

ELS ESTATS DEL FACTOR S I ELS FENOTIPS DE LES CÈL·LULES CORRESPONENTS

per JOAN JOFRE

Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències
(Universitat de Barcelona)

INTRODUCCIÓ

Dues cèl·lules fenotípicament diferents es troben formant part d'una descendència clonal en una proporció constant de cadascuna quan la població és suficientment gran, sigui el que sigui dels dos tipus de cèl·lules el que dona lloc a la dita població.

Això es troba en contradicció amb alguns fets generals de la microbiologia, com és ara el concepte de cultiu pur o bé els principis generals de mutació i regulació gènica.

Aquests fenotips potser difereixin en molts aspectes, bé que nosaltres per a llur estudi prenem un marcador definit per a diferenciar-los. Mentre que un tipus de cèl·lules excreten alanina i glutàmic al medi, l'altre no. Anomenarem EG⁺ les que excreten, i EG⁻ les que no. Dues raons fan que treballem sobre aquest marcador particular. Primerament, perquè fou estudiant la segregació d'aminoàcids quan foren trobats els dos fenotips, i, d'altra part, per la facilitat de detectar els dos tipus utilitzant la tècnica de revelat amb soques auxotròfiques, en el nostre cas concretament amb la soca *P 60* de *Leuconostoc mesenteroides* segons ha estat descrit per PARÉS, GUINEA i HERNÁNDEZ^{3,7}.

Els primers estudis fets a la soca *Citrobacter intermedium C3* per PARÉS, GUINEA i HERNÁNDEZ feren pensar en la presència d'un factor episòmic, que fou anomenat factor S. Aquesta suposició no era sinó la base d'un model de treball que, des d'un punt de vista especulatiu, plantejava la possibilitat formal de relacionar una sèrie de situacions d'aquest factor S. Hom ha de tenir en compte que molts experiments han hagut d'ésser fets amb poblacions no uniformes, tant pel que fa als fenotips com

al factor S. Aquest fet ens portarà a un nombre definit de fenotips molt més petits que el nombre de poblacions diferents.

Per tant, calien uns experiments que permetessin d'interpretar cada població real. Per això el primer problema que es plantejà fou el de l'eliminació del factor S, que havia de portar-nos a l'obtenció d'una població homogènia.

Després d'evidències indirectes de l'acció del taronja d'acridina, hom assajà l'esmentada eliminació amb aquest colorant. VALOIX obtingué, després del tractament amb taronja d'acridina, soques que donaven sempre poblacions uniformes i que mai no excretaven aminoàcids al medi després de quasi dos anys de subcultiu.

Hi ha una sèrie de raons que feren que es plantegés el problema de si realment aquests tipus de soques eren descendents d'una sola bactèria que inicialment tenia el factor S.

Aquestes possibilitats d'error a la troballa de soques S⁻ són les següents:

Presenten diferències fenotípiques molt importants en relació amb la soca original. A més, entre elles també presenten algunes diferències, bé que no entre les qualitats més significatives.

Malgrat que són uns quants els diversos investigadors que han aconseguit soques S⁻, aquestes no són obtingudes regularment en tots els experiments, sinó que llur obtenció depèn en gran part de l'atzar.

El taronja d'acridina és també un agent mutagen important. No podem, doncs, excloure la possibilitat que aquestes soques que anomenem S⁻ hagin sofert un dany general en llur material hereditari i que deixin d'excretar per alguna mutació en particular que no tingui cap relació amb la pèrdua del factor S, i que aquest romangui present a l'interior de les cèl·lules, bé que cap d'elles no excreti aminoàcids.

La selecció és indirecta, puix que seleccionem les possibles soques que han estat deslliurades del factor S, per la dimensió de les colònies, basant-nos en el fet que les cèl·lules no segregadores tenen un temps de generació més llarg que les segregadores. No seleccionem directament no segregadores, per la impossibilitat experimental de diferenciar d'entre les colònies no segregadores les que han perdut el factor S.

