

MORT PER CARENCIA DE TIMINA I REGULACIÓ GENÈTICA DE LA SÍNTESI DE PRECURSORS DE L'ADN

per RICARD GUERRERO

Professor Agregat de Microbiologia. Departament de Microbiologia, Facultat de Ciències
i Institut de Biologia Fonamental (Nova Universitat Autònoma de Barcelona)

INTRODUCCIÓ

La timina (5-metil, 2,4-dioxipirimidina), la timidina (1-β-D-2-desoxi-ribofuranosiltimina) i els seus nucleòtids normals (5' mono-, di- i trifosfat de desoxiribosiltimina) presenten la particularitat que llurs ribosil-derivats equivalents no són metabòlits normals de les cèl·lules. La timina és, doncs, l'única base nitrogenada distintiva de l'ADN, i això ha de tenir unes raons evolutives concretes i determinables¹¹. Hi ha, però, excepcions d'aquesta regla quasi universal: l'ADN d'alguns bacteriòfags de *Bacillus subtilis*^{2, 20} té uracil en comptes de timina, i els ARN de transferència¹⁰ tenen alguns monòmers de ribotimina (figura 1).

L'absència al *pool* cel·lular de quantitats significatives de nucleòtids de ribotimina implica que la biosíntesi dels fosfats de la desoxitimidina deu requerir mecanismes particulars, on no participa l'enzim ribonucleòsid-difosfat reductasa, que catalitza la reducció dels quatre difosfats de ribonucleòsid més comuns (ADP, GDP, UDP i CDP) en els 2'-desoxiribosil corresponents.

Ja el 1957, Friedkin i Kornberg descriviren a *Escherichia coli* un enzim, timidilat sintetasa, que catalitzava una metilació del monofosfat desoxiribouracil (dUMP) en el monofosfat de timidina (TMP), dependent de l'àcid tetrahidrofòlic:



* Treball dut a terme al Departament de Bacteriologia de la Universitat de Califòrnia, a Davis.

Durant la transferència, l'unitat d'un carboni és reduïda al grup metil de la timina, i resta dihidrofolat com a segon producte de la reacció. El tetrahidrofolat actua, en conseqüència, tant com a portador de la unitat C_1 com d'agent reductor. La metilació de l'àcid desoxiüridílic ha estat objecte d'una investigació intensiva per FRIEDKIN i col·laboradors⁹

Les lletres cursives sota alguns dels canvis químics dels intermediaris simbolitzen els gens que codifiquen l'enzim que catalitza la reacció, i que han estat localitzats al mapa cromosòmic bacterià. Per a llur denomina-

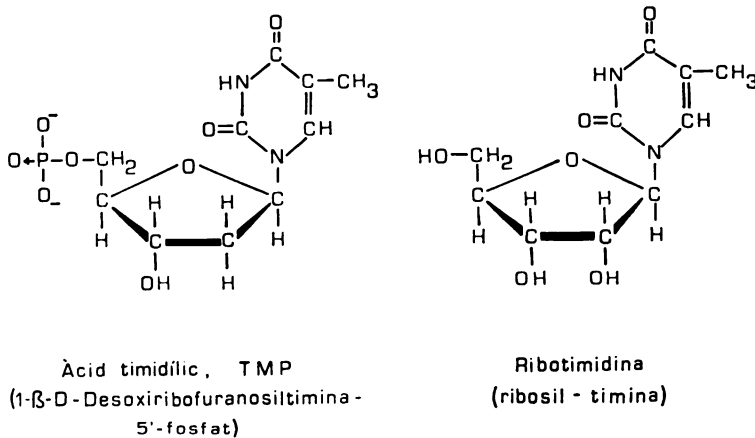


FIG. 1. — A l'esquerra, estructura del nucleòtid de timina que forma part de la cadena de l'ADN per mitjà de la polimerització $5' \rightarrow 3'$ de molècules similars. A la dreta, estructura del nucleòtid de ribosil-timina, que es troba als ARN de transferència

ció hom segueix, com per a la resta de la nomenclatura gènica d'aquest treball, les indicacions de DEMEREC *et al.*⁷

