

BC-C
575

**ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA
PROTEINA MAYORITARIA DE LA ENVOLTURA
CELULAR DE *Thermus thermophilus***



Julio de 1992

R.B.E. 56135

José Ruiz Castón

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

A mis padres y Maite,
a mis hermanas.

El trabajo recogido en esta memoria, que se presenta para optar al grado de doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular (C.S.I.C.- U.A.M.) bajo la dirección conjunta de los Drs. José López Carrascosa y José Berenguer Carlos. Su financiación corrió a cargo, durante el primer año, de una beca de la Universidad Autónoma de Madrid y, los tres años y medio restantes, del Ministerio de Educación y Ciencia. También se contó con una Ayuda para finalización de Tesis Doctoral de la Caja de Ahorros de Madrid.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los Drs. José López Carrascosa y José Berenguer Carlos (tanto monta, monta tanto), directores de este trabajo, por su apoyo incondicional, tanto científico como a nivel personal, así como por todo lo que de ellos he aprendido.

Gracias al Dr. Miguel A. de Pedro, por permitirme la realización de parte del trabajo de esta tesis en su laboratorio; al Dr. José María Carazo, siempre presto a resolver los problemas que surgían con los programas de ordenador; al Dr. Juan Ayala por su sentido crítico, pero constructivo, de los resultados de esta memoria y al Dr. Sven Hövmoller por lo que me enseñó de cristalografía.

A Maite, gracias por su interés constante a lo largo de estos años y las innumerables discusiones y comentarios, muchas de madrugada; a Iñigo, dispuesto siempre para ayudarme en lo que hiciese falta; al Dr. L.E. Donate por su ayuda y amistad, y al Dr. Carles Suñé, que me enseñó lo que sé de los anticuerpos monoclonales.

A los compañeros con los que tuve el placer de encontrarme en los laboratorios 303 y 122 y que me soportaron estoicamente, por su amistad, ayuda y consejos recibidos; en especial a Manolo, Pedro, Mari Carmen y Sergio. También al resto del "becariaje" del CBM, que en algún momento me brindaron su ayuda desinteresadamente.

A Julita, por su amistad y ayuda técnica.

Al personal del CBM; a Javier Palacín y los de fotografía, en especial.

A mi familia, que a cambio de verme menos durante los cuatro años y medio últimos, me apoyaron constantemente.

Por último, y sin embargo con un aprecio especial, al profesor David Vázquez, fallecido en Febrero de 1986, porque fué la primera persona que me aceptó para trabajar en un laboratorio.

INDICE

ABREVIATURAS

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

1.0 INTRODUCCION	1
2.0 MATERIALES Y METODOS	14
2.1 MATERIALES	14
2.1.1 ANIMALES	14
2.1.2 BACTERIAS, CELULAS Y PLASMIDOS	14
2.1.3 MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO	14
2.1.4 MEDIOS DE CULTIVO CELULAR Y TAMPONES PARA LA OBTENCION DE HIBRIDOMAS	15
2.1.5 MATERIALES PARA EL CULTIVO DE CELULAS	15
2.1.6 MATERIALES PARA RIAs Y ENSAYOS RELACIONADOS	16
2.1.7 PROTEINAS UTILIZADAS	16
2.1.8 PRODUCTOS RADIATIVOS	16
2.1.9 OTROS PRODUCTOS	16
2.1.10 MATERIAL FOTOGRAFICO	17
2.1.11 MATERIAL CROMATOGRAFICO	17
2.1.12 EQUIPO DE PROCESADO DE DATOS	18
2.2 METODOS	18
2.2.1 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE ESTIRPES BACTERIANAS	18
2.2.2 PREPARACION DE MUESTRAS PARA SU ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA	19
2.2.2.1 PREPARACION DE LAS REJILLAS	19
2.2.2.2 ADSORCION DE LAS MUESTRAS	19
2.2.2.3 CONTRASTADO DE LAS MUESTRAS	19
2.2.2.4 VISUALIZACION	20
2.2.2.5 ANALISIS DE MUESTRAS PARA CRIOSECADO	21
2.2.2.6 ANALISIS DE MUESTRAS POR CRIOFRACTURA	22

2.2.2.7 INCLUSION EN EPON 812 PARA ESTUDIOS DE ULTRAESTRUCTURA.....	22
2.2.3 PROCESAMIENTO DE IMAGENES.....	23
2.2.3.1 DIFRACCION OPTICA	23
2.2.3.2 DIGITALIZACION DE IMAGENES	23
2.2.3.3 PROCESAMIENTO BIDIMENSIONAL DE IMAGENES.....	24
2.2.3.4 PROCESAMIENTO TRIDIMENSIONAL DE IMAGENES.....	25
2.2.4 CUANTIFICACION, SEPARACION E IDENTIFICACION DE PROTEINAS.....	26
2.2.4.1 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS.....	26
2.2.4.3 TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL INMOBILON Y DETECCION CON ANTICUERPOS	26
2.2.5 EXTRACCION Y SEPARACION DE LIPIDOS POLARES	27
2.2.6 PREPARACION DE ENVOLTURAS CELULARES.....	27
2.2.7 PURIFICACION DE LA PROTEINA P100	27
2.2.8 PURIFICACION DEL LIPOPOLISACARIDO.....	28
2.2.9 MARCAJE DE PROTEINA A CON ¹²⁵ I.....	30
2.2.10 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD MUREIN HIDROLASA	31
2.2.11 ENSAYOS DE PROTEOLISIS LIMITADA	31
2.2.12 MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS	31
2.2.12.1 OBTENCION DE DNA PLASMIDICO.....	31
2.2.12.2 ANALISIS DE RESTRICCION.....	31
2.2.12.3 TRANSFORMACION BACTERIANA	32
2.2.13 EXPRESION DE FORMAS TRUNCADAS DEL GEN DE LA P100.....	32
2.2.14 RADIOINMUNOENSAYO	33
2.2.15 ELISA.....	33
2.2.16 OBTENCION DE ANTISUERO POLICLONAL FRENTE AL LIPOPOLISACARIDO DE <i>T. thermophilus</i>	33
2.2.17 TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS.....	34
2.2.17.1 OBTENCION DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ACMs ESPECIFICOS PARA LA PROTEINA P100	34
2.2.17.1.1 INMUNIZACION	34

2.2.17.1.2 FUSION	34
2.2.17.1.3 SELECCION DE LOS HIBRIDOS POSITIVOS	35
2.2.17.1.4 CLONAJE, EXPANSION Y PRODUCCION DE ACMs.....	35
2.2.18 CARACTERIZACION DE LOS ACMs	35
2.2.18.1 DETERMINACION DEL ISOTIPO DE LOS ACMs.....	35
2.2.18.2 DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ACMs	35
2.2.19 PURIFICACION DEL ACM 1AE1	36
2.2.20 OBTENCION Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS Fab.....	36
2.2.21 ENSAYO DE UNION DEL ACM 1AE1 A LAS ESTRUCTURAS REGULARES DE P100.....	36
2.2.22 ENSAYO DE UNION DEL FRAGMENTO Fab 1AE1 A LA ESTRUCTURA REGULAR DE SIMETRIA HEXAGONAL	37
3.0 RESULTADOS	41
3.1 CRIOFRACTURA Y TINCION NEGATIVA DE CELULAS ENTERAS DE <i>T. thermophilus</i>	41
3.2 IDENTIFICACION ELECTROFORÉTICA Y ANALISIS POR TINCION NEGATIVA DE LAS FRACCIONES DE LA ENVOLTURA CELULAR	41
3.3 ANALISIS ESTRUCTURAL DE LA SUPERFICIE NATIVA DE LA CAPA S.....	43
3.4 SOLUBILIZACION DIFERENCIAL DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA.....	47
3.4.1 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LOS CRISTALES TIPO S1.....	48
3.4.2 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LOS CRISTALES TIPO PS2.....	52
3.4.3 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LOS CRISTALES TIPO S2.....	55
3.5 IDENTIDAD PROTEICA DE LAS DISTINTAS ESTRUCTURAS PERIODICAS.....	55

3.6 RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA DE SIMETRIA HEXAGONAL	58
3.7 MAPA TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA S2.....	66
3.8 DETERMINACION DE LA ALTURA DE LOS CRISTALES FORMADOS POR P100	70
3.9 PLANOS DE FRACTURA EN LAS CELULAS DE <i>T thermophilus</i>	72
3.10 ANALISIS TOPOGRAFICO DE LOS CRISTALES S1, pS2 Y S2	74
3.11 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE CRISTALES DE P100 PURIFICADA	76
3.12 TRANSFORMACIONES DE LAS ESTRUCTURAS REGULARES	81
3.13 ANALISIS LIPIDICO DE LAS ESTRUCTURAS S1-pS2-S2	83
3.14 ANTISUERO α -LPS: RECONOCIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS REGULARES.....	85
3.15 OBTENCION DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ACMs ESPECIFICOS PARA LA P100	89
3.16 CONSTRUCCION DE LAS FORMAS TRUNCADAS DE LA P100.....	89
3.17 EXPRESION DE LAS FORMAS TRUNCADAS DE LA P100.....	91
3.18 CARACTERIZACION DE LOS ACMs α -P100.....	92
3.19 DETERMINACION DE LOS EPTOPOS ACCESIBLES EN LAS ESTRUCTURAS S1, pS2 Y S2	96
3.20 DETERMINACION DEL EPTOPO I CON FRAGMENTOS Fab.....	98
4.0 DISCUSION.....	101
5.0 CONCLUSIONES.....	117
6.0 BIBLIOGRAFIA.....	118

ABREVIATURAS.

aa(s): aminoácido(s)

ACM: anticuerpo monoclonal

AFC: adyuvante de Freund completo

AFI: adyuvante de Freund incompleto.

BSA: seroalbúmina bovina

DNA: ácido desoxirribonucleico

DME: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DO₅₅₀: densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm

EDTA: ácido etilén-diamino tetraacético

ELISA: inmunoensayo enzimático ("Enzyme-linked-immunosorbent assay")

IgX: inmunoglobulina de la clase X

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

kDa: 1000 dalton

KDO: ácido 2-deoxioctulónico

LPR: relación lípido/proteína (p/p)

LPS: lipopolisacárido

MET: microscopía electrónica de transmisión

Mr: masa molar relativa

OMPr: proteína regular de la membrana externa

PAGE-SDS: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

PBS: solución salina tamponada con fosfato

pI: punto isoeléctrico

Plac: promotor del operón de la lactosa

PT7: promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7

RIA: radioinmunoensayo

RNA: ácido ribonucleico

SDS: dodecil sulfato sódico

SFT: suero fetal de vaca

SDS: lauril sulfato sódico

TF: Transformada de Fourier

TMED: N,N,N',N' tetrametilén-etilén-diamina

Tris: tri-(hidroximetil)-aminometano

TX-100: Tritón X-100

α -XXX: anticuerpos monoespecíficos contra XXX

3DR: reconstrucción tridimensional

FIGURAS

FIGURA I.1.- Presencia de capas S en las ramas filogenéticas de eubacterias y arqueobacterias	8
FIGURA I.2.- Esquema de las tres categorías de envolturas celulares con superficies periódicas	9
FIGURA I.3.- Tipos de red observados en las capa S de células procarióticas	11
FIGURA II.1.- Purificación de la P100.....	29
FIGURA II.2.- Purificación del ACM 1AE1 por cromatografía de afinidad.....	38
FIGURA II.3.- Digestión con papaína del ACM 1AE1	39
FIGURA II.4.- Purificación del fragmento Fab del ACM 1AE1.....	40
FIGURA III.1.- Microscopía electrónica de células de <i>T. thermophilus</i>	42
FIGURA III.2.- Estructura y composición proteica de las fracciones de la envoltura celular	44
FIGURA III.3.- Procesamiento de imágenes de micrografías electrónicas de la capa regular superficial	46
FIGURA III.4.- Análisis electroforético de las fracciones de la envoltura celular.....	49
FIGURA III.5.- Influencia del EDTA en la solubilización diferencial de la proteína P84.....	50
FIGURA III.6.- Vista general al microscopio electrónico de los diferentes cristales constituidos por P100	51
FIGURA III.7.- Cristales bidimensionales de simetría hexagonal (S1)	53
FIGURA III.8.- Análisis bidimensional de los cristales tipo S1	54
FIGURA III.9.- Cristales bidimensionales del tipo pseudoS2	56
FIGURA III.10.- Cristales bidimensionales de simetría tetragonal (S2)	57
FIGURA III.11.- Análisis electroforético de la proteólisis limitada y desnaturizante de las estructuras S1, pS2 y S2.....	59
FIGURA III.12.- Detección mediante anticuerpos de los productos de la proteólisis limitada y desnaturizante de las estructuras S1, pS2 y S2.....	60
FIGURA III.13.- Representación de la varianza (σ^2) de los valores de la densidad óptica de los píxeles de cada plano paralelo a la superficie del cristal.....	62
FIGURA III.14.- Imágenes de secciones del mapa de densidades tridimensional de la estructura S1.....	63
FIGURA III.15.- Representaciones en perspectiva de la reconstrucción tridimensional del cristal S1	64

FIGURA III.16.- Modelos de la unidad estructural del cristal S1.....	67
FIGURA III.17.- Imágenes de secciones perpendiculares al eje longitudinal del mapa de densidad reconstruido de los cristales S2.....	68
FIGURA III.18.- Representaciones en perspectiva de la reconstrucción tridimensional del cristal S2.....	69
FIGURA III.19.- Secciones de células de <i>T. thermophilus</i>	71
FIGURA III.20.- Secciones de las estructuras regulares constituidas por P100.....	73
FIGURA III.21.- Crio fractura y sombreado metálico de células de <i>T.</i> <i>thermophilus</i>	75
FIGURA III.22.- Análisis topográfico de las superficies del cristal de simetría hexagonal.....	77
FIGURA III.23.- Análisis topográfico de las superficies del cristal de simetría trigonal.....	78
FIGURA III.24.- Correlación de las imágenes de la superficie y de las proyecciones bidimensionales de los cristales pS2.....	79
FIGURA III.25.- Análisis topográfico de las superficies del cristal de simetría tetragonal	80
FIGURA III.26.- Análisis bidimensional de cristales constituidos por P100 purificada.....	82
FIGURA III.27.- Transformación de las estructuras hexagonales en estructuras trigonales	84
FIGURA III.28.- Análisis de los anticuerpos policlonales frente al LPS de <i>T.</i> <i>thermophilus</i>	87
FIGURA III.29.- Análisis por anticuerpos α -LPS y α -P100 de las estructuras pS2 y S2.....	88
FIGURA III.30.- Análisis de las purificaciones del LPS de <i>T. thermophilus</i>	90
FIGURA III.31.- Colección de los plásmidos que contienen distintos fragmentos del gen <i>slpA</i>	93
FIGURA III.-32 Análisis de la expresión de los plásmidos con fragmentos de formas truncadas del gen de la P100.....	94
FIGURA III.33.- Localización de las zonas de reconocimiento de los ACMs en la secuencia de la proteína P100	97
FIGURA III.34.- Inmunomicroscopía electrónica de las estructuras pS2 y S2	99
Figura III.35.- Localización del epítipo I en la estructura S1.....	100

TABLAS

TABLA III.1.- Diversidad de las capas S hexagonales.....	65
TABLA III.2.- Dimensiones de las estructuras regulares de P100	73
TABLA III.3.- Características de los ACMs específicos para la proteína P100 de <i>T. thermophilus</i>	95
TABLA III.4.- Determinación de regiones accesibles a ACM y fragmentos Fab en las estructuras nativas.	99
TABLA IV.1.- Proceso de obtención de los cristales S1, pS2 y S2.....	103
TABLA IV.2.- Parámetros estructurales y relación LPR de las porinas de <i>E. coli</i> y la P100 de <i>T. thermophilus</i>	113

INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La vida a altas temperaturas

La temperatura es uno de los factores ambientales que mayor influencia ejerce sobre la funcionalidad de las moléculas y estructuras biológicas, existiendo un rango ideal dentro del cual se han adaptado la mayor parte de las especies actualmente conocidas. Sin embargo, existen ambientes naturales estables, normalmente de origen volcánico, cuya temperatura media es muy superior a la considerada como adecuada para el desarrollo de la vida, en los que ha sido posible el aislamiento de microorganismos tales como algas unicelulares, hongos y bacterias, denominados, por esta razón, termófilos. El fenómeno de la termofilia se produce en distintos hábitats geotérmicos: profundidades marinas y fuentes termales ácidas de elevado contenido en azufre o ligeramente alcalinas, siendo considerados organismos termófilos exclusivamente aquellos capaces de desarrollar todo su ciclo vital a altas temperaturas, diferenciándose por contraposición del término termotolerante reservado para aquellos organismos capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo, pero incapaces de reproducirse en estas condiciones (Brock, 1978). En ambos casos resulta evidente la existencia de mecanismos de resistencia o adaptación, respectivamente, que les permiten la estabilización de sus estructuras. Es interesante destacar que no ha sido posible el aislamiento de organismos eucariotas a temperaturas por encima de los 65°C (Tansey y Brock, 1972). Por el contrario, existen organismos procarióticos, a los que se denomina termófilos extremos, capaces de crecer a temperaturas superiores a 70°C, como en fuentes termales de aguas en ebullición, e incluso en agua sobrecalentada y a presión (Stetter y Zillig, 1985), como es el caso de algunas arqueobacterias hipertermófilas, cuyas temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre 90 y 110°C.

El estudio de la termofilia como fenómeno que permite la adaptación de los seres vivos a temperaturas superiores a las "normales", resulta interesante desde varios puntos de vista:

i) Evolutivamente, los ambientes naturales en los que habitan los organismos termófilos, relacionados en la mayoría de los casos con la actividad volcánica, se consideran semejantes a aquellos en los que aparecieron los primeros seres vivos sobre el planeta. De hecho, una eubacteria aislada recientemente de fuentes termales submarinas, *Thermotoga maritima* (Huber y cols., 1986), cuya temperatura óptima de crecimiento es de 90°C,

representa el estadio de diferenciación más antiguo y de más lenta evolución entre todas las eubacterias, según se desprende del análisis comparativo del RNAr 16S (Achenbach-Richter y cols., 1987). Además, la otra ramificación más temprana de la línea de las eubacterias, representada por las bacterias verdes no sulfurosas *Chloroflexus* y *Thermomicrobium* (Oyaizu y cols., 1987), también es termófila, lo que sugiere que todas las eubacterias han surgido a partir de un ancestro termófilo durante el proceso de enfriamiento de la superficie del planeta. No obstante, hay casos de termofilia secundaria, como algunas especies de *Bacillus* o *Clostridium*, muy similares a sus equivalentes mesófilos a nivel molecular (Stetter, 1986).

ii) A nivel industrial, desde hace algunos años se vienen utilizando organismos y proteínas termófilas en diversas aplicaciones. Ejemplos clásicos lo constituyen el aislamiento y utilización de *Lactobacillus* termófilos en la fabricación del yogur, la adición de proteasas termoestables a los detergentes, o el procesamiento de féculas para la obtención de dulcificantes naturales (Cowan y cols., 1985). Aún de mayor actualidad es el gran esfuerzo en el desarrollo y la aplicación de enzimas inmovilizadas, procedentes de organismos termófilos, en reactores de flujo continuo para la síntesis de aminoácidos y productos farmacéuticos. La gran ventaja atribuida a estos sistemas es su enorme termoestabilidad y resistencia a agentes químicos, factores que incrementan considerablemente la vida media de los reactores. Además, se evitan en gran medida los enormes problemas y pérdidas económicas derivadas de la frecuente contaminación de sistemas de temperatura moderada por organismos mesófilos ubicuos. Por otra parte, algunas de estas enzimas son también ampliamente utilizadas en el campo de la Biología Molecular, como las enzimas de restricción y, en algunos casos, han tenido un impacto tan profundo como la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, usada en el sistema de amplificación PCR (Kristjansson, 1989).

iii) A nivel bioquímico básico, las macromoléculas y estructuras biológicas de los organismos termófilos presentan a su vez termofilia, detectándose los máximos de actividad o funcionalidad a temperaturas próximas a la óptima de crecimiento, lo que significa que la termofilia es una característica intrínseca de los componentes celulares y no el simple resultado de un equilibrio entre moléculas desnaturalizadas y rápidamente sintetizadas como se propuso inicialmente.

En este sentido, desde hace algunos años se han venido realizando investigaciones sobre las consecuencias a nivel molecular de la adaptación de microorganismos a la termofilia, haciendo especial hincapié en el estudio de proteínas y su síntesis (Zuber, 1976),

composición de ácidos nucleicos y estructuras de membranas. En todos los casos estudiados, las actividades enzimáticas y la síntesis de proteínas de estos organismos, aisladas y ensayadas *in vitro*, presentan su actividad máxima en un rango de temperaturas que provocaría la inactivación de los sistemas equivalentes en organismos mesófilos. Sin embargo, los análisis comparativos de secuencia de aminoácidos de enzimas homólogas revelan modificaciones mínimas, distribuidas más o menos regularmente, entre mesófilos y termófilos (Ameluxen y Singleton, 1976; Hocking y Harris, 1976) y concretándose, en general, en la disminución de residuos de prolina y aminoácidos azufrados (Klibanov, 1983), pero manteniendo muchas veces incluso el mismo sistema de activadores e inhibidores (Freeze y Brock, 1970). Aparentemente, estos cambios pueden afectar a la estabilidad de la proteína mediante la creación de un pequeño número de interacciones intramoleculares adicionales, sin producir alteraciones estructurales. Un ejemplo claro lo constituyen los sistemas de proteasas en los que la unión específica de iones metálicos (especialmente Ca^{2+}) incrementa en gran medida la termoestabilidad molecular (Khoo y cols., 1984; Imanaka y cols., 1986). En este sentido, se ha detectado un contenido mayor en cationes divalentes en organismos termófilos extremos que pueden producir, a través de interacciones electrostáticas, cambios en las propiedades termodinámicas de los componentes celulares, contribuyendo a la estabilización de la estructura tridimensional de los mismos a alta temperatura (Hensel y Köning, 1988).

Una diferencia destacable entre proteínas termófilas y mesófilas, además de la casi total ausencia en las primeras de aminoácidos con azufre, es el incremento en la proporción de aminoácidos hidrofóbicos, lo que implica la importancia de las interacciones hidrofóbicas intra e intermoleculares a altas temperaturas.

Aunque con notables excepciones (Zillig y cols., 1987), a nivel de ácidos nucleicos existe una tendencia generalizada hacia el aumento en el contenido relativo de apareamientos guanina-citosina (G-C) a medida que aumenta la termofilia de los organismos estudiados, pasando del 50% en la mayoría de los organismos mesófilos, al 65-73% en algunas cepas capaces de crecer por encima de 80°C (Saiki y cols., 1972; Brock, 1978). La teoría más aceptada es que este sistema permite la estabilización de la doble hélice del DNA al aumentar el número de puentes de hidrógeno entre ambas cadenas. Como consecuencia del alto contenido en pares G-C, los termófilos presentan en sus genes un uso de codones peculiar, muy distinto al encontrado en *Escherichia coli* y otras especies mesófilas (Gouy y Gautier, 1982). Por otra parte, los RNA de transferencia presentan modificaciones estructurales así como sustituciones de bases, mayores cuanto mayor es la temperatura de crecimiento del microorganismo. Sin embargo, la termoestabilidad de los RNA ribosómicos parece estar

mediada, lógicamente, por las interacciones RNA-proteínas en la partícula ribosomal (Sundaram, 1986).

La envoltura celular es un componente al que se le ha dado la mayor importancia y ha sido estudiado en gran detalle en la adaptación de los microorganismos a la termofilia. Su estabilidad depende de las interacciones entre lípidos, proteínas y otros componentes. El análisis comparado de los componentes lipídicos de las membranas de las bacterias termófilas con respecto a las mesófilas ha mostrado, de forma general, un incremento en la longitud media de la cadena alifática y en las cadenas ramificadas, normalmente con grupos metilo, así como una disminución en la proporción de ácidos grasos insaturados (Langworthy y Pond, 1986). Estos resultados son similares a los obtenidos con géneros que tienen representantes capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, como es el caso de distintas cepas del género *Thermus* (Prado y cols., 1988) donde, además, se ha comprobado un incremento espectacular en el contenido de glicolípidos en los de mayor termofilia, lo que ha planteado la hipótesis de que pudieran constituir la base de la adaptación a altas temperaturas en estos microorganismos (Ray y cols., 1971; Pask-Hughes y Shaw, 1982). En el caso de las arqueobacterias, los lípidos son muy distintos químicamente de los del resto de los organismos, ya que están basados en enlaces éter en lugar de los enlaces éster (De Rosa y cols., 1988), e incluso se han detectado altos niveles de lípidos con dos cabezas polares unidos a través de una o dos cadenas isoprenoides, suficientemente largas como para formar una monocapa lipídica (Langworthy, 1977). El punto de fusión de vesículas reconstituidas con lípidos procedentes de termófilos extremos suele estar próximo a la temperatura mínima de crecimiento del organismo del que proceden, indicando, de nuevo, la termofilia intrínseca de las estructuras y moléculas de estos organismos.

El género *Thermus*

Uno de los géneros de eubacterias con representantes termófilos, moderados y extremos, de mayor expansión a nivel mundial es *Thermus* (Brock y Freeze, 1969). Este género ha sido aislado a partir de fuentes termales neutras o ligeramente básicas en Japón (Saiki y cols., 1972), Islandia (Pask-Hughes y Williams, 1977; Hudson y cols., 1987b), Rusia (Egovora y Loginova, 1974; Loginova y Egovora, 1984), Nueva Zelanda (Patel, 1984) y Estados Unidos (Brock y Freeze, 1969; Munster y cols., 1986), donde también ha podido ser aislado en calentadores de agua industriales (Brock y Boylen, 1973). Su temperatura de crecimiento varía de unos aislados a otros, siendo la más baja próxima a 45°C

y la más alta alrededor de 75°C. En ningún caso ha sido posible aislar representantes mesófilos del género *Thermus*.

Morfológicamente, este género está constituido por grandes bacilos Gram negativos, aparentemente inmóviles, con tendencia a formar filamentos en cultivos jóvenes (Brock y Freeze, 1969) y que presentan pigmentación amarillo-anaranjada, con algunas excepciones no pigmentadas. Son heterótrofos y aerobios estrictos, pudiendo utilizar como fuentes de carbono y energía maltosa, sacarosa, glucosa, lactosa, galactosa, acetato, etc., y como fuente de nitrógeno glutamato, NH_4^+ , prolina, etc. No requieren vitaminas, aunque sí algunos elementos traza, como hierro, manganeso, cobalto y cobre (Brock y Freeze, 1969).

La posición taxonómica de *Thermus* está aún por definir, pues aunque en principio fué considerado próximo a *Flavobacterium* por sus características morfológicas y su pigmentación, este género abarca bacterias mesófilas y con características metabólicas y de movilidad muy distintas a *Thermus*. Por otro lado, las especies de este género presentan un alto contenido en G-C en su DNA, mientras que *Flavobacterium* agrupa especies de variado contenido en G-C (Weeks, 1974). Posteriormente, el conocimiento de las secuencias de los RNAr 16S, ha permitido relacionar al género *Thermus* con el de los micrococcos radiotolerantes o *Deinococcus* (denominado anteriormente *Micrococcus*, Hensel y cols., 1986), proponiéndose una nueva familia, los *Deinococales*, que agrupa a ambos, y que constituye la segunda rama más antigua en la evolución de las eubacterias (Woese, 1987; Hartmann y cols., 1989), tras *Thermotoga*.

Recientemente, se ha propuesto una subdivisión del género *Thermus* en dos subgrupos: organismos de pigmentación amarilla y temperatura óptima de crecimiento de 70°C, y otros con pigmentación rosa y temperatura óptima de 60°C (Hensel y cols., 1986), si bien distintos aislados presentan características intermedias con fenotipos locales asociados a las áreas geográficas termales. A pesar de su amplia distribución y la gran cantidad de aislados, sólo han sido aceptadas oficialmente tres especies para este género: *T. aquaticus* YT-1 (Brock y Freeze, 1969), *T. ruber* (Loginova y Egovora, 1975) y *T. filiformis* (Hudson y cols., 1987). No obstante, hay indicios suficientes para pensar que existen al menos otras cinco especies distintas (Hudson y cols., 1989), entre las que se encontraría la cepa *T. thermophilus* utilizada en este trabajo.

Desde un punto de vista químico-físico, las membranas de *Thermus* presentan algunas características distintas, como una temperatura de transición sólido-fluido mucho

mayor (50°C, Oshima y Osawa, 1983) a la de las bacterias mesófilas (15-20°C). Estrechamente relacionada con la fluidez de las membranas y con su termofilia está la composición lipídica de las mismas (Ray y cols., 1971; Donato y cols., 1990), caracterizada por dos componentes mayoritarios, un glicolípido y un glicofosfolípido (Pask-Hughes y Shaw, 1982). El lipopolisacárido que presenta carece de heptosa y del ácido 2-deoxioctulónico (KDO) (Pask-Hughes y Williams, 1978), dos de los marcadores característicos de las membranas externas de bacterias Gram negativas. La composición del peptidoglicano también es peculiar, ya que contiene L-ornitina en la 3ª posición de la cadena de aminoácidos, más frecuente en la composición del peptidoglicano de Gram positivos (de Pedro y Vázquez, 1984) y, aparentemente, no parece poseer lipoproteína unida covalentemente.

Entre las cepas del género *Thermus*, "*T. thermophilus*" HB8, originalmente aislado de fuentes termales de Japón (Oshima e Imahori, 1974), ha sido objeto de numerosos estudios por ser uno de los de mayor termofilia (60-85°C) y crecer fácilmente en condiciones de laboratorio, lo que permite su manejo. Como se ha comentado anteriormente, la posición taxonómica de esta cepa está aún por determinar ya que, si bien algunos autores lo consideran un aislado particular de *T. aquaticus* (Brock, 1984), posteriores estudios taxonómicos señalan que ambos están más alejados de lo que en principio se pensó (Hudson y cols., 1986).

Los estudios realizados hasta la fecha sobre la composición y estructura de la pared celular de *T. thermophilus* son muy escasos, existiendo poca información en cuanto a la caracterización y distribución de las proteínas de membrana de este organismo. Los análisis de nuestro grupo han demostrado que las membranas de *T. thermophilus* están constituidas por un grupo de proteínas de alto peso molecular, oligómeros de una proteína de 100 kDa (P100) estabilizados por Ca^{2+} , y otras proteínas minoritarias de bajo peso molecular. Además de la P100, presenta otra proteína mayoritaria de 84 kDa (Berenguer y cols., 1988). Los primeros trabajos de esta Memoria nos permitieron asociar la proteína P100 con la existencia de una capa proteica cristalina en la envoltura celular de *T. thermophilus* (Castón y cols., 1988).

Capas S

La existencia de capas proteicas cristalinas sobre la superficie de organismos unicelulares ha dejado de ser considerada como un hecho excepcional, puesto que se han

descrito en unas 250 especies de eubacterias, Gram positivos y Gram negativos (Beveridge y Graham, 1991), abarcando más de 320 estirpes, y en unos 40 especies, con más de 50 cepas, de arqueobacterias (Baumeister y Engelhardt, 1987) (figuras I.1 y I.2). De hecho, se sospecha una distribución mucho más amplia, puesto que algunas bacterias pierden la capacidad de síntesis de sus capas S tras prolongados períodos de incubación en el laboratorio, donde las condiciones ambientales no son exigentes.

Las capas S (del inglés "Surface-layers") están constituidas mayoritariamente por una única proteína, o glicoproteína (Messner y Sleytr, 1991), que representa entre el 8 y 10% del contenido proteico total de la bacteria (Sleytr y Messner, 1983). Este hecho sugiere la gran importancia que en su entorno natural deben jugar estas estructuras, ya que, si ello no fuera así, sería inexplicable el tremendo esfuerzo de síntesis que supone la posesión de estas estructuras. En general, estas proteínas, de tamaño variable entre 40 y 140 kDa, presentan características comunes en cuanto a su composición aminoacídica, que incluyen su carácter ácido, su alto contenido en residuos polares e hidrofóbicos, con alguna excepción en especies mesófilas (Peters y cols., 1987), la ausencia de cisteína y, por tanto, de puentes disulfuro.

El grado de interacción entre las capas S y la envoltura celular varía enormemente de unas especies a otras, existiendo géneros como *Campylobacter* en los que la capa S se extrae fácilmente con agitación en agua, y otros en los que parece existir interacciones muy fuertes con el peptidoglicano, como es el caso de *T. aquaticus*. De hecho se han descrito casos de interacción covalente entre las subunidades de la capa S (*Thermoproteus tenax*).

A nivel estructural, las subunidades de la capa S se disponen formando redes periódicas con simetría hexagonal, tetragonal u oblícua (figura I.3), envolviendo completamente a las células. A pesar de la extensión de los estudios realizados en este área, apenas se conocen sus funciones específicas debido a la escasez de mutantes de una misma cepa carentes de esta estructura. La hipótesis que considera a las capas S como precursores primitivos de las paredes bacterianas, puesto que tienen la capacidad de autoensamblarse sin necesidad de energía ni de maquinaria celular, sugiere que a lo largo de su evolución estas estructuras han ido adquiriendo otras funciones (figura I.4) como son:

- Control de la "permeabilidad" debido a la presencia de canales de distinto tamaño (Sára y Sleytr, 1987b). En los casos en los que se han podido analizar diferencias entre una cepa parental con capa S y un mutante carente de ella, como por ejemplo *T.*

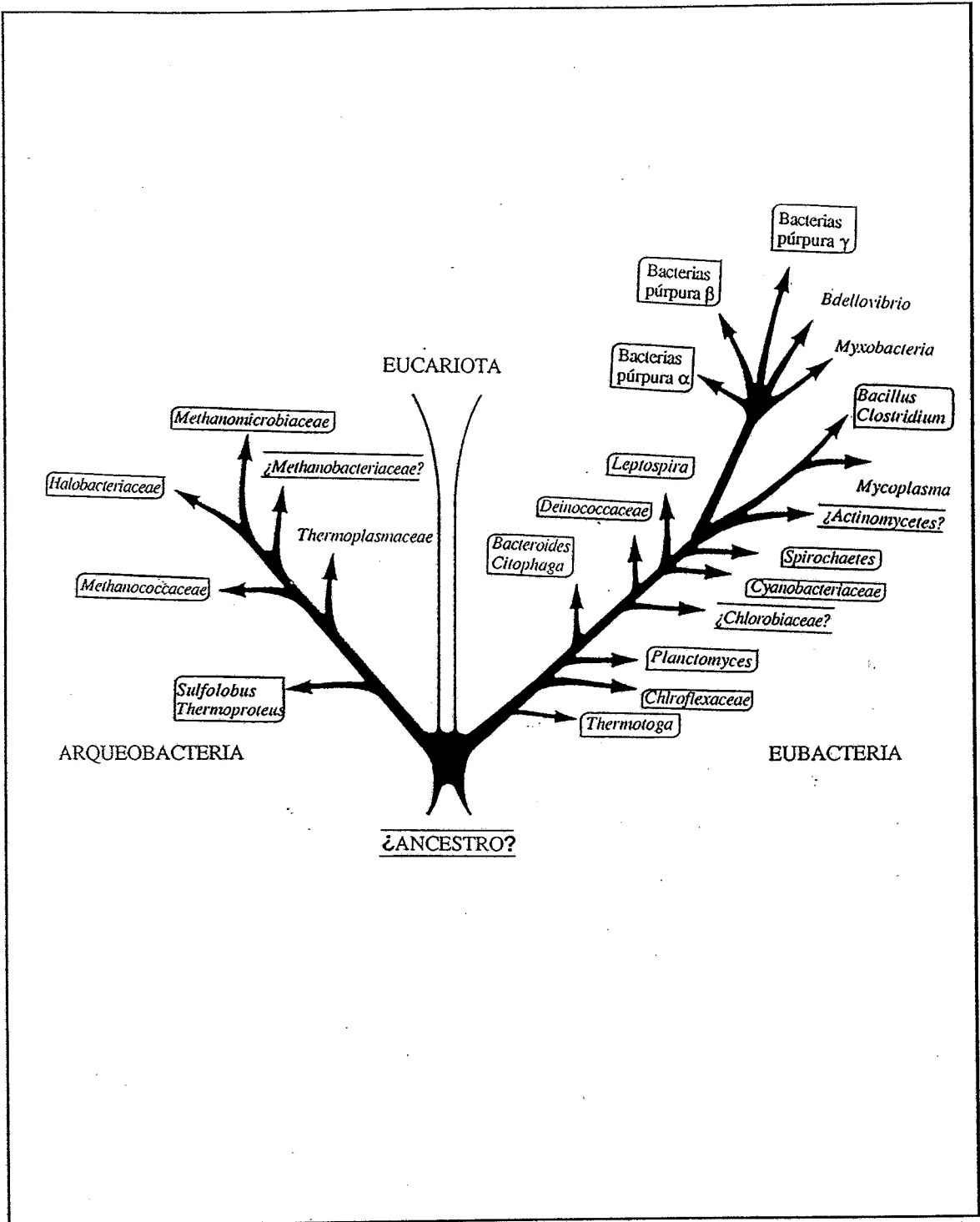


FIGURA I.1 Presencia de capas S en las ramas filogenéticas de eubacterias y arqueobacterias. Las cajas indican que la capa S es común en la línea filogenética correspondiente; los interrogantes denotan que las capas S han sido detectadas pero no como un hecho común; las especies que no son encuadradas son aquellas en las que hasta el momento no se ha encontrado que posean capa S. Este árbol filogenético está realizado a partir de las comparaciones de la secuencia del RNAr 16S y considerando una ramificación filogenética cuando $S_{AB} = 0.3$ (S_{AB} es el coeficiente de similitud de RNAr 16S) (tomado de Baumeister y Engelhardt, 1987).

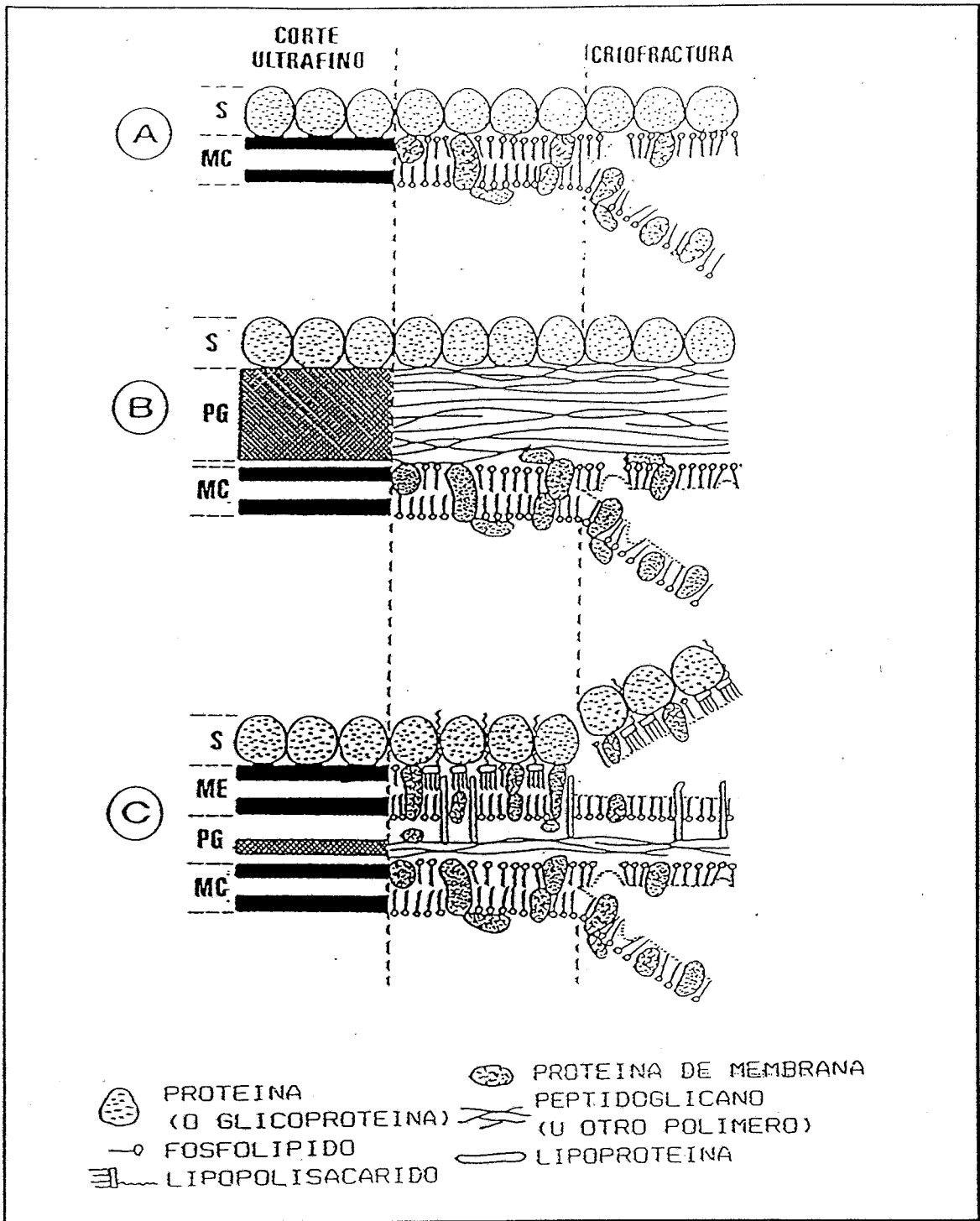


FIGURA 1.2 Esquema de las tres categorías de envolturas celulares con superficies periódicas. En la izquierda se muestra el perfil observado en cortes ultrafinos; en el centro, la arquitectura molecular mostrándose los componentes más importantes; en la derecha, los distintos planos de criofractura de las envolturas celulares. (A) Envoltura celular de arqueobacterias; (B) Envoltura celular de bacterias Gram positivas; (C) Envoltura celular de bacterias Gram negativas. MC: membrana citoplasmática; PG: mureina, pseudomureina u otros polímeros; ME: membrana externa; S: capa S constituida por un retículo regular de macromoléculas (tomado de Sleytr y Glauert, 1982)

thermophilus (Lasa y cols., 1992), se ha llegado a la conclusión de que resultan especialmente importantes para la protección de la célula frente a agentes externos, actuando como barrera defensiva frente a enzimas hidrolíticas. En este sentido, cabe destacar la aplicación de estas capas sobre membranas con el fin de obtener filtros moleculares de corte a tamaños muy definidos, entre 20 y 40 kDa (Sára y Sleytr, 1987b).

- Mecanismo de adhesión que permite a la bacteria desarrollarse y acumularse en los hábitats a los que se ha adaptado (Sára y Sleytr, 1987a).

- Impiden la liberación de macromoléculas de las células bacterianas. Se ha especulado que las capas S pueden retener enzimas de acción extracelular en Gram positivas (Sleytr y Messner, 1983) de forma similar a lo que ocurre con el espacio periplásmico de las Gram negativas.

- En cepas de *Halobacterium*, cuya capa S es el único componente de la pared (Mescher y Strominger, 1976; Wildhaber y Baumeister, 1987), así como en *Thermoproteus tenax*, son responsables del mantenimiento de la forma celular.

- Infectividad en microorganismos patógenos. En los casos de *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* (Ishiguro y cols., 1981; Dooley y Trust, 1987), *Campylobacter fetus* (Winter y cols., 1978), y *Bacteroides buccae* (Sjögren y cols., 1985), está establecida la correlación existente entre la presencia de su capa S y la virulencia provocada. *Campylobacter fetus* provoca el aborto infectivo y esterilidad en animales de granja (Winter y cols., 1978), e infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos (Guerrant y cols., 1978). Otro caso conocido lo constituyen las cepas del género *Bacteroides*, que provocan infecciones en el hueso de la mandíbula (Sjögren y cols., 1985).

- Receptor de fagos, de igual modo que algunas de las proteínas de la membrana externa de *E. coli*, ya que mutantes en capa S de *Bacillus sphaericus* son resistentes a fagos líticos (Howard y Tipper, 1973).

- También se han especulado otros aspectos funcionales como la mediación de las capas S en las interacciones entre microorganismos en analogía a las uniones en "gap" de los tejidos animales (Baumeister y Hegerl, 1986), y en los procesos de deslizamiento (Buchard, 1981).