Finalment, si pensem que la ciència ha d'ésser explícitament objectiva i que, per tant (malgrat que les nostres experiències són objectives), un treball com aquest (que ha arribat a uns alts nivells de sofisticació) requereix un alt nivell d'exigència formal, no és absurd de pensar en una possibilitat de contaminació.

Aleshores, davant totes aquestes possibilitats, hom establí uns criteris que fessin vàlides les nostres experiències. El primer punt era tenir la seguretat que realment fossin descendents d'una cèl·lula determinada, i el

segon, poder saber que es tractava de la pèrdua del factor S i no d'una mutació.

La primera part es resol fàcilment obtenint cèl·lules amb un marcador genètic que ens permeti de seguir d'una forma clara una descendència clonal. Pensàrem que les mutants auxotròfiques eren un material idoni per a aquest tipus d'estudis.

Hom pot solventar el segon problema mitjançant dos tipus d'experiències. D'una banda es fa necessària l'obtenció de soques S⁻ per altres procediments diferents del taronja d'acridina, la qual cosa redueix la possibilitat de causar el mateix dany al material cromosòmic. D'altra part, si aconseguim que per herència infecciosa es recuperi altra vegada el caràcter excretor, resta pràcticament exclosa la possibilitat que l'efecte del taronja d'acridina sigui una mutació i no l'eliminació del factor S.

Amb els experiments que esmentem a continuació deixem resolts aquests problemes.

CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES I RESULTATS

Obtenció de mutants auxotròfiques. — Ha estat duta a terme d'acord amb els procediments generals descrits a la literatura. Pot ésser dividida en tres parts: mutagènesi, contraselecció i identificació.

Mutagènesi. — Ha estat emprat un fort element mutagen com és ara la N-metil-N-nitro-N-nitroso-guanidina (NTG).

Sobre una suspensió d'aproximadament 10^7 - 10^8 cèl./ml. en amortidor trismaleic, 1/20 molar i a pH = 6, afegim NTG de manera que aconseguim una concentració de 100 µg/ml. Aquesta és una innovació que ens indicà el professor GRAHAM⁵ quan vingué a Barcelona amb motiu del 3.^{er} Congrés Nacional de Microbiologia, ja que fins aleshores el tractament es feia arreu amb brou ordinari i concentracions més febles de NTG (30 µg./ml.), puix que era generalment acceptada la idea que aquest agent mutagen semblava que actuava sobre les cèl·lules amb divisió i, per tant, el seu tractament s'havia de fer sobre un medi de creixement de les bacteries. Cal incubar-ho a 37° C, durant 30 minuts i amb agitació.

Hom ho filtra per tal de concentrar la població bacteriana que ha sobreviscut al tractament de NTG, i ho renta per eliminar les restes de l'agent mutagen.

Contraselecció. — Les cèl·lules sobrevivents són incubades una nit a 30° C. Després hom ho filtra, renta i torna a suspendre en M₁ i s'hi afegeixen 20.000 U.I./ml. de penicil·lina. Com que el M₁ és un medi mínim,

les cèl·lules auxotròfiques per algun aminoàcid o nucleòtid no es divideixen. D'aquesta manera, en actuar la penicil·lina únicament sobre les cèl·lules que es van dividint, enriqueim extraordinàriament de bacteries auxotròfiques la població bacteriana amb què treballem.

Hom filtra, renta i torna a suspendre la població sobrevivent al tractament amb penicil·lina en 10 ml de R 1/4.

Identificació. — De la suspensió en R 1/4, hom n'espargeix sobre plaques d'agar ordinari. D'aquelles plaques en què creix un nombre adequat de colònies, de 20 a 50, hom fa una rèplica sobre plaques de medi mínim M₁, utilitzant un tampó de vellut segons va descriure Ledelberg.

Les colònies que creixen sobre agar ordinari i no sobre M₁ són considerades auxotròfiques.

Seguint un enginyós sistema descrit per HOLIDAY⁴, a base de fer uns medis amb unes barreges d'aminoàcids convenients, s'arriba fàcilment a determinar quins són llurs requeriments.

