

# El operón lactosa desde La Mesada: mi experiencia con Jacob y Monod.

Carmen Sánchez de Rivas, investigadora *ad-honorem* de CONICET (Argentina).

Con la reciente desaparición de François Jacob (19 de Abril 2013), se ha ido el último de los 3 investigadores que recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1965 (Jacob, Monod y Lwoff). Ese premio coronaba los trabajos sobre *La regulación de la expresión genética de la síntesis de enzimas y de virus bacterianos*, para muchos la consagración del operón\* [1].

Hoy, cuando ya han pasado más de 50 años desde la publicación de dichos trabajos, es importante destacar la conjunción de saberes e intereses involucrados tanto en la elucidación de la regulación de la lisogenia\*\*, como de la síntesis de enzimas metabólicas. Fueron los estudios realizados sobre virus bacterianos (bacteriófagos), de la lisogenia e inducción de profagos, de la transferencia de genes por conjugación, de la inducción cigótica\*\*\*, llevados a cabo primero por André Lwoff, luego por François Jacob y Elie Wollman, los que condujeron a Monod y Jacob a

Carmen Sánchez de Rivas, (Barcelona, 1939): licenciada en Química y Fisiología, doctor de 3º ciclo en Bioquímica (Université de Paris VI, Faculté des Sciences). Desarrolló su carrera científica entre Francia (Instituto Pasteur y Universidad de Orsay) y Argentina (Universidad de Buenos Aires). Actualmente participa de un grupo de investigación sobre *Bacterias Gram positivas, sus fagos y estrés*. Es investigadora *ad-honorem* del CONICET (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) de Argentina.



asociarse para elucidar ese complejo regulatorio que también permitiría explicar cómo la bacteria *Escherichia coli* regula los genes involucrados en la utilización de la lactosa como fuente de carbono.

Durante y después de la II Guerra Mundial, se fue reuniendo un grupo importante de investigadores bajo la protección y el auspicio de A. Lwoff, que se alojaron en los altillos del Institut Pasteur (*le grenier*) del edificio de Química Biológica. Monod primero y luego Jacob, se encontraron aquí después de haber participado muy activamente en la Guerra. Jacques Monod tuvo una participación muy intensa en la resistencia acompañando al Partido Comunista, aunque rara vez habló de ello. Sin embargo, le acarreo importantes dificultades para obtener el visado en cada viaje que hacía a EE.UU.! Jacob, con apenas 20 años y solo iniciados sus estudios de Medicina, se unió al General De Gaulle en Londres, fue enviado posteriormente a combatir en África del Norte y trabajó como cirujano. Durante el desembarco de Normandía resultó gravemente herido. En este sentido, Jacob ha sido uno de los pocos combatientes *Compagnon de la Libération* nombrados por el General de Gaulle [4].

En 1954-55, después de varios años de convivencia en el altillo, J. Monod fue nombrado jefe de servicio y se mudó a la planta baja donde le adjudicaron una área importante, que denominaría *Service de Biochimie Cellulaire*. Eso permitió aumentar las posibilidades del 'grenier' y compartir las bibliotecas donde se realizaban los seminarios, y un comedor. En 1958 después de terminar 3 años de estudios de técnica en Bioquímica, tuve la oportunidad de comenzar a trabajar con Jacques Monod. En aquel tiempo Monod estaba entrevistando a jóvenes, posibles ayudantes, para completar el grupo que necesitaban él y sus colegas en el nuevo departamento. Monod me contrató en su equipo y empezó para mí esa gran aventura personal de la investigación científica. Monod me presentó a A. Lwoff para que intercediera en mi nombramiento como técnica del IP. La figura de Lwoff infundía un gran respeto e incluso un punto de temor al conjunto de técnicos e investigadores; he de decir que su escritorio se encontraba en un rincón escondido del altillo y la puerta estaba protegida por sus secretarías. Sin embargo, también es cierto que siempre me recibió con su mayor sonrisa y le divertía verme en los seminarios, ya que no era habitual ver a jóvenes técnicas en ese entorno.

