

EXPRESSION INDEPENDENT DE LES FUNCIONS CONTROLADES PEL SISTEMA DE REPARACIÓ D'EMERGÈNCIA A *SALMONELLA TYPHIMURIUM* *

per

JORDI BARBÉ i RICARD GUERRERO

Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències i Institut de Biologia Fonamental.
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.

SUMMARY

We have studied the expression of two of the SOS functions, namely inhibition of respiration and induction of prophages, in a mutant of Salmonella typhimurium which presents a higher resistance to ultraviolet radiation and bleomycin treatment than the parent strain. The results obtained show that this resistance is due to the fact that, after UV-irradiation or bleomycin exposure, the mutant strain presents a lower inhibition of cell respiration, measured by sodium dodecyl sulfate sensitivity of the culture and ATP production of the cells. Nevertheless, both strains show a similar level of prophage induction by the effect of UV-radiation or thymine starvation. Hence, we can conclude that in Salmonella typhimurium two SOS mediated functions, inhibition of respiration and induction of prophages, can be expressed independently, and that, as a consequence, the bacterial SOS repair system presents a differential induction and expression.

INTRODUCCIÓ

El tractament d'un cultiu del bacteri *Escherichia coli* amb agents que interfereixen la replicació normal de l'ADN (com ara la radiació ultraviolada, carència de timina, bleomicina, etc.) origina la inducció d'un conjunt de funcions, denominat sistema de reparació d'emergència, o sistema SOS, destinades a garantir la supervivència cel·lular. La manifestació d'aquestes funcions depèn dels gens *recA* i *lexA* (GUDAS i PARDEE, 1975), així com d'una certa degradació de l'ADN afectat en la seva replicació (CROWL *et al.*, 1978). Les principals funcions que es desencade-

* Article basat en la comunicació presentada a la Sessió Ordinària del 25 de gener de 1979.

nen en aquestes condicions són: la inducció de pròfags, la inhibició de la divisió, la inhibició reversible de la respiració cel·lular i un important augment en la freqüència de mutagènesi.

Diferents teories (GUDAS i PARDEE, 1975; WITKIN, 1976) han tractat d'explicar el procés pel qual es desenvolupa l'expressió del sistema SOS. Recentment, BAILONE *et al.* (1979) han proposat una hipòtesi basada en els treballs de MORAND *et al.* (1977) sobre l'estructura del producte del gen *recA* (anomenat proteïna X); aquesta teoria contempla el fet que una part de les funcions regulades pel gen *recA* (funcions recombinatòries i de reparació prereplicativa de l'ADN) són constitutives, mentre que una altra part (funcions dependents del sistema SOS) són induïbles. Segons aquests autors, la proteïna X té una zona funcional, regió A, que actua com a estabilitzadora de les regions d'ADN de cadena senzilla que es formen en els processos de reparació constitutiva i de recombinació. En aquesta proteïna hi ha també una altra zona, regió B, que té activitat proteàsica sobre una sèrie de repressors gènics, degradant-los i permetent l'expressió de les funcions induïbles SOS. En condicions normals, la proteïna X forma amb el producte de *lexA*, un complex que reprimeix la transcripció del gen *recA*, a la vegada que inactiva la regió B de la proteïna X. Això determinaria que el nivell d'aquesta darrera proteïna fos molt baix, si bé n'hi ha la quantitat suficient perquè la regió A pugui portar a terme les seves funcions constitutives. D'aquesta forma, quan es produeix una alteració estructural en l'ADN, tot impedit la replicació normal d'aquest (fig. 1), la proteïna *recA* acomplexada es combina amb un efector (probablement algun producte de degradació de l'ADN), i es produeix un canvi allostèric i s'origina una nova conformació (proteïna *recAa*). Aquesta proteïna *recAa* tindria poca afinitat pel producte *lexA*, la qual cosa comporta la dissociació del complex *recAa-lexA*. El següent pas és l'activació de l'activitat proteàsica de la proteïna *recAa*, probablement per la interacció amb aquesta d'alguna molècula d'ATP (ROBERTS *et al.*, 1978); aquest procés està controlat negativament per l'acció del producte del gen *infA*. En aquest context, el fenotip dels mutants *lexA* s'explicaria tot considerant que el producte gènic corresponent formaria amb la proteïna X un complex no induïble. En qualsevol cas, aquest model no explica satisfactòriament la seqüència de fets necessària per a l'expressió de totes les diferents funcions SOS.

En aquest punt, cal dir que si bé ha estat en *Escherichia coli* on s'ha estudiat més a fons les funcions SOS, aquest sistema també es troba en altres gèneres, com ara *Salmonella* (TOKUNO i GOUGH 1978), *Proteus* (HOFEMEISTER, 1977) i *Bacillus* (YASBIN, 1977).

En el present treball, s'ha estudiat un mutant de *Salmonella typhimurium* que és incapaç de portar a terme la inhibició de la respiració