Las capas S no pueden ser considerados como buenos marcadores taxonómicos debido al alto grado de variación existente a nivel antigénico y bioquímico entre las de microorganismos de la misma especie. Junto con otros casos descritos en la literatura (Koval, 1988), este hecho ha sido comprobado en nuestro laboratorio para distintas especies de *Thermus*: *T. aquaticus* (ATCC 25105) posee una capa S tetragonal e insoluble a altas concentraciones de SDS a temperaturas superiores a 100°C; *Thermus sp.* (ATCC 27737)

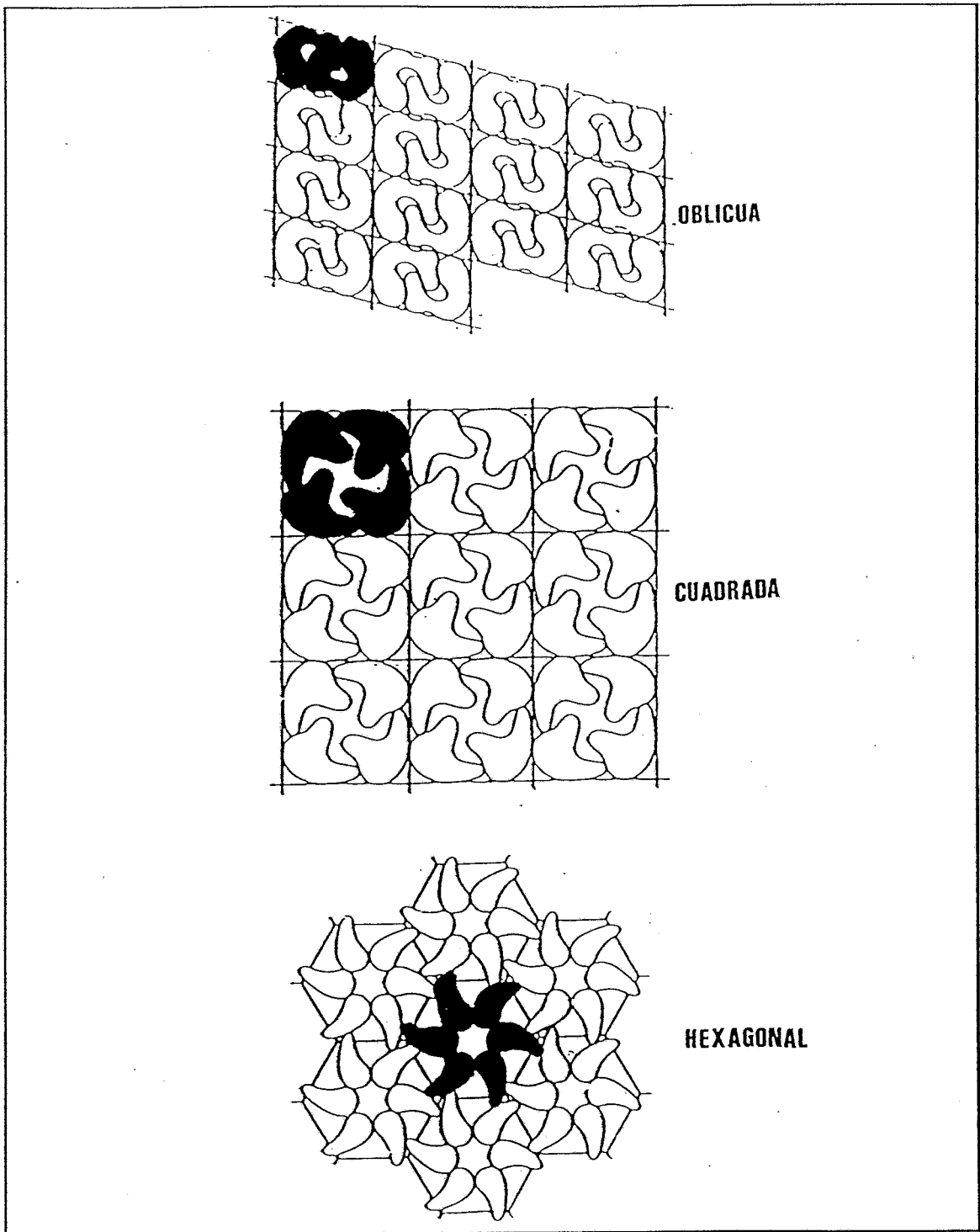


FIGURA I.3 Tipos de red observados en las capas S de células procarióticas (tomado de Sleytr y cols., 1982).

también posee una capa S tetragonal que es solubilizable en SDS a 60°C, y *T. thermophilus* que, como veremos, posee una capa S hexagonal, cuyo componente mayoritario es una única proteína, y con las mismas características de solubilidad que *Thermus sp* (Castón, 1988). La razón de semejante variabilidad parece radicar en que la naturaleza externa de estas proteínas, las convierte en blancos de unión de fagos o sustratos de enzimas hidrolíticas, lo que conlleva una fuerte presión selectiva.

Desde un punto de vista de las interacciones proteína-proteína, las capas S constituyen un excelente modelo para llevar a cabo estudios estructurales, ya que cuando son purificadas a partir de las propias células presentan un alto grado de regularidad formando grandes cristales de simetría definida. El uso combinado de la microscopía electrónica y del tratamiento digital de imágenes ha demostrado ser una poderosa herramienta que ha permitido analizar con gran detalle la estructura de distintos sistemas biológicos (Amos y cols., 1982). Gracias a las técnicas de procesamiento bidimensional de imágenes de micrografías electrónicas de alta resolución, se han conocido un gran número de estructuras de proyección de capas S. El análisis estadístico y la extracción de información no discernible de forma directa en las micrografías se realiza mediante el uso de la transformada de Fourier. Este operador permite diferenciar la información periódica del ruido aperiódico y, mediante filtraciones adecuadas, obtener imágenes con una mayor relación señal/ruido a partir de sus proyecciones obtenidas en el microscopio electrónico.

Sin embargo, puesto que el microscopio electrónico no permite obtener información tridimensional de las muestras bajo estudio debido a la gran profundidad de foco (el foco no puede ajustarse a los diferentes niveles de la estructura cuando se consideran resoluciones apreciables), es obvia la necesidad del empleo de técnicas objetivas de reconstrucción tridimensional asistidas por ordenador. Ello se puede realizar a partir de las proyecciones de las muestras a distintos ángulos de inclinación (DeRosier y cols., 1968).

Como resultado de los análisis estructurales comparativos entre las distintas capas S de eubacterias y arqueobacterias, se ha podido deducir la marcada asimetría de los monómeros constituyentes de estas estructuras, presentando fundamentalmente dos dominios (Saxton y Baumeister, 1986): un dominio pesado donde se concentra la mayor parte de la masa proteica que constituye núcleos en las estructuras regulares, y un dominio ligero que proporciona conectividad a la red. Las interacciones que permiten la integridad de la estructura han sido ampliamente estudiadas, mediante experimentos de reconstitución *in vitro* de capas S a partir de sus componentes purificados y, comprendiendo bacterias tan

dispare como *Bacillus sphaericus* (Hastie y Brinton, 1979) o *Pseudomonas* (Austin y cols.,1990), siempre se han obtenido unas estructuras periódicas con las mismas características estructurales que las mostradas sobre la célula (Sleytr y Messner, 1983). Las fuerzas moleculares que determinan la capacidad de autoasociación de los monómeros son muy variadas, enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas y, si bien predominan unas sobre otras dependiendo de cada tipo particular de capa S, dicha capacidad es independiente de la presencia de un componente que actúe como molde (peptidoglicano), aunque también es cierto que éste suele contribuir a la estabilidad de la estructura. Por lo tanto, la reasociación de las capas S está determinada por enlaces direccionales entre las subunidades y no por el material subyacente.

El trabajo presentado en esta Memoria se ha centrado en la caracterización estructural, mediante técnicas de MET, bioquímicas, genéticas e inmunológicas, de la proteína mayoritaria de la envoltura celular de *T. thermophilus*. El conjunto de estos estudios, junto con aquellos realizados por la Dra. Faraldo (1990, Tesis Doctoral. UAM), sientan las bases de un modelo sobre el que analizar las interacciones proteína-proteína de extremada resistencia características de los organismos termófilos.

MATERIALES Y METODOS

2.0 MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 ANIMALES

Los ratones BALB/c que se utilizaron para las inmunizaciones y como fuente de timocitos y macrófagos peritoneales, así como los 2 conejos blancos de Nueva Zelanda utilizados para la producción de anticuerpos policlonales, fueron obtenidos del Servicio de Animalario del CBM (Madrid).

2.1.2 BACTERIAS, CELULAS Y PLASMIDOS

A lo largo de este trabajo hemos utilizado las siguientes estirpes bacterianas:

"*Thermus thermophilus*" HB8 (no descrita estrictamente como especie): aislada de fuentes termales del Japón (Oshima e Imahori, 1974) (ATCC 27634). En el presente trabajo nos referiremos a esta estirpe como *Thermus thermophilus*.

Escherichia coli JM109: K-12, recA1, Δ (lac-pro), end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, F' (traD36, proAB, lacIq ZAM15) (Yanisch-Perron y cols., 1985).

E. coli JM109 (DE3): igual que la anterior, pero incluye el lisógeno λ DE3 que contiene el gen que codifica para la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor de la lactosa

E. coli BL21 (DE3): F-, ompT, r_B^- mB⁻, λ DE3 (Studier y Moffat, 1986).

E. coli BL21 (DE3) plysS (Moffat y Studier, 1987).

La línea celular X63/Ag 8.653, procedente de un mieloma de ratón BALB/c, no productora de inmunoglobulinas (Kearny y cols., 1979), fué proporcionada por el Dr. L. Enjuanes (CBM, Madrid).

Los plásmidos que se utilizaron fueron los siguientes:

- pUC9 (Vieira y Messing, 1982).

- pMF4, pMF41 y pMF51 (Faraldo y cols., 1991).

2.1.3 MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO

Para el crecimiento de *T. thermophilus* se empleó un medio rico con la siguiente

composición: 8 g/l de extracto de levadura; 8 g/l de tripticasa; 3 g/l de NaCl y 1 g/l de glucosa. Dichos compuestos se disolvieron en agua caliente del grifo que aportó los elementos traza requeridos para el buen crecimiento de esta bacteria.

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó medio rico LB (Lennox, 1955), o bien medio mínimo M9 (Miller, 1972) suplementado con tiamina a 2 µg/ml y glucosa al 0.2% (p/v). En los casos que se especifica se añadió ampicilina a 100 µg/ml (de Antibióticos SA).

Los compuestos de estos medios fueron de las marcas Difco y Merck.

2.1.4 MEDIOS DE CULTIVO CELULAR Y TAMPONES PARA LA OBTENCION DE HIBRIDOMAS

El medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco y Freeman, 1959) (DME), suplementado con aminoácidos no esenciales de Gibco, fué el medio básico de cultivo. Este medio fué suplementado con glutamina 2mM (Sigma), ácido pirúvico 1mM (Merck), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma) y suero fetal de ternera, SFT, al 15% (Flow).

El medio selectivo de hibridomas (medio HAT) se preparó como el medio anterior, pero añadiendo hipoxantina 10^{-4} M (Calbiochem), ametofterina 10^{-7} M (Cyanamid e Ibérica), timidina 10^{-3} M (Sigma) y glicina 10^{-3} M (Sigma). Los hibridomas seleccionados y estables fueron crecidos en el medio anterior sin ametofterina (medio HT).

La fusión celular se realizó con polietilenglicol 1000 adquirido a Koch Light. La solución de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 0.155 M, HKCO_3 0.01 M y EDTA 0.1 mM) se hizo con reactivos comprados a Merck. La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se preparó según la formulación de Dulbecco y Vogt (1954) y contiene NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM y KH_2PO_4 1.47 mM, pH 7.2.

2.1.5 MATERIALES PARA EL CULTIVO DE CELULAS

Las placas de Petri de 55 cm² de superficie de cultivo (denominada P100), las placas de 6 y 24 pocillos (denominadas M6 y M24, de 8 y 2 cm²/pocillo, respectivamente) y las microplacas de 96 pocillos (MII, de fondo plano y 0.32 cm²/pocillo) se adquirieron a Costar y Nunc. Los criotubos para almacenamiento de células en nitrógeno líquido se adquirieron a Nunc.

2.1.6 MATERIALES PARA RIAs Y ENSAYOS RELACIONADOS

El antígeno se adsorbió a placas flexibles de cloruro de polivinilo de fondo plano obtenidas de Titertek (Flow). El segundo anticuerpo, suero de conejo anti-Ig de ratón, se compró a Nordic. La proteína A (Pharmacia) fué marcada con yodo radiactivo (Na^{125}I , Amersham) por el método de la cloramina T.

El suero de carnero anti-IgG de ratón, conjugado con oro de 5 nm, el suero de conejo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa y la orto-fenil-diarfina (OPD) fueron adquiridos a Biocell, Nordic y Sigma, respectivamente.

El kit utilizado para la determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales de ratón (ACMs) y el antisuero de conejo específico para F_{ab} de Ig de ratón fueron de BioRad.

2.1.7 PROTEINAS UTILIZADAS

- Albúmina de suero bovino (Sigma).
- Catalasa de hígado bovino (Boehringer Mannheim).
- Lisozima de clara de huevo (Sigma).
- Proteína A (Pharmacia).
- Marcadores de peso molecular (Boehringer Mannheim y Pharmacia).
- Endonucleasas de restricción y enzimas en el manejo de DNA fueron suministradas por Boehringer Mannheim, Pharmacia y Biolabs.
- Proteasas: Tripsina (Sigma); α -quimiotripsina (Boehringer Mannheim); Proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (Sigma); Papaina (Sigma).

2.1.8 PRODUCTOS RADIATIVOS

Na^{125}I (100 mCi/ml; 1700 Ci/mmol) de Amersham International.

Acido meso-(3,4,5, ^3H)-diaminopimélico (40 Ci/mmol) del Commissariat à l'Energie Atomique (Service de Molécules Marquées).

2.1.9 OTROS PRODUCTOS

- Resina Epon812 (FLuka Chemie AG).
- Colodión (nitrocelulosa) de EMScope.

- Nitrógeno líquido (Sociedad Española del Oxígeno).
- Papel "Inmobilon" (membranas de difluoropolivinilideno, PVDF) con un poro de 0.45 μm ; papel de nitrocelulosa (HAWP de 0.45 μm) y filtros Millex de 0.22 y 0.45 μm de poro, adquiridos a Millipore.
- Rejillas de cobre y níquel de microscopía electrónica suministradas por Veco.
- Adyuvante de Freund completo (AFC) e incompleto (AFI) de Difco.
- Pristano (Aldrich).
- Leche en polvo desnatada Molico (Nestlé).

Los productos de tipo general utilizados en este trabajo fueron de grado analítico procedentes de las firmas Sigma, Merck, Serva, Panreac o Difco.

2.1.10 MATERIAL FOTOGRAFICO

Las placas del microscopio electrónico fueron Scintia Film de Agfa-Gevaert y se revelaron con revelador D-163 y se fijaron con fijador ácido, ambos productos de Kodak.

Los difractogramas se registraron en películas Kodak plus-X Pan PXP120.

Las imágenes filtradas por ordenador se fotografiaron en la pantalla de visualización con la película Kodak plus-X Pan 135 (35 mm).

El papel para positivos fué de las marcas Negra, Agfa, Kentmere e Ilford de distintos grados de dureza. El revelador y fijador era de las marcas Kodak y Tetenal Photowork.

Los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio fueron fotografiados con Películas Polaroid tipo 665 y 667.

Para las autorradiografías se utilizaron placas de Kodak (X-Omat S) y pantallas amplificadoras Dupont, Cronex (Ligting Plus).

2.1.11 MATERIAL CROMATOGRAFICO

Resina de Sepharosa CL4B unida con proteína A para cromatografías de afinidad (Sigma y Pharmacia).

Matrices de intercambio iónico de Sephadex (dextrano modificado) de intercambio aniónico, DEAE-Sephadex A-25, e intercambio catiónico, CM-Sephadex C-25 (Pharmacia).

Matriz para cromatografía de exclusión de Sephadex G-25 (Pharmacia).

2.1.12 EQUIPO DE PROCESADO DE DATOS

Ordenadores y periféricos de visualización:

- Las operaciones realizadas con ordenador en el Centro de Investigación UAM-IBM lo fueron con un ordenador IBM 4341 con 8 Mb de memoria. En dicho centro se utilizaron como terminales de visualización de imágenes un Ramtek 9351 y un IBM 7350.

- Estación de trabajo implementada en nuestro laboratorio en la que las funciones de visualización de imágenes y procesamiento de las mismas se realizan básicamente sobre un ordenador IBM PS/2 modelo 80 con procesador Intel 80386 a 20Mhz, dotado del coprocesador matemático 80387 para acelerar la operación en coma flotante. La visualización de imágenes se ha montado sobre un monitor IBM 8514 con adaptador IBM 8514/A. La estación de trabajo incorpora así mismo un monitor de datos VGA IBM 8513. El logical básico está formado por el sistema operativo, facilidades para exploración de disco (FL), programas de comunicaciones (TWC y CP78COPY), editor PEII de IBM y compilador de lenguaje C IBM C/2-1.0 para OS2 1.0 utilizado en su modelo largo.

2.2 METODOS

2.2.1 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE ESTIRPES BACTERIANAS

La temperatura de crecimiento fué de 37°C para *E. coli* y de 75°C para *T. thermophilus* bajo fuerte agitación.

El crecimiento en masa de los cultivos se determinó midiendo la variación de D.O. a 550 nm de longitud de onda (D.O.₅₅₀) en un colorímetro Spectronic 20 (Bausch and Lomb).

Las estirpes de *E. coli* de uso rutinario se mantuvieron en medio solidificado con agar (Difco) al 1.5% (p/v), a 4°C y se recrecieron cada 30 días. Para su conservación a largo plazo se mantuvieron en glicerol al 20% (v/v) a -70°C. *T. thermophilus* se mantuvo congelado a -70°C en forma de precipitados compactados.

2.2.2 PREPARACION DE MUESTRAS PARA SU ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

2.2.2.1 PREPARACION DE LAS REJILLAS

Se usaron rejillas de microscopía electrónica de cobre de 400 hexágonos por pulgada cuadrada y de níquel de 200 cuadrados por pulgada cuadrada. Sobre éstas se depositó una capa muy fina de nitrocelulosa (colodión) que sirve de soporte para la posterior adsorción de las muestras. Con el fin de proporcionar estabilidad a la película de plástico, se evaporó sobre ésta una capa de carbón de unos 2-6 nm de espesor. La superficie de la rejilla así preparada presenta un carácter marcadamente hidrofóbico y para conferirle hidrofiliidad (necesidad que surge cuando se tiene en cuenta que las muestras objeto de estudio se encuentran en un medio acuoso) se la somete a un proceso denominado de descarga iónica (del inglés "glow discharge"), que habilita la disponibilidad de las rejillas para su uso por un espacio de tiempo no superior a los 15 min.

2.2.2.2 ADSORCION DE LAS MUESTRAS

Sobre una gota de la muestra bajo estudio, cuyo volumen aproximado era de 5-10 μ l, depositada sobre un papel de Parafilm, se colocó una rejilla de microscopía electrónica preparada según se acaba de describir, de forma que la cara de la rejilla que soporta la película de carbón contacte con la muestra. Se incubó durante 3-5 min y se elimina el exceso mediante 3-4 lavados en agua destilada y el contacto del borde de la rejilla con un papel de filtro entre cada pase, poniendo especial cuidado en que la rejilla no se seque.

2.2.2.3 CONTRASTADO DE LAS MUESTRAS

En este trabajo hemos usado dos procedimientos generales para dar contraste a las muestras, el sombreado con un metal pesado y la tinción negativa. La información que se obtiene en ambos métodos es complementaria. El sombreado, o deposición sobre una muestra seca de una fina película de un metal pesado, nos ofrece información de superficie mientras que la tinción negativa, en la que el espécimen queda inmerso en un material electrodensito, información de volumen.

Tinción negativa

Las rejillas sobre las que previamente se han adsorbido las muestras se incuban sobre gotas de acetato de uranilo al 2% (p/v) o de fosfotungstato sódico al 2% (p/v) en agua destilada de preparación reciente, y filtrados a través de filtros de $47\mu\text{m}$ de diámetro de poro (de Millipore). El tiempo de tinción fué de 45 s a 1 min. Una vez finalizada la incubación se eliminó el exceso de agente de tinción por contacto de la rejilla con un papel de filtro convencional. Previamente a la introducción de la rejilla en el microscopio electrónico se deja que ésta se seque por completo.

Sombreado metálico

Consiste en hacer una réplica metálica de la superficie del espécimen bajo estudio lo más fidedigna posible. Mediante un cañón termoiónico, el sombreado se hizo con una mezcla de platino y carbón, con un ángulo de incidencia fijo de 20° ó 40° y de un modo unidireccional.

El espesor de la capa de platino se reguló mediante sistemas instrumentales de control basados en osciladores de cuarzo, y nunca fué superior a 20 \AA .

Para dar estabilidad mecánica a la réplica de platino, ésta fué cubierta con una fina capa de carbono de 40 \AA de grosor, con un ángulo de incidencia de 90° .

2.2.2.4 VISUALIZACION

Las preparaciones se visualizaron y fotografiaron en los microscopios electrónicos Jeol JEM 100B y Jeol JEM 1200EX ; este último equipado con un goniómetro eucéntrico de entrada lateral.

Las series de imágenes inclinadas comprendían vistas entre $\pm 60^\circ$, y se trabajó en condiciones de dosis electrónica relativamente baja (esto es, $2000\text{-}3000 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ en cada micrografía), para tratar de prevenir una posible redistribución del agente de tinción causada por la irradiación electrónica durante el proceso de observación y toma de fotografías. De forma rutinaria, las series de inclinación se comenzaron siempre con una imagen a 0° , seguida de fotografías espaciadas 5° desde -60° hasta $+60^\circ$, para acabar de nuevo con una imagen a 0° del cristal objeto de estudio (así se comprueba si la muestra ha sufrido cambios o

no durante todo el proceso de análisis). Se trabajó siempre con una magnificación de 50.000 aumentos.

2.2.2.5 ANALISIS DE MUESTRAS PARA CRIOSECADO

El criosecado y posterior sombreado con platino es una técnica que permite la visualización de las superficies de las muestras. El procedimiento empleado para este tipo de estudios fué el siguiente:

Se partió de una suspensión concentrada del espécimen bajo estudio en tampón Tris-HCl 10mM pH 7.8 , depositándola sobre una lámina de mica de aproximadamente 0.5 cm². La superficie del soporte de mica se hizo hidrofílica, en los casos que convino, mediante la exfoliación de alguna de sus capas y utilizándose la superficie nueva presentada para la adhesión del material biológico. Después de 5-10 min, se eliminó el exceso de material sumergiendo el trozo de mica en el tampón anteriormente descrito y se retiró el exceso de tampón con papel de filtro convencional. A continuación las muestras fueron congeladas de forma muy rápida en nitrógeno líquido y se introdujeron en la unidad de criosecado y sombreado metálico, evitando la formación de cristales de hielo sobre su superficie como consecuencia de la humedad atmosférica.

Antes de ser utilizada, la unidad de criosecado fué enfriada a la temperatura del nitrógeno líquido y sometida a un vacío elevado (4×10^{-6} Torr). Una vez introducidas las muestras, se subió la temperatura de la mesa sobre la que están sujetas los soportes, hasta alcanzar un valor de -80°C, permaneciendo el resto de la unidad a la temperatura de -150°C. Gracias al vacío en el que se encuentran las muestras, se procedió a la sublimación del hielo. Para facilitar este proceso, en las proximidades superiores de las muestras se situó un foco de condensación del hielo sublimado (la propia cuchilla de la unidad). El tiempo de sublimación fué de 1 ó 2 horas

El sombreado de las muestras fué realizado según el método descrito en el apartado 3.2.3.2. Una vez conseguidas las réplicas sobre el soporte de mica, éstas fueron extraídas de la unidad , equilibradas y secadas a temperatura ambiente, depositándolas en una solución de hipoclorito sodico al 1% (p/v) durante 30 min., con el fin de eliminar el resto de material biológico. El posterior lavado de las réplicas se realizó con agua destilada.

Por último, las réplicas fueron depositadas sobre rejillas de níquel, eliminando el exceso de agua con papel de filtro.

2.2.2.6 ANALISIS DE MUESTRAS POR CRIOFRACTURA

La criofractura y el posterior sombreado con platino es una técnica que nos permite visualizar, además de las superficies del espécimen, las zonas internas en los planos de fractura.

El procedimiento seguido fué básicamente el mismo que el descrito para el análisis de muestras por criosecado. La fractura del material se hizo según dos métodos distintos:

a).- La muestra fué depositada con una micropipeta sobre un soporte de oro de 2 mm de diámetro y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido sobreenfriado. Una vez que se introdujeron los soportes en la unidad de criosecado se procedió, de forma manual, a realizar las fracturas con una cuchilla de acero (mantenida a -150°C) de igual forma que en un microtomo.

b).- En este caso la adsorción del material se hizo sobre una lámina de mica, se retiró el exceso de muestra, y se colocó un papel de filtro húmedo de igual tamaño, que se adhirió en toda la superficie de la lámina de mica, a modo de "sandwich". A continuación se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se separaron ambas capas con la ayuda de unas pinzas de microscopía (Nermut y Williams, 1977; Nermut y cols, 1978). En este caso el contrastado de las muestras se hizo por los dos métodos generales descritos en el apartado 2.2.2.3.

2.2.2.7 INCLUSION EN EPON 812 PARA ESTUDIOS DE ULTRAESTRUCTURA

Los sedimentos de células o fracciones de membrana se fijaron con gluteraldehído al 2% (p/v) y ácido tánico al 2% (p/v) en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 10 min con PBS, el material fijado se trató con OsO_4 al 1% (p/v) en PBS a 4°C . La deshidratación posterior de las muestras se llevó a cabo con soluciones de etanol (del 30, 50, 70, 95 y 100%, v/v) antes de proceder al tratamiento con mezclas de etanol:Epon812 (3:1, 1:1 y 1:3 v/v) y dicha resina al 100%. Durante la etapa de etanol al 70% se tiñeron las muestras con acetato de uranilo al 2% (p/v) (proceso denominado tinción *en bloc*). Una vez infiltradas, y transferidas a cápsulas de plástico, las muestras se polimerizaron a 60°C

durante dos días, obteniéndose posteriormente secciones de las mismas, de 60-70 nm, con un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung). Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo saturado (10 min) y citrato de plomo (1 min), se lavaron con NaOH 20mM y agua, y se estudiaron por microscopía electrónica.

2.2.3 PROCESAMIENTO DE IMAGENES

2.2.3.1 DIFRACCION OPTICA

Previamente al procesamiento digital de imágenes, todas las micrografías electrónicas se estudiaron en un difractor óptico de construcción propia según el modelo descrito por Aebi y cols. (Aebi y cols., 1973; Carrascosa y cols., 1982). Este análisis nos permitió estudiar tanto la calidad de los cristales como la información estructural de éstos (Hövmoller, 1986).

Los difractogramas se obtuvieron con una ventana de 2 cm de diámetro y los negativos de microscopía electrónica se colocaron de forma que incidiera la luz sobre la cara del negativo que lleva la emulsión fotográfica.

Los difractogramas ópticos se registraron siempre con la misma intensidad del haz, por lo que los tiempos de exposición variaron en función de la densidad óptica de cada negativo.

Las series de vistas de inclinación que presentaban problemas de observación de foco se desecharon, seleccionándose aquellas que presentaban puntos de difracción bien definidos en las frecuencias altas del espacio recíproco.

2.2.3.2 DIGITALIZACION DE IMAGENES

Se llama digitalizar una imagen al proceso de muestreo y almacenamiento necesario para convertir una imagen analógica (una micrografía electrónica) en una imagen digital, que será la presentación para el ordenador de la imagen de partida. La imagen digital está formada por cada uno de los elementos en que se dividió la imagen analógica, o su valor asociado, recibiendo el nombre de pixel (del inglés "PICTure ELe ment").

Evidentemente el entorno de muestreo, o tamaño de la ventana de muestreo, debe ser menor que el detalle más pequeño que se quiera reproducir, o de lo contrario éste se perderá. El teorema de muestreo de Shannon-Wittaker (Wittaker, 1915; Shannon, 1949), extendido al campo del procesamiento digital de imágenes por Hunt (Hunt, 1978), prueba que en las condiciones de obtención de las imágenes, el muestreo que es necesario realizar en la imagen es, en ambos ejes coordenados, de $1/2B$, siendo B la máxima frecuencia espacial posible en la imagen (otra forma de definirlo es como la inversa de la mínima distancia que es posible pasar de blanco a negro y nuevamente a blanco).

Debido a nuestros métodos de preparación de muestras, la máxima frecuencia espacial que se puede esperar es de 2 nm, es decir, en este caso $B=1/2$ nm. Por consiguiente, el muestreo de la imagen debe hacerse, como mínimo, a 1nm.

En este trabajo se han utilizado los microdensitómetros Optronics Photomation P-1700 con dispositivo portamuestras cilíndrico y Perkin-Elmer 1010A de tipo plano. También se ha utilizado la cámara de video Ektron (Applied Imaging) con una ventana de 4,9 Å/pixel. El intervalo de muestreo ha sido de 50 μ m, utilizándose una ventana cuadrada de dimensiones iguales. La distancia de muestreo sobre el espécimen corresponde a 1 nm, lo que implica un sobremuestreo en la imagen que se traduce en la obtención de una cantidad de información redundante. Siempre se operó en condiciones en las que la información obtenida era linealmente proporcional a la densidad óptica de las micrografías (Valentine y cols., 1964; Valentine 1966).

2.2.3.3 PROCESAMIENTO BIDIMENSIONAL DE IMAGENES

El procedimiento utilizado es esencialmente el puesto a punto en nuestro laboratorio y que ha sido descrito en publicaciones anteriores (Carrascosa y cols., 1982, 1983, 1985; Carazo y cols., 1984, 1985, 1986).

Las imágenes fueron digitalizadas de forma que las áreas de interés, seleccionadas por sus diagramas de difracción, quedasen plenamente incluidas dentro del área digitalizada, por lo que se tuvieron que remuestrear a unas dimensiones de 256 x 256 píxeles (para las estructuras "S1") o 512 x 512 (para las estructuras "pS2" y "S2"), las cuales, dan cuenta de más de 100 celdillas unidad. El proceso de muestro se llevó a cabo mediante un interpolador por convolución cúbica (Keys, 1981).

Sobre las transformadas de Fourier (TF), calculadas por el eficaz algoritmo FFT (del inglés "Fast Fourier Transform") de Cooley y Tukey (1965), se localizó la red recíproca mediante un algoritmo de mínimos cuadrados a partir de los puntos que podían asignarse a reflexiones sin ambigüedades. El análisis de las reflexiones de la TF se efectuó considerando una ventana cuadrada de 7×7 (Roberts y cols., 1981). Una vez filtradas las TF de las imágenes a cero grados, se determinó el centro de simetría correspondiente a los grupos de simetría puntual P6 o P2. El mejor centro de simetría se determinó mediante el método del residuo de fase que nos da cuenta de las discrepancias de fase entre los valores predichos por la simetría cristalográfica y los valores observados (Hövmoller, 1986; Stewart, 1988; Amos y cols., 1982).

A partir de la lista de amplitudes y fases para todas las reflexiones, mediante la transformada inversa de Fourier, se obtienen los mapas de densidad de las estructuras analizadas, libres de ruido y simetrizadas en los casos que se indican (Amos y cols., 1982).

2.2.3.4 PROCESAMIENTO TRIDIMENSIONAL DE IMAGENES

Se han calculado un total de 5 reconstrucciones, 3 para la estructura "S1" y 2 para la estructura "S2", todas ellas independientes por provenir cada una de una serie de inclinación de un solo cristal. Los parámetros de inclinación se evaluaron según el método de Shaw y Hills (1981). El residuo de fase fué alrededor de 25° .

Los factores finales de estructura se muestrearon a intervalos regulares de $1/20 \text{ nm}^{-1}$, debido a la altura inicialmente supuesta, mediante interpolación en los valores experimentales de amplitud y fase. El mapa tridimensional del cristal se obtuvo mediante el cálculo de la transformada tridimensional inversa de Fourier de los factores de estructura interpolados.

La altura del cristal reconstruido se definió haciendo uso del criterio de la varianza de los valores de D.O. en cada plano de la reconstrucción (Carazo y cols., 1985, 1986). Una vez que se definieron el primer y último plano reconstruidos, se delimitaron los umbrales mínimos de densidad preservando la continuidad del espécimen. La representación tridimensional de estas secciones se obtuvo mediante las técnicas de computación gráficas descritas por Jiménez y cols. (1986)

2.2.4 CUANTIFICACION, SEPARACION E IDENTIFICACION DE PROTEINAS

2.2.4.1 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

La determinación de la concentración de proteínas se realizó siguiendo los métodos de Lowry y cols. (1951) y de Bradford (1976), utilizando BSA como referencia e incluyendo en los patrones las sustancias que pudieran interferir en el ensayo.

2.2.4.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de electroforesis en geles planos de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) descrito por Laemli (1970).

Las muestras se hirvieron rutinariamente en el tampón de desnaturalización Tris 35 mM, SDS al 1% (p/v), EDTA 5 mM (o Cl_2Ca 5 mM) y 2% (v/v) de β -mercaptoetanol ajustado con HCl a pH 6.8, durante 10 min, tras lo cual se centrifugaron a $10.000 \times g$, 10 min, para eliminar los restos no solubles, y el sobrenadante se mezcló en proporción 5:1 (v/v) con glicerol al 50 % (v/v) y azul de bromofenol al 0.01 % (p/v). A continuación se sometieron a SDS-PAGE en aparatos verticales adaptados para este uso. Finalizada la electroforesis, la detección de proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie (Brilliant Blue R).

2.2.4.3 TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL INMOBILON Y DETECCION CON ANTICUERPOS

Separadas las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a hojas de Inmobilon prehumedecidas en metanol y equilibradas en Tris 48 mM, glicina 39 mM pH 8.5, con SDS al 0.036% (p/v) y metanol al 20% (v/v). La transferencia se efectuó durante 2 a 2.5 horas con una intensidad de corriente de 0.8 mA/cm^2 , en un aparato Novablot 217-250 (LKB).

Para la detección de proteínas con anticuerpos y ^{125}I -proteína A, se incubó el papel en la solución de saturación de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, gelatina al 0.25% (p/v) y Nonidet P-40 al 0.05% (p/v), pH 7.5 (tampón de incubación), con leche en polvo desnatada al 1% (p/v) durante 30 min. A continuación se añadió el antisuero de conejo, diluido de 100 a 1000 veces en el tampón de incubación, con una agitación suave durante 2 a 3 horas. Tras

3 lavados intensos de 10 min con el mismo tampón, se añadieron 5 μCi de una preparación reciente de ^{125}I -proteína A, incubándose durante 1 a 2 horas, también a temperatura ambiente. Por último, se lavó el papel 3 veces y se dejó secar a 37 °C. Las proteínas se detectaron por autorradiografía, tras exposición a temperatura ambiente o a -70°C.

Cuando se usaron anticuerpos monoclonales de ratón, el papel se incubó con un segundo antisuero (suero de conejo específico para inmunoglobulinas de ratón) para amplificar la reacción, previamente al tratamiento proteína A.

2.2.5. EXTRACCION Y SEPARACION DE LIPIDOS POLARES

Partiendo de una fracción de membranas o bien de un precipitado celular, se lavó en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.9, y se procedió a la extracción lipídica según el método de Bligh y Dyer (1959) con las modificaciones de Prado y cols. (1988).

2.2.6 PREPARACION DE ENVOLTURAS CELULARES

Para obtener las envolturas celulares de *T. thermophilus* se siguió un protocolo similar al descrito por Spratt (1975). Las células, resuspendidas en tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.8, se rompieron con 3 pulsos de sonicación de 45 s, con intervalos de 2 min, a 18 μm de amplitud, en un aparato MSE 150 W.

Las células enteras se retiraron por centrifugación suave a 5.000 x g, 5 minutos, a 4 °C, y las envolturas se recuperaron del sobrenadante por centrifugación a 30.000 x g, 30 min, a 4°C. El precipitado se lavó 3 veces en Tris-HCl 10 mM, pH 7.8, y finalmente se resuspendió en este mismo tampón. Después de determinar la concentración de proteínas (normalmente entre 40-50 mg/ml), se guardaron a -20 °C hasta su uso.

2.2.7 PURIFICACION DE LA PROTEINA P100

El procedimiento seguido en la purificación de P100 es el descrito por Faraldo y cols. (1988).

Se partió de volúmenes de 10 ml de envolturas celulares, preparadas como se acaba de describir en el apartado anterior, a las que se añadió Triton X-100 hasta una concentración final del 1% e incubándolas a 60 °C durante 30 min. El material insoluble se precipitó a

30.000 x g, 30 min. Esta extracción diferencial se repitió 3 veces con objeto de obtener un precipitado altamente enriquecido en P100.

El precipitado de la última centrifugación fué resuspendido en 20 ml de acetato amónico 50 mM pH 7.4 y, para degradar totalmente el peptidoglicano, sometido a una digestión con lisozima (150 mg/ml), durante 12-15 horas, a 37 °C y con agitación. Los muropéptidos resultantes de la digestión del peptidoglicano se eliminaron con el sobrenadante tras centrifugar a 30.000 x g durante 30 min. Posteriormente el precipitado fué incubado con Triton X-100 al 1% (60 °C, 30 min), y después de centrifugar en las mismas condiciones, el sobrenadante, que contenía la mayor parte de la P100, fué diluido 1/10 en acetato amónico 50 mM pH 6, y sometido a dos cromatografías consecutivas de intercambio iónico, equilibradas en el mismo tampón.

En la primera columna de CM-Sephadex C-25 (de 1.5 x 30 cm), la P100 fué mayoritariamente excluída, reteniéndose un porcentaje importante de las proteínas contaminantes. La fracción excluída fué sometida a una cromatografía en DEAE-Sephadex A-25, donde la P100 quedó retenida. Después de lavar con el mismo tampón, la columna fué eluida con un gradiente lineal de NaCl hasta 1 M en el tampón acetato. La fracción obtenida a 0.6 M, contenía P100 prácticamente pura, de acuerdo con el criterio de tinción con azul de Coomassie, y fué precipitada con ClNa 2 M. El precipitado fué lavado 3 veces con agua destilada, liofilizado y almacenado a -20 °C.

El seguimiento de la purificación de P100 se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Fig. II.1).

2.2.8 PURIFICACION DEL LIPOPOLISACARIDO

Para la purificación del lipopolisacárido (LPS) de *T. thermophilus* se siguieron 4 métodos basados en distintos principios, todos ellos derivados de protocolos aplicados en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o especies de *Salmonella*, que se describen muy someramente a continuación:

1.- Método de Uchida y Mizushima (1987). Consiste en 3 etapas fundamentalmente:

1.1 Obtención del LPS como precipitado insoluble mediante incubación a 100 °C, 10 min, en Triton X-100 al 2% (p/v) y MgCl₂ 50 mM y posterior precipitación por enfriamiento.

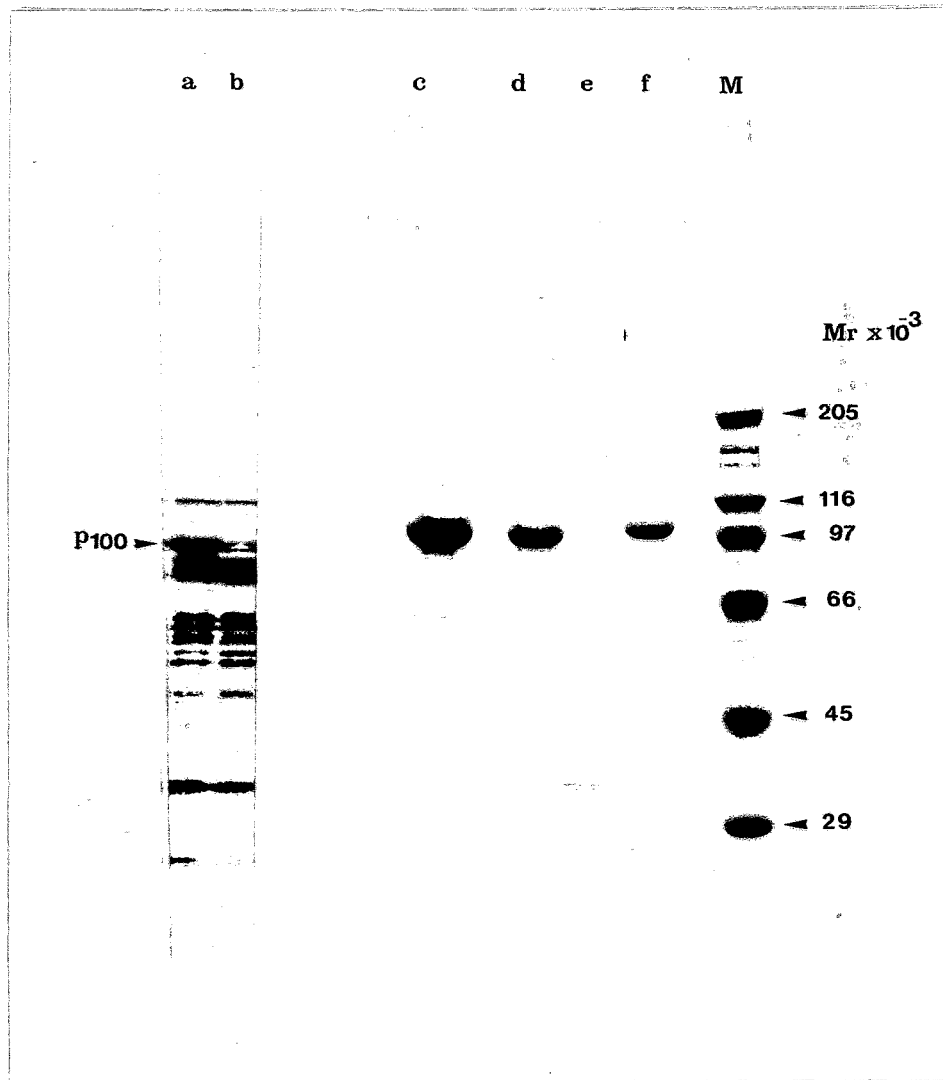


FIGURA II.1 Purificación de la P100. Fracciones obtenidas a distintos pasos de la purificación fueron separadas mediante SDS-PAGE, detectándolas con azul de Coomassie: (a) Proteínas totales de membrana tratadas con EDTA (se indica la posición de la P100); (b) Fracción soluble en Triton X-100 al 1%; (c) Fracción soluble en Triton X-100 al 1% después del tratamiento con lisozima; (d) Fracción eluida de la columna de CM-Sephadex; (e) Fracción retenida en CM-Sephadex; (f) P100 purificada (50 μ g). M: marcadores de peso molecular.

1.2 Solubilización del LPS precipitado en Tritón X-100 2% (p/v) y EDTA 50 mM

(temperatura de incubación de 37 °C, 1 hora).

1.3 Precipitación específica del LPS por centrifugación a 100.000 x g, 90 min a 15°C.

2.- Método de Westphal y Jann (1965). A partir de un precipitado celular se hizo una extracción con fenol: agua (1:1) en caliente y con fuerte agitación. Después de enfriar hasta 10 °C, se centrifugó y se tomó la fase acuosa. Posteriormente se dializó frente a agua destilada y se liofilizó. El extracto crudo liofilizado es sometido a una precipitación selectiva de ácidos nucleicos con un detergente catiónico (Cetavlon).

3.- Método de Osborn (1966). Este procedimiento, cuyas líneas generales son similares al anterior, permite una purificación más selectiva para las formas R del LPS. En este caso, mediante la incubación con 25 mM de MgCl₂, se provocó la precipitación selectiva del LPS en el extracto crudo.

4.- Método de Kido y cols. (1990). Es un método muy rápido similar al de las preparaciones de DNA plasmídico. La lisis celular se llevó a cabo con una solución alcalina; se hizo una extracción fenol: cloroformo (1:1) y se precipitó el LPS con etanol en varias etapas, obteniéndose a una concentración aproximada de 2 mg/ml (según la concentración de KDO).

2.2.9 MARCAJE DE PROTEINA A CON ¹²⁵I

Se siguió el método de la cloramina T descrito por Greenwood y cols. (1963). A 200 mg de proteína A en un volumen de 100 µl de tampón fosfato 0.02 M, pH 7, se añadió 2 mCi de ¹²⁵I y 10 µl de cloramina T (1 mg/ml en el mismo tampón); se agitó durante 1 min a temperatura ambiente y se paró la reacción por adición de 10 µl de metabisulfito sódico (3 mg/ml), 10 µl de yoduro potásico 0.1 M y 50 µl de BSA (10 mg/ml). Para separar la proteína yodada del ¹²⁵I libre se realizó una cromatografía de filtración en gel, en una columna de 5ml de Sephadex G-25. La proteína yodada se eluyó con tampón fosfato 0.01 M, ClNa 10 mM, Triton X-100 0.01%, pH 7, y el ¹²⁵I libre quedó retenido en la columna o salió en las últimas fracciones.

Con un rendimiento del 50% en el marcaje, la actividad específica promedio siguiendo este método fue de 2×10^7 cpm/µg de proteína.

2.2.10 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD MUREIN HIDROLASA

La actividad mureín-hidrolasa de la lisozima de huevo y la muramidasa de *Chalaropsis sp* utilizadas en los ensayos de transformación de estructuras, fueron determinadas de acuerdo con el siguiente protocolo: se incubaron a 37 °C 20 µl de muestra con otros 20 µl de peptidoglicano de *E. coli* W7 marcado radiactivamente (proporcionado por el Dr. Berenguer) en un volumen final de 100 µl del tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.8. Después de 2 horas, se añadió Cetavlon al 1% (p/v) final y se incubó a 4 °C durante 30 min. Tras centrifugar se midió la radiactividad presente en el sobrenadante en un contador de centelleo.

2.2.11 ENSAYOS DE PROTEOLISIS LIMITADA

Se siguió básicamente el método propuesto por Cleveland y cols. (1977). Fracciones de membrana insolubles en Triton X-100 que mostraban las distintas estructuras regulares, fueron solubilizados con SDS 1% (p/v) a 60 °C durante 1 hora. El sobrenadante fué diluido 1:3 en el tampón de proteolisis (Tris-HCl 0.125 M, 0.5% (p/v) SDS, 10 mM EDTA, 10% (p/v) glicerol, pH 6.8) y hervido durante 10 min. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron las proteasas oportunas y se las dejó actuar durante 30 min a 37 °C. Finalmente se añadió β-mercaptoetanol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v) y azul de bromofenol al 0.01 % (p/v) y se calentaron a 100 °C, 10 min. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE (Laemli, 1970).