Rápidamente, Monod me introdujo en el estudio de las curvas de inducción de la  $\beta$ -galactosidasa, ensayos enzimológicos e inmunológicos. En aquel momento, para estudiar la  $\beta$ -Gal en una gran cantidad de cepas, primero se permeabilizaban los cultivos con detergente y tolueno para luego agregar el sustrato (ONPG) y medir la enzima por el color amarillo del orto-nitro-fenol liberado. Eso nos llevó a poner a punto un buffer que permitía la mayor actividad reproducible, que nombramos PM2, y posteriormente fue rebautizado como 'Buffer Z...'; y también introdujimos el bicarbonato de sodio para frenar la reacción. Medición de permeasas, de transacetylases en las mutantes, con diferentes inductores gratuitos o no, eran los elementos de trabajo cotidianos. Aprendí a organizar protocolos y experimentos, a redactar y analizar los resultados para luego comentarlos con el profesor Monod.

Al mediodía o una vez finalizaban los seminarios, investigadores, técnicos y visitantes de ambos grupos nos solíamos reunir para comer en el 'comedor', que era un amplio corredor vidriado al lado de la biblioteca. Uno de los ritos era el café que preparaba Sarah Rapkine. La mayoría de los científicos que estaban 'construyendo' la Biología Molecular realizaban diferentes estancias en el laboratorio.

Entre el altillo y nuestro servicio, había un ascensor estrecho sin demasiada seguridad -más parecido al montacargas de una obra en construcción- que permitía el tránsito de tubos, placas de Petri, e ideas entre los 2 equipos.

Todas las mañanas, Jacob solía pasar rápidamente por nuestro laboratorio antes de encerrarse con sus técnicas, Martine y Danièle, para analizar los colores de las colonias en las placas de Petri, resultantes de la eficiencia de degradación de la lactosa, de las cepas sometidas a mutágenos como UV, RX..., y repicar, aislar y programar con detalle los siguientes experimentos. Después de visualizar sus placas, seleccionaba una gran cantidad de 'mutantes' que luego 'bajaban' a nuestro laboratorio. Madeleine Jolit (la otra técnica de Monod) se encargaba del mapeo de las mismas. Yo analizaba las enzimas del sistema en varias condiciones de crecimiento. Los datos eran analizados y contabilizados en función de la inducción o no y repetidos. Una nomenclatura apropiada de las cepas y mutantes nos permitía saber si se trataba de cepas HFR (dadoras) o F-receptoras para la conjugación\*\*\*; de cepas salvajes para el operón lactosa o mutantes de UV o RX en alguno de sus genes, auxótrofos, etc.



Jacques Monod y Carmen Sánchez en 1960. Foto Madeleine Brunerie, Institut Pasteur.

Jacob, al que llamábamos *Le grand François*, volvía por la tarde a nuestro laboratorio para 'controlar' resultados y discutirlos con Monod. Su escritorio se comunicaba con el laboratorio y en ese horario solíamos compartir el té con Madeleine, David Perrin, Gérard Buttin, y otros invitados. Solo permanecía ajeno el silencioso Shiro Naono, que no compartía ni el idioma ni las costumbres culinarias, y menos aún 'nuestro té', pero nos regalaba su mejor sonrisa como oriental bien educado!

Las discusiones eran intensas, y David intervenía continuamente. Poco a poco, Monod solía desplegar un mapa sobre el escritorio donde se ubicaban las mutantes y las actividades enzimáticas, inducidas o no. El 'modelo' aparecía y se analizaba qué experimentos y construcciones faltaban para ser más convincente[1]. El aislamiento de plásmidos F'\*\*\* permitió obtener merodiploides\*\*\* estables para el operón Lac, construir fusiones de Lac a otros operones y avanzar con el modelo[2]. Muchas tardes, Jacob se paseaba con cierta impaciencia esperando los resultados: ¡La aparición del amarillo en los tubos del experimento en curso! Los 'experimentos del siglo' eran cotidianos y todos creíamos en ellos, hasta que después de varias horas o días de trabajo nos convencían de que el resultado no era el adecuado y el mismo quedaba "enterrado en el armario de resultados no explicables". Jacob desaparecía en cuanto vislumbraba que el resultado era negativo. Muchos días nos venía a convencer de lo importante del experimento, 'copiando' a Monod que tenía como principio explicarnos tanto las metas de los experimentos como las bases de las técnicas y aparatos utilizados.

Recuerdo que muchas noches yo volvía al laboratorio, antes de que cerraran la entrada principal del Instituto, bien para terminar algún experimento, cambiar muestras en el contador de centelleo, repicar cultivos, etc. Entonces escuchaba el paso del sereno que venía apagando el gas y las luces, dejando sonar su ristra de llaves que turbaban el silencio de la noche; parecía un personaje de novela siniestra. Nunca tuve que saltar la reja para entrar como muchos de mis compañeros, pero sí entré en más de una ocasión a través del acceso del hospital.