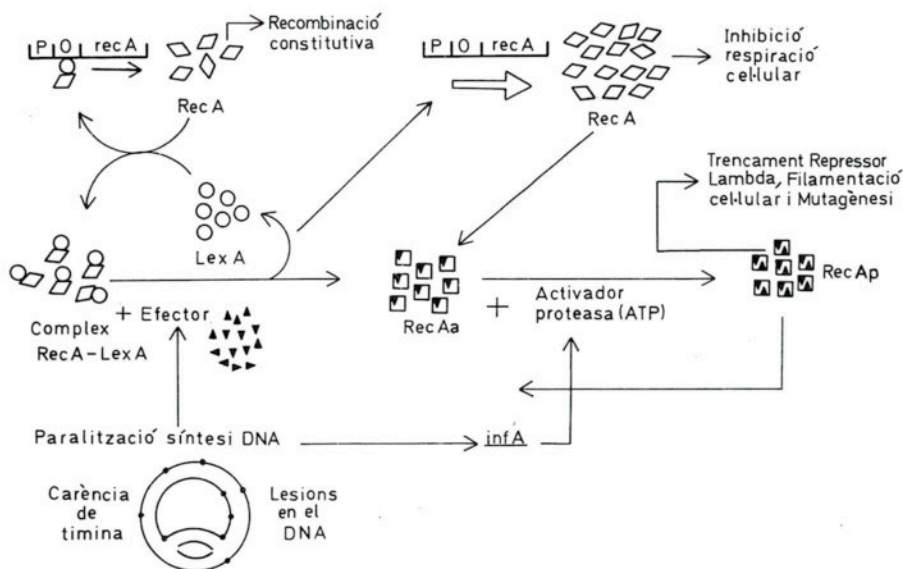


FIG. 1.— Model per a l'expressió de les diferents funcions del sistema SOS en *Escherichia coli* mitjançant l'activació de la proteïna *recA*. *recAa* correspon a la forma activada d'aquesta proteïna, essent *recAp* la seva forma proteolítica. Vegeu l'explicació en el text. (Modificat de BAILONE *et al.*, 1979.)

cel·lular quan es tracta amb agents inductors del sistema SOS, els quals, al contrari, desencadenen en el mateix mutant altres processos de l'esmentat sistema, com per exemple la inducció de pròfags. Aquest fet ens permet afirmar que la inducció del sistema SOS no és un fenomen a tot o res, i que les seves funcions poden expressar-se diferencialment.

MATERIAL I MÈTODES

Soques bacterianes i medis de cultiu i de dilució utilitzats

Les soques de *Salmonella typhimurium* utilitzades es recullen en la taula 1. Com a medi ric de cultiu s'utilitzà LB, el qual té la següent composició per litre d'aigua destil·lada: 10 g de triptona, 10 g de NaCl i 5 g d'extracte de llevat. La composició del medi mínim AB, per litre, és: 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 3 g de NaCl, 4 g de MgCl_2 , 11 mg de CaCl_2 , 11 mg de Na_2SO_4 i 0,8 mg de FeCl_3 ; la font de carboni fou glucosa (0,2 % p/v); els nucleòsids s'afegiren a una concentració final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El medi sòlid fou preparat afegint agar (1,5 %) al medi de cultiu líquid. La concentració d'agar dels tubs utilitzats per al recompte

de bacteriòfags fou del 0,5 %. Les dilucions, tant dels bacteris com dels bacteriòfags, s'efectuaren en dissolució salina Ringer 1/4.

Sensibilitat bacteriana a la radiació ultraviolada

Es partí d'un cultiu bacterià que creixia en medi ric LB o mínim AB fins arribar a la fase exponencial, amb una concentració aproximada de 2.3×10^8 unitats formadores de colònies per mil·lilitre (cfu/ml). En aquest punt es prengueren 10 ml i es rentaren per centrifugació a $5.000 \times g$ durant 10 minuts, resuspenent tot seguit el sediment en el mateix volum de dissolució Ringer. A continuació es posaren 4 ml d'aquesta suspensió en una placa de Petri de vidre i s'irradiaren a diferents temps amb un tub germicida Sylvania G1578 de baixa pressió a una dosi constant ($0,5 \text{ Jm}^{-2}$) fixada prèviament amb un dosímetre Latarjet.

Als temps desitjats es prengueren mostres i després de fer les dilucions adients se sembraren en plaques d'agar mínim suplementades amb els requeriments corresponents per a cada cas, incubant seguidament a 37°C durant dos dies.

Determinació de la inhibició de la respiració en bacteris

La inhibició de la respiració d'un cultiu bacterià pot ésser determinada tractant aquest cultiu amb detergents, com el dodecil sulfat de sodi (SDS) o Triton $\times 100$ (SWENSON i SCHELEY, 1974); aquests detergents provoquen la lisi de les cèl·lules en les quals la respiració ha cessat. Aquest fenomen es detecta a nivell poblacional per un descens en la densitat òptica (absorbència) del cultiu. En el nostre cas s'ha estudiat l'efecte de la radiació ultraviolada i de la bleomicina sobre la respiració cel·lular.

A) Radiació ultraviolada

Les soques bacterianes foren incubades en diferents medis de cultiu (LB i AB), suplementats amb els requeriments necessaris, fins arribar a una concentració de 2.3×10^8 cfu/ml. En aquest punt es prengueren 20 ml del cultiu i se centrifugaren a $10.000 \times g$ durant 5 minuts, resuspenent el sediment en el mateix volum del medi AB. La suspensió bacteriana fou dipositada en una placa de Petri de vidre de 20 cm de diàmetre i s'irradià a la dosi desitjada. Immediatament després, es filtraren els 20 ml

amb un filtre de membrana de 0,45 μm de porus, ressuspenent aquest filtre en 20 ml del mateix medi que s'havia utilitzat prèviament per al creixement dels bacteris. A continuació, es dividí el volum en dues parts iguals, les quals es col·locaren en dos flascons; un d'ells es tenia com a control, en l'altre s'afegia SDS a la concentració adient, incubant tot seguit els dos a 37° C amb agitació. Periòdicament es pregueren mostres per a la determinació de les variacions de l'absorbència dels cultius.

B) *Bleomicina*

Es partí d'un cultiu de les diferents soques en medi ric LB suplementat amb timidina. Quan la població bacteriana arribà a una concentració de 2.3×10^8 cfu/ml es prengueren dues al·lòtques de 15 ml i es filtraren paral·lelament sobre filtres de membrana Millipore de 0,45 μm de porus. Seguidament, es ressuspengueren els filtres en dos flascons amb 15 ml de medi LB més timidina, bleomicina a la concentració desitjada i SDS en un d'ells, tot mantenint l'altre com a control. A continuació s'incubaren a 37° C amb agitació i s'anaven prenent mostres periòdicament per determinar l'evolució de l'absorbència del cultiu.

