

Genètica i fisiologia bacteriana

1. INTRODUCCIÓ

1.1. *L'inici de la genètica bacteriana*

A mitjan segle passat, diferents investigadors varen dur a terme experiments clau per al desenvolupament de la genètica bacteriana, entre els quals cal destacar els següents:

— El 1945 Beadle i Tatum varen aïllar mutants nutricionals del fong *Neurospora crassa*. Això va permetre l'ús de la selecció nutricional per a l'estudi de processos genètics poc freqüents. Tanmateix, també varen establir el concepte un gen / un enzim, primera connexió entre genotip i fenotip [1].

— L'any 1943 Luria i Delbrück varen desenvolupar el test de la fluctuació, un concepte essencial per dur a terme estudis quantitius sobre les mutacions bacterianes [2].

— El 1944 Avery, MacLeod i McCarty varen demostrar que el principi transformant del pneumococ era DNA [3].

— El 1946 Lederberg i Tatum varen descobrir la conjugació en *Escherichia coli* K12 [4].

— L'any 1946 Hersey va demostrar que els bacteriòfags poden presentar recombinació genètica [5].

— I l'any 1950 els experiments de Lwoff i Gutmann varen comprovar que la lisogènia fàgica és un procés cel·lular i no pas un procés poblacional [6].

1.2. *Episomes i plasmidis*

L'any 1945 Lederberg va intentar desenvolupar un sistema genètic en un bacteri. Pensant en el concepte de reproducció sexual com a forma de generar variabilitat, va considerar l'ús de mutants nutricionals com una forma de detectar aparellament (*mating*) entre cèl·lules bacterianes. Treballant al laboratori d'E. L. Tatum, el qual disposava de mutants auxotròfics dobles d'*E. coli*, varen poder demostrar que existia recombinació entre dos mutants dobles diferents i es generaven variants prototròfiques. Posteriorment, Hayes va demostrar que els dos elements que participaven en l'encreuament no eren equivalents. Finalment, es va descobrir la partícula F [7] i la natura de les soques Hfr [8]. Inicialment, el factor F es va considerar com un element genètic codificant per la seva replicació i transferència. Posteriorment es varen identificar factors F que havien incorporat gens cromosòmics, anomenats factors F' [9]. Jacob i Wollman varen interpretar els factors F' com a resultants de la integració del factor F en diferents localitzacions del cromosoma. Per tant, el factor F podia coexistir en dos estats: integrat en el cromosoma (generant soques Hfr) o autònom. Jacob i Wollman [10] varen denominar aquests elements *episomes*. Aquesta terminologia va romandre durant un temps, però posteriorment va ser reemplaçada pel terme més general de *plasmidi* [11].

1.3. *Transferència genètica horitzontal i variabilitat en el món microbià*

La transferència genètica horitzontal, HGT (també denominada lateral, LGT), és el moviment de DNA entre organismes (usualment unicel·lulars) no relacionats per la descendència. Per tant, l'HGT pot tenir lloc entre cèl·lules d'espècies o fins i tot gèneres diferents. L'HGT és especialment prevalent en el món procariota. Tenint en compte que la reproducció dels microorganismes procariotes és predominantment asexual, els mecanismes de variabilitat quedarien restringits a les modificacions locals en la seqüència de nucleòtids (processos relacionats a la replicació) o bé a fenòmens de duplicacions, delecions, inversions o translocacions (processos relacionats amb la replicació) [12]. La transferència genètica horitzontal, per tant, genera una nova perspectiva de variabilitat en el món microbià.

L'impacte de l'HGT sobre la variabilitat microbiana ha estat reconsiderat en l'època de la genòmica. Tan aviat com les seqüències de diferents genomes bacterians i d'arqueobacteris varen estar disponibles, es va posar de manifest la sorprenent complexitat de l'evolució dels genomes microbians. El procés dominant en l'evolució dels microbis és la transferència horitzontal de gens, per sobre de l'herència vertical [13]. Les comparacions de genomes microbians posen de manifest que fins i tot genomes de microorganismes molt relacionats difereixen substan-

cialment en els seus repertoris de gens [13]. Un exemple el representa *Escherichia coli*. La comparació del genoma de diferents aïllats mostra l'existència d'un conjunt d'aproximadament 3.000 gens compartits (*core genome*) i d'aproximadament 90.000 gens no compartits (*pangenome*) [14].