En aquel tiempo, además de los seminarios que se realizaban de forma cotidiana, un viernes al mes todos nos desplazábamos a la biblioteca del →





Monod, Carmen Sánchez y André Lwoff en 1960. Foto Madeleine Brunerie, Institut Pasteur.



François Jacob y Sarah Rapkine.



Mme. Odette Monod y Carmen Sánchez en 1960. Foto Madeleine Brunerie, Institut Pasteur.

Institut de Physico-chimie, en el barrio latino, donde se realizaban seminarios más importantes (Club de Physiologie Cellulaire) con la presencia de invitados extranjeros.

Monod quiso desde el principio que yo estuviese presente en todos los seminarios y después me hacía un examen y yo le escribía un informe del mismo.

Recuerdo las clases de genética que Jacob dictó en el Collège de France, que eran un verdadero placer por su calidad, imaginación y humor.

La clase inaugural de Monod en el Collège de France, en 1967, donde presentó su primer ensayo sobre el análisis filosófico de la ciencia, levantó mucha controversia e impactó tanto a científicos como a filósofos. “¿Cómo un científico se atreve hablar de Filosofía?” Ese fue el inicio de sus nuevas preocupaciones, que plasmó en su libro *Le hasard et la nécessité*, aún hoy tema de análisis y discusión en clases de Filosofía<sup>[6]</sup>.

La presencia de Monod en los seminarios era a la vez apreciada y temida, ya que tenía la facultad de incomodar a cualquiera que hiciese alguna pregunta que él considerase absurda o poco elaborada. Su mirada dejaba ‘clavado’ a uno en su silla y sus reflexiones podían llegar a ser descalificadoras. Por otro lado, su capacidad de análisis, de síntesis, le permitía ‘explicar’ al expositor los alcances de sus resultados, los experimentos que faltaban..., incluso en terrenos no directamente ligados a su especialidad, lo que la mayoría admiraba y respetaba.

Entusiasta, cordial, atento, ese era el ‘Jacques’ que describe también Jacob y es el que estimuló mi compromiso con la ciencia, el que me permitió terminar mis estudios universitarios. Tuve la suerte de participar en lo que fue la gran aventura del operón y más tarde en plena euforia de la Alostera<sup>\*\*\*[3]</sup> participé en muchos experimentos sobre enzimas alostéricas con JP Changeux<sup>[8]</sup>. Al finalizar mi licenciatura, me ‘confiaron’ analizar a la GDH (glutámico-deshidrogenasa) de *E. coli* para poner en evidencia sus propiedades alostéricas. Purificación, cinéticas de todo tipo, determinación de la velocidad de sedimentación, de *K<sub>m</sub>* y *K<sub>i</sub>* de diferentes sustratos en las dos direcciones..., todas mostraban el comportamiento esperable para una enzima alostérica, pero ninguna ‘nueva’ propiedad para ‘el modelo’, así que solo quedó en mis cuadernos! Después de más de 1 año, esta línea de trabajo fue abandonada<sup>[7]</sup>; no se publicaba nada que no fuese considerado como novedoso y aceptado por *le patron*. ¡Cuál hubiese sido su asombro (y alegría) si hubiese descubierto que el Represor, su represor Lac, es una proteína alostérica!<sup>[9]</sup>

Cuando mi carrera científica estuvo encaminada, Monod puso una luz de alerta: “Carmen, este oficio es muy duro, déjesele a los muchachos!”. Toda una explícita opinión que muestra lo difícil que ha sido para las mujeres el acceso al mundo de la ciencia, como lo analiza Sandra Legout<sup>[16]</sup>. Aunque hubo muchas científicas trabajando en su laboratorio, creo que he sido la única mujer en haber realizado una tesis bajo su dirección.

