

109. R. CAVANNA, E. B. CHAIN, C. G. HEDÉN, B. MALMGREN, N. A. ELIASSON, E. HAMMARSTEN, S. ÅQVIST. — Correlazione tra la sintesi delle proteine e quella dei polinucleotidi in *Escherichia coli*.

Riassunto. — L'*E. coli* è stato coltivato in quantità variabili fino a 1000 l., sia in terreno sintetico che in brodo.

Non si osservò correlazione tra le quantità per cellula di PNA, DNA e proteine e l'andamento della divisione cellulare. Viene discusso l'accordo tra questi risultati e quelli ottenuti con fegato in fase di rigenerazione.

Le quantità per cellula di PNA e di proteina aumentarono sia nella fase di latenza che in quella logaritmica.

In complesso la quantità per cellula di DNA si mantenne costante, con un andamento ondulato. Ciò nonostante l'incorporazione dell'¹⁵N fu molto rapida, particolarmente durante la fase di latenza; e questo indicherebbe che simultaneamente a una sintesi aveva luogo un attivo processo di demolizione.

I composti a basso peso molecolare, correlati con gli acidi nucleici, costituivano soltanto una piccola percentuale dei polinucleotidi.

Durante la fase di latenza e all'inizio di quella logaritmica si ebbe un aumento della quantità per cellula di lipidi, nei quali si riscontrò un elevato contenuto di ¹⁵N.

La velocità di incorporazione dell'azoto nel PNA, DNA e negli aminoacidi era massima nella fase di latenza.

Vengono discussi i risultati.

Questa ricerca è stata sostenuta dalla Fondazione Knut e Alice Wallenberg e dalla Fondazione Rockefeller.

Résumé. — On a cultivé l'*E. coli* en milieu synthétique et en bouillon, en volumes allant jusqu'à 1000 l..

On n'a pas observé de corrélation entre les quantités de PNA, DNA et protéines par cellule et les taux de division cellulaire. On discute l'accord entre ces résultats et ceux obtenus en travaillant sur du foie en régénération.

Les quantités par cellule de PNA et de protéines augmentaient et dans la phase de latence et dans celle logarithmique.

La quantité de DNA par cellule était dans l'ensemble constante, la courbe affectant de légères ondulations. Néanmoins l'incorporation de ¹⁵N se faisait très rapidement, particulièrement pendant la phase de

latence, ce qui indiquerait que simultanément à une synthèse se produisait un processus actif de démolition.

Les composés de poids moléculaire peu élevé corrélés avec les acides nucléiques ne représentaient qu'un faible pourcentage des polynucléotides.

Il y eut au cours de la phase de latence et au début de la phase logarithmique une augmentation de la quantité par cellule de lipides, dont le contