
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIO AGENO

**Compartimenti funzionali nella cellula batterica. 2.
Ripresa della crescita dopo rinfresco della coltura**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 82 (1988), n.1, p. 145–150.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_1_145_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. — *Compartimenti funzionali nella cellula batterica. 2. Ripresa della crescita dopo rinfresco della coltura (*)*. Nota (**) del Cor-risp. MARIO AGENO.

ABSTRACT. — *Functional compartments in a Bacterial cell. 2: The resumption of Growth in a refreshing medium.* When some bacterial cells are removed from a saturated culture and transferred to a glucose-rich new medium, they resume growing if a set of conditions are satisfied. Glucose catabolism resumes almost immediately, as well as protein synthesis. However, cells do not divide during the first 30 ÷ 60 minutes, after which the cell number starts growing suddenly.

The lag can be due neither to insufficient energy supply to the cell, nor to a substance, synthesized constitutively, whose concentration does not reach a threshold.

We show that there are two kinds of molecules in the cell: *a)* building materials, which are products of glucose catabolism and grow in number exponentially with the age of the cell; and *b)* control molecules, which are coded in the DNA and grow in number parabolically with the age of the cell.

At the beginning, the effective lengths of the cells are smaller in the refreshing medium than in the mother culture during the exponential phase of growth. Now, the cells have an excess of DNA with regard to their length. They do not divide as far as the control molecules are sufficient in number to work out all the building materials. However, an exponential growth of the building materials eventually exceeds any parabolic growth of the control molecules, and the internal processes of the cell cannot remain coherent for ever.

When the level of inexhausted materials reaches an enzymatic threshold, the division process starts. In this way, cell division reveals itself a process of recovering.

KEY WORDS: Bacterial cell; Bacterial growth; Cell division.

RIASSUNTO. — Cellule trasferite da una coltura in saturazione in terreno fresco riprendono a crescere, se sono soddisfatte alcune condizioni. Se la coltura madre è rimasta in saturazione per non più di 2-3 ore, la sintesi proteica riprende immediatamente nel nuovo mezzo, mentre il numero delle cellule riprende a crescere esponenzialmente solo dopo un lag di 30-60 minuti.

Dopo aver escluse alcune presunte cause di tale lag, si fa notare che nella cellula sono presenti due categorie di molecole: 1) materiali da costruzione, che derivano dal catabolismo del glucosio, il cui numero cresce esponenzialmente al crescere dell'età della cellula; 2) molecole regolatrici (RNA e proteine), che sono codificate nel DNA e il cui numero totale, di conseguenza, cresce solo parabolicamente con l'età della cellula.

Nella coltura figlia, le cellule dell'inoculo sono di regola più piccole del normale

(*) Questa ricerca è stata in parte finanziata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato per la Fisica.

(**) Pervenuta all'Accademia il 9 settembre 1987.

e contengono un eccesso di DNA e di molecole regolatrici, rispetto al materiale nutritivo entrante, da elaborare chimicamente. Il materiale entrante cresce però esponenzialmente con l'età della cellula, e la sua crescita diventa a un certo punto più rapida della crescita del numero delle molecole regolatrici. Si forma quindi a un certo punto un surplus di materiale che non può essere elaborato, il che fa scattare, quando la relativa concentrazione supera la soglia di un enzima, il processo di divisione cellulare. Queste ipotesi, che la divisione cellulare sia essenzialmente un intervento correttivo, verrà ripresa e discussa in altro lavoro.

Abbiamo visto in un precedente lavoro [1] come la cellula batterica si possa idealmente considerare costituita da tre compartimenti funzionali (non identificabili con tre regioni della cellula stessa spazialmente distinte), il primo dei quali comprende tutte quelle funzioni, mediante le quali la cellula provvede ad alimentare se stessa in energia e materiali da elaborare chimicamente, rifornendone poi in forma appropriata gli altri compartimenti.

Abbiamo anche esaminato come questo primo compartimento possa rimettersi in moto, quando delle cellule quiescenti, provenienti da una coltura in saturazione, vengono trasferite in un nuovo mezzo, ricco di materiale nutritivo.