Càlcul de la concentració d'ATP

Extracció de l'ATP. — Per al càlcul de la concentració d'ATP es prenen 2 ml de cultiu bacterià, congelant-se tot seguit a — 20 °C. Fou de gran importància efectuar aquesta operació amb la màxima rapidesa per evitar la degradació de l'ATP, ja que aquest és un nucleòtid molt làbil. L'extracció de l'ATP es realitzà afegint als 2 ml de la mostra, prèviament descongelada, 6 ml d'amortidor Tris-clorhídric, 25 mM a pH 7,5 en ebullició, deixant a continuació la mostra a 95° C durant 3 minuts.

Quantificació de la concentració d'ATP. — L'ATP extret pot quantificar-se mitjançant la reacció de bioluminiscència que produeix el complex enzimàtic luciferina-luciferasa, el qual reacciona amb aquest nucleòtid en presència de Mg^{2+} i oxigen molecular, i dóna lloc a un fotó per cada molècula d'ATP consumida, a pH neutre o alcalí. El complex enzimàtic es preparà a partir d'un extracte liofilitzat de luciferina-luciferasa (Sigma Chemical Co.), al qual s'afegiren 12,5 ml d'aigua destil·lada, 7,5 ml d'amortidor arseniat 0,1 M, pH 7,75, i 5 ml de sulfat magnèsic 0,005 M, pH 7,75. Aquesta solució fou incubada durant 6-7 hores a 23-28 °C, per eliminar l'ATP endogen de l'extracte i d'aquesta forma reduir l'activitat espontània de l'enzim. A continuació, se centrifugà a $20.000 \times g$ durant 5 minuts, i

el sobrenedant recollit es conservà sempre, a partir d'aquest moment, a 4° C. La mesura de les mostres es realitzà col·locant-ne 1 ml en un vial de vidre al qual s'havia afegit 0,5 ml de Tris-clorhídric 25 mM, a pH 7,5, per amortir la reacció, i s'insertà immediatament en la cadena d'un comptador de radiactivitat Nuclear Chicago Unilux. Tot seguit s'afegí, a cada vial, exactament 0,5 ml de la solució enzimàtica, s'agità suaument, i després de 30 segons des de l'injecció de l'enzim es comptà durant 20 segons. Parallelament, es féu una corba patró d'ATP amb un marge de concentracions entre 0,2 i 100 ng/ml. Aquesta corba patró s'efectuà en el mateix medi en el qual es trobaven les mostres.

Inducció del pròfag Z1

A) *Inducció espontània.* — Es partia d'un cultiu de les soques lisogèniques en medi mínim AB més els requeriments necessaris a 37° C. A diferents temps es prengué 1 ml i se centrifugà a 8000×g durant 5 minuts; posteriorment es recollí el sobrenedant i es calculà la concentració de fags presents, utilitzant com a soca indicadora *Salmonella typhimurium* UA1.

B) *Inducció per la radiació ultraviolada.* — Es prengueren 10 ml d'un cultiu exponencial de les soques lisogèniques en medi AB amb els suplementes adients, centrifugant-los a 8000×g durant 5 minuts. El sediment fou ressuspès en 5 ml de solució salina Ringer. Després d'ésser irradiats amb llum ultraviolada a la dosi adequada, es filtraren (0,45 µm), ressuspensent el filtre en el mateix medi en el qual havien crescut prèviament els bacteris, i s'incubaren a continuació a 37° C amb agitació. Periòdicament es determinà la concentració de bacteriòfags, com s'ha comentat anteriorment.

C) *Inducció per carència de timidina.* — D'un cultiu de les soques lisogèniques en fase exponencial, en medi AB amb glucosa, uracil i timidina a 37° C, se'n prengueren 40 ml, filtrats i ressuspesos a continuació en 40 ml del mateix medi però sense timidina. A diferents temps, es prengueren mostres per tal de calcular la concentració de partícules fàgiques. Després d'una hora, s'afegí timidina al cultiu a una concentració de 20 µg/ml i es continuaren prenent mostres al llarg del temps.

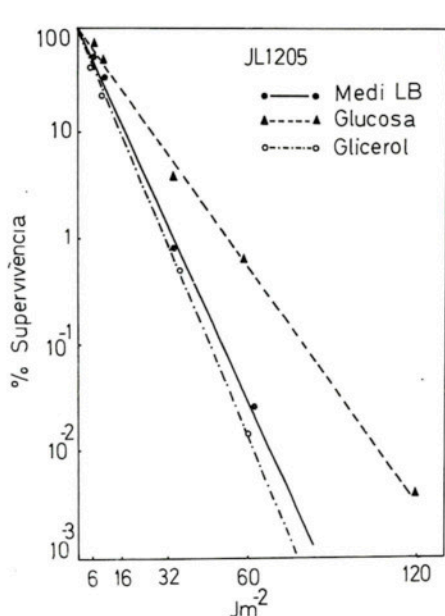


FIG. 2. — Sensibilitat de *Salmonella typhimurium* JL1205 multiplicada en diferents medis de cultiu prèviament a la irradiació amb llum ultraviolada. Es representa el percentatge de supervivència en funció de la dosi d'irradiació.