También conocí al otro protagonista, ‘Monod’. Así como todos pudimos comprobar y apreciar su creatividad e inteligencia, podía ser extremadamente rígido en ‘modificar’ cualquier aspecto referido al ‘dogma central’: ADN-> ARNm proteínas. No resultó fácil que aceptara la regulación positiva\* de arabinosa (Engelsbeg en 5) y más próxima de nosotros, la de maltosa (M Schwart en 5). En ese contexto mis resultados de Tesis sobre, ‘La represión catabólica en el operón lactosa’, que proponían una regulación a nivel traduccional, o la presencia de un segundo promotor para el inicio de la traducción (lo que después sería una secuencia Shine-Delgarno), no fueron ‘bienvenidos’ y no se publicaron! Prefirió ahondar en los estudios de represión catabólica con los efectos del AMPc, donde



Premios Nobel de 1965. Por la derecha Dr. Robert B. Woodward (Química), Julian Schinger y Richard P. Feynman (Física), François Jacob, André Lwoff y Jacques Monod (Fisiología o Medicina), Michael A. Sholokhov (Literatura). Institut Pasteur/Service des Archives.

se pusieron en evidencia efectos regulatorios a nivel transcripcional<sup>[11]</sup>. Pronto aparecerían trabajos mostrando efectos regulatorios de la represión catabólica a nivel de traducción<sup>[12]</sup>; yo misma, lejos del Instituto, pude aportar datos en ese sentido<sup>[13]</sup>.

Con el paso del tiempo, Monod fue ganando terreno. Este se exacerbó por su necesidad incomprensible de cortejo que algunos fomentaron. A muchos nos pareció lamentable su paso del té al whisky rodeado de una corte adicta, ya que en nuestra opinión no necesitaba de ella para ser valorado. Su intransigencia en aceptar resultados ‘diferentes’, sobre todo cuando sus impulsores no participaban de ‘la corte’, le llevaron a cometer injusticias. Así es como no entendió o aceptó los resultados de la ‘transcriptasa reversa’<sup>\*\*\*\*\*</sup> en bacterias, que describía Mirko Beljanski ya en 1967<sup>[14]</sup> en su propio *Service* antes que H. Temin lo hiciera en virus<sup>[15]</sup>, lo que le valió el Premio Nobel junto con D. Baltimore y R. Dulbecco en 1975. En cambio se cometió una gran discriminación con Mirko tanto en términos científicos como en lo que respecta a los recursos que le facilitaron en el Instituto. Precisamente en esa época, durante mis experimentos sobre represión catabólica, sugerí que otros mecanismos diferentes del represor podrían intervenir en la regulación de Lac. Entonces pensé que una transcriptasa reversa podría jugar un rol en ese tipo de regulación. Medí esa enzima en condiciones o no de represión catabólica y observé diferencias significativas que podrían justificar un tipo de regulación por otra vía. Pese a las advertencias de David (*¡Le patron n’aimera pas ça!*), cuando me encontré con Monod para analizar los progresos de mi trabajo, traté primero de convencerme de lo poco fiables que eran los datos (y de la ‘enzima de Mirko!’) y, tras mi resistencia e insistencia en un

análisis más científico, me conminó a abandonar esa línea.

Hacia los años 70, Jacob se dedicó al estudio de organismos eucariotas (ratones) y se mudó al nuevo edificio Jacques Monod, al otro lado de la calle. Era toda una aventura cruzar la calle del Dr. Roux donde se encuentran la cripta de Pasteur y la Biblioteca Central, testigos de otra época. En ese lugar, en Año Nuevo, los directores ofrecían al personal sus deseos de felicidad. ¡También en la fecha de la muerte de Pasteur se realizaba una conmemoración con todo el personal que luego desfilaríamos por la cripta para dar el pésame a las autoridades! ¡Dos importantes ocasiones para ‘cruzar’ la calle!

Monod, en cambio, dejó el laboratorio por la dirección del Institut Pasteur donde reorganizó tanto la obtención de recursos como la distribución de grupos: los proyectos de investigación se realizarían en París; las aplicaciones y producción en Garches, todo un revuelo. ¡en el Instituto Pasteur! En una conversación que tuve con F. Jacob en 2010, repasamos nuestra visión de la ciencia actual: demasiado justificada hacia las ‘aplicaciones’. Para ambos fue un placer recordar lo que fue el periodo excitante que nos tocó vivir; lo que algunos denominaron ‘la fiebre de la Biología Molecular’. Solo 2 periodos de su vida fueron tan excitantes, el otro fue su vivencia en África del Norte durante los combates y como médico durante la II Guerra Mundial.

