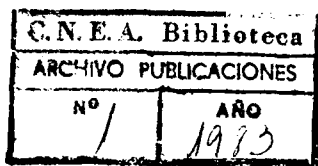


Estudio de la división celular en *Salmonella typhimurium*: propiedades de un mutante termosensible¹

ANA T. DE MICHELI * y DORA N. ANTON **

Departamento de Radiobiología, Comisión
 Nacional de Energía Atómica, Avda. del
 Libertador 8250, 1429 Buenos Aires, Argentina



Resumen

La cepa DA138 de *Salmonella typhimurium* presenta crecimiento termosensible debido a una mutación (*fts-131*) localizada en la Unidad 3 del mapa genético de *Salmonella*. A 42°C, la mutación *fts-131* inhibe la división celular y promueve la formación de filamentos no tabicados, pero no interfiere con la síntesis de ADN ni de proteína. Los filamentos formados a 42°C se dividen rápidamente al aumentar la presión osmótica del medio o al disminuir la temperatura a 32°C; la recuperación de la capacidad de división por pasaje a temperatura permisiva no es inhibida por ácido nalidíxico, cloranfenicol o cicloserina pero es completamente anulada por penicilina o cefalotina. Estos resultados indican que el paso alterado por *fts-131* es posterior a las etapas del ciclo celular en las que se sintetizan el ADN, las proteínas y los monóme-

ros de mureína, pero anterior a la etapa en la que esos monómeros son polimerizados e incorporados a la pared. A 37°C, *fts-131* no sólo no interfiere con la división celular sino que la estimula en cepas constitutivas para el operón histidina, aún en aquellas hipersensibles a altos niveles de represión de dicho operón. Esta última característica explica la selección positiva de *fts-131* en un derivado *his01242* de una cepa hipersensible.

Introducción

Son muchas las funciones que durante el ciclo celular intervienen, directa o indirectamente, en la división celular. Si bien este proceso consiste específicamente en la formación de un septo o tabique en la célula madre y en la separación de las células hijas, su realización está estrechamente relacionada con eventos anteriores del ciclo celular tales como el aumento de la masa citoplasmática, el crecimiento coordinado de las envolturas celulares y la duplicación del cromosoma bacteriano.

Aunque son muchos los aspectos que aún se ignoran sobre el complejo

¹ Este trabajo se ha realizado, en parte, con un subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

* Becaria del CONICET.

** Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

proceso de la división, en los últimos años se ha progresado activamente en su conocimiento gracias al estudio de mutantes alterados en la división celular. El aislamiento de esos mutantes, en su mayoría condicionales (termosensibles) dado el carácter vital de las funciones afectadas, fue encarado sistemáticamente en *Escherichia coli* K-12 y permitió la identificación de varios genes involucrados en la duplicación del ADN y en el proceso de septación (Hirota *et al.*, 1968; Van de Putte *et al.*, 1964).

A diferencia con lo que ocurre en *E. coli*, son muy pocos los mutantes de división conocidos en *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, se ha descrito recientemente un sistema de selección positiva de mutantes de envoltura celular basado en el empleo de una cepa de *S. typhimurium* hipersensible a los productos de los genes *hisF* e *hisH* que permite el aislamiento de mutantes con crecimiento termosensible (Antón, 1979).

En el presente trabajo se describe el estudio genético y fisiológico de

una de esas cepas (DA138) y la demostración de que la misma contiene una mutación condicional de división celular que afecta el proceso de septación.

Material y métodos

Cepas y Bacteriófagos

Las cepas utilizadas en este trabajo derivan de la cepa LT2 de *Salmonella typhimurium* y sus principales características se detallan en el Cuadro I; los bacteriófagos usados fueron KB1 y P22.

Medios y Drogas

El medio completo usado fue caldo nutritivo que contiene por litro de agua 5 g de peptona (Difco), 3 g de extracto de carne y 5 g de NaCl (aproximadamente 0.086 M). Como medio mínimo se usó el medio E de Vogel y Bonner (1956) al que se agregó 2 % de glucosa. Los respectivos medios