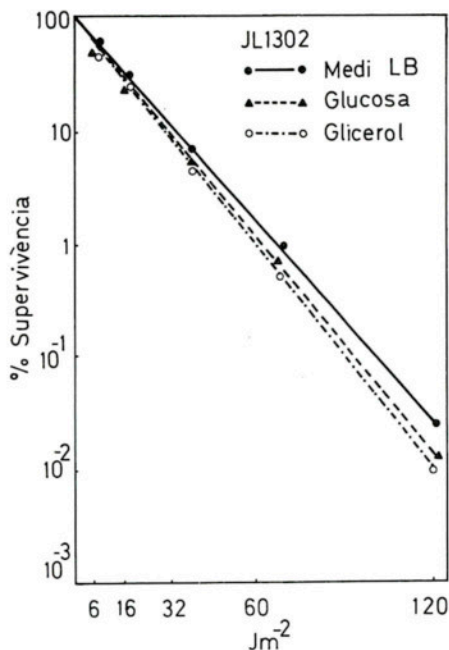


FIG. 3. — Sensibilitat de *Salmonella typhimurium* JL1302 multiplicada en diferents medis de cultiu prèviament a la irradiació amb llum ultraviolada. Es representa el percentatge de supervivència en funció de la dosi d'irradiació.

RESULTATS

En les figures 2 i 3 es recullen les cinètiques d'inactivació per la radiació ultraviolada del mutant *S. typhimurium* JL1302, així com de la soca paterna JL1205, multiplicades prèviament les dues en medi mínim AB amb glucosa o glicerol i en medi LB. En primer lloc, es pot apreciar com la sensibilitat de la soca JL1205 a la radiació ultraviolada no és la mateixa en tots els medis de cultiu. Així, aquesta soca és més resistent a la irradiació quan creix en medi mínim amb glucosa que si ha crescut en medi LB o en medi AB amb glicerol. Aquestes dades concorden amb les obtingudes per SWENSON i SCHENLEY (1970) en *E. coli* B/r, en el sentit que el nivell de resistència a la radiació ultraviolada està influenciat pel medi en el qual prèviament s'han desenvolupat les cèl·lules irradiades. Al contrari, el mutant JL1302 presenta uns nivells de resistència molt similars en els tres medis de cultiu, essent aquest nivell superior en tots els casos al qual s'observa en la soca paterna JL1205.

Com que el mutant JL1302 presenta nivells similars de resistència a la llum ultraviolada independentment del medi en el qual s'hagués desenvolupat, i ja que aquest fenomen, que pertany al sistema de reparació SOS, està influenciat per les condicions de creixement anteriors a la irradiació (SWENSON, 1976), es cregué oportú estudiar la influència de la radiació ultraviolada sobre la inhibició de la respiració cel·lular de l'esmentat mutant. La inhibició de la respiració en les cèl·lules irradiades pot detectar-se tractant el cultiu amb els detergents Triton \times 100 o SDS. Aquests detergents, a concentracions baixes, tenen poca influència sobre el creixement bacterià, però si s'inhibeix la respiració cel·lular amb KCN i s'afegeix posteriorment SDS, les cèl·lules es tornen sensibles al detergent, i això determina un fort descens en l'absorbència del cultiu (figura 4). Hom no coneix amb exactitud les causes per les quals es produeix aquesta vulnerabilitat de la membrana plasmàtica de les cèl·lules que no respiren, si bé alguns autors (SWENSON, 1976) creuen que pot ésser deguda a un canvi en l'orientació dels enzims respiratoris en la membrana. En qualsevol cas, la radiació ultraviolada no produeix cap tipus de lesió directa en la membrana, ja que mutants *recA* i *lexA* (gens dels quals depèn l'expressió del conjunt de funcions SOS) d'*E. coli* no aturen la seva respiració després d'ésser irradiats i, en conseqüència, no experimenten cap descens en l'absorbència del cultiu en ésser tractats amb detergents.

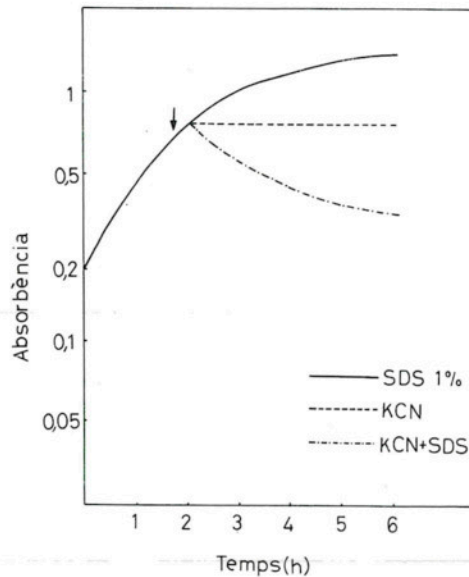


FIG. 4. — Influència del SDS sobre *Salmonella typhimurium* UA1. Un cultiu en medi LB es dividí en tres parts, afegint respectivament a cada una SDS a l'1%, KCN (0,01M) i els dos productes a la vegada.

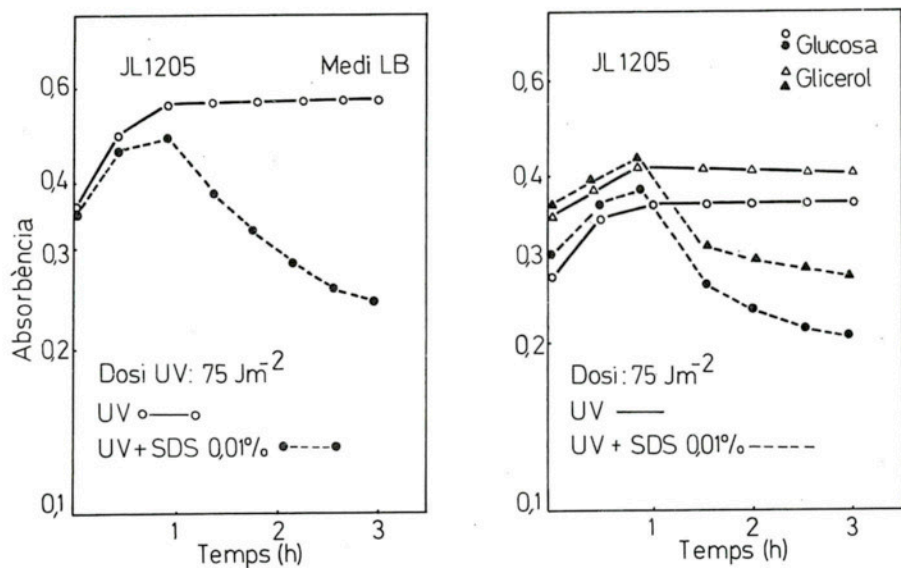


FIG. 5.— Efecte del SDS sobre l'absorbència de tres cultius de *Salmonella typhimurium* JL1205 en els medis LB i AB més glucosa o glicerol, després d'haver estat irradiats amb llum ultraviolada a una dosi de 75 Jm^{-2} .