Resultats. — Seguint aquest sistema, hem obtingut un bon nombre de mutants auxotròfiques per a diferents metabòlits, entre ells per a: metionina, cisteïna, vitamines, prolina, guanosina, histidina, diaminopimèlic, serina-glicocol·la, aminoàcids aromàtics, lisina, purines, ileucina-valina, arginina i treonina.

OBTENCIÓ DE SOQUES S⁻ PER DIFERENTS PROCEDIMENTS

Eliminació o curat per taronja d'acridina. — Aquest colorant és considerat un agent eficaç per a la curació d'alguns episomes, no de tots, puix que se sap que alguns factors són resistents a ésser eliminats per ell.

El camí seguit és el següent: Hom posa en suspensió una colònia C (no segregadora) procedent d'un revelat de C₃ en 10 ml. de R 1/4.

En un tub amb M₁ més 40γ de taronja d'acridina per ml., de manera que la població inicial oscil·li entre 10 i 100 cèl./ml., hom incuba 12-18 hores a 30° C, amb agitació i amb el medi protegit de la llum, puix que el taronja d'acridina és fotolàbil.

A les 12-18 hores hom n'agafa una part al·lòquina i la porta altra vegada a M₁ més 40γ d'OA/ml., de manera que la població inicial sigui del mateix ordre que en el primer tractament.

Es repeteix fins a 8-10 tractaments, i finalment hom ho sembla damunt plaques de M₁-Agar. Al cap de dos o tres dies d'incubació a 30° C apareix un nou tipus de colònia de la qual farem una dissociació i anàlisi colonial.

Com hem dit abans, no sempre hom n'obté resultats positius. Probablement aquest fet és degut que moltes vegades hom selecciona formes amb el factor S integrat, que creixen més ràpidament, i probablement també degut que les soques S⁻ creixen molt dificultosament sobre M₁ més OA.

Curat per bromur d'etidi (BE). — Per tal de complementar els estudis fets amb OA, pensarem en el BE, puix que és considerat un dels reactius químics més efectius per a la curació d'episomes¹.

Com en el cas anterior, partim d'una colònia C, i en un tub amb M₁ més BE ($7,5 \times 10^{-5}$ M) inoculem una població inicial de 10^2 - 10^3 cèl./ml. És incubada 24 hores amb forta agitació, que hom millora mitjançant dues barretes de vidre de diferent diàmetre i llargada. En aquest cas és més eficient el tractament en presència de llum.

Tot seguit hom procedeix de la mateixa manera que en el cas anterior.

Tampoc ací hom no troba sempre resultats positius. Creiem que les raons són les mateixes que en el cas anterior.

Enriquiment de cèl·lules S⁻ en una població de la soca salvatge de C₃. — Pensarem que, si el model inicial que havia estat proposat per a explicar el comportament del factor S era correcte, hi havia d'haver una petita possibilitat que en una població de la soca salvatge C₃ hom trobés per accident alguna cèl·lula S⁻. Aleshores, com que totes les soques S⁻ que teníem eren resistents al bacteriòfag F₁ (bacteriòfag específic de *C. intermedium* C₃ aïllat d'aigua residual de paperera), si sotmetíem la població bacteriana a una forta pressió selectiva a favor de les resistents al bacteriòfag, algun dels diferents tipus de resistents al bacteriòfag seria el corresponent a les cèl·lules S⁻.

El procediment és senzill, ja que no cal sinó afegir una forta quantitat de bacteriòfags a una població bacteriana que és a la fase de creixement exponencial, i hom les incuba conjuntament durant una nit. Després hom sembla les cèl·lules sobrevivents sobre plaques de M₁.

El procés continua com en els casos anteriors i hom n'obté els mateixos resultats.

Resultats. — En els tres casos han estat obtingudes soques S⁻, bé marcades per algun aminoàcid, bé sense marcar. Amb taronja d'acridina, VALOIX, VALLESPINÓS i l'autor obtingueren soques sense marcar; últimament, FUSTÉ n'ha obtingudes de marcades per histidina.