Genètica de la síntesi del monofosfat de timidina

La principal diferenciació entre les vies metabòliques que produeixen els nucleòtids de purina o pirimidina és el moment de síntesi de l'enllaç N-glucosídic. Mentre que en el cas de les purines és establert aviat (i abans de la síntesi de l'anell purínic), en el de les pirimidines cal la prèvia síntesi de l'anell (àcil oròtic) per l'acoblament de la ribosa activada. El procés és controlat a *E. coli* i *Salmonella typhimurium* per sis enzims codificats pels gens *pyrA*, *pyrB*, *pyrC*, *pyrE* i *pyrF*, l'últim dels quals descarboxila l'orotidina 5'-fosfat a àcid uridílic (UMP), el producte central de les pirimidines com a substrats dels àcids nucleics.

Mort per carència de timina

El fenomen de la mort bacteriana per manca de timina (*thymineless death*) és conegut fa temps⁶ a *E. coli*, però encara no ha estat explicat satisfactoriament. Quan soques auxòtrofes per a la timina són privades d'aquest substrat en un medi complet pel que fa als altres nutrients, les cèl·lules comencen a morir en nombre cada vegada més gran. És un fenomen exclusiu de la timina, puix que les soques auxòtrofes per a d'altres substàncies (incloent-hi totes les altres pirimidines i purines, aminoàcids i vitamines) no poden créixer en medis dels quals ha estat retirat el factor en qüestió, però poden recobrar la capacitat de creixement quan hi és afegit de nou. MALOE¹² utilitzà soques auxòtrofes en les quals era possible de bloquejar selectivament i independentment la síntesi d'ADN, o de proteïna o d'ARN, per exemple *E. coli* 15TAU (la qual requereix timina, arginina i uracil). Si les cèl·lules són privades alhora dels tres factors, una fracció important d'elles és immune a la mort per carència de timina. Dit d'una altra manera: sota condicions de síntesi inhibida de proteïna i ARN, alguna part de la població no resulta afectada. Aquesta fracció immune presenta dues característiques importants: 1) si els supervivents són incubats durant un temps curt en un medi complet i després transferits a un altre sense suplement, la majoria són ara sensibles a la mort per carència de timina; i 2) després de tornar al medi complet, la població presenta un grau elevat de sincronia divisional. Aquests foren els experiments capitals¹³ per a afirmar que la síntesi proteica era necessària per a iniciar la nova replicació de l'ADN, però no perquè aquesta continués una vegada iniciada. Hom postulà que la mort per carència de timina era ocasionada per «algun error irreparable durant l'intent de síntesi de l'ADN». Aquesta solució, més aviat semàntica, no ha pogut ésser superada, puix que l'absència de timina solament és letal per a l'ADN que ja es va dividint, i no per les cèl·lules que han interromput la síntesi d'ADN en el punt de començament per la manca de les proteïnes necessàries per a la iniciació.

Localització genètica de la mort per carència de timina

Poc després del descobriment del timidilat sintetasa hom demostrà³ que els dos únics mutants que requerien timina a l'abast en aquell moment, *E. coli* 15 T i *E. coli* B₃, no tenien actiu l'esmentat enzim. En els mutants condicionals sensibles al calor aïllats posteriorment, ha pogut ésser demostrada¹⁶ una disminució de fins el 98-99 % de l'activitat enzimàtica, a temperatura restrictiva (37° C). Bé que han estat citats dos *loci*,

thyA i *thyB*, com a responsables de la auxotròfia per a la timina, és únicament el primer, denominat en l'actualitat *thy* o bé *thyA*, el que codifica la proteïna timidilat sintetasa i determina requeriments alts de timina (uns 10 µg/ml).