CUADRO I. Cepas de *S. Typhimurium* usadas en este trabajo

Cepa	Características principales	Origen
DA78	<i>hisW1824, his-203, rpsL</i>	D. N. Antón
DA138	<i>hisW1824, his01242 fts-131, rod-1 rpsL</i>	D. N. Antón
DA419	<i>hisW1824, his01242, fts-131, rod-1 leu-1261, met-1059 rpsL</i>	Mutagénesis de DA138 con dietil sulfato (DES)
DA457	<i>aroG, leu-1262</i>	Mutagénesis de AroG con DES
DA470	<i>aroG, fts-131</i>	Transducción de DA457 con fago DA138
DA471	<i>aroG</i>	Transducción de DA457 con fago DA138
DA636	<i>hisF3031, his01242, trpA3, leu-1263</i>	Mutagénesis de SB2299 con DES
Ara-9	<i>ara-9</i>	P. E. Hartman
AroG	<i>aroG</i>	D. B. Sprinson
SB2299	<i>hisF3031, his01242, trpA3</i>	P. E. Hartman

sólidos se obtuvieron agregando 15 g de agar (Difco) por litro de medio líquido. Las pruebas de fermentación de maltosa se realizaron sobre EMB Agar (Difco) adicionado con 1 % de dicho azúcar.

Los antibióticos mecilnam y cefalotina fueron obsequiados por los laboratorios Roche y Lilly respectivamente. Los demás antibióticos se obtuvieron comercialmente.

Conjugación y Transducción

Se llevaron a cabo según las técnicas descriptas por Antón (1968) y Roth *et al.* (1966) respectivamente.

Autólisis y Pruebas de sensibilidad

El nivel de autólisis expresa el porcentaje de disminución de la densidad óptica (650 nm) de un cultivo resuspendido en "buffer" Tris-HCl 0.05 M, pH 8.5, durante 2 horas a 37°

centígrados (Antón y Orce, 1976). Las pruebas de sensibilidad a cicloserina y desoxicolato se efectuaron según la técnica usada por Antón (1979).

Recuento de células totales

El número de células totales se estableció mediante cámaras para recuento de glóbulos rojos. Los cultivos fueron diluidos en formaldehído 0.1 % para obtener 10^7 bacterias/ml aproximadamente; previamente a la lectura, las cámaras se dejaron reposar durante 30 minutos con el objeto de que las células se depositaran en la base de las mismas. En cada determinación se contaron entre 150 y 200 células.

Síntesis de ADN y de proteína

La síntesis de ADN y de proteína se midió en cultivos exponenciales crecidos en caldo nutritivo a los cuales se agregó 10 μ Ci/ml de 3 H-Timidina (47 Ci/mmol) y 100 μ g/ml de

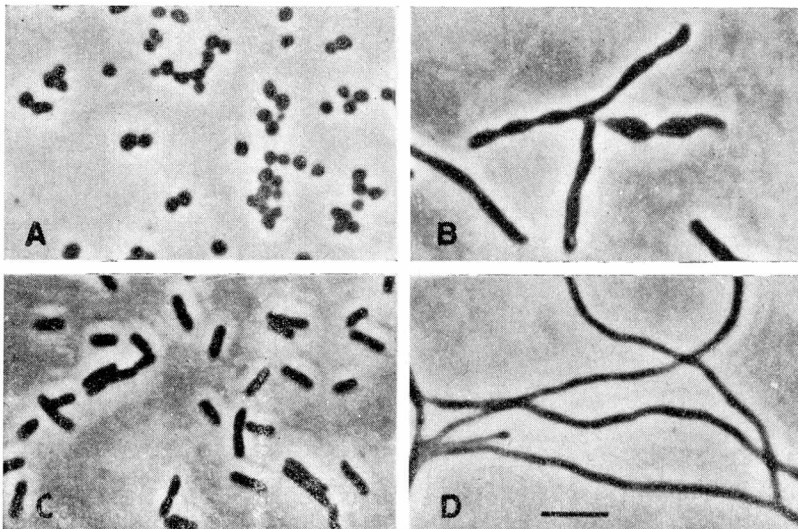


Figura 1. - Morfología celular de la cepa DA138 crecida en caldo nutritivo a 32° C (A) y a 42° C (B) y aspecto de DA470 crecida en las mismas condiciones a 32° C (C) y a 42° C (D). La barra representa 5 μ .

adenosina para medir síntesis de ADN y 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -Leucina (2 mCi/miligramo) para medir síntesis de proteína. Las muestras de esos cultivos (0.1 ml), tomadas a intervalos, se absorbieron sobre discos de papel de filtro de 25 mm de diámetro; los discos se sumergieron en ácido tricloroacético (TCA) 10 %, se lavaron dos veces con TCA 5 %, se secaron y se midieron en un contador de centelleo líquido Beckman.