La ripresa della crescita e delle divisioni cellulari è naturalmente subordinata al fatto che per le cellule dell'inoculo siano soddisfatte alcune condizioni iniziali. Ad esempio:

1) ogni cellula deve ancora possedere una certa riserva interna di ATP, in assenza della quale non potrebbe incominciare ad attivare e quindi a metabolizzare il glucosio presente nel nuovo mezzo;

2) deve inoltre possedere un corredo di enzimi e fattori essenziali, in assenza dei quali non potrebbe incominciare a catabolizzare il glucosio e ad avviare la sintesi proteica. La mancanza anche di uno solo di questi enzimi (per esempio, di almeno una molecola di RNA-polimerasi DNA-dipendente) renderebbe la cellula incapace di sintetizzare, in particolare, l'enzima mancante e quindi di riprendere a crescere e a moltiplicarsi regolarmente.

Se tutte le condizioni iniziali sono soddisfatte, la cellula proveniente da una coltura in saturazione riprende a metabolizzare, quando venga trasferita in un nuovo mezzo, che supponiamo ricco di glucosio e in condizioni di ossigenazione non limitanti. Ci resta da discutere come questa ripresa possa aver luogo negli altri due compartimenti funzionali.

Il secondo compartimento è quello in cui i materiali ricevuti dal primo compartimento in forma di precursori vengono elaborati chimicamente in componenti specifiche (molecole e strutture) necessarie per l'espletamento di tutte le funzioni cellulari. Esso comprende in particolare l'intero macchinismo per la sintesi delle proteine.

Incominciamo col ricordare che il flusso di glucosio entrante nella cellula (in condizioni di normale funzionalità del primo compartimento) è presumibilmente proporzionale all'estensione della superficie batterica, con gli apparati

di trasporto (gruppi della fosfotrasferasi) distribuiti con densità costante su tale superficie, che lavorano sempre al massimo della loro portata.

Tale flusso entrante è concettualmente costituito da due frazioni. Una frazione e che viene completamente ossidata e che provvede al rifornimento di energia dell'intera cellula, in forma di 36 molecole di ATP sintetizzate da ADP e fosfato inorganico per molecola di glucoso ossidata. Ed una frazione $m = 1 - e$, che costituisce la materia prima per il raddoppio di tutte le componenti e le strutture cellulari. È questa seconda frazione che contribuisce all'incremento della massa batterica.

Se la cellula è dotata del suo normale corredo di molecole regolatrici, è da ritenere che e ed m siano costanti nel corso del ciclo cellulare. Da dati ricavati dalla letteratura [2], scende che per il ceppo *Escherichia coli* B/r'è, per esempio, nel corso della crescita esponenziale: $e \simeq m \simeq 1/2$.

Appena trasferite nel nuovo mezzo, le cellule riprendono a metabolizzare il glucoso: in un tempo sperimentalmente appena apprezzabile, che non supera i tre minuti, riprende la crescita esponenziale della densità ottica, il che significa che il secondo compartimento riprende subito a funzionare, non appena venuta meno quella carenza di glucoso che l'aveva bloccato nella coltura madre [3]. Tre minuti sono un tempo dell'ordine di grandezza del tempo richiesto perché nella sintesi proteica si raggiunga una fase stazionaria, a partire dal momento in cui ha ripreso la sintesi degli mRNA [4]. Ciò significa che le cellule hanno sostanzialmente conservato il corredo completo di enzimi e fattori proteici di cui disponevano nel corso della crescita esponenziale della coltura madre. Naturalmente, questo è ciò che sperimentalmente si osserva quando la coltura madre è rimasta nella fase di saturazione per un tempo non troppo lungo. Dopo due o tre ore di permanenza in tale fase, la situazione incomincia a cambiare. La ripresa della crescita della densità ottica nel rinfresco non è più così immediata: compare un lag, che va crescendo con l'aumentare del tempo di permanenza delle cellule in saturazione, e da un certo tempo in poi fa la sua comparsa anche una frazione via via crescente di cellule morte. Di questa fenomenologia ci occuperemo in un prossimo lavoro, limitandoci per il momento al caso in cui la ripresa delle cellule nel rinfresco è pressoché immediata.

Meno semplice è la ripresa del terzo compartimento funzionale della cellula, quello che comprende la duplicazione del cromosoma e l'intero processo di divisione cellulare. Ciò che sperimentalmente si osserva, almeno coi ceppi di *Escherichia coli* da noi studiati, è che, a differenza della crescita della densità ottica, la crescita della numerosità batterica non riprende subito dopo il rinfresco della coltura. In una prima fase, i batteri si allungano senza dividersi e le divisioni cellulari riprendono, col solito andamento esponenziale della numerosità, solo dopo un lag di almeno 30 minuti [5]. Ciò pone numerose questioni, per le quali occorre trovare una risposta.