El gen *thy* es troba entre les 7 i les 8 hores dels mapes genètics d'*E. coli* i *S. typhimurium*, al minut 55 d'*E. coli* i al 91 de *S. typhimurium*^{17, 19}, i fins ara era l'únic les mutacions del qual originaven auxo-

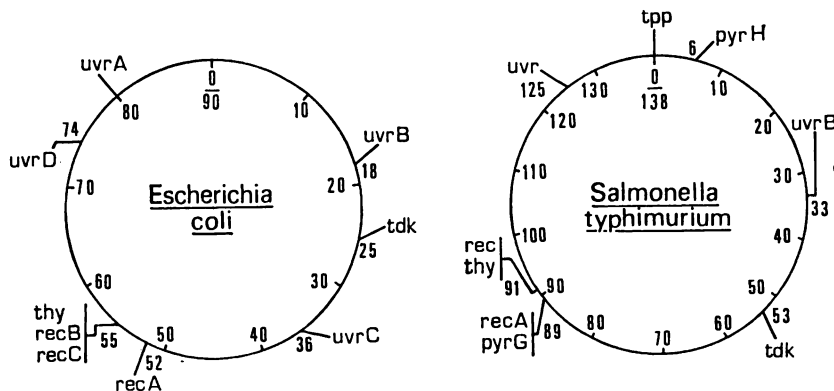


FIG. 3. — Localització aproximada al mapa d'*Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* d'alguns dels loci que controlen les vies metabòliques de síntesi de TMP i d'altres que intervenen directament en la síntesi o reparació de l'ADN. Les xifres indiquen la distància en minuts des de l'origen convencional

tròfia per a quantitats importants de timina; l'absència d'aquestes determinava la mort per carència.

Evidentment, l'aïllament de mutants *thy* no pot tenir lloc per contra-selecció en poblacions mutagenitzades, puix que els mutants també moririen per manca de timina. Aquesta dificultat resultà superada quan hom descobrí que una gran part dels mutants espontanis resistents a l'aminopterina o trimetoprina (antagonistes del folat) amb timina o timidina present en el medi, eren mutants *thy*. Aquests antagonistes són potents inhibidors del dihidrofolat reductasa, enzim que catalitza la formació de tetrahidrofolat a partir de dihidrofolat. El timidilat sintetasa és l'únic enzim, d'entre els que intervenen en reaccions de transferència de C₁, que consumeix (oxidant-lo) tetrahidrofolat. Per tant, l'acció continuada de l'enzim en presència de l'inhibidor esgota ràpidament les disponibilitats de tetrahidrofolat. I com que aquesta substància (o els seus derivats) és necessària en diverses vies metabòliques (iniciació de la síntesi

proteica, biosíntesi de purines, metabolisme d'alguns aminoàcids, entre altres), el tractament amb aminopterina o trimetoprima determina la interrupció de les activitats cel·lulars. Però si al medi hi ha timidina, aquells mutants espontanis amb inactivació del timidilat sintetasa redueixen enormement llur necessitat de tetrahidrofolat, i el dihidrofolat-reductasa (que no sofreix una inhibició total) pot sintetitzar les quantitats catalítiques de tetrahidrofolat requerides per a la resta del metabolisme¹⁵. L'aminopterina —per raons ben allunyades de la genètica bacteriana— ha deixat d'emprar-se, i actualment hom utilitza generalment els medis amb trimetoprima (8 µg/ml) i timidina (20-40 µg/ml) per a l'aïllament de mutants *thy*.

MATERIAL I MÈTODES

Medis de cultiu

Durant els diversos experiments, hom utilitzà un medi mínim de glucosa i sals minerals descrit per CLARK i MAALOE⁵, completament amb els substrats necessaris. Hom emprà, també, Nutrient Broth (Difco) i Nutrient Agar (Difco) com a medis complets, principalment després de la mutagènesi.

