Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Anna Maria Salvatore

Effetti di piccole concentrazioni di timina esogena sul comportamento di un mutante $^{-}$ di E. coli

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **73** (1982), n.1-4, p. 64–73.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1982_8_73_1-4_64_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

Articolo digitalizzato nel quadro del programma bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica) SIMAI & UMI
http://www.bdim.eu/

Biofisica. — *Effetti di piccole concentrazioni di timina esogena sul comportamento di un mutante thy⁻ di* E. coli (*). Nota (**) di ANNA MARIA SALVATORE, presentata dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — In this research the behaviour of an auxotrophic strain of *E. coli* in the presence of different concentrations of thymine in a synthetic growth medium has been determined.

Experimental growth curves have shown that at low concentrations of thymine (< 0.05 μg/ml) the bacteria underwent the thymineless death, although the " death rate " of the cells was in this case considerably reduced.

At thymine concentrations between 0.05 and 0.12 μg/ml, the number of viable cells remained constant for several hours.

Still higher concentrations of thymine allowed cell division to proceed, although with considerably longer generation times than those typical of normal growth.

Ai primi lavori di Barner e Cohen nel 1954 [1–3] hanno fatto seguito numerosi tentativi da parte di altri ricercatori di spiegare la « morte » delle cellule per mancanza di timina ma, nonostante la gran quantità di dati raccolti, il fenomeno non è stato ancora chiarito.

Con « morte per mancanza di timina » (t.l.d.) si indica il particolare comportamento osservato in cellule incapaci di sintetizzare timina quando queste, in fase di crescita esponenziale, vengono trasferite in un terreno di coltura mancante di timina (— T). A 37 °C, il numero delle cellule vitali *non diminuisce* [4] per i primi 30 minuti circa a partire dal trasferimento nel mezzo (— T), poi, in modo brusco, le cellule incominciano a perdere esponenzialmente la capacità di riprodursi, con un tempo di dimezzamento τ' di 10–12 minuti [5].

Nessuna delle numerose ipotesi avanzate finora, per esempio la rottura in più punti di una [6–7] o di entrambe [8] le eliche della molecola di DNA o il verificarsi di errori « irreparabili » nella replicazione [3–9], forse attraverso la sostituzione nel DNA di molecole di timina con uracile [10] o con N–metilamino purina [11], sembra capace di fornire una spiegazione convincente di tutti gli aspetti del fenomeno di t.l.d.

Si può però ora escludere con certezza l'ipotesi avanzata più volte che molecole di timina siano direttamente coinvolte nella sintesi di qualche componente dell'involucro cellulare [12–13] o nella formazione del setto [14]. Risultati sperimentali ottenuti nel nostro laboratorio [4] mostrano infatti che il processo di divisione cellulare non è influenzato, almeno inizialmente, dalla

(*) Ricerca finanziata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche.
(**) Pervenuta all'Accademia il 20 luglio 1982.

mancanza di timina esogena: durante i primi minuti nel mezzo (— T) le cellule continuano a dividersi normalmente con τ uguale a quello pre-shift.

Altri risultati sono derivati inoltre dall'analisi biochimica di cellule in condizioni di t.l.d., per esempio l'accumulo di molecole di deossiadenosina trifosfato (dATP) che si produce nelle cellule trattate [5], e dallo studio della produzione di fagi o colicine [15, 16, 17] indotta in alcuni ceppi di *E. coli* dalla privazione di timina. Ancora, lo studio della sensibilità alla t.l.d. di mutanti *rec* ha suggerito un possibile ruolo che l'endonucleasi V avrebbe nel proteggere le cellule dalla « morte » per assenza di timina [18].

Questi risultati sembrano però aver messo in luce effetti probabilmente solo secondari del fenomeno senza aver dato alcuna indicazione chiara sui reali meccanismi d'azione.

La grande quantità delle informazioni raccolte fino ad oggi, i numerosi tentativi e le ipotesi diverse ancora in discussione mostrano quindi una fenomenologia particolarmente complessa.

I problemi legati allo studio dei mutanti auxotrofi per la timina conservano tuttavia l'interesse iniziale: la conoscenza del meccanismo di t.l.d. e la possibilità, variando la concentrazione di timina del mezzo, di produrre variazioni nella durata del ciclo di replicazione del DNA promettono ancora, infatti, di fornire informazioni importanti sui principi generali di regolazione dei processi cellulari.