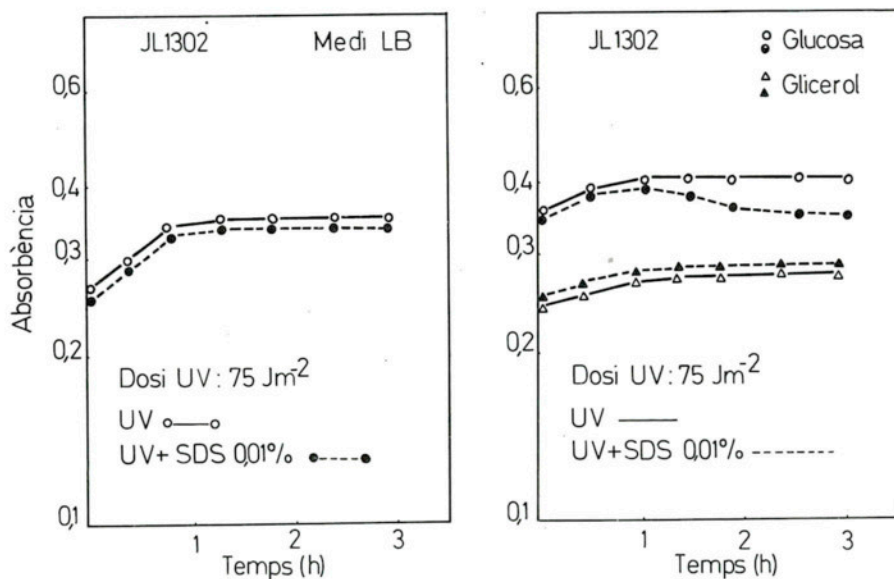


FIG. 6.— Efecte del SDS sobre l'absorbència de tres cultius de *Salmonella typhimurium* JL1302 en els medis LB i AB, més glucosa o glicerol, després d'haver estat irradiats amb llum ultraviolada a una dosi de 75 Jm^{-2} .

Els resultats obtinguts en el nostre cas es troben en les figures 5 i 6. S'hi aprecia que amb la soca JL1205, independentment del medi de cultiu, es dona creixement fins aproximadament una hora després de la irradiació; en aquest moment s'atura el creixement en el cultiu sense detergent, mentre que el cultiu tractat amb SDS experimenta un descens en la seva absorbència, que arriba fins un 50 % passades tres hores. Contràriament, el mutant JL1302, si bé atura el seu creixement al mateix temps, no experimenta pràcticament cap descens en l'absorbència del cultiu tractat amb SDS. De tot això podem deduir que la soca JL1302 presenta després de la irradiació una inhibició de la respiració considerablement inferior a la de la soca paterna.

En funció dels resultats exposats suara, es va creure oportú d'estudiar la variació de la concentració del nucleòtid ATP durant el creixement de les poblacions irradiades. Amb aquesta finalitat, s'irradiaren dos cultius exponencials de les soques JL1205 i JL1302 multiplicades prèviament en medi LB més els suplementes adequats. Tot seguit, es col·locaren els cultius a 37° C en el mateix medi i es prengueren mostres periòdicament per a la determinació de l'absorbència del cultiu, així com per al càlcul de la concentració cel·lular d'ATP. Els resultats obtinguts, expressats com a quantitat d'ATP per unitat d'absorbència a 550 nm, es recullen en la figura 7. En aquesta figura hom pot observar que les dues soques presenten un important augment en la concentració d'ATP durant la primera mitja hora després de la irradiació; passat aquest temps, la concentració d'ATP baixa considerablement, fins arribar a un 40 % del nivell inicial en JL1205, mentre que en la soca JL1302 el descens és molt petit. El comportament de JL1205 pot explicar-se pel fet que, després de la irradiació, les cèl·lules bacterianes han de reparar l'ADN afectat, la qual cosa comporta irremediament una important despesa d'ATP, tant perquè és la font de l'adenosina monofosfat com perquè és el donador d'energia per a la polimerització de tots els nucleòtids. Aquest fet va acompanyat per una important inhibició de la respiració cel·lular en JL1205, la qual cosa provoca que el nivell d'ATP d'aquesta soca baixi considerablement. Això, lligat al que s'ha exposat anteriorment, origina una considerable disminució en el nivell d'ATP d'aquesta soca. Contràriament, la soca JL1302 té una inhibició de la respiració cel·lular molt més petita, i això li permet continuar sintetitzant ATP, i en conseqüència mantenir pràcticament constant la seva concentració després de l'important augment inicial.

Amb la finalitat de corroborar els resultats exposats fins ara, es cregué oportú d'estudiar el comportament del mutant i de la soca paterna quan les dues són tractades amb un altre agent capaç d'induir les funcions SOS. L'agent escollit fou la bleomicina. Aquest compost és un antibiòtic glucopeptídic produït per *Streptomyces verticillus* i que posseeix activi-

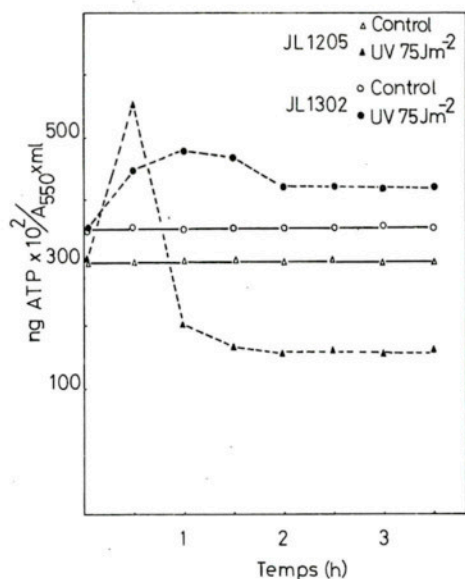


FIG. 7.— Evolució al llarg del temps de la concentració d'ATP per unitat d'absorbència de dos cultius en medi LB de *Salmonella typhimurium* JL1205 i JL1302 irradiats amb llum ultraviolada a una dosi de 75 Jm⁻². Les línies contínues representen els mateixos paràmetres per a dos cultius no irradiats d'aquestes soques.

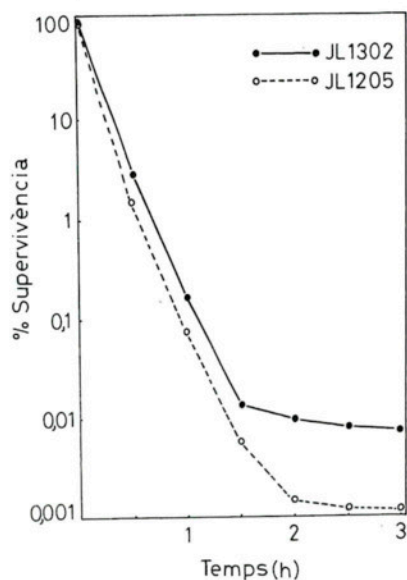


FIG. 8.— Evolució de la concentració de cèl·lules viables de dos cultius de *Salmonella typhimurium* JL1302 i JL1205 en medi mínim AB més glucosa, timidina i uracil en ésser tractats amb bleomicina a una concentració final de 20 µg/ml.

tat antitumoral. L'efecte de la bleomicina sobre les cèl·lules bacterianes consisteix en la producció de trencaments en una de les dues cadenes del genòfor bacterià, efecte que origina l'alliberament de l'ADN associat a la membrana i la seva consegüent degradació. Sembla ésser que aquests trencaments no es produeixen a l'atzar, sinó que es localitzen fonamentalment en seqüències GC i GT de la mateixa cadena del genòfor (TAKESHITA *et al.*, 1978), i en menor proporció en regions TA. En el nostre cas, es partia d'un cultiu de JL1205 o JL1302 en medi mínim més glucosa i els suplementes adients. En arribar a la fase exponencial, el cultiu fou dividit en dues alíquotes a les quals s'afegí bleomicina, i a una d'elles, però a l'altra no, se li administrà SDS amb la finalitat d'estudiar l'evolució de la respiració cel·lular del cultiu. Tot seguit, s'incubaren els cultius a 37° C amb agitació i es determinà periòdicament l'absorbència i la concentració de cèl·lules viables. En la figura 8 es pot comprovar com la soca JL1302 posseeix una major resistència a la bleomicina que la JL1205, tant en les dues primeres hores d'actuació de l'antibiòtic, en les quals es posa de manifest un pendent més elevat, com després d'aquest temps, quan es produeix una atenuació del pendent. Aquestes dades

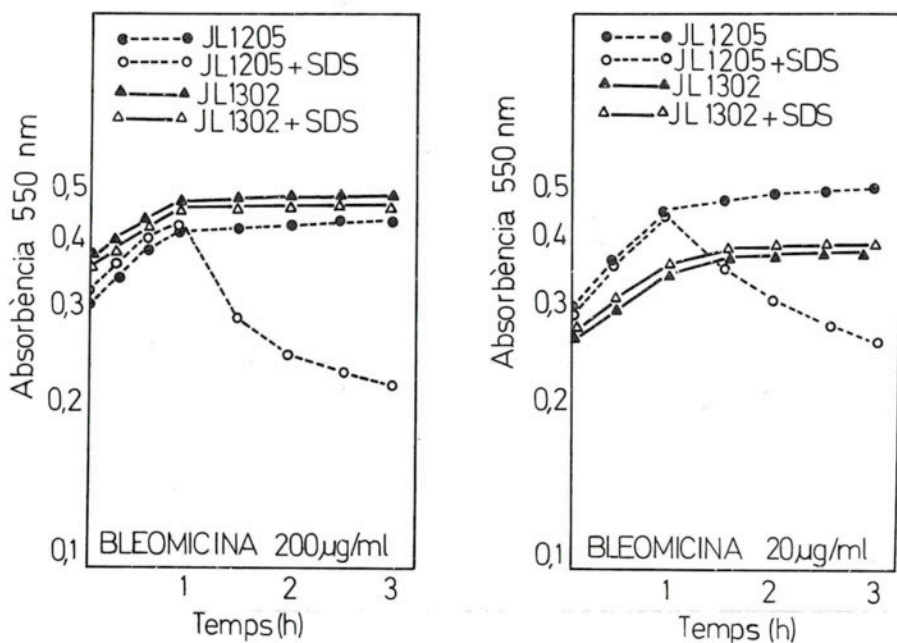


FIG. 9. — Efecte de la bleomicina (20 µg/ml i 200 µg/ml) sobre la respiració cel·lular de les soques JL1302 i JL1205 de *Salmonella typhimurium*.

concorden amb els resultats expressats en la figura 9, en la qual es mostra com el mutant experimenta una inhibició considerablement menor de la respiració en comparació amb la soca paterna, havent estat tractades les dues amb bleomicina a unes concentracions de 20 µg i 200 µg/ml.