2.2.12 MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS

2.2.12.1 OBTENCION DE DNA PLASMIDICO

El DNA plasmídico se obtuvo mediante la lisis alcalina de las células crecidas en un volumen adecuado de medio selectivo (Birnboim y Doly, 1979). La purificación de DNA plasmídico a escala semipreparativa se hizo por el método del polietilenglicol (Maniatis y cols., 1989).

2.2.12.2 ANALISIS DE RESTRICCION

Las digestiones del DNA con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las

instrucciones del fabricante, analizando los fragmentos resultantes en geles de agarosa (Maniatis y cols., 1989).

Para purificar fragmentos de DNA en geles de agarosa se utilizó el método de congelación rápida en nitrógeno líquido (Tautz y cols, 1983).

2.2.12.3 TRANSFORMACION BACTERIANA

La preparación de células competentes se realizó según el método de Cohen y cols. (1972) y la transformación se hizo siguiendo el método originariamente descrito por Mandel e Higa (1970).

2.2.13 EXPRESION DE FORMAS TRUNCADAS DEL GEN DE LA P100

La expresión de los fragmentos del gen *slpA* (de la proteína P100), obtenidos con enzimas de restricción, se llevó a cabo según el promotor que controlaba dichos fragmentos:

1.- Plásmidos en los que su expresión está controlada por el promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, cuyo gen está incluido en el fago lisógeno λ DE3. Colonias individuales de las estirpes de *E. coli* JM109 DE3, BL21 o BL21 *plysS*, transformadas con los plásmidos correspondientes, fueron inoculadas en medio LB conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina y crecidas a 37 °C. Cuando alcanzaron una D.O.₅₅₀ = 0.4-0.5, se les añadió 2 mM de IPTG a cada cultivo con el fin de inducir el gen de la RNA polimerasa de T7 que está bajo el control por el promotor Plac, continuando la incubación a 37 °C. Tras 30 min o 1 hora, se añadió rifampicina (200 μ g/ml) para inhibir la transcripción dependiente de la RNA polimerasa bacteriana y, tras 4-6 horas, se recogieron las células del cultivo mediante centrifugación. Estas fueron hervidas en el tampón de desnaturalización enriquecido con EDTA y SDS (apartado 3.4.2), sonicadas y separadas mediante SDS-PAGE. El análisis de los productos de expresión se llevó a cabo mediante inmunoblots con anticuerpos específicos para la proteína P100.

2.- Plásmidos cuya expresión depende del promotor de la β -galactosidasa (Plac). Cultivos de *E. coli* JM109, crecidos en medio M9 con ampicilina a 37 °C y transformados con dichos plásmidos, fueron inducidos al alcanzar una D.O.₅₅₀ de 0.4-0.6 mediante la adición de 2 mM de IPTG. Tras 4-6 horas de incubación las células fueron procesados de igual modo que en el caso anterior.

2.2.14 RADIOINMUNOENSAYO

Para el clonaje de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la proteína P100, se utilizó un radioinmunoensayo indirecto en fase sólida (RIA, del inglés "radioimmunoassay"). La proteína P100, obtenida a partir de gel como se describe en el Apartado 3.16, (0.2 µg de proteína por pocillo en 50 µl de PBS) se adsorbió a placas de cloruro de polivinilo de fondo plano, incubando de 16 a 20 horas a 37 °C. Las siguientes etapas del ensayo se realizaron según un método descrito previamente (Sanz y cols., 1985; García-Barreno y cols., 1986), utilizando un segundo antisuero (suero de conejo específico para inmunoglobulinas de ratón) para amplificar la reacción, y ¹²⁵I-proteína A para revelar el ensayo mediante autorradiografía o por contaje directo de los pocillos en un contador gamma.

2.2.15 ELISA

Para la determinación del isotipo y selección de los ACMs para la proteína P100, se utilizó un ensayo de ELISA indirecto en fase sólida (ELISA, del inglés "enzyme-linked-immunosorbent assay"), según protocolos ya descritos (Voller y cols., 1976). A diferencia de un RIA, el segundo anticuerpo, que también es un suero de conejo específico para inmunoglobulinas de ratón, está conjugado con peroxidasa. El seguimiento del ELISA se lleva a cabo por lectura de los pocillos a 450 nm tras revelado de la actividad enzimática..

2.2.16 OBTENCION DE ANTISUERO POLICLONAL FRENTE AL LIPOPOLISACARIDO DE *T. thermophilus*

El método seguido fué el descrito por Boulard y Lecroisey (1982). En la sección 3.16 de resultados se explicará porqué a este suero se le llama antisuero anti-LPS (α-LPS)

Después de separar electroforéticamente en un gel las proteínas totales de la membrana de *T. thermophilus*, se cortó la banda transversal a la altura de la P84, la segunda proteína mayoritaria de la envoltura celular, se troceó, y se incubó con agitación suave a 4 °C durante 36 horas en bicarbonato amónico 50 mM. El sobrenadante, que contenía los componentes eluidos de los trozos del gel de acrilamida, fué dializado frente a agua destilada 48 horas. Posteriormente se liofilizó y se resuspendió en un volumen pequeño de PBS.

Las características del proceso de inoculación se resumen en el siguiente esquema:

DIA DE INYECCION	0	14	21	27
AFC	400	-	-	-
AFI	-	200	200	200
PROTEINA (1mg/ml)	200	200	200	200
VIA DE INYECCION	IM	SC	SC	SC

IM:intramuscular; SC: subcutánea (Cantidades expresadas en µl)

La extracción de suero se realizó el día 33. Después de una quinta dosis en una inyección subcutánea el día 45, se sacó toda la sangre al conejo el día 56. Como control negativo, previamente a la primera inoculación del antígeno, se extrajeron 15 ml de sangre de la que se obtuvo el suero correspondiente. Todos los sueros fueron almacenados a -70 °C hasta su utilización.

2.2.17 TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS

Todos los métodos generales que se han usado para el desarrollo de líneas celulares productoras de ACMs están descritos por Harlow y Lane (1988)

2.2.17.1 OBTENCION DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ACMs ESPECIFICOS PARA LA PROTEINA P100

2.2.17.1.1 INMUNIZACION

Para la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos específicos para la proteína P100, se inmunizaron ratones BALB/c con dicha proteína obtenida de gel (de igual forma que la que se comentó en el apartado 2.2.16). Se inmunizaron ratones de 8 semanas de edad, administrando una primera dosis del antígeno emulsionado con adyuvante completo de Freund, seguida de dos dosis del antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund, con intervalos de 15 días entre ellas. Las dosis sucesivas se administraron en PBS, y la vía de administración fué intraperitoneal o subcutánea.

2.2.17.1.2 FUSION

Células del mieloma de ratón X63/Ag 8.653 se fusionaron con células de bazo de los

ratones inmunizados, según el método descrito por Nowinski y cols. (1979) y Sanz y cols. (1985).

2.2.17.1.3 SELECCION DE LOS HIBRIDOS POSITIVOS

La selección de los hibridomas secretores de anticuerpos específicos para la proteína P100 se realizó por RIAs.

2.2.17.1.4 CLONAJE, EXPANSION Y PRODUCCION DE ACMs

Los hibridomas seleccionados fueron clonados, al menos 3 veces, por dilución límite, en presencia de timocitos y macrófagos peritoneales de ratones BALB/c (Sanz y cols., 1985). Después del clonaje, los hibridomas fueron crecidos en cultivo y transferidos a placas de mayor superficie cuando se alcanzó la confluencia. Como fuente de ACMs se utilizó, bien sobrenadante de cultivo *in vitro* de los hibridomas o bien fluido ascítico producido en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (producción *in vivo*), tratados con 0.5 ml de pristano 7-10 días antes de inocularles los hibridomas.

2.2.18 CARACTERIZACION DE LOS ACMs

2.2.18.1 DETERMINACION DEL ISOTIPO DE LOS ACMs

La clase y subclase de los ACMs se determinó por ensayos de ELISA en los que el segundo anticuerpo es un anticuerpo de conejo específico para las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas de ratón, y se emplea un tercer anticuerpo de camero conjugado con peroxidasa, específico para las inmunoglobulinas de conejo. El protocolo empleado fué el indicado por el fabricante (BioRad).

2.2.18.2 DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ACMs

Se determinó mediante ensayos de inmuoadsorción con los distintos productos de expresión de los plásmidos con formas truncadas de la P100, separados por SDS-PAGE y electrotransferidos a papel Inmobilon.

2.2.19 PURIFICACION DEL ACM 1AE1

Los ACMS fueron purificados mediante cromatografía de afinidad en columnas de Sepharosa-proteína A, según el método descrito por el fabricante ("Affinity Chromatography: principles and methods" Pharmacia Fine Chemicals. Suecia). La actividad del ACM purificado se comprobó mediante ensayos de inmunoadsorción con las proteínas totales de la membrana de *T. thermophilus* separados por SDS-PAGE y electrotransferidos a papel Inmobilon.

En el cromatograma de la figura II.2 se muestra la purificación de la Ig del ACM 1AE1 a partir de fluido ascítico y su análisis por SDS-PAGE.

2.2.20 OBTENCION Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS F_{ab}

La preparación directa de fragmentos F_{ab} y F_c de la inmunoglobulina de ratón purificada se realizó por digestión con papaína según métodos ya descritos (Parham, 1986). El tampón de digestión seleccionado fué el tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.3. Para asegurarnos de una digestión completa de la IgG, el tiempo de incubación con papaína se alargó hasta 30 horas. En la figura II.3 se muestra el análisis por SDS-PAGE de la digestión del ACM 1AE1 por papaína.

La purificación de los fragmentos F_{ab} se hizo también mediante cromatografía de afinidad, como en el caso del mismo ACM del que procede, si bien la fracción eluida en este caso es la que contiene los péptidos de digestión que nos interesan. La actividad de reconocimiento de la P100 fué ensayada mediante ELISA con un antisuero de conejo específico para F_{ab} de ratón. En el cromatograma de la figura II.4 se muestra la purificación de los fragmentos del ACM 1AE1 tratado con papaína y su análisis por SDS-PAGE.

2.2.21 ENSAYO DE UNION DEL ACM 1AE1 A LAS ESTRUCTURAS REGULARES DE P100

El protocolo seguido fué básicamente el mismo que el empleado para el marcaje de cápsidas del bacteriófago T4 (Steven y cols., 1991).

Alícuotas de las estructuras periódicas constituidas por la P100 (0.2 mg/ml) en tampón fosfato 0.1 M, MgSO₄ 1 mM, pH 7 (tampón A), se mezclaron con el ACM 1AE1 purificado en un volumen de 150 µl y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y 30 min a

37 °C. La relación molar de IgG a P100 fué de 5:1. Las estructuras fueron precipitadas en una airfuga Beckman (30 psi, 10 min) por dos veces consecutivas y resuspendidas finalmente en un volumen de 30 µl del tampón Hepes 50 mM, MgSO₄ 1 mM, pH 7.4. A continuación se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con un antisuero de carnero específico para IgGs de ratón y conjugado con oro coloidal de 5 nm, diluido 1:10 o 1:50 en el volumen de la muestra. Se centrifugaron nuevamente 2 veces para quitar el exceso de anticuerpo marcado con oro, se resuspendieron en el tampón A, y las muestras fueron tratadas para su análisis por microscopía electrónica (tinción negativa).

2.2.22 ENSAYO DE UNION DEL FRAGMENTO Fab 1AE1 A LA ESTRUCTURA REGULAR DE SIMETRIA HEXAGONAL

Fracciones de membrana que mostraban los cristales bidimensionales de simetría hexagonal fueron incubadas con los fragmentos Fab, purificados a partir de la digestión con papaína del ACM 1AE1 (apartado 2.2.20), en un volumen de 15 µl, durante 1 hora a temperatura ambiente seguida por otras 2 horas a 37 °C. La relación molar de Fab a P100 fué de 10:1. Las estructuras fueron precipitadas a 16.000 x g, 15 min, y resuspendidas suavemente en un volumen igual al de partida en el tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.8. A continuación, las muestras fueron teñidas negativamente para su observación al microscopio electrónico. Como control se empleó una alícuota de la misma muestra añadiendo una cantidad igual de volumen del tampón.

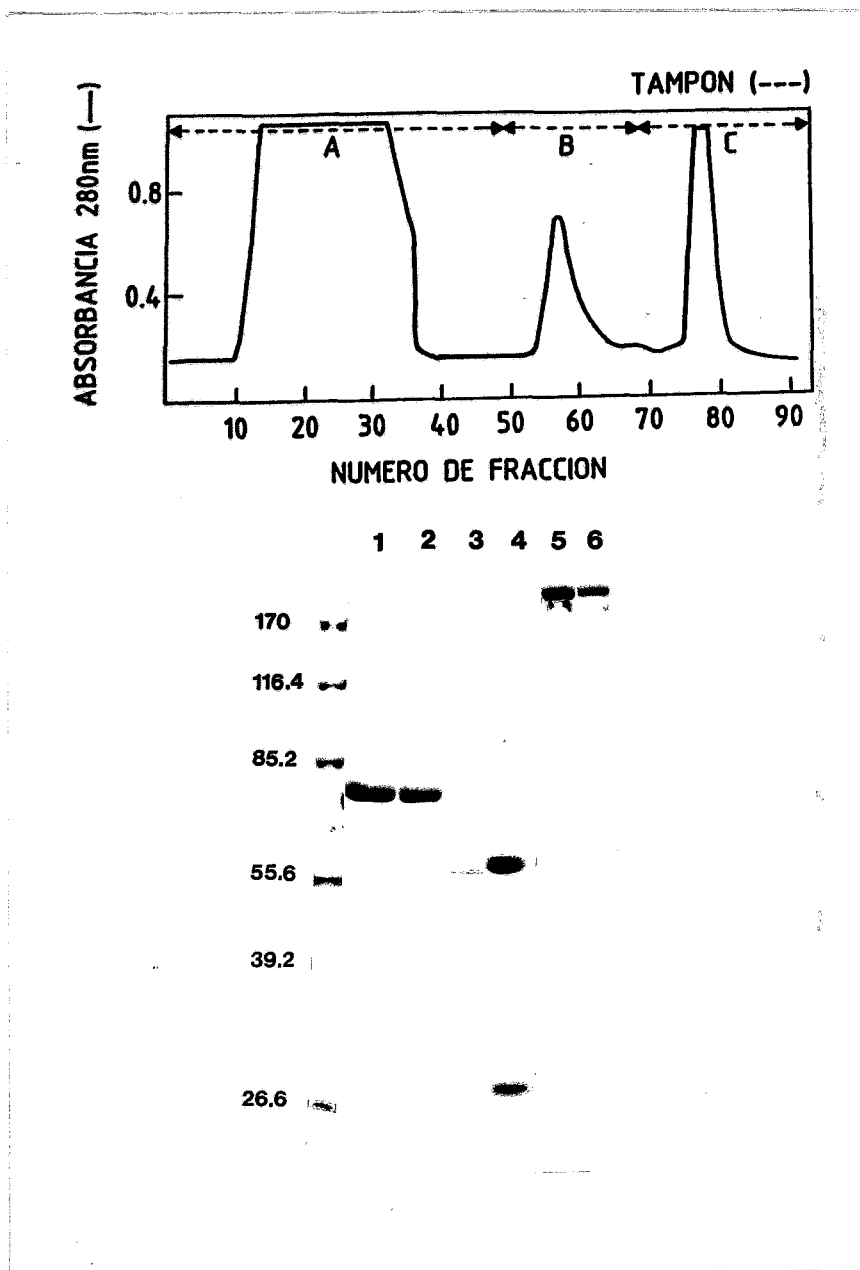


FIGURA II.2 Purificación del ACM 1Ae1 por cromatografía de afinidad. El fluido ascítico producido por el hibridoma 1Ae1 se centrifugó a 10.000 x g 60 min, se pasó por un filtro de 0.45 μ m y se diluyó 1:1 en el tampón de unión (glicina 1.5 M, NaCl 3 M pH 8.9). Posteriormente fue sometido a cromatografía en un columna de Sepharosa-proteína A y se eluyó con los tampones A (tampón de unión), B (Acido cítrico 0.1 M, pH 6) y C (Acido cítrico, pH 3). En la parte superior se muestra el cromatograma obtenido y, en la parte inferior, el análisis de las fracciones por SDS-PAGE al 10%: (1) Fluido ascítico de partida; (2) Fracción eluida con el tampón A; (3) y (5) Fracción eluida con el tampón B; (4) y (6) Fracción eluida con el tampón C. En los carriles 5 y 6 no se incluyó β -mercaptoetanol en el tampón de desnaturalización.

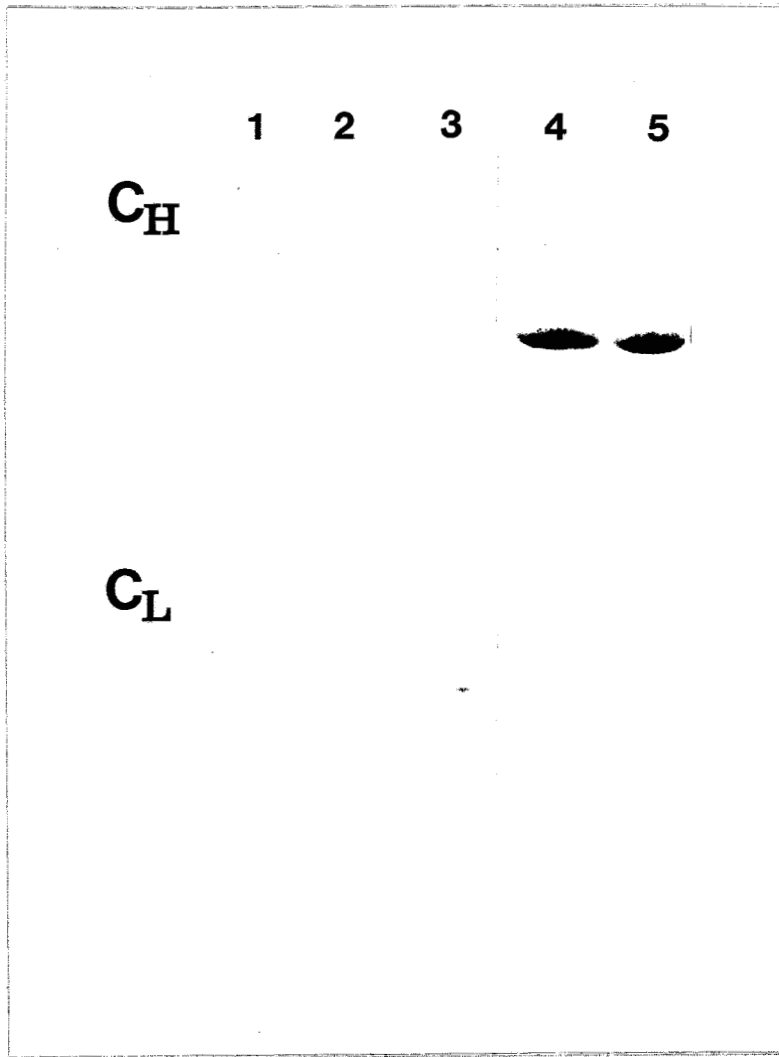


FIGURA II.3 Digestión con papaína del ACM 1AE1. En un experimento por duplicado, 120 μ l (1 mg/ml) del ACM 1AE1 en el tampón fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.3, purificado según se describe en el apartado 3.20, fueron diluidas hasta un volumen de 1 ml en el mismo tampón añadiendo a continuación 50 μ l de EDTA 0.02 M, 50 μ l de cisteína 0.1 M y 10 μ l de una solución de papaína de 1 mg/ml. Tras 30 horas de incubación a 37°C se añadió 50 μ l de yodoacetamida 0.15 M a la muestra que, una vez dializada frente a PBS durante 24-36 horas, fué analizada por SDS-PAGE (12%): (1) Ig del ACM 1AE1 (C_H y C_L : cadenas pesada y ligera de la IgG, respectivamente); (2) y (3) productos de digestión (1, 2 y 3 fueron analizados en condiciones reductoras); (4) y (5) productos de digestión hervidos en un tampón de desnaturalización sin β -mercaptoetanol

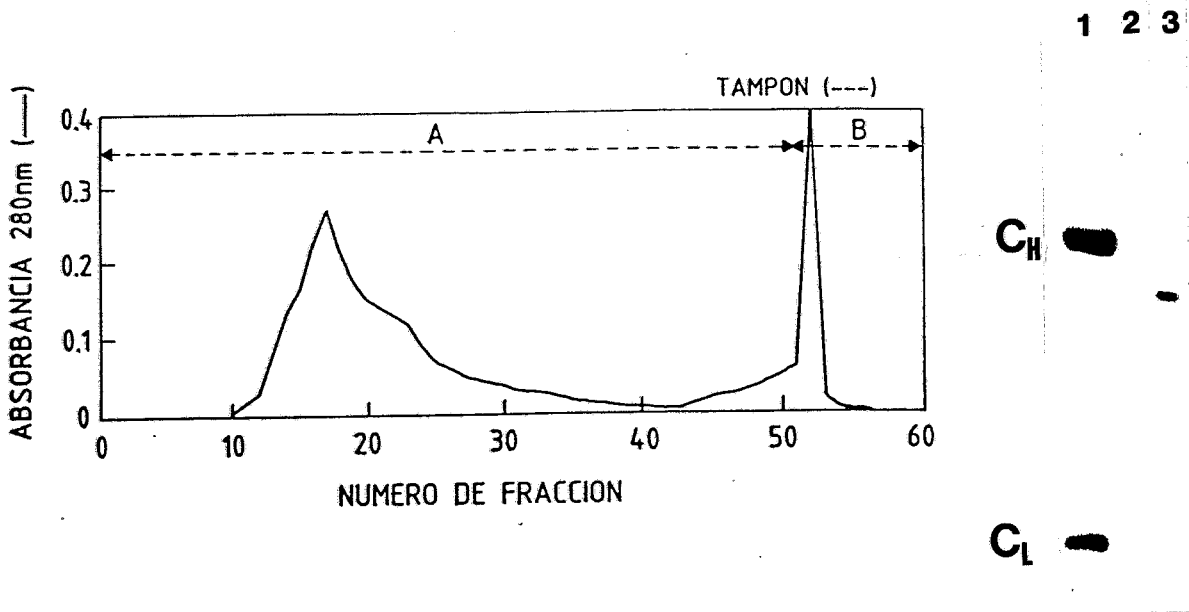


FIGURA II.4 Purificación del fragmento Fab del ACM 1AE1. Los productos de digestión del ACM 1AE1, obtenidos con papaína, fueron sometidos a cromatografía en una columna de Sepharosa-proteína A y eluidos con los tampones A (glicina 1.5 M, NaCl 3 M, pH 8.9) y B (Acido cítrico, pH 3). En la parte izquierda se muestra el cromatograma obtenido y, en la derecha, el análisis electroforético de la fracción eluida con el tampón A: (1) Ig del ACM 1AE1 (C_H y C_L: cadenas pesada y ligera de la IgG, respectivamente); (2) y (3) Péptidos de la fracciones eluidas en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol, respectivamente.

RESULTADOS

3.0 RESULTADOS

3.1 CRIOFRACTURA Y TINCION NEGATIVA DE CELULAS ENTERAS DE *T. thermophilus*

Partiendo de células en crecimiento exponencial y, tras prepararlas por criofractura para su análisis por Microscopía Electrónica según el método 2.2.2.6 (a), se obtuvieron micrografías como la observada en la figura III.1. La gran mayoría de las células presentaban una superficie irregular, probablemente debido a la presencia de una cubierta externa semejante a las capas de LPS observables en Gram negativas, que dan una apariencia amorfa típica (figura III.1A). Sin embargo en algunos casos, que no llegaron al 2% sobre un total de 200 áreas de observación, se podían distinguir superficies con una cierta ordenación regular (figura III.1B). Asimismo, ocasionalmente se podía distinguir, mediante tinción negativa, dicha periodicidad en los extremos de algunas células (figura III.1C). Este hecho hacía suponer que se estaba produciendo un enmascaramiento de una posible capa regular por componentes externos. Con objeto de poner de manifiesto inequívocamente esta superficie periódica, se procedió a la repetición del mismo experimento, sobre células tratadas previamente con EDTA. Dicho agente quelante aumenta la permeabilidad y sensibilidad de las células a enzimas hidrolíticas, debido a la extracción del LPS de la membrana externa (Hammond y cols, 1984) que, en nuestro caso, implicaría desenmascarar una posible capa estructural en *T. thermophilus*.

En la figura III.1D se muestran los resultados de un experimento en el que un precipitado de células en fase exponencial fué resuspendido en tampón Tris-HCl 50 mM, 100 mM de EDTA, pH 7.8, incubado durante 15 min a temperatura ambiente, y sometido al tratamiento por criofractura. Como se puede observar, la presencia de una capa regular cristalina, o capa S, es fácilmente detectable. Los surcos transversales superficiales pueden ser debidos a fenómenos de colapsamiento en las etapas de adsorción y/o sublimación del hielo (Kistler y cols, 1977), o bien presentarse de forma natural como necesidades geométricas (Nabarro y Harris, 1971).

3.2 IDENTIFICACION ELECTROFORÉTICA Y ANALISIS POR TINCION NEGATIVA DE LAS FRACCIONES DE LA ENVOLTURA CELULAR

Para la identificación de los componentes de la estructura periódica observada en *T. thermophilus*, procedimos al análisis electroforético de membranas totales y fracciones

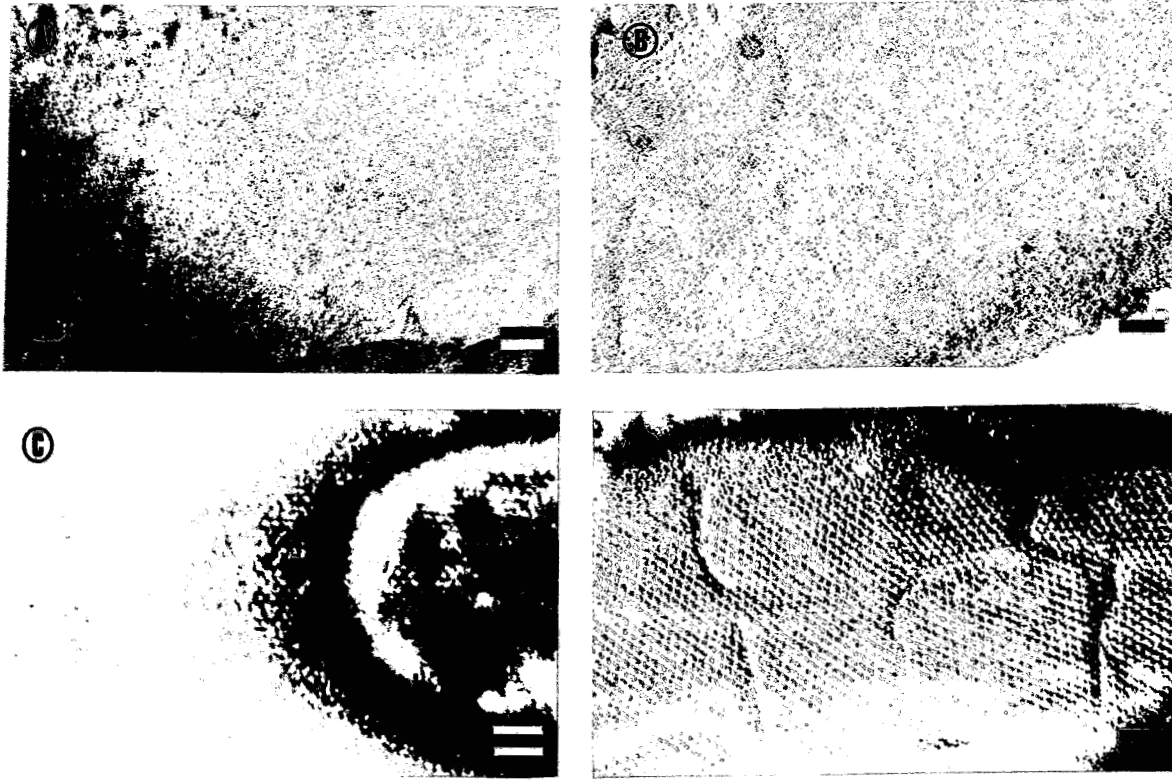


FIGURA III.1 Microscopía electrónica de células de *T. thermophilus*. Una suspensión concentrada de células en crecimiento exponencial fué preparada por criofractura (A,B y D) o directamente por tinción negativa (C), y observada al microscopio electrónico: (A) Célula mostrando una superficie irregular; (B) Célula mostrando una superficie ligeramente ordenada (2% del total de células observadas); (C) Extremo de una célula, teñida negativamente con fosfotungstato sódico al 2%, mostrando una zona regular; (D) Célula tratada con 100 mM de EDTA (10 min, 20 °C). Las barras representan 100 nm.

solubles en distintos detergentes.

Membranas obtenidas como se describió en el apartado 2.2.6, fueron incubadas con TX-100 1% (p/v) durante 1 hora a 60°C, separándose los componentes solubles e insolubles mediante centrifugación a 15.000 x g durante 10 min. El precipitado insoluble fué lavado dos veces en agua destilada e incubado a continuación con SDS 1% (p/v), 1 hora a 60°C. Del mismo modo que el descrito anteriormente fueron obtenidas las fases solubles e insolubles en SDS.

Las muestras así obtenidas fueron separadas en dos alícuotas: una de ellas se analizó electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 10%, y la otra fué analizada por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) tras tinción con fosfotungstato sódico al 2% (figura III.2).

En el análisis mediante SDS-PAGE, las muestras fueron tratadas en el tampón de desnaturalización (apartado 2.2.4.2) a 100 °C, 15 min. Con los precipitados insolubles se siguió el mismo procedimiento, retirando el peptidoglicano insoluble por centrifugación, previamente a la separación electroforética. Como control se utilizó una muestra de membranas totales en el que se puede observar cómo el patrón de proteínas totales de *T. thermophilus*, en presencia de EDTA 5 mM, presenta dos proteínas mayoritarias de Mr 100.000 (P100) y 84.000 (P84) (figura III.2, carril A). Con TX-100 al 1% se extraen la mayor parte de las proteínas de bajo peso molecular junto con la P84 (carril B), permaneciendo insoluble la P100 (carril C). El tratamiento posterior con SDS al 1% en las mismas condiciones produce la solubilización prácticamente total de esta proteína (80%, carril D).

Al comparar los resultados obtenidos con el análisis por tinción negativa de las fracciones de la envoltura celular, se puede inferir que la proteína P100 debe ser el componente proteico mayoritario de la capa S. Hemos de notar que la solubilización con SDS permite que las capas S sean observadas como estructuras planas y no formando parte de restos de envolturas celulares (figura III.2D).

3.3 ANALISIS ESTRUCTURAL DE LA SUPERFICIE NATIVA DE LA CAPA S

La técnica de criofractura y sombreado metálico (apartado 2.2.2.6), fué empleada para mostrar las características de la superficie nativa de células de *T. thermophilus*.

solubles en distintos detergentes.

Membranas obtenidas como se describió en el apartado 2.2.6, fueron incubadas con TX-100 1% (p/v) durante 1 hora a 60°C, separándose los componentes solubles e insolubles mediante centrifugación a 15.000 x g durante 10 min. El precipitado insoluble fué lavado dos veces en agua destilada e incubado a continuación con SDS 1% (p/v), 1 hora a 60°C. Del mismo modo que el descrito anteriormente fueron obtenidas las fases solubles e insolubles en SDS.

Las muestras así obtenidas fueron separadas en dos alícuotas: una de ellas se analizó electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 10%, y la otra fué analizada por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) tras tinción con fosfotungstato sódico al 2% (figura III.2).

En el análisis mediante SDS-PAGE, las muestras fueron tratadas en el tampón de desnaturalización (apartado 2.2.4.2) a 100 °C, 15 min. Con los precipitados insolubles se siguió el mismo procedimiento, retirando el peptidoglicano insoluble por centrifugación, previamente a la separación electroforética. Como control se utilizó una muestra de membranas totales en el que se puede observar cómo el patrón de proteínas totales de *T. thermophilus*, en presencia de EDTA 5 mM, presenta dos proteínas mayoritarias de Mr 100.000 (P100) y 84.000 (P84) (figura III.2, carril A). Con TX-100 al 1% se extraen la mayor parte de las proteínas de bajo peso molecular junto con la P84 (carril B), permaneciendo insoluble la P100 (carril C). El tratamiento posterior con SDS al 1% en las mismas condiciones produce la solubilización prácticamente total de esta proteína (80%, carril D).

Al comparar los resultados obtenidos con el análisis por tinción negativa de las fracciones de la envoltura celular, se puede inferir que la proteína P100 debe ser el componente proteico mayoritario de la capa S. Hemos de notar que la solubilización con SDS permite que las capas S sean observadas como estructuras planas y no formando parte de restos de envolturas celulares (figura III.2D).

3.3 ANALISIS ESTRUCTURAL DE LA SUPERFICIE NATIVA DE LA CAPA S

La técnica de criofractura y sombreado metálico (apartado 2.2.2.6), fué empleada para mostrar las características de la superficie nativa de células de *T. thermophilus*.

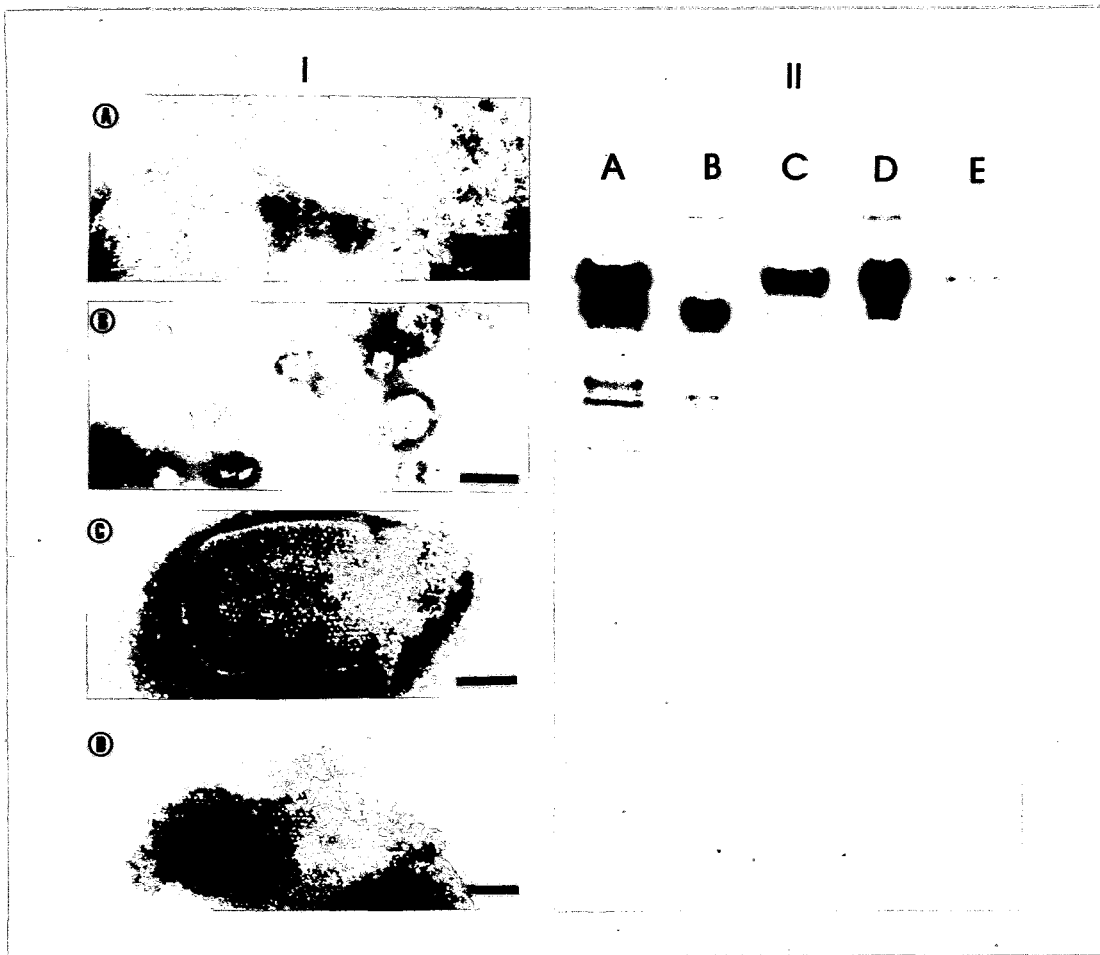


FIGURA III.2 Estructura y composición proteica de las fracciones de la envoltura celular. Membranas totales, obtenidas según el método 2.2.6, fueron fraccionadas mediante solubilización diferencial con TX-100 al 1% (1 hora a 60°C) y SDS al 1% (1 hora a 60°C). las fracciones solubles e insolubles fueron separadas por centrifugación a 15.000 x g, 10 min. Los precipitados correspondientes, así como los sobrenadantes de cada extracción, fueron preparados para su análisis por MET mediante tinción negativa (I) y SDS-PAGE (II) como se indica en el apartado 3.2 (A) Envolturas celulares totales; (B) Material soluble en TX-100 al 1%; (C) Material insoluble en TX-100; (D) Material soluble en SDS al 1% (insoluble en TX-100); (E) Material insoluble en TX-100 y SDS. Las barras representan 200 nm.

La constante de red, o distancia entre puntos equivalentes de la red, fué determinada a partir de micrografías electrónicas, utilizando un microcomparador Nikon modelo 6CT2. Los valores medios y desviaciones standard de las distancias medidas fueron de 24 ± 2 nm a partir de las preparaciones por criofractura, y 22 ± 2 nm de las preparaciones por tinción negativa, sobre un total de 200 mediciones para cada caso. Teniendo en cuenta que en el primer caso, partiendo además de células enteras, no se introduce ningún agente de tinción, la dimensión real de la red debe estar más próxima a 24 ± 2 nm.

La localización de las reflexiones en el patrón de difracción, obtenido también a partir de micrografías electrónicas, indica la simetría hexagonal del cristal que se corresponde con la red cristalina de la capa S en el espacio real (figura III.3B). En los difractogramas aparecen 4 órdenes de difracción; ello nos permitió llegar a una resolución cristalográfica de al menos 6 nm, suficiente para determinar algunos elementos estructurales de la capa S.

En los análisis de reconstrucción de imágenes se utilizaron las superficies que quedaban reveladas por criofractura (figura III.3A), tomando aquellas cuyos difractogramas estaban libres de astigmatismo. En la figura III.3C se presentan los resultados de las dos mejores reconstrucciones a partir de una selección de 10 campos. Las áreas digitalizadas tenían un tamaño de 1.2 cm^2 (se representan encuadradas en la figura III.3A). Las filtraciones mediante el método de Fourier de la estructura cristalina regular se muestra en la figura III.3C, donde se eliminó toda la información no periódica presente en la imagen original.

En las imágenes filtradas se pueden observar zonas intensas correspondientes a la red y zonas oscuras que se corresponden con espacios vacíos y se pueden distinguir varios elementos morfológicos. La celdilla unidad está formada por un área central, en forma de rueda con dientes, con una depresión en el centro que probablemente atraviesa el complejo en la dirección transmembranal. A partir de este área central irradian seis brazos conectados con brazos adyacentes de celdillas unidad vecinas en la red hexagonal. Es de suponer que estas conexiones, mediadas directamente por brazos, serían las responsables de la integridad de la red que se observa tras su extracción con detergentes. De la apariencia tridimensional de las imágenes reconstruidas, se deduce que el área central estaría por encima del plano donde se conectan los brazos por la altura diferencial medida en las zonas sombreadas.

A pesar de que mediante MET se obtienen proyecciones bidimensionales a lo largo del eje perpendicular al plano de la muestra, es fácil establecer una correlación entre los

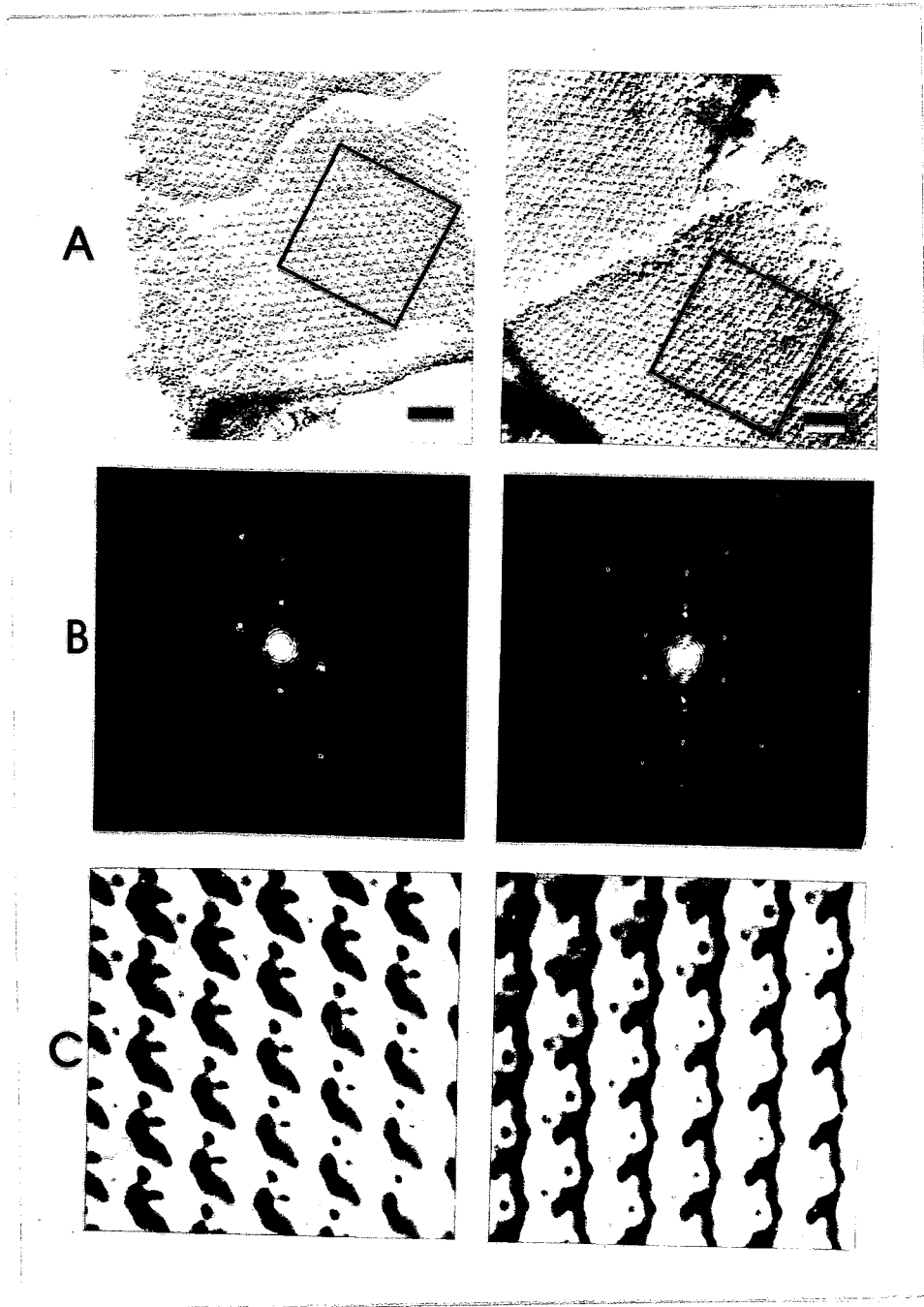
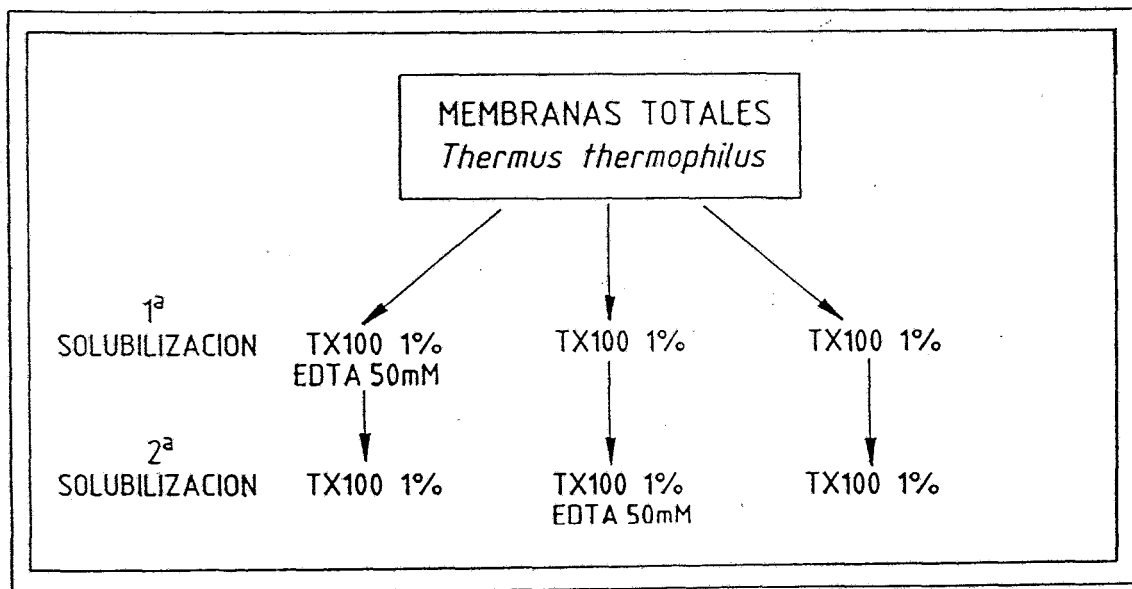


FIGURA III.3 Procesamiento de imágenes de micrografías electrónicas de la capa regular superficial. Imágenes de las capas S reveladas por criofractura en células tratadas con EDTA 100 mM pH 7.8, durante 15 min a 20°C, fueron seleccionadas para su digitalización y posterior procesamiento, según se describió en el apartado 2.3. (A) Micrografías originales (las zonas encuadradas fueron las que se procesaron); (B) Difractogramas ópticos; (C) Imágenes filtradas por el método de Fourier. Las barras representan 100 nm.

elementos morfológicos presentes en la imagen filtrada y los elementos bioquímicos de la muestra, moléculas de P100, si tenemos en cuenta las propiedades descritas para éstos en el trabajo previo de Berenguer y cols. (1988). Posiblemente la celdilla unidad está formada por la participación de trímeros de la P100.