Aïllament de mutants thy i soques utilitzades

Plaques amb 40 µg/ml de timidina (Sigma) i 8 µg/ml de trimetoprima (2,4-Diamino-5-[3,4,5-Trimetoxibencil] Pirimidina) (Calbiochem) foren sembrades amb uns 10⁸ bacteris per placa. Després de dos dies foren aïllades les colònies resistents a la trimetoprima, i hom provà llur resistència a la droga i dependència de la timidina. D'aquesta manera hom pot aïllar tant mutants absoluts *thy* (que ho són a qualsevol temperatura) com mutants condicionals (que ho són solament a unes temperatures dites restrictives). Foren aïllats mutants *thy* CS (sensibles al fred, que podien créixer sense timidina a 37° C i 42° C, però no per sota dels 30° C) i *thy* HS (sensibles a la calor, que no poden créixer sense timidina per sobre dels 30° C).

La mutació *thy* aconseguida a *Salmonella typhimurium* LT2 (tipus salvatge) pot ésser passada a qualsevol altra soca per transducció amb diversos bacteriòfags.

En aquests experiments hom emprà les soques indicades a la taula I, pertanyents a la col·lecció del Departament de Bacteriologia de la Universitat de Califòrnia, a Davis.

TAULA I

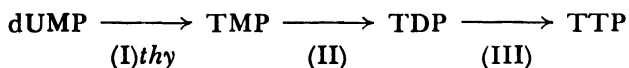
Soques de *S. typhimurium* emprades per a la selecció de mutants *thy* i en loci després de la formació de TMP

Soca núm.	Genotip	Fenotip
JL 1205	<i>pyrC1502, cdd9, cod8, tpp1, udp11, thy1388</i>	Auxòtrof per a l'uracil per damunt de 30° C Auxòtrof per a la timidina a qualsevol temperatura
JL 1233	<i>thy1392</i>	Auxòtrof per a la timidina per damunt dels 30° C. A 30° C i temperatures inferiors, tipus salvatge
LT ₂	Salvatge (LT ₂)	Salvatge

Selecció de mutants defectius en trifosfat de timidina

El procediment de selecció es basava en la tècnica de BONHOEFFER i SCHAEFFER⁴, amb les modificacions adients per a evitar la mort per carència de timina.

El darrers passos metabòlics que condueixen a la síntesi de trifosfat de timidina (TTP) són:



Al pas (I) hom coneix mutants *thy*, i ha estat purificat l'enzim i determinada la seva activitat, tal com ha estat esmentat. Al pas (II) hom coneix l'enzim¹⁴, però no hi han estat citats mutants. Al pas (III) hom no coneix l'activitat de l'hipotètic enzim (timidina 5'-difosfatkinasa), ni hi han estat citats mutants. Prèviament al present treball, en els bacteris no havien estat citats enzims (5'-nucleotidasa) que específicament degradesin qualsevol dels esmentats intermediaris.

El mètode utilitzat per a la selecció és el següent:

1. Incubació en medi mínim 37° C.
2. Mutagènesi amb nitrosoguanidina (Eastman-Kodak) 100 µg/ml, 20 min., en les condicions descrites per ADELBERG i col·lab.¹
3. Expressió fenotípica dels mutants per incubació d'una nit.
4. Incorporació de 5-bromo-desoxiüridina (50 µg/ml), un poderós anàleg de la timidina. Per evitar la mort per carència, hom ha assa-

jat amb èxit l'addició de 2 a 5 $\mu\text{g/ml}$ de timidina. La incorporació de l'anàleg és molt bona en el cas de JL 1205, a causa dels seus marcadors *udp* (no pot degradar la uridina) i *tpp* (vegeu fig. 2).

5. Irradiació amb llum UV d'ona llarga (313 nm). Les cèl·lules que contenen l'anàleg en llur ADN són molt més sensibles que les que hi tenen només timidina. Aquest fet ofereix la possibilitat de seleccionar positivament mutants entre una població amb un gran nombre de cèl·lules salvatges. Temps d'irradiació: 15, 30 i 45 minuts.