I risultati sperimentali presentati qui sono i primi risultati ottenuti quindi nel tentativo di riaffrontare in modo diverso il problema. Si vuole tentare cioè di scoprire aspetti nuovi del fenomeno attraverso uno studio dettagliato del comportamento di batteri thy$^-$ in presenza di *piccole quantità di timina* nel brodo di coltura.

BATTERI E CONDIZIONI DI CRESCITA

I batteri usati per questi esperimenti sono del ceppo TAU di *E. coli* precedentemente descritto [19].

Le colture sono state incubate aerobicamente a 37 °C in terreno sintetico M9 al quale sono stati inoltre aggiunti, oltre a timina, L-arginina (100 μg/ml), uracile (10 μg/ml), L-prolina (45 μg/ml), L-metionina (45 μg/ml), L-triptofano (45 μg/ml), ed L-leucina (20 μg/ml).

Il numero delle cellule vitali è stato determinato mediante conteggio delle colonie su agar. All'agar molle sono stati aggiunti timina, L-arginina ed uracile.

Il trasferimento delle cellule dal terreno ad alta concentrazione di timina a quello a concentrazione più bassa è stato ottenuto diluendo la coltura, a 37 °C, in terreno privo di timina.

Per lo studio delle cellule in completa assenza di timina nel mezzo la coltura è stata indifferentemente filtrata (filtri MILLIPORE, 0.3 μ, 25 mm) o diluita di un fattore 2000 in terreno privo di timina. Il comportamento delle cellule, come verificato sperimentalmente, è infatti uguale nei due casi.

