts-131 se estudió su ligamiento por transducción con otros marcadores ubicados en la unidad 3 tales como leu y ara (Sanderson y Hartman, 1978). El estudio de 254 transductantes leu<sup>+</sup> obtenidos al cruzar DA419 con fago crecido en una cepa ara-9 fts<sup>+</sup> leu<sup>+</sup> mostró que 30 de ellos eran termoresistentes (fts<sup>+</sup>) (11,8%), 135 habían adquirido el marcador ara-9 (53,1%) y solamente 3 (1,2%) tenían los marcadores

fts<sup>+</sup> ara-9.

En base a las frecuencias de cotransducción encontradas entre leu y los marcadores fts y ara, y a que la clase minoritaria de recombinantes hallada en ese cruzamiento fue la de los derivados fts<sup>+</sup> ara-9, se construyó el mapa de la Fig. 3 en el que se muestran las distancias y posición relativa de los tres marcadores analizados.

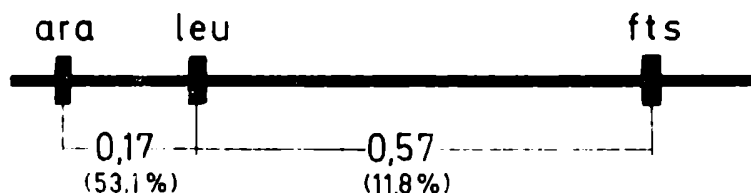


Fig. 3: Representación esquemática de la posición de fts con respecto a otros marcadores cercanos. Los números indican las distancias entre los marcadores calculadas por medio de la fórmula de Kemper (1974) en base a las frecuencias de cotransducción que se indican entre paréntesis.

### 1.2. Propiedades de un transductante fts-131.

Con el objeto de estudiar las alteraciones producidas por fts-131, y a fin de evitar la interferencia de otras mutaciones presentes en DA138, dicha mutación fue transferida a una cepa leu-1262 por transducción con fago crecido en DA138. Se obtuvieron así las cepas isogénicas DA470 (fts-131 leu<sup>+</sup>) y

TABLA II: Propiedades de DA138 y de las cepas DA470 (fts-131) y DA471 (fts<sup>+</sup>) obtenidas por transducción de una cepa salvaje leu<sup>-</sup> con fago crecido en DA138.

CEPA	ALELO	CRECIMIENTO A 42°C (1)	FORMA CELULAR A 37°C	RESPUESTA A (2)		AUTOLISIS %	FERMENTACION DE MALTOSA (3)
				CICLOSERINA DESOXICOLATO	CICLOSERINA DESOXICOLATO		
DA471	<u>fts</u> <sup>+</sup>	+	Bacilar	R	R	15,2	Normal
DA470	<u>fts-131</u>	-	Bacilar	R	R	15,8	Normal
DA138	<u>fts-131</u>	-	Redonda	S	S	54,3	Anormal

1: Formación de colonias en medio completo sólido.

2: Cicloserina, 20 µg/ml; desoxicolato, 3 mg/ml; R, resistente; S, sensible.

3: Observada en medio EMB maltosa; Normal, producción de colonias verde metálico; Anormal, colonias rojas y opacas.

DA471 (fts<sup>+</sup> leu<sup>+</sup>) que difieren únicamente en el alelo fts y que pueden ayudar a identificar el fenotipo propio de fts-131 por comparación con el tipo salvaje y la cepa parental DA138.

La Tabla II muestra que tanto DA470 como DA138 son incapaces de formar colonias en medio sólido a 42°C en tanto que DA471 crece normalmente a esa temperatura. A pesar de esa semejanza, DA470 difiere de DA138 en todas las otras propiedades analizadas ya que la forma celular, nivel autolítico, respuesta a cicloserina y desoxicolato y el tipo de fermentación de maltosa de DA470 son semejantes a los de la cepa DA471. Se deduce de estos resultados que fts-131 es responsable de la falta de crecimiento en medio sólido a 42°C pero no está involucrada en la variación morfológica ni en ninguna de las otras alteraciones detectadas en DA138.

### 1.3. Comportamiento de una cepa fts-131 a 42°C.

Con el objeto de analizar cuantitativamente el efecto de la temperatura sobre los mutantes fts-131 se estudió el comportamiento de DA470 a 42°C en medio líquido y se lo comparó con el de DA471.

En la Fig. 4 se observa que si bien el cambio de 32°C a 42°C no causa variaciones apreciables en el incremento del título o la densidad óptica de DA471 (Fig. 4A y 4B), el mismo produce la detención completa y casi instantánea del aumento de células totales en el cultivo de DA470 (Fig. 4C).

El efecto de la temperatura sobre el número de células de DA470 no está acompañado por alteraciones en el crecimiento del cultivo ni en la síntesis de macromoléculas ya que tanto el aumento de la densidad óptica como la incorporación de precursores radioactivos en el ADN y proteínas a 42°C continúan

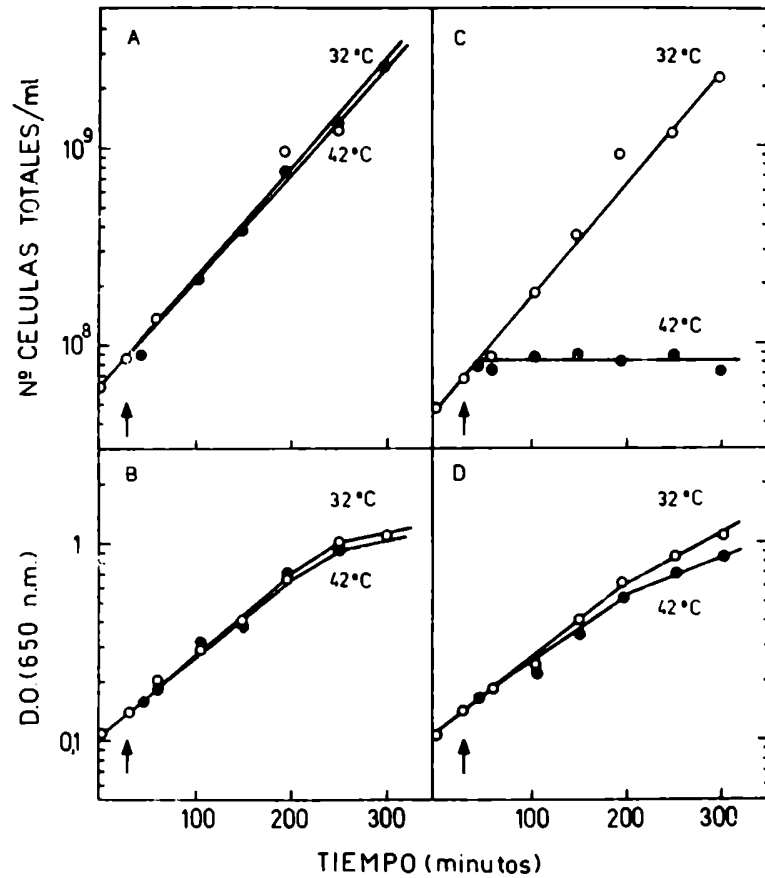


Fig. 4: Efecto de la incubación a 32°C y 42°C sobre el incremento del número de células totales y la densidad óptica de DA471 (*fts*<sup>+</sup>) (A y B) y de DA470 (*fts*-131) (C y D). Los cultivos fueron crecidos en caldo nutritivo a 32°C y en el momento indicado por la flecha se transfirió una parte de los mismos a 42°C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de los subcultivos de 32°C y 42°C para medir la densidad óptica (650 nm) y efectuar el recuento de células totales.



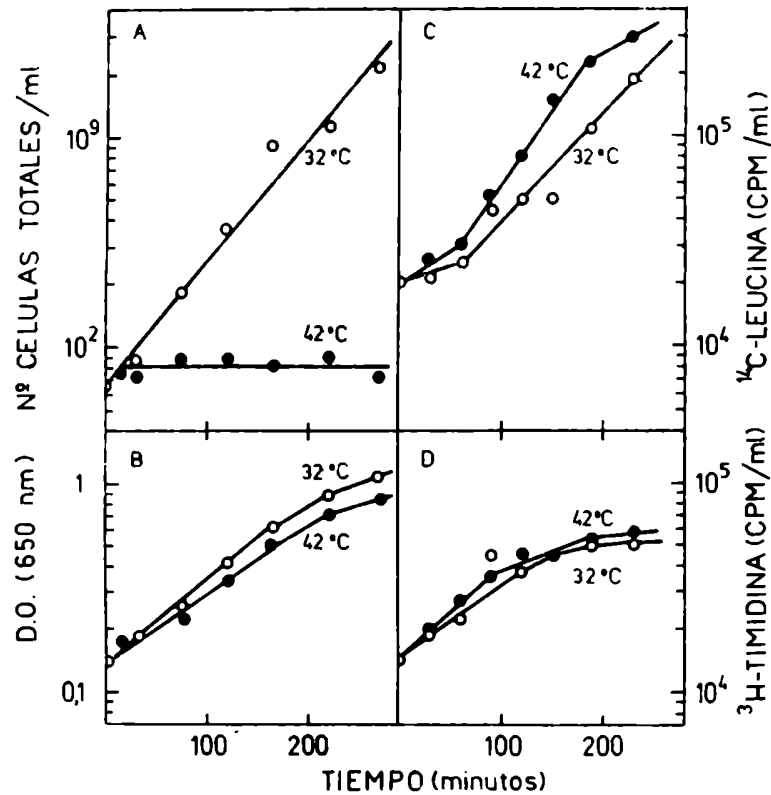


Fig. 5: Efecto de la incubación a 32°C y 42°C sobre la incorporación de <sup>14</sup>C-Leucina (C) y <sup>3</sup>H-Timidina (D) en cultivos de DA470. La cepa fue crecida en caldo nutritivo a 32°C y en el momento de iniciar la experiencia se pasó una alícuota a 42°C. La incorporación de precursores radioactivos se estudió en cultivos preincubados durante 70 minutos con 2,5  $\mu$ Ci/ml de <sup>14</sup>C-Leucina (2 mCi/mg) (síntesis de proteínas) o con 10  $\mu$ Ci/ml de <sup>3</sup>H-Timidina (47 Ci/mmol) mas 100  $\mu$ g/ml de adenosina (síntesis de ADN); las muestras fueron tomadas y procesadas como se indica en Materiales y Métodos. Los paneles A y B muestran el efecto de la temperatura sobre el número de células totales y la densidad óptica respectivamente.

con una velocidad semejante a la del control mantenido a 32°C (Fig. 5).

Por microscopía óptica se observó que si bien el cultivo de DA470 crecido a 32°C estaba formado por bacilos normales (Fig. 6A), el crecido a 42°C estaba constituido por filamentos aparentemente no septados cuya longitud aumentaba con el tiempo de incubación a temperatura no permisiva (Fig. 6B).

