

NOVES PERSPECTIVES EN LA RECERCA DEL FACTOR S DE *C. INTERMEDIUM C3*

per J. JOFRE, J. GUINEA i R. PARÉS

Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències.
Universitat de Barcelona

Estudis portats a terme al nostre laboratori estableixen a la soca *Citrobacter intermedium C3* la presència d'un element de tipus episòmic el factor S, que es pot presentar en tres alternatives: integrat al cromosoma bacterià, autònom i absent. Segons el nostre model, condiciona l'excreció de glutamat al medi quan es troba en l'estat integrat (vegeu figura 1) ⁶.

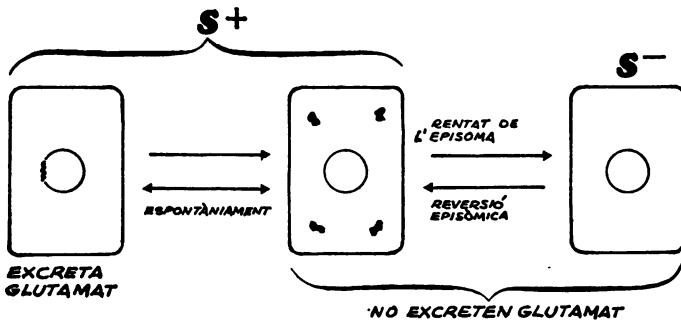


FIG. 1. — Model proposat per al factor S. Presenta tres possibilitats: integració, autonomia, absència. La seva acció sobre l'excreció de glutamat només té lloc quan es troba en l'estat integrat.

Un fet casual ens va proporcionar una via d'investigació que ens ha aportat molta informació nova sobre aquest factor S. A la tasca rutinària de comprovació de soques, després de tractament amb NTG per a l'obtenció de mutants auxotròfics, varem trobar-nos amb la sorpresa

que, en fer l'estudi de l'excreció de glutamat d'unes mutants auxotrófiques per a la prolina, observàrem que cap de les colònies excretava glutamat.

Aquest tipus de mutants va fer que encaminéssim la nostra tasca a la recerca de noves mutants pro^- per tal de veure fins quin punt les peculiars propietats que trobàvem en aquella soca es repetien a totes les mutants pro^- , o bé si, en aquestes mutants que havíem aïllat, hi havia alguna altra mutació responsable d'aquesta manca d'excreció de glutamat i, en cas d'ésser així, fins quin punt i de quina manera devien estar relacionats els *loci* responsables d'aquesta mutació i el *locus pro* i els dos amb el factor S.

Després d'obtingudes unes quantes mutants auxotrófiques per prolina ens trobem amb els tres tipus següents.

El primer tipus és pràcticament idèntic a la soca salvatge de *C. intermedium C3*, almenys pel que es refereix als marcadors genètics que nosaltres utilitzem freqüentment.

El segon tipus és, potser, el més interessant i és el que va fer que ens dediquéssim a l'estudi de les mutants pro^- de *C. intermedium C3*. Són soques mutants per prolina i que mai excreten aminoàcids al medi, mentre que per totes les altres coses són idèntiques a la soca salvatge de

SOQUES	% sg +	O/F	sf	lac
S+(sg+ sg-)	60-70	+/+	+	+
S-(Tipus I)	0	+/-	-	-
S-(Tipus II)	0	+/+	+	+
S+ sg+	99-100	+/+	+	+

FIG. 2. — Propietats més característiques de diferents soques de *C. intermedium C3* segons la situació del factor S (sg=excreció de glutamat; o/F oxidació/fermentació i sf=sensibilitat al bacteriòfag F1; las=fermentació lactosa).

C. intermedium C3, a excepció del temps de generació en medi mínim M1. En iniciar el seu estudi ens va sorprendre molt aquesta semblança, ja que les soques S- (tipus I a la fig. 2) que teníem fins aleshores diferien molt de la *C3* salvatge i, per tant, d'aquesta soca (tipus II a la fig. 2).

Tenint en compte que el model elaborat per al factor S postula que, quant a l'excreció d'aminoàcids, només és actiu quan està integrat i que la seva influència té un lloc al cicle de Krebs a nivell de la iso-

critatdeshidrogenasa², vàrem pensar en quatre possibilitats per a explicar el comportament d'aquestes soques i a la vegada vàrem plantejar tres experiments que havien de donar una solució a la nostra hipòtesi.