3.4 SOLUBILIZACION DIFERENCIAL DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA

El hecho de que los cristales bidimensionales, obtenidos mediante la solubilización con SDS al 1%, presentasen una baja integridad estructural (la máxima resolución alcanzable era de 5 nm), nos hizo plantearnos diferentes alternativas para obtener dichos cristales con una mejor preservación, y poder deducir elementos estructurales con una resolución más significativa. Con este fin, sometimos varias alícuotas de membranas totales de *T. thermophilus* a dos solubilizaciones consecutivas, a 60°C durante 1 hora, con TX-100 al 1% en presencia o ausencia de 50 mM de EDTA pH 7.8, de la manera que se indica en el siguiente esquema:



El análisis electroforético de todas las fracciones obtenidas se muestra en la figura III.4. El precipitado insoluble de la extracción secuencial con TX-100 y 50 mM de EDTA y posterior extracción sólo con el detergente, está constituido fundamentalmente por las proteínas P100 y P84 (carril 4); después de una tercera extracción con TX-100, la P84 es solubilizada (carril 5), quedando la P100 como la proteína mayoritaria del precipitado (carril 6). Las solubilizaciones secuenciales con TX-100 en la primera y TX-100 y EDTA en la

segunda, dan también como resultado un precipitado mayoritariamente constituido por P100 (carril 10). Por último, la doble extracción con TX-100 resulta de nuevo en una fracción insoluble compuesta esencialmente por P100 (carril 14).

Con respecto a la P84 resulta importante destacar dos aspectos de los resultados observados en la figura III.4. Por un lado, la solubilización de la P84 está influida por la presencia del agente quelante de forma tal que cuando el EDTA se encuentra a una concentración de 50 mM, la P84 prácticamente no resulta solubilizada (carril 1). Sin embargo, en ausencia de EDTA se extrae casi en su totalidad con TX-100 (carriles 7 y 11). De hecho, del análisis de solubilizaciones de proteínas de membrana con TX-100 al 1% y distintas concentraciones de EDTA, mostrado en la figura III.5, se puede deducir que la extracción de P84 está inversamente relacionada con la concentración de EDTA. El segundo aspecto destacable es la transformación aparente en muchos experimentos de la P84 en un conjunto de 3-4 bandas de movilidades muy similares (figura III.4: carriles 3, 7 y 11). Aparentemente este comportamiento podría estar relacionado con fenómenos de degradación parcial de la proteína.

A pesar de estar constituidos mayoritariamente por la P100, la observación al microscopio electrónico de los precipitados obtenidos en las diferentes solubilizaciones, reveló la presencia de estructuras muy distintas para los cristales bidimensionales que se obtuvieron: hexagonal o irregular, a partir de la fracción del carril 6 (figura III.6a); irregular o tubular, a partir de la fracción del carril 10 (figura III.6b); y rectangular a partir de la fracción del carril 14 (figura III.6c). Se les denominó cristales S1, pseudoS2 (pS2) y S2, respectivamente. Se estaba planteando la interesante posibilidad de que una misma proteína tuviese la capacidad de constituir diferentes agregados bidimensionales

3.4.1 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LOS CRISTALES TIPO S1

A partir de las imágenes de proyección de los cristales bidimensionales denominados S1, y promediando un total de 9 de las mejores micrografías, determinamos su estructura bidimensional. La apariencia de dichos cristales, teñidos con acetato de uranilo al 2% (p/v), coincidía con la observada *in vivo* e *in vitro* para la capa S de *T. thermophilus* (figura III.2), si bien las dimensiones de la celdilla unidad, de 19.2 ± 0.2 nm, eran algo menores (figura III.7a). Evidentemente, el difractograma o la Transformada de Fourier (cuya representación de los módulos es similar al difractograma), mostró una simetría hexagonal, pero ahora los puntos de difracción se extendían hasta los $1/3.2$ nm⁻¹ (figura III.7b).

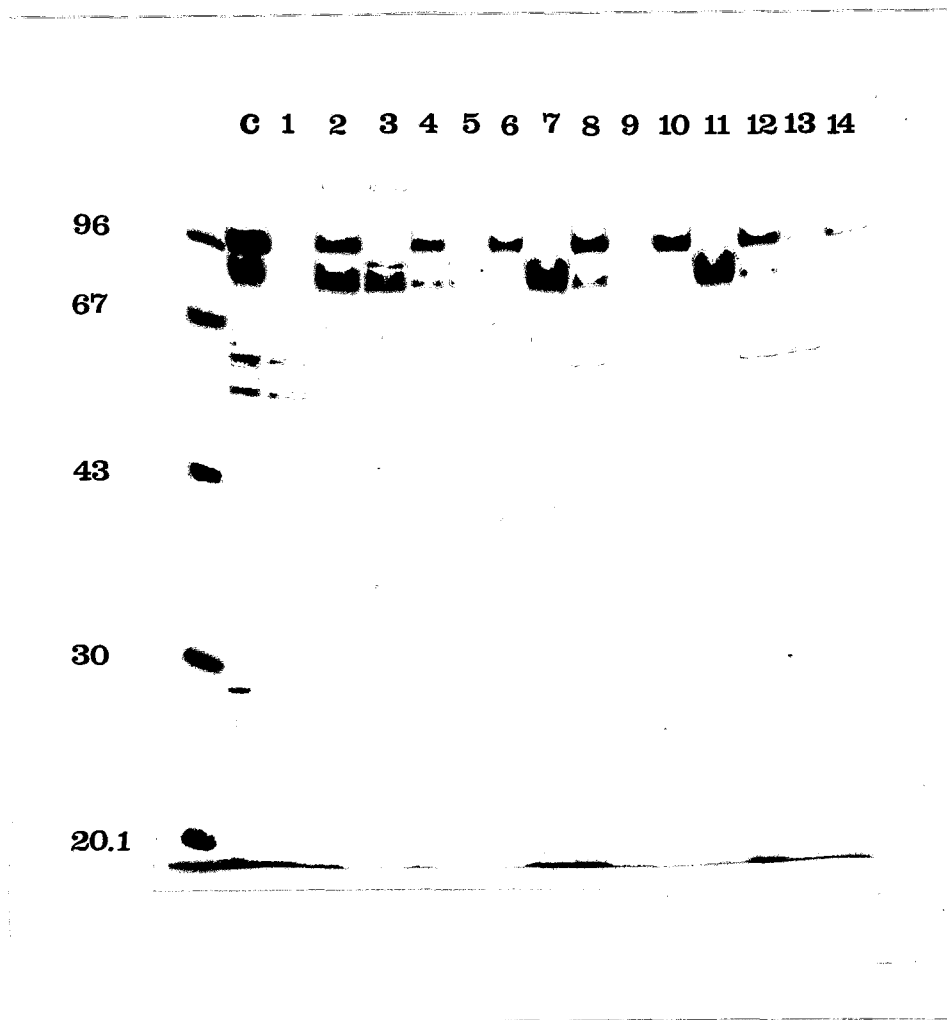


FIGURA III.4 Análisis electroforético de las fracciones de la envoltura celular. Membranas totales fueron fraccionadas mediante solubilizaciones secuenciales con TX-100 al 1%, en presencia o ausencia de 50 mM de EDTA, según se describe en apartado 3.4 de resultados. (C) Control de proteínas totales de la membrana de *T. thermophilus*; (1) y (2) Fracciones soluble e insoluble respectivamente, en TX-100 al 1%, 50 mM de EDTA; (3) y (4) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (2); (5) y (6) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (4); (7) y (8) Fracciones soluble e insoluble de proteínas totales de membrana en TX-100 al 1%; (9) y (10) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, 50 mM de EDTA, a partir de (8); (11) y (12) Fracciones soluble e insoluble de proteínas totales de membrana en TX-100 al 1%; (13) y (14) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (12). En la izquierda del gel, marcadores de Mr (kDa).

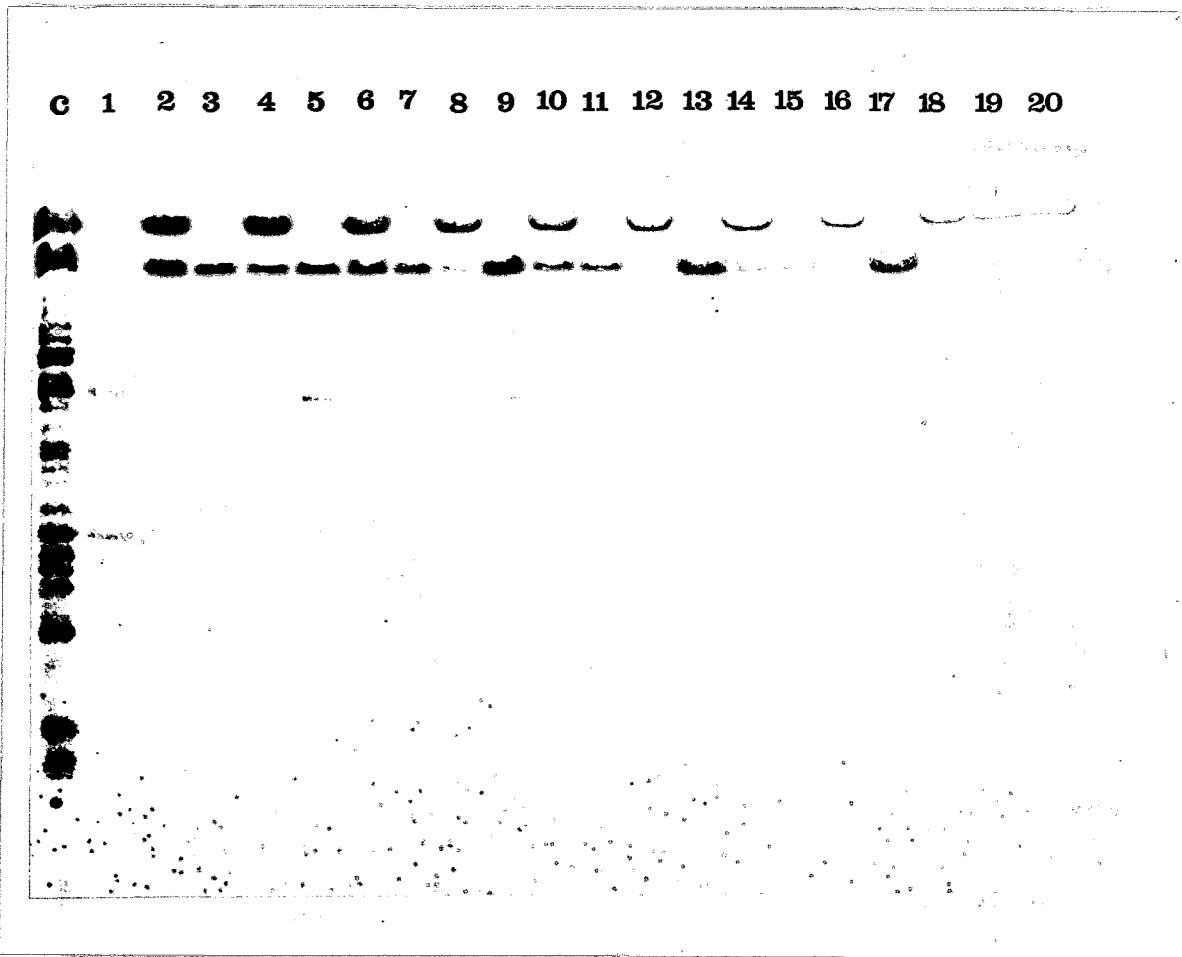


FIGURA III.5 Influencia del EDTA en la solubilización diferencial de la proteína P84. Membranas totales fueron fraccionadas mediante dos solubilizaciones secuenciales: la primera con TX-100 al 1%, en presencia de distintas concentraciones de EDTA, y la segunda solamente con TX-100 al 1%, a 60°C durante 1 hora. (C) Control de proteínas totales de la membrana de *T. thermophilus*; (1) y (2) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, 50 mM de EDTA; (3) y (4) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (2); (5) y (6) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, 25 mM de EDTA; (7) y (8) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (6); (9) y (10) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, 10 mM de EDTA; (11) y (12) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (10); (13) y (14) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, 5 mM de EDTA; (15) y (16) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (14); (17) y (18) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (18); (19) y (20) Fracciones soluble e insoluble en TX-100 al 1%, a partir de (18).

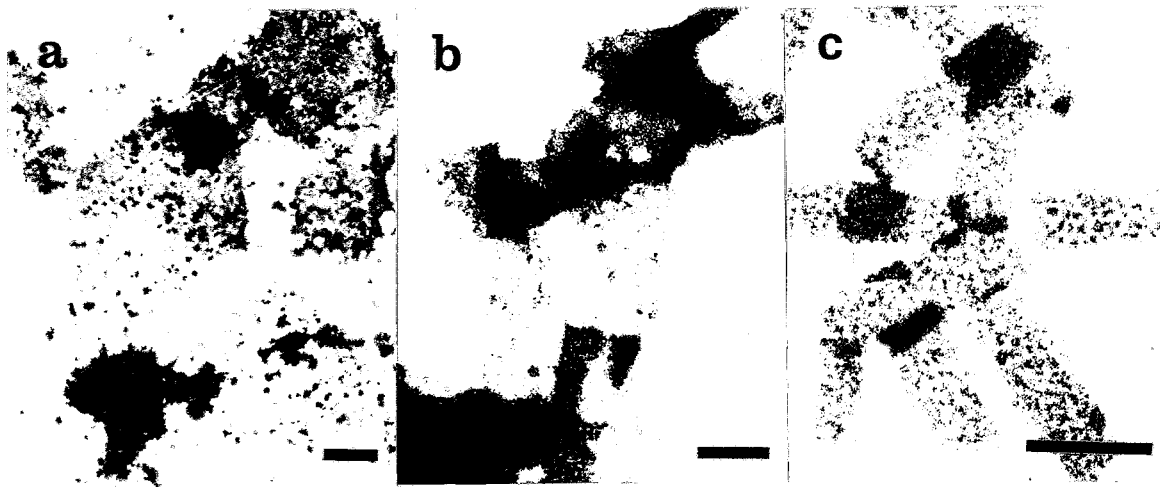


FIGURA III.6 Vista general al microscopio electrónico de los diferentes cristales constituidos por P100. A partir de membranas totales, y tras las solubilizaciones secuenciales realizadas según se describen al pie de la figura III.4, los precipitados insolubles obtenidos (carriles 6, 10 y 14) se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2%. (a) Fragmentos hexagonales de la estructura S1; (b) cristales de la estructura pS2; (c) Cristales bidimensionales rectangulares de la estructura S2. Las barras representan 0.5 μm .

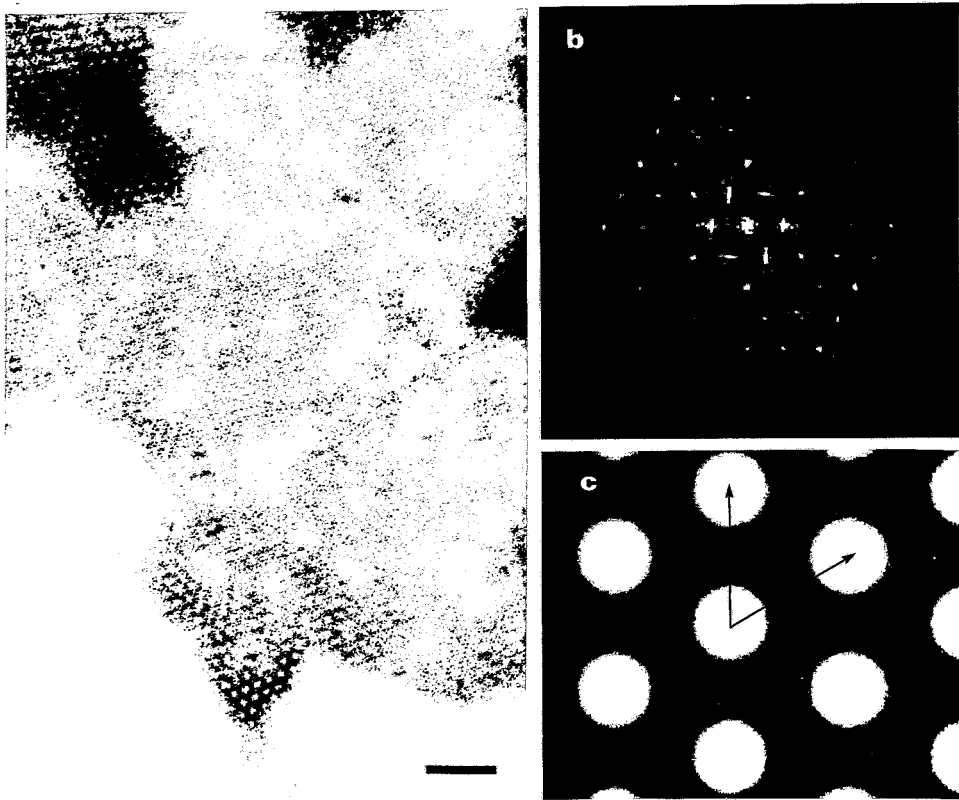


FIGURA III.7 Cristales bidimensionales de simetría hexagonal (S1). (a) Imagen a 0° de un cristal bidimensional teñido negativamente con acetato de uranilo al 2%; (b) Transformada de Fourier del cristal anterior. Los puntos de difracción nítidos alcanzan el 6º orden ($1/3.2 \text{ nm}^{-1}$); (c) Imagen promedio obtenida por Filtración de Fourier de cristales como el presentado en (a). Los vectores de la celdilla unidad, desde un centro p6 a otro equivalente e indicados por flechas, son $a=b= 19.2 \pm 0.2 \text{ nm}$. La barra representa 100 nm.

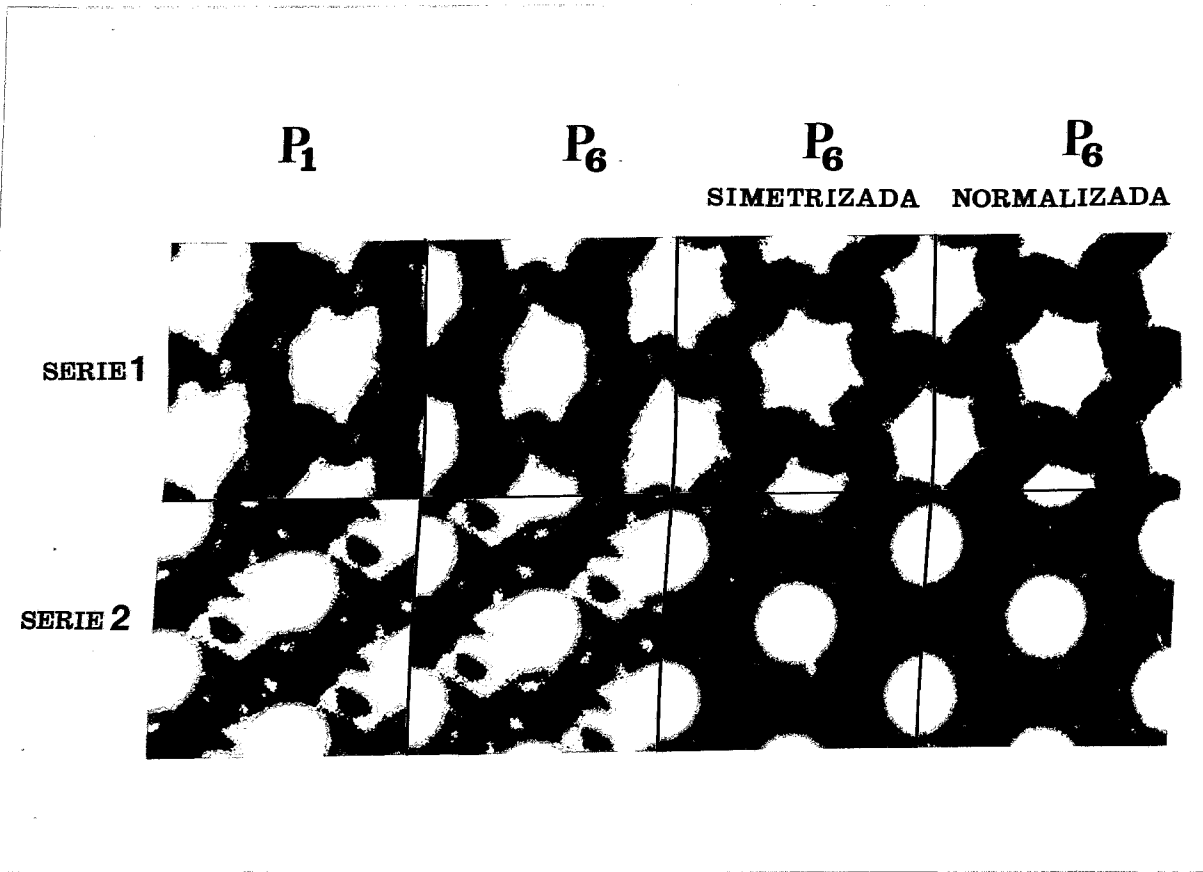


FIGURA III.8 Análisis bidimensional de los cristales tipo S1. Dos áreas regulares de distintos cristales S1 (series 1 y 2), obtenidos tras el análisis microscópico de la fracción 6 (figuras III.4 y III.6a), fueron procesadas (digitalización, TF y filtración) bajo la imposición de diversas restricciones de simetría: (p_1) Controles de imágenes filtradas; (p_6) Imágenes filtradas y centradas en el eje de simetría de orden 6; (p_6 simetrizada) Imágenes filtradas, centradas y simetrizadas con respecto al eje de 6º orden; (p_6 normalizada) Imágenes filtradas, centradas, simetrizadas y con los valores de fase de los puntos de la TF corregidos con respecto a aquellos que son más frecuentes.

rebajaba el número de órdenes considerados. Estos resultados dan cuenta de lo erróneo del planteamiento inicialmente supuesto, y por ello las imágenes filtradas se obtuvieron sin imposición de simetría alguna (figura III.9c). Se puede apreciar la existencia de trímeros de poros alrededor de un área de, supuestamente, simetría P3; no se puede definir con exactitud si dicho área también es un poro de mayor tamaño, o bien si la heterogeneidad que presenta se debe a problemas de contraste en el proceso de la tinción negativa por las características propias del cristal.

3.4.3 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LOS CRISTALES TIPO S2

Como se ha mostrado en la figura III.4, una doble extracción consecutiva con TX-100 al 1% de las membranas de *Thermus* genera una fracción insoluble en la que la proteína mayoritaria, P100, se encuentra formando cristales rectangulares (figura III.10a). Las dimensiones de la celdilla unidad en esta estructura, determinadas del mismo modo que para los cristales pS2, son de $a = 24.2 \pm 0.2$ y $b = 21 \pm 0.2$ nm.

Según se infiere del difractograma óptico (figura III.10b), los cristales presentan una simetría P2 con puntos de difracción que se extienden hasta una resolución de aproximadamente 2.5 nm. Las imágenes filtradas, obtenidas tras el promediado de 11 áreas distintas, se muestran en la figura III.10c. La apariencia de los cristales S2 es muy similar a la presentada por los cristales pS2, aunque en este caso los supuestos centros de simetría P3 han desaparecido. Probablemente mediante desplazamientos longitudinales de los trímeros de poros se podría constituir una estructura de tipo pS2 a partir de una S2. Es interesante destacar que la morfología de los cristales tetragonales es muy similar a la mostrada por las proteínas de membrana externa de *E. coli* implicadas en la permeación de solutos (porinas).

3.5 IDENTIDAD PROTEICA DE LAS DISTINTAS ESTRUCTURAS PERIODICAS

Aunque la movilidad electroforética del componente mayoritario de las tres estructuras analizadas era la misma (100 kDa), la demostración de su identidad proteica exigía la realización de experimentos adicionales. Con este fin se recurrió a la proteólisis limitada de las fracciones que mostraban los distintos tipos de red. Para ello, las proteínas de cada una de las estructuras fueron solubilizadas con SDS al 1% (60°C, 1 hora) y, para que presentasen una estructura completamente accesible a las proteasas, diluidas después en el tampón de proteólisis (descrito en el apartado 2.2.11) y hervidas durante 10 min,

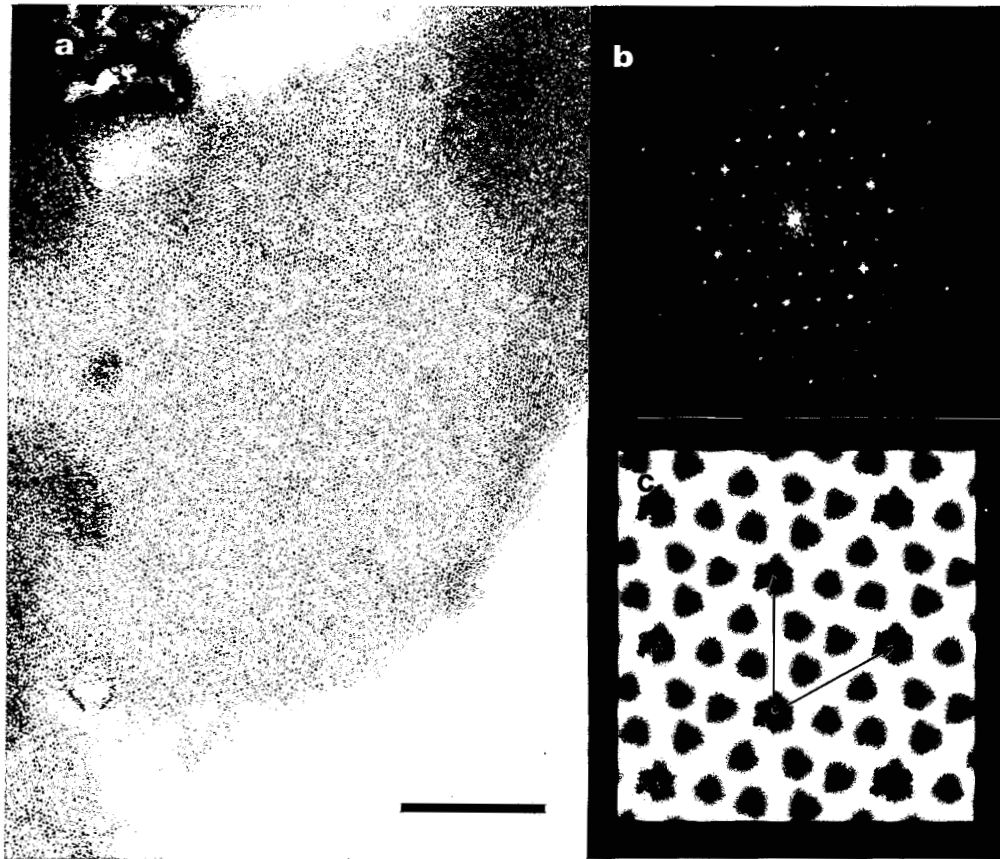


FIGURA III.9 Cristales bidimensionales del tipo pseudoS2. (a) Imagen no inclinada de un cristal teñido negativamente; (b) Transformada de Fourier del cristal anterior. Los puntos de difracción se extienden hasta el 7^o orden (frecuencias del orden de 2.57 nm^{-1}); (c) Imagen obtenida por Filtración de Fourier del cristal mostrado en (a). Los vectores de la celdilla unidad, indicados por flechas, son $a=b= 18 \text{ nm}$. La barra representa 100 nm .

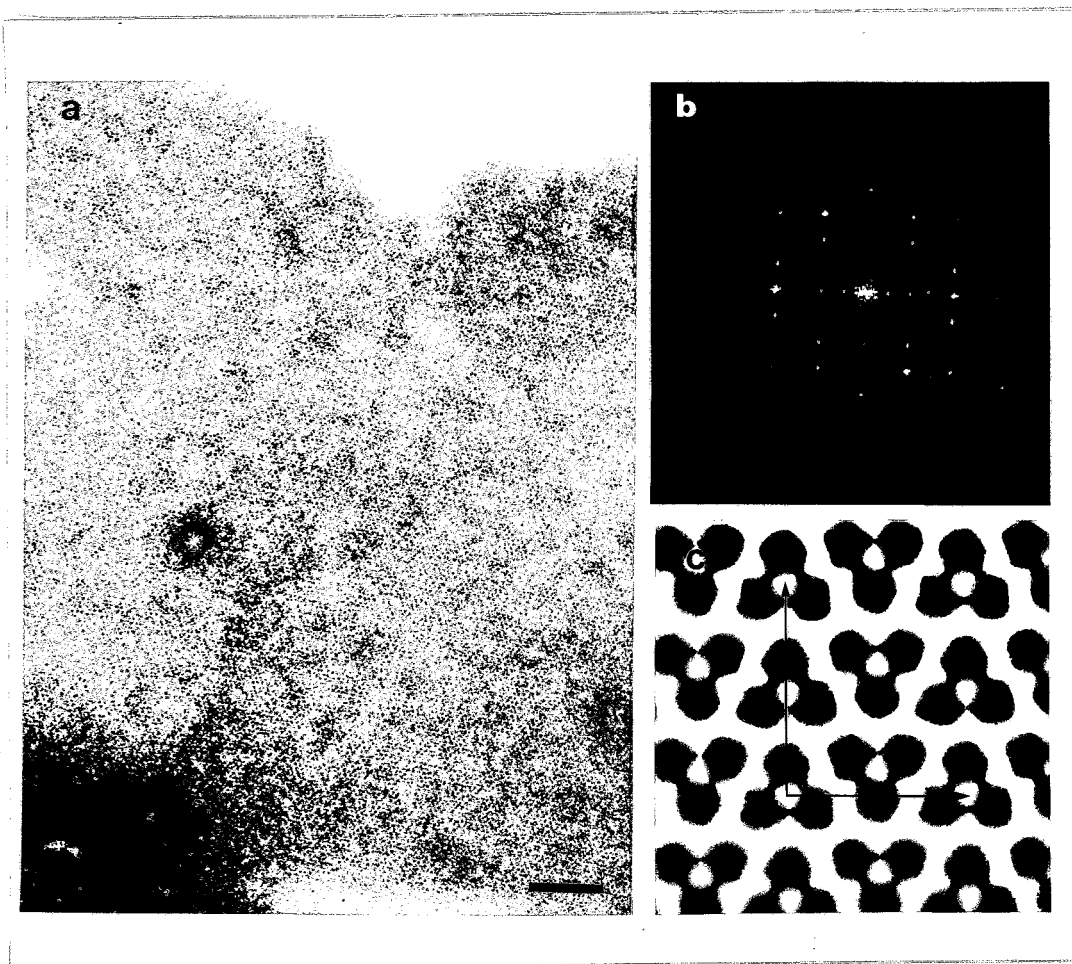


FIGURA III.10 Cristales bidimensionales de simetría tetragonal (S2). (a) Imagen a 0° de inclinación de un cristal S2 teñido negativamente con acetato de uranilo al 2%; (b) Transformada de Fourier del cristal anterior. Los spots de difracción se extienden hasta el 10° orden, con una resolución de aproximadamente 20 \AA^{-1} ; (c) Imagen filtrada por el método de Fourier del cristal mostrado en (a). Los vectores de la celdilla unidad, indicados por flechas, son $a=24.2$ y $b=21$ nm. La barra representa 100 nm

previamente a la adición de proteasas. Las proteasas que se utilizaron fueron las siguientes: Proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*, α -quimiotripsina y tripsina.

Los péptidos resultantes de las digestiones parciales fueron separados en un gel de acrilamida al 12%, y posteriormente detectados por tinción con azul de Coomassie (figura III.11) o con anticuerpos α -P100 tras ser electrotransferidos a papel Inmobilon (figura III.12). Cuando las fracciones de las distintas estructuras son sometidas al tratamiento con la misma proteasa, es evidente la identidad en los productos de digestión con los dos sistemas de detección. La detección con anticuerpos α -P100 descartó cualquier duda sobre la procedencia de dichos fragmentos proteolíticos, si bien no todos los fragmentos visualizados en el gel son detectados en el inmunoblot y viceversa, puesto que la mayoría de los anticuerpos en el suero policlonal están dirigidos contra la zona amino terminal de la P100 (Faraldo y cols., 1991).

Estos datos confirmaban la sorprendente capacidad de la proteína P100 para constituir distintas estructuras cristalinas, e implicarían cambios conformacionales bien intra-dominios, que parecen improbables, o bien inter-dominios, con la "simple" alteración de la disposición de todos o algunos de los dominios de la proteína P100. Evidentemente, deben de estar implicados otros factores afectados en el proceso de solubilización secuencial que provocan tales cambios.

3.6 RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA DE SIMETRIA HEXAGONAL

La reconstrucción tridimensional de los cristales hexagonales se realizó mediante el análisis de vistas a distintos ángulos de inclinación, hasta un máximo de $\pm 60^\circ$, tomadas en condiciones de mínima dosis electrónica, y la posterior combinación de éstas mediante métodos basados en la Transformada de Fourier tridimensional.

Como ya se mencionó, las series de vistas inclinadas empleadas para la reconstrucción tridimensional fueron tres, combinadas independientemente tras imponer una simetría P6. Puesto que a la resolución alcanzada las reconstrucciones individuales proporcionaron resultados análogos, se tomó una de ellas para obtener el modelo tridimensional final. Ello fué debido a la imposibilidad de determinar la orientación del cristal sobre la superficie de la rejilla a la que está adsorbido ("la mano"). El mapa de densidades del espécimen reconstruido se representó a través de planos perpendiculares al eje Z (esto es,

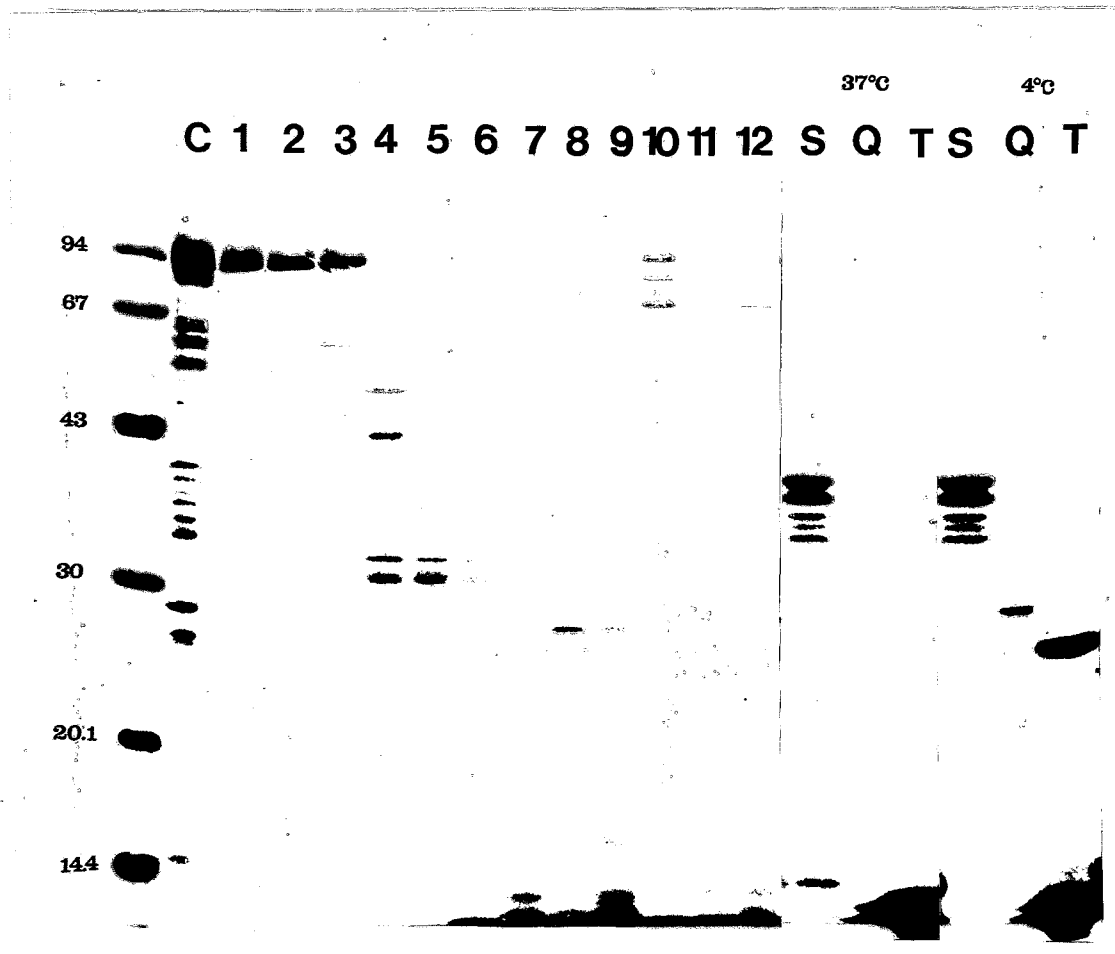


FIGURA III.11 Análisis electroforético de la proteólisis limitada y desnaturalizante de las estructuras S1, pS2 y S2. Fracciones de membrana que mostraban los cristales S1, pS2 y S2, fueron tratadas con diversas proteasas a 37°C, según se describe en el apartado 2.2.11, separadas mediante SDS-PAGE al 12% y detectadas con azul de Coomassie. (c) Control de proteínas totales de la membrana de *T. thermophilus*, tratadas con 5 mM de EDTA; (1,2 y 3) Controles de los constituyentes de las estructuras S1, pS2 y S2, respectivamente; (4, 5 y 6) Fracciones de S1, pS2 y S2, respectivamente, tratadas con la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* a una concentración final de la proteasa de 0.2 µg/ml; (7, 8 y 9) Fracciones de S1, pS2 y S2 tratadas con α -quimiotripsina a una concentración final de 0.2 µg/ml, respectivamente; (10, 11 y 12) Fracciones de S1, pS2 y S2 tratadas con tripsina a una concentración final de 1.4 µg/ml respectivamente. A la derecha se muestran los patrones de bandas generadas por las propias proteasas empleadas: V8 de *S. aureus* (S), quimiotripsina (Q) y tripsina (T), incubadas a 37°C y 4°C; en este caso se cargaron 40, 10 y 120 µg/pocillo, respectivamente. A la izquierda se muestran marcadores de peso molecular (en kDa).

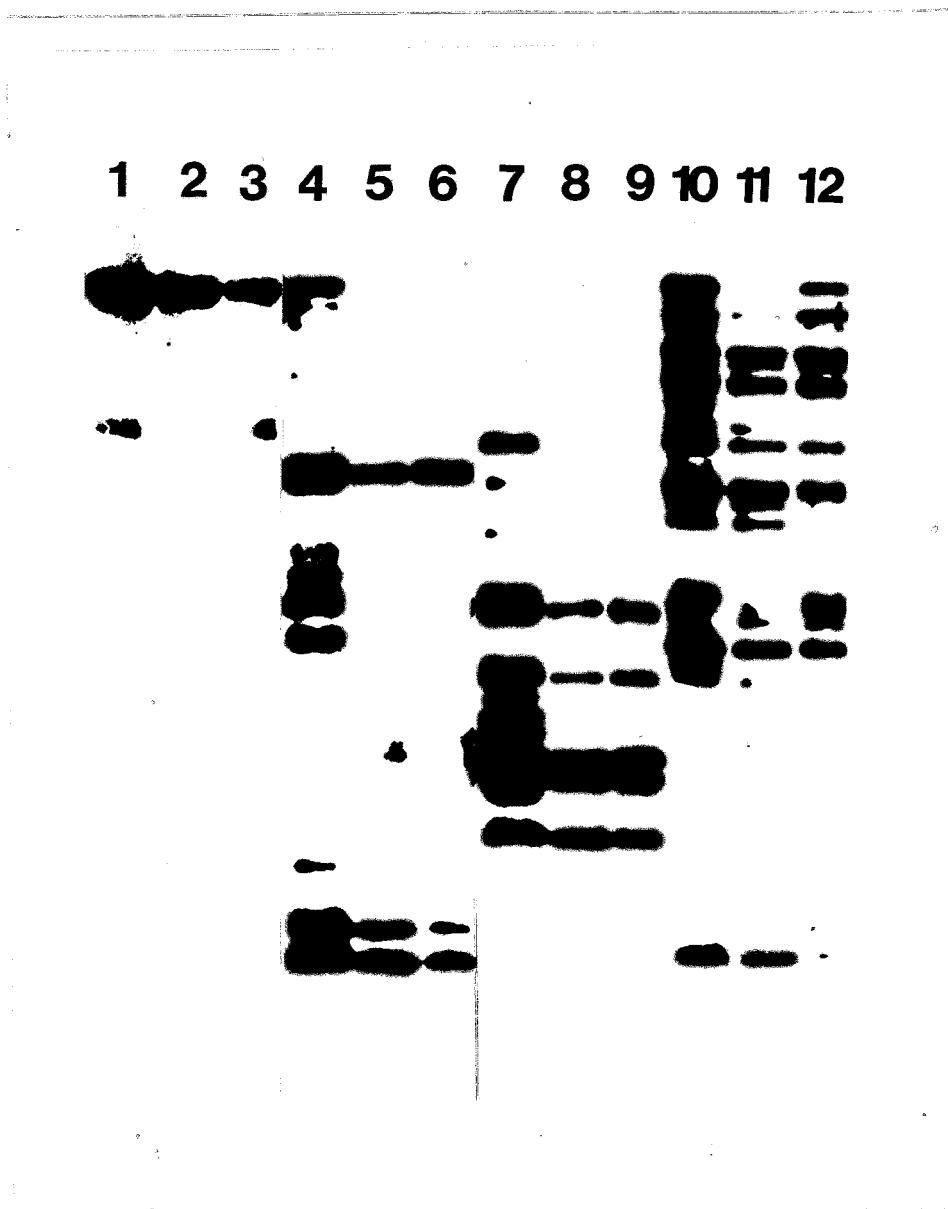


FIGURA III.12 Detección mediante anticuerpos de los productos de la proteólisis limitada y desnaturalizante de las estructuras S1, pS2 y S2. Fracciones de membrana que mostraban las cristales S1, pS2 y S2, fueron tratadas con diversas proteasas a 37°C, según se describe en el apartado 2.2.11, sometidas a una SDS-PAGE al 12% y los productos derivados de P100 detectados con un suero policlonal de conejo α -P100. La descripción numérica de los carriles es la misma que para la figura III.11

el eje perpendicular a la superficie del cristal). La determinación de la altura a lo largo del eje Z se calculó a partir de los valores de la varianza de la densidad óptica para cada uno de los 64 planos que se obtienen en la reconstrucción (figura III.13). Los límites superior e inferior del espécimen se pudieron localizar en los planos 23 y 54, respectivamente, lo cual, quería decir que la altura de la celdilla reconstruida es de alrededor de 10 nm. Una selección de los planos perpendiculares al eje Z se muestra en la figura III.14, donde se pone un mayor énfasis en los primeros planos, puesto que los 18 últimos eran prácticamente iguales. El rasgo estructural más sobresaliente hace referencia al centro de simetría P6, que se dispone a lo largo de todo el ancho de la estructura, y donde se concentra la mayor parte de la masa proteica en seis dominios bien diferenciados. El poro que se observa en su superficie podría existir *in vivo*, atravesando el centro P6, si tenemos en cuenta que en el análisis de los valores de densidad óptica en dicha zona, para cada uno de los planos seleccionados siempre resultó en un mínimo local, lo que sugería una obstrucción debida a los fenómenos de colapsamiento del cristal (figura III.14g). Por otra parte, los brazos que proporcionan la conectividad a la red hexagonal mediante interacciones en los centros de simetría P3 desaparecen a partir del plano nº 36, lo que indica que solamente están presentes en el tercio superior de la estructura.

Para la consecución de la representación tridimensional de la capa S de *T. thermophilus* se emplearon los planos seleccionados y umbralizados, que sirvieron de ficheros de entrada para la aplicación de los programas de representación gráfica asistida por ordenador diseñados por Jiménez y cols. (1986). La representación tridimensional del cristal S1 se ilustra en la figura III.15, donde es visible el perfil general del espécimen visto desde arriba, así como la zona interna del centro P6.