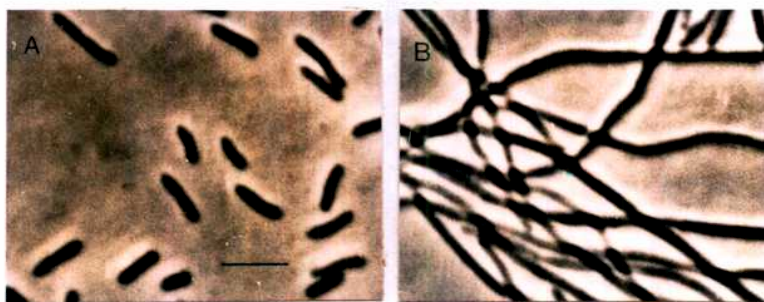


Fig. 6: Morfología de células de DA470 crecidas en caldo nutritivo a 32°C (A) y a 42°C (B). La barra representa 5  $\mu$ .

Estos resultados indican que la mutación fts-131 inhibe la división celular a 42°C sin interferir con otros aspectos del crecimiento tales como la síntesis de ADN y de proteínas y el alargamiento celular.

#### 1.4. Recuperación de la división celular por disminución de la temperatura. Efecto de diversos antibióticos.

La Fig. 7 muestra que el efecto de la temperatura sobre DA470 es re-

versible ya que cuando un cultivo de esa cepa crecido a 42°C es pasado a 32°C se produce, a partir de los 15 minutos, un brusco aumento en el número de células totales el cual alcanza rápidamente el valor del control mantenido a 32°C; una vez llegado a ese punto, el cultivo continúa creciendo a la misma velocidad del control.

La pendiente de la primer fase de la curva de recuperación (tiempo de duplicación 12,7 minutos) es aproximadamente 4 veces mayor que la del cultivo control de 32°C (tiempo de duplicación 48 minutos). Estos sugiere que, a pesar de la inhibición de la división celular, durante el crecimiento de los filamentos a 42°C se acumulan todos los elementos necesarios para la división y que es suficiente el pasaje a 32°C para que las divisiones detenidas se completen en poco tiempo provocando la rápida fragmentación de los filamentos.

Con el objeto de establecer en qué punto del ciclo celular se encuentra la alteración producida por fts-131 se analizó el efecto de distintos inhibidores del metabolismo celular sobre la división de los filamentos a 32°C.

El agregado de ácido nalidíxico o de cloranfenicol, inhibidores de la síntesis de ADN y proteínas respectivamente, en el momento de la transferencia del cultivo de 42°C a 32°C no impide el aumento del número de células totales aunque el título alcanzado en ambos casos es inferior al obtenido en ausencia de esas drogas (Fig. 7). Similares resultados se obtuvieron con otros inhibidores de la síntesis proteica tales como puromicina (100 µg/ml) o tetraciclina (5 µg/ml) (De Micheli y Antón, 1983). Estos datos permiten concluir que el paso alterado en DA470 es posterior a las etapas de la división

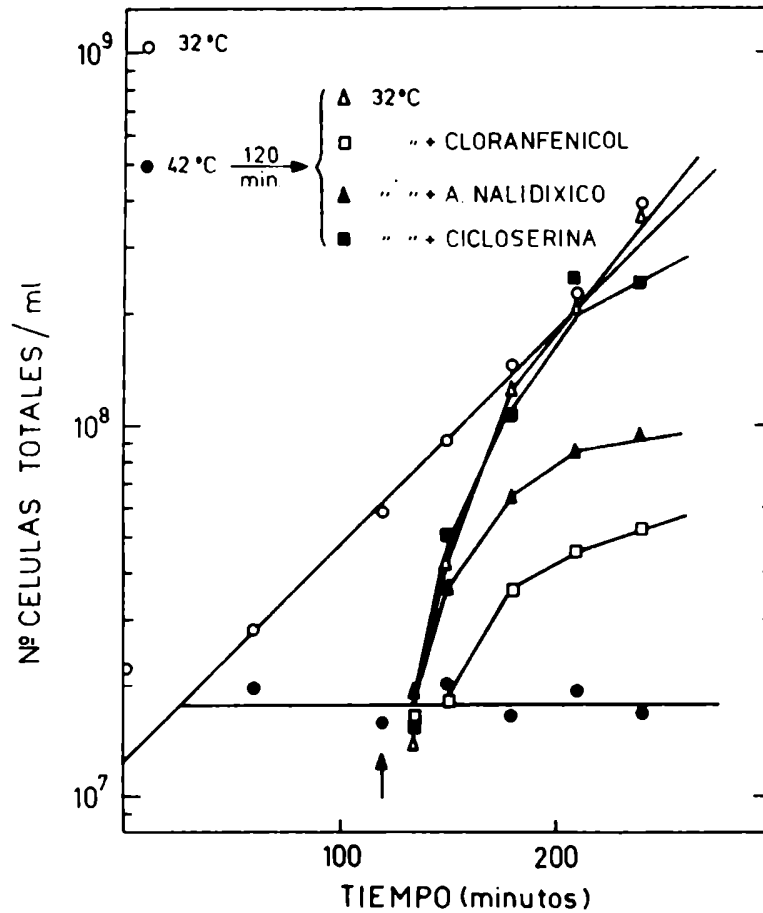


Fig. 7: Recuperación de la división celular de filamentos de DA470 por pasaje a 32°C. Parte de un cultivo exponencial de DA470 crecido a 32°C en caldo nutritivo fue transferido a 42°C al iniciar el experimento. A los 120 minutos (flecha) se tomaron cuatro alícuotas del cultivo de 42°C y se las pasó a 32°C; una de ellas se mantuvo como control en tanto que a las restantes se les adicionó, a una ácido nalidixico (24  $\mu\text{g/ml}$ ), a otra cloranfenicol (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y a la tercera cicloserina (35  $\mu\text{g/ml}$ ).

celular que requieren la síntesis de ADN o de proteínas.

Se analizó, además, el efecto de distintos inhibidores de la síntesis de mureína, el componente fundamental de la capa rígida de la envoltura, sobre la recuperación del cultivo de DA470. La Fig. 7 muestra que la cicloserina, un antibiótico que interfiere con la síntesis de los monómeros de esa macromolécula (Ghuysen y Shockman, 1973), no impide la división de los filamentos lo que indica que el paso alterado por fts-131 es posterior a esa etapa de la formación de la capa rígida.

Por otra parte, en la Fig. 8 se observa que el agregado de penicilina en el momento del pasaje a 32°C anula completamente el aumento del título de DA470. Si bien se acepta que la penicilina inhibe la etapa final de la polimerización de la mureína (transpeptidación) (Mirelman, 1979), su modo de acción no está completamente aclarado. Recientemente se ha demostrado que ese antibiótico se une específicamente a por lo menos siete proteínas de la membrana interna (Spratt, 1975) y que la mayor parte de esas proteínas (PBPs) intervienen enzimáticamente en la síntesis de la mureína (Nishimura y col., 1980; Ishino y col., 1980; Ishino y Matsubashi, 1981; Nakagawa y Matsubashi, 1982).

Con el objeto de establecer si el efecto inhibitorio de la penicilina sobre la división de los filamentos fts-131 se debe a su interacción con alguna de las PBPs, se estudió la recuperación de DA470 a 32°C en presencia de antibióticos que interfieren con algunas de esas proteínas en forma específica. Para ello se utilizó cefalotina que presenta alta afinidad de unión con la PBP-1 y PBP-3 (Spratt, 1977), piperacilina que se une con la PBP-3 (Botta y Park, 1981) y necilnam que es captado por la PBP-2 (Spratt y Pardee, 1975).

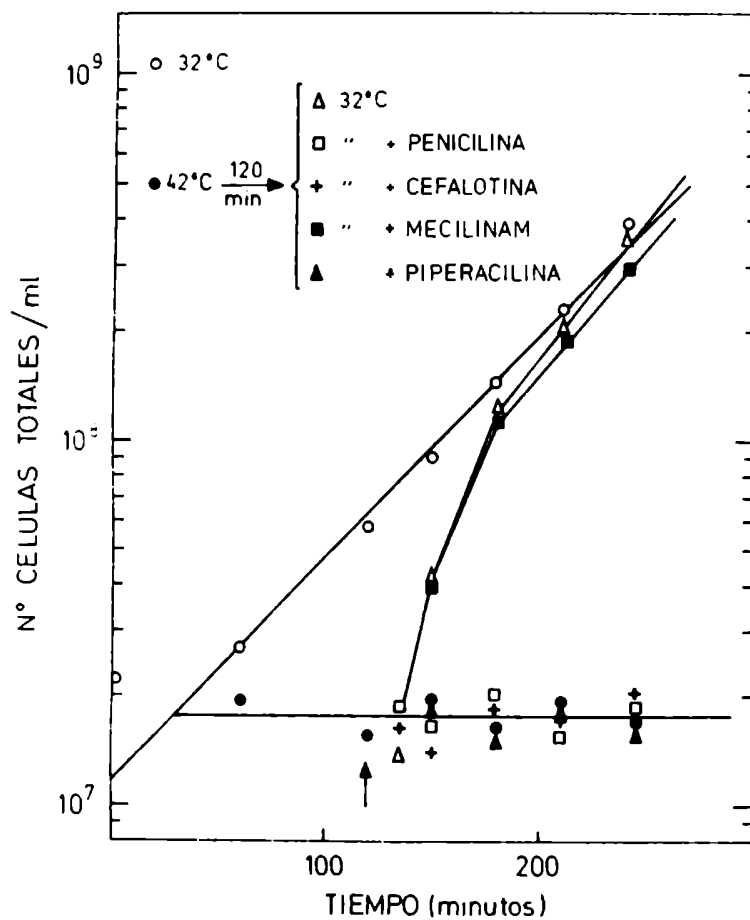


Fig. 8: Efecto de antibióticos con distinta especificidad de unión para las proteínas captadoras de penicilina (PBPs) sobre la recuperación de los filamentos de DA470 a 32°C. A partir de un cultivo de DA470 crecido a 42°C durante 2 horas se tomaron cinco alícuotas que fueron transferidas a 32°C (flecha); a una de ellas no se le hizo ningún agregado y a las otras cuatro se les adicionó: a una penicilina (5 U/ml), a otra cefalotina (5  $\mu\text{g/ml}$ ), a la tercera mecilinam (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y a la cuarta piperacilina (5  $\mu\text{g/ml}$ ).

La Fig. 8 muestra que el agregado de mecilnam no interfiere con la división de los filamentos fts-131 lo que indica que la PBP-2 no participa en el proceso de recuperación.

Se observa también que la adición de cefalotina o piperacilina en el momento del pasaje a 32°C inhibe completamente la recuperación de DA470. Dado que ambos antibióticos se unen a la PBP-3 (la piperacilina lo hace en forma exclusiva), esos resultados indican que la PBP-3 es necesaria para la división de los filamentos y permiten postular que el paso alterado por fts-131 es anterior a la etapa de la síntesis de mureína catalizada por esa proteína.

La falta de antibióticos específicos para la PBP-1 no permite determinar si su actividad es también necesaria para la recuperación de DA470. Al igual que la PBP-3, la PBP-1 tiene actividad de transglicosilasa y transpeptidasa (Ishino y col., 1980; Ishino y Matsushashi, 1981), pero existen evidencias que sugieren que está involucrada en el proceso de elongación en tanto que la PBP-3 actuaría solamente en la formación del septo (Spratt, 1975; Bottta y Park, 1981). La formación de filamentos a 42°C demuestra que la elongación de DA470 a altas temperaturas no está alterada y, en consecuencia, indica que no está inhibida la actividad de la PBP-1. Estas evidencias sugieren que el paso alterado por fts-131 es posterior a la etapa de la síntesis de mureína catalizada por la PBP-1, pero esta hipótesis debería comprobarse mediante estudios bioquímicos.