1. Que tingués inactivitat el sistema de la glutamat deshidrogenasa, és a dir, que el cicle dels àcids tricarboxílics funcionés igual que a la C₃ salvatge, però que no pogués passar a glutamat des de α -cetoglutarat. En aquest cas, quant al factor S, que és el que a nosaltres ens interessa, serien soques normals. Si observem la fig. 3 es pot veure com creixent

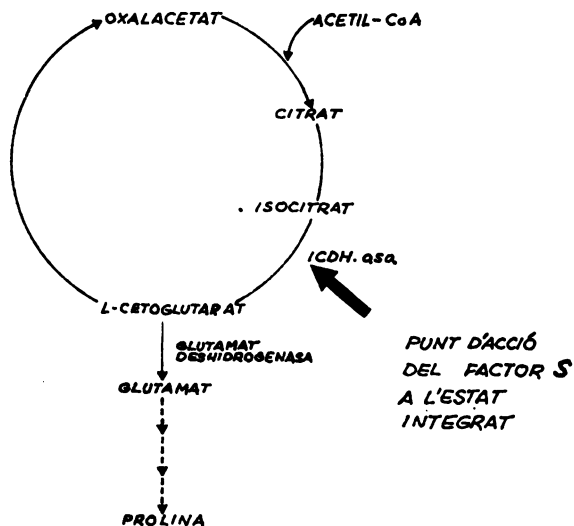


FIG. 3. — Lloc d'acció bioquímica del factor S.

sobre α -cetoglutarat, l'excreció o no de glutamat ens hauria de donar resposta a aquesta primera possibilitat, que queda exclosa en comprovar que un 100% de les colònies excreten glutamat quan creixen sobre α -cetoglutarat com a font de carboni.

2. Que tingués el factor S, però només en estat autònom, comportant-se, doncs, com a plàsmid. Això podria ésser si, juntament amb la mutació per prolina, hi hagués hagut algun canvi a la regió d'homologia on s'integra el factor S i per tant no es pogués integrar. D'ésser així, aquesta soca hauria d'ésser capaç de transferir el factor S a *Para-colobactrum intermedium* ATCC 11606 tal i com ho fa la soca salvatge de C₃². Els resultats de l'experiència esquematitzada a la figura 4 ens indiquen que no hi ha transferència a *P. intermedium*.

3. La tercera possibilitat era que realment en aquestes mutants s'hagués eliminat el factor S i ens trobèssim davant de soques S⁻. Si es trac-

tava d'una soca S⁻ hauria de rebre el factor S d'altres soques de *C. intermedium* C₃ i per tant tornar a adquirir la propietat d'excretar aminoàcids. Amb experiències de transferència, tal i com es pot veure a la figura 4, trobem una freqüència de l'ordre de 10⁻². Tinguérem una

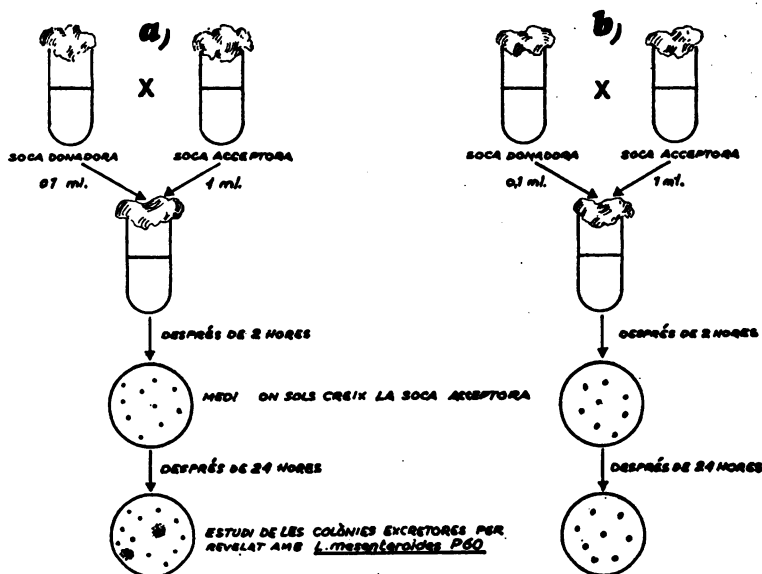


FIG. 4. — Experiències de transferència del factor S.