1.4. Els plasmidis: un sistema que facilita la transferència genètica horitzontal

Existeixen tres mecanismes fonamentals d'HGT en el món procariota: transformació, transducció i conjugació. La transformació fa referència a la incorporació de DNA extern al citoplasma de la cèl·lula receptora. La transducció implica la vehiculització del DNA mitjançant bacteriòfags, a causa de la integració de DNA exogen al genoma del fag. Finalment, la conjugació implica l'establiment de contacte cel·lular entre dos individus, i la transferència de DNA d'un d'ells (dador) a l'altre (receptor). El DNA és transferit mitjançant un conducte cilíndric (*pili* conjugatiu). Els plasmidis són elements autoreplicatius de massa molecular inferior al cromosoma, molts dels quals tenen la capacitat de catalitzar la seva transferència per conjugació. Els plasmidis tenen un paper essencial en l'HGT, a causa de la seva capacitat de transferència per conjugació tant entre hostatgers propers com poc relacionats. Un exemple de l'efectivitat d'aquest procés d'adaptació és la ràpida distribució de la resistència a antibiòtics a través de les poblacions bacterianes [15].

2. EL FACTOR S DE *CITROBACTER INTERMEDIUS* C3

2.1. Identificació de la soca C3 de «*C. intermedius*»: variabilitat en la producció d'àcid glutàmic

Al final de la dècada dels anys seixanta del segle passat, liderat pel doctor Parés, al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, es va iniciar un projecte de recerca que tenia com a objectiu identificar soques bacterianes productores d'àcid glutàmic, un aminoàcid d'interès alimentari. Durant el procés de cribratge es va identificar un microorganisme productor d'aquest aminoàcid. El mètode de cribratge consistia a fer créixer colònies del microorganisme objecte d'anàlisi en un medi nutritiu sòlid i, posteriorment, cobrir les colònies amb una segona capa de medi inoculat amb el microorganisme *Leuconostoc mesenteroides*, un microorganisme auxotròfic per l'àcid glutàmic, i que amb aquesta metodologia forma colònies satèl·lit al voltant de colònies de microorganismes productors de l'esmentat aminoàcid.

Un dels microorganismes productors aïllats es va classificar com a *Citrobacter intermedius*, soca C3. De manera sorprenent, aquest microorganisme presentava una elevada variabilitat fenotípica. Aproximadament un 60 % de les colònies excretaven àcid glutàmic (Sg^+) (i presentaven, per tant, colònies satèl·lit de *L. mesenteroides* amb el sistema de cribratge esmentat anteriorment), i un 40 % eren no excretores (Sg^-). En colònies Sg^- , aquest procés era reversible i generava les mateixes colònies Sg^+ . Tenint en compte el que s'ha dit en la introducció, en el moment de l'aïllament i la caracterització de la soca C3, la variabilitat en el món microbià s'associava a processos de transferència genètica mediat per plasmidis. Davant d'aquest fenomen inesperat, el doctor Parés va plantejar la hipòtesi que la base d'aquest procés de variabilitat podria ésser un plasmidi i que el que provocés la integració/desintegració del cromosoma fos el fenotip d'excreció d'àcid glutàmic. De fet, aquest model correspondria al concepte *episoma*, presentat per Jacob i Wollman pocs anys abans [10].

2.2. Producció de glutamat i la prova de la fluctuació

Una de les primeres aproximacions per estudiar la variabilitat colonial de l'excreció d'àcid glutàmic va consistir a aplicar la prova de la fluctuació, que havia estat definida per Delbrück i Luria uns vint anys abans [2]. La base d'aquesta prova consisteix a analitzar la variància d'un fenotip d'una població bacteriana en una sèrie de cultius independents obtinguts a partir de poques cèl·lules i, en el seu cas, comparar-ho amb la variància obtinguda en un únic cultiu sembrat amb moltes cèl·lules.

Si el fenotip es produeix com a conseqüència de l'exposició dels cultius a un mateix estímul, la proporció de cultius (o de cèl·lules de cada cultiu) que presenten el fenotip serà semblant. En canvi, si l'aparició del fenotip correspon a un procés genètic (p. ex., una mutació), es produirà una gran variabilitat (variància elevada) entre els diferents cultius, depenent del moment en què aquest procés aleatori apareix en la població, comparada amb la variabilitat obtinguda en la mostra sembrada amb moltes cèl·lules.

Aquesta estratègia es va fer servir per estudiar la secreció de glutamat a la soca C3. L'anàlisi de la producció de glutamat en la descendència de colònies individuals i també d'un cultiu massiu va posar de manifest que la variància en la descendència de colònies individuals era significativament superior a la del cultiu, fet que suggeria, per tant, que la reversió no excretor (Sg^-) / excretor (Sg^+) era espontània, a l'atzar i d'elevada freqüència [16]. Per tant, la base genètica d'aquest procés podria coincidir amb l'existència d'un plasmidi que, de manera aleatòria, dictés la producció de glutamat.

2.3. *El taronja d'acridina (AO) i la proporció de colònies Sg⁺*

L'AO és un compost que permet eliminar plasmidis en un cultiu bacterià. Per donar suport a la hipòtesi que la secreció d'àcid glutàmic estava associada a un element extracromosòmic, es va analitzar l'efecte d'aquest compost sobre la freqüència de cèl·lules Sg⁺. Tal com era esperable, si el fenotip de producció d'àcid glutàmic depèn d'un plasmidi, el cultiu amb AO va tenir com a conseqüència la pràctica desaparició de colònies Sg⁺. Tanmateix, l'agitació dels cultius (que interfereix amb la transferència de plasmidis per conjugació) també disminueix la proporció d'elements Sg⁺ [16].

2.4. *Obtenció de derivats Sg⁻*

Després de subcultivar la soca C3 en presència d'AO, es varen poder aïllar descendents Sg⁻ que presentaven incapacitat de revertir a Sg⁺. Aquests clons presentaven una taxa de creixement baixa en un medi mínim. No fermenten sucres, i els empren aeròbicament de manera limitada. Tampoc no creixen en agar de MacConkey i són resistents als bacteriòfags que infecten la soca C3 [16]. Aquests tipus de clons varen esdevenir essencials per demostrar la transferència de la capacitat de secreció d'àcid glutàmic per conjugació.

2.5. *Transferència de la capacitat d'excretar àcid glutàmic a «Paracolobactrum intermedium»*

Un dels experiments crítics per demostrar l'associació entre una propietat fenotípica i un plasmidi consisteix a demostrar la transferència per conjugació de l'esmentada propietat. Una altra aproximació que es va fer servir per demostrar l'associació entre un factor extracromosòmic i la secreció de glutamat va consistir inicialment a preparar cocultius de la soca C3 amb *Paracolobactrum intermedium* (aquest darrer gènere d'enterobacteris avui dia ha desaparegut i els seus representants s'han reclassificat com a *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* o *Edwardsiella*). *P. intermedium* no excreta glutamat i es pot diferenciar fenotípicament de la soca C3. Aquests experiments de conjugació van permetre seleccionar colònies de *P. intermedium* amb capacitat de secretar glutamat [16].

2.6. *Metabolisme d'aminoàcids i secreció de glutamat: el factor S, un plasmidi metabòlic?*

Tal com s'ha referit anteriorment, els cultius de la soca C3 amb AO varen permetre aïllar derivats Sg⁻ de la soca C3. Al grup de recerca es va iniciar una estratègia encaminada a obtenir mutants auxotròfics, tant de la soca salvatge com dels derivats Sg⁻. Això possibilitaria demostrar la transferència de la capacitat de secretar glutamat als esmentats mutants Sg⁻ (seleccionant per les diferents auxotròfies). L'obtenció dels esmentats mutants va permetre diferenciar els clons Sg⁺ dels clons Sg⁻ en cocultius, i demostrar la transferència de la capacitat de secretar glutamat de clons Sg⁺ a clons Sg⁻, tal com s'havia demostrat en el cas de *P. intermedius*.