En la tabla III.1 se compara la capa S de *T. thermophilus* con algunas de otros géneros según las clasificaciones estructurales realizadas por otros autores (Baumeister y cols., 1986; Hövmoller y cols., 1988). Es interesante reseñar que la capa S de *T. thermophilus* es de las pocas descritas que poseen brazos dobles

Asumiendo que la P100 fuese el único componente de la capa S, podemos determinar la posible unidad estructural que la constituye mediante su repetición indefinida en la red. Si además tenemos en cuenta que la P100 se presenta como trímeros altamente estables, aparte de otros oligómeros de mayor peso molecular más inestables (Berenguer y cols., 1988; Faraldo y cols., 1988), las únicas posibilidades que existían son las que se representan en la figura III.16. En todas ellas se pueden deducir tres dominios, dos de ellos de pequeño

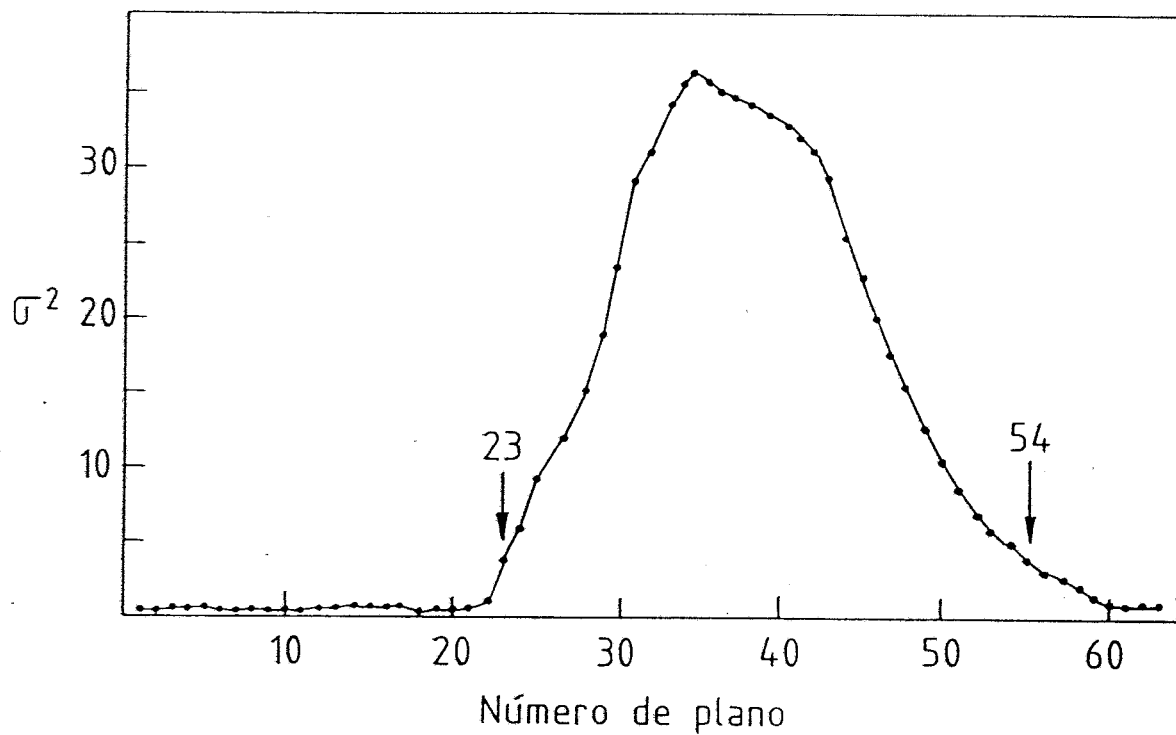


FIGURA III.13 Representación de la varianza (σ^2) de los valores de la densidad óptica de los píxeles de cada plano paralelo a la superficie del cristal. Las ordenadas están medidas en unidades arbitrarias y en abscisas se representa el número de plano a lo largo del eje Z. La distancia entre dos planos consecutivos es de 0.3125 nm. Las flechas indican los extremos que se han considerado para delimitar el espécimen reconstruido a lo largo del eje Z.

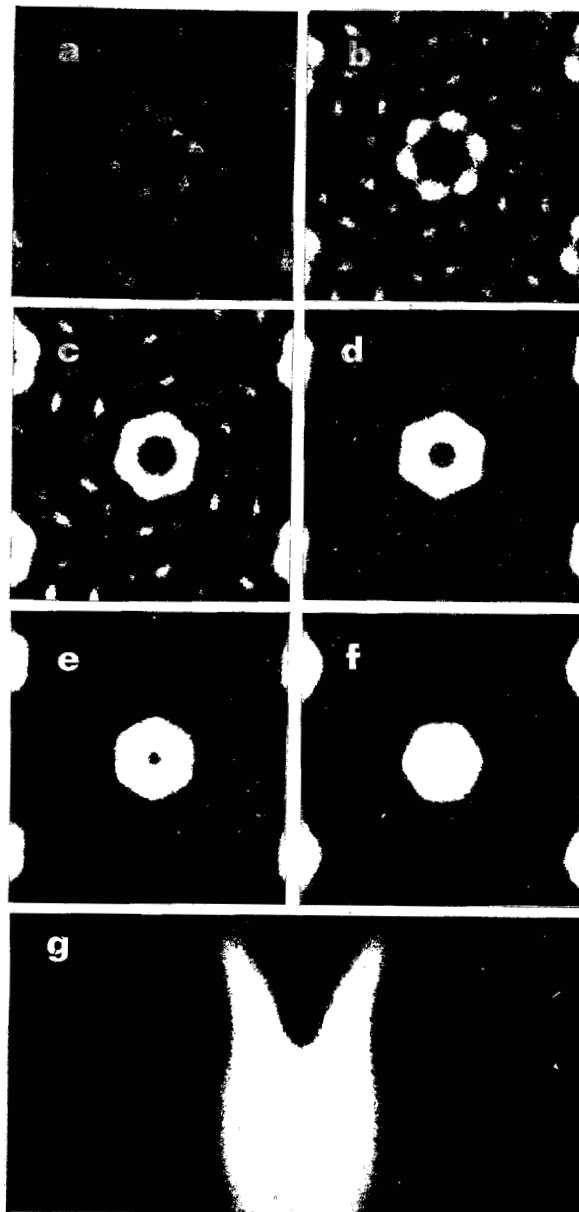


FIGURA III.14 Imágenes de secciones del mapa de densidades tridimensional de la estructura S1. Planos perpendiculares al eje longitudinal del cristal equiespaciados 0.625 nm (a-f). De los 31 planos seleccionados para el modelo tridimensional (figura III.13), se muestra una selección de los 16 primeros; los 15 planos restantes son prácticamente idénticos al plano f; (g) Plano longitudinal a través del centro de la zona de simetría P6 donde se aprecia la cavidad existente.

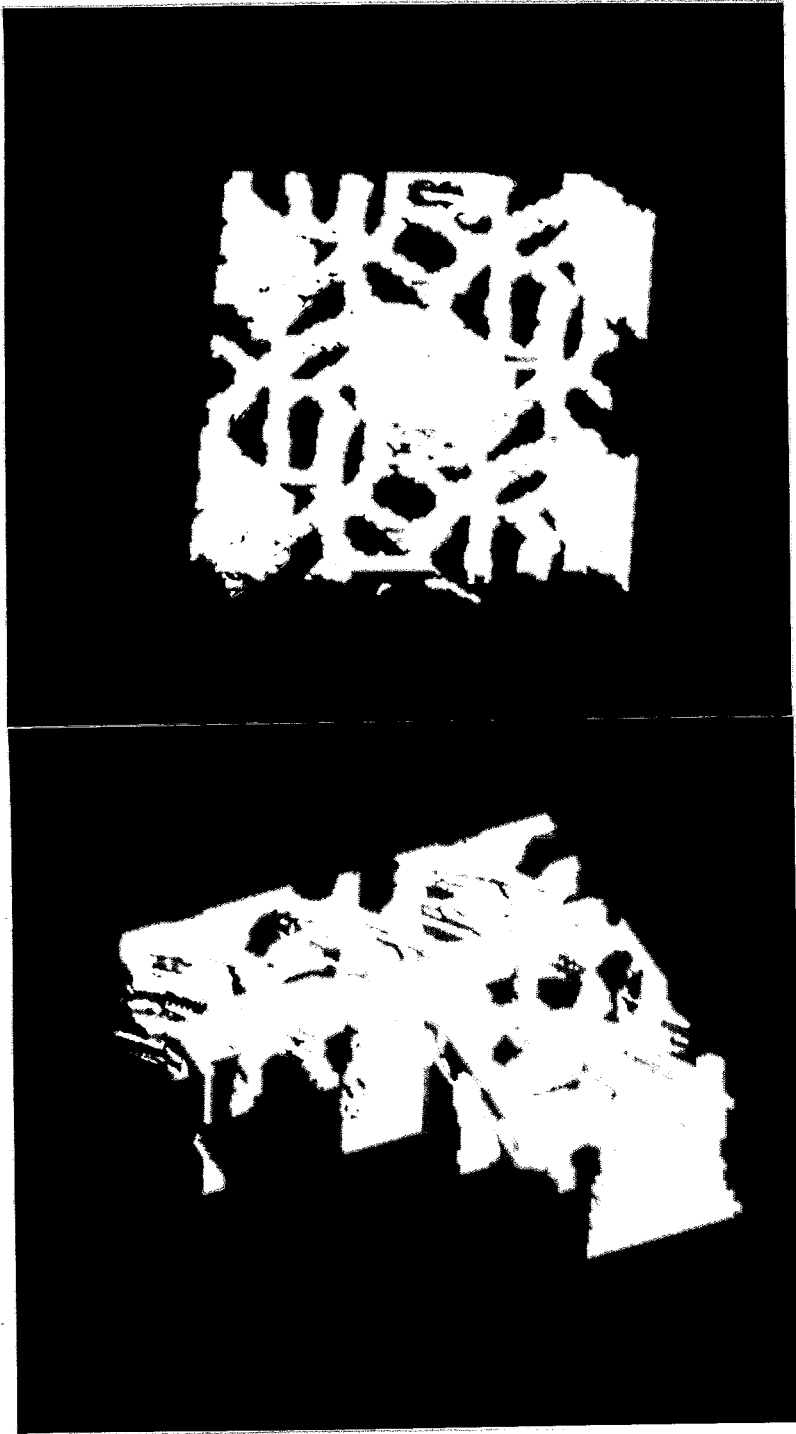


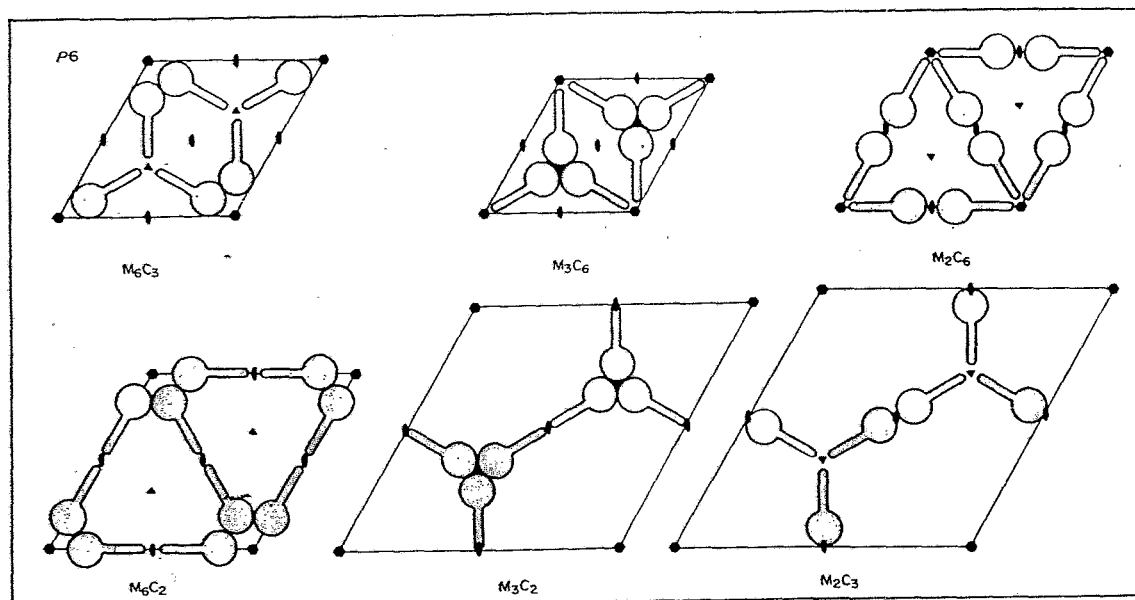
FIGURA III.15 Representaciones en perspectiva de la reconstrucción tridimensional del cristal S1. Se calcularon mediante las técnicas de representación gráfica asistidas por ordenador propuestas por Jiménez y cols. (1986). La fotografía superior muestra el perfil general de la estructura hexagonal vista desde arriba; en la inferior se representa también una imagen de volumen sólido al que le falta un cuadrante para hacer visible el interior del pilar de simetría P6.

TABLA III.1 Diversidad de las capas S hexagonales

ESPECIE	GRUPO BACTERIANO	TIPO*	Proteína (+) o poro (-) en los ejes		
			P6	P3	P2
<i>Acetogenium kivui</i> ^a	Gram -	M ₆ C ₃	+	+	-
<i>Aquaspirillum serpens</i> VHA ^b	Gram -	M ₆ C ₃	+	+	-
<i>Bacteroides buccae</i> ^c	Gram -	M ₃ C _{2,6}	-	+	+
<i>C. thermohydrosulfuricum</i> ^d	Gram +	M ₆ C ₃	+	+	-
<i>Deinococcus radiodurans</i> ^e	Deinococales	M ₆ C ₂	+	-	+
<i>Eubacterium</i> sp. AHN 990 ^f	Gram -	M ₆ C _{2,3}	+	-	+
<i>Halobacterium volvanyii</i> ^g	Arqueobacteria	M ₃ C ₆	+	+	-
<i>Methanoplanus limicola</i> ^h	Arqueobacteria	M ₆ C ₃	+	-	-
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ⁱ	Arqueobacteria	M ₂ C _{6,3}	-	-	+
<i>Synechocystis</i> sp CLIII	Cianobacteria	M ₆ C ₂	+	-	+
<i>Thermoproteus tenax</i> ^{k,l}	Arqueobacteria	M ₆ C ₃	+	+	-
<i>Thermus thermophilus</i>	Deinococales	M ₆ C _{3,6}	+	+	-

* Los monómeros estructurales constan de dominios "pesados" (formando núcleos) y "ligeros" (formando conexiones); ambos se disponen según los ejes de simetría. MnCm significa que los dominios pesados se disponen formando núcleos alrededor de un eje de simetría n y los dominios ligeros proporcionan la conectividad en ejes de simetría m (Según la clasificación de Saxton y Baumeister, 1986). Abajo se muestran unos ejemplos.

(a) Baumeister y Engelhardt (1987); (b) Dickson y cols., (1986); (c) Sjögren y cols., (1985); (d) Cejka y cols., (1986); (e) Baumeister y cols., (1986); (f) Sjögren y cols., (1988); (g) Kessel y cols., (1988); (h) Cheong y cols. (1991); (i) Deatherage y cols., (1983); (j) Karlsson y cols. (1983); (k) Wildhaber y Baumeister (1987); (l) Messner y cols., (1986)



tamaño que constituirían los brazos, mientras que el tercero participaría del centro P6 y daría cuenta de la mayor parte de la proteína.

Cuando fueron comparadas las imágenes del modelo tridimensional obtenido con las imágenes filtradas de criofractura de la capa S de *T. thermophilus* (figura III.3), concluimos que la zona superior del modelo tridimensional, donde están situados los brazos de conexión, se corresponde con la superficie más externa de la capa S *in vivo*, mientras que los pilares de simetría P6 estarían anclados en la envoltura celular, bien directamente o bien a través de algún componente adicional.

3.7 MAPA TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA S2

La reconstrucción tridimensional de los cristales tetragonales se realizó siguiendo básicamente las mismas pautas descritas para la estructura S1. En este caso se realizaron dos reconstrucciones independientes y la simetría impuesta fué P2.

La determinación de la altura se calculó de igual forma que para la estructura hexagonal. El primer y último plano seleccionados fueron el 23 y el 42, respectivamente, lo que supuso una altura reconstruida de 6.25 nm. En la figura III.17 se muestra una selección de planos transversales equiespaciados a lo largo del eje Z. Los trímeros de poros visibles en las proyecciones bidimensionales, de un diámetro aproximado de 3.9 nm, atravesaban la estructura en la dirección del eje Z como era de suponer. Asimismo, se puede apreciar como la masa dispuesta en el centro del trímero, presente en una de las caras de forma alternativa entre los distintos trímeros (parte superior en la figura III.17), en la cara opuesta desaparecía y viceversa. Esta disposición implicaría la existencia de un eje de rotación-traslación que daría cuenta de las numerosas ausencias de puntos de difracción en la TF del cristal S2.

En la figura III.18 se muestran las vistas superior e inferior de la reconstrucción tridimensional de los cristales tetragonales. El alto grado de entramado hace muy difícil delimitar la posible subunidad estructural, a diferencia de la estructura S1, y sugiere una distribución homogénea de la masa de los componentes que la constituyen.

Dado el parecido estructural entre los cristales pS2 y S2, se puede predecir una estructura tridimensional muy similar para la pS2. Los datos obtenidos en la reconstrucción tridimensional de los cristales S2, y en sus imágenes de proyección bidimensionales, nos han permitido deducir una cierta homología con respecto al hipotético modelo tridimensional

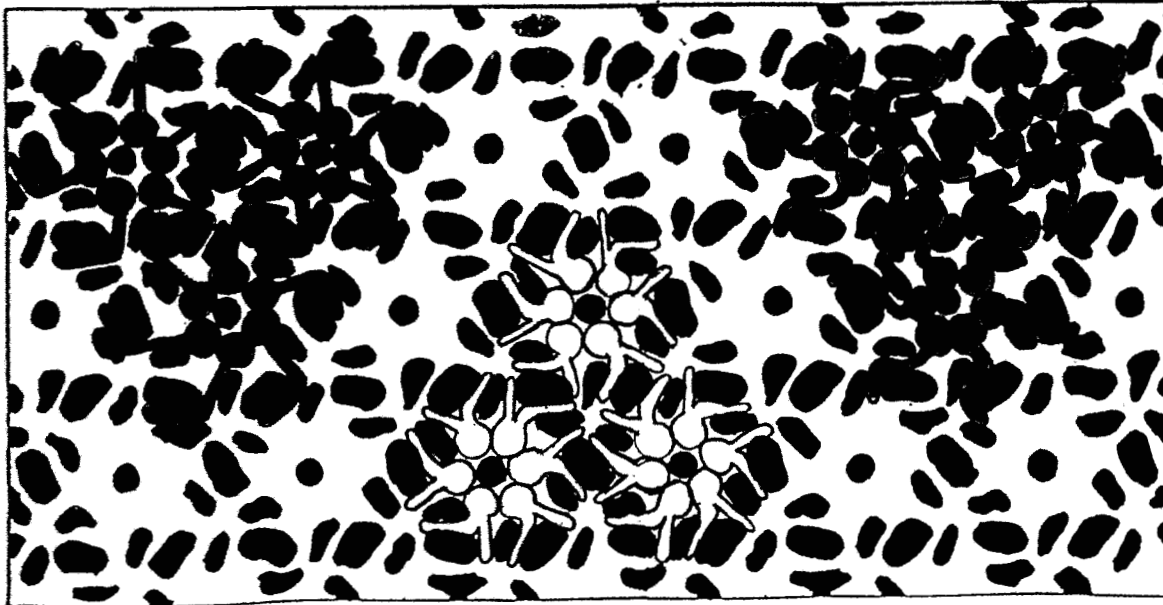


FIGURA III.16 Modelos de la unidad estructural del cristal S1. Sobre imágenes bidimensionales y umbralizadas, se muestran en distintos colores las posibles disposiciones de la unidad estructural de los cristales de simetría hexagonal. Obsérvese que cada posibilidad implica distintas interacciones entre los monómeros: $M_6C_{3,6}$ (modelos en rojo y verde) y $M_6C_{3,3}$ (modelo en naranja)

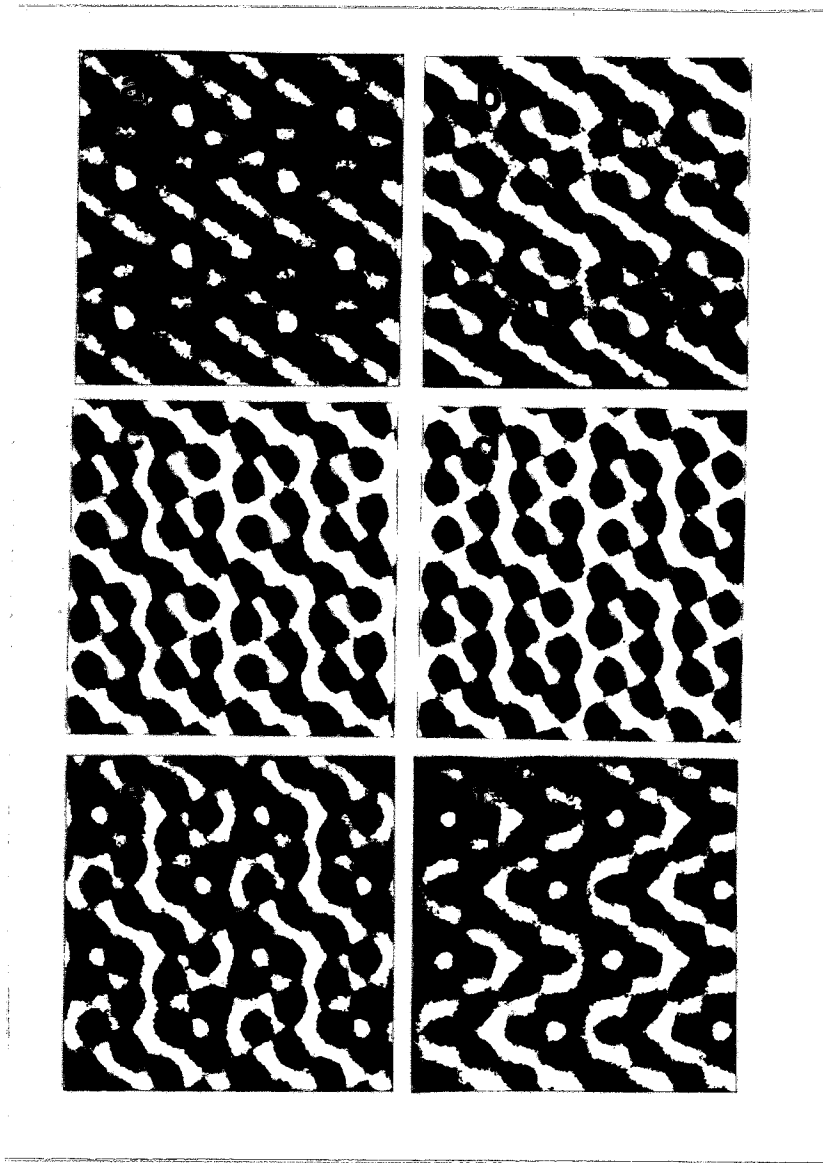


FIGURA III.17 Imágenes de secciones perpendiculares al eje longitudinal del mapa de densidad reconstruido de los cristales S2. Se muestran los planos transversales, equiespaciados 0.96 nm., desde el plano superior reconstruido (a) hacia abajo (b-f). Obsérvese la asimetría en la disposición longitudinal de la unidad trimérica con respecto a la masa proteica existente en el centro del trímero



FIGURA III.18 Representaciones en perspectiva de la reconstrucción tridimensional del cristal S2. Se muestran los modelos sólidos del cristal tetragonal visto desde sus dos superficies.

de la estructura pS2, si bien éste tendrá que ser desarrollado completamente para determinar la existencia de posibles pilares similares a los encontrados en la estructura S1.

3.8 DETERMINACION DE LA ALTURA DE LOS CRISTALES FORMADOS POR P100

Con objeto de estudiar la envoltura celular de *T. thermophilus* descrita como Gram negativa, se procedió a la inclusión de células en Epon 812, una resina que conserva fielmente la estructura del material incluido, debido a las drásticas condiciones de fijación que se emplean antes de la inclusión propiamente dicha (método 2.2.2.7). De igual modo, también fué incluido el material correspondiente a las distintas estructuras regulares, con la idea de determinar el espesor de cada una, ya que el determinado en las reconstrucciones tridimensionales solamente da cuenta de las zonas contrastadas por el agente de tinción.

En la figura III.19 se muestran células incluidas en Epon 812. La visualización de la capa S llegó a ser evidente sobre la superficie celular en forma de pilares equiespaciados 16 nm. Esta diferencia con respecto a las dimensiones determinadas a partir de muestras teñidas negativamente o sometidas a criofractura (19.2 y 24 ± 2 nm, respectivamente) es lógica si tenemos en cuenta que las muestras fueron deshidratadas durante el proceso de inclusión. La altura determinada para los pilares fué de 18.2 nm. También fué evidente la observación de una doble membrana, detectable como estructuras pentalaminares al MET cuyo grosor era de 20.5 nm. En cualquier caso, el hecho más sorprendente fué la presencia de una envuelta, con un grosor de 30 nm, que se detectó entre la capa S y la doble membrana. Puesto que dicha capa aparece en más del 90% de las células enteras observadas mediante este método, y nunca es detectable en otras bacterias como *E. coli*, se supuso que no se debía a artefactos del proceso de inclusión.

En la figura III.20 se muestran secciones de las estructuras S1, S2 y pS2 preparadas mediante el mismo método de inclusión y corte. Las estructuras S1 fueron visualizadas tanto en cortes transversales como longitudinales (figura III.20a y b, respectivamente). En los cortes transversales se pudo determinar el valor de la celdilla unidad de la S1, que resultó ser de 15.5 nm., muy próximo al determinado en cortes de células enteras. Por otra parte, la altura de la S1, determinada también a partir de micrográficas, fué de 35.6 nm, algo menor que el doble del valor determinado en las secciones de células. Estos resultados indicaron claramente que los cristales bidimensionales de S1 están formados por hojas dobles de la capa S, con los pilares de simetría P6 perfectamente alineados. Esta es la razón, por la que



FIGURA III.19 Secciones de células de *T. thermophilus*. Se obtuvieron cortes transversales (a) y longitudinales (b) de células incluidas de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.2.2.7 Las flechas negras indican las zonas donde se visualiza claramente la capa S (estructura S1); la flecha blanca indica una zona de la envoltura celular donde se distingue la estructura pentalaminar que se debe corresponder con la membranas interna y externa (además del peptidoglicano). Las barras representan 200 nm.

no se pudo determinar la orientación de los cristales en la reconstrucción tridimensional, ya que la superficie mostrada en cada lado era siempre idéntica (apartado 3.6).

Con respecto a las estructuras S2 y pS2, las imágenes de las secciones eran muy similares entre sí, con un grosor de 10 nm aproximadamente. En la estructura S2 se podía intuir, en algunos casos, una cierta regularidad a lo largo del corte transversal (figura III.20c).

En la tabla III.2 se presenta un resumen de todas las dimensiones obtenidas para cada una de las estructuras periódicas a partir de las distintas técnicas de microscopía electrónica que han sido empleadas.

3.9 PLANOS DE FRACTURA EN LAS CELULAS DE *T thermophilus*

Los resultados mostrados hasta el momento indicaban que la única estructura que está presente *in vivo* es la estructura hexagonal, que se correlaciona inequívocamente con la capa S de *T. thermophilus*. Sin embargo, con respecto a las estructuras tetragonal y trigonal cabía la doble posibilidad de que dichos cristales bidimensionales fuesen artefactos del proceso de solubilización de membranas, o bien estructuras que también estuvieran presentes en la envoltura celular. Con objeto de verificar dichas alternativas, se realizaron criofracturas, por el método del "sandwich" (descrito en el apartado 2.2.2.6 b), con células recogidas en la fase de crecimiento exponencial. El contrastado de las muestras se realizó mediante sombreado metálico o por tinción negativa. En el primer caso (figura III.21a y b) fueron reveladas distintas superficies, cóncavas y convexas, en los planos de fractura. Puesto que se trataba de muestras no incubadas previamente con EDTA, la capa S raramente fué visualizada en la superficie. Se detectó el plano convexo de fractura similar al correspondiente a la membrana externa de Gram negativas. Como se puede observar en la figura III.21a este plano se presenta densamente poblado de partículas, probablemente proteínas, sin disposición regular alguna, a diferencia del plano cóncavo donde disminuyen considerablemente. Nunca se revelaron las estructuras pS2 y S2. El grosor de la envuelta dispuesta entre esta cara externa y la superficie celular amorfa es de 40 nm, lo que implica la existencia *in vivo* de algún material entre ambas capas, dato que concordaba con lo que se dedujo a partir de las secciones de células enteras (figura III.19).

El contraste por tinción negativa proporcionó imágenes de células cubiertas en toda su superficie por la capa S (figura III.21c), pero tampoco reveló ninguna de las estructuras

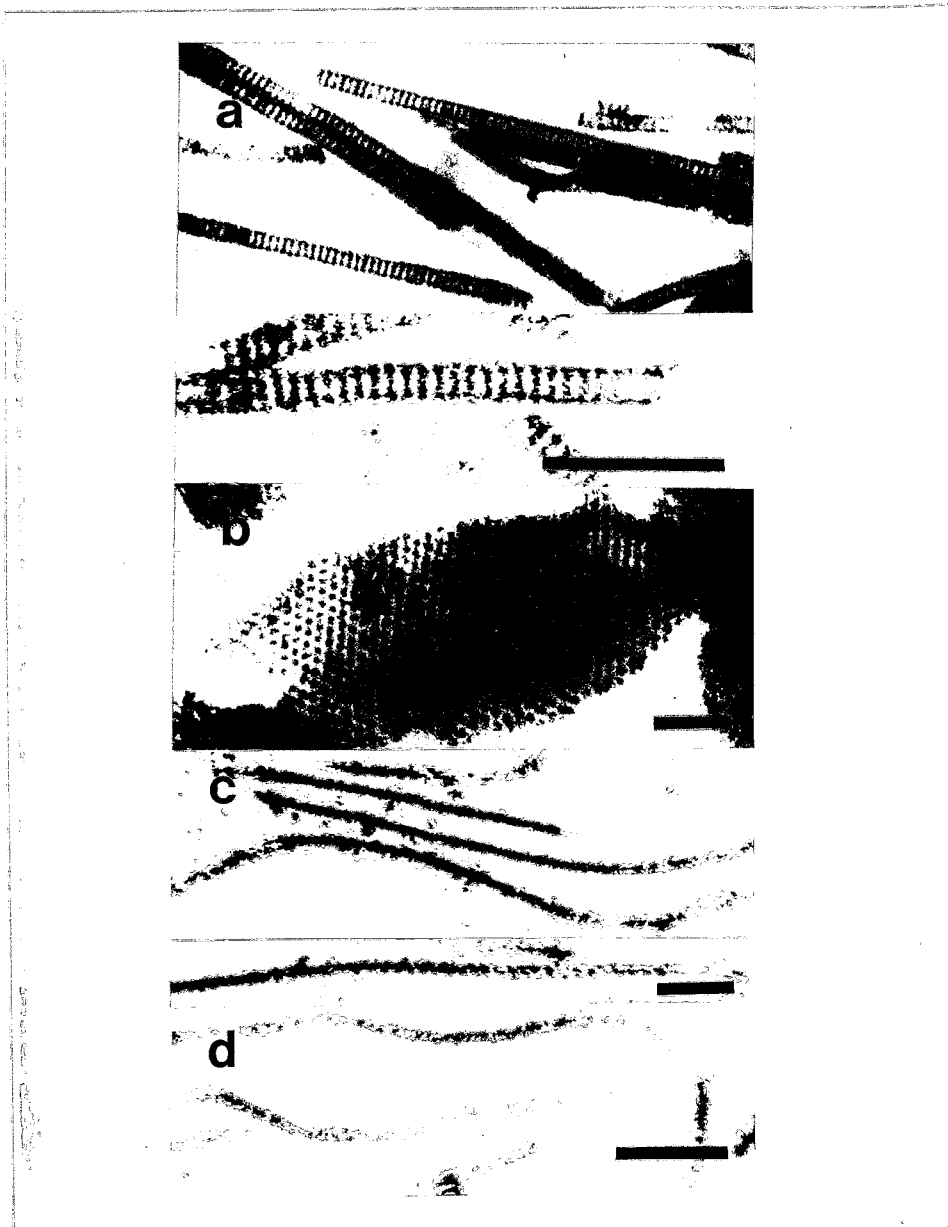


FIGURA III.20 Secciones de las estructuras regulares constituidas por P100. Fracciones de membrana donde se observaban las estructuras S1 (a y b), S2 (c) y pS2 (d), fueron incluidas y cortadas como se describe en el apartado 2.2.2.7. La estructura S1 fué observada en cortes perpendiculares al cristal (a) y paralelos a su superficie (b). Las barras representan 100 nm.

TABLA III.2 Dimensiones de las estructuras regulares de P100 (nm)

CRISTAL	SIMETRIA	GROSOR			CELDILLA Y CORTE	UNIDAD TINCION NEGATIVA	UNIDAD (HOJAS) REPLICAS
		CELULAS	HOJAS	3DR*2			
S1	p6	18.2	35.6	11	15.5*1	19.2±0.2	24±2
pS2	p3	-	~10	-	-	18±0.3	-
S2	p2	-	10.7	6.25	-	24.2/21	-

*1 A partir de cortes de células enteras este valor es de 16 nm.

*2 3DR: reconstrucción tridimensional

buscadas.

A pesar de los resultados expuestos, esta técnica fué mucho más eficaz que la criofractura con cuchillo para revelar superficies y planos de fractura de la envoltura celular de *T. thermophilus* (comparese las figuras III.20a y b y III.1D).

3.10 ANALISIS TOPOGRAFICO DE LOS CRISTALES S1, pS2 Y S2

Con objeto de realizar un análisis de la superficie de las estructuras S1, pS2 y S2, se prepararon suspensiones densas de dichas estructuras mediante centrifugación (15.000 x g, 10 min) en el tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.8, que fueron sometidas a continuación a criosecado para su observación al microscopio electrónico, según el método 2.2.2.5. Con objeto de controlar de manera eficiente, la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica del soporte sobre el que se depositaron las muestras, se utilizaron trozos de mica sin exfoliar o exfoliados, respectivamente. De este modo se dirigía preferencialmente la adhesión de los cristales bidimensionales y, si existían diferencias entre las dos superficies del cristal, éstas podrían ser detectadas.

Tras su análisis, las estructuras S1 mostraron el mismo aspecto topográfico independientemente de la naturaleza del soporte (figura III.22a y d), y consistente con la naturaleza de bilamina que se describió como resultado de los experimentos de corte (apartado 3.8). La TF de las áreas digitalizadas mostraban puntos de difracción solamente hasta el tercer orden (figura III.22b y e), pero fueron suficientes para destacar los elementos morfológicos característicos de la estructura S1. Las depresiones de la estructura (zonas oscuras en la imagen filtrada) se correlacionan con las cavidades o poros detectados en especímenes teñidos negativamente. Aunque la resolución alcanzada fué menor, debido en parte a que la apariencia de los detalles estructurales está limitada por el efecto del sombreado unidireccional, las imágenes filtradas (figura III.22 c y f) fueron muy similares a las obtenidas a partir de células enteras (figura III.3).

Las estructuras pS2 mostraban un patrón pseudo-hexagonal en los difractogramas obtenidos a partir de las dos superficies, con puntos de difracción que se extendían hasta el 4º orden (figura III.23b y e). Cuando los cristales bidimensionales fueron adsorbidos sobre un soporte hidrofílico, mostraron unas características topográficas fácilmente identificables con las determinadas mediante tinción negativa (figura III.23c). Se identificaban sin

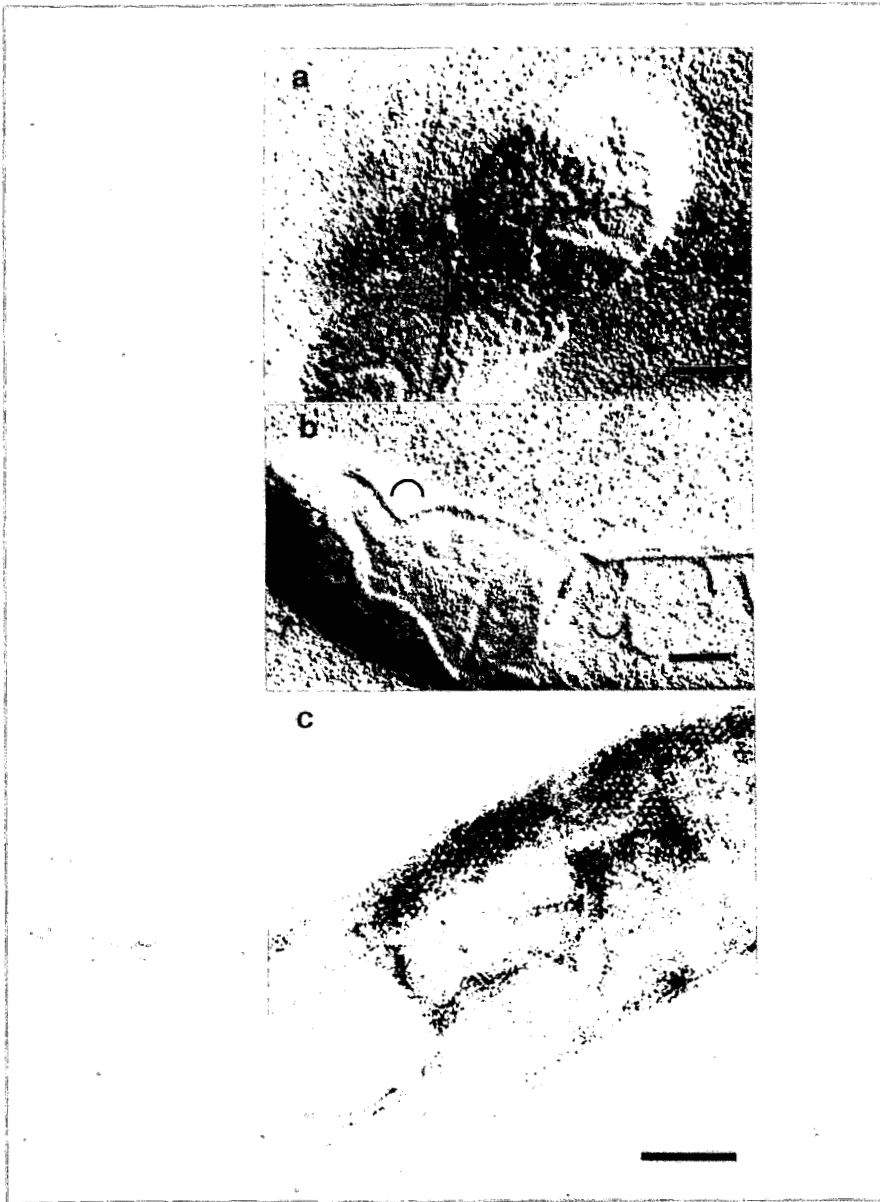


FIGURA III.21 Crio fractura y sombreado metálico de células de *T. thermophilus*. Un precipitado de células en fase de crecimiento exponencial fué fracturado (método 2.2.2.6b) y contrastado por sombreado metálico (a y b) o tinción negativa (c). Las flechas indican zonas donde es visible la capa S; (∪) Indica el plano cóncavo de la fractura en la membrana externa; (∩) Indica el plano convexo de la fractura en la membrana externa. Las barras representan 200 nm.

ambigüedad seis trímeros de poros dispuestos alrededor de un centro de simetría P3 (figura III.24). Cuando se usó un soporte hidrofóbico, el patrón de la TF fué similar; la baja resolución de los cristales sombreados resultó en una imagen filtrada con una apariencia bastante distinta a la que corresponde a la estructura pS2 (figura III.23f). Sin embargo, los vectores de la celdilla unidad eran del mismo tamaño.

Las estructuras S2 se mostraron muy diferentes en función de la naturaleza del soporte. Cuando el soporte era hidrofílico, y por tanto el cristal mostraba su superficie más hidrofóbica (figura III.25a), fué muy evidente la periodicidad de las redes S2: La TF contenía spots hasta del 6º orden (figura III.25c). Los trímeros de poros, típicos de la red S2, quedaban claramente revelados (figura III.25d). Por el contrario, cuando el soporte era hidrofóbico, dicha regularidad desaparecía.

3.11 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE CRISTALES DE P100 PURIFICADA

La disponibilidad de un protocolo de purificación de la P100, el componente proteico mayoritario de las estructuras S1, pS2 y S2, hacía evidente y necesario el análisis por MET de tales fracciones de proteína pura, libres de peptidoglicano y, probablemente, también de azúcares o lípidos (método 2.2.7, figura II.1). Básicamente dicho protocolo consistía en hacer varias extracciones diferenciales con TX-100 al 1% a 60°C, donde permanecían insolubles la P100 y el peptidoglicano, y seguidamente, una vez que se degradaba el peptidoglicano con lisozima, se solubilizaba la P100 con el mismo detergente. A continuación, el solubilizado fué sometido a una doble cromatografía de intercambio iónico, y se obtenía libre de los contaminantes detectables por azul de Coomassie.

La preparación de las muestras para su análisis mediante MET se hizo del modo siguiente: Una alícuota de 20 µl de P100, disuelta a una concentración de 1 mg/ml en el tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.8, fué incubada a 60°C durante 1 hora con 20 mM de Cl₂Ca, y teñida con acetato de uranilo al 2%. El resultado obtenido se muestra en la figura III.26. Los cristales bidimensionales de P100 eran morfológicamente irregulares, pero mostraban una alta ordenación como se podía inferir de sus TF, con armónicos hasta del 6º orden, lo cual nos permitió obtener imágenes filtradas de alta resolución sin imposición de ninguna simetría. La comparación de los cristales filtrados con las distintas estructuras periódicas indica la relación estructural entre la pS2 y la P100 purificada. Además, el tamaño de la celdilla unidad fué el mismo que el determinado para la estructura pS2 (18 nm). Se puede observar la existencia de un centro de simetría P3 (tampoco fué posible la imposición de

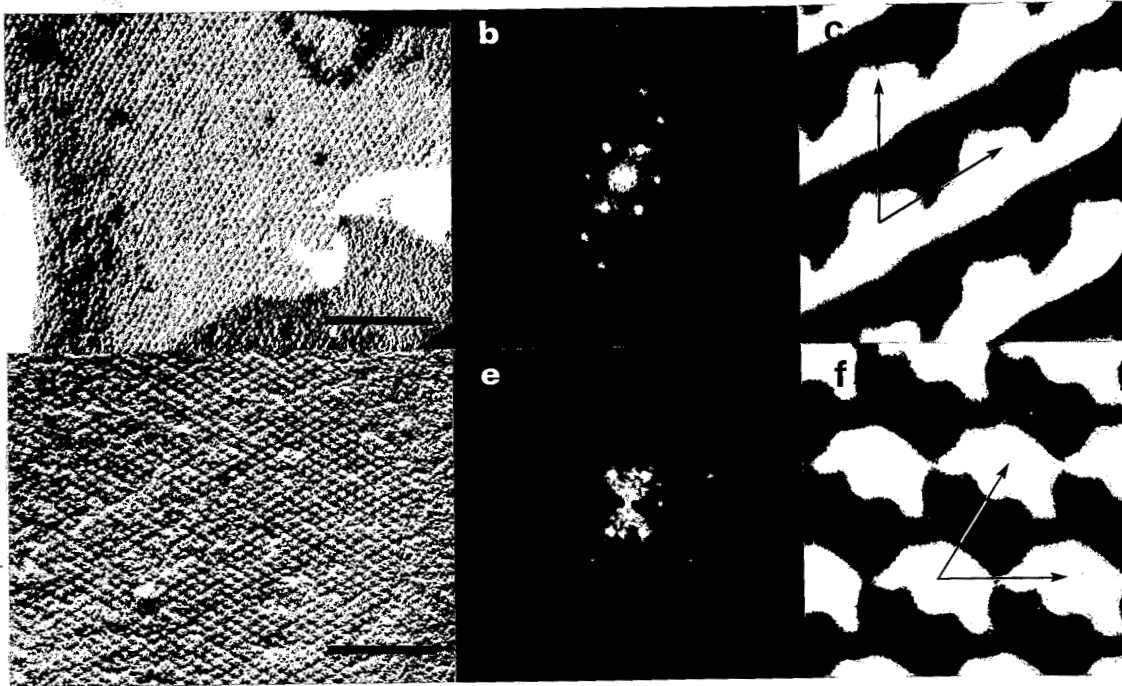


FIGURA III.22 Análisis topográfico de las superficies del cristal de simetría hexagonal. Los cristales S1 fueron adheridos a una superficie de mica hidrofílica (a) o hidrofóbica (d). Tras analizar sus TF (b y e, respectivamente), se obtuvieron las imágenes filtradas correspondientes a la superficie mostrada en cada caso (c y f, respectivamente); En ambos casos se indican los vectores de la celdilla unidad. Las barras representan 200 nm.