6. Extensió en plaques amb medi mínim de la fracció supervivent. Incubació: 36 hores a 30° C.

7. Còpia en plaques (*replica plating*) a 20°, 30° i 37° C.

8. Tria dels mutants condicionals morts per carència de timina.

RESULTATS I CONCLUSIONS

Foren aïllats diversos mutants condicionals a la temperatura, tant HS com CS. Tots ells presentaven el següent fenotip a temperatura restrictiva: 1) no podien créixer àdhuc amb timidina; 2) no solament no creixien sinó que morien, puix que tornats a temperatura permissiva no podien recobrar-se; i 3) els *pools* cel·lulars de TTP eren anormalment baixos (mesurats per mitjà de la cromatografia de capa prima).

Entre el mutants sensibles al fred, un (JL 1301) tenia el fenotip descrit, però les activitats *in vitro* de les seves TMP-cinasa i TDP-cinasa eren similars a la soca mare (JL 1205). L'aparent concentració final quasi nul·la de TTP (vegeu taula II) al mutant és en realitat efecte d'una desaparició dels productes formats, puix que en els primers minuts la síntesi de TDP i TTP té una cinètica enzimàtica semblant (taula II).

Aquesta baixa concentració de TTP i subsegüent mort per carència de timina és produïda per l'activitat d'una TMP 5'-nucleotidasa específica (E.C. 3.1.3.—) que amb la seva activitat supera la capacitat sintètica de la timidina-cinasa i fa decreixer significativament la quantitat de TMP que va cap a l'ADN. El TMP 5'-nucleotidasa és també present a la soca mare, però amb una activitat molt més baixa, i compatible amb la vida normal de les cèl·lules. El temps de generació del mutant a temperatura permissiva és molt més llarg. A temperatura restrictiva n'aturen el creixement i moren.

Aquesta nova mutació, denominada provisionalment *tmf* (mnemotècnica: TMP fosfatasa), pot ésser afegida gràficament a la figura 2, suposant que el TMP és degradat ràpidament a timidina (la qual cosa fou demostrada experimentalment per cromatografia de capa prima, on els extrems de JL 1301 feien aparèixer una taca de timidina a partir del TMP mar-

TAULA II

Activitat enzimàtica dels extrems de *S. typhimurium* JL 1205 (soca original) i JL 1301 (mutant) emprant TMP marcat com a substrat. Les xifres indiquen la radioactivitat (cpm) mesurada sobre cromatogrames

Soca	Temps de reacció	TMP	TDP	TTP	Total	Diferència
JL 1205	0 min.	19500	0	0	19500	0
	5	18175	226	948	19349	151
	10	17559	493	1227	19279	221
	20	15837	894	1674	18405	1095
	40	12935	1400	2073	16408	3092
	80	9925	2218	2224	14367	5133
	120	7148	2728	1758	11634	7866
JL 1301	0 min.	19500	0	0	19500	0
	5	16899	116	488	17503	1997
	10	13223	250	692	14165	5335
	20	10050	518	821	11389	8111
	40	6600	880	816	8296	11204
	80	3623	1004	523	5150	14350
	120	2035	634	174	2843	16657

cat) i té, per tant, un efecte oposat al cinasa de la timidina (codificada per *tdk*, vegeu fig. 2).

La mutació és reversible per transducció amb el bacteriòfag P22(L4) o per reversió espontània. L'activitat de la TMP 5'-nucleotidasa en aquests revertents és la mateixa que a la soca mare. Per contra, quan el *locus thy* és el curat per transducció, les cèl·lules que tenen la nova mutació (*tmf*) encara no poden créixer a temperatura baixa (20° C).

Per tant, una soca amb una activitat normal de la timidilato-sintetasa pot resultar morta per carència de timina en presència d'aquesta. Aquest fenotip pot ésser explicat per una nova mutació que codifica una alta velocitat de degradació del TMP sintetitzat per les cèl·lules.

Agraïments

L'autor agraeix el gran ajut del senyor Enric Herrero i Perpiñán, sobretot pel que fa a la preparació de les figures i a la recerca bibliogràfica.