#### 1.5. Recuperación de la división celular por aumento de la presión osmótica del medio. Efecto de distintos antibióticos.

Similarmente a lo observado en otros mutantes termosensibles (Cieřla

y col., 1972; Ricard e Hirota, 1973), los filamentos de DA470 se dividen rápidamente a temperatura no permisiva si la presión osmótica del medio es elevada de 0,09 M (concentración salina del caldo nutritivo) a 0,25 M (Fig. 9). Otras sales (por ejemplo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y la sacarosa, usadas en concentraciones osmóticamente equivalentes a la del NaCl, tienen un efecto semejante lo que indica que los filamentos se dividen por el aumento de la presión osmótica y no por un efecto específico del NaCl.

El NaSCN,  $\text{NaClO}_4$  y el tricloroacetato de sodio actúan en forma diferente ya que no sólo son incapaces de inducir la división de los filamentos sino que además inhiben el crecimiento de DA470 y el de las cepas salvajes. Este comportamiento anómalo podría atribuirse al hecho de que esas tres sales son poderosos agentes caotrópicos y como tales provocan la desorganización de la membrana celular (Hatefi y Hanstein, 1974).

La recuperación de los filamentos fts-131 promovida por el agregado de sales no es afectada por la presencia de ácido nalidíxico pero es totalmente inhibida por el cloranfenicol (Fig. 9) lo que indica que las divisiones inducidas por el aumento de la presión osmótica requieren síntesis de proteínas. Puede observarse también en la Fig. 9 que la división de los filamentos no es impedida por la cicloserina, pero es completamente anulada por la adición de penicilina o cefalotina.

De las Fig. 7, 8 y 9 surge que la recuperación de los filamentos a 32°C y la que tiene lugar al aumentar la presión osmótica del medio difieren en el comportamiento frente a inhibidores de la síntesis proteica, ya que el agregado de cloranfenicol no impide el aumento del título a 32°C pero anula completamente la división de los filamentos inducida por las sales.



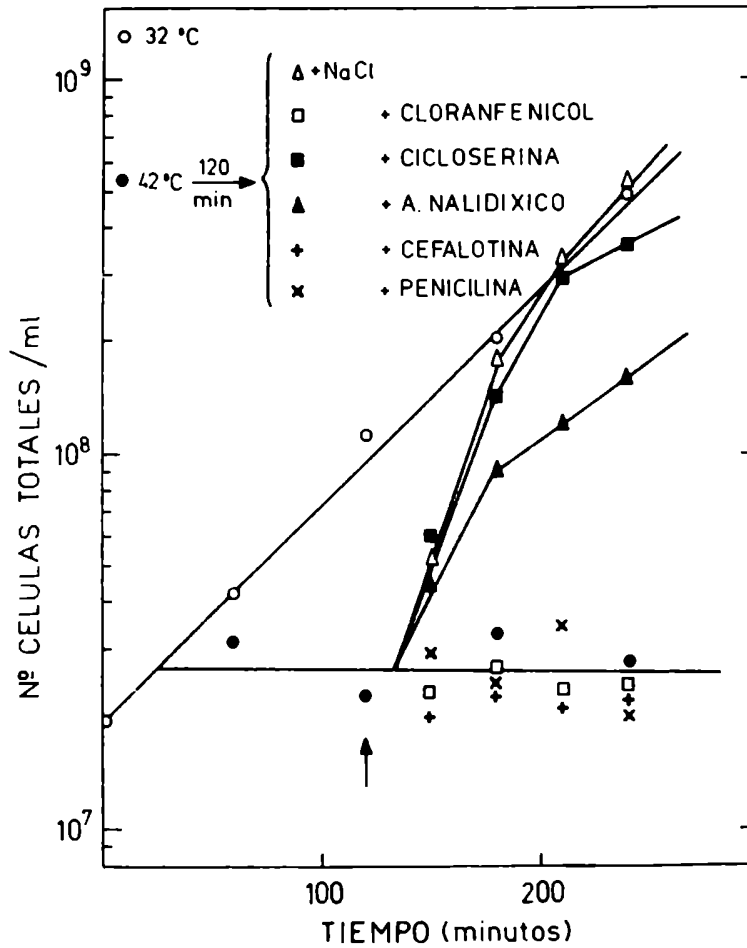


Fig. 9: Recuperación de la división celular de filamentos de DA470 por aumento de la presión osmótica del medio. Parte de un cultivo de DA470 crecido en caldo nutritivo a 32°C fue transferido a 42°C al iniciar la experiencia. A los 120 minutos (flecha) se tomaron seis alícuotas del cultivo crecido a 42°C y se les adicionó NaCl (conc. final 0,25 M); a una de ellas no se le hizo ningún otro agregado pero a las cinco restantes se les adicionó ácido nalidixico (24 µg/ml), cloranfenicol (40 µg/ml), cicloserina (35 µg/ml), penicilina (5 U/ml) o cefalotina (5 µg/ml).

Además de la diferencia mencionada, ambos procesos de recuperación difieren también en su potencialidad temporal. En la Fig. 10 se observa que la capacidad de los filamentos para dividirse a 32°C se mantiene mientras el cultivo control se encuentra en fase logarítmica y se pierde cuando éste entra en fase estacionaria; por el contrario, el cultivo de DA470 crecido a 42°C deja de responder al estímulo de las sales cuando el control se encuentra aún en fase logarítmica.

Estos resultados indican que el mecanismo de recuperación de los filamentos fts-131 inducido por el aumento de la presión osmótica del medio es diferente al que tiene lugar cuando se disminuye la temperatura.

#### 1.6. Comportamiento de una cepa fts-131 frente al shock osmótico.

El shock osmótico es un método descrito por Neu y Heppel (1965) que facilita la liberación al medio externo de las proteínas contenidas en el espacio periplásmico sin ocasionar lisis celular.

Dado que el comportamiento normal de una cepa ante el shock osmótico depende en gran medida de las propiedades de su envoltura, y con el objeto de detectar posibles alteraciones en esa estructura celular debidas a la presencia de la mutación fts-131, se estudió la respuesta de DA470 y de la cepa isogénica fts<sup>+</sup> DA471 a dicho tratamiento. Para ello las cepas crecidas a 37°C fueron sensibilizadas con HCl Tris - sacarosa - EDTA y posteriormente se resuspendieron las células en una solución hipotónica (shock osmótico) o en una solución isotónica (tratamiento control ) tal como se describe en Materiales y Métodos; en los medios externos resultantes de ambos tratamientos (S y C respectivamente) se midió la actividad de una enzima periplásmica

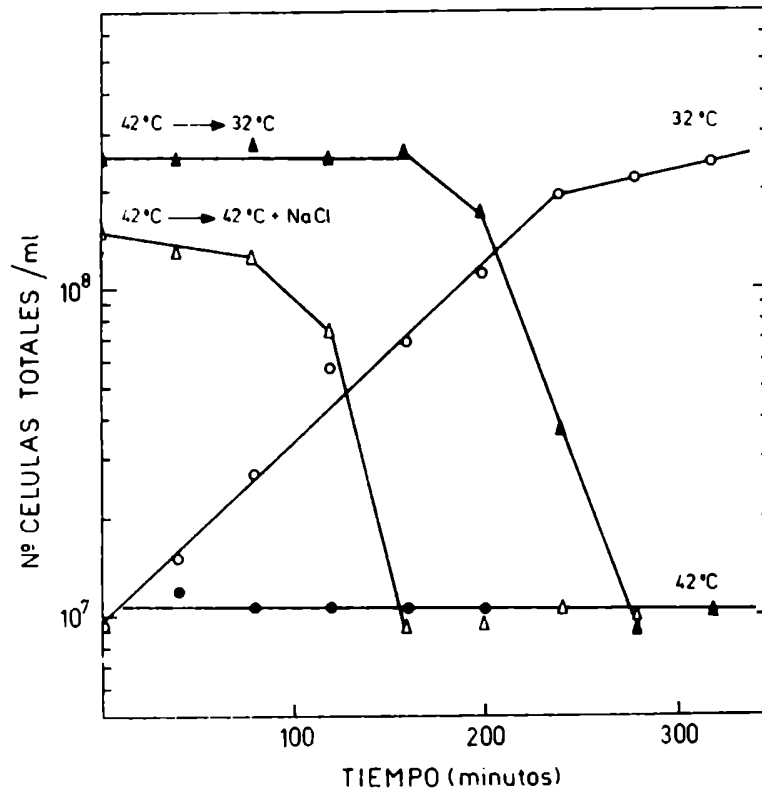


Fig. 10: Influencia de la edad de los filamentos en la recuperación producida por pasaje a 32°C y por aumento de la presión osmótica del medio. Un cultivo de DA470 crecido en caldo nutritivo a 32°C (○) se pasó a 42°C al iniciar la experiencia; en ese momento y cada 40 minutos se tomaron dos alícuotas del cultivo mantenido a 42°C (●) y se pasó una de ellas a 32°C (▲) y a la otra, que se mantuvo a 42°C, se le agregó NaCl (0,25 M conc. final) (△). A los 430 minutos de comenzado el experimento se hizo el recuento de células totales en todas las alícuotas y se graficó el valor obtenido en función del momento en que fueron extraídas.

(fosfodiesterasa cíclica) y la de una enzima citoplásmica (treonina desaminasa).

Los resultados de la Tabla III muestran que el porcentaje de actividad de fosfodiesterasa hallado en los medios hipotónicos S de ambas cepas fue de aproximadamente el 70% en tanto que el detectado en los respectivos medios control C sólo alcanzó valores del 10%. Además, en ninguno de los medios S o C se encontró actividad de treonina desaminasa, lo que indica las dos cepas estudiadas no se lisan al ser sometidas a estos tratamientos.

La gran liberación de material periplásmico (fosfodiesterasa) por efecto del shock osmótico y el escaso porcentaje liberado por el tratamiento control, así como la ausencia de lisis celular, evidencian que tanto DA470 como DA471 tienen un comportamiento normal frente a ambos tratamientos.

Valores de liberación de fosfodiesterasa cíclica y treonina desaminasa semejantes a los presentados en la Tabla III se obtuvieron con las cepas crecidas a 42°C y posteriormente sometidas al shock osmótico y al tratamiento control.

Estos resultados muestran que si bien la mutación fts-131 produce la inhibición de la división celular a 42°C, no causa alteraciones en la envoltura celular que modifiquen la respuesta frente al shock osmótico.