La inhibició de la respiració cel·lular originada en impedir la replicació normal de l'ADN és, com ja s'ha comentat, una funció de l'anomenat sistema de reparació SOS. A causa de la manca de manifestació d'aquesta funció en el mutant JL1302, es cregué interessant estudiar l'expressió d'algun altre procés SOS per tal d'esbrinar el tipus d'alteració que presenta la soca JL1302 en aquest sistema. Ja fa un cert temps (vegeu la revisió de WITKIN, 1976) que hom coneix que la inducció de pròfags tant per la radiació ultraviolada com per la carència de timina depenen del gen *recA*, així com que pertanyen al conjunt de funcions SOS. A causa d'això s'estudià la inducció del pròfag Z1, present en les soques JL1205 i JL1302, per efecte de dos tractaments: carència de timina i radiació ultraviolada. En la figura 10 es recullen les dades corresponents a la inducció del bacteriòfag Z1 per la carència de timina. Hom pot veure com el nivell d'inducció augmenta unes 10 vegades en les dues soques. Contràriament, quan l'agent inductor és la llum ultraviolada (fig. 11) el nivell

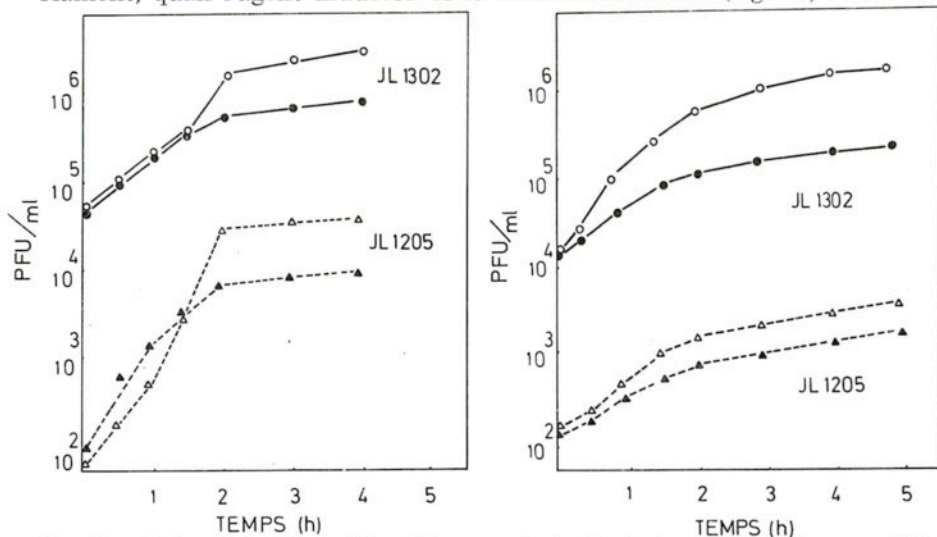


FIG. 10. — Inducció del bacteriòfag Z1 per carència de timina durant 1 hora en *Salmonella typhimurium* JL1205, desenvolupant-se en medi mínim AB glucosa (0,2%), uracil (10 µg/ml) i timidina (20 µg/ml). Els símbols negres (●, ▲) representen la inducció espontània en dos cultius d'aquestes soques que no varen ésser tractats amb carència de timina.

FIG. 11. — Inducció del bacteriòfag Z1 per irradiació amb llum ultraviolada de *Salmonella typhimurium* JL1205 i JL1302 a una dosi de 75 Jm⁻². Els símbols negres (●, ▲) representen la inducció espontània en dos cultius no irradiats d'aquestes soques.

d'inducció és més gran en JL1302 (unes 10 vegades) que en JL1205 (aproximadament 5 vegades) a una dosi de 75 Jm^{-2} . Això pot ésser atribuït al fet que en la soca JL1302 es produeix una disminució menor que en JL1205 en el nivell d'ATP després de la irradiació amb llum ultraviolada, fet que evidentment pot determinar una menor reducció del metabolisme de les cèl·lules del mutant, i, en conseqüència, una producció més elevada de partícules fàgiques.

DISCUSSIÓ

Al llarg d'aquest treball s'ha posat de manifest que la soca JL1302 no presenta una anul·lació de l'expressió del conjunt de funcions SOS, ja que si bé no és capaç de desencadenar la inhibició de la respiració cel·lular, sí que pot portar a terme la inducció de pròfags. Aquest fet permet afirmar que les funcions SOS poden manifestar-se diferencialment, és a dir, la inhibició de la replicació de l'ADN no té per què induir totes les diverses funcions d'aquest sistema de reparació. Aquesta afirmació es veu recolzada pels resultats obtinguts per diferents grups d'investigadors. Així, SWENSON i SCHENLY (1978) han demostrat que el compost antipaïna, un oligopèptid inhibidor de les proteases, és capaç d'impedir, després de la irradiació amb llum ultraviolada, la formació de filaments i la inducció de pròfags en un cultiu d'*E. coli* lisogènica pel bacteriòfag Lambda, si bé aquest mateix producte no elimina la inhibició de la respiració cel·lular en les mateixes condicions. Relacionat amb això, HUTCHINSON i STEIN (1980) han trobat que la carència de timina és incapaç de produir mutagènesi de bacteriòfags, si bé provoca la inducció del cicle virulent. Aquestes dades concorden amb els resultats obtinguts en el nostre laboratori, segons els quals la carència de timina tampoc no comporta la inhibició de la respiració cel·lular. Una possible causa d'aquest fenomen pot radicar en la naturalesa molecular dels factors del sistema SOS. Aquests efectors sembla que són productes residuals de la degradació de l'ADN per exonucleases com la codificada pels gens *recBC*, i que es produeixen en les forques de replicació de l'ADN afectat per lesions que impossibiliten la continuació normal de la replicació. Segons això, les diferents funcions SOS s'expressarien en relació amb el grau de degradació del cromosoma. Així, OISHI *et al.* (1978) han demostrat l'existència d'una correlació entre el temps necessari per a la inactivació del repressor del bacteriòfag Lambda i la importància de la degradació de l'ADN originada pel tractament inductor del sistema SOS.