Resultados

La cepa DA138 fue aislada como transductante *his01242* viable de la cepa DA78 y en ella se han detectado numerosas alteraciones que de una u otra forma involucran la envoltura celular (Antón, 1979). Además de mostrar sensibilidad a cicloserina y desoxicolato, DA138 presenta un nivel autolítico elevado, fermenta anormalmente maltosa y sus células tienen forma esférica (Fig. 1A). La cepa es también incapaz de formar colonias en medio sólido a 42° C aunque sí lo hace a 37° C y a temperaturas inferiores; sin embargo, crece a 42° C en medio líquido formando filamentos que presentan ensanchamientos redondeados (Fig. 1B).

Mapeo de la mutación de termosensibilidad y estudio de su relación con las otras alteraciones de DA138

La mutación responsable de la falta de crecimiento de DA138 a 42° C en medio sólido, a la que se denominó *fts-131*, fue ubicada inicialmente en las proximidades de la Unidad 3 del cromosoma por medio de cruces entre DA419, un derivado auxotrófico de DA138, y distintas cepas Hfr.

Con el objeto de realizar un mapeo más preciso se estudió la cotransducción de *fts-131* con otros marcadores de la zona, tales como *leu* y *ara* (Sanderson y Hartman, 1978). De 254 transductantes *leu*⁺ obtenidos al cruzar DA419 con fago crecido en una cepa *fts*⁺ *ara-9*, 30 perdieron el marcador *fts-131* lo que significa que *leu* y *fts* están ligados con una frecuencia del 11.8 %. Además, entre *leu* y *ara* se detectó un ligamiento del 53 % ya que 135 de los derivados *leu*⁺ de DA419 recibieron también el carácter *ara-9*. El orden de los genes está dado por la clase de recombinantes aparecida con menor frecuencia en ese cruzamiento, que fue la combinación *ara-9 fts*⁺, presente en sólo el 1.2 % de los derivados *leu*⁺ estudiados. En base a este último resultado y a las frecuencias de cotransducción halladas entre *leu* y *ara-9* y entre *leu* y *fts-131*, se construyó el mapa de la Figura 2 que muestra la posición relativa de los tres marcadores.

En el Cuadro II pueden compararse las propiedades de la cepa original, DA138, con las características mostradas por dos derivados isogénicos *fts-131* (DA470) y *fts*⁺ (DA471) obtenidos por transducción (Cuadro I).

Se observa que DA470, al igual que DA138, es incapaz de formar colonias en medio sólido a 42° C en tanto que DA471 crece normalmente en di-

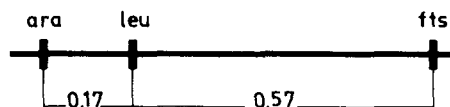


Figura 2. - Representación esquemática de la posición de *fts-131* respecto a otros marcadores cercanos. Los números indican las distancias entre los marcadores calculadas según la fórmula de Kemper (1974) en base a las frecuencias de cotransducción halladas.

CUADRO II. Propiedades de las cepas isogénicas DA470 (*fts-131*) y DA471 (*fts+*). Para facilitar la comparación se consignan también las propiedades de la cepa original DA138.

Cepa	Alelo	Forma celular a 37° C	Crecimiento a 42° C ¹	Respuesta a ²		Fermentación Maltosa ³	Autólisis %
				CICLOS	DOC		
DA471	<i>fts+</i>	Bacilar	+	R	R	Normal	15.2
DA470	<i>fts-131</i>	Bacilar	—	R	R	Normal	15.8
DA138	<i>fts-131</i>	Redonda	—	S	S	Anormal	54.3

¹ Medio completo sólido.

² CICLOS: cicloserina, 20 µg/ml; DOC: desoxicolato, 3 mg/ml; R: Resistente; S: Sensible.

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

chas condiciones. Por el contrario, DA470 difiere de DA138 en todas las demás propiedades estudiadas ya que su respuesta a cicloserina y a desoxi-

colato, su nivel antolítico, su forma celular a 37° C y el tipo de fermentación de maltosa son iguales a los de la cepa isogénica salvaje. Surge de