## 2. ANALISIS DE LA ALTERACION MORFOLOGICA DE DA138, DA139 y DA140.

### 2.1. Mapeo de la mutación responsable de esa alteración.

El mapeo preliminar de la mutación responsable de la alteración morfológica de DA139, DA138 y DA140, a la que se denominó rod-1, se realizó cruzando DA527, un derivado F<sup>+</sup> de DA139 cuyo origen se detalla en la Tabla I, con SU268, una cepa receptora que tiene marcadores auxotróficos ubicados en distin-

TABLA III: Efecto del shock osmótico sobre la liberación de enzimas periplásmicas (fosfodiesterasa cíclica) y citoplásmicas (treonina desaminasa) en DA470 y DA471. Las cepas fueron sometidas al shock osmótico y al tratamiento control tal como se describe en Materiales y Métodos y en los respectivos medios externos (S y C) se midió la actividad de ambas protefinas. Las actividades obtenidas se expresaron como el porcentaje de la actividad enzimática total, valor que fue obtenido sumando las actividades halladas en el líquido hipotónico S y en el sonicado celular del remanente.

CEPA	ALELO	% FOSFODIESTERASA CICLICA		% TREONINA DESAMINASA	
		S	C	S	C
DA470	<u>fts-131</u>	67,8	6,2	1,0	0
DA471	<u>fts<sup>+</sup></u>	72,6	13,5	3,4	0

tos puntos del cromosoma. Se seleccionaron en forma independiente recombinantes prototróficos para cada uno de los marcadores presentes en la cepa receptora y se observó que el 40% de los derivados nadA<sup>+</sup> his<sup>+</sup> tenían forma redonda lo que indicó que la mutación rod-1 se encontraba cerca del marcador nadA (unidad 17) (Sanderson y Hartman, 1978).

En esa zona del cromosoma de S. typhimurium no se conoce ningún gen relacionado con la forma celular, pero en el minuto 14 de Escherichia coli hay dos genes estrechamente ligados entre sí que cotransducen con el marcador lip y que están involucrados en el mantenimiento de la forma celular: pbpA y rodA (Tamaki y col., 1980; Spratt y col., 1980).

Con el objeto de establecer si la mutación rod-1 de DA139 correspondía a alguno de esos dos genes, se estudió su ligamiento con el marcador lip. En la Tabla IV se observa que 313 de los 493 transductantes lip<sup>+</sup> seleccionados en el cruzamiento de SA342 (lip-2) con fago crecido en DA139 eran redondos lo que indica que rod cotransduce con lip con una frecuencia del 63,5%; además, la mutación que produce la alteración morfológica en DA139 está también ligada con leuS, otro marcador de la zona, ya que se comprobó que el 9,9% de los recombinantes leuS<sup>+</sup> obtenidos al transducir CV356 (leuS3) con fago DA139 tenían forma esférica. Los ligamientos detectados entre rod y lip y entre rod y leuS indican que la mutación de redondez de DA139 está ubicada en el gen de S. typhimurium homólogo al gen pbpA o bien al gen rodA de E. coli.

Un estudio genético similar llevado a cabo con las mutaciones responsables de la forma redonda de DA138 y DA140 mostró frecuencias de transducción semejantes a las halladas en el caso de DA139 (Tabla IV). Este resultado, sumado al estrecho parentesco que existe entre las tres cepas, permite con-

TABLA IV: Frecuencias de cotransducción observadas entre marcadores situados en la unidad 14 del mapa genético de S. typhimurium.

CEPA DADORA	CEPA RECEPTORA	MARCADOR SELECCIONADO	NUMERO RECOMBINANTES	MARCADOR NO SELECCIONADO	Nº RECOMBINANTES CON MARCADOR SELECCIONADO	FRECUENCIA DE COTRANSDUCCION %
DAL39	SA342	<u>lip<sup>+</sup></u>	493	<u>rod-1</u>	313	63,5
	CV356	<u>leuS<sup>+</sup></u>	505	<u>rod-1</u>	50	9,9
DAL38	SA342	<u>lip<sup>+</sup></u>	144	<u>rod-1</u>	94	65,2
	CV356	<u>leuS<sup>+</sup></u>	286	<u>rod-1</u>	35	12,2
DAL40	SA342	<u>lip<sup>+</sup></u>	133	<u>rod-1</u>	84	63,1
	CV356	<u>leuS<sup>+</sup></u>	384	<u>rod-1</u>	70	18,2
SA342	CV356	<u>leuS<sup>+</sup></u>	413	<u>lip-2</u>	28	6,8

cluir que sus alteraciones morfológicas se deben a la presencia de la misma mutación rod-1 que habría aparecido en una de las primeras etapas de la selección de esta familia de cepas, antes de la diferenciación de DA138, DA139 y DA140 (ver Fig. 2).

En base a las frecuencias de cotransducción halladas entre rod y los marcadores lip y leuS y al ligamiento detectado entre lip y leuS (6,8%) (Tabla IV), se construyó el mapa de la Fig. 11 donde se representa la posición relativa de los tres marcadores.

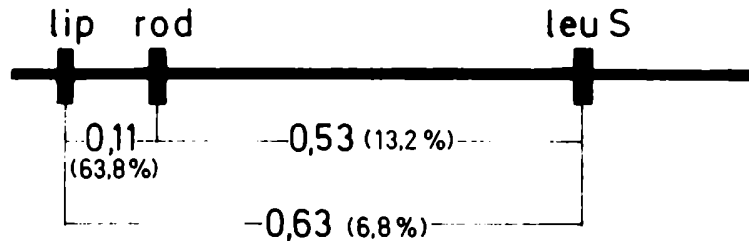


Fig. 11: Representación esquemática de la posición de rod con respecto a los marcadores lip y leuS. Los números indican las distancias entre los marcadores calculadas según la fórmula de Kemper (1974); entre paréntesis se muestran las frecuencias de cotransducción halladas entre ellos.

Con el objeto de estudiar la dominancia de la mutación rod-1, y a-



provechando que *S. typhimurium* no utiliza lactosa ( $\text{lac}^-$ ) por tener una deficiencia en la zona del operón correspondiente, se cruzó una cepa F-prima de *E. coli* cuyo factor F lleva integrado el trozo de cromosoma bacteriano que comprende los alelos  $\text{rod}^+$  y  $\text{lac}^+$  con una receptora  $\text{rod}-1$  de *S. typhimurium* y se seleccionaron recombinantes  $\text{lac}^+$ .

Por microscopía óptica se observó que esos derivados  $\text{lac}^+$ , que se comportaban como diploides parciales porque segregaban con alta frecuencia colonias  $\text{lac}^-$ , tenían forma bacilar (Fig. 12A) en tanto que los segregantes haploides  $\text{lac}^-$  mantenían su forma esférica (Fig. 12B). Estos resultados indican que la mutación  $\text{rod}-1$  es recesiva respecto al alelo salvaje aportado por el F prima de *E. coli*.

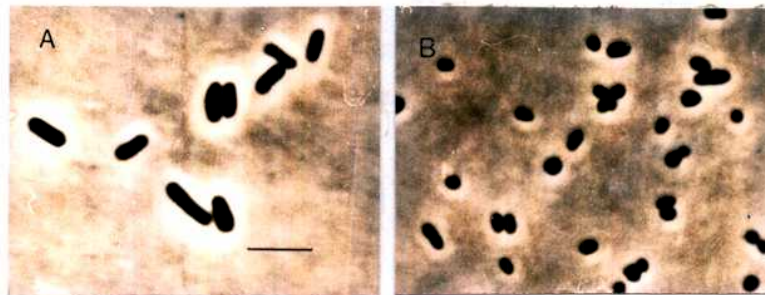


Fig. 12: Forma celular de un diploide parcial  $\text{rod}^+$   $\text{lac}^+/\text{rod}-1$  (A) y de un segregante  $\text{rod}-1$  (B) crecidos en caldo nutritivo a 37°C. La barra representa 5  $\mu$ .

## 2.2. Estudio de las proteínas captadoras de penicilina (PBPs) en una cepa rod-1.

De los dos genes involucrados en la morfología celular que mapean en el minuto 14 de E. coli, pppA es el gen estructural de la proteína captadora de penicilina 2 (PBP-2) en tanto que el gen rodA no interviene en la aparición de esa proteína (Spratt y col., 1980; Tamaki y col., 1980).

Dado que rod-1 está ubicada en la misma zona que estos genes, y con el objeto de determinar a cuál de ellos corresponde, se analizó la presencia de la PBP-2 en las cepas isogénicas DA587 (rod-1) y DA588 (rod<sup>+</sup>) obtenidas como transductantes lip<sup>+</sup> de una cepa lip-2 (SA342) cruzada con fago crecido en DA139.

Con ese propósito se incubó la fracción de membranas de ambas cepas con <sup>14</sup>C-Bencil penicilina durante 10 minutos, se solubilizaron las proteínas de la membrana interna con un detergente específico y se las separó por electroforesis en placa de poliacrilamida tal como se describe en Materiales y Métodos.

En la Fig. 13 se observa que la distribución de las PBPs de DA587 es semejante a la de DA588 y que en ambas cepas está presente la PBP-2 de aproximadamente 66.000 daltons. Este resultado permite concluir que la mutación rod-1 es homóloga a las mutaciones rodA de E. coli porque, al igual que éstas, no afecta al gen estructural de la PBP-2.

## 2.3. Propiedades de una cepa rod-1.

La Tabla V muestra las propiedades de DA139 y las de las cepas DA587 (rod-1) y DA588 (rod<sup>+</sup>) cuyo origen fue detallado en el punto anterior. Se ob-

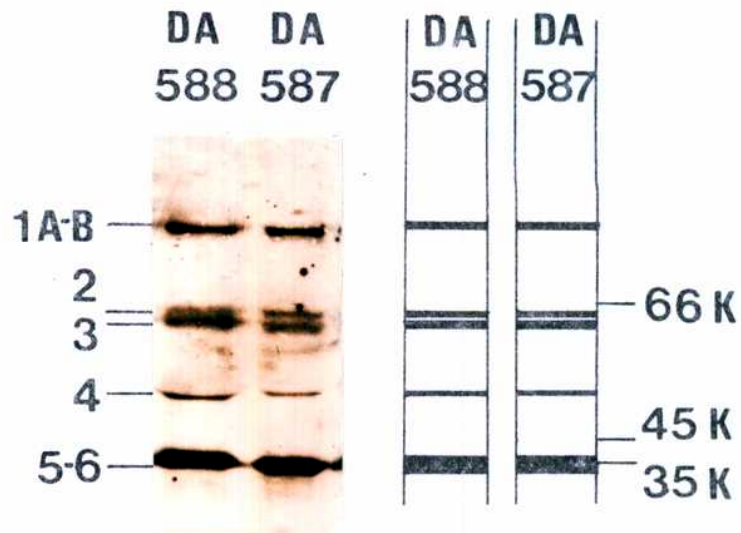


Fig. 13: Distribución de las proteínas captadoras de penicilina (PBPs) en DA588 (rod<sup>+</sup>) y DA587 (rod-1). Las fracciones de membranas de ambas cepas fueron incubadas con <sup>14</sup>C-Bencil penicilina durante 10 minutos a 30°C. Al cabo de ese período, las proteínas fueron solubilizadas selectivamente con Sarkosyl y posteriormente fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (Materiales y Métodos). Las bandas de las PBPs fueron reveladas por fluorografía utilizando una película X-Omat AR de Kodak. Se indican también las distancias de migración de las proteínas usadas como referencia: albúmina bovina (66.000 daltons), albúmina de huevo (45.000 daltons) y pepsina (35.000 daltons).

serva que tanto DA587 como DA139 tienen forma celular redonda, presentan un nivel autolítico elevado, fermentan anormalmente maltosa y son sensibles a cicloserina, mientras que DA538 es normal respecto a esas propiedades.