Un altre aspecte important de la inducció del sistema SOS és la influència que el nucleòtid AMP cíclic té sobre diferents funcions de l'es-

mentat sistema. Aquest nucleòtid regula la decisió entre lisi o lisogènia quan un bacteriòfag infecta una cèl·lula, atès que està sota el seu control la síntesi del repressor de les funcions lítiques del bacteriòfag. Igualment, SWENSON *et al.* (1978) han demostrat que la inhibició de la respiració cel·lular dependent del sistema SOS està regulada per l'AMP cíclic, encara que hom no coneix el mecanisme pel qual es produeix aquesta regulació. Cal dir, finalment, que el mutant JL1302 presenta importants alteracions en el metabolisme de l'AMP cíclic pel fet de tenir desregulat el mecanisme de control de la síntesi d'aquest nucleòtid.

En qualsevol cas, les relacions existents entre les diferents funcions SOS i els seus processos d'expressió estan encara molt lluny d'ésser conegudes amb exactitud. Aquest fet, sens dubte, és una conseqüència lògica de la complexitat i de la importància que aquest sistema de reparació té per a la supervivència bacteriana enfront dels agents que actuen sobre el seu ADN.

TAULA 1. — Soques de *Salmonella typhimurium* utilitzades en el present treball

<i>Soca</i>	<i>Genotip</i>	<i>Fenotip</i>	<i>Procedència</i>
UA1 (LT2-JL1)	—	Salvatge	J. L. INGRAHAM ^a
JL1205	<i>pyrC 1502</i> ^b <i>cdd9</i> <i>cod 8 tpp 1 udp 11</i> <i>thy 1388</i> (Z1)	Ura ⁻ Thy ⁻ Tpp ⁻ Lisògena bacteriòfag Z1	J. L. INGRAHAM
JL1302	<i>pyrC 1502 cdd9</i> <i>cod 8 tpp 1 udp 11</i> <i>thy 1388 tmf</i> ^c (Z1)	Ura ⁻ Thy ⁻ Tpp ⁻ Tmf ⁻ Lisògena Bacteriòfag Z1	R. GUERRERO

a. J. L. INGRAHAM, Department of Bacteriology, Universitat Califòrnia, USA.

b. *pyrC 1502* és una mutació sensible a la temperatura que confereix auxotrofia per l'uracil a 44° C.

c. *tmf* és la mutació (ns) que determina el fenotip de JL1302 diferenciat de la soca progenitora JL1205.

BIBLIOGRAFIA

- BAILONE, A., LEVINE, A., i DEVORET, R. — Inactivation of prophage λ repressor *in vivo*. *J. molec. Biol.*, 131: 553-572 (1979).
- CROWL, R. M., AHMED, S. U., i BOYCE, R. P. — Expression of λ *red* genes restores *recB*-dependent protein X induction in *E. coli*. *Nature*, 275: 71-72 (1978).
- GUDAS, L. J., i PARDEE, A. B. — Model for regulation of *E. coli* DNA repair functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 72: 2330-2334 (1975).
- HOFEMEISTER, J. — DNA-Repair in *Proteus mirabilis*. IV. Post-irradiation DNA degradation as influenced by a function inducible in Rec^+ cells. *Molec. gen. Genet.*, 154: 35-43 (1977).
- HUTCHINSON, F., i STEIN, J. — Mutagenesis of ultraviolet-irradiated Lambda phage by host cell irradiation: Induction of Weigle mutagenesis is not an all-or-none process. *Molec. gen. Genet.*, 177: 207-211 (1980).
- MORAND, D., GOZE, A., i DEVORET, R. — Complementation pattern of *lexB* and *recA* mutations in *Escherichia coli* K12: mapping of *tif-1*, *lexB* and *recA* mutations. *Molec. gen. Genet.*, 157: 69-82 (1977).
- OISHI, M., SMITH, C. L., i FRIEFELD, B. — Molecular events and molecules that lead to induction of prophage and SOS functions. *Symp. Quant. Biol. Cold Spring Harbor*, 43: 897-906 (1978).
- ROBERTS, J. W., ROBERTS, C. W., i CRAIG, N. L. — *Escherichia coli recA* gene product inactivates phage λ repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75: 4714-4718 (1978).
- SWENSON, P. A. — Physiological responses of *E. coli* to far-ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol. Rev.*, 1: 269-386 (1976).
- SWENSON, P. A., i SCHENLEY, R. L. — Evidence relating cessation of respiration, cell envelope changes and death in ultraviolet-irradiated *E. coli* B/r cells. *J. Bacteriol.*, 117: 551-559 (1974).
- SWENSON, P. A., i SCHENLEY, R. L. — Effects of antipain on respiration, viability and excision of pyrimidine dimers in UV-irradiated *E. coli* cells. *J. Bacteriol.*, 135: 1167-1170 (1978).
- SWENSON, P. A., JOSHI, J. G., i SCHENLEY, R. L. — Regulation of cessation of respiration and killing by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and its receptor protein after far-ultraviolet-irradiation of *E. coli*. *Molec. gen. Genet.*, 159: 125-130 (1978).
- TAKESHITA, M., GROLIMAN, A. P., OHTSUBO, E., i OHTSUBO, H. — Interaction of bleomycin with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75: 5983-5987 (1978).
- TOKUNO, S., i GOUGH, M. — UV-sensitivity of a non repressor regulatory protein of bacteriophage P22. *J. Virol.*, 18: 65-70 (1976).
- WITKIN, E. W. — Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*. *Bacteriol. Rev.*, 40: 869-907 (1976).
- YASBIN, R. E. — DNA repair in *Bacillus subtilis*. I. The presence of an inducible system. *Molec. gen. Genet.*, 153: 211-218 (1977).