BIBLIOGRAFIA

1. ADELBERG, E. A., MANDEL, M. i CHEIN CHING CHEN, G.: *Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli K 12*. «Biochem. Biophys. Res. Com. 18: 788-795 (1965).
2. APOSHIAN, H. V., *A dTMPase found after infection of Bacillus subtilis with phage SP5C*. «Biochem. Biophys. Res. Com.», 18: 230-235 (1965).
3. BARNER, H. D. i COHEN, S. S., *Virus-induced acquisition of metabolic function. IV. Thymidilate synthetase in thymine-requiring Escherichia coli infected by T2 and T5 bacteriophages*. «J. Biol. Chem.», 234: 2987-2991 (1959).
4. BONHOEFFER, F. i SHAELEER, H., *A method for selective enrichment of mutants based on the high UV sensitivity of DNA containing 5-BU*. «Biochem. Biophys. Res. Com.», 20: 93-97 (1965).
5. CLARK, D. J. i MAALOE, O., *DNA replication and the division cycle in Escherichia coli*. «J. Mol. Biol.», 23: 99-112 (1967).
6. COHEN, S. S. i BARNER, H. D., *Studies on unbalanced growth in E. coli*. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 40: 885-893 (1954).
7. DEMEREC, M., ADELBERG, E. A., CLARK, A. J. i HARTMAN P. E., *A proposal for an uniform nomenclature in bacterial genetics*. «Genetics», 54: 61-76 (1966).
8. FLEMING, W. H. i BESSMAN, M. J., *The enzymology of virus-infected bacteria. IX. Purification and properties of the deoxycytidilate deaminase of T6-infected Escherichia coli*. «J. Biol. Chem.», 242: 363-371 (1967).
9. FRIEDKIN, M. i KORNBURG, A., *The enzymatic conversion of deoxyuridilic acid to thymidilic acid and the participation of tetrahydrofolic acid*, 609-613. A W. D. McElroy i B. Glass (eds.), *A symposium on the chemical basis of heredity*. John Hopkins Press, Baltimore 1957.
10. HOLLEY, R. W., APGAR, J., EVERETT, G. A., MADISON, J. T., MARQUISSE, M., MERRILL, S. H., PENSWICK, J. R. i ZAMIR, A., *Structure of a ribonucleic acid*. «Science», 147: 1462-1465 (1965).
11. LESK, A. M., *Why does DNA contain thymine and RNA uracil?* «J. Theoret. Biol.», 22: 537-540 (1969).
12. MAALOE, O., *The control of normal DNA replication in bacteria*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26: 45-52 (1961).
13. MAALOE, O. i HANAWALT, P. C., *Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle. I*. «J. Mol. Biol.», 3: 144-155 (1961).
14. NELSON, D. J. i CARTER, C. E., *Purification and characterization of thymidine 5'-monophosphate kinase from Escherichia coli*. «J. Biol. Chem.», 244: 5354-5262 (1969).
15. O'DONOVAN, G. i NEUDHARD, J., *Pyrimidine metabolism in microorganisms*. «Bacteriol. Rev.», 34: 278-343 (1970).
16. ROODMAN, S. T. i GREENBERG, G. R., *A temperature-sensitive thy mutant blocked in the synthesis of thymidilate synthetase*. «J. Biol. Chem.», 246: 2609-2617 (1971).
17. SANDERSON, K. E., *Linkage map of Salmonella typhimurium*. Edition IV. «Bacteriol. Rev.», 36: 558-586 (1972).
18. SCOCCA, J. J., PANNY, S. R. i BESSMAN, M. J., *Studies of deoxycytidilase deaminase from T4-infected Escherichia coli*. «J. Biol. Chem.», 244: 3698-3706 (1969).
19. TAYLOR, A. L. i TROTTER, C. D., *Linkage map of Escherichia coli Strain K-12*. «Bacteriol. Rev.», 36: 504-524 (1972).
20. TOMITA, F. i TAKAHASHI, I., *A novel enzyme, dCTP deaminase, found in Bacillus subtilis infected with phage PBS1*. (Biochem. Biophys. Acta), 179: 18-27 (1969).