A pesar de las semejanzas existentes entre DA139 y DA587, ambas cepas difieren en su respuesta a desoxicolato y anaranjado de acridina ya que mientras DA139 es sensible a desoxicolato y resistente a anaranjado de acridina, DA587 es resistente al detergente pero no crece en presencia del colorante.

Los resultados presentados indican que la mutación rod-1 es responsable no sólo de la forma celular redonda sino que también produce un incremento en la sensibilidad a cicloserina y anaranjado de acridina, un aumento en el nivel autolítico y anomalías en la fermentación de maltosa, pero no está involucrada en la sensibilidad a desoxicolato detectada en DA139. La resistencia a anaranjado de acridina de DA139 sugiere que en esta cepa el efecto de rod-1 sobre la respuesta a ese colorante está enmascarado por una de las mutaciones presentes en ella o, quizás, por alguna aún no identificada.

Por último, mientras la sobrevida de DA588 frente a 1 µg de mecilina, un antibiótico que se une específicamente a la PBP-2 (Spratt y Pardee, 1975), es de aproximadamente  $10^{-5}$ , la de DA587 alcanza valores de  $10^{-2}$  lo que indica que la mutación rod-1 produce también un aumento en la resistencia a esa droga.

#### 2.4. Comportamiento de una cepa rod-1 frente al shock osmótico.

Con el objeto de detectar posibles alteraciones en la envoltura celular de una cepa rod-1 se estudió el comportamiento de DA587 frente al shock

TABLA V: Propiedades de DA139 y de las cepas DA587 (rod-1) y DA588 (rod<sup>+</sup>) obtenidas por transducción de SA342 (Lip-2) con fago crecido en DA139.

CEPA	ALELO	FORMA CELULAR	RESPUESTA A (1)				FERMENTACION DE MALTOSA (2)
			CICLOSERINA	DESOXICOLATO	ACRIDINA	AUTOLISIS %	
DA588	<u>rod<sup>+</sup></u>	Bacilar	R	R	R	24,11	Normal
DA587	<u>rod-1</u>	Redonda	S	R	S	50,62	Anormal
DA139	<u>rod-1</u>	Redonda	S	S	R	50,61	Anormal

1: Cicloserina, 20 µg/ml; desoxicolato, 3 mg/ml; anaranjado de acridina, 100 µg/ml; R, resistente S, sensible.

2: Probada en EMB maltosa; Normal, producción de colonias color verde metálico; Anormal, formación de colonias color rojo opaco.

osmótico y se lo comparó con el de la cepa isogénica DA588.

Con ese propósito las cepas fueron sometidas al shock osmótico y al tratamiento control isotónico (Materiales y Métodos) y en los medios externos resultantes de ambos tratamientos se midieron las actividades de dos enzimas citoplásmicas (treonina desaminasa y ornitina transcarbamilasa) y la de una enzima periplásmica (fosfodiesterasa cíclica).

En la Tabla VI se observa que DA588 (rod<sup>+</sup>) tiene un comportamiento normal ya que, por un lado, libera grandes cantidades de fosfodiesterasa al medio S del shock osmótico pero no al medio C del tratamiento control y, por otro lado, no se lisa cuando es sometida al tratamiento hipotónico como lo evidencia el bajo porcentaje de enzimas citoplásmicas detectado en el medio S.

Por su parte, DA587 (rod-1) muestra dos evidentes anomalías. En primer lugar, no sólo libera un alto porcentaje de enzima periplásmica al medio S sino que también lo hace cuando es sometida al tratamiento control isotónico (47% de fosfodiesterasa en el medio C). La liberación de material periplásmico al medio externo, independientemente de la presión osmótica de éste, indica que la cepa es afectada en forma anormal por la etapa de sensibilización con HCl Tris - sacarosa - EDTA común al tratamiento control y al de shock. Dado que la sensibilización actúa fundamentalmente sobre la membrana externa, este resultado sugiere que DA587 presenta alguna alteración en esa capa de la envoltura celular.

Por otra parte, si bien en el medio C no se detectan cantidades apreciables de las enzimas citoplásmicas, en el medio S se encuentra un 35% de la treonina desaminasa y un 55% de la ornitina transcarbamilasa lo que indica que esta cepa se lisa cuando es sometida al shock osmótico.

TABLA VI: Efecto del shock osmótico sobre la liberación de la enzima periplásmica fosfodiesterasa cíclica y las citoplásmicas ornitina transcarbamilasa y treonina desaminasa en DA587 y DA588. Se midió la actividad de las tres enzimas en los medios resultantes de someter a ambas cepas al shock osmótico y al tratamiento isotónico control (medios S y C respectivamente). Los valores obtenidos en cada caso se expresaron como porcentaje de la actividad total que fue calculada sumando las actividades halladas en el medio S y las medidas en el sonificado celular del remanente.

CEPA	ALELO	% FOSFODIESTERASA CICLICA		% TREONINA DESAMINASA		% ORNITINA TRANSCARBAMILASA	
		S	C	S	C	S	C
DA587	<u>rod-1</u>	67,7	46,5	35	3,4	55,4	7,8
DA588	<u>rod<sup>+</sup></u>	67,7	13,7	3,5	1,5	10,8	7,4

La fragilidad osmótica de DA587 sugiere que esa cepa presenta alguna alteración en su capa rígida lo que, sumado a la modificación en la membrana externa mencionada previamente, indicaría que la mutación rod-1 produce alteraciones en por lo menos dos de las capas de la envoltura celular.

### 3. EFECTO DE fts-131 Y rod-1 SOBRE LAS MANIFESTACIONES DE LA DESREPRESION DEL OPERON HISTIDINA.

Se ha postulado que las mutaciones aparecidas entre los derivados hisO1242 viables de las cepas hipersensibles al exceso de las proteínas hisH e hisF, entre las que se encuentran fts-131 y rod-1, fueron seleccionadas positivamente por ejercer algún efecto supresor sobre las alteraciones producidas por la desrepresión del operón histidina (Antón, 1979).

Con el objeto de analizar esta hipótesis, y teniendo en cuenta que la desrepresión de ese operón produce la inhibición de la división celular en la mayor parte de las cepas (Murray y Hartman, 1972), y además la letalidad en por lo menos tres cepas denominadas hipersensible (Savic, 1972; Ely y col. 1974; Antón, 1979) (ver Introducción), se investigó la acción de fts-131 y rod-1 sobre ambas manifestaciones de la expresión constitutiva del operón histidina.

#### 3.1. Efecto de fts-131 y rod-1 sobre la inhibición de la división celular en cepas constitutivas.

Para realizar este estudio se construyeron derivados fts-131 y rod-1 de las cepas constitutivas para el operón histidina DA37 y DA676, a las



que se denominaron DA499 y DA679 respectivamente, y se comparó su comportamiento con el de las isogénicas fts<sup>+</sup> y rod<sup>+</sup> (DA500 y DA678) (ver Tabla I).

En la Fig. 14 se observa que debido a la inhibición de la división las cepas constitutivas fts<sup>+</sup> y rod<sup>+</sup> forman filamentos heterogéneos cuando crecen a 37°C en medio adicionado con 2% de glucosa (A y C). Por el contrario, sus derivados fts-131 y rod-1 se dividen normalmente originando bacilos y células redondas respectivamente (B y D) lo que indica que ambas mutaciones son capaces de suprimir la falta de división celular producida por la desrepresión del operón histidina.

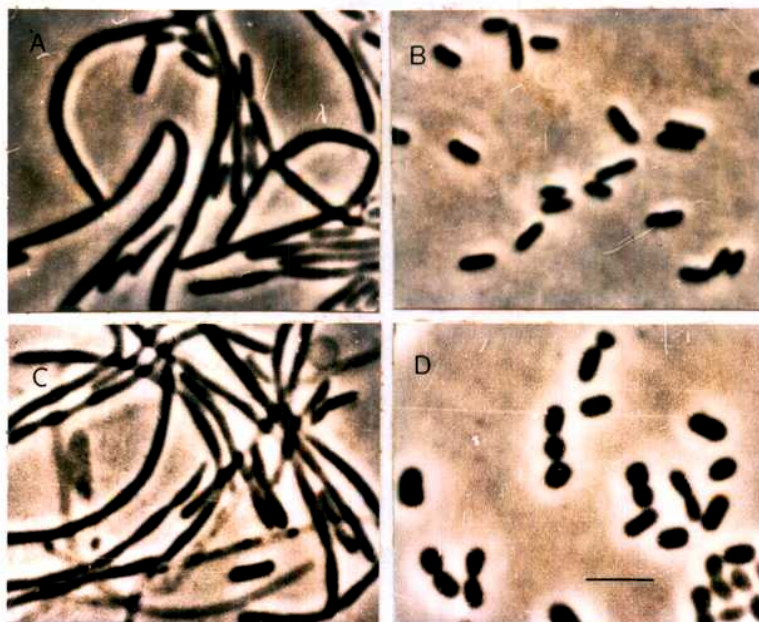


Fig. 14: Morfología de las cepas DA500 (hisU1206 hisW1824 fts<sup>+</sup>) (A), DA499 (hisU1206 hisW1824 fts-131) (B), DA678 (hisO1832 rod<sup>+</sup>) (C) y DA679 (hisO1832 rod-1) (D) crecidas en medio con 2% de glucosa a 37°C. La barra representa 5 $\mu$ .

### 3.2. Efecto de fts-131 sobre la falta de viabilidad de las cepas hipersensibles.

La cepa SB2299 es hipersensible a altos niveles de síntesis de las proteínas hisH e hisF y por ello no origina transductantes hisF<sup>+</sup> cuando es cruzada con fago crecido en una cepa hisO1242, una mutación que produce un alto nivel de desrepresión del operón histidina, en tanto que sí los forma con fago salvaje (Savic, 1972).

Con el objeto de investigar el efecto de fts-131 sobre dicha hipersensibilidad, se pasó esa mutación al derivado leu-1262 de SB2299 (DA636) transduciéndolo con fago crecido en DA138. Los recombinantes fts-131 leu<sup>+</sup> y fts<sup>+</sup> leu<sup>+</sup> de SB2299 así obtenidos fueron cruzados con fago hisO1242 y con fago salvaje a fin de analizar la aparición de colonias hisF<sup>+</sup>.

Se observó que, así como ocurre con la cepa parental, los derivados fts<sup>+</sup> de SB2299 producen transductantes hisF<sup>+</sup> cuando son cruzados con fago salvaje pero no los forman con fago hisO1242. Por el contrario, los derivados fts-131 originan transductantes hisF<sup>+</sup> cuando son cruzados tanto con fago salvaje como con fago crecido en una cepa hisO1242 lo que indica que esta mutación suprime la letalidad producida por altos niveles de desrepresión del operón histidina en SB2299.

El efecto de rod-1 sobre la hipersensibilidad no ha podido estudiarse debido a que esa mutación produce, por causas aún no establecidas, una marcada disminución de la transducibilidad de las cepas lo que impide poner de manifiesto dicha expresión de la desrepresión del operón histidina.