- a) Utilitzant com a donador una soca S⁺ de *C. intermedium* C₃ i com acceptor la soca 3MA₂.
- b) Com a donador la soca 3MA₂ (pro-) i com acceptor *P. intermedium* ATCC 11606.

nova sorpresa quan en agafar una d'aquestes colònies revertides per a estudiar el seu comportament trobàrem que hi havia un ràpid rentat de la seva capacitat d'excreció (veure fig. 5). Aquest fenomen, que podríem anomenar de reversió abortiva, ens indica que aquestes mutants tenen el sistema responsable de la duplicació del factor S a l'estat autònom danyat. Nosaltres pensem que la DNA-polimerasa pot ésser responsable de la duplicació plasmídica a causa de la proximitat dels *loci pol* (DNA polimerasas) i *pro* al mapa genètic de *E. coli*, encara que se sap que no és l'únic *locus* responsable de l'estabilitat dels episomes a l'estat autònom^{5, 3, 7, 9}. Nosaltres direm a aquest *locus eps* (estabilitat del episoma). Per altra banda, aquest ràpid rentat ens dóna una prova molt contundent d'un *locus* d'integració del factor S molt inestable. Experiències segons l'esquema a de la figura 5 ens permeten calcular la velocitat

mínima de desintegració a aquest *locus*, que vindria a ésser de l'ordre de 5×10^{-2} per cèhula i per generació.

4. Per fi, es podria presentar alguna deficiència al factor S d'aquestes soques de manera que no es manifestés la seva presència ni a elles ni a

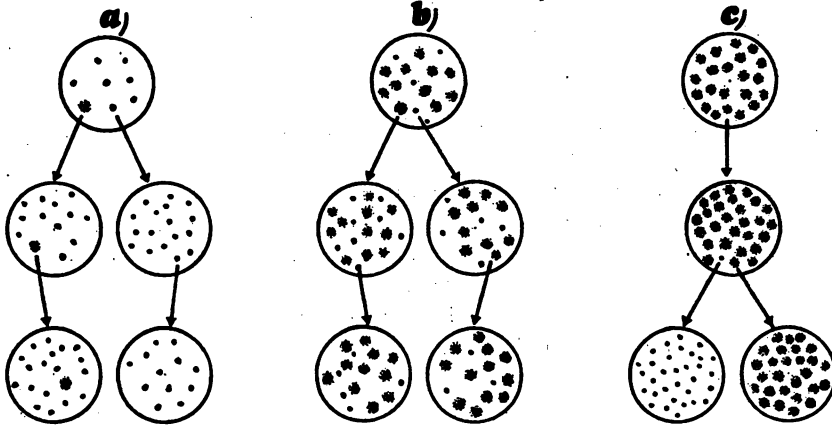


FIG. 5. — Estudi de l'excreció de glutamat a diferents soques de *C. intermedium* C3.

- a) A les soques que presenten reversió abortiva.
- b) A la soca salvatge
- c) A la soca pro- $S^- sg^+$.

P. intermedium en el cas que no hagués perdut la capacitat de transferir-se. Els resultats de l'experiència anterior eliminen aquesta hipòtesi.

El tercer tipus de mutants auxotròfiques per prolina (tipus $S^+ sg^+$ fig. 2) pel que respecta a l'excreció de glutamat presenta pràcticament un 100 % de colònies excretors, o sigui que el factor S es trobaria quasi sempre en l'estat integrat. Com mostra l'esquema c de la figura 5, presenta una petita proporció, que no arriba a l'1 % de colònies no excretors, que tenen la peculiaritat que es mantenen no excretors en un 100 % i que, a més, fenotípicament es comporten igual que les soques s^- que a la figura 2 anomenem de tipus I. Aquest fet ens indica que aquestes soques també deurien tenir lesionat el sistema responsable de l'estabilitat epistèmica al seu estat autònom, i, per altra banda, que deurien tenir el factor S integrat a un *locus* estable diferent de l'esmentat anteriorment. Igualment, segons dades d'experiències del tipus I de la fig. 5, obtenim una velocitat mínima de desintegració de l'ordre de 1×10^{-4} per cèhula i per generació.

L'estudi d'aquestes soques ens aporta unes interessants conclusions que podríem resumir de la següent manera.