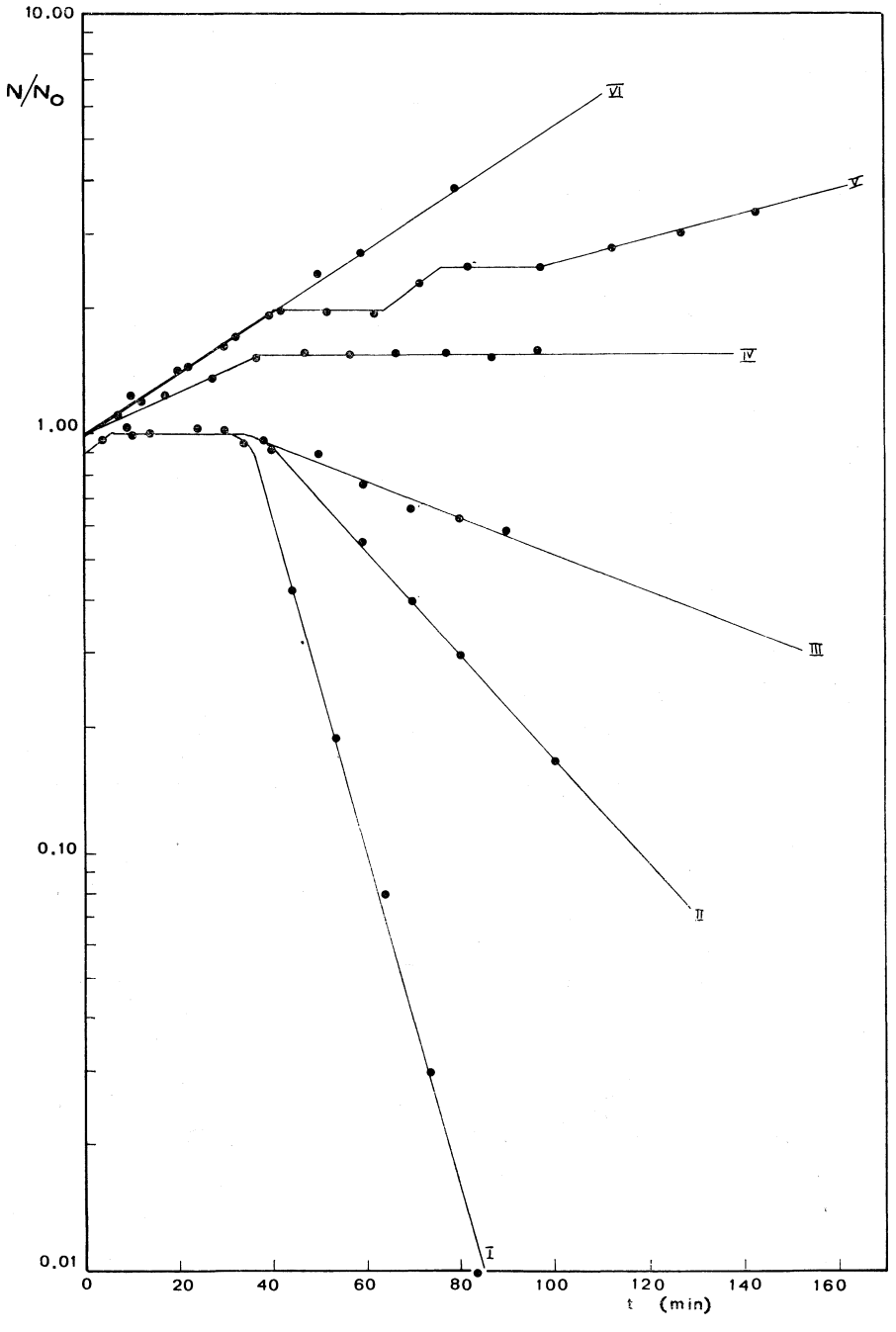

Fig. 1. – Comportamento dei batteri TAU in funzione della concentrazione di timina esogena. Le curve I–VI corrispondono nell'ordine alle concentrazioni di timina di 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.15 e 20 γ/ml.

RISULTATI

A partire dalla completa assenza di timina nel terreno di coltura, il comportamento delle cellule è stato studiato a concentrazioni via via più elevate fino a quelle che consentono ai batteri TAU un normale andamento di crescita esponenziale ($\tau = 40$–45 min).

Per ogni concentrazione di timina studiata è stato determinato in funzione del tempo il numero di cellule vitali mediante conteggio delle colonie su agar.

Le curve sperimentali riportate qui rappresentano il comportamento delle cellule subito dopo un shift (al tempo $t = 0$ min) da un mezzo ad alta concentrazione di timina, in cui le cellule sono in fase di crescita esponenziale, a quello a concentrazione di timina più bassa.