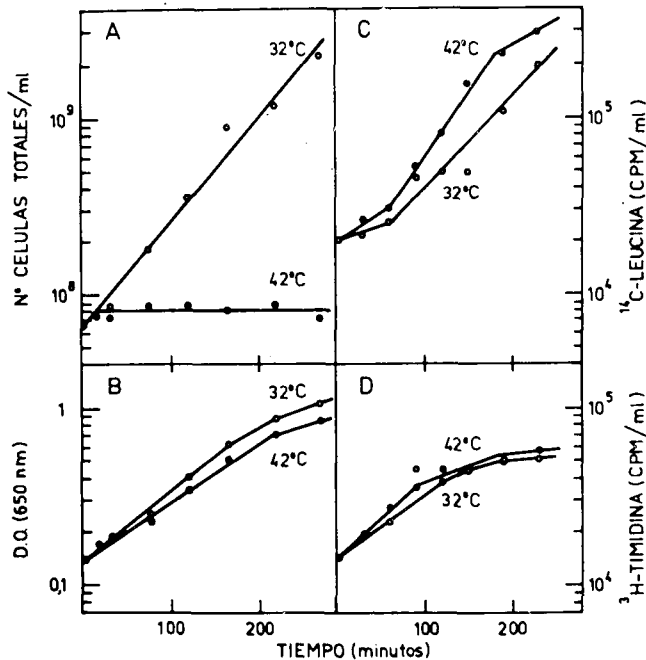


Figura 3. - Número de células totales (A), densidad óptica (B), incorporación de ¹⁴C-Leucina (C) y de ³H-Timidina (D) de DA470 en función del tiempo de incubación a 32° C y a 42° C. La cepa DA470 fue crecida en caldo nutritivo a 32° C y en el momento de iniciar la experiencia se pasó una alícuota a 42° C. La incorporación de precursores marcados se analizó en cultivos preincubados durante 70 minutos con 2.5 µCi/ml de ¹⁴C-Leucina (2 mCi/miligramo) para medir síntesis proteica y con 10 µCi/ml de ³H-Timidina (47 Ci/mmol) más 100 µg/ml de adenosina para medir la síntesis de ADN. Las muestras fueron tomadas y procesadas como se reseña en Material y Métodos.

estos resultados que la mutación *fts-131* es responsable de la falta de crecimiento en medio sólido a 42° C, pero no está involucrada en la alteración morfológica de DA138, ni en ninguna de las otras anomalías detectadas en esa cepa.

Inhibición de la división celular en una cepa fts-131 a 42° C y su recuperación

Con el objeto de evitar el efecto de las otras alteraciones presentes en DA138, el estudio del comportamiento de la mutación *fts-131* se continuó en la cepa DA470 y, para poder encararlo en forma cuantitativa, el mismo se realizó en medio líquido.

La Figura 3 muestra el comportamiento de un cultivo de DA470 al ser transferido de 32° C a 42° C. El aumento de temperatura no altera el incremento de la densidad óptica ni afecta la síntesis de ADN o de proteína pero detiene, casi instantáneamente, el aumento del número de células totales. El cultivo crecido a 42° C está formado por filamentos, aparentemente no septados, que muestran una longitud proporcional al tiempo de incubación a temperatura restrictiva (Figura 1D).

Estos resultados indican que la alta temperatura inhibe la división celular de DA470 sin detener el crecimiento. Experimentos similares con la cepa isogénica *fts*⁺ (DA471) indican que el crecimiento y la división celular de ésta no se modifican a 42° C.

La Figura 4 muestra que el efecto de la temperatura sobre DA470 es reversible ya que cuando un cultivo de DA470 crecido a 42° C es pasado a 32° C se produce, a partir de los 15 minutos, un brusco aumento en el número de células totales que rápidamente alcanza el valor del control

mantenido a 32° C; una vez llegado a ese punto, el cultivo continúa creciendo a la misma velocidad del control.

Así como sucede con otras mutantes de división celular termosensible (Ricard e Hirota, 1973; Ciesla *et al.*, 1972), los filamentos de DA470 se dividen a 42° C si la concentración de NaCl del medio es elevada de 0.08 M a 0.25 M (Fig. 4).

La sacarosa y otras sales tales como el Na₂SO₄, usadas en concentraciones osmóticamente equivalentes a la de NaCl, tienen un efecto semejante a éste lo que indica que los filamentos se dividen por el aumento de la presión osmótica del medio y no por un efecto específico del NaCl. A ese respecto, el NaSCN, NaClO₄ y el tricloraacetato de sodio constituyen excepciones ya que no solo no promueven la división celular del cultivo crecido a 42° C sino que además inhiben el crecimiento de los filamentos formados. Este comportamiento anómalo podría atribuirse al hecho de que esas tres sales son poderosos agentes caotrópicos y como tales provocan la desorganización de la membrana celular (Hatefi y Hanstein, 1974).

La pendiente de las curvas de recuperación obtenidas al pasar los filamentos de DA470 a temperatura permisiva o al aumentar la presión osmótica del medio es proporcional al tiempo de incubación a 42° C lo que indica que durante el crecimiento a 42° C se "acumulan" divisiones celulares potenciales, y que es suficiente el pasaje a 32° C o el agregado de sales, para que esas divisiones se completen en poco tiempo.

Efecto de distintos antibióticos sobre la recuperación de la división celular a 32° C

La Figura 4 demuestra que la presencia de ácido nalidíxico o cloranfe-

nicol, inhibidores de la síntesis de ADN y de proteína respectivamente, en el momento del pasaje a 32° C no impide la división de los filamentos aunque el título alcanzado es menor; similares resultados se obtuvieron con otros inhibidores de la síntesis proteica tales como puromicina (100 $\mu\text{g/ml}$) o tetraciclina (5 $\mu\text{g/ml}$).

El hecho de que la división de los filamentos se efectúe en presencia de inhibidores de la síntesis de ADN y de proteína indica que el paso termosensible en la cepa DA470 es posterior a todas las etapas que requieren

síntesis de esas macromoléculas.

Se investigó también la recuperación de los filamentos de DA470 en presencia de distintos inhibidores de la síntesis de mureína, polímero que forma la capa rígida de la pared bacteriana. La cicloserina, que inhibe la síntesis de los monómeros de esa macromolécula, no impide la división de los filamentos en tanto que la penicilina y la cefalotina la anulan completamente (Figura 4).

Si bien se acepta que la penicilina actúa en los últimos pasos de la síntesis de mureína, su modo de acción

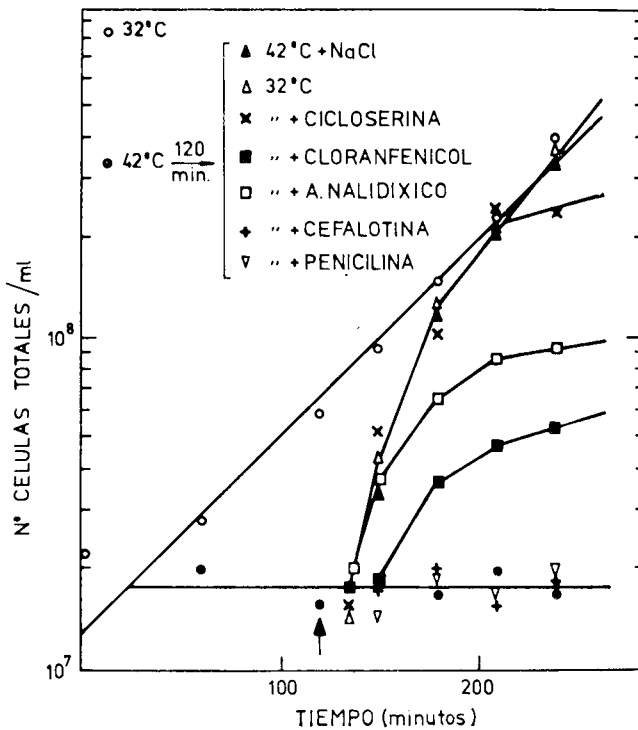


Figura 4. - Recuperación de la división celular en filamentos de DA470. Parte de un cultivo exponencial de DA470 crecido en caldo nutritivo a 32° C fue transferido a 42° C al iniciar la experiencia. A los 120 minutos (flecha) se tomaron siete alícuotas del cultivo crecido a 42° C; una de ellas fue mantenida a 42° C con el agregado de NaCl (0.25 M conc. final) y las otras seis se pasaron a 32° C. Una de ellas no tuvo agregados en tanto que cada una de las restantes recibió uno de los siguientes antibióticos: ácido nalidixico (24 $\mu\text{g/ml}$), cloranfenicol (40 $\mu\text{g/ml}$), cicloserina (35 $\mu\text{g/ml}$), penicilina (5 U/ml) o cefalotina (5 $\mu\text{g/ml}$).

parecería ser muy complejo ya que se han descubierto por lo menos seis proteínas de la membrana interna, a las que se denomina PBP, que captan específicamente dicho antibiótico (Spratt, 1977). Varias de esas proteínas tienen actividad enzimática y regulan distintos pasos de la síntesis de mureína y por ello se supone que el efecto de la penicilina sobre la recuperación de los filamentos se debe a la interferencia con esas funciones.

Por otra parte la cefalotina, que pertenece al grupo de las cefalosporinas estrechamente relacionado con el de las penicilinas, se une específicamente sólo a las PBP-1 y PBP-3 (Spratt, 1977), proteínas a las que se atribuye un rol importante en la polimerización de los monómeros de mureína (Ishino *et al.*, 1980; Ishino y Matsuhashi, 1981). La similitud en el efecto inhibitorio de la cefalotina y la penicilina sugiere que ambos antibióticos actúan por un mecanismo común, posiblemente su interacción con las PBP-1 y PBP-3. Concordantemente con esta suposición, mecilnam, un antibiótico que se une sólo a la PBP-2 (Spratt, 1977) no inhibe la recuperación de los filamentos de DA470 (datos no publicados).