Troblem un nou tipus de soques S^- que fenotípicament difereixen molt poc de la soca salvatge de *C. intermedium* C3 i que per tant són molt diferents de les soques S^- que havíem obtingut pels procediments usuals de rentat d'episomes. Cal recalcar, doncs, que tenim dos tipus de S^- perfectament definits i molt diferents, sense que trobem mai els tipus intermedis, cosa que fa pensar que hi deu haver alguna raó perquè això sigui així, la qual de moment ens és desconeguda.

Es confirma la presència de dos *loci* d'integració amb unes freqüències de desintegració definides que tindrien un valor mínim 1×10^{-4} per al *locus* estable i de 5×10^{-3} per a l'instable. Pensem que aquest *locus* estable que hem vist a les soques $pro^-S^+sg^+$ deu ésser el mateix que hom troba a les poblacions enriquides amb elements excretors, ja sigui amb taronja d'acridina o amb estreptomycinina.

Tenim raons per pensar que l'obtenció dels dos tipus de S^- està relacionada amb l'existència d'aquests dos *loci* i que les soques S^- del tipus I, tan diferents de la soca salvatge de C3, s'obtindrien després de desintegració del *locus* estable, el qual alliberaria un veritable factor S'. Les del tipus II serien derivades després de la desintegració del *locus* instable, del qual estudiis pets de la velocitat de canvi $sg^+ \rightarrow sg^-$ indiquen que és el més freqüent en una població normal.

Segons les dades experimentals presentades ací es podria pensar que aquest tipus d'integració estable només es dona després de tractament amb agents químics, ja sigui taronja d'acridina, estreptomycinina o NTG, però el fet que dintre d'una població natural per selecció amb el bacteriòfag F1 es puguin obtenir soques S^- del tipus I ens indica que es troba a les poblacions naturals encara que sigui amb freqüències molt petites. Segurament, el fet que no es seleccionin aquestes formes es deu deure al fet que la integració-desintegració ràpida al *locus* instable té uns clars avantatges adaptatius.

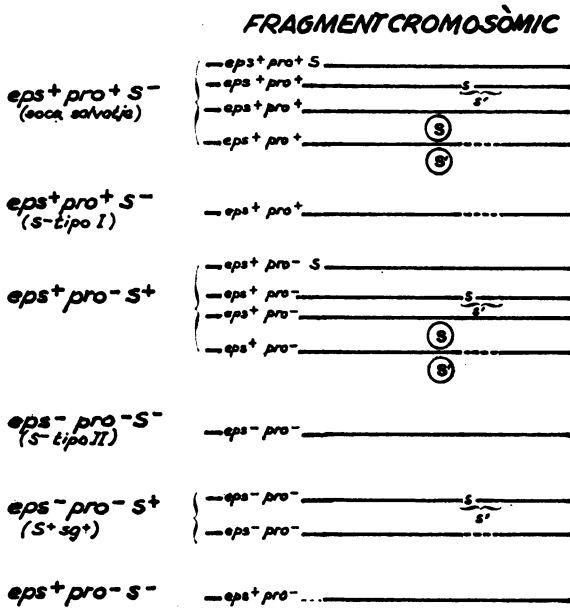
Hi ha algun mecanisme responsable de la duplicació del DNA episòmic a l'estat autònom diferent al responsable de la duplicació del cromosoma i de la duplicació del factor S a l'estat integrat.

Aquest *locus* responsable de la duplicació plasmídica el detectem a la majoria de mutants pro^- , però no a totes, la qual cosa ens indica que aquests dos *loci* presenten un elevat grau de commutació, encara que són independents.

Per altra banda veiem a les experiències de transferència abortiva que el factor S no tragina el sistema responsable de la seva duplicació, fet que també sembla que es dona en els altres plàsmids i episomes, és a dir, que el fet que una soca bacteriana determinada tingui o deixi de

tenir un plàsmid no depèn del fet que hagi tingut l'oportunitat d'adquirir-lo, sinó del fet que sigui capaç de mantindre'l al seu interior.

A manera de resum presentem l'esquema 1, on es poden veure els diferents genotips en allò que es refereix als seus gens *eps*, *pro* i al comportament del factor S a *C. intermedium* C₃.



ESQUEMA I. Genotips que es poden presentar a *C. intermedium* C₃ pel que respecta als loci *eps* (responsables del manteniment del factor S) *pro* i al factor S.

El genotip de C₃ salvatge seria, doncs, *eps*⁺, *pro*⁺, *S*⁺ amb un equilibri precís de formes amb el factor S integrat a dos loci diferents i formes amb el factor S autònom que en algun cas seria un veritable factor S'.