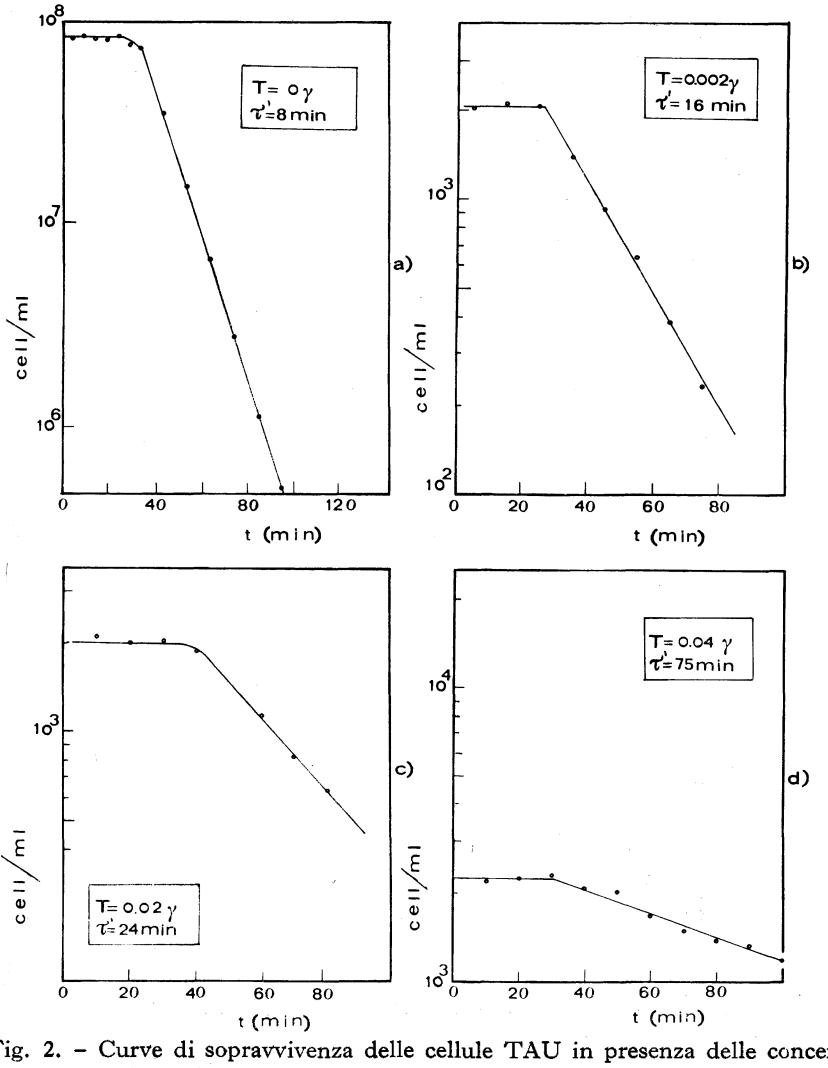

Fig. 2. – Curve di sopravvivenza delle cellule TAU in presenza delle concentrazioni di timina di *a*) 0, *b*) 0.002, *c*) 0.02 e *d*) 0.04 γ/ml.

La concentrazione di timina nelle condizioni iniziali di crescita, 2 μg/ml in tutti gli esperimenti descritti, è la concentrazione minima che consente ai batteri di questo ceppo una normale velocità di crescita ($\tau = 40$–45 min).

I risultati ottenuti sono riassunti in un quadro generale in fig. 1.

Nelle figure successive sono riportati i risultati in dettaglio: le curve sperimentali sono state ora divise in gruppi che individuano, ciascuno, intervalli di concentrazioni di timina entro i quali il comportamento delle cellule è qualitativamente lo stesso.

Le curve in fig. 2 mostrano il caratteristico andamento di « morte » osservato in completa assenza di timina continua a manifestarsi anche per piccole quantità di timina nel mezzo. L'intervallo di concentrazioni individuato è compreso, per i batteri del ceppo TAU, tra 0 e 0.04 μg/ml. L'esame di questo gruppo di curve indica una durata costante, circa 30 minuti, del periodo di tempo che precede la fase di perdita di vitalità delle cellule ma le diverse concentrazioni di timina nel mezzo influenzano fortemente il tempo di dimezzamento dei batteri. τ', inizialmente 8–10 minuti, aumenta infatti rapidamente fino al valore di 75 minuti all'aumentare della concentrazione di timina nell'intervallo indicato.

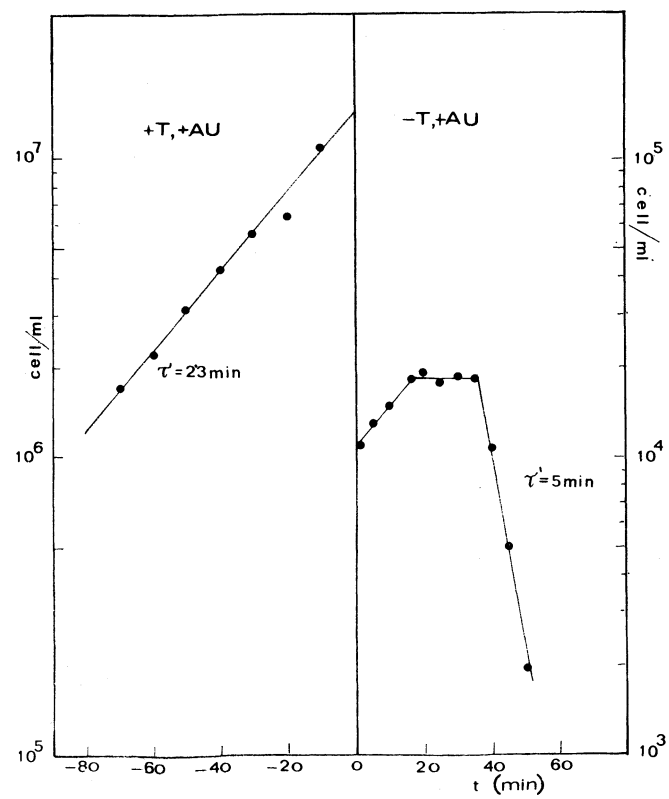

Fig. 3. - Curva di sopravvivenza di *E. coli* TAU in assenza di timina. Prima del trasferimento nel mezzo (—T) le cellule si dividono ogni 23 minuti.