## CAPITULO IV

## DISCUSION

En este trabajo se realizó el estudio genético y fisiológico de dos alteraciones aparecidas espontáneamente entre las cepas DA138, DA139 y DA140 y sus efectos sobre la filamentación y la hipersensibilidad de la cepa en la que se originaron.

1. Alteración de la división celular en DA138.

La termosensibilidad de DA138 se debe a la presencia de la mutación fts-131, ubicada en la unidad 3 del cromosoma de S. typhimurium, que produce a 42°C la inhibición de la división celular con la consiguiente formación de filamentos.

De acuerdo a estudios realizados en E. coli, un organismo estrechamente emparentado con S. typhimurium, la zona de la unidad 3 tiene gran importancia en el control de la división celular ya que en ella abundan los genes conectados con esa función (ftsA, ftsZ y envA), con la síntesis de mureína (murE, murC, murF, mraA, mraB y ddl) o con ambos fenómenos a la vez (pbpB) (Bachmann y Low, 1980).

El comportamiento general de las cepas fts-131 es semejante al de los derivados ftsA, ftsZ y pbpB de E. coli. Se han descrito algunas diferencias entre esos tres tipos de mutantes tales como la presencia de septos incompletos en las cepas pbpB (Walker y col., 1975) o el requerimiento de síntesis

sis de ADN y proteínas para la recuperación de los filamentos ftsA a 32°C (Tormo y col., 1980). Sin embargo, el hecho de que en cada caso se haya estudiado un solo mutante, sumado a la dificultad para clasificar mutantes provenientes de diferentes reaslamientos y genotipos, hacen que esas características no sean suficientemente concluyentes para asegurar que los filamentos fts-131, que no las presentan, sean producidos por alteración del gen ftsZ o de alguno aún no identificado.

Los resultados presentados indican que la inhibición de la división celular producida por fts-131 a 42°C se debe a la alteración de un paso terminal del ciclo celular posterior a la duplicación del cromosoma y a todos los eventos que requieren síntesis de proteínas, pero anterior a la etapa de polimerización de la mureína catalizada por una proteína (la PBP-3) que tiene actividad de transglicosilasa y transpeptidasa y parece estar involucrada en la construcción del septo (Ishino y Matsushashi, 1981; Botta y Park, 1981).

La incapacidad de los mutantes fts-131 de dividirse a 42°C parece indicar que el producto de fts-131, necesario para la división celular, es termosensible. Sumado a ello, la recuperación de los filamentos fts-131 a bajas temperaturas, aún en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, sugeriría que la inactivación del producto de fts-131 a 42°C es reversible y que es suficiente el pasaje a 32°C para que esa proteína recupere su configuración normal y se complete el proceso de división.

Los filamentos fts-131 pueden dividirse a 42°C si la presión osmótica del medio se eleva de 0,09 a 0,25 M; pero, a diferencia de lo que ocurre por pasaje a temperaturas permisivas, las divisiones inducidas por el agrega-

do de sales son anuladas por la adición de inhibidores de la síntesis proteica. Este hecho sugiere que en este caso la recuperación no se debe a la normalización de la proteína fts-131 sino que requiere la síntesis de nueva proteína. Si bien se han descrito otros mutantes termosensibles (alterados en la división celular o en la síntesis de fosfolípidos) que se normalizan a temperatura no permisiva por el agregado de sales sin que haya renaturalización de la proteína alterada (Reeve y col., 1970; Ohta y Shibuya, 1977), la explicación de este hecho no es sencilla. Para el caso de fts-131 podría postularse que el aumento de la presión osmótica modifica la envoltura permitiendo la división celular a 42°C aún en ausencia del producto de fts-131, y que para ello se necesita la síntesis de una proteína de baja estabilidad cuya función podría ser la de adaptar la cubierta a las nuevas condiciones osmóticas.

La hipótesis de la termosensibilidad de la proteína fts-131 y su renaturalización a bajas temperaturas concuerda con el normal crecimiento mostrado por las cepas fts-131 a 37°C y temperaturas inferiores ya que en esas condiciones la proteína funcionaría normalmente. Sin embargo, se ha comprobado que la mutación fts-131 es capaz de anular a 37°C la inhibición de la división celular que las cepas constitutivas para el operón histidina sufren cuando crecen en medio con 2% de glucosa. Este efecto supresor parece ser específico para la inhibición de la división producida por el exceso de las proteínas hisH e hisF ya que fts-131 no impide la filamentación causada por el agregado de ácido nalidíxico o penicilina (datos no presentados). La manifestación de fts-131 a 37°C indicaría que la normalidad de la proteína fts-131 a

esa temperatura no es completa y que, sin llegar a impedir la división celular, produce desequilibrios metabólicos que compensan los efectos de la desrepresión del operón histidina.

Recientemente se han identificado varios genes cuyos productos son necesarios para el crecimiento a altas temperaturas pero no a 37°C (Yamamori y col., 1978; Neidhart y col., 1981). Este hallazgo permite postular una hipótesis alternativa a la de la termosensibilidad de fts-131 y su parcial normalización a temperaturas permisivas. En base a ella, la mutación fts-131 produciría la pérdida de una proteína necesaria para la expresión de la constitutividad del operón histidina que, además, estaría involucrada en el proceso de división celular a 42°C. La reanudación de la división a 42°C en presencia de sales se explicaría por el mismo mecanismo postulado para la otra hipótesis.

La identificación del producto del gen afectado por fts-131, así como un mejor conocimiento del mecanismo de inhibición de las proteínas hisH e hisF, seguramente permitirán comprender el modo de acción de la mutación fts-131 y su capacidad para estimular o inhibir, según el caso, la división celular.

El otro efecto notable de fts-131 a 37°C es el de suprimir la hipersensibilidad que presenta la cepa SB2299 frente a altos niveles de desrepresión del operón histidina. La similitud existente entre esa hipersensibilidad y la manifestada por DA78 sugiere que fts-131 puede anular también la hipersensibilidad de esa última cepa. El estudio de 41 derivados hisO1242 de DA78 permitió identificar, además de fts-131, otras dos mutaciones termosensibles de origen

independiente y ubicadas en la unidad 3, que inhiben la división celular a 42°C y suprimen la hipersensibilidad de SB2299 a 37°C (Antón, 1979; De Micheli, 1980). Tan alta frecuencia de aparición de este tipo de mutantes (3/41) en condiciones no selectivas demuestra la existencia de una ventaja adaptativa de los mismos que consiste, sin duda, en la capacidad de esas mutaciones de suprimir la hipersensibilidad de la cepa en la que se originaron.

Se ha postulado que las cepas hipersensibles tienen alguna alteración en la envoltura celular que las hace particularmente sensibles al efecto inhibitorio de hisH e hisF, y que las mutaciones capaces de suprimir dicha hipersensibilidad producen modificaciones en la envoltura que contrarrestan la alteración original (Antón, 1979). No se han observado hasta el presente alteraciones en la envoltura de las cepas hipersensibles (De Micheli, 1982) y los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las cepas fts-131 son similares a las salvajes en cuanto a diversas propiedades que involucran la envoltura celular tales como la respuesta a cicloserina y desoxicolato, el nivel autolítico, el tipo de fermentación de maltosa y el comportamiento frente al shock osmótico. Sin embargo, el efecto de la mutación fts-131 en un proceso tan estrechamente vinculado a la envoltura celular como es el de la división sugiere que tal alteración de la cubierta podría existir aunque las pruebas realizadas no la hayan detectado, y que se requieren otros ensayos para ponerla de manifiesto.

## 2. Alteración de la forma celular de DA138, DA139 y DA140.

La forma celular redonda de las cepas DA138, DA139 y DA140 se debe a la presencia de la mutación recesiva rod-1 ubicada en la unidad 14 del mapa

genético de S. typhimurium.

El análisis de mutantes redondos de E. coli ha permitido identificar, además del gen envB ubicado en el minuto 70 (Westling-Haggstrom y Nor-mark, 1975), los genes pbpA y rodA que están estrechamente ligados entre sí y mapean en el minuto 14 (Spratt, 1980). El gen pbpA es el gen estructural de la PBP-2 pero los genes rodA y envB no parecen modificar dicha proteína (Iwaya y col., 1978; Spratt y col., 1980; Tamaki y col., 1980).

Dado que rod-1 se encuentra en la misma zona que los genes pbpA y rodA de E. coli y que, además, no interfiere con la presencia de la PBP-2, se ha concluido en este trabajo que dicha mutación afecta a un gen, hasta ahora no conocido de S. typhimurium, que es homólogo al gen rodA de E. coli.

rodA es el tercer gen descrito en S. typhimurium que participa en el mantenimiento de la forma bacilar ya que todos los mutantes esféricos conocidos hasta el presente correspondían al gen envB, homólogo al gen envB de E. coli (Antón, 1978) o a un gen ubicado en la unidad 56 y denominado divD (Wyche y col., 1974; Antón y col., 1983). De acuerdo a los estudios realizados en E. coli, parece probable que el método de selección positiva de mutantes redondos por resistencia a mecilina (Iwaya y col., 1978) permita la obtención de derivados pbpA lo que elevaría a cuatro el número de genes involucrados en el proceso morfogénico de Salmonella; si bien divD no ha sido descrito en E. coli, los factores F-prima de esa especie que contienen la zona cromosómica en la que ese gen debería hallarse (minuto 56) normalizan la forma de los mutantes divD de S. typhimurium (Wyche y col., 1974) lo que demuestra que el alelo salvaje de divD está presente en E. coli.



Dado que el mantenimiento de la forma celular depende en gran medida de la arquitectura de la capa rígida, podría esperarse que la alteración morfológica detectada en los mutantes redondos estuviera acompañada por modificaciones en ese componente de la envoltura celular.

En este trabajo se ha comprobado que, además de la forma celular esférica, las cepas rod-1 tienen otras características anómalas, tales como el elevado nivel autolítico y la fragilidad osmótica frente al shock osmótico, que también podrían atribuirse a modificaciones en la capa rígida. Se ha observado (De Micheli y Antón, datos no publicados) que los mutantes redondos del tipo envB y divD también presentan un alto nivel autolítico y que las cepas envB son osmóticamente frágiles (no se ha estudiado el comportamiento de las cepas divD) frente al shock osmótico); estos hechos avalan la hipótesis de que las mutaciones que producen el redondeamiento celular modifican las propiedades de la capa rígida de la envoltura.

El defectuoso funcionamiento de la capa rígida en los tres tipos de mutantes redondos conocidos en S. typhimurium sugiere que esos tres genes podrían estar involucrados en una o más etapas de la síntesis de mureína. Sin embargo, ciertas características de las cepas rod-1 sugieren que esa mutación produce además alteraciones en otro componente de la cubierta celular. A ese respecto, el aumento en la sensibilidad a cicloserina y anaranjado de acridina mostrados, no sólo por las bacterias rod-1 sino también por las cepas envB y divD, y la excesiva liberación de material periplásmico por tratamiento con una solución de HCl Tris - sacarosa - EDTA detectada tanto en los mutantes rod-1 como en los envB (no se investigó este aspecto de las cepas divD) (An-

tón, 1979; De Micheli y Antón, datos no publicados), pueden interpretarse como debidas a un deficiente funcionamiento de la membrana externa. Aunque estas propiedades de las mutaciones de forma esférica podrían ser efectos pleiotrópicos de las mismas, no puede descartarse que sean efectos secundarios de la alteración de la capa rígida ya que el funcionamiento de la membrana externa depende en gran medida de la estructura de esta capa a la cual se encuentra estrechamente asociada a través de la lipoproteína de Braun (Inouye, 1974; Yem y Wu, 1978).