Los resultados presentados indican que la división de los filamentos de DA470 requiere la síntesis de mureína y que el paso termosensible es posterior a la formación de los monómeros de esta macromolécula pero anterior a los pasos de la síntesis en los que intervienen la PBP-1 y/o la PBP-3.

Efecto de fts-131 sobre la expresión constitutiva del operón histidina

Se ha sugerido que las mutaciones detectadas en los derivados viables

his01242 de DA78 son positivamente seleccionadas por su capacidad para suprimir la hipersensibilidad de esa cepa al exceso del producto de los genes *hisH* e *hisF* (Antón, 1979).

La cepa SB2299 muestra una hipersensibilidad semejante a la de DA78 ya que, al igual que ésta, no produce transductantes *hisF*⁺ viables cuando es cruzada con fago *his01242* en tanto que sí los produce con fago salvaje (Savic, 1972).

Para investigar el efecto de la mutación *fts-131* sobre la hipersensibilidad se construyeron por transducción derivados isogénicos *fts-131* y *fts*⁺ de DA636, un derivado *leu* de SB2299. Se observó que a diferencia de lo que ocurre con SB2299 y sus derivados *fts*⁺, los derivados *fts-131* forman numerosos transductantes *hisF*⁺ cuando son cruzados con fago *his01242*.

Este hecho indica que la mutación *fts-131*, que a 37° C no altera la división celular, puede suprimir a esa temperatura la expresión de la hipersensibilidad de la cepa SB2299.

Se sabe que las cepas constitutivas para el operón histidina forman filamentos cuando crecen a 37° C en medio adicionado con 2 % de glucosa produciendo, por ello, colonias rugosas (Murray y Hartman, 1972). Por el contrario las colonias *hisF*⁺ que se obtienen al cruzar los derivados *fts-131* de SB2299 con fago *his01242*, así como los derivados *fts-131* de todas las cepas constitutivas no hipersensibles probadas, tienen aspecto liso y están formadas por bacilos de tamaño normal; este hecho indica que *fts-131* suprime también la inhibición de la división celular producida por la desrepresión del operón histidina en medio con alto contenido de glucosa.

Discusión

Los resultados presentados demuestran que la termosensibilidad de la cepa DA138 se debe a la presencia de una mutación (*fts-131*) que a 42° C produce la inhibición de la división celular y la formación de filamentos no tabicados. Todas las otras alteraciones detectadas en la cepa, con excepción de la sensibilidad a desoxicolato cuya determinación genética no se conoce son expresiones pleiotrópicas de otra mutación (*rod-1*) cuya manifestación más conspicua es el redondeamiento celular (manuscrito en preparación). Parece probable que la mutación *rod-1* sea también responsable de la escasa longitud de los filamentos formados por DA138 a 42° C y de su aspecto redondeado.

El gen afectado por la mutación *fts-131* se encuentra en la Unidad 3 del cromosoma de *S. typhimurium*, zona en la que Ciesla *et al.* (1972) describieron, hace tiempo, otra mutación de división celular (*divC*). De acuerdo a los estudios realizados en *E. coli*, organismo estrechamente emparentado con *S. typhimurium*, esa zona del cromosoma tendría gran importancia en el control de la división celular como lo indica la gran abundancia de genes conectados con esa función (*ftsA*, *ftsZ* y *envA*), con distintos aspectos de la síntesis de mureína (*murE*, *murF*, *murC*, *mraA*, *mraB* y *ddl*) o con ambos fenómenos a la vez (*pbpB*) que existen en ella (Bachmann y Low, 1980).

De acuerdo a su comportamiento fisiológico, la mutación *fts-131* tiene parecido con los mutantes de *E. coli* correspondientes a los genes *ftsA*, *ftsZ* y *pbpB*. Aunque se han descrito algunas diferencias entre esos mutantes, tales como la presencia de

septos rudimentarios en las cepas *pbpB* (Walker *et al.*, 1975) y la ausencia de recuperación de la división celular a bajas temperaturas y en presencia de inhibidores de la síntesis de ADN o proteína en las mutantes *ftsA* (Tormo *et al.*, 1980), las mismas no bastan para identificar concluyentemente el gen alterado. Solamente pruebas de complementación génica permitirían aclarar la posible homología de *fts-131* con alguno de los varios tipos de mutantes semejantes de *E. coli* y con el mutante *divC* de *S. typhimurium*.