Amb BE han estat obtingudes soques S⁻ marcades per arginina.

Per selecció amb bacteriòfag, han estat obtingudes soques S⁻ sense marcar i d'altres de marcades per arginina.

Totes elles presenten una sèrie de característiques comunes, com és ara la pèrdua del metabolisme fermentatiu, pèrdua de sensibilitat al bacteriòfag F₁, canvis morfològics, etc.

REVERSIÓ S⁻ → S⁺ PER TRANSFERÈNCIA INFECCIOSA

Després d'unes primeres dades obtingudes per VALOIX, emprenguérem la tasca d'aconseguir experiments de reversió totalment crítics amb donadors que tinguessin diferent marcador que l'acceptor i així poder-los diferenciar fàcilment.

El mètode emprat fou el mateix que havia estat descrit per als experiments de transferència a *P. intermedium* ATCC 11606 per GUINEA i PARÉS. Hom va introduir-hi una lleugera modificació, que consistí a inocular una part alíquota de la barreja entre dadors i acceptors després de les dues hores d'incubació conjunta en un medi on només creixia la soca acceptadora. D'aquesta manera hom donava temps a les cèl·lules que haguessin rebut el factor S a multiplicar-lo i integrar-lo, i d'aquesta manera augmentaria el nombre de cèl·lules que l'haurien rebut i el de les que excretarien aminoàcids. Hom ho espargí sobre M₁, de manera que només cresquessin les cèl·lules de la soca acceptora, i hom n'escollí les colònies que tenien el creixement més ràpid.

Els resultats d'aquestes experiències estan relacionats a la taula I.

CONCLUSIONS

Primerament resta provat que hom pot eliminar el factor S pels mètodes usuals d'una manera irreversible, no incompatible amb la viabilitat cel·lular.

En segon lloc, veiem que és transmissible per infecció, bé interspecífica, com ha estat provat amb *P. intermedium*, bé intraspecífica, com resta demostrat per les experiències de reversió S⁻ → S⁺.

Tenint en compte els criteris de selecció seguits per a l'obtenció, tant de soques S⁻ com de soques revertides, hom no pot assegurar que el fenotip que ens donen les soques S⁻ sigui unívoc. Podem pensar que se'ns presenti un fenomen semblant als factors F'. El fet que la velocitat de transferència que obtenim en la reversió sigui més petita que l'obtinguda per la transferència a *P. intermedium*, dona una certa base per a pensar en aquesta possibilitat.

Aquests fets concrets ens donen una base molt ferma per a explicar la relació entre els diferents fenotips de les diverses poblacions i el model

TAULA I. — *Experiments de reversió S⁻ → S⁺*

Experiments de reversió S ⁻ → S ⁺	Experiments Soca dadora	Soca S ⁻	Comportament especial	Velocitat de reversió	Nombre de colònies comptades	Experiments independents
1	3 MA7 (Ileu ⁻)	S ₁ ⁻ (curat per AO)	MC (CMS Oxoid)	0	7550	3
2	»	S _π ⁻ (curat per AO)		2,3 × 10 ⁻⁴	8725	3
3	»	S _{rt} ⁻ (obtingut per selecció fàgica)		1,8 × 10 ⁻³	2750	2
4	»	Arg ⁻ 439 (curat per EB)	Arg ⁻	1,5 × 10 ⁻⁴	5802	2
5	5 MA1 (His ⁻)	S ₁ ⁻	MC (CMS Oxoid)	0	16530	3
6	»	S _π ⁻		0	10530	3
7	»	S _{rt} ⁻		1,3 × 10 ⁻⁴	14520	3
8	»	Arg ⁻ 439	Arg ⁻	0	6486	3
9	<i>C. intermedium</i> C3	<i>P. intermedium</i> 11606	lac ⁻ a 24 h.	8,8 × 10 ⁻²	540	6

QUADRE I

Estats possibles del factor S i fenotips de les cèl·lules corresponents a les diferents poblacions bacterianes.