L'obtenció de mutants auxotròfics per alguns aminoàcids també va permetre correlacionar la secreció de glutamat amb la capacitat de la soca C3 de sintetitzar alguns aminoàcids, com la prolina. Els mutants auxotròfics per la prolina derivats de la soca salvatge havien perdut també la capacitat d'excretar àcid glutàmic. Aquest no era el cas d'altres mutants auxotròfics, com els de la leucina o histidina. Mutants auxotròfics per la leucina o la histidina que conserven la capacitat de secretar àcid glutàmic poden transferir aquesta capacitat d'excretar àcid glutàmic a mutants Pro⁻, que també recuperen la capacitat de sintetitzar aquest aminoàcid. Aquests transconjugants podien perdre simultàniament la capacitat de sintetitzar prolina juntament amb la capacitat d'excretar àcid glutàmic [17]. Estudis posteriors varen correlacionar la capacitat d'excretar àcid glutàmic amb l'activitat de l'enzim isocitrat deshidrogenasa [18].

2.7. *Aïllament de DNA plasmídic de la soca C3 i transformació*

El DNA genòmic total de la soca C3 es va aïllar i posteriorment es va analitzar amb la tècnica d'ultracentrifugació de DNA en gradient de clorur de cesi amb bromur d'etidi. Això va permetre aïllar DNA CCC (*covalently closed circular*), que hauria de correspondre al factor S. L'obtenció d'aquest DNA plasmídic de la soca C3 va possibilitar transformar un derivat Pro⁻ no excretor de glutamat de la soca C3. Els transformants Pro⁺ també varen recuperar la capacitat d'excretar àcid glutàmic. Tots aquests estudis correlacionen la capacitat de sintetitzar prolina amb la d'excretar àcid glutàmic i amb DNA extracromosòmic, i suggereixen, per tant, que el factor S aïllat de la soca C3 confereix propietats metabòliques específiques [16, 17, 18].

3. EL FACTOR S DE *CITROBACTER INTERMEDIUS* C3: PERSPECTIVA HISTÒRICA L'ANY 2019

Els darrers anys, la interacció plasmidis-cromosoma ha esdevingut un tema de recerca de notable interès, com ho demostren diferents publicacions en revistes rellevants tant de genètica com de microbiologia. La influència dels plasmidis modificant l'expressió de gens cromosòmics és un procés ben documentat [19, 20, 21, 22, 23]. Específicament, és reconegut que alguns plasmidis modifiquen el metabolisme d'aminoàcids i la producció d'energia [19, 20], models que ressemblen el del factor S de la soca C3. Addicionalment, s'ha demostrat també que els plasmidis poden potenciar l'adaptació dels seus hostes a determinades condicions ambientals [23].

Avui dia un dels aspectes més rellevants d'aquesta problemàtica fa referència al mecanisme pel qual els plasmidis produeixen aquests efectes als seus hostes. Més que per un problema d'integració-excisió del plasmidi al cromosoma, les modulacions del transcriptoma de la soca hoste pel plasmidi estan associades a la codificació de proteïnes reguladores globals que modifiquen l'expressió tant de gens plasmídics com cromosòmics. Exemples ben estudiats són les famílies de reguladors AraC [24] o H-NS [25]. En tots dos exemples, reguladors globals de codificació plasmídica influeixen l'expressió de gens cromosòmics. Tots aquests exemples donen valor als estudis portats a terme als anys setanta del segle passat amb el factor S de *Citrobacter intermedius* C3, que clarament varen esdevenir pioners i es varen avançar al seu temps, i varen influir de manera decisiva en la visió de la microbiologia i de la genètica bacteriana de tota una generació de microbiòlegs que, liderats pel doctor Parés, van participar en aquest projecte.

ANTONIO JUÁREZ GIMÉNEZ
Catedràtic de microbiologia de la Universitat de Barcelona

REFERÈNCIES

- [1] BEADLE, G. W. (1945). «Biochemical genetics». *Chemical Reviews*, 37, p. 15-96.
- [2] LURIA, S. E.; DELBRÜCK, M. (1943). «Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance». *Genetics*, 28, p. 491-511.
- [3] AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. (1944). «Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III». *Journal of Experimental Medicine*, 79, p. 137-158.