Hoy, 50 años después de esas vivencias y muchos kilómetros de por medio, sigo valorando lo importante que fue encontrarme ahí en ese momento y con ese entorno tan excepcional, lo que encendió la llama estimulante (*le feu sacré*) que me permite continuar siempre mas allá, pese a las trabas con las cuales nos tropezamos en el día a día. ■ →



**Bibliografía**

- [1] 1960 "L'opéron: groupe de gènes à expression coordonnée par un opérateur". F. Jacob, D. Perrin, C. Sanchez et J. Monod. *Compt. Rend Acad. Sci.* 250, 1727-1729
- [2] 1961 "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins". F. Jacob & J. Monod. *J Mol Biol* 3: 318-336
- [3] 1963 "Allosteric proteins and cellular control systems". Monod, J., Changeux, J.-P., and Jacob, F. (1963) *J. Mol. Biol.* 6, 306-329
- [4] 1987. "La Statue Intérieure". F. Jacob Editions Odile Jacob
- [5] 1980. "Les origines de la Biologie Moléculaire : Hommage à Jacques Monod". A. Lwoff & A. Ullmann. *Collection Academic Press*
- [6] 1970. "Le hasard et la nécessité. Essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne". J. Monod, *Éditions du Seuil*
- [7] 1964-1965-"Caracterización y parámetros enzimológicos de la L-glutamato-deshidrogenasa de *E. coli*". C. Sánchez, J. Monod & J.P. Changeux. Inédito
- [8] 1966. "Sur les propriétés de la l-thréonine désaminase de biosynthèse d'un mutant d'*E. coli* K12". C. Sanchez, J.P. Changeux. *Bull. Soc. Chi. Biol.* 48, 705-713
- [9] 2009. "Allostery in the LacI/GalR family: variations on a theme". L. Swint-Kruse and KS Matthews. *Current Opinion in Microbiology* 12:129-137
- [10] 1968 "Etude de l'effet glucose sur l'opéron lactose d'*E. coli* K12". C. Sánchez, Tesis de 3er ciclo en Bioquímica, Universidad de París VI. Noviembre 1968. Director: J. Monod
- [11] 1968- "Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*". Ullmann A. & J. Monod. *J. Febs Letters* vol2 nº1: 57-60
- [12] 1969- "Catabolite Repression of the lac operon: repression of translation". M. D. Yudkin and V. Moses. *Biochem. J.* (1969) 113, 423
- [13] 1976- "Catabolite translational effects on the lac messenger RNA of *E. coli* K12". C. Sanchez-Rivas & B. Mendez. *Molec. Gen. Genet.* 148, 98-104.
- [14] 1972 Synthèse *in vitro* de l'ADN sur une matrice d'ARN para une transcriptase d'*Escherichia coli*. Beljanski M. *Compt Rend Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1972 May 1. 5:274 (20):2801-4.
- [15] 1972 "The RNA tumor viruses--background and foreground". Temin HM. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1972 Apr;69 (4):1016-20
- [16] 2013 "Les femmes pasteurienues: de la "cuisine" à la paillasse". Sandra LEGOUT. Conférence culturelle du Musée Pasteur. 21 février 2013.

**OPERÓN\***

Para una determinada función (metabolismo de la lactosa) se requieren una serie de enzimas ( $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosil permeasa, transacetilasa). Los genes correspondientes se encuentran asociados estructuralmente y responden coordinadamente a un equipo de reguladores (proteínas y secuencia operador) formando un operón. Las interacciones ambientales permitirán (regulación positiva) o no (regulación negativa) la transcripción de la conjunta (unidad transcripcional) para luego producir las proteínas necesarias a la función. En el caso de regulación negativa (como Lac) el inductor (lactosa y/o alolactosa) intercepta la asociación del represor al ADN (operador) y permite la transcripción del conjunto. La presencia de glucosa, fuente de carbono preferente, interfiere la capacidad de inducción de la lactosa ejerciendo represión catabólica. Solo al agotar la glucosa se expresan los genes lac; en esas condiciones las curvas de crecimiento muestran 2 etapas con diferentes velocidades de crecimiento separadas por una meseta (diauxia).

**PROFAGO Y LISOGENIA\*\***

Algunos virus de bacterias (bacteriófagos o fagos) pueden permanecer 'mudos' al interior de su huésped en forma de profago y se dice que su huésped es lisógeno para ese fago. Eso implica que la bacteria es inmune



Carmen Sánchez y el grupo de investigadores y estudiantes en la Universidad de Buenos Aires.

a virus similares; sin embargo en ciertas condiciones (de estrés) el profago se puede 'despertar' y lisar al huésped.