El genotip de les soques *S*⁻ tipus I, seria *eps*⁺, *pro*⁺, *S*'⁻; juntament amb el factor S hauria perdut una part important del cromosoma.

El genotip *eps*⁺, *pro*⁻, *S*⁺ seria en tot semblant a C₃ salvatge excepte pel que es refereix a l'auxotrofia per prolina.

El de les *S*⁻ tipus II, seria *eps*⁻, *pro*⁻, *S*⁻; el factor S l'haurien perdut, pràcticament sol, sense arrossegar una part important del cromosoma.

Finalment, ens trobem amb el genotip de les soques *pro*⁻*S*⁺*sg*⁺ que serien *eps*⁻, *pro*⁻, *S*⁺ amb el factor S integrat a un locus estable i que quan es perd s'emporta un tros important del cromosoma bacterià.

Així, doncs, de totes les possibilitats que es poden presentar respecte a aquests dos loci i el factor S experimentalment, tan sols ens falta per trobar la *eps*⁺, *pro*⁻, *S*⁻. Experiències recents de transferència aco-

plada *Spro* d'elevada freqüència ens fan pensar que el factor S quan s'allibera del *locus* d'integració inestable deu arrossegar quasi sempre el gen *pro*. Aquest fet està d'acord amb el que passa algunes vegades al factor F d'*E. coli*. Aquesta identitat de *locus* d'integració entre el factor F d'*E. coli* i el S de *C. intermedium* podria induir a pensar en el factor S com un factor de sexualitat. De tota manera tenim resultats experimentals que indiquen que el factor S a *C. intermedium* C₃ no és equivalent a les Hfr d'*E. coli*.

BIBLIOGRAFIA

1. BROOKS LOW, K. — *Escherichia coli* K-12 F-Prime Factors, Old and New. «Bacteriological Reviews», 36: 587-607 (1972).
2. GUINEA, J. i PARÉS, R. — *Transferencia interespecífica del factor episòmic que condiciona la segregació de glutamato en C. intermedium C₃*. «Anales de la Estación Experimental Aula Dei». 9: 287-296 (1969).
3. GOEBEL, W. i SCHREMPF, H. — *Replication of the minicircular DNA of E. coli 15 is Dependent on DNA polymerase I but Independent of DNA polymerase III*. «Biochemical and Biophysical (Research Communications)». 49: 591-601 (1972).
4. HERNÁNDEZ, S. — *Segregación de Glutamato en Citrobacter intermedium C₃ como propiedad determinada por la presencia de un factor episòmic*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona (1969).
5. KINGSBURY, D. T. i HELINSKI, D. R. — *DNA polymerase as a requirement for the maintenance of the bacterial plasmid colicinogenic factor E₁*. «Biochemical and Biophysical (Research Communications)». 41: 1538-1544 (1970).
6. PARÉS, R. — *El Factor S de Citrobacter intermedium C₃*. Real Academia de Farmacia de Barcelona. Sesión Inaugural (1973).
7. TAYLOR, A. and TROTTER, C. — *Linkage Map of Escherichia coli Strain K-12*. «Bacteriological Reviews». 36: 504-524 (1972).
8. URGELL, J. — *Drenaje del ciclo del ácido cítrico por efecto de un factor episòmic*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona (1970).
9. YAMAGATA, H. and UCHIDA, H. — *Chromosomal Mutations affecting the Stability of Sex-Factors in Escherichia coli*. «Journal of Molecular Biology». 73: 281-294 (1972).

DISCUSSIÓ

DOMINGO. — Quin és el control de seguretat de la puresa de cultiu?; es fa contínuament?

JOFRE. — Treballem sempre amb soques marcades per un parell de marcador cromosòmics.

PARÉS. — La manera absolutament crítica és marcar amb dos o tres marcadors cromosòmics les soques que s'utilitzen. No es pot pensar que tots tres mutin simultàniament al normal.

Potser seria interessant afegir que el factor S, quan està col·locat en el *locus* més estable, en separar-se'n s'emporta un tros gros de cromosoma; segons els estudis de Prieto, es troba, a més a més, una alteració en la proporció de bases. C/G.

JOFRE. — Varia de 56 a 46.

PARÉS. — Hi ha evidències de transducció fàgica en el factor S.

JOFRE. — Això ho trobo molt optimista.