Il risultato riportato in fig. 3 indica ancora un altro aspetto nuovo: la rapidità del fenomeno di « morte » non è solo funzione della concentrazione di timina ma dipende anche dal tempo di generazione delle cellule al momento

del trattamento. Quando batteri TAU in crescita molto rapida ($\tau = 23$ min) sono stati infatti sottoposti a t.l.d. il valore di τ' trovato è di soli 5 minuti [4].

Per concentrazioni di timina appena superiori a 0.04 μg/ml il comportamento dei batteri studiati cambia improvvisamente (figg. 4 e 5). Dalla concen-

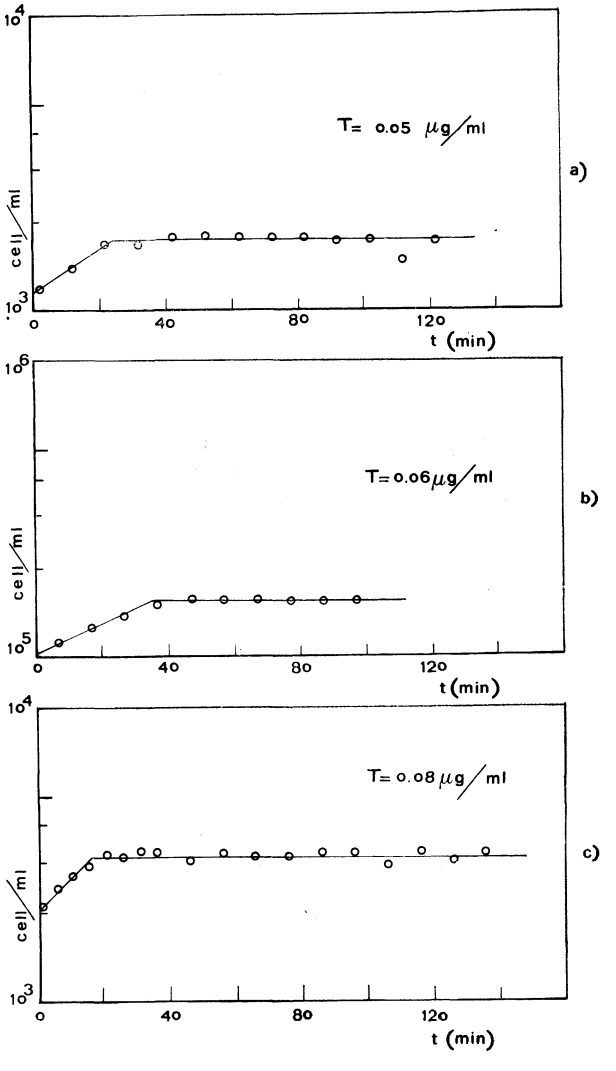

Fig. 4. – Curve di crescita di *E. coli* TAU in presenza delle concentrazioni di timina di *a*) 0.05, *b*) 0.06, *c*) 0.08 γ/ml.

trazione di 0.05, infatti, fino a quella di 0.12 μg/ml, una frazione di cellule non inferiore al 50% del numero iniziale è in grado di dividersi una volta nel nuovo mezzo, poi nessuna cellula perde la capacità di riprodursi per un lungo intervallo di tempo della durata di almeno quattro ore (gli esperimenti non sono stati portati avanti per un tempo più lungo).