Otra propiedad de la mutación rod-1 es la de incrementar considerablemente la resistencia a mecilinam. Este antibiótico está emparentado estructuralmente con la penicilina (Lund y Tybring, 1972) pero a diferencia de ella sólo se une en forma específica con la PBP-2 (Spratt y Pardee, 1975). Usado en bajas concentraciones, el mecilinam produce redondeamiento celular pero a dosis más altas tiene un poderoso efecto bactericida. La mayor resistencia de las cepas rod-1 a mecilinam, a pesar de tener presente la PBP-2, indica que esta proteína, aunque capta específicamente la droga, no es el blanco de su acción letal.

Las cepas envB son también resistentes a ese antibiótico, pero las divD son tan sensibles como las cepas salvajes (Antón y col., 1983). Esa propiedad, que constituye una de las más evidentes diferencias funcionales detectadas hasta ahora entre los diversos tipos de mutantes redondos, indica que el efecto deletéreo de mecilinam tampoco está relacionado con la forma bacilar. Asimismo, el aislamiento de numerosos mutantes resistentes entre los que se encuentran, además de las cepas redondas, otras que conservan su mor-

fología normal (De Micheli, 1982) confirmaría este hecho.

La mutación rod-1 es capaz de suprimir la inhibición de la división celular de las cepas constitutivas para el operón histidina pero no ha podido documentarse concluyentemente se efecto sobre hipersensibilidad. La información genética obtenida en este trabajo indica que rod-1 apareció antes de la diferenciación de DA138, DA139 y DA140 y que posteriormente en esa cepa rod-1 original se seleccionaron espontáneamente otras mutaciones, que como fts-131 en DA138 y las mutaciones polares his<sup>-</sup> en DA139, anulan completamente los efectos de la constitutividad. Este hecho indica que si rod-1 tiene algún efecto sobre la hipersensibilidad, éste no es completo. Resulta evidente, sin embargo, que la forma celular redonda es ventajosa para las cepas hipersensibles ya que entre 41 derivados hisO1242 viables de DA78 se encontraron, además de las tres cepas rod-1 estudiadas en este trabajo, un mutante envB y otro del tipo divD (Antón, 1979). A semejanza con lo que ocurre con rod-1, las mutaciones envB y divD también anulan la filamentación de las cepas constitutivas (Antón y col., 1983) lo que sugiere que la ventaja adaptativa de las mutaciones de forma radica justamente en su capacidad para suprimir esa manifestación de la desrepresión.

### 3. Consideraciones finales.

Se ha demostrado que las mutaciones fts-131 y rod-1 tienen la propiedad de suprimir la filamentación de las cepas constitutivas para el operón histidina; sumado a ello, fts-131 es capaz de anular completamente la hipersensibilidad presentada por ciertas cepas al exceso de los productos de los genes hisH e hisF, en tanto que rod-1 no la afecta o lo hace sólo en forma parcial.

El efecto de las dos mutaciones sobre las manifestaciones de la desrepresión de las enzimas de histidina concuerda con la hipótesis de que esas mutaciones confieren una ventaja selectiva a las cepas hipersensibles en las que se producen, y explica su presencia entre los derivados hisO1242 viables de DA78.

A pesar de haber sido seleccionadas en el mismo sistema y compartir la capacidad de suprimir total o parcialmente los efectos de la desrepresión, las dos mutaciones estudiadas presentan características muy disímiles; se ha observado que rod-1 produce alteraciones en el comportamiento de dos capas de la envoltura pero no interfiere con el crecimiento ni la división celular, en tanto que fts-131 no parece afectar la cubierta pero altera un paso de la división previo a la síntesis de la mureína del septo. Las modificaciones producidas por las mutaciones fts-131 y rod-1 sugieren que el sistema de selección basado en la hipersensibilidad es un método eficaz para la obtención de mutantes con alteraciones en diferentes funciones de la envoltura celular. Resulta evidente que el estudio de esos mutantes puede proveer mucha información, no sólo acerca de los diferentes componentes de la envoltura, sino también sobre el modo de acción de las proteínas hisH e hisF y el papel de la cubierta en el control de la división celular.

## C A P I T U L O V

### B I B L I O G R A F I A

- Adams, M. H., 1959. Bacteriophages. New York, Interscience Publishers, Inc.
- Ames, G. F., 1968. Lipids of Salmonella typhimurium and Escherichia coli: structure and metabolism. J. Bacteriol., 95: 833-843.
- Antón, D. N. y Orce, L. V., 1976. Envelope mutation promoting autolysis in Salmonella typhimurium. Mol. gen Genet., 144: 97-105.
- Antón, D. N., 1978. Genetic control of defective cell shape and osmotic-sensitivity in a mutant of Salmonella typhimurium. Mol. gen. Genet., 160: 277-286.
- Antón, D. N., 1979. Positive selection of mutants with cell envelope defects of a Salmonella typhimurium strain hypersensitive to the products of genes hisF and hisH. J. Bacteriol., 137: 1271-1281.
- Antón, D. N., De Micheli, A. T. y Palermo, A. M., 1983. Isolation of round-cell mutants of Salmonella typhimurium. Can. J. Microbiol, en prensa.
- Rachmann, B. J. y Low, B. K., 1980. Linkage map of Escherichia coli K-12, Edition 6. Microbiol. Rev., 44: 1-56.

- Bayer, M. E., 1979. Bacterial outer membranes. Biogenesis and functions. M. Inouye Ed., New York, John Wiley and Sons.
- Begg K. J. y Donachie, W. D., 1977. Growth of the Escherichia coli cell surface. J. Bacteriol., 129: 1524-1536.
- Bell, R. M., Mavis, R. D., Osborn, M. J. y Vagelos, P. R., 1971. Enzymes of phospholipid metabolism: localization in the cytoplasmic and outer membrane of the cell envelope of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Biochim. Biophys. Acta, 249: 628-635.
- Berg, H. C. y Anderson, R. A., 1973. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. Nature, 245: 380-382.
- Botta, G. A. y Park, J. T., 1981. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. J. Bacteriol., 145: 333-340.
- Brown, D. A. y Berg, H. C., 1974. Temporal stimulation of chemotaxis in Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci., 71: 1388-1392.
- Burdett, I. D. J. y Murray, R. G. E., 1974. Electron microscope study of septum formation in Escherichia coli strains B and B/r during synchronous growth. J. Bacteriol., 119: 1039-1056.
- Burns, R. O., 1971. L-Threonine deaminase. Biosynthetic (Salmonella typhimurium). Methods Enzymol., 17 B: 555-560.

- Cieřla, Z., Baędasarian, M., Szczurkiewicz, W., Przygońska, M. y Kłopotowski, T., 1972. Defective cell division in thermosensitive mutants of Salmonella typhimurium. Mol. gen. Genet., 116: 107-125.
- Clark, D. P. y Beard, J. P., 1979. Altered phospholipid composition in mutants of Escherichia coli sensitive or resistant to organic solvents. J. Gen. Microbiol., 113: 267-274.
- Cole, R. M., 1965. Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their parts. III. Bacterial cell-wall replication followed by immunofluorescence. Bacteriol. Rev., 29: 326-344.
- Coulton, J. W. y Murray, R. G. E., 1978. Cell envelope associations of Aquaspirillum serpens flagella. J. Bacteriol., 136: 1037-1049.
- De Micheli, A. T., 1980. Estudio de mutantes de envoltura en Salmonella typhimurium. Informe Final de la Beca de Iniciación del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- De Micheli, A. T., 1982. Estudio genético de la hipersensibilidad a las proteínas codificadas por los genes hisF e hisH y su supresión. Informe Final de la Beca de Perfeccionamiento del CONICET.
- De Micheli, A. T. y Antón, D. N., 1983. Estudio de la división celular en Salmonella typhimurium: propiedades de un mutante termosensible. Mendeliana, en prensa.
- Dix, D. y Helmstetter, C., 1973. Coupling between chromosome completion and cell division in Escherichia coli. J. Bacteriol., 115: 786-795.

- Duguid, J. P., Anderson, E. S. y Campbell, I., 1966. Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae. *J. Pathol. Bacteriol.*, 92: 107-138.
- Ely, B., Fankhauser, D. B. y Hartman, P. E., 1974. A fine structure map of Salmonella histidine operator-promoter. *Genetics*, 78: 607-631.
- Fung, J., Mac Alister T. J. y Rothfield, L. I., 1978. Role of murein-lipoprotein in morphogenesis of the bacterial division septum: phenotypic similarity of lykD and lpo mutants. *J. Bacteriol.*, 133: 1467-1471.
- Ghuysen, J. M. y Shockman, G. D., 1973. Bacterial membranes and walls. L. Leive Ed., New York, Marcel Dekker Inc.
- Hatefi Y. y Hanstein, W. G., 1974. Destabilization of membranes with chaotropic ions. *Methods. Enzymol.*, 31: 770-790.
- Hirota, Y., Ryter, A. y Jacob, F., 1968. Thermosensitive mutants of E. coli affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 33: 677-693.
- Inouye, M., 1974. A three dimensional molecular assembly model of a lipoprotein from the Escherichia coli outer membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71: 2396-2400.
- Ishino, F., Mitsui, K., Tamaki, S. y Matsushashi, M., 1980. Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of Escherichia coli penicillin-binding protein 1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97: 287-293.



- Ishino, F. y Matsuhashi, M., 1981. Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in Escherichia coli: a septum forming reaction sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101: 905-911.
- Iwaya, M. y Strominger, J. L., 1977. Simultaneous deletion of D-alanine carboxypeptidase 1B-C and penicillin-binding component IV in a mutant of Escherichia coli K-12. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 2980-2984.
- Iwaya, M., Jones, C. W., Khorana, J. y Strominger, J. L., 1978. Mapping of the mecillinam-resistant round morphological mutants of Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 133: 196-202.
- Jones, N. C. y Donachie, W. D., 1973. Chromosome replication, transcription and control of cell division in Escherichia coli. *Nature New Biology*, 243: 100-103.
- Kaback, H. R., 1972. Transport across isolated bacterial cytoplasmic membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 265: 367-416.
- Kamiryo, T. y Strominger, J. L., 1974. Penicillin-resistant temperature-sensitive mutants of Escherichia coli with synthesize hypo-or-hypercross linked peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, 117: 568-577.
- Kanazawa, H. y Wu, H. C., 1979. Lipoprotein synthesis in Escherichia coli spheroplasts: accumulation of lipoprotein in cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.*, 137: 818-823.