Si bien no pueden descartarse otras explicaciones, los resultados presentados sugieren que *fts-131* codifica un producto termosensible que a 42° C se inactiva produciendo la detención de la división celular en un paso terminal del ciclo celular; ese paso sería posterior a la duplicación del cromosoma y a todos los eventos en los que se requiere síntesis de proteína, y anterior a la etapa de la síntesis de mureína en la que intervienen las proteínas PBP-1 y/o PBP-3.

Se ha demostrado que tanto la PBP-1 como la PBP-3 tienen actividad de transglicosilasa y transpeptidasa (Ishino *et al.*, 1980; Ishino y Matsuhashi, 1981), pero evidencias recientes indican que la PBP-3 actúa específicamente en las síntesis de mureína del septo mientras que la PBP-1 intervendría en el alargamiento de las paredes laterales (Botta y Park, 1981). Dado que los filamentos de *fts-131* parecen ser normales en elongación y deficientes en septación, puede suponerse que es la actividad de la PBP-3 y no la de la PBP-1 la que se requiere para su división. Esta interesante posibilidad podría ser investigada estudiando la división celular de los filamentos en presencia de

antibióticos con capacidad de unirse específicamente a la PBP-3.

La mutación *fts-131*, presente en la cepa DA138, no solamente suprime la hipersensibilidad que muestran ciertas cepas a los productos de los genes *hisF* e *hisH*, sino que también suprime la filamentación que estos productos causan en cepas constitutivas para el operón histidina.

Además de DA138, entre los derivados *his01242* viables de DA78, una cepa hipersensible, se aislaron otras dos cepas de origen independiente que presentan también crecimiento termosensible (Antón, 1979). Al igual que en el caso de DA138, estas dos cepas llevan mutaciones que inhiben la división celular a 42°C, están localizadas en la Unidad 3 y tienen efecto supresor sobre la hipersensibilidad y la filamentación debida a los productos *hisF* e *hisH* (De Micheli y Antón, datos no publicados). Las evidencias halladas en el presente trabajo explican la alta frecuencia de aparición de ese tipo de mutaciones en una cepa hipersensible (3/41) ya que la capacidad de las mismas para suprimir la hipersensibilidad impondría una fuerte selección en su favor.

Es digno de recalcar el hecho de que la mutación *fts-131*, a pesar de no expresarse a 37°C (en esas condiciones la bacteria crece y se divide normalmente) es capaz de promover, a esa temperatura, la división celular en cepas hipersensibles y constitutivas. Este hecho podría ser indicio de que la aparente normalidad de la cepa *fts-131* a 37°C no es tal y que existen en la misma desequilibrios metabólicos que compensan el efecto de la desrepresión sin llegar a inhibir el proceso de división. O, alternatively, podría significar que la mutación *fts-131* se expresa a todas las

temperaturas pero que su producto sólo se necesita a 42°C.

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

Summary

Celular division studies in *SALMONELLA TYPHIMURIUM*: properties of a termosensible mutant

An effective method for the selection of mutants of *Salmonella typhimurium* defective in cell envelope properties was recently described. That method, based on the hypersensitivity displayed by strain DA78 to the excess of *hisF* and *hisH* gene products, allowed the isolation of three strains unable to grow on solid medium at 42°C (Antón, 1979). The present work reports the genetic and physiological study of mutation *fts-131* that causes the thermosensitivity of DA138, one of such strains.

Besides the thermosensitivity produced by *fts-131*, DA138 shows high autolytic activity and abnormal fermentation of maltose, it is sensitive to cycloserine (20 µg/ml) and deoxycholate (3 mg/ml) and its cells are round-shaped. With the exception of sensitivity to deoxycholate, all the other alterations are due to the presence of mutation *rod-1* whose most conspicuous characteristic is to confer round cell shape (manuscript in preparation).

By conjugation and transduction crosses, it was found out that *fts-131* is located in the Unit 3 of the linkage map and cotransduces with the *leu* marker at a frequency of 11.8 % (Fig. 2).

Mutation *fts-131* inhibits cell division at 42°C but does not interfere with synthesis of DNA or protein (Fig. 3) and, consequently, non-septate filaments are formed at that temperature (Fig. 1D).

Filaments formed at 42°C divide very rapidly when the concentration of NaCl in the medium is increased from 0.086M to 0.25M or when the temperature is decreased from 42°C to 32°C or less (Fig. 4). Division promoted by a temperature shift proceeds even in the presence of nalidixic acid, chloramphenicol or cycloserine demonstrating that the block imposed at 42°C by *fts-131* comes after the syntheses of DNA, protein and early precursors of murein are completed.