1) Una prima giustificazione per l'esistenza di questo lag della numerosità batterica è offerta dalla considerazione seguente. Nell'ultima fase di crescita della coltura madre, i batteri avevano continuato per un tempo di $20 \div 30$ mi-

nuti a dividersi a densità ottica costante. È quindi da ritenere che la loro lunghezza media, almeno la lunghezza efficace ai fini dell'ingresso del glucoso, fosse diventata *minore* di quella che avevano nella precedente fase di crescita esponenziale della densità ottica, e che anche il loro corredo enzimatico, se non qualitativamente, fosse diventato quantitativamente più scarso che nei batteri normali della stessa età. Se nel rinfresco le divisioni cellulari riprendessero contemporaneamente alla ripresa della crescita della densità ottica, si otterrebbe una coltura in crescita esponenziale con batteri in media più piccoli e più poveri di enzimi di quelli della coltura madre.

Il lag della numerosità batterica nel rinfresco, mentre la densità ottica ha ripreso a crescere esponenzialmente, si presenta così come il tempo necessario perché i batteri riprendano le loro dimensioni medie normali e il loro normale corredo enzimatico. Questa ovviamente è una giustificazione, non una spiegazione del fatto.

2) Un orientamento per trovare una spiegazione è offerto da questa osservazione. La crescita della numerosità batterica alla fine del lag riprende di colpo esponenzialmente, senza traccia (di regola) di fenomeni di almeno parziale sincronizzazione dei batteri. Ciò significa che a un certo istante in tutti i batteri della coltura figlia riprende in modo sincrono la duplicazione del DNA, cioè l'avanzamento delle forchette replicative, che nella coltura madre si erano arrestate tutte allo stesso istante, al blocco delle divisioni cellulari. Poiché nella coltura sono contemporaneamente presenti batteri di ogni dimensione, ne segue che l'evento che determina la ripresa dell'avanzamento delle forchette replicative non è direttamente legato alle dimensioni dei batteri e neppure alla loro età.

3) Secondo dati reperiti in letteratura [6], per mantenere attiva la sintesi del DNA a partire dai nucleotidi trifosfati presintetizzati sarebbe necessario il consumo di 377 molecole di glucoso al secondo, mentre un batterio in condizioni di metabolismo normale assorbe dal mezzo $3,27 \cdot 10^5$ molecole di glucoso al secondo per micron di lunghezza. Ciò significa che per *Escherichia coli* K 12 ad esempio, il flusso energetico richiesto per riattivare la sintesi del DNA è appena qualche decimillesimo del flusso totale. Ciò rende estremamente improbabile che sia una richiesta energetica non soddisfatta che blocca l'avanzamento delle forchette replicative fino al momento in cui i batteri non abbiano raggiunto dimensioni (e quindi rifornimento energetico) sufficienti.

4) Un'altra osservazione importante ai fini di un orientamento per trovare una spiegazione del lag della numerosità batterica, sembra essere questa. Le concentrazioni delle sostanze normalmente presenti nel citoplasma non subiscono sostanziali variazioni all'atto della divisione cellulare. Analogamente, le concentrazioni di tutte le sostanze cellulari che vengono sintetizzate in quantità proporzionali al flusso di materiale entrante nella cellula, non subiscono sostanziali variazioni nel corso della crescita di quest'ultima. Ciò sembra escludere che una qualsiasi di queste sostanze, accumulandosi, raggiunga a un certo punto una soglia enzimatica, che faccia scattare la ripresa delle divisioni cellulari.

5) Questa ultima osservazione indica probabilmente la via giusta verso la soluzione del problema. Infatti, non tutte le sostanze presenti normalmente nella cellula vengono sintetizzate in quantità proporzionale al flusso di materiale entrante.

Le sostanze presenti nella cellula possono dividersi concettualmente in due categorie:

a) le sostanze che costituiscono nel loro complesso *materiale da costruzione*: sono prodotti del catabolismo del glucosio e vengono via via elaborate chimicamente fino a costituire molecole e strutture necessarie al funzionamento e alla crescita della cellula;

b) le molecole la cui struttura molecolare è codificata nel DNA e che chiameremo, con un termine generale solo parzialmente appropriato, *molecole regolatrici*: i vari tipi di RNA e le molecole proteiche in genere.