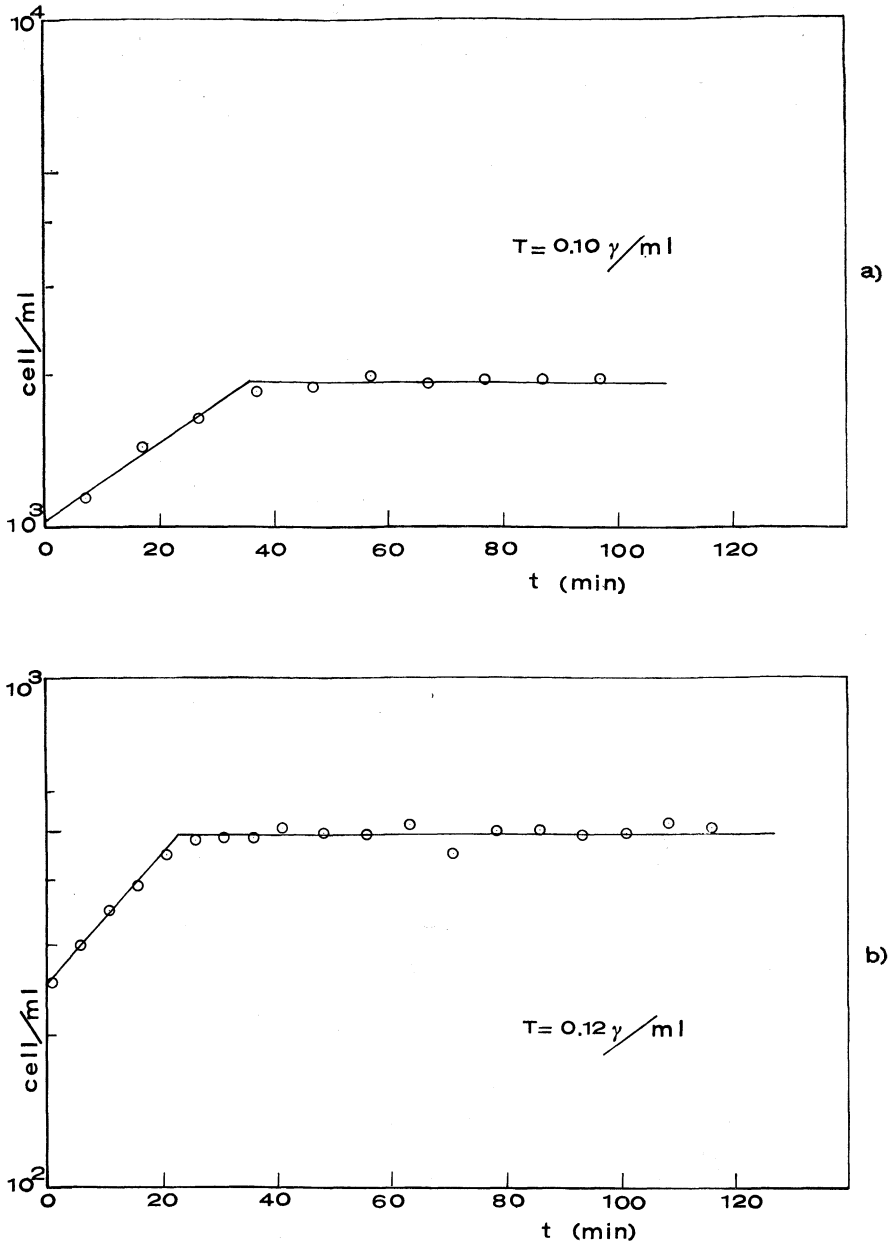

Fig. 5. – Curve di crescita di *E. coli* TAU in presenza delle concentrazioni di timina di *a*) 0.10 e *b*) 0.12 γ/ml.

Ancora diversi sono gli andamenti di crescita osservati nel piccolo intervallo di concentrazioni di timina compreso tra 0.15 e 0.30 μg/ml. In queste condizioni (fig. 6) tutte le cellule si dividono una volta alla stessa velocità pre-shift, una piccola frazione di queste si divide poi rapidamente una seconda