- [4] LEDERBERG, J.; TATUM, E. L. (1946). «Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 11, p. 113-114.
- [5] HERSEY, A. D. (1946). «Spontaneous mutation in bacterial viruses». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 11, p. 67-77.
- [6] LWOFF, A.; GUTTMAN, A. (1950). «Recherches sur un *Bacillus megatherium* lysogène». *Annales de l'Institut Pasteur*, 78, p. 711-739.
- [7] HAYES, W. (1953). «Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in *Bacterium coli*». *Journal of General Microbiology*, 8, p. 72-88.
- [8] LEDELBERG, J.; CAVALLI, L. L.; LEDELBERG, E. M. (1952). «Sex compatibility in *Escherichia coli*». *Genetics*, 37, p. 720-730.
- [9] HAYES, W. (1964). *The genetics of bacteria and their viruses*. Nova York: John Wiley, 740 p.
- [10] JAKOB, F.; WOLLMAN, E. L. (1958). «Les épisomes, elements genetiques ajoutés». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 247, p. 154-156.
- [11] HAYES, W. (1969). «Introduction: what are episomes and plasmids?». A: WOLSTERHOME, G. E. W.; O'CONNOR, M. (ed.). *Bacterial episomes and plasmids*. Boston: Little, Brown and Co., p. 4-8.
- [12] ARBER, W. (2014). «Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution». *Life*, 4, p. 217-224.
- [13] KOONIN, E. V. (2016). «Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions». *F1000Research* 5, 1805.
- [14] LAND, M. [et al.] (2015). «Insights from 20 years of bacterial genome sequencing». *Functional Integrative Genomics*, 15, p. 141-161.
- [15] BENNETT, P. M. (2008). «Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria». *British Journal of Pharmacology*, 153, S347-S357.
- [16] PARÉS, R.; GUINEA, J.; HERNÁNDEZ, S.; VALOIX, J.; JOFRE, J. (1974). «A new episomic element controlling fermentative metabolism and excretion of amino acids by *Citrobacter intermedius* C3». *Journal of Bacteriology*, 119, p. 9-19.
- [17] JOFRE, J.; PRIETO, M. J.; TOMÁS, J.; PARÉS, R. (1979). «Excretion of glutamic acid in *Citrobacter intermedius* C3 associated with plasmid deoxyribonucleic acid». *Journal of Bacteriology*, 138, p. 721-725.
- [18] VIVES-REGO, J.; JUÁREZ, A.; IMPERIAL, J.; PARÉS, R. (1980). «Correlation between isocitrate dehydrogenase activity and glutamate excretion by *Citrobacter intermedius* C3». *Journal of General Microbiology*, 122, p. 167-170.
- [19] SAN MILLAN, A.; TOLL-RIERA, M.; QI, Q.; BETTS, A.; HOPKINSON, R.; MCCULLAGH, J. M.; MAC LEAN, R. C. (2018). «Integrative analysis of fitness and metabolic effects of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1». *The ISMe Journal*, 12, p. 3014-3024.

- [20] GAMA, J. A.; ZILHAO, R.; DIONISIO, F. (2018). «Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance». *Plasmid*, 99, p. 82-88.
- [21] LANG, K. S.; JOHNSON, T. J. (2015). «Transcriptomic modulations due to A/C2 plasmid acquisition». *Plasmid*, 80, p. 83-89.
- [22] LETEK, M. [et al.] (2010). «The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions». *PLOS Genetics*, 6, e1001145.
- [23] PAYTUBI, S.; AZNAR, S.; MADRID, C.; BALSALBORE, C.; DILLON, S. C.; DORMAN, C. J.; JUÁREZ, A. (2014). «A novel role for antibiotic resistance plasmids in facilitating *Salmonella* adaptation to non-host environments». *Environmental Microbiology*, 16, p. 950-962.
- [24] SANTIAGO, A. E. [et al.] (2017). «The AraC negative regulator family modulates the activity of histone-like proteins in pathogenic bacteria». *PLOS Pathog.*, 13 (8), e1006545.
- [25] DOYLE, M.; FOKES, M.; IVENS, A.; MANGAN, M. W.; WAIN, J.; DORMAN, C. J. (2007). «An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria». *Science*, 3125, p. 251-252.