Mentre le prime costituiscono una ben determinata frazione del flusso di materiale entrante nella cellula, che nel suo complesso cresce quindi esponenzialmente col tempo, si può ritenere che le molecole regolatrici vengano sintetizzate in quantità complessivamente proporzionale alla quantità di DNA presente nella cellula, e che almeno in parte si accumulino. Siccome la quantità di DNA è costante nelle cellule durante il lag della numerosità batterica e cresce linearmente col tempo nelle cellule che stanno duplicando il loro cromosoma, si può ammettere che la quantità totale di molecole regolatrici di cui la cellula dispone ad ogni istante vada crescendo col tempo (con l'età della cellula) come una parabola del secondo ordine nel primo caso, del terzo ordine nel secondo caso.

La composizione del pool totale di molecole regolatrici della cellula è fissata dal punto di lavoro del sistema generale di regolazione della cellula stessa, a sua volta determinato dalle condizioni iniziali e dalle condizioni al contorno [7]. Queste sono fisse, finché vengono mantenute costanti le condizioni di crescita. Perché i processi cellulari possano continuare a svolgersi in modo regolare e coerente, occorre tuttavia ancora che la quantità totale di molecole regolatrici sia ad ogni istante sufficiente per elaborare tutto il materiale da costruzione entrante nella cellula: solo a queste condizioni non si creano squilibri o accumuli di materiale che non può essere elaborato.

Queste condizioni sono certamente soddisfatte per le cellule che da una coltura madre in saturazione vengono trasferite ad un nuovo terreno ricco di sostanze nutritive. Nella coltura madre, esse hanno continuato per un certo tempo a sintetizzare DNA a densità ottica costante: hanno un eccesso di DNA rispetto alla loro massa e presumibilmente anche alla loro lunghezza. Nelle nuove condizioni di pieno rifornimento energetico, sono quindi in grado di fabbricare molecole regolatrici in eccesso rispetto a quanto richiesto dal flusso entrante di materiale da costruzione, proporzionale alle loro dimensioni.

Non c'è quindi all'inizio assolutamente nessuna ragione per cui le cellule del rinfresco debbano dividersi: in esse tutti i processi interni continuano a

svolgersi regolarmente, senza che si creino squilibri od accumuli di materiale non elaborato. Perché mai dovrebbero dividersi?

Ma, con l'avanzare del tempo, il flusso di materiale da costruzione va crescendo esponenzialmente, mentre il numero totale di molecole regolatrici cresce solo come una parabola: da un certo momento in poi, la crescita esponenziale diventa inevitabilmente più rapida di ogni crescita parabolica e la formazione di accumuli di materiale non elaborato diventa a quel punto inevitabile. È tale accumulo che, superando una soglia enzimatica, deve rimettere in moto il meccanismo della duplicazione del DNA e della successiva divisione cellulare.

La divisione cellulare si presenta quindi come un *intervento correttivo*, nel momento in cui i processi interni incominciano a perdere la loro coerenza per il crearsi di uno squilibrio tra materiale da elaborare e molecole regolatrici a questo fine disponibili.

In un prossimo lavoro riprenderemo questa osservazione, facendone il punto di partenza per una teoria della divisione cellulare, e discuteremo il quadro completamente nuovo della funzionalità batterica che ne deriva.

REFERENCES

- [1] M. AGENO (1986) – *Compartimenti funzionali nella cellula batterica. 1: Il catabolismo del glucoso*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 80, 458.
- [2] J.L. INGRAHAM, O. MAALØE and F.C. NEIDHARDT (1983) – *Growth of the Bacterial Cell*, Sinauer, Sunderland Mass., 3.
- [3] M. AGENO, M. BENINI, M.A. MATRICCIANI (1986) – *Fattori limitanti la crescita batterica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 80, 447.
- [4] J.L. INGRAHAM *et al.*, citato in [2], 285 sgg.
- [5] M. AGENO, A.M. SALVATORE and D. VALLERANI (1986) – *Stati di crescita stazionari e transitori di una coltura batterica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 80, 244.
- [6] J.L. INGRAHAM *et al.*, citato in [2], p. 99.
- [7] M. AGENO (1987) – *La biofisica*, Laterza, Roma-Bari, IV-5.