**CONJUGACIÓN\*\*\***

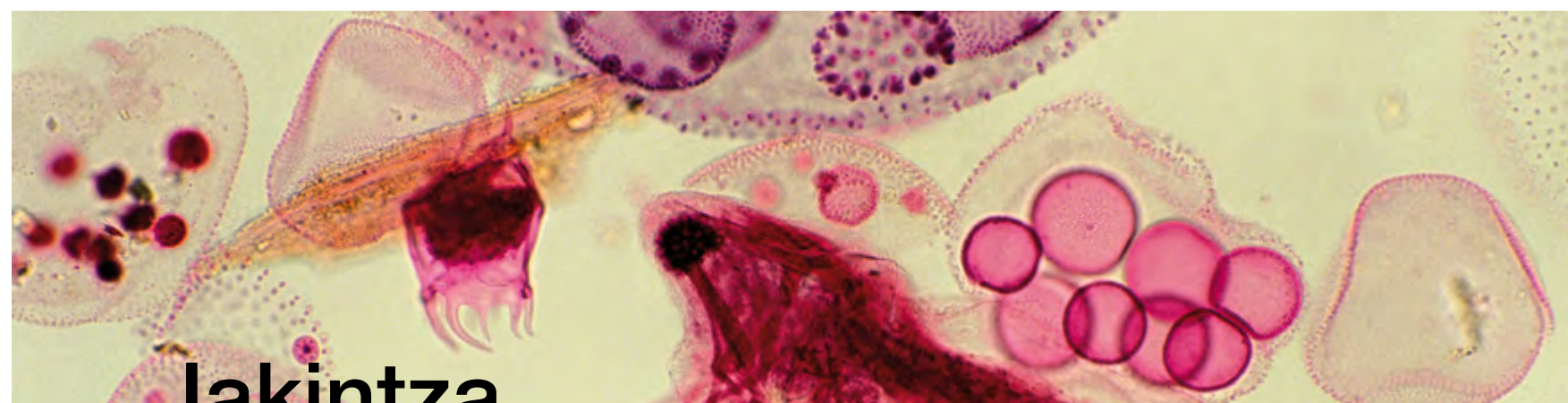
Se puso en evidencia en bacterias, primero en *Escherichia coli*, lo que permitió hablar de la sexualidad de las bacterias. Algunas cepas tienen la capacidad de transferir con alta eficiencia su genoma (HFR, por alta frecuencia de recombinación) a otras bacterias receptoras en una secuencia de tiempo relacionada con la posición de los genes en el cromosoma. Se debe a la presencia de un factor F integrado a su genoma ausente en la aceptora (F-). En algunos casos se han podido aislar cepas portadoras del factor F en forma de plásmido que al escindirse del genoma bacteriano conllevan algunos de los genes (F' o F prima). Eso permite construir diploides parciales para esos genes (merodiploides). Cuando el ADN entrante es portador de un profago, y la bacteria receptora es susceptible a ese fago, en el momento en que ingresa el profago en la cepa receptora este provoca la lisis (inducción cigótica). Esto se debe a la ausencia de represor del ciclo lítico en el receptor.

**ALOSTERIA\*\*\*\***

Las proteínas alostéricas son multímeros en los cuales la unión de una molécula de efector (substrato o inhibidor) a uno de sus monómeros (protómero) provoca un cambio conformacional que modifica la afinidad ( $K_m$ ,  $K_i$ ) y/o la velocidad de la reacción ( $V_{max}$ ) por el efector.

**TRANSCRIPTASA REVERSA\*\*\*\*\***

Son enzimas que a partir de ARN, sintetizan ADN. Los virus cuyo genoma es ARN, requieren de esta enzima para poder permanecer y asociarse al genoma del huésped.



# Jakintza eta ikerketa unibertsoa

## Universo de conocimiento e investigación

Euskal Herriko Unibertsitatea etengabeko mugimendua duen eremu bat da, unibertso ireki eta aurreratu bat. Ikerketa eta garapen teknologikoa gizarte hobea sortzen parte hartzeko abiatu dugun bidea dira.

La Universidad del País Vasco es un espacio en constante movimiento, un universo abierto y avanzado. La investigación y el desarrollo tecnológico son el camino que hemos emprendido para participar en la creación de una sociedad mejor.