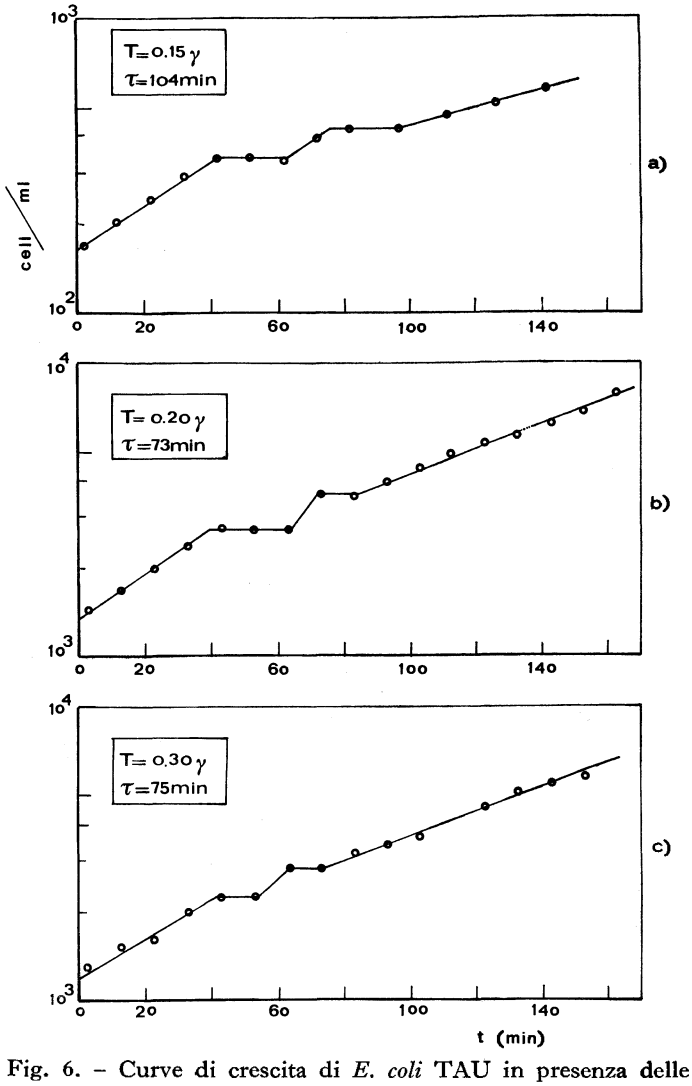

Fig. 6. – Curve di crescita di *E. coli* TAU in presenza delle concentrazioni di timina di *a*) 0.15, *b*) 0.20 e *c*) 0.30 γ/ml.

volta, quindi la curva di crescita riassume un andamento esponenziale ma con un τ ora molto più lungo di 40 minuti.

In presenza di concentrazioni di timina superiori a 2 μg/ml, fino a quella studiata di 20 μg/ml, è stato poi osservato un normale andamento esponenziale di crescita senza nessuna variazione apprezzabile di τ.

DISCUSSIONE

Lo studio descritto dei batteri TAU fornisce ora un quadro completo del comportamento di questi batteri in risposta a variazioni della concentrazione di timina nel mezzo di coltura.

I risultati ottenuti (fig. 1) sembrano indicare che la capacità delle cellule thy$^-$ di riprodursi ed i loro tempi di divisione seguono con una specie di « continuità » la diminuzione di concentrazione di timina esogena. L'aspetto nuovo del fenomeno che essi mettono in luce è cioè la presenza, in corrispondenza di ben definiti intervalli di concentrazioni di timina, di andamenti di crescita « intermedi » tra la normale crescita esponenziale e la « morte » delle cellule.

In particolare, il gruppo di risultati in figg. 3 e 4 rivela l'esistenza di condizioni in cui i processi di divisione cellulare sono bloccati in tutte le cellule già 40–50 minuti dopo il momento dello shift ma nelle quali tutte le cellule conservano inalterata per un tempo molto lungo la capacità di riprodursi non appena venga restituita timina in quantità sufficiente. Questa situazione è di particolare interesse: essa suggerisce infatti la possibilità che il fenomeno di « morte » delle cellule sia solo la manifestazione ultima di un meccanismo che opera già in presenza di concentrazioni di timina più elevate senza però produrre ancora in queste condizioni danni cellulari irreversibili.

Un'ulteriore indicazione in questo senso deriva dalle curve di t.l.d. (fig. 5). Anche la velocità con cui le cellule perdono la capacità di riprodursi dipende infatti dalla concentrazione di timina nel mezzo.

Questi gruppi di risultati aprono quindi un nuovo campo d'indagine.

Ulteriore materiale di ricerca è costituito ancora dalle curve in fig. 2. Esse possono consentire infatti lo studio dei meccanismi attraverso i quali l'impoverimento del pool di dTTP che si produce nelle cellule riduce la velocità di replicazione del DNA.