On the contrary, the division of the filaments is completely suppressed by penicillin and cephalothin, two antibiotics that share the property of binding specifically to PBP-1 and PBP-3, two of the six penicillin-binding proteins of the inner cell membrane (Spratt, 1977). It has been reported that PBP-1 and PBP-3 are involved in late stages of murein synthesis owing to their activity as transglycosylases and transpeptidases (Ishino *et al.*, 1980; Ishino y Matsuhashi, 1981); therefore, the inhibitory action of penicillin and cephalothin indicates that the alteration caused by mutation *fts-131* affects, or is previous, to the step mediated by those penicillin-binding proteins.

Although mutation *fts-131* does not halt cell division at 37°C, it does suppress, at that temperature, the inhibi-

tion of cell division displayed, on medium containing 2 % glucose, by strains constitutive for the histidine operon. Furthermore, the mutation suppresses also the hypersensitivity shown by some strains to high levels of expression of the histidine operon; this fact should provide a strong advantage to hypersensitive strains carrying mutations like *fts-131* and would, then, explain their positive selection.

Bibliografía:

- Antón, D. N., 1968. Histidine regulatory mutants in *Salmonella typhimurium*. V. Two new classes of histidine regulatory mutants. *J. Mol. Biol.*, 33:533-546.
- Antón, D. N.; Orce, L. V., 1976. Envelope mutation promoting autolysis in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.*, 144:97-105.
- Antón, D. N., 1979. Positive selection of mutants with cell envelope defects of a *Salmonella typhimurium* strain hypersensitive to the products of genes *hisF* and *hisH*. *J. Bacteriol.*, 137:1271-1281.
- Bachmann, B. J.; Low, B. K., 1980. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 6. *Microbiol. Rev.*, 44:1-56.
- Botta, G. A. y Park, J. T., 1981. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J. Bacteriol.*, 145:333-340.
- Ciesla, Z.; Bagdasarian, M.; Szczurkiewicz, W.; Przygonska, M.; Kłopotowski, T., 1972. Defective cell division in thermosensitive mutants of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. genet.*, 116:107-125.
- Ishino, F.; Mitsui, K.; Tamaki, S.; Matsuhashi, M., 1980. Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97:287-293.
- Ishino, F.; Matsuhashi, M., 1981. Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum forming reaction sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101:905-911.

- Hatefi, Y.; Hanstein, W. G.**, 1974. Destabilization of membranes with chaotropic ions. *Methods Enzymol.*, 31:770-790.
- Hirota, Y.; Ryter, A.; Jacob, F.**, 1968. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 33:677-693.
- Kemper, J.**, 1974. Gene order and co-transduction in the *leu-ara-fol-pyrA* region of the *Salmonella typhimurium* linkage map. *J. Bacteriol.*, 117:94-99.
- Murray, M. L.; Hartman, P. E.**, 1972. Overproduction of *hisH* and *hisF* gene products leads to inhibition of cell division in *Salmonella*. *Can. J. Microbiol.*, 18:671-681.
- Ricard, M.; Hirota, Y.**, 1973. Effet des sels et autres composés sur le phénotype de mutants thermosensibles de *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 124A: 29-43.
- Roth, J. R.; Antón, D. N.; Hartman, P. E.**, 1966. Histidine regulatory mutants in *Salmonella typhimurium*. I. Isolation and general properties. *J. Mol. Biol.*, 22:305-323.
- Sanderson, K. E.; Hartman, P. E.**, 1978. Linkage map of *Salmonella typhimurium*, Edition V. *Microbiol. Rev.*, 42:471-519.
- Savic, D. J.**, 1972. A histidine operator-constitutive mutation decreases the frequency of recombination within the histidine operon of *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, 71:461-464.
- Spratt, B. G.**, 1977. Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.*, 72:341-352.
- Tormo, A.; Martínez-Salas, E.; Vicente, M.**, 1980. Involvement of the *ftsA* gene product in late stages of the *Escherichia coli* cell cycle. *J. Bacteriol.*, 141:806-813.
- Van de Putte, P.; Van Dillewijn, J.; Rorsch, A.**, 1964. The selection of mutants of *Escherichia coli* with impaired cell division at elevated temperature. *Mutat. Res.*, 1:121-128.
- Vogel, H. J.; Bonner, D. M.**, 1956. Acetyl-crithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.*, 218:97-106.
- Walker, J. R.; Novarik, A.; Allen, J. S.; Gustafson, R. A.**, 1975. Regulation of bacterial cell division: temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* that are defective in septum formation. *J. Bacteriol.*, 123:693-703.