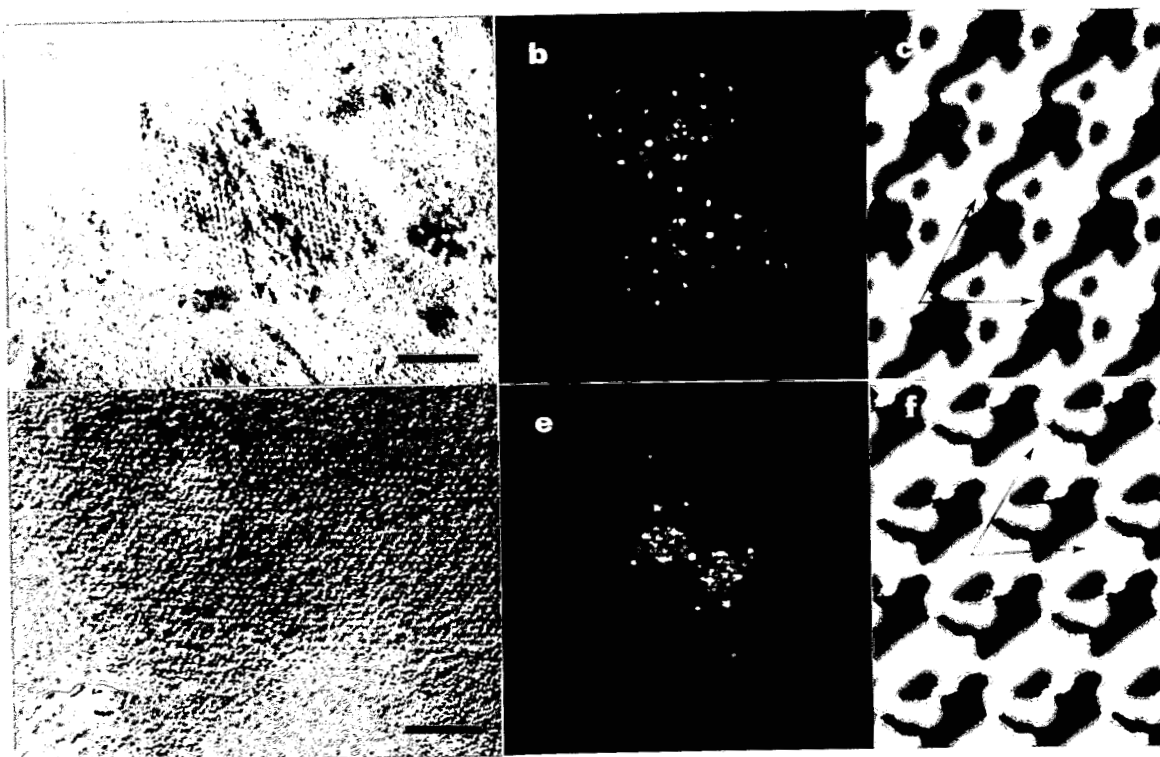


FIGURA III.23 Análisis topográfico de las superficies del cristal de simetría trigonal. Los cristales pS2 fueron adheridos a una superficie de mica hidrofílica (a) o hidrofóbica (d). Se muestran las TF de los cristales presentados en (a) y (d) (b y e, respectivamente). Después de filtrarlas y calcular sus Transformadas inversas de Fourier, se obtuvieron imágenes como las mostradas en (c) (sobre superficie hidrofílica) y (f) (sobre superficie hidrofóbica); En ambos casos se indican los vectores de la celdilla unidad. Las barras representan 200 nm.

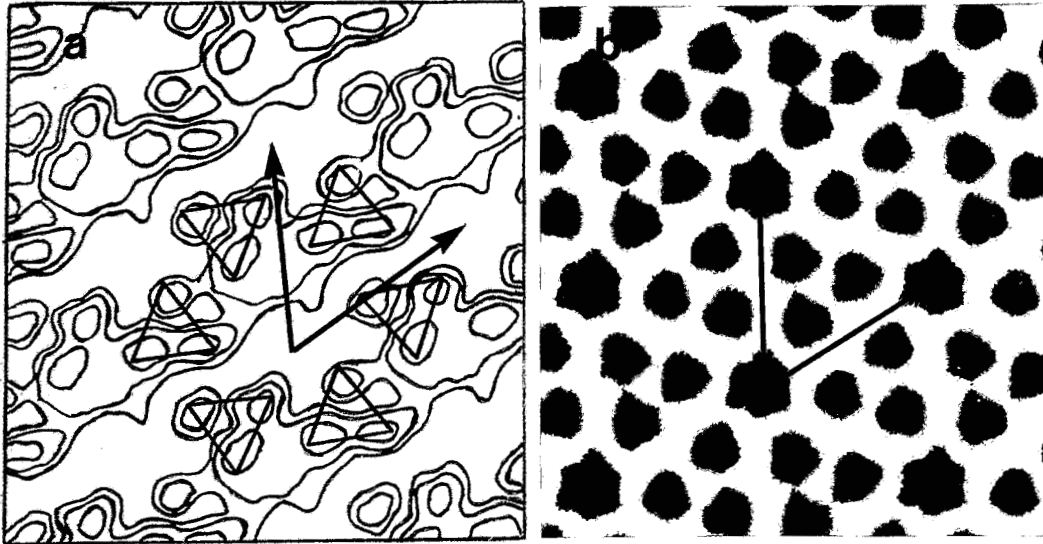


FIGURA III.24. Correlación de las imágenes de la superficie y de las proyecciones bidimensionales de los cristales pS2. (a) Mapa bidimensional de densidades de la superficie de la estructura pS2, mostrada sobre soportes hidrofílicos (obtenido a partir de la figura III.23c). Se señalan los seis trímeros de poros alrededor del centro de simetría P3, así como los vectores de la celdilla unidad. (b) Imagen filtrada a partir de cristales de pS2 a 0° , teñidos negativamente con acetato de uranilo al 2%.

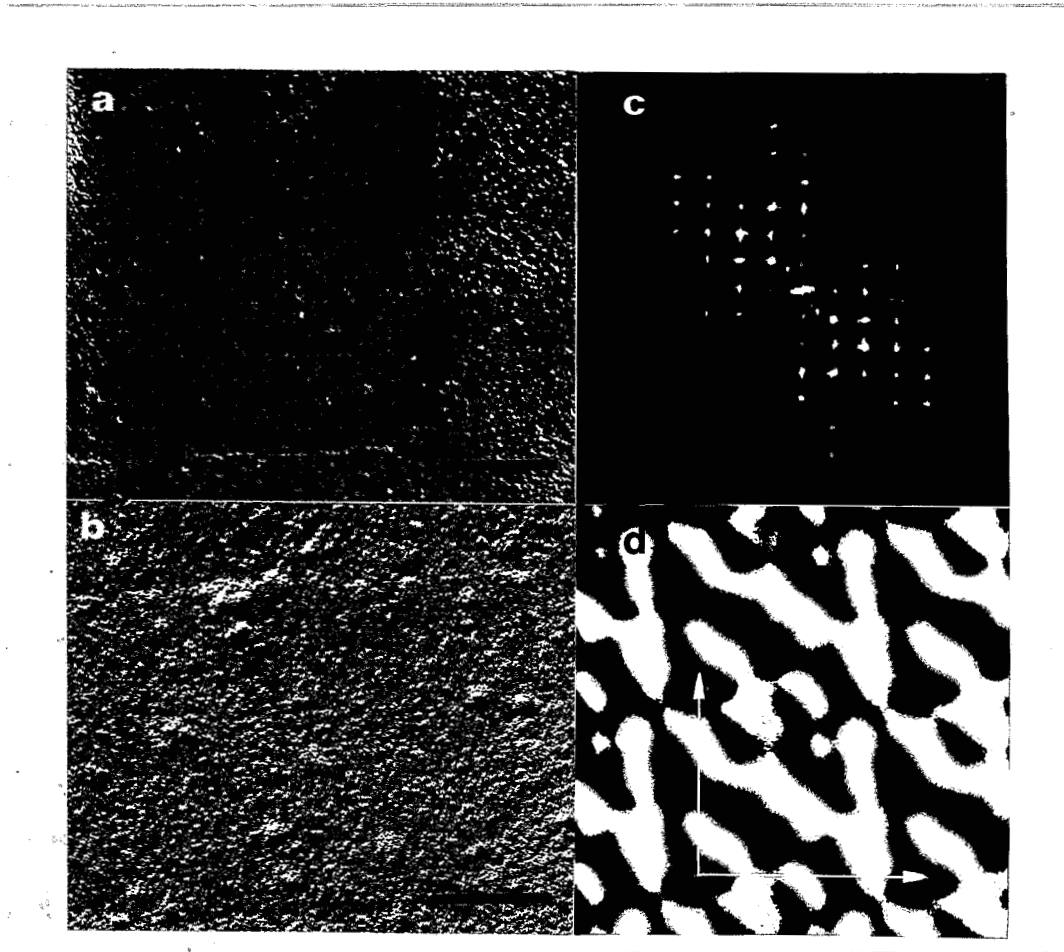


FIGURA III.25 Análisis topográfico de las superficies del cristal de simetría tetragonal. Los cristales S2 fueron adheridos a una superficie de mica hidrofílica (a) o hidrofóbica (b). La TF de los cristales que mostraban características periódicas (a) contenía spots del 6º orden (c). La imagen filtrada de la superficie regular es mostrada (d); están indicados con flechas los vectores de la celdilla unidad. Las barras representan 200nm

simetría P6), mostrando también la misma heterogeneidad que en la estructura pS2. De hecho, se detectan dos clases de trímeros, en función del diámetro de su poro, que están agrupados de 3 en 3 alrededor del centro donde se localiza el eje ternario.

Los cristales de P100 observados sin la incubación previa con Cl_2Ca , eran de aspecto similar pero sus difractogramas ópticos sólo contenían puntos de difracción hasta el tercer orden (datos no mostrados).

3.12 TRANSFORMACIONES DE LAS ESTRUCTURAS REGULARES

Los análisis de los cristales bidimensionales de P100 purificada indicaban indirectamente la ausencia del peptidoglicano en la estructura pS2. Con objeto de verificar dicha hipótesis, se incubaron las estructuras S1, pS2 y S2 con lisozima de huevo o muramidasa de *Chalaropsis sp* (200 $\mu\text{g/ml}$), enzimas que degradan totalmente el peptidoglicano a muropéptidos, durante 16 horas a 37 °C. Como controles negativos se emplearon las mismas preparaciones pero con estas enzimas inactivadas previamente en autoclave (121°C, 20 min). El precipitado obtenido después de centrifugar la solución anterior fué preparado para su análisis mediante microscopía electrónica, mientras que el sobrenadante fué utilizado para ensayar su actividad mureín-hidrolasa, según se describió en el apartado 2.2.10.

El resultado más sobresaliente fué el obtenido con las estructuras S1: Después de la incubación con lisozima o muramidasa, se observó su transformación en cristales con la apariencia de la estructura pS2 (difractograma de la figura III.27). Cuando dichos enzimas eran inactivados, como fué comprobado determinando la actividad mureín-hidrolasa del sobrenadante, nunca se observaba dicha transformación. Estos resultados sugerían que la formación de la estructura pS2 requería la eliminación del peptidoglicano y , consecuentemente, la existencia de interacciones P100-peptidoglicano necesarias para la integridad de la estructura S1. Además, el hecho de que los cristales pS2 obtenidos por la transformación de la S1 no mostrasen una alta integridad estructural, como se dedujo a partir de los difractogramas ópticos, podría indicar la necesidad de algún otro componente minoritario que diese cuenta de los excelentes cristales de pS2 obtenidos en el proceso de solubilización diferencial (Figura III.9). Por otra parte, la incubación con lisozima o muramidasa de las estructuras pS2 y S2 no provocó ninguna alteración reforzando la hipótesis de que en la estructura S2, de existir interacciones entre P100 y peptidoglicano, éstas no son necesarias para su integridad.

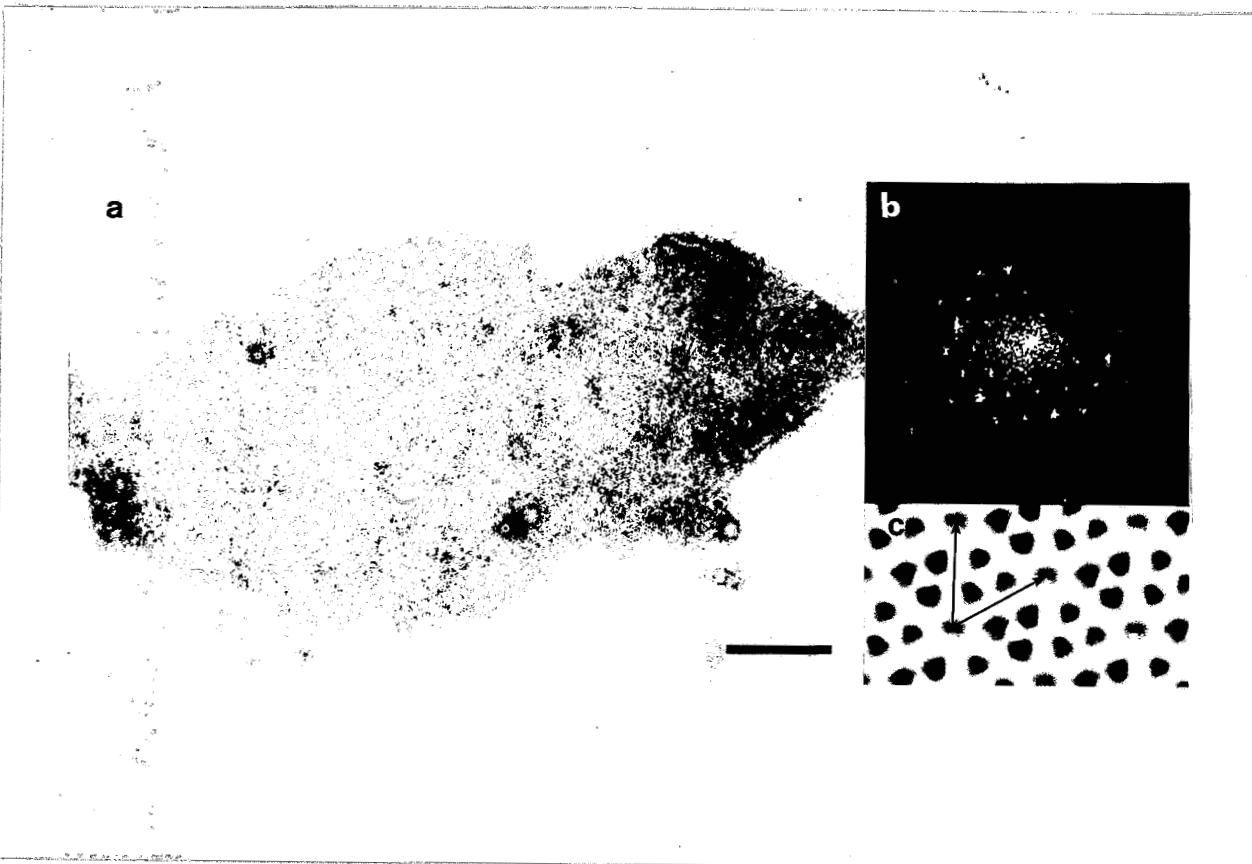


FIGURA III.26 Análisis bidimensional de cristales constituidos por P100 purificada. (a) Imagen a 0° de un cristal de P100 (obtenido siguiendo el protocolo de purificación 2.2.7) teñido con acetato de uranilo al 2%; (b) Transformada de Fourier del cristal anterior con puntos de difracción que llegan hasta el 6^o orden; (c) Imagen obtenida por Filtración de Fourier del cristal mostrado en (a). Las flechas indican la celdilla unidad desde un centro de simetría pseudo-hexagonal. La barra representa 200 nm.

Teniendo en cuenta que la única diferencia en el proceso de solubilización secuencial para la obtención de las estructuras pS2 ó S2 era la presencia de 50 mM de EDTA en la segunda extracción con TX-100 para el caso de aquella (apartado 3.4.2), y con objeto de proceder a la conversión de las estructuras tetragonales de S2 en las trigonales de pS2, se incubó una alícuota de la fracción de S2 en TX-100 al 1% y EDTA 50mM, a 60°C durante 1 hora y, tras centrifugar (15.000 x g, 10 min), el precipitado fué teñido negativamente con acetato de uranilo al 2%. La observación por MET reveló la transformación de la estructura S2 a la pS2, pero además también fueron muy abundantes los cristales del tipo S1. Sin embargo, si las fracciones de S2 eran tratadas previamente con lisozima (de la forma descrita anteriormente), la transformación sólo ocurría hacia la estructura pS2. Por tanto, el EDTA con el detergente debe provocar la extracción total o parcial de algún componente necesario para la S2. Asimismo, se confirma también que el peptidoglicano es necesario para la formación *de novo* de los cristales de simetría hexagonal.

En el siguiente esquema se resumen las transformaciones estructurales de los cristales S1, pS2 y S2:

ESTRUCTURA INICIAL	TRATAMIENTO	ESTRUCTURA FINAL
S1	Lisozima o muramidasa	pS2
S2	TX-100-EDTA	S1 y pS2
S2	Muramidasa TX-100-EDTA	pS2
P100 purificada	Cl ₂ Ca	pS2

3.13 ANALISIS LIPIDICO DE LAS ESTRUCTURAS S1-pS2-S2

A partir de fracciones de membrana que mostraban las distintas estructuras regulares se procedió a la extracción de los lípidos totales según se describió en el apartado 2.2.5. La determinación del peso seco de cada una de las fracciones fué realizada por métodos gravimétricos, mientras que el contenido de proteínas se calculó por el método de Bradford (1976), ya que es el método que menos interfiere con componentes como el Tris, EDTA o TX-100. La relación en peso Lípidos/Proteínas para las estructuras S1 y pS2 fué la misma (0.56), mientras que para la estructura S2 fué superior (0.70). Estos valores sugieren que uno de los efectos del EDTA en la transformación entre estructuras S2 a pS2 o S1 consiste en la extracción de parte de los lípidos.



FIGURA III.27 Transformación de las estructuras hexagonales en estructuras trigonales. Fracciones de membrana constituidas por cristales bidimensionales hexagonales (a), fueron tratados con lisozima, como se describe en el apartado 3.14, y después se centrifugaron a $15.000 \times g$, 10 min. La observación posterior del precipitado obtenido mostraba unas estructuras tipo pS2 (b), como se puede deducir de su difractograma (c) y de las imágenes filtradas (d). Las barras representan 200 nm.

3.14 ANTISUERO α -LPS: RECONOCIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS REGULARES

La obtención de anticuerpos policlonales frente al LPS de *T. thermophilus* se realizó según se describe en el apartado 2.2.16 de métodos. La idea inicial fué la obtención de un suero que reconociese la P84, pero el análisis por ensayos de inmunoadsorción a proteínas totales de membrana electrotransferidas a tiras de papel Immobilon, reveló que fué otro el componente reconocido por dicho antisuero.

Cuando se analizan por SDS-PAGE las membranas totales de *T. thermophilus*, se pueden observar dos patrones de proteínas como previamente había descrito nuestro grupo (Berenguer y cols., 1988): al hervirlas en presencia de 5 mM de EDTA en el tampón de desnaturalización, se obtiene un patrón donde destacan las proteínas P100 y P84, además de otras proteínas minoritarias (figura III.28, carril B); sin embargo, cuando la incubación a 100°C se realiza en presencia de 5 mM de Cl_2Ca , la P100 desaparece, constituyendo los oligómeros de alto peso molecular llamados "HMrPs" (figura III.28, carril A), mientras que el destino de la P84 permanece sin resolver, aunque hay indicios de que pudiera ser degradada inespecíficamente por una proteasa dependiente de calcio (posibilidad que está siendo comprobada actualmente en nuestro laboratorio).

En los análisis por inmunoblots se utilizó siempre la misma cantidad de proteínas totales por pocillo (tratadas con EDTA o Cl_2Ca) y las autorradiografías fueron obtenidas después de un mismo tiempo de exposición para cada caso. Como control se usó un suero de conejo α -P100 que detectaba dos señales débiles a la altura de la P100 y del oligómero constituido por 3 moléculas de P100 (es muy ineficiente la transferencia de las "HMrPs" al papel Immobilon) cuando las proteínas totales fueron tratadas con Cl_2Ca . Dicha señal se vió muy incrementada cuando se repitió el mismo proceso a partir de proteínas totales tratadas con EDTA, como era de esperar por la inspección del análisis en SDS-PAGE (compárense los carriles nº 3 de la figura III.28). Por el contrario, cuando se procedió a la detección de los componentes de membrana que migraban a la altura de la P84, no se observó ningún incremento cuando las proteínas totales fueron tratadas con EDTA (carriles nº 2 de la figura III.28). Este resultado fué corroborado por un anticuerpo monoclonal (ACM), obtenido accidentalmente durante el clonaje de los ACMs α -P100, que también reconocía unas bandas que migraban a la misma altura (carriles nº1 de la figura III.28). El conjunto de estos resultados implicaba que el suero preparado, en principio para la detección de P84, reconocía otro componente que migraba a la misma altura que la P84 y que no era detectado por

tinción con azul de Coomassie. Además, parecía no estar afectado por la presencia del EDTA ni del calcio en el tampón de desnaturalización de la electroforesis. Todas estas características apuntaban a un componente no proteico y de naturaleza lipídica e inmunogénico, probablemente un lipopolisacárido o glicolípido.

Puesto que el peptidoglicano es el componente que determina la disposición de la P100 en unos cristales bidimensionales de simetría hexagonal, según pudimos deducir a partir de las distintas transformaciones estructurales (apartado 3.12), y teniendo en cuenta que el contenido lipídico entre las estructuras S2 y pS2 es bastante similar, procedimos a analizar otras posibles diferencias que determinan la presencia de una estructura S2 o pS2. En este sentido, el componente detectado con el suero α -LPS se presentaba como un firme candidato que explicase la disposición de la P100 en cristales tetragonales o trigonales. Con objeto de comprobar esta hipótesis, se hicieron ensayos de inmunoblots utilizando este antisuero con las fracciones de membrana que contenían las estructuras S2 y pS2, partiendo de una cantidad igual de proteínas determinadas por el método de Bradford (1976), y comprobado mediante SDS-PAGE (figura III.29, a la izquierda). Los resultados de dichos ensayos, donde se emplearon antisueros α -P100, α -LPS y el ACM 2CF1, se muestran en la figura III.29. El suero α -P100, usado como otro control interno, confirma que la cantidad de proteína P100 en cada estructura es la misma. Los anticuerpos del suero policlonal α -LPS y el ACM 2CF1, que reconocían una banda a la altura de P84 tanto en las fracciones de S2 como de pS2, mostraban una mayor intensidad en la primera. Este resultado indica que dicho componente está presente en ambas estructuras, pero en la estructura S2 está en una mayor proporción, lo que concuerda con los resultados obtenidos sobre su composición lipídica.

Por último, y para comprobar directamente la presencia del LPS, se procedió a su purificación siguiendo distintos métodos puestos a punto para otros géneros bacterianos (apartado 2.2.16), ya que hasta la fecha no se dispone de protocolos definidos para esta bacteria, aunque el método de Westphal y Jann (1965) ya ha sido empleado para el análisis del LPS de distintas cepas de *Thermus* (Pask-Hughes y Williams, 1978). El análisis comparativo de las fracciones del LPS purificado por estos métodos y el componente que se detectaba en los precipitados insolubles de las estructuras S2 y pS2, fué realizado mediante inmunoblots con el ACM 2CF1. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.30 en la que se observa como las bandas detectadas por el ACM migraban a la misma altura en cada fracción purificada y en las fracciones de S2 y pS2. Puesto que, suponiendo una transferencia homogénea al papel, la intensidad de la banda correspondiente al LPS es

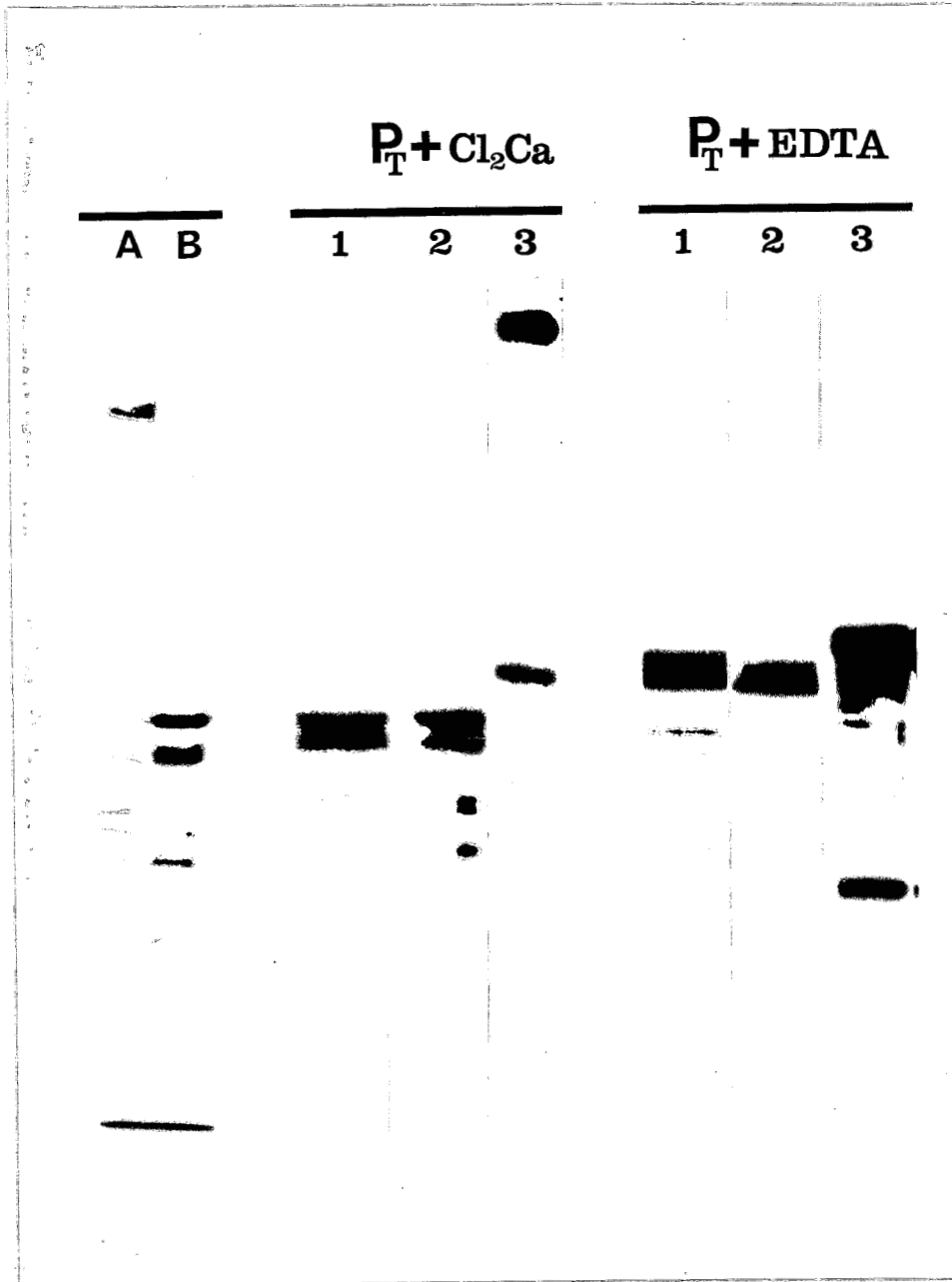


FIGURA III.28 Análisis de los anticuerpos policlonales frente al LPS de *T. thermophilus*. Proteínas totales de la membrana de *T. thermophilus* fueron hervidas en el tampón de desnaturalización (descrito en el apartado 2.2.4.2), en presencia de 5 mM de Cl_2Ca (A y $P_T + Cl_2Ca$) o 5 mM de EDTA (B y $P_T + EDTA$), y sometidas a SDS-PAGE de concentración mixta (6-11%). La detección de bandas se hizo por tinción con azul de Coomassie (carriles A y B) o por inmunoblots con el ACM 2CF1 (1), o con los sueros policlonales α -LPS (2) y α -P100 (3).

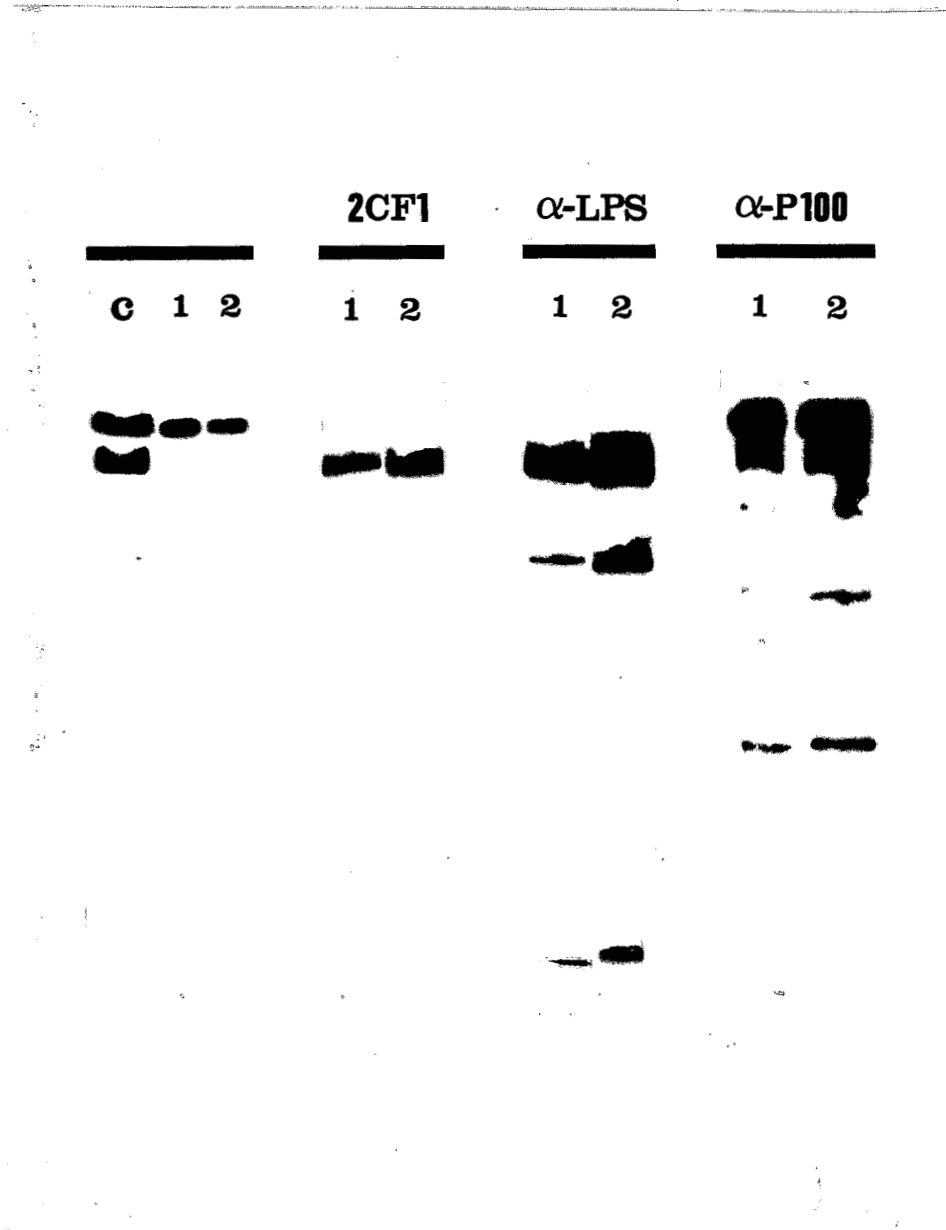


FIGURA III.29 Análisis por anticuerpos α -LPS y α -P100 de las estructuras pS2 y S2. Fracciones de membrana que mostraban las estructuras regulares pS2 (carriles nº 1) y S2 (carriles nº 2) fueron procesadas para su análisis por SDS-PAGE al 10% (apartado 2.2.4.2) y detectadas con azul de Coomassie. En ensayos paralelos, las mismas muestras fueron transferidas a papel Inmobilon y detectadas con 125 I-Proteína A tras la incubación con los distintos anticuerpos indicados en la figura: el ACM 2CF1 y los sueros policlonales α -LPS y α -P100.

distinta para cada método de purificación, el LPS de *T. thermophilus* debe tener una estructura peculiar que favorece un proceso de purificación con respecto a otros. La identificación directa de dicho componente por los métodos standard de tinción con plata resultó infructuosa, de forma similar a lo descrito en otros casos (Fomsgaard y cols., 1990)

3.15 OBTENCION DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ACMs ESPECIFICOS PARA LA P100

Para la obtención de ACMs específicos para la proteína P100 se realizaron un total de 3 fusiones. La proteína P100 usada como antígeno fué obtenida a partir de fracciones de membrana enriquecidas que fueron hervidas en tampón de desnaturalización y sometidas a una electroforesis desnaturalizante (apartado 2.2.4.2). La proteína fué extraída del gel de la forma descrita en el apartado 2.2.16.

Los sobrenadantes de los pocillos con crecimiento celular se analizaron por RIAs. De ellos, alrededor de un 17% secretaron ACMs. Se seleccionaron los hibridomas que mejor señal dieron en el primer ensayo, un total de 35, y se clonaron al menos tres veces mediante la técnica de dilución límite inmediatamente después de la fusión. El resto fueron congelados a -150°C . Una vez clonados y expandidos, se inocularon 5 ratones BALB/c con cada hibridoma para usarlos como fuente ascites conteniendo altas concentraciones de ACMs.

Los ACMs secretados por los hibridomas clonados y estabilizados, bien a partir del sobrenadante de cultivos celulares o de ascites, se muestran en la tabla III.4. El isotipo predominante fué $\gamma_1\text{K}$.

3.16 CONSTRUCCION DE LAS FORMAS TRUNCADAS DE LA P100

Con objeto de determinar las regiones de aminoácidos de la P100 que eran reconocidos por los ACMs, se procedió a la construcción de formas truncadas de la P100 a partir de plásmidos que expresaban fragmentos de la proteína bajo el control de promotores inducibles en *E. coli*. Para ello partimos de los plásmidos pMF51, pMF41 y pMF4 (Faraldo y cols., 1991). En el plásmido pMF51, el inserto, con el gen *slpA* completo, se encuentra bajo el control de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, mientras que en el pMF41 está bajo el control del promotor Plac y da lugar a una proteína de fusión que incluye los nueve aminoácidos iniciales de la β -galactosidasa y los aas 288 a 917 de la P100. El plásmido pMF4 contiene el gen *slpA* completo y sus secuencias flanqueantes.

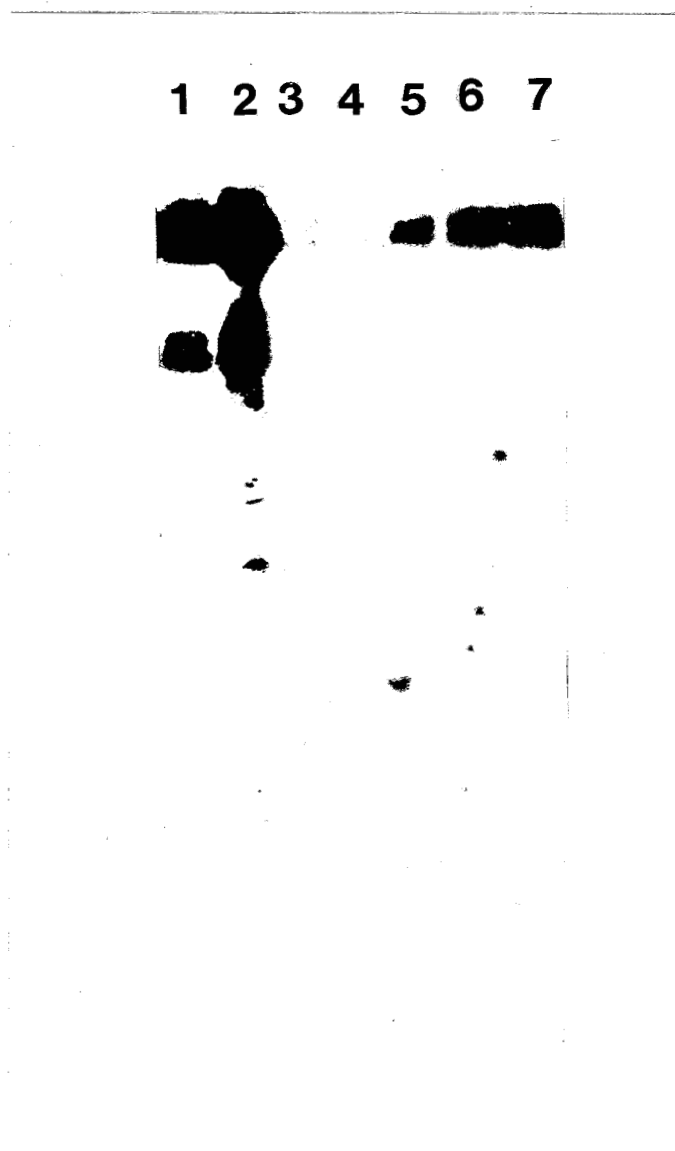


FIGURA III.30 Análisis de las purificaciones del LPS de *T. thermophilus*. Fracciones de membrana conteniendo la estructura pS2 (1) o S2 (2), y fracciones del LPS, purificado por los métodos de Uchida y Mizushima (1987) a partir de células (3) o membranas (4), de Westphal y Jann (1965) (5), de Osborn (1966) (6) y de Kido y cols. (1990) (7), según se describe en el apartado 2.2.8, fueron sometidas a una SDS-PAGE al 10% y detectadas por inmunoblots con el ACM 2CF1.

Puesto que la secuencia del gen *slpA* era conocida (Faraldo y cols., 1992), mediante el uso de enzimas de restricción, de dianas únicas en unos casos, o por digestiones parciales de dianas múltiples en otros, fué posible obtener un conjunto de plásmidos con insertos de distintos tamaños, como se muestra en la figura III.31. En resumen, a partir del plásmido pMF51 fueron obtenidos los plásmidos pMF511 y pMF512 mediante digestiones parciales con PstI y BstEII, respectivamente; Los plásmidos pMF412 y pMF413 se obtuvieron a partir de pMF41 mediante las digestiones con BstEII y AccI, respectivamente. El plásmido pMF49 fué obtenido a partir del pMF4 tratado con XhoI y Sall (localizada en el "polilinker"), y religado.

3.17 EXPRESION DE LAS FORMAS TRUNCADAS DE LA P100

La expresión de los distintos fragmentos del gen *slpA* se llevó a cabo en función del promotor que precedía al inserto y se realizó como está descrito en el apartado 2.2.13.

1.- Plásmidos cuya expresión está controlada por el promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. La expresión de los plásmidos pMF51, pMF511 y pMF512 fué realizada en las estirpes de *E. coli* JM109 DE3, BLB21 o BLB21 *plysS*, al disponer éstas en su cromosoma del gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7 controlado por el promotor Plac. La estirpe BL21 *plysS* lleva además el gen que codifica para la lisozima del mismo bacteriófago en un plásmido, lo que permite controlar los escapes indeseables en la expresión de la polimerasa al inhibir ésta de forma específica.

2.- Plásmidos cuya expresión está bajo el control del promotor de la β -galactosidasa. En este caso la expresión de los plásmidos pMF41, pMF412, pMF413 y pMF49 se realizó en la estirpe de *E. coli* JM109.

Las expresiones fueron analizadas mediante inmunoblots con un suero policlonal de conejo α -P100, y sus resultados se muestran en la autorradiografía de la figura III.32. Como se observa en la tabla incluida en esta figura, las movilidades electroforéticas de los productos de expresión fueron, en general, algo mayores que las esperadas. Como ya se sabía de antemano, la expresión del pMF51 sólo da lugar a la P100 completa en estirpes de *E. coli* lon^- de forma que en JM109 (lon^+) da un fragmento amino de unos 52 kDa (Faraldo y cols., 1991). Las expresiones de los plásmidos pMF511 y pMF512 mostraron fragmentos cuyo tamaño era muy similar al esperado, así como en el caso de los plásmidos pMF41, pMF412 y pMF413. La expresión del plásmido pMF49 daba lugar a un

producto cuyo tamaño era mucho menor del esperado, 38 en lugar de 90 kDa, comportándose en este aspecto de la misma forma que el plásmido pMF51.

3.18 CARACTERIZACION DE LOS ACMs α -P100

La técnica seguida para identificar las zonas de la P100 reconocidas por cada uno de los ACMs consistió en el ensayo de unión de cada uno de éstos a los distintos fragmentos de P100 expresados en *E. coli* y procesados como inmunobolts. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.3 junto con las características isotópicas de cada ACM.

El esquema seguido para la localización de los epítomos reconocidos por cada ACM se basó inicialmente en la separación de los que reconocían productos de la zona amino, expresados a partir de pMF511 (30% inicial de la P100, aas 1-261), y los que reconocían la zona carboxilo (aas 288-917), expresados a partir de pMF41. A su vez, los que se localizaban en el extremo amino fueron subdivididos en tres zonas: Los que no reconocen al producto de pMF512 (aas 1-196) fueron adjudicados a la zona diferencial, esto es, desde el aminoácido 196 al 261. Los que dieron un resultado positivo con el pMF512 se separaron en dos subgrupos en función de si reconocían el producto de expresión de pMF49 (desde el aa 98 en adelante) o si, por el contrario, daban un resultado negativo, adjudicándolos a los primeros 98 aminoácidos. Por otra parte, los de la zona carboxilo, que reconocen el producto del pMF41, fueron subdivididos de la siguiente forma: Los que no reconocían al producto de pMF413 fueron adjudicados a la zona de los aas 728 al 917; los que reconocían a pMF413 pero no al pMF412 fueron localizados en la zona diferencial (aas 556-728); los que reconocían a pMF412 (aas 288-556) fueron divididos entre los que identificaban al producto de pMF51 y/o pMF49 (aproximadamente hasta la mitad de la proteína) de los que no los reconocían, que deben interaccionar con la zona final expresada por el plásmido pMF412.

En el esquema de la figura III.33 se puede apreciar claramente que la mayoría de los ACMs van dirigidos contra la zona amino de la P100, si bien se pudo identificar al menos un ACM para cada una de las regiones estudiadas. Es interesante destacar que, de forma accidental, y como consecuencia del proceso de obtención de la P100 usada en la selección de los hibridomas para su clonaje (comentado en el apartado.2.2.16), se obtuvo un ACM que reconocía una banda de 84 kDa (según movilidad en SDS-PAGE), cuyas características, como ya se ha comentado en el apartado 3.14, sugieren una naturaleza lipopolisacáridica

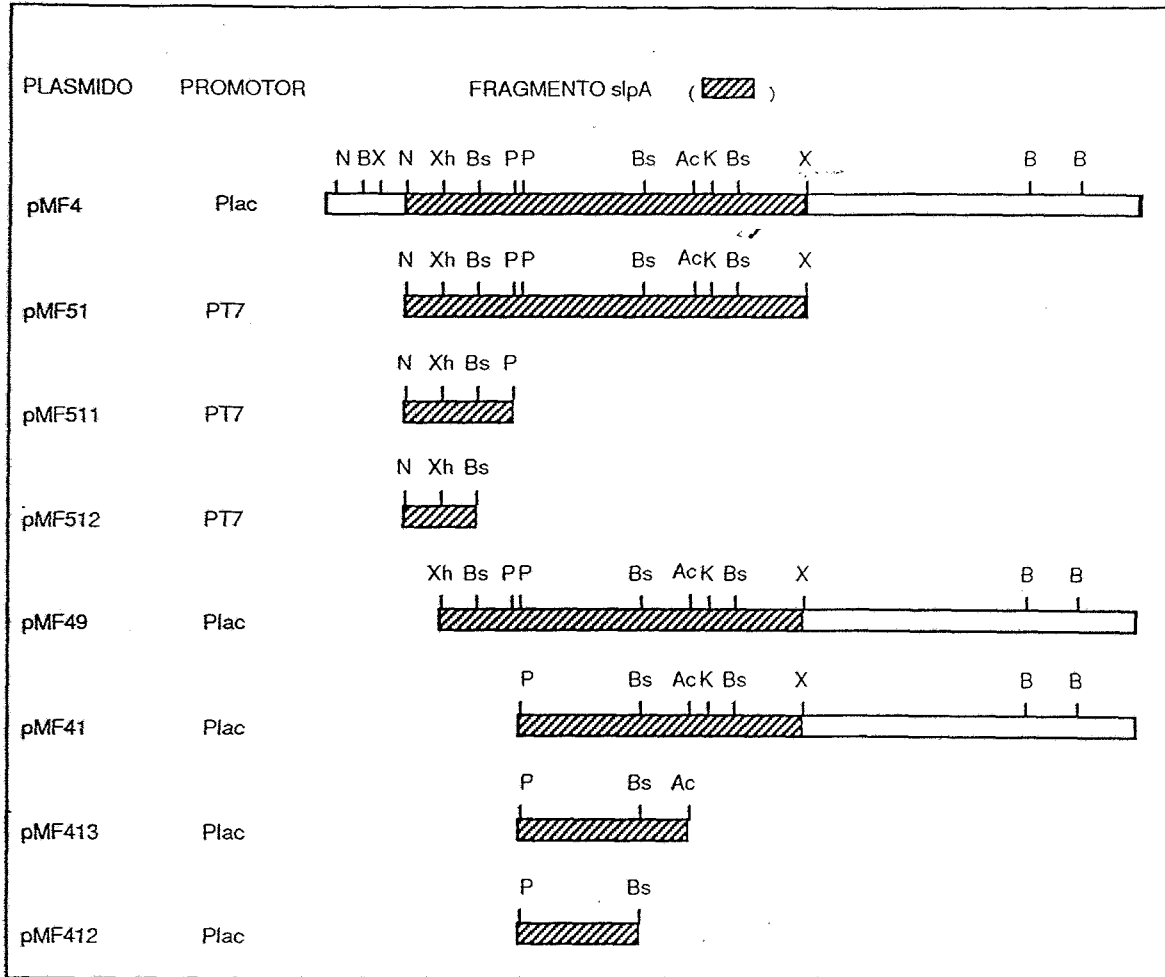
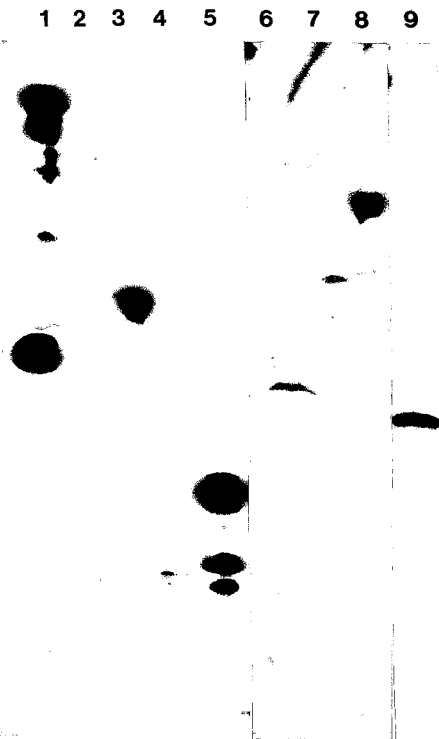


FIGURA III.31 Colección de los plásmidos que contienen distintos fragmentos del gen *slpA*. En el esquema se muestran, en trazo rayado, los fragmentos de la región codificante del gen *slpA* que contiene cada uno de los plásmidos construidos y el promotor que regula su expresión. Clave: Ac: *AccI*; B: *BamHI*; Bs: *BstEII*; K: *KpnI*; N: *NdeI*; P: *PstI*; X: *XmaI*; Xh: *XhoI*.