- Kemper, J., 1974. Gene order and co-transduction in the leu-ara-fol-pyrA region of the Salmonella typhimurium linkage map. J. Bacteriol., 117: 94-99.
- Konisky, J., 1979. Bacterial outer membranes. Biogenesis and functions. M. Inouye Ed., New York, John Wiley and Sons.
- Kundig, W., Ghosh, S. y Roseman, S., 1964. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. Proc. Nat. Acad. Sci., 52: 1067-1074.
- Kundig, W. y Roseman, S., 1971. Sugar transport. II. Characterization of constitutive membrane-bound enzymes II of the Escherichia coli phosphotransferase system. J. Biol. Chem., 246: 1407-1418.
- Laskey, R. A. y Mills, A. D., 1975. Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem., 50: 335-341.
- Lazdunski, C. y Shapiro, B. M., 1972. Isolation and some properties of cell envelope altered mutants of Escherichia coli. J. Bacteriol., 111: 495-498.
- Lin, E. C. C., Hirota, Y y Jacob, F., 1971. On the process of cellular division in Escherichia coli. VI. Use of a methocel-autoradiographic method for the study of cellular division in Escherichia coli. J. Bacteriol., 108: 375-385.

- Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P. y van Alphen, L., 1975. Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of Escherichia coli K-12 into four bands. *FEBS Lett.*, 53: 254-258.
- Lund, F. y Tybring, L., 1972.  $6\beta$ -amidinopenicillanic acids, a new group of antibiotics. *Nature New Biology*, 236: 135-137.
- Lutkenhaus, J. F., 1977. Role of a major outer membrane protein in Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 131: 631-637.
- Mangiarotti, G., Apirion, D. y Shlessinger, D., 1966. Selection of sucrose-dependent Escherichia coli to obtain envelope mutants and fragile cultures. *Science*, 153: 892-894.
- Manning, P. A. y Reeves, P., 1976. Outer membrane of Escherichia coli: differentiation of proteins 3A and 3B on acrylamide gels and further characterization of con (tolG) mutants. *J. Bacteriol.*, 127: 1070-1079.
- Manning, P. A. y Achtman, M., 1979. Bacterial outer membranes. Biogenesis and functions. M. Inouye, Ed., New York, John Wiley y Sons.
- Matsubashi, M., Kamiryo, T., Blumberg, P. M., Linnett, P., Willoughby, E. y Strominger, J. L., 1974. Mechanism of action and development of resistance to a new amidino penicillin. *J. Bacteriol.*, 117: 578-587.
- Matsubashi, M., Tamaki, S., Curtis, S. J. y Strominger, J. L., 1979. Mutational evidence for identity of penicillin-binding protein 5 in Escherichia coli with the major D-alanine carboxypeptidase IA activity. *J. Bacteriol.*, 137: 644-647.

- Mirelman, D., 1979. Bacterial outer membranes. Biogenesis and functions. H. Inouye Ed., New York, John Wiley and Sons.
- Murray, M. L. y Hartman, P. E., 1972. Overproduction of hisH and hisF gene products leads to inhibition of cell division in Salmonella. Can. J. Microbiol., 18: 671-681.
- Nakae, T. y Nikaido, H., 1975. Outer membrane as a diffusion barrier in Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem., 250: 7359-7365.
- Nakagawa, J. y Matsushashi, M., 1982. Molecular divergence of a major peptidoglycan synthetase with transglycosylase-transpeptidase activities in Escherichia coli: penicillin-binding protein 1Bs. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105: 1546-1553.
- Neidhart, F. C., Phillips, T. A., van Bogelen, R. A., Smith, M. W. y Subramanian, A. R., 1981. Identify of the B56.5 protein, the A-protein and the groE gene product in Escherichia coli. J. Bacteriol., 145: 513-520.
- Neu, H. C. y Heppel, L. A., 1965. The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J. Biol. Chem., 240: 3685-3692.
- Nishimura, Y., Suzuki, H., Hirota, Y. y Park, J. T., 1980. A mutant of Escherichia coli defective in penicillin-binding protein 5 and lacking D-alanine carboxypeptidase IA. J. Bacteriol., 143: 531-534.

- Ohta, A. y Shibuya, I., 1977. Membrane phospholipid synthesis and phenotypic correlation of an Escherichia coli pss mutant. J. Bacteriol., 132: 434-443.
- Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E. y Carson, J., 1972 a. Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem., 247: 3962-3972.
- Osborn, M. J., Gander, J. E. y Parisi, E., 1972 b. Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Site of synthesis of lipopolysaccharide. J. Biol. Chem., 247: 3973-3986.
- Picken, R. N. y Beachman, I. R., 1977. Bacteriophage-resistant mutants of Escherichia coli K-12. Location of receptors within the lipopolysaccharide. J. Gen. Microbiol., 102: 305-318.
- Piovant, M., Varenne, S., Pagés, J. M. y Lazdunski, C., 1978. Preferential sensitivity to syntheses of exported proteins to translation inhibitors of low polarity in Escherichia coli. Mol. gen. Genet. 164: 265-274.
- Prescott, L. H. y Jones, M. E., 1969. Modified methods for the determination of carbamyl aspartate. Anal. Biochem., 32: 408-419.
- Reeve, J. N., Groves, D. J. y Clark, D. J., 1970. Regulation of cell division in Escherichia coli: characterization of temperature-sensitive division mutants. J. Bacteriol., 104: 1052-1064.

- Picard, M. e Hirota, Y., 1973. Effet des sels et autres composés sur le phenotype de mutants thermosensibles de Escherichia coli. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 124A: 29-43.
- Rosenberg, B. H. y Cavalieri, L. F., 1968. Shear sensitivity of the E. coli genome: multiple membrane attachment points of the E. coli DNA. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 33: 65-72.
- Rosen, B. P. y Heppel, L. A., 1973. Bacterial membranes and walls. L. Leive Ed., New York, M. Dekker Inc.
- Roth, J. R., Antón, D. N. y Hartman, P. E., 1966. Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. I. Isolation and general properties. J. Mol. Biol., 22: 305-323.
- Ryter, A., Hirota, Y. y Jacob, F., 1968. DNA-membrane complex and nuclear segregation in bacteria. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 33: 669-676.
- Sanderson, K. E., Ross, H., Ziegler, L. y Mákéla, H. P., 1972. F<sup>+</sup>, Hfr and F' strains of Salmonella typhimurium and Salmonella abony. Bacteriol. Rev., 36: 608-637.
- Sanderson, K. E. y Hartman, P. E., 1978. Linkage map of Salmonella typhimurium, edition V. Microbiol. Rev., 42: 471-519.
- Sanderson, K. E., Janzer, J. y Head, J., 1981. Influence of lipopolysaccharide and protein in the cell envelope on the recipient capacity in conjugation of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol., 148: 283-293.

- Savic, D. J., 1972. A histidine operator-constitutive mutation decreases the frequency of recombination within the histidine operon of Salmonella typhimurium. *Genetics*, 71: 461-464.
- Schnaitman, C. A., 1970. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 104: 890-901
- Schmidt, G., Männel, D., Mayer, H., Whang, H. Y. y Neter, E., 1976. Role of a lipopolysaccharide gene for immunogenicity of the Enterobacterial common antigen. *J. Bacteriol.*, 126: 579-586.
- Singer, S. J. y Nicolson, G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.
- Smít, J., Kamio, Y. y Nikaido, H., 1975. Outer membrane of Salmonella typhimurium: chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants. *J. Bacteriol.*, 124: 942-958.
- Smith, H. S. y Pardee, A. B., 1970. Accumulation of a protein required for division during the cell cycle of Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 101: 901-909.
- Spratt, B. G., 1975. Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation and shape of Escherichia coli K-12. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 2999-3003.
- Spratt, B. G. y Pardee, A. B., 1975. Penicillin-binding proteins and cell shape in Escherichia coli. *Nature*: 254: 516-517.

- Spratt, B. G., 1977. Properties of the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K-12. Eur. J. Biochem., 72: 341-352.
- Spratt, B. G., Boyd, A. y Stoker, N., 1980. Defective and plaque-forming lambda transducing bacteriophage carrying penicillin-binding protein-cell shape genes: genetic and physical mapping and identification of gene products from the lip-dacA-rodA-pbpA-leuS region of the Escherichia coli chromosome. J. Bacteriol., 143: 569-581.
- Stock, J. B., Rauch, B. y Roseman, S., 1977. Periplasmic space in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. J. Biol. Chem., 252: 7850-7861.
- Tamaki, S., Matsuzawa, H. y Matsushashi, M., 1980. Cluster of mrdA and mrdB genes responsible for the rod shape and mecillinam sensitivity of Escherichia coli. J. Bacteriol., 141: 52-57.
- Tomo, A., Martinez-Salas, E. y Vicente, M., 1980. Involvement of the ftsA gene product in late stages of the Escherichia coli cell cycle. J. Bacteriol., 141: 806-813.
- van Alphen, W., van Selm, N. y Lugtenberg, B., 1978. Pores in the outer membrane of Escherichia coli K-12. Mol. gen. Genet., 159: 75-83.
- van de Putte, P., van Dillewijn, J. y Rörsch, A., 1964. The selection of mutants of Escherichia coli with impaired cell division at elevated temperature. Mutation Res., 1: 121-128.



- Vogel, H. J. y Bonner, D. M., 1965. Acetyl-ornithinase of Escherichia coli: partial purification and some properties. J. Biol. Chem., 218: 97-106.
- Walker, J. R., Novarik, A., Allen, J. S. y Gustafson, R. A., 1975. Regulation of bacterial cell division: temperature-sensitive mutants of Escherichia coli that are defective in septum formation. J. Bacteriol., 123: 693-703.
- Weidel, W. y Pelzer, H., 1964. Bagshaped macromolecules. A new outlook in bacterial cell walls. Advan. Enzymol., 26: 193-232.
- Weigand, R. A. y Rothfield, L. I., 1976. Genetic and physiological classification of periplasmic-leaky mutants of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol., 125: 340-345.
- Westling-Haggstrom, B. y Normark, S., 1975. Genetic and physiological analysis of an envB spherelike mutant of Escherichia coli K-12 and characterization of its transductants. J. Bacteriol., 123: 75-82.
- White, D. A., Albright, F. R., Lennarz, W. J. y Schnaitman, C. A., 1971. Distribution of phospholipid-synthesizing enzymes in the wall and membrane subfractions of the envelope of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 249: 636-642.
- Wijsman, H. J. W. y Pafort, H. C., 1974. Pleiotropic mutations in Escherichia coli conferring tolerance to glycine and sensitivity to penicillin. Mol. gen. Genet., 128: 349-357.

- Wolf-Watz, H. y Normark, S., 1976. Evidence for a role of N-acetyl muramyl-L-alanine amidase in septum separation in Escherichia coli.  
J. Bacteriol., 128: 580-586.
- Wyche, J, H., Kennedy, J., Hartman, Z, Hartman, P. F. y Diven, J., 1974.  
Round-cell mutant of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol.,  
120: 965-969.
- Yamamori, T, Ito, K. y Yura, T., 1978. Transient regulation of protein synthesis in Escherichia coli upon shift-up to growth temperature.  
J. Bacteriol., 134: 1133-1140.
- Yem, D. W. y Wu, H. C., 1978. Physiological characterization of an Escherichia coli mutant altered in the structure of murein lipoprotein.  
J. Bacteriol., 133: 1419-1426.