Estat del factor S	Obtenció	Tipus de població	Excreció de glutamat	O/F	Lactosa	Sensibilitat a les sals bilials	Sensibilitat UV	KCN	Sensibilitat al bacteriòfag	Temps de en M ₁ generació
C ₃ (1)	Tipus salvatge. Després de regressió espontània de (2) i (3). Després de la reversió infecciosa de (4).	Integrat o autònom. En el primer cas, preferentment en un <i>locus</i> làbil. En el segon, amb un nombre variable per cèl·lula.	0,6	+/+	+	baixa	1	+	+	1
S ⁺ sg ⁺ (2)	Enriquida amb AO o estreptomicina.	Integrada preferentment en un <i>locus</i> més estable.	0,9-1	+/+	+	baixa	< 1	+	+	< 1
S ⁺ sg ⁻ (3)	Curació parcial amb AO o EB.	Cèl·lules amb pocs elements autònoms.	0	+/+	+	baixa	> 1	+	+	> 1
S ⁻ (4)	Curat amb AO, EB, fag F1.	Absent.	0	+/-	-	alta	>> 1	±	-	>> 1
<i>P. intermedium</i> (5)	ATCC 11606.	Absent.	0	+/+	retardada	baixa	no provada	+	-	1
<i>P. intermedium</i> (6)	Després de la infecció dels donants C ₃ .	Integrat en un <i>locus</i> relativament estable.	1	+/+	retardada	baixa	no provada	+	-	1

proposat segons estudis fets anteriorment per PARÉS, GUINEA, HERNÁNDEZ i GUERRERO.

Vegem ara els diferents estats que hom postula per al factor S, i després veurem els fenotips corresponents reunits en un quadre.

Hom ha aconseguit integració permanent després d'infecció en *P. intermedium* i selecció de les S⁺. Segons dades de VALOIX, si hom fa l'anàlisi d'una colònia segregadora, troba meitat i meitat d'elements excretors i no excretors. Però si hom fa una anàlisi colonial de la descendència d'aquests excretors, trobem que el 100 % alliberen aminoàcids al medi i així continuen comportant-se després de subcultius usccessius. Així, doncs, cal pensar que en *P. intermedium* s'integra en un *locus* molt estable.

Ha estat obtinguda integració quasi permanent a *C. intermedium* C₃ després de selecció d'excretors resistents a estreptomicona.

Hom aconsegueix fàcilment amb OA poblacions enriquides amb elements excretors, si comença el tractament amb un inòcul elevat. Això es basa en el fet que, a l'estat integrat del factor S, les cèl·lules es multipliquen més ràpidament, i el factor S, a l'estat integrat, no té sensibilitat diferencial a l'OA. En aquest tipus de població es planteja el problema que, segons els estudis cinètics portats a terme per GUINEA i HERNÁNDEZ⁸, el pas EG⁺ → EG⁻ és de l'ordre d'un 1 %, la qual cosa fa que al cap de 8-10 generacions arribin a l'equilibri. Aquest fet, junt amb el dels excretors resistents a l'estreptomicona, fa pensar en l'existència de diferents *loci* d'integració amb diferents graus d'estabilitat. És possible que els més estables siguin zones de més feble homologia, que podrien estar lligades a l'existència de factors S' tal i com hem esmentat abans. En aquest cas els *loci* més estables serien els seleccionats.

Dins una població de la soca salvatge C₃, el factor S es trobaria en un equilibri integració-desintegració. De l'estudi de la cinètica de canvi, deduïm que seria integrat preferentment en un *locus* poc estable. En el cas que es trobi en estat autònom, es dividiria independentment del cromosoma i també més ràpidament, puix que, si no, la població aviat es veuria rentada. En arribar a un nombre determinat dins el citoplasma bacterià, hi hauria una alta probabilitat d'integració; en passar a l'estat integrat, hi hauria un rentat de la resta d'elements autònoms.

Hom pot obtenir, per tractament amb OA de petits inòculs, poblacions enriquides amb elements no excretors. De fet això no seria sinó una etapa en el camí de rentat total que hem esmentat abans.