PLASMIDO	Mr teórico del fragmento clonado*	Mr según movilidad observada*
pMF51	100	52
pMF511	27,9	29
pMF512	21,8	22,7
pMF49	89,5	38
pMF41	71	76
pMF413	47,2	55
pMF412	31	42

* ($\times 10^{-3}$ daltons)

FIGURA III.32 Análisis de la expresión de los plásmidos con fragmentos de formas truncadas del gen de la P100. La expresión de los distintos fragmentos del gen *slpA* se llevó a cabo en función del promotor que precedía al inserto y fué realizada como se describe en el apartado 2.2.13. Los productos expresados fueron detectados mediante ensayos de inmunoblots con un suero de conejo α -P100: (1) Proteínas totales de la membrana de *T. thermophilus*; (2) Proteínas totales de *E. coli* JM109 DE3; (3) Proteínas totales de *E. coli* JM109 DE3/pMF51; (4) Proteínas totales de *E. coli* BL21 plysS/pMF512; (5) Proteínas totales de *E. coli* JM109 DE3/pMF511; (6) Proteínas totales de *E. coli* JM109/pMF412; (7) Proteínas totales de *E. coli* JM109/pMF413; (8) Proteínas totales de *E. coli* JM109/pMF41; (9) Proteínas totales de *E. coli* JM109/pMF49. En la tabla incluida se muestran las movilidades electroforéticas teóricas y deducidas de los productos de expresión de los fragmentos del gen *slpA*.

TABLA III. 3 Características de los ACMs específicos para la proteína P100 de *T. thermophilus*

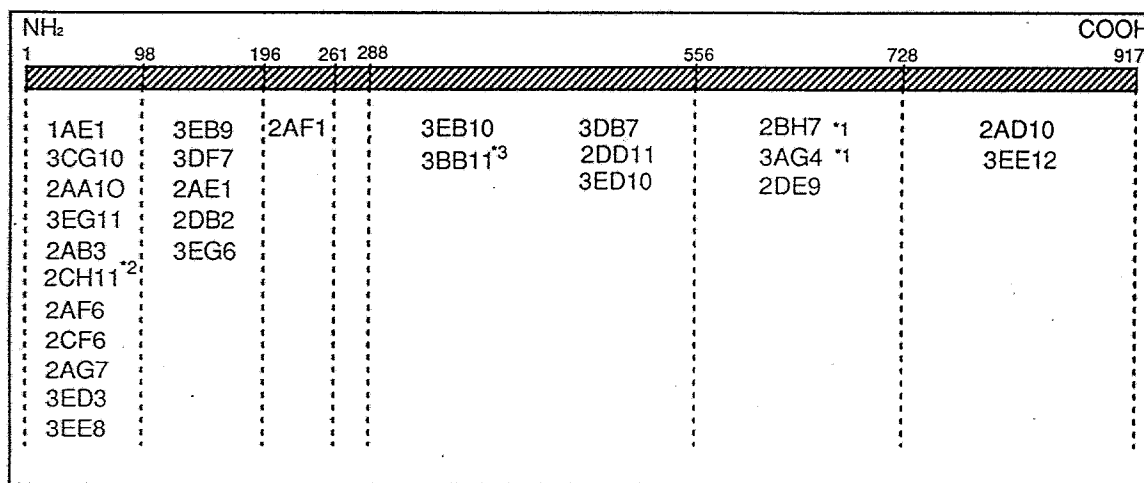
ACM	ISOTIPO	pMF51	pMF511	pMF512	pMF49	pMF41	pMF413	pMF412
1AE1	G ₁	+	+	+	-	-		
3EB9	G ₁		+	+	+	-		
2CF1*	M							
3CG10	G ₁		+	+	-	-		
2DE9	M	-		-		+	+	-
2AA10	G ₁		+	+	-	-		
2AD10	M	-	-	-		+	-	-
3EG11	G ₁	+	+	+	-	-		
3DF7	G _{2b}		+	+	+	-		
2BH7	G ₁	-	-			+	+	+/-
3EE12	M	-	-	-		+	-	-
2AB3	G ₁		+	+	-	-		
2CH11	G ₁	-	+	+/-	-	-		
2AF6	G ₁		+	+	-	-		
3EB10	G ₁	+	-	-	+	+	+	+
3AG4	G ₁	-	-	-		+	+	+/-
2CF6	M		+	+	-	-		
3DB7	G ₁	-	-			+	+	+
2BB11	G _{2b}	-	-			+		
2AG7	G ₁	+	+	+	-	-		
3ED3	G ₁		+	+	-	-		
2AE1	G _{2b}		+	+	+	-		
2AF1	G ₁	+	+	-	+	-		
3ED10	M	-	-	-		+	+	+
2DD11	G ₁	-	-			+	+	+
2DB2	M		+	+	+	-		
3EE8	G ₁	+	+	+	-	-		
3EG6	G ₁	+	+	+	+	-		

* ACM α -LPS; +:reconocimiento; -: no reconocimiento; +/-:reconocimiento dudoso.

3.19 DETERMINACION DE LOS EPITOPOS ACCESIBLES EN LAS ESTRUCTURAS S1, pS2 Y S2

Los análisis bioquímicos e inmunológicos de los distintos ACMs frente a P100 siempre fueron realizados usando como antígeno la proteína completa, o fragmentos de ésta, desnaturalizados a 100°C en un tampón con SDS, EDTA y β -mercaptoetanol. Para poder determinar si las zonas inmunogénicas de secuencia se podían correlacionar con zonas estructurales de la P100, se hacía necesario un estudio de los ACMs usando la P100 en condiciones lo más parecidas a su estado nativo o, por lo menos, en su disposición estructural en los distintos cristales bidimensionales que constituye. Para ello, fueron realizados ensayos de ELISA (2.2.15) empleando como antígeno la P100 de los precipitados insolubles que contenían las estructuras S1, pS2 y S2. Se partió de una colección de ACMs en la que había un representante de cada zona estudiada de la secuencia de la P100 y, a su vez, en previsión de posibles impedimentos estéricos debidos al tamaño de las Igs (150 kDa), se prepararon fragmentos Fab (de 50 kDa) a partir de uno de los ACMs, el 1AE1 (apartado 2.2.20; figuras II.3 y II.4). El resultado de dichos análisis es mostrado en la tabla III.4. Mientras que los ACMs de la zona amino (aas 1-261) no se unían a las estructuras S1, el fragmento Fab (aas 1-98) dió un resultado claramente positivo, indicando la escasa accesibilidad de los epítomos de la P100 en la estructura hexagonal. Con respecto a la estructura pS2, todos los ACMs de la región amino fueron positivos mientras que para la estructura S2, dieron un resultado favorable los ACMs localizados en los primeros 98 aas a diferencia de los ACMs 3EB9 (aas 98-196) y 2AF1 (196-261). El conjunto de los ACMs de la zona restante de la P100 (aas 288-917) no se unían a ninguna de las estructuras regulares, indicando bien que los dominios antigénicos de la zona carboxilo terminal no son accesibles, o que se trata de ACM de secuencia.

La prueba más evidente de la unión de los ACMs de la región amino a las estructuras pS2 y S2 se obtuvo tras un estudio inmunomicroscópico con las estructuras mencionadas. Para ello, las fracciones de pS2 y S2 se incubaron con el ACM 1AE1, visualizándose los anticuerpos en el microscopio electrónico por conjugación con el complejo proteína A-oro coloidal de 5 nm de diámetro (apartado 2.2.21). Los resultados de la figura III.34 muestran que, mientras en los controles donde se usó un ACM contra el virus de la fiebre aftosa (cedido por el Dr. E. Domingo) apenas se visualizaban las marcas de oro, en los ensayos realizados con el ACM 1AE1 se observaban en toda la superficie de los cristales de pS2 y S2 (figura III.34b y d, respectivamente).



*1 Puede mapear en cualquier zona comprendida entre los aa288 y aa728.

*2 " " " " " " aa1 y aa196.

*3 " " " " " " aa288 y aa917.

FIGURA III.33 Localización de las zonas de reconocimiento de los ACMs en la secuencia de la proteína P100. La proteína P100, de 917 aas, se muestra subdividida en las zonas indicadas en función de los fragmentos del gen *slpA* expresados en los distintos plásmidos (figura III.31). Se muestra la localización antigénica de los ACMs disponibles

3.20 DETERMINACION DEL EPITOPO I CON FRAGMENTOS Fab

Los resultados de los ensayos de inmunomicroscopía electrónica con las estructuras pS2 y S2, así como los obtenidos en los ensayos de ELISA resumidos en la tabla III.4, nos permitieron plantearnos que, con los fragmentos Fab de los ACMs localizados en secuencias concretas de la P100, podríamos determinar los dominios estructurales donde éstas se encontraban mediante la combinación de las técnicas de inmunomicroscopía electrónica y el procesamiento digital de imágenes. Para ello, y teniendo en cuenta que el fragmento Fab utilizado en los ensayos de ELISA descritos en el apartado anterior tenía accesible el epítipo que reconocía en la estructura S1, y que además se unía a éste con una alta afinidad, se procedió a la incubación de las estructuras S1 con los fragmentos Fab del 1AE1, en una relación molar de 10:1 (Fab:P100), de la forma indicada en el apartado 2.2.22. Puesto que las micrografías electrónicas de las estructuras S1 con y sin el fragmento Fab eran indistinguibles, se hizo necesario el procesamiento de las imágenes para comprobar si existían diferencias. Los resultados de dicho análisis se muestran en la figura III.35. Como cabía suponer, los cristales controles mostraban las características morfológicas que definen a la S1 (comparense las imágenes filtradas de la figura III.35a y las figuras III.7c y III.8). Sin embargo, en el caso de las estructuras S1 marcadas con Fabs se pudieron determinar, y de forma repetitiva, la aparición de ciertas características nuevas. En la figura III.35b-f se muestra una selección de los 15 cristales distintos que se procesaron: El centro de simetría $p6$ queda severamente distorsionado mientras que las áreas de los brazos apenas sufren cambios apreciables. Además, en ninguno de los cristales procesados se pudo imponer una simetría $p6$ debido a los inaceptables valores de residuo de fase que se obtuvieron. Estos resultados sugerían bien que la unión de los fragmentos Fab no llegó a ser saturante y por ello se perdía la simetría hexagonal en el centro donde se localiza la mayor parte de la masa proteica, o bien que, debido a impedimentos estéricos entre los propios Fabs, no es posible saturar todos los puntos de unión al encontrarse éstos muy próximos físicamente. A pesar de ello, la distorsión en el centro $p6$ sirvió para localizar la zona amino terminal de la P100 en dicho centro. A este epítipo localizado lo hemos denominado epítipo I.

TABLA III.4 Determinación de regiones accesibles a ACM y fragmentos F_{ab} en las estructuras nativas (% de unión con respecto al control positivo -Antisero policlonal de ratón-).

RED	ACMs*							
	Fab (1-98)	1AE1 (1-98)	2AB3 (1-98)	3EB9 (99-196)	2AF1 (197-261)	3ED10 (288-556)	3AG4 (557-728)	2AD10 (729-917)
S1	71	28	0	14	14	0	0	0
pS2	62	44	87	38	56	6	0	12
S2	55	27	55	18	18	0	0	18

* Se indica, entre paréntesis, la región antigénica donde se localiza cada ACM

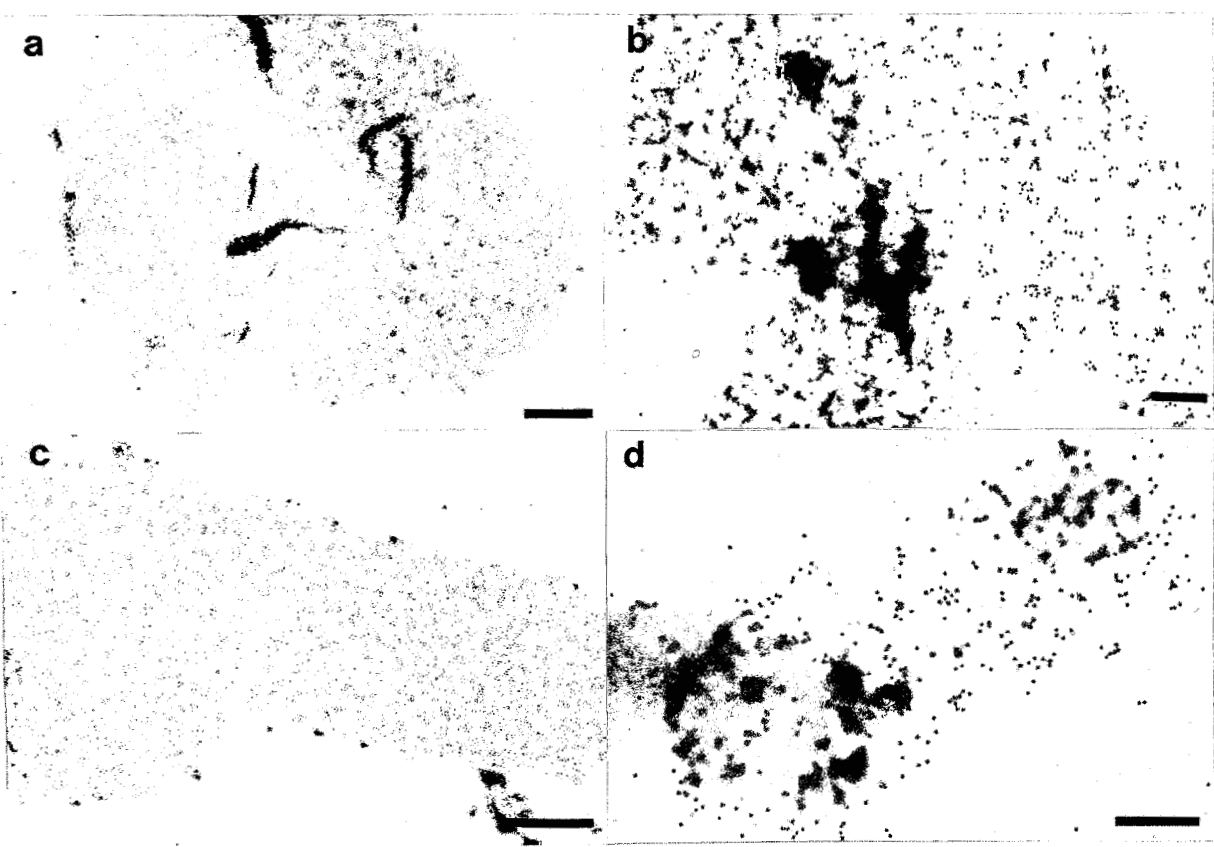


FIGURA III.34 Inmunomicroscopía electrónica de las estructuras pS2 y S2. Los cristales bidimensionales de simetría trigonal y tetragonal se incubaron con un ACM contra el virus de la fiebre aftosa (a y c, respectivamente), o con el ACM 1AE1, localizado en los primeros 98 aas de la P100, (b y d, respectivamente), posteriormente con proteína A-oro coloidal de 5 nm, y se tificaron con acetato de uranilo al 2%. Las barras representan 200 nm.

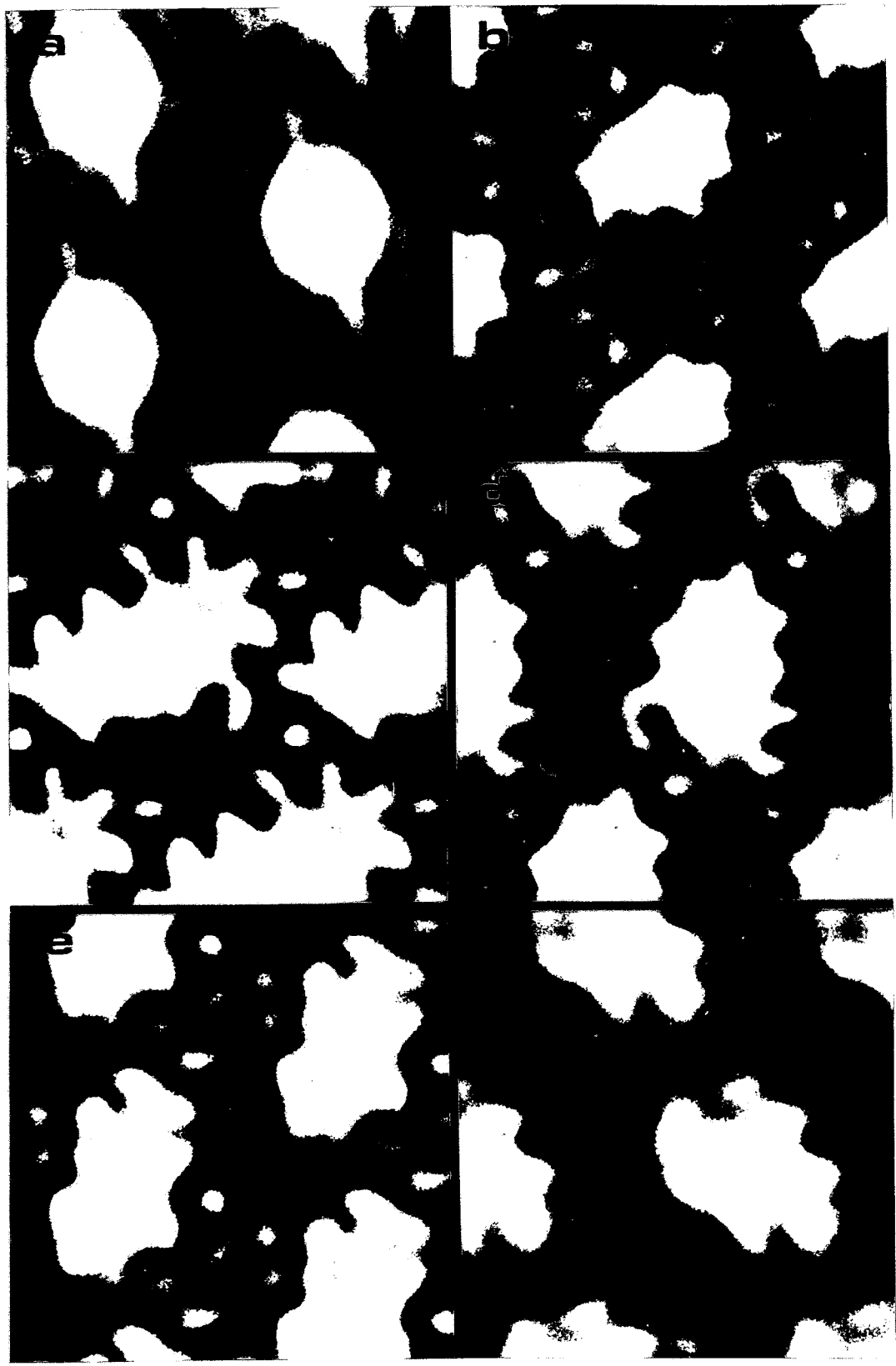


Figura III.35 Localización del epítipo I en la estructura S1. Fracciones de membrana que mostraban unos cristales hexagonales, fueron incubadas con los fragmentos Fab del ACM 1AE1 (aas 1-98), teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2% y observadas al microscopio electrónico. Las áreas cristalinas seleccionadas en base a sus difractogramas (que mostraban 5-6 órdenes), fueron digitalizadas, calculadas y filtradas sus TF, y obtenidas las imágenes filtradas sin imposiciones de simetría p6: (a) Imagen control de un cristal S1; (b-f) Imágenes de cristales S1 marcados con los fragmentos Fab

DISCUSSION

4.0 DISCUSION

Análisis estructurales

La caracterización de las proteínas de membrana de *T. thermophilus*, realizada en nuestro laboratorio (Berenguer y cols., 1988; Faraldo y cols., 1988), mostró la existencia de un grupo de proteínas de alto Mr de naturaleza oligomérica (HMrPs), cuyas unidades componentes, una proteína de 100 kDa (P100), están fuertemente asociadas entre sí a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Este hecho sugería la presencia de polímeros proteicos extremadamente estables en la envoltura celular, lo que nos llevó a realizar un estudio microscópico detallado de este microorganismo. Nuestros resultados, obtenidos a partir de la técnica de criofractura y sombreado metálico, demostraron la presencia *in vivo* de una capa S en la superficie externa de la bacteria (figura III.1). Además se pudo confirmar que esta compleja estructura cubría completamente la superficie celular, y que se trataba de una estructura constitutiva, puesto que todos los análisis sobre células obtenidas a partir de cultivos en distintas fases de crecimiento dieron resultados idénticos. Si bien esta característica está extendida entre bacterias con capas S, hay importantes excepciones como los géneros *Spirillum* y *Caulobacter* (Smit y cols., 1981). La observación directa de la capa S de *T. thermophilus* por la técnica de criofractura fué particularmente dificultosa, pues sólo en un 2% de las células se detectaban estas estructuras, lo que nos hizo suponer que esta bacteria posee material capsular que, al colapsar durante la sublimación del hielo, enmascara la topografía de la capa S. Tal suposición presentaba otro punto de apoyo: las colonias de *T. thermophilus* sobre agar presentaban un aspecto mucilaginoso típico de bacterias con cápsula. Teniendo en cuenta el efecto desestabilizador ejercido por agentes quelantes sobre la cápsula y membrana externa de bacterias Gram negativas (Hammond y cols., 1984), la incubación con EDTA de células de *T. thermophilus*, previamente a su tratamiento por criofractura, se presentó como método idóneo para revelar la capa cristalina en la práctica totalidad de las células así preparadas (figura III.1D).

De la dos proteínas mayoritarias de la membrana de *T. thermophilus*, P100 y P84, era la primera la que mostraba características bioquímicas (composición aminoacídica, punto isoeléctrico, pI, etc.) similares a las de proteínas de capa S (Faraldo y cols., 1988). Con el fin de demostrarlo, analizamos mediante electroforesis y MET distintas fracciones obtenidas por solubilización diferencial con TX-100 y SDS. Este análisis permitió concluir que la capa S era detectable únicamente en aquellas fracciones donde la P100 era mayoritaria (figura III.2), siendo posible, además, separarla de P84 debido a la fácil extracción de ésta con el detergente neutro. Las características de solubilidad de la capa S de *T. thermophilus*

demonstraron que no se encuentra unida covalentemente al material subyacente (membrana externa o peptidoglicano), y se puede deducir, además, que las interacciones entre las unidades en la estructura deben de ser más intensas que las que mantienen con otras supraestructuras, lo que encaja en principio con la definición más ortodoxa de capa S (Hövmoller y cols., 1988).

La unidad estructural que se repite en la capa S de *T. thermophilus* se dispone en una simetría planar hexagonal (P6), que es la responsable de las reflexiones observadas en los patrones de difracción (figura III.3). Las imágenes obtenidas mediante el procesamiento asistido por ordenador indican que esta unidad está constituida por un área central con una depresión en su centro, desde la cual salen seis brazos que se unen a brazos adyacentes de celdillas unidad vecinas en la red hexagonal. Las dimensiones de la celdilla unidad son $a=b=24\pm 2$ nm, una de las más grandes determinadas, lo que implicaba una compleja red de contactos intermoleculares para asegurar la necesaria estabilidad estructural.

Para estudiar este aspecto, el siguiente paso que se planteó fué el análisis bidimensional de los cristales de la capa S teñidos negativamente, manteniendo en lo posible un alto grado de integridad estructural del material de partida, con el fin de obtener una resolución lo suficientemente significativa. Las mejores condiciones fueron conseguidas a partir de membranas preparadas por sonicación y, tras solubilizaciones diferenciales con TX-100 y EDTA, fueron obtenidas fracciones altamente enriquecidas en P100 (superior al 80-90%). Sin embargo, y dependiendo de las condiciones de extracción, resultó que los precipitados insolubles que se obtenían eran fácilmente distinguibles a nivel macroscópico en función de su grado de compactación. Cuando se observaron al microscopio se comprobó que en realidad constituían distintas estructuras cristalinas a las que denominamos S1, pS2 y S2 (figuras III.7, III.9 y III.10). En la tabla IV.1 se resumen las características del proceso de obtención de cada cristal, así como las que hacen referencia a su estructura .

Los cristales bidimensionales de simetría hexagonal, que denominamos S1, se correlacionan inequívocamente con la capa S observada *in vivo*. El proceso de obtención de dichos cristales mejoró notablemente su preservación estructural, lo que permitió deducir otras características estructurales, en particular las que se refieren a los brazos de conexión que, además de proporcionar puntos de contacto en los centros P3, conectan los centros P3 y P6 y, por tanto, incrementan las interacciones entre los distintos dominios de la P100. En los centros P6 es donde se concentra la mayor parte de la masa proteica. Por otra parte, los rasgos estructurales de los cristales S2, con simetría P2, son radicalmente distintos a los

TABLA IV.1 Proceso de obtención de los cristales S1, pS2 y S2

	MEMBRANAS TOTALES		
1ª SOLUBILIZACION	TX-100 1% EDTA 50 mM	TX-100 1%	TX-100 1%
2ª SOLUBILIZACION	TX-100 1%	TX-100 1% EDTA 50 mM	TX-100 1%
3ª SOLUBILIZACION	TX-100 1%	⋮	⋮
ESTRUCTURA	▽ S1	▽ pS2	▽ S2
SIMETRIA	P6	P3	P2
CELDILLA UNIDAD (nm)	a=b=19.2±0.2	a=b= 18±0.3	a=24.2 b=21
GRADO DE COMPACTACION	alto	alto	bajo

presentados por los cristales S1, y se asemejan a los que forman las distintas porinas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Rosenbusch y cols., 1980). Por último, la estructura pS2 se presentaba, desde un punto de vista meramente morfológico, como la estructura intermedia entre ambas, manteniendo los trímeros de poros como el rasgo estructural más sobresaliente en la red tipo S2, al tiempo que mostraba un centro de simetría pseudo-hexagonal (P3).

El análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones que mostraban los distintos cristales (figura III.4) sugería la interesante posibilidad de que una misma proteína tuviese la capacidad de constituir tan diferentes agregados bidimensionales. Dicha hipótesis, sin precedentes en ninguna de las 30-40 proteínas de capa S analizadas con cierta profundidad, requería de experimentos adicionales y definitivos para su confirmación. Además, como posibilidad alternativa, también podría darse el caso de que la banda correspondiente a la P100 estuviese constituida por varias proteínas, de igual Mr, aunque esta posibilidad se presentaba cómo muy remota al tener en cuenta que el proceso de purificación de la P100 implica cromatografías de intercambio iónico. Con el fin de descartar esta última hipótesis, y mediante proteólisis limitada y desnaturizante de las fracciones que mostraban los distintos cristales, se comprobó la identidad de los productos proteolíticos con un suero policlonal α -P100, además de ser identificados éstos por tinción con azul de Coomassie (figuras III.11 y III.12). Estos datos confirmaban la capacidad de la proteína P100 para constituir distintas estructuras cristalinas, que implicarían cambios conformacionales intra-dominios o/y inter-dominios, mediante distintas disposiciones conformacionales de todos o algunos de los dominios de la proteína P100. Un experimento que apunta hacia esta última posibilidad lo constituye el análisis mediante proteólisis parcial de las distintas estructuras regulares en condiciones nativas que, cuando son tratadas con la misma proteasa, genera el mismo fragmento mayoritario para cada una de los cristales, si bien habría que determinar que se trata de la misma secuencia (datos no mostrados). Evidentemente, deben de estar implicados otros factores afectados en el proceso de solubilización secuencial que provoca tales cambios.

Continuando con los análisis estructurales de los cristales S1, pS2 y S2, fueron abordadas sus reconstrucciones tridimensionales (3DRs) a partir de una serie de vistas a distintos ángulos de inclinación, ya que la información obtenida en los análisis bidimensionales se puede considerar relativamente limitada. Las técnicas empleadas ya han sido aplicadas en este laboratorio a otras estructuras periódicas, como las constituidas por los conectores de los fagos ϕ 29 y T3 (Carazo y cols., 1986; Donate y cols., 1988) y, puesto que se sale del contexto de este apartado, no serán discutidas. El modelo tridimensional (3D) de

la estructura S1 mostró que el centro P6 es un pilar con una altura de 10 nm, mientras que los brazos sólo se localizan en el tercio superior, con un grosor aproximado de 3.3 nm (figuras III.14 y III.15). A pesar de la diversidad existente entre las capas S hexagonales (tabla III.1), en nuestro modelo se deduce también el rasgo estructural más destacable de estas redes periódicas, la asimetría con respecto a las dos superficies del cristal, presentando una superficie suave (en la cara donde se localizan los brazos), y otra con protusiones que le dan una apariencia "rugosa".

El conjunto de los análisis estructurales con la capa S1 sugería que el monómero constituyente estaría formado por un(os) dominio(s) mayoritario(s) que constituiría(n) 1/6 del pilar en el centro P6, y otro(s) que daría(n) cuenta de los brazos. Con respecto a los brazos, se podían presentar hasta tres posibilidades, mostradas en la figura III.16, que permitirían generar la red a partir de interacciones equivalentes entre los monómeros. Considerando que de todas las formas oligoméricas de alto Mr constituidas por P100, y estabilizadas por Ca^{2+} , la forma trimérica es la más abundante y estable (Berenguer y cols., 1988; Faraldo y cols., 1988), se podría descartar el modelo $\text{M}_6\text{C}_{3,3}$, ya que en éste no aparecen contactos exclusivos en número de tres (en los ejes de simetría P3 convergen 6 brazos, si bien es cierto que son iguales de 3 en 3). Los dos modelos restantes, del tipo $\text{M}_6\text{C}_{3,6}$, y que difieren únicamente en el orden en que están considerados los dominios de los brazos, presentan zonas de interacción proteína-proteína en ejes de simetría P3, los cuales podrían representar los centros de interacción electrostática dependientes de Ca^{2+} . Otro dato que apoya tal hipótesis es el hecho de que los monómeros de las capas suelen estar constituidos por un dominio pesado y otro que forma las conexiones (Saxton y Baumeister, 1986). Asimismo, es destacable que el monómero de la capa S de *T. thermophilus*, junto con el determinado para la arqueobacteria *Thermoproteus tenax* (Messner y cols, 1986), es una de las formas más alargadas que se han presentado hasta el momento.

El modelo 3D de la red S2 mostró una cierta similitud estructural con los cristales constituidos por las porinas (figura III.18). El triplete de poros atraviesa completamente la estructura, a diferencia de la porina OmpF en la que convergen en un único poro en la cara interna (Engel y cols., 1985), pero en concordancia con los cristales de maltoporina (Lepault y cols., 1988) y de la porina PhoE (Jap, 1989). Las ausencias sistemáticas que se observan en la TF obtenida a partir de cristales a 0° indican la existencia de ejes de rotación-traslación en la celdilla unidad, lo cual puede ser visualizado en el conjunto de los planos obtenidos en su 3DR. Siguiendo el dominio localizado en el centro de los trímeros de poros de una celdilla

unidad, se puede deducir que los trímeros adyacentes tienen orientaciones opuestas (figura III.17).

La comparación de los análisis bidimensionales de las estructuras pS2 y S2 muestra el gran parecido entre ambas. Las imágenes de proyección a 0° de la red pS2 indican que los poros atraviesan toda la estructura, aunque es imposible deducir si existen pilares a modo del cristal S1, lo que permitiría una muy interesante correlación entre las dos estructuras.

Los modelos tridimensionales de los cristales S1 y S2 nos conducen a interesantes consideraciones estructurales sobre la transformación que ocurre en función del proceso de solubilización. La subunidad estructural determinada en el cristal S1, que tiene una forma alargada tanto en su dirección transversal (el pilar situado en el eje P6) como en su dirección longitudinal (los brazos de conexión), se transforma en un monómero mucho más compacto en la estructura S2. Este cambio no implica necesariamente transformaciones masivas si consideramos que, en algunas preparaciones de estructuras S2, aparecen cristales en los que coexisten ambas estructuras (datos no mostrados). Si bien no ha sido posible controlar los factores que conducen a estos cristales mixtos, este hecho sugiere que la transformación estructural es un proceso *in situ* y, por tanto, conservativo en el sentido de que no necesariamente los monómeros proteicos se disgregan completamente y después vuelven a constituir un agregado bidimensional. A pesar de las diferencias estructurales reveladas por las filtraciones bidimensionales de los distintos cristales, también es interesante destacar la reiterada presencia de un hexágono de puntos de difracción de mayor amplitud en las TF para cada cristal, indicando quizás alguna similitud estructural.

Los métodos que hemos empleado para obtener un modelo 3D de los cristales bajo estudio, solamente permiten deducir la altura del espécimen hasta el nivel donde el agente de tinción negativa ha penetrado. Con el fin de obtener medidas fiables del grosor de las estructuras S1, pS2 y S2, así como de la estructura de la envoltura celular de *T. thermophilus*, se incluyeron dichas muestras en la resina Epon 812. Una vez cortadas se comprobó que las dimensiones de la celdilla unidad y de la altura de la capa S, en las células incluidas, fueron de $a=b=16\text{nm}$ y $c=18.2\text{ nm}$, respectivamente (figura III.19). La diferencia existente con respecto a las dimensiones de la red determinadas a partir de muestras por tinción negativa o sometidas a criofractura (19.2 nm y $24\pm 2\text{ nm}$, respectivamente), es lógica si tenemos en cuenta que en este caso las muestras fueron deshidratadas. Por otra parte, puesto que la altura determinada en la 3DR (10 nm), fué mucho menor que la determinada en los cortes transversales, cabe deducir que no se llegó a contrastar toda la estructura con el

agente de tinción negativa, fenómeno común en la preparación de muestras para MET (Carazo y cols., 1985).

La determinación de las dimensiones de la capa S a partir de cristales bidimensionales del tipo S1 reveló que, si bien el tamaño de la celdilla unidad era prácticamente el mismo que en las secciones de células ($a=b= 15.5$ nm), la altura era aproximadamente el doble, 35.6 nm (figura III.20). Este resultado está indicando que los cristales S1 son estructuras artefactuales constituidas durante el proceso de solubilización, en las que la P100, que se mantiene en su conformación estructural nativa, es obligada a constituir estructuras dobles, quizá por la extracción de algún material lipídico y con objeto de disminuir la desfavorable situación energética producida por la presencia de dominios hidrofóbicos puestos al descubierto. Además, como se deduce a partir de las imágenes filtradas obtenidas a partir de la preparación por criosecado de las estructuras S1, y cuya información está limitada a la topografía superficial del cristal, las superficies que se observan son las mismas en ambos lados del doble cristal, y coincide con la superficie mostrada sobre las células. El dominio hidrofóbico al que nos referimos sería el pilar situado en el centro P6.

Las secciones de células mostraron también la extremada complejidad de la envoltura celular de *T. thermophilus*. Rodeando al citoplasma, se ha determinado la presencia de una estructura pentalaminar de un grosor de 20.5 nm, que podría dar cuenta de las membranas citoplasmática y externa además de una capa de peptidoglicano, de forma parecida a lo observado en Gram negativas. Un dato que apoya dicha hipótesis es la presencia de esta estructura pentalaminar en mutantes de capa S obtenidos en nuestro laboratorio (Lasa y cols., 1992). Sin embargo, el hecho más sorprendente lo constituyó la presencia de una envuelta, aparentemente amorfa y con un grosor de 30 nm, por encima de la membrana externa que también fué revelada a partir de fracturas de células, y sobre la cual se situaría la capa S (figuras III.19 y III.21). Aunque no disponemos de datos experimentales, en el marco de nuestras consideraciones, podría pensarse que se trata de una capa de naturaleza lipídica. Este modelo de envoltura es similar al que se ha descrito en *Deinococcus* (Sleytr y Glauert, 1982), si bien en el caso del radiotolerante la envuelta amorfa, a la que denominan material intercalante, es localizada entre la membrana externa y el peptidoglicano. Este dato refuerza la relación filogenética de los géneros *Thermus* y *Deinococcus*, planteada a partir de la comparación de las secuencias de RNAr 16 S (Weisburg y cols., 1989), ya que teniendo en cuenta los hábitats tan dispares de ambos géneros quedaría excluido un fenómeno de evolución convergente.

El análisis realizado sobre las estructuras S2 y pS2 no reveló la existencia de estructuras regulares dobles, y las medidas de grosor obtenidas (10 nm) resultaron similares a las deducidas del análisis 3DR (al menos en el caso de la S2).

A pesar de que se ha descrito algún caso, como en *Bacteroides buccae* (Kerosuo y cols., 1987), en que las porinas, llamadas también proteínas regulares de la membrana externa (OMPr), constituyen *in vivo* agregados bidimensionales que recubren la práctica totalidad de la superficie de la membrana externa, los intentos de localización de las estructuras S2 y pS2 en algunos de los planos de fractura de la envoltura celular, fueron fallidos. Si bien este dato no es definitivo, un hecho que apoya la idea de que sean estructuras constituidas *in vitro*, al menos para los cristales S2, es su forma de rectángulos perfectos.

Por último, los análisis estructurales de los cristales S1, pS2 y S2 fueron completados con un estudio de la topografía de cada estructura mediante la técnica de criosecado y sombreado metálico. Para ello, se controló el carácter hidrofílico o hidrofóbico del soporte al que se adherían las cristales, con objeto de revelar posibles diferencias entre las dos caras de los agregados bidimensionales. Como ya se mencionó anteriormente, los cristales S1 mostraban la misma apariencia sobre soportes hidrofílicos o hidrofóbicos, confirmando que son estructuras dobles (figura III.22). Con las estructuras pS2 se demostró que las dos superficies también son regulares. Cuando fueron adheridas sobre un soporte hidrofílico mostraban unas características estructurales fácilmente identificables con las que se obtenían a partir de las mismas muestras teñidas negativamente; la superficie regular mostrada cuando el soporte era hidrofóbico, morfológicamente se presentaba bastante distinta, pero el tamaño de los vectores de la celdilla unidad fue el mismo que en el caso anterior (figuras III.23 y III.24). Esta característica estaría indicando la existencia de asimetría entre las caras de los cristales pS2, aunque no se puede descartar que fuese debido al efecto del sombreado unidireccional o la baja resolución de los cristales. Sin embargo, el análisis de los cristales S2 mostró que si bien la superficie más hidrofóbica del cristal era regular, distinguiéndose los tripletes de poros en las imágenes filtradas, la cara más hidrofílica se presentaba irregular quizás debido a la presencia de lípidos sobre esta superficie del cristal (figura III.25).

Análisis bioquímicos

El conjunto de los análisis estructurales descritos para los cristales S1, pS2 y S2 nos proporcionó un conocimiento detallado de cada uno de ellos, pero permanecían sin resolver los asuntos, quizás más interesantes, que hacen referencia a las transformaciones estructurales. Dichas transformaciones no sólo se pueden explicar como un polimorfismo estructural, así descrito en el caso de las porinas, sino que deben de estar implicados cambios más drásticos que afectan a la disposición estructural de los distintos dominios de la P100, y más concretamente a los trímeros de P100, ya que esta unidad se mantiene cuando las fracciones de las tres estructuras son calentadas a 70°C en presencia de EDTA y analizadas por SDS-PAGE (datos no mostrados).

Los datos obtenidos hasta el momento con otras proteínas de capa S de organismos tan variados como *Acinetobacter* (Thornley y cols., 1974), *Aquaspirillum* (Kist y Murray, 1984), *Bacillus* (Tsuboi y cols., 1982), *Clostridium* (Sleytr, 1976), *Lactobacillus* (Lortal y cols., 1992), y especies relacionadas con *Pseudomonas* (Austin y cols., 1990), demuestran que las estructuras reconstituidas *in vitro* por la proteína purificada son idénticas a las observadas *in vivo*. Estos datos contrastan con el análisis por MET de los cristales que formaba la P100 purificada que, tras ser incubados a 60°C en presencia de Ca^{2+} , mostraron la inequívoca relación estructural de éstos con los cristales pS2 (y no con la estructura nativa S1), pues no solamente las celdillas unidad de ambos tenían las mismas dimensiones, sino que además compartían los mismos rasgos estructurales así como las simetrías (figuras III.26 y III.9). Esta homología planteaba la posibilidad de que la pS2, que está presente en los precipitados insolubles después de dos extracciones, no estuviera constituida por la interacción de la P100 con el peptidoglicano, como en principio cabría suponer. En este sentido, una aparente contradicción que surgió en el comportamiento de la P100 fue su insolubilidad en TX-100 durante el proceso de obtención de pS2 (y S2) a partir de membranas totales, y su solubilización en el mismo detergente tras la digestión del peptidoglicano durante el proceso de purificación de la proteína. Si bien este comportamiento sugería una interacción pS2 (y S2) con el peptidoglicano, la digestión de esta estructura con lisozima una vez formados los cristales pS2 (o S2), no permitió la solubilización de éstos debido, con toda probabilidad, al gran tamaño alcanzado (figuras III.9 y III.10). Además, la solubilización de P100 durante su purificación se realizó bajo una agitación violenta y continua, lo que limitó el tamaño de los cristales (observado en el análisis de los cristales de P100 sin la incubación con Ca^{2+}) y facilitó su solubilidad.

La subsiguiente comprobación de la dispensabilidad del peptidoglicano para el mantenimiento de las estructuras pS2 y S2 se realizó tratando estas estructuras con dos enzimas que degradan el peptidoglicano, lizozima y muramidasa de *Chalaropsis sp* (en previsión de posibles artefactos de la lizozima, Ohno y Morrison, 1989). Mientras que S2 y pS2, como se ha comentado anteriormente, no mostraron alteración alguna, el tratamiento de la S1 con dichas enzimas desembocó en la transformación estructural hacia la pS2 (figura III.27). Este experimento sugería además que en la S1 debían de ser necesarias las interacciones P100-peptidoglicano para su integridad. Por otra parte, considerando que los cristales S1 son hojas dobles con sus dos superficies reguláres, el peptidoglicano debería estar situado entre ambas. El análisis bidimensional de 10 cristales distintos del tipo pS2, obtenidos a partir de S1, reveló que se trataba de cristales con una baja integridad estructural si los comparamos con los obtenidos en el proceso de la solubilización secuencial, lo que puede estar indicando que es necesario algún otro componente adicional.

Una vez establecida la existencia de un factor que diferenciaba a la estructura S1 de pS2 y S2, se analizó la transformación entre estas dos estructuras. El tratamiento con TX-100 y EDTA de las fracciones que mostraban los cristales S2 daba lugar a la estructura pS2 cuando previamente había sido digerido el peptidoglicano. Por el contrario, cuando no se degradaba, la transformación ocurría mayoritariamente hacia S1, aunque también se observaban, en menor proporción, las redes pS2. Estos resultados, además de confirmar que la presencia del peptidoglicano es necesaria para la formación *de novo* de los cristales S1, sugieren que el tratamiento con EDTA y el detergente debe extraer además algún componente adicional necesario para la S2. Esto explicaría también el hecho de que nunca fueran posibles los pasos hacia S2 desde las redes S1 y pS2.

Considerando que la relación Lípido/Proteína (LPR; p/p) para las estructuras S1 y pS2 fué de 0.56 mientras que para la S2 era de 0.7, el EDTA podría estar implicado en la extracción de parte del material lipídico, en especial de lipopolisacáridos, como está descrito con las envolturas de *E. coli* (Leive, 1965), que podría constituir el componente adicional. La existencia de una cierta cantidad de este componente podría también explicar las diferencias de integridad de los cristales de la P100 purificada comparados con la capa pS2.

Por otra parte, la diferencia entre S1 y pS2 reside en el orden de las extracciones en presencia o ausencia de EDTA. Cuando se añade el EDTA en la primera incubación se obtiene siempre S1, y cuando es en la segunda pS2. En este sentido, existe la posibilidad de que la extracción de algún componente en ausencia de EDTA debilite la interacción de la P100 con el peptidoglicano, aparentemente necesaria para el mantenimiento de la estructura

S1, de forma que un segundo tratamiento con TX-100 llevase hacia S2 o pS2, dependiendo de la ausencia o presencia del agente quelante, respectivamente. Un posible componente candidato a ser el intermediario en la interacción P100-peptidoglicano es la proteína P84 cuya solubilización en TX-100 está relacionada inversamente con la concentración de EDTA (figura III.5). Su ausencia debilitaría tal interacción y posibilitaría cambios estructurales hacia los cristales S2 y pS2. La diferencia entre estas dos estructuras estaría relacionada, por otra parte, con la relación LPR, superior en S2.