Si è fatta qui l'ipotesi, sulla base delle attuali conoscenze, che il solo effetto primario di una concentrazione limitante di timina sia quello di produrre una diminuzione nella velocità con cui i nucleotidi vengono aggiunti alla catena polimerica di DNA in crescita [20–21]. Non c'è però nessuna evidenza sperimentale che questi meccanismi e quelli responsabili del fenomeno di t.l.d. siano collegati tra loro.

Quest'ultimo gruppo di risultati ripropone comunque un problema più generale riguardante l'organizzazione temporale dei processi cellulari. Non è ancora chiaro infatti se ed entro quali limiti velocità di crescita delle cellule e velocità di replicazione del cromosoma siano tra loro indipendenti come vuole il modello proposto da Helmstetter [22]. Nel ceppo TAU, τ è indipendente da C ma solo per concentrazioni di timina superiori a 2 μg/ml. (C è il tempo impiegato da una forchetta di replicazione a percorrere la lunghezza del cromosoma).

I problemi indicati, posti da questi primi risultati sperimentali, sono attualmente oggetto di ricerca.

Il presente lavoro è parte di un programma di ricerca finanziato dal Consiglio Nazionale delle Ricerche, ed è stato eseguito nel quadro dell'attività del gruppo di Biofisica dell'Istituto di Fisica dell'Università di Roma, associato al « Centro di studio acidi nucleici », del C.N.R.

BIBLIOGRAFIA

[1] H. D. BARNER e S. S. COHEN (1954) – « J. Bacteriol. », *68*, 80.
[2] H. D. BARNER e S. S. COHEN (1956) – « J. Bacteriol. », *71*, 149.
[3] H. D. BARNER e S. S. COHEN (1956) – « J. Bacteriol. », *72*, 115.
[4] A. M. SALVATORE – « Rend. Accad. Naz. Lincei », in corso di stampa.
[5] O. MAALØE e N. O. KJELDGAARD (1966) – « Control of Macromolecular synthesis », W. A. Benjamin, New York, Amsterdam.
[6] J. R. WALKER (1970) – « J. Bacteriol. », *104*, 1391.
[7] A. D. MENNIGMANN e W. SZYBALSKI (1962) – « Biochem. Biophys. Res. Commun. », *9*, 398.
[8] K. YOSHINAGA (1975) – « Biochim. Biophys. Acta », *294*, 204.
[9] O. MAALØE e P. C. HANAWALT (1961) – « J. Mol. Biol. », *3*, 144.
[10] A. KORNBERG (1980) – « DNA Replication », Freeman, San Francisco, p. 73.
[11] B. S. DUNN e J. D. SMITH (1955) – « Nature », *175*, 336.
[12] K. J. BEGG e W. D. DONACHIE (1978) – « J. Bacteriol. », *133*, 452.
[13] T. OKAZAKI, J. L. STROMINGER e R. OKAZAKI (1963) – « J. Bacteriol. », *86*, 118.
[14] W. D. DONACHIE e MILLICENT MASTERS (1969) – *Temporal Control of Gene Expression in Bacteria*, in: G. M. Padilla, G. L. Wihtson e I. L. Cameron eds., *The Cell Cycle*, « Gene-Enzyme Interaction », Academic Press, New York and London, pp. 69–72.
[15] N. E. MELECHEN e P. D. SKAAR (1962) – « Virology », *16*, 21.
[16] N. E. MELECHEN, G. Go e H. A. LOZERON (1978) – « Molec. gen. Genet. », *163*, 213.
[17] N. SICARD e R. DEVORET (1962) – « Compt. Rend. », *255*, 1417.
[18] S. I. AHMAD (1980) – « Z. Naturforsch. », *35*, 279.
[19] A. M. SALVATORE (1981) – Tesi di laurea. Istituto di Fisica dell'Università di Roma.
[20] R. H. PRITCHARD e A. ZARITSKY (1970) – « Nature », *226*, 126.
[21] P. A. MEACOCK, R. H. PRITCHARD e E. M. ROBERTS (1978) – « J. Bacteriol. », *133*, 320.
[22] C. HELMSTETTER, O. PIERUCCI, M. WEINBERGER, M. HOLMS e M. TANG (1979) – in *The Bacteria :* vol. vii, « Mechanism of Adaptation », Academic Press, New York.