Al quadre I esmentem les diferències fenotípiques que hom troba entre aquestes diferents poblacions.

Així doncs, a les diferents poblacions de C₃ estudiades, resta coherent el model que hom havia proposat inicialment per explicar el comportament de la població de la soca C₃.

DISCUSSIÓ

Davant tots aquests fets, hom planteja dues preguntes. La primera és si, com assenyala DAVIS, en el concepte inicial de JACOB i WOLLMAN resta implicada la intranscendència dels factors episòmics enfront de la viabilitat del bacteri, de què la resistència episòmica als antibiòtics no representa una excepció formal.

El segon punt, molt lligat amb aquest, és preguntar-nos si és possible que continuem veient el fenomen de la variabilitat bacteriana com a resultat d'un grup d'acoblament que anomenem cromosoma. El nombre creixent de fenòmens coneguts independents del cromosoma bacterià fa pensar que l'esmentat cromosoma és com una mena de fórmula de compromís amb un paper semblant al que tenen les lleis de Mendel en la genètica dels organismes superiors.

Podem pensar que la genètica bacteriana realment sempre ha estat molt lluny de la genètica dels organismes eucariotes i que, de fet, caldria, considerar-la com a molt més diversificada; tot i que el seu emparellament amb la genètica dels eucariotes, després dels descobriments de BEADLE i TATUM, DELBRÜCK i LURIA i LEDELBERG, fou molt favorable per al seu desenvolupament, i també per al de la genètica dels eucariotes. Pensem que un fet semblant es donà en els estudis de metabolisme bacterià; al principi hom pensava només en un metabolisme de tipus oxidatiu com en els éssers superiors, però després hom anà veient uns altres tipus metabòlics, o sigui que, de fet, en els bacteris, les possibilitats d'adaptació en aquest sentit són molt més grans.

Aquest fet d'una pluralitat de mecanismes en els procariotes és força explicable, si els acceptem com a precursors dels eucariotes i, per tant, hem de pensar que han de tenir un nombre molt més gran de camins per a resoldre els mateixos problemes.

És realment molt excitant per a nosaltres l'estudi de l'herència extracromosòmica, puix que veiem la importància creixent que hom dóna als plàsmids i episomes, no solament pel nombre de fenòmens que actualment controlen a les poblacions bacterianes, sinó també pel paper que poden haver representat en l'evolució dins el pas de procariotes a eucariotes. En aquest segon aspecte ha estat llançada una hipòtesi, potser una mica atrevida, però molt suggeridora, que complementa la idea que els diferents orgànuls de les cèl·lules eucariotes haurien estat originats per simbiosi de diferents procariotes^{2, 6}; però aquesta teoria no és suficient per a explicar l'acumulació inicial d'àcids nucleics per a formar el nucli

primitiu. Adeshores sembla que una acumulació de plàsmids en els avantpassats dels eucariotes dóna una solució força versemblant a aquest problema⁸.

BIBLIOGRAFIA

1. BOUANCHAUD, D. H., SCAVIZZI, M. R. i CHABBERT, Y. A.: *Elimination by E.B. of Antibiotics Resistance in Enterobacteria and Staphylococci*. «J. Gen. Microbiol.», 54, 417-425 (1969).
2. FLAVELL, R.: *Mitochondria and Chloroplast as Descendants of Prokaryotes*. «Biochemical Genetics», Vol. 6, núm. 4 (1972).
3. HERNÁNDEZ, S.: *Segregación de glutamato en C. intermedium C3 como propiedad determinada por la presencia de un factor episómico*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona (1968).
4. HOLIDAY, R.: *A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms*. «Nature» (1956).
5. INGRAHAM, J.: Comunicació personal.
6. MARGULIS, L.: *Symbiosis and Evolution*. «Scientific American» (1971).
7. PARÉS, R.: *El factor S de Citrobacter intermedium C3*. Real Academia de Farmacia. Sesión inaugural (1973).
8. SONEA, S.: *Bacterial plasmid instrumental in the origin of eucariotes?* «Rev. Can Biol.» (1972).