Puesto que la diferencia entre S2 y pS2 en el proceso de obtención también es la presencia de EDTA, y este agente quelante es capaz de extraer (por secuestro de cationes divalentes) el LPS en Gram negativas, decidimos analizar la presencia de un hipotético LPS en las estructuras cristalinas. Además, existía el precedente de que el LPS de *E. coli* se copurifica con la fracción de la porina OmpF (Garavito y Rosenbusch, 1986) e incluso, está relacionado con la trimerización *in vitro* de éstas (Sen y Nikaido, 1991).

La obtención de un suero α -LPS se realizó accidentalmente, ya que éste tenía una movilidad electroforética que coincidía con la de la P84 (figura III.28), objetivo inicial de la inmunización. De hecho, el antisuero obtenido reconocía específicamente fracciones de LPS, purificadas por distintos métodos, en las que no se observaban bandas ni siquiera tras tinción con plata (figura III.30) (Tsai y Frasch, 1982; Al-Hendy y cols., 1991). Este hecho también ocurre con las fracciones de LPS de otros géneros como *Pseudomonas* (Fomsgaard y cols., 1990). El análisis con α -LPS de las fracciones de las estructuras S2 y pS2, mostró que el LPS, si bien está presente en ambas, se encuentra en mayor proporción en la estructura S2 (figura III.29). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos sobre la composición lipídica.

En la tabla IV.2 se muestra la comparación de las distintas relaciones LPR para la P100 y las porinas. Estos datos sugieren que las mayores relaciones LPR se corresponden con un aumento en el tamaño de los vectores de la celdilla unidad. Asimismo, es destacable que es en nuestro caso donde se dan las variaciones más pequeñas, debido quizás a que se está forzando la situación para obtener fracciones lo suficientemente enriquecidas en la proteína P100. La reconstitución de las distintas estructuras periódicas en un sistema *in vitro* a partir de los distintos componentes implicados, P100, peptidoglicano, lipopolisacárido y probablemente también otros lípidos y P84, contribuirá en el futuro a dilucidar de forma definitiva la composición de cada una de las estructuras. Teniendo en cuenta los precedentes de la proteína de capa S de *C. fetus*, cuya oligomerización para constituir una red periódica es específica del tipo de LPS que posee (hay dos serotipos descritos, Perez y cols., 1986) así

como del estado de éste en función de la presencia de cationes divalentes (Yang y cols., 1992), dicho sistema *in vitro* debe ser planteado con los componentes purificados obtenidos a partir de un mismo aislado, en nuestro caso, *T. thermophilus* HB8.

Llegados a este punto, cabe preguntarse si tiene algún sentido la posibilidad de que una proteína de capa S pueda formar distintas estructuras, y que además estas estructuras se muestran similares a las constituidas por porinas. Desde un punto de vista funcional apenas podemos plantear suposiciones. Por un lado sabemos que es una proteína importante para el crecimiento de la bacteria puesto que el mutante de capa S que hemos obtenido (Lasa y cols., 1992), aunque es viable, muestra un crecimiento más lento y formas aberrantes que están siendo caracterizadas en este momento, lo que no concuerda con lo observado en otras capas S (*Aeromonas*, Ishiguro y cols., 1981). Por otro lado, las consideraciones evolutivas que surgen son muy interesantes. Se ha planteado que las OMPr constituyan formas muy evolucionadas de las capas S, al incorporarse éstas a la membrana externa y, por tanto, implicando la drástica transformación de proteínas periféricas en proteínas intrínsecas, seguida de una diferenciación hacia proteínas que forman poros de mayor especificidad (Baumeister y Engelhardt, 1987). Sin embargo, las comparaciones de secuencia de aminoácidos de las pocas proteínas de capa S que se conocen, y en particular de la P100, con porinas como OmpF, PhoE y maltoporina, no muestran un grado de homología significativo, lo cual no es de extrañar si tenemos en cuenta que PhoE y OmpF tampoco presentan homología en la estructura primaria con la maltoporina (Stauffer y cols., 1992). No obstante, está contrastado que las similitudes entre las distintas porinas se dan a nivel de estructura 3D así como en estructura secundaria, ya que presentan un elevado contenido en hojas β . En este sentido, la P100 sí podría ser equiparable. Además, presenta unas características bioquímicas similares a las de OmpF: pI ácido, elevado contenido de aas con carga (lo que es raro para proteínas de membrana), persistencia del LPS en preparaciones enriquecidas de la proteína, estructura básica de trímeros altamente estables y, aunque sólo sea a nivel de predicción en el caso de la P100, tienen un alto contenido en hojas β (Rosenbusch, 1974; Kleffel y cols., 1985; Overbeeke y cols., 1980).

Por todo ello, y considerando la enorme presión selectiva a la que deben estar sometidas las proteínas de membrana, en especial las que están en contacto directo con el medio, parece lógico pensar que la capacidad de la P100 en constituir diferentes estructuras no es sólo una casualidad, y podríamos estar en un caso que, por razones desconocidas, representa un estado intermedio en la evolución de las proteínas de capa S.

TABLA IV.2 Parámetros estructurales y relación LPR de las porinas de *E. coli* y la P100 de *T. thermophilus*.

PROTEINA	LPR	SIMETRIA	CELDILLA UNIDAD (nm)
PhoE ^a	0.25	P2	a= 15; b= 13
Maltoporina ^b	0.1	P3	a= b= 7.9
		P2	a= 7.9; b= 13.7
	1	P6	a= b= 8.4
OmpC ^c	1	P6	a= b= 6.5
	>1	P6	a= b= 7.5
OmpF ^d	0.16	P6	a= b= 7.9
		P2	a= 13.7; b= 5.9
	0.72	P6	a= b= 9.3
P100	0.56	P6	a= b= 19.2
		P3	a= b= 18
	0.7	P2	a= 24.2; b= 21

^a Jap (1989); ^b Stauffer y cols., 1992; ^c Chang y cols., 1985 y Yamada y Mizushima 1980; ^d Dorset y cols., 1983 y Steven y cols., 1977

Análisis de epítomos

La parte final de esta Memoria ha consistido en sentar las bases para determinar cómo ocurre la transformación estructural entre los distintos cristales. Para ello, se tomaron como referencia los espectaculares análisis realizados por el grupo de Aebi con el fago T4, que mediante el uso de fragmentos Fab de anticuerpos policlonales localizaron el movimiento relativo de epítomos de la proteína mayoritaria de la cabeza del fago, ligado a transformaciones estructurales que tienen lugar durante su morfogénesis (Aebi y cols., 1977; Kistler y cols. 1978 y Buhle y Aebi, 1984).

Nuestro trabajo se dividió en las siguientes etapas:

- 1^a.- Obtención de una colección de ACMs.
- 2^a.- Caracterización tanto isotípica como inmunogénica de los ACMs.
- 3^a.- Determinación de los epítomos estructurales accesibles a los ACMs.
- 4^a.- Obtención y purificación de los fragmentos Fab de cada ACM representativo.
- 5^a.- Análisis de los epítomos estructurales y correlación con los epítomos de secuencia mediante análisis digital de imágenes.

La necesidad de una colección de ACMs lo suficientemente significativa en el sentido de que mapeasen en el mayor número de regiones posibles de la P100, se hacía evidente si tenemos en cuenta que la unidad estructural de los distintos cristales estaba constituida por una única proteína mayoritaria. La disposición de 27 ACMs, en principio distintos entre sí, fué suficiente. Su caracterización posterior fué abordada a partir de una colección de plásmidos que expresaban distintos fragmentos de la proteína P100 (Figuras III.31 y III.32) y, aunque la mayoría mapearon en la zona amino terminal, se consiguió al menos un ACM para cada una de las zonas estudiadas de P100. Ello nos permitió formar grupos de ACMs que reconocían la misma zona de la secuencia de P100, y a su vez seleccionar el de mayor afinidad para proceder a su posterior purificación (figura III.33). También fué importante determinar el isotipo de cada ACM, puesto que los protocolos de purificación varían en función de la clase de Ig que se trate. En nuestro caso la mayoría fueron del tipo IgG₁ (tabla III.3).

Antes de proceder a su purificación procedimos a determinar si el ACM seleccionado se unía a su epítomo también en las estructuras obtenidas *in vitro*. Estos análisis fueron realizados mediante ensayos de ELISA, utilizando como antígeno la P100 de las estructuras S1, pS2 y S2 (tabla III.4). De esta forma se determinó que la accesibilidad al epítomo de los

ACMs representativos de cada grupo era bastante variable en función de la estructuras que se empleaban. Mientras que la estructura S1 no era accesible a ninguno de los ACMs, la estructura pS2 mostraba epítomos accesibles a los ACM que mapeaba hasta el aa 261. Por otra parte, la estructura S2 sólo fue marcada por ACMs localizados hasta el aa 98. Sin embargo, estos datos pueden conducir a conclusiones erróneas ya que el tamaño de un ACM podría impedir su acceso al epítomo correspondiente, mientras que su fragmento Fab podría acceder a él, como ocurrió con el ACM 1AE1. El resultado negativo obtenido con los ACMs localizados en la zona carboxilo de la P100 (considerada a partir del aa 288), podría estar indicando la inaccesibilidad de estos dominios antigénicos a proteínas muy grandes, aunque tampoco se puede descartar si se trata de ACMs contra epítomos de secuencia y no estructurales.

No obstante, el resultado más generalizado en los ensayos de ELISA fue que los ACMs seleccionados en principio contra epítomos de secuencia, fueron funcionales para epítomos estructurales.

El análisis microscópico de las estructuras S2 y pS2 marcadas con los ACMs que dieron resultados positivos en los ensayos de ELISA (figura III.34), y detectados con el conjugado proteína A-oro coloidal, reveló que la unión era uniforme sobre toda la superficie del cristal. Puesto que el fragmento Fab que mapea en los primeros 98 aas de la P100 dió un excelente resultado en la unión con la estructura S1, fue ésta la que se seleccionó para llevar a cabo el marcaje de los epítomos estructurales localizados en dicha zona. La unión del fragmento Fab sólo puede ser revelada después del análisis digital de imágenes con las estructuras S1 marcadas. En principio cabía suponer que la diferencia entre los cristales marcados y los controles se detectaría por la aparición de nuevos dominios en las primeras (masas blancas en las imágenes filtradas) que se corresponderían con los fragmentos Fab unidos. Además, y puesto que el epítomo reconocido por el ACM está dispuesto de forma periódica, estos nuevos dominios también se deberían de repetir en el cristal siguiendo la misma simetría. En nuestros análisis se observó que el centro de simetría P6 de la estructura S1 está alterado cuando es marcado con el fragmento Fab, lo que nos hizo deducir que ésta es la zona de unión del Fab (figura III.35). No obstante, los cristales marcados perdían la simetría P6, lo que sugiere la existencia de un fenómeno de insaturación de los puntos de unión del fragmento Fab, bien porque no se alcanzaron las concentraciones necesarias (lo cual parece bastante improbable puesto que la relación molar P100: Fab fue de 1: 10), o bien por impedimentos estéricos entre los fragmentos Fab. Teniendo en cuenta que en un círculo aproximado de 80 nm^2 (la superficie del centro P6) se tienen que localizar 6 moléculas de 50

kDa, esta segunda posibilidad parece la más probable. Con objeto de verificar este efecto, tendremos que proceder en condiciones más saturantes aún en futuros experimentos

A pesar de estos problemas, los análisis de marcaje con fragmentos Fabs realizados con las estructuras S1, nos han permitido localizar un epítipo estructural en el dominio globular del centro P6 y, puesto que sabíamos la zona de P100 que es reconocida por el ACM del que proceden los fragmentos Fabs, hemos correlacionado dicho epítipo estructural con la secuencia comprendida en los primeros 98 aas de la P100.

Este método de marcaje de epítipos estructurales con fragmentos Fabs, cuya especificidad de secuencia es conocida, se presenta como una estrategia de gran futuro en el campo de la Biología Molecular, no solamente para correlacionar epítipos secuenciales y estructurales, sino que también, y lo que es más interesante en nuestro caso, para dilucidar el modo en que tiene lugar la transformación estructural entre las capas S1, pS2 y S2. El marcaje de las distintas estructuras con el mismo fragmento Fab señalará el epítipo equivalente en cada una de ellas, y la comparación de una colección de ensayos similares permitirá establecer los cambios conformacionales de los dominios de la P100, así como las zonas que, como debe ser el caso del dominio de la interacción de los trímeros estabilizados por Ca^{2+} , permanecen constantes en los tres estructuras.

CONCLUSIONES

5.0 CONCLUSIONES

- Las células de *T. thermophilus* presentan una estructura regular superficial, capa S, de simetría hexagonal, constituida mayoritariamente por una proteína de 100 kDa. La dimensión de su celdilla unidad es de 24 ± 2 nm, y sus características más sobresalientes son la presencia de una región central donde se acumula la mayor parte de la masa proteica desde la cual, irradian 6 brazos.

- La envoltura celular de *T. thermophilus* es extremadamente compleja, estando compuesta por la membrana citoplasmática, el peptidoglicano, una segunda membrana, una gruesa capa amorfa, la capa S y otra capa amorfa menor, quizás de LPS.

- La proteína P100, como componente proteico mayoritario, tiene la capacidad de adoptar diversas conformaciones para constituir distintos agregados cristalinos bidimensionales, con características estructurales muy diferenciadas. Se les ha denominado tipo S1 (con simetría P6 y equivalente a la capa S), tipo pS2 (con simetría P3) y tipo S2 (con simetría P2). Las estructuras pS2 y S2 muestran un gran parecido estructural con las porinas de bacterias Gram negativas.

- La capacidad de la P100 para constituir cristales con características estructurales muy diferenciadas está determinada por la presencia del peptidoglicano y lípidos. La interacción entre los distintos componentes se puede regular por agentes quelantes y/o detergentes.

- Se ha puesto a punto un sistema para la localización de epítomos en estructuras periódicas, constituidas por una proteína mayoritaria, mediante el uso de fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales cuya especificidad antigénica es conocida previamente, y técnicas de procesamiento digital de imágenes. Este método ha permitido localizar el extremo amino de la proteína P100 en el centro de simetría P6.

BIBLIOGRAFIA

6.0 BIBLIOGRAFIA

Achenbach-Richter, L., R. Gupta, K.O. Stetter y C.R. Woese (1987). "Were the original eubacteria thermophiles?". *System. Appl. Microbiol.* **9**: 34-39.

Aebi, U., P.R. Smith, J. Dubochet, C. Henry y E. Kellenberg (1973). "A study of the structure of the T-layer of *Bacillus brevis*". *J. Supramol. Struct.* **1**: 498-522.

Aebi, U. B. ten Heggeler, L. Onorato, J. Kistler y M.K. Showe (1977). "New method for localizing protein in periodic structures: Fab fragment labeling combined with image processing of electron micrographs". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5514-5518.

Al-Hendy, A., P. Toivanen y M. Skurnik (1991). "Rapid method for isolation and staining of bacterial lipopolysaccharide". *Microbiol. Immunol.* **35**: 331-333.

Ameluxen, R.E. y R. Singleton (1976). "Thermophilic glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase", p.107-120. En **Enzymes and proteins from thermophilic microorganism**. Birkhäuser Verlag. Basel.

Amos, L.A., R. Henderson y P.N.T. Unwin (1982). "Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two-dimensional crystals". *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **39**: 183-231.

Austin, J.W., M. Stewart y R.G.E. Murray (1990). "Structural and chemical characterization of the S-layer of a *Pseudomonas*-like bacterium". *J. Bacteriol.* **172**: 808-817.

Baumeister, W., M. Barth, R. Hegerl y G. Guckenberger (1986). "Three-dimensional structure of the regular surface layer (HPI layer) of *Deinococcus radiodurans*". *J. Mol. Biol.* **187**: 241-253.

Baumeister, W. y H. Engelhardt (1987). "Three-dimensional structure of bacterial surface layer". En **Electron Microscopy of proteins, Membranous structures** (ed por J.R. Harris y R.W. Horne). p. 109-154. Academic Press, New York.

Baumeister, W. y R. Hegerl (1986). "Can S-layers make bacterial connexons?". *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 119-125.

Berenguer, J., M.L.M. Faraldo y M.A. de Pedro (1988). "Ca²⁺-stabilized oligomeric protein complexes are major components of the cell envelope of "*Thermus thermophilus*" HB8". *J. Bacteriol.* **170**: 2441-2447.

Beveridge, T.J. y L.L. Graham (1991). "Surface layer of bacteria". *Microbiol. Rev.* **55**: 684-705.

Birnboim, H.C. y J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Bligh, E. y W.J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification" *Can. J. Biochem. Phys.* **37**: 911-917.

Boulard, C. y A. Lecroisey (1982). "Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrilamide gel containing small amounts of proteins". *J. Immunol Methods* **50**: 221-226.

Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.* **72**: 248-258.

Brock, T.D. (1978). "The genus *Thermus*". En **Thermophilic microorganisms and life at high temperatures** (ed por M.P. Starr). p. 72-91. Springer-Verlag, New York.

Brock, T.D. (1984). "Genus *Thermus*". En **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9^o ed., (ed.por N.R.Krieg y J. G. Holt).p. 333-337. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Brock T. D. y K. L. Boylen. (1973). "Presence of thermophilic bacteria in laundry and domestic hot-water heaters". *Appl. Microbiol.* **25**: 72-76.

Brock T.D. y H. Freeze. (1969). "*Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non sporulating extreme thermophile". J. Bacteriol. **98**: 289-297.

Buchard, R.P. (1981). "Gliding motility of prokaryotes: ultrastructure, physiology and genetics". Ann. Rev. Microbiol. **35**: 497-529.

Buhle, E.L. y U. Aebi (1984). "Specific labeling of proteins domains with antibody fragments". J. Ultrastruct. Res. **89**: 165-178.

Carazo, J.M., L.E. Donate, L. Herranz, J.P. Secilla y J.L. Carrascosa. (1986). "Three-dimensional reconstruction of the connector of bacteriophage $\phi 29$ at 1.8 nm resolution". J. Mol. Biol. **192**: 853-867.

Carazo, J.M., N. García, A. Santisteban y J.L. Carrascosa (1984). "Structural study of tetragonal arrays of phage $\phi 29$ necks". J. Struct. Res **89**: 79-88.

Carazo, J.M., A. Santisteban y J.L. Carrascosa (1985). "Three-dimensional reconstruction of phage $\phi 29$ neck particles at 2.2 nm resolution". J. Mol. Biol. **183**: 79-88.

Carrascosa, J.L., J.M. Carazo y N. García (1983). "Structural localization of the proteins of the head to tail connecting region of bacteriophage $\phi 29$ ". Virology **124**: 133-143.

Carrascosa, J.L., J.M. Carazo, C. Ibañez y A. Santisteban (1985). "Structure of phage $\phi 29$ connector protein assembled *in vivo*". Virology **141**: 190-200.

Carrascosa, J.L., E. Viñuela, J.A. García y A. Santisteban (1982). Structure of the head-tail connector of bacteriophage $\phi 29$ " J. Mol. Biol. **154**: 311-324.

Castón, J.R. (1988). Descripción y análisis de una capa cristalina superficial en bacterias del género *Thermus*. Memoria de Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.

Castón J. R., J.L. Carrascosa, M. A. de Pedro y J. Berenguer. (1988). "Identification of a crystalline surface layer on the cell envelope of the thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*". FEMS Microbiol. Lett. **51**: 225-230.

Cejka, Z., R. Hegerl y W. Baumeister (1986). "Three-dimensional structure of the surface layer protein of *Clostridium thermohydrosulfuricum*". J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. **96**: 1-11.

Chang, C.-F., S. Mizushima y R.M. Glaeser (1985). "Projected structure of the pore forming OmpC protein from *Escherichia coli* outer membrane". Biophys. J. **47**:629-639.

Cheong, G.-W., Z. Cejka, J. Peters, K.O. Stetter y W. Baumeister (1991). "The surface protein layer of *Methanoplanus limicola*: three-dimensional structure and chemical characterization". System. Appl. Microbiol. **14**: 209-217.

Cleveland, D.W., S.G. Fischer, M.W. Kirschner y U.K. Laemmli (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis". J. Biol. Chem. **252**: 1102-1106.

Cohen, S.N., A.C.Y. Chang y L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**: 2110-2115.

Cooley, J.W. y J.W. Tukey (1965). "An algorithm for the machine computation of complex Fourier series". Math. Computation **19**: 297-305.

Cowan, D., R. Daniel y H. Morgan (1985). "Thermophilic proteases: properties and potential applications". Trends in Biotechnol. **3**: 68-72.

Deatherage, J.F., K.A. Taylor y L.A. Amos (1983). "Three-dimensional arrangement of the cell wall protein of *Sulfolobus acidocaldarius*". J. Mol. Biol. **167**: 823-852.

de Pedro, M.A. y D. Vázquez (1984). "Aminoacid composition of the peptidoglycan of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*". FEMS Symposium evolution on prokaryotes. Munich. Alemania

De Rosa, M., V. Lazotti, B. Nicolaus, A. Trincone y A. Gambacorta. (1988). "Lipids of archaeobacteria: structure and biosynthetic aspects". En **Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology**, FEMS Symposium n.49, (ed. por M.S. da Costa, J.C. Duarte, y R.A.D. Williams.). pp:131-151. Elsevier Applied Science, London, New York.

DeRosier, D.J. y A. Klug (1968). "Reconstruction of three-dimensional structures from electron micrographs". *Nature* **217**: 130-134.

Dickson, M.R., K.H. Downing, W.H. Wu y R.M. Glaeser (1986). "Three-dimensional structure of the surface layer protein of *Aquaspirillum serpens* VHA determined by electron crystallography". *J. Bacteriol.* **167**: 1025-1034.

Donate, L.E., L. Herranz, J.P. Secilla, J.M. Carazo, H. Fujisawa y J.L. Carrascosa (1988). "Bacteriophage T3 connector: three-dimensional structure and comparison with other viral head-tail connecting regions". *J. Mol. Biol.* **201**: 91-100.

Donato, M.M., E.A. Saleiro y M. Da Costa.(1990). "Polar lipid and fatty acid composition of strains of the genus *Thermus*". *System. and Appl. Microbiol.***13**: 234-239.

Dooley, J.S.G. y T.J. Trust (1987). "Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein". *J. Bacteriol.* **170**: 499-506.

Dorset, D.L., A. Engel, M. Häner, A. Massalski y J.P. Rosenbusch (1983). "Two-dimensional crystal packing of matrix porin. A channel forming protein in *Escherichia coli* outer membranes". *J. Mol. Bio.* **165**: 701-710.

Dulbecco, R. y R. Freeman (1959). "Plaque production by the polyoma virus". *Virology* **8**: 396-397.

Dulbecco, R. y M. Vogt (1954). "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus" J. Exp. Med. **99**: 167-182.

Egovora, L.A. y L.G. Loginova. (1974). "Nonsporulating bacteria from Kamchatka hot sources with a 70-75°C optimum growth temperature". Microbiology **43**: 758-762.

Engel, A., A. Massalski, H. Schindler, D.L. Dorset y J.P. Rosenbusch (1985). "Porin channel triplets merge into single outlets in *Escherichia coli* outer membranes". Nature **317**: 643-645.

Faraldo, M.L.M. (1990). Caracterización bioquímica y genética del principal componente estructural de la envoltura celular de *Thermus thermophilus*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Faraldo, M.L.M., M.A. de Pedro y J. Berenguer (1988). "Purification, composition and Ca²⁺-binding properties of the monomeric protein of the S-layer of *Thermus thermophilus*". FEBS Lett. **235**: 117-121.

Faraldo, M.L.M., M.A. de Pedro y J. Berenguer (1991). "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene coding for the monomeric protein of the S layer of *Thermus thermophilus* HB8". J. Bacteriol. **173**: 5346-5351.

Faraldo, M.L.M., M.A. de Pedro y J. Berenguer (1992). "Sequence of the S-layer gene of *Thermus thermophilus* HB8 and functionality of its promoter in *Escherichia coli*". J. Bacteriol. (enviado para su publicación).

Fomsgaard, A., M.A. Freudenberg y C. Galanos (1990). "Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels". J. Clin. Microbiol. **28**: 2627-2631.

Freeze, H. y T.D. Brock (1970). "Thermostable aldolase from *Thermus aquaticus*". J. Bacteriol. **101**: 541-550.

Garavito R.M. y J.P. Rosenbusch (1986). "Isolation and characterization of bacterial porin". Meth. Enzymol. **5**: 309-328.

García-Barreno, B., A. Sanz, M.L. Nogal, E. Viñuela y L. Enjuanes (1986). "Monoclonal antibodies of african swine fever virus: antigenic differences among field virus isolates and viruses passaged in cell culture". *J. Virol.* **58**: 385-392.

Gouy, M. y C. Gautier. (1982). "Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity". *Nucl. Acid. Res.* **10**: 7055-7074.

Greenwood, F.C., W.M. Hunger y J.M. Glover (1963). "The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity" *Biochem. J.* **89**: 114-123.

Guerrant, R.L., G.R. Lahita, W.C. Winn, Jr., R.B. Roberts (1978). "Campylobacteriosis in man: pathogenic mechanism and review of 91 bloodstream infections". *Am. J. Med.* **65**: 584-592.

Hammond, S.M., P.A. Lambert y A.N. Rycroft (1984). "The cell envelope of Gram negative bacteria", p. 57-118. En *The bacterial cell surface*. Crom. Helm. London, Sidney.

Harlow, E. y D. Lane (1988). En *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Hartmann, R.K., J. Wolters, B. Kröger, S. Schultze, T. Specht y V.A. Erdmann (1989). "Does *Thermus* represent another deep eubacterial branching?" *System. Appl. Microbiol.* **11**: 243-249.

Hastie, A.T. y C.C. Briton, Jr. (1979). "Isolation, characterization and *in vitro* assembly of the tetragonally arranged layer of *Bacillus sphaericus*". *J. Bacteriol.* **139**: 999-1009.

Hensel, R., W. Demharter, O. Kandler, R.M. Kroppenstedt y E. Stackebrandt. (1986). "Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus *Thermus* : Evidence for a phylogenetic relationship of *Thermus aquaticus* and *Thermus ruber* to the genus *Deinococcus*". *Int. J. System. Bacteriol.* **6**: 164-170.

Hensel, R. y H. Köning (1988). "Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration". *FEMS Microbiol. Lett.* **49**: 75-79.

Hocking, J.D. y J.I. Harris (1976). "Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus aquaticus*". En **Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms**. p. 121-134. Birkhäuser Verlag, Basel.

Hövmoler, S. (1986). "Three-dimensional structure of membrane proteins". En **Technique for the analysis of membrane proteins** (ed. por C.I. Ragan y R.J. Cherry). p. 315-344. Chapman and Hall, London.

Hövmoller, S., A. Sjögren y D.N. Wang (1988). "The structure of crystalline bacterial surface layers". *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **51**: 131-163.

Howard, L. y D.J. Tipper (1973). "A polypeptide bacteriophage receptor: modified cell wall protein subunits in bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus sphaericus* strain P-1". *J. Bacteriol.* **113**: 1491-1504.

Huber, R., T.A. Langworthy, H. Köning, M. Thomm, C.R. Woese, U.B. Sleytr y K.O. Stetter (1986). "*Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C". *Arch. Microbiol.* **144**: 324-333.

Hudson, J.A., H.W. Morgan y R.M. Daniel. (1986). "A numerical classification of some *Thermus* isolates". *J. Gen. Microbiol.* **132**: 531-540.

Hudson, J.A., H.W. Morgan y R.M. Daniel. (1987). "Numerical classification of some *Thermus* isolates from Icelandic hot springs". *System. and Appl. Microbiol.* **9**: 218-223.

Hudson, J.A., H.W. Morgan y R.M. Daniel. (1989). "Numerical classification of *Thermus* isolates from globally distributed hot springs". *System. Appl. Microbiol.* **11**: 250-256.

Hunt, B.R. (1978). "Digital image processing". En **Application of digital signal processing** (ed. por A.V. Oppenheim). p. 169-237. Prentice-Hall Inc., New York.

Imanaka, T., M. Shibasaki y M. Takagi (1986). "A new way of enhancing the thermostability of proteases". *Nature* **234**: 695-697.

Ishiguro, E.E., W. Kay, T. Ainsworth, J.B. Chamberlain, R.A. Austin, T.J. Buckley y T.J. Trust (1981). "Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature". *J. Bacteriol.* **148**: 333-340.

Jap, B.K. (1989). "Molecular design of PhoE porin and its functional consequences". *J. Mol. Biol.* **205**: 407-419.

Jiménez, J., A. Santisteban, J.M. Carazo y J.L. Carrascosa (1986). "Computer graphic display method for visualizing three-dimensional biological structures". *Science* **229**: 1113-1115.

Karlsson, B., T. Vaara, K. Lounatmaa y H. Gyllenberg (1983). "Three-dimensional structure of the regularly constructed surface layer from *Synechocystis sp.* strain CLII". *J. Bacteriol.* **156**: 1338-1343.

Kearney, J.F., A. Radbruck, B. Liesegang y K. Rajewsky (1979). "A new mouse myeloma line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines". *J. Immunol.* **140**: 944-948.

Kerosuo, E., M. Haapsalo, H. Ranta y K. Lounatmaa (1987). "Hexagonal periodicity in the outer membrane of *Bacteroides buccae*". *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2217-2224.

Kessel, M., I. Wildhaber, S. Cohen y W. Baumeister (1988). "Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea". *EMBO J.* **7**: 1549-1554.

Keys, R.G. (1981). "Cubic convolution interpolation for digital image processing". *IEEE Trans. Acoust Speech, Signal Proc.* **29**: 1153-1160.

Khoo, T.C., D.A. Cowan, R.M. Caniel y H.W. Morgan (1984). "Interactions of calcium and other metal ions with caldolysin, the thermostable proteinase from *Thermus aquaticus* strain T351". *Biochem. J.* **221**: 407-413.

Kido, N., M. Ohta y N. Kato (1990). "Detection of lipopolysaccharides by ethidium bromide staining after dodecil sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis". *J. Bacterio.* **172**: 1145-1147.

Kist, M.L. y R.G.E. Murray (1984). "Components of the regular surface array of *Aquaspirillum serpens* MW5 and their assembly in vitro". *J. Bacteriol.* **157**: 599-606.

Kistler, J., U. Aebi, y E. Kelleberger (1977). "Freeze-drying and shadowing of a two-dimensional periodic specimen". *J. Ultrastruc. Res.* **59**: 76-86.

Kistler, J., U. Aebi, L. Onorato, B. ten Heggeler y M.K. Showe (1978). "Structural changes during the transformation of bacteriophage T4 polyheads: characterization of the initial and final states by freeze-drying and shadowing Fab-fragment-labelled preparations". *J. Mol. Biol.* **126**: 571-589.

Kleffel, B., R.M. Garavito, W. Baumeister y J.P. Rosenbusch (1985). "Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *E. coli* outer membranes". *EMBO J.* **4**: 1589-1592.

Klibanov, A.M. (1983). "Stabilization of enzymes against thermal inactivation", p. 1-26. En *Advances in Applied Microbiology* vol 6. Academic Press. Londres.

Kristjansson, J.K. (1989). "Thermophilic organism as sources of thermostable anzymes". *Trends in Biotechnol.* **7**: 349-353.

Koval, S.F. (1988). "Paracrystalline protein surface arrays on bacteria". *Can. J. Microbiol.* **34**: 407-414.

Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227**:680-685.

Langworthy, T.A. (1977). "Long-chain diglycerol tetraethers from *Thermoplasma acidophila*". *Biochim. Biophys. Acta.* **487**: 37-50.

Langworthy, T.A. y J.L. Pond (1986). "Membranes and lipids of thermophiles". En **Thermophiles: general, molecular, and applied microbiology** (ed. por T.D.Brock). pp 39-74. John Wiley & sons, New York.

Lasa, I., J.R. Castón, L.A. Fernández-Herrero, M.A. de Pedro y J. Berenguer (1992). "Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *Thermus thermophilus* HB8". *Mol. Microbiol.* **6**: 1555-1564.

Leive, L. (1965). "Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**: 290-296.

Lennox, E.X. (1955). "Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1". *Virology* **1**: 190-206.

Lepault, J., B. Dargent, W. Tichelaar, J.P. Rosenbusch, K. Leonard y F. Pattus (1988). "Three-dimensional reconstruction of maltoporin from electron microscopy and image processing". *EMBO J.* **7**: 261-268.

Loginova, L.A.G. y L.A. Egovora. (1975) "An obligately thermophilic bacterium *Thermus ruber* from hot springs in Kamchatka". *Microbiology* **44**: 593-597.

Lortal, S., J. van Heijenoort, K. Gruber y U.B. Sleytr (1992). " S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride". *J. Gen. Microbiol.* **138**: 611-618.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Mandel, M. y A. Higa (1970). "Calcium dependent bacteriophage DNA infection". *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.

Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook (1989). En **Molecular cloning: a laboratory manual** (ed. por N. Ford, C. Nolan y M. Ferguson). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Mescher, M.F. y J.L. Strominger (1976). "Structural (shape-maintaining) role of the cell surface glycoprotein of *Halobacterium salinarium*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**: 2687-2691.

Messner, P., D.Pum., M. Sára, K.O. Stetter y U.B. Sleytr (1986). "Ultrastructure of the cell envelope of the achaeobacteria *Thermoproteus tenax* y *Thermoproteus neutrophilus*". J. Bacteriol. **166**: 1046-1054.

Messner, P. y U.B. Sleytr (1991). "Bacterial surface layers glycoproteins". Glycobiology **1**: 545-551.

Miller, J.H. (1972). En **Experiments in Molecular Genetics**. Cold Spring Harbor Laboratories, New York.

Moffat, B.A. y F.W. Studier (1987). "T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase". Cell **49**: 221-228.

Munster, M.J., A.P. Munster, J.R. Woodrow y R.J. Sharp. (1986). "Isolation and preliminary taxonomic studies of *Thermus* strains isolated from Yellowstone National Park, USA". J. Gen. Microbiol. **132**: 1677-1683.

Nabarro, F.R. y W.F. Harris (1971). "Presence and function of disclinations in surface coats of unicellular organisms". Nature **232**: 423.

Nermut, M.V. y L.D. Williams (1977). "Freeze-fracturing of monolayers (capillary layers) of cells, membranes and viruses: some technical considerations". J. Microsc. **110**: 121-132.

Nermut, M.V., I.D.J. Burdett y L.D. Williams (1978). "Negative staining of freeze-fractured envelopes of *Escherichia coli* K12". J. Microsc. **114**: 229-239.

Nowinski, R.C., M.E. Lostrom, M.R. Tam, M.R. Stone y W.N. Burnette (1979). "The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of murine leukemia viruses". Virology **93**: 11-126.

Ohno, N. y D.C. Morrison (1989). "Lipopolysaccharide interaction with lysozyme". *J. Biol. Chem.* **264**: 4434-4441.

Osborn, M.J. (1966). "Preparation of lipopolysaccharide from mutant strains of *Salmonella*" *Methods Enzymol.* **8**: 161-164.

Oshima, M. y K. Imahori (1974). "Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a non sporulating thermophilic bacterium from a Japanese hot spa". *Int. J. System.* **24**: 102-112.

Oshima, M. y Y. Osawa. (1983). "Outer and inner membrane preparations of extreme thermophile and their physico-chemical properties". *J. Biochem.* **93**: 225-234.

Overbeeke, N., G. van Scharrenburg y B. Lugtenberg (1980). "Antigenic relationships between pore proteins of *Escherichia coli* K12" *Eur. J. Biochem.* **110**: 247-254.

Oyaizu, H., B. Debrunner-Vossbrinck, L. Mandelco, J.A. Studier y C.R. Woese (1987). "The green non-sulfur bacteria: a deep branching in the eubacterial line of descent". *System. Appl. Microbiol.* **9**: 47-53.

Pask-Hughes, R.A. y N. Shaw (1982). "Glycolipids from some extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*". *J. Bacteriol.* **149**: 54-58.

Pask-Hughes, R.A. y R.A.D. Williams. (1977). "Yellow-pigmented strains of *Thermus* sp. from Icelandic hot springs". *J. Gen. Microbiol.* **102**: 375-383.

Pask-Hughes, R.A. y R.A.D. Williams (1978). "Cell envelope components of strains belonging to the genus *Thermus*". *J. Gen. Microbiol.* **107**: 65-72.

Parham, P. (1986). "Preparation and purification of active fragments from mouse monoclonal antibodies". En **Handbook of Experimental Immunology** (ed. por D.M. Weir). pp 14.1-14.22. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Patel B.K.C. (1984). "Extremely thermophilic bacteria in New Zeland hot springs" PhD thesis. University of Waikato. Hamilton.

Perez, G.I. y M.J. Blaser y J.H. Bryner (1986). "Lipopolysaccharides structures of *Campylobacter fetus* are related to heat-stable serogroups". *Infect. Immun* **51**: 209-212.

Peters, J., M. Peters, F. Lottspeich, W. Schäfer y W. Baumeister (1987). "Nucleotide sequence analysis of the gene encoding the *Deinococcus radiodurans* surface protein, derived amino acid sequence and complementary protein chemical studies". *J. Bacteriol.* **169**: 5216-5223.

Prado, A., M.S. da Costa y V.M.C. Madeira (1988). "Effect of growth temperature on the lipid composition of two strains of *Thermus sp.*" *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1653-1660.

Ray, P.H., D.C. White y T.D. Brock (1971). "Effect of growth temperature on the lipid composition of *Thermus aquaticus*". *J. Bacteriol.* **108**: 227-235.

Roberts, K., P.J. Shaw y G.J. Hills (1981). "High-resolution electron microscopy of glycoproteins: the crystalline cell wall of *Lobomonas*" *J. Cell. Sci.* **51**: 295-321.

Rosenbusch, J.P. (1974). "Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.* **249**: 8019-8029.

Rosenbusch, J.P., A.C. Steven, M. Alkan y M. Regenass (1980). "Matrix protein: a periodically arranged pore protein in the outer membrane of *Escherichia coli*". En *Electron Microscopy al molecular dimensions* (ed. por W. Baumeister y W. Vogell). pp 1-10. Springer-Verlag, Berlín, Nueva York.

Saiki, T., R. Kimura y K. Arima (1972). "Isolation and characterization of extremely thermophilic bacteria from hot spring". *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2357-2366.

Sanz, A., B. García-Barreno, M.L. Nogal, E. Viñuela y L. Enjuanes (1985). "Monoclonal antibodies specific for African swine fever virus proteins". *J. Virol.* **54**: 199-206.

Sára, M. y U.B. Sleytr (1987a). "Charge distribution on the S-layer on *Bacillus stearothermophilus* and importance of charged groups for morphogenesis and functions". J. Bacteriol. **169**: 2804-2809.

Sára, M. y U.B. Sleytr (1987b). "Molecular sieving through S-layer of *Bacillus stearothermophilus* strains". J. Bacteriol. **169**: 4092-4098.

Saxton, W.O. y W. Baumeister (1986). "Principles of organization in S-layers". J. Mol. Biol. **187**: 251-253.

Sen, K. y H. Nikaido (1991). "Lipopolysaccharide structure required for in vitro trimerization of *Escherichia coli* OmpF". J. Bacteriol. **173**: 926-928.

Shannon, C.E. (1949). "Communication in the presence of noise". Proc. I.R.E. **37**:10-21.

Shaw, P.J. y G.J. Hills (1982). "Three-dimensional structure of a cell wall glycoprotein". J. Mol. Biol. **162**: 459-471.

Sjögren, A., S. Hövmoller, G. Farrants, H. Ranta, M. Haapasalo, K. Ranta y K. Lounatmaa (1985). "Structures of two different surface layers found in six *Bacteroides* strains". J. Bacteriol. **164**: 1278-1282.

Sjögren, A., D.N. Wang, S. Hövmoller, M. Haapasalo, H. Ranta, E. Kerosuo, H. Jousimies-Somer y K. Lounatmaa (1988). "The three-dimensional structures of the S-layers of two novel *Eubacterium* species isolated from inflammatory human processes". Mol. Microbiol. **2**: 81-87.

Sleytr, U.B. (1976). "Self-assembly of the hexagonally and tetragonally arranged subunits of bacterial surface layers and their reattachment to cell walls". J. Ultrstruct. Res. **55**: 360-377.

Sleytr, U.B. y A.M. Glauert (1982). "Bacterial cell walls and membranes". En *Electron Microscopy of proteins*, vol. 3 (ed. por J. Harris). pp 41-76. Academic Press, London.

Sleytr, U.B. y P. Messner (1983). "Crystalline surface layers on bacteria". *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 311-339.

Sleytr, U.B., P. Messner, P. Schiske, y D. Pum (1982). "Periodic surface structures on prokaryotic cells". *Proc. 10th Int. Congr. Electron Microsc.*, Hamburg, **3**: 1-8.

Spratt, B.G. (1975). "Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 2999-3003.

Stauffer, K.A., A. Hoenger y A. Engel (1992). "Two-dimensional crystals of *Escherichia coli* maltoporin and their interaction with the maltose-binding protein". *J. Mol. Biol.* **223**: 1155-1165.

Stetter, K.O. (1986). "Diversity of extremely thermophilic Archaeobacteria". En **Thermophiles: general, molecular, and applied microbiology** (ed. por T.D.Brock). pp 39-74. John Wiley & sons, New York.

Stetter, K.O. y W. Zillig (1985). En **The bacteria** vol. 8 (ed. por C.R. Woese y R.S. Wolfe). pp 85-170. Academic Press Inc, Orlando.

Steven, A.C., B. ten Heggeler, R. Müller, J. Kistler y J.P. Rosenbusch (1977). "Ultrastructure of a periodic protein layer in the outer membrane of *Escherichia coli*". *J. Cell. Biol.* **72**: 292-301.

Stewart, M. (1988). "Introduction to the computer image processing of electron micrographs of two-dimensionally ordered biological structures". *J. Electron Microsc. Tech.* **9**:301-324.

Studier, F.W. y B.A. Moffat (1986). " Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes". *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.

Sundaram, T.K. (1986). "Physiology and growth of thermophilic bacteria". En **Thermophiles: general, molecular, and applied microbiology** (ed. por T.D.Brock). pp 75-106. John Wiley & Sons. New York.

Tansey, M.R. y T.D. Brock (1972). "The upper temperature limit for eukaritic organisms". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2426-2428.

Tautz, D. y M. Renz (1983). "An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels". *Anal. Biochem.* **132**:14-19.

Thornley, M.J., K.J.I. Thorne y A.M. Glauert (1974). "Detachment and chemical characterization of the regularly arranged subunits from the surface of a *Acinetobacter*". *J. Bacteriol.* **118**: 654-662.

Tsuboi, A., N. Tsukagoshi y S. Udaka (1982). "Reassembly *in vitro* of hexagonal surface arrays in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47". *J. Bacteriol.* **151**:1485-1497.

Uchida, K y S. Mizushima (1987). "A simple method for isolation of lipopolysaccharides for *Pseudomonas aeruginosa* and some other bacterial strains". *Agric. Biol. Chem* **51**:3107-3114.

Valentine, R.C. (1966). "The response of photographic emulsions to electrons". En **Advances in Optical and Electron Microscopy** vol **1** (ed por R. Barer y V.E. Cosslett). pp. 180-203. Academic Press Inc. Ltd., London.

Valentine, R.C. y Wrigley, N.G. (1964). "Graininess in the photographic recording of electron microscope images". *Nature* **203**:713-715.

Vieira, J. y J. Messing (1982). "The pUC plasmids, an M13mpT-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers". *Gene* **19**:259-268.

Voller, A., D.E. Bidwell y A. Bartlett (1976). "Enzyme immunoassays in diagnostic medicine". *Bull. World Health Organ.* **53**:55-65.

Weeks, O.B. (1974). "Genus *Flavobacterium*". En **Bergey's Manual of determinative bacteriology**, 8ª edición (ed. por R.E. Buchanan y N.E. Gibbons). pp 357-364. Williams and Wilkins Company, Baltimore.

Weisburg, W.G., S.J. Giovannoni y C.R. Woese (1989). "The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction". *System. Appl. Microbiol.* **11**: 128-134.

Westphal, O. y K. Jann (1965). "Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure". *Meth. Carbohy. Chem.* **5**: 83-91.

Wildhaber, I. y W. Baumeister (1987). "The cell envelope of *Thermoproteus tenax*: three-dimensional structure of the surface layer and its role in shape maintenance". *EMBO J.* **6**: 1475-1480.

Winter, A.J., E.C. McCoy, C.S. Fuller, K. Burda y P.J. Bier (1978). "Microcapsule of *Campylobacter fetus*: chemical and physical characterization". *Inf. Immun.* **22**: 963-971.

Wittaker, E.T. (1915). "On the functions which are represented by expansion of the interpolation theory". *Proc. Roy. Soc. Edinburg* **A35**:181-194.

Woese, C.R. (1987). "Bacterial evolution". *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

Yamada, H. y S. Mizushima (1980). "Interaction between major outer membrane protein (O-8) and lipopolysaccharide in *Escherichia coli* K-12". *Eur. J. Biochem.* **103**: 209-218.

Yang, L., Z. Pei, S. Fujimoto y M.J. Blaser (1992). "Reattachment of surface array proteins to *Campylobacter fetus* cells". *J. Bacteriol.* **174**: 1258-1267.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors". *Gene* **33**:103-119.

Zillig, W.I., I. Holz, H.-P. Klenk, J. Trent, S. Wunderl, D. Janekovic, E. Imsel y B. Hass (1987). "*Pyrococcus woesei* sp. nov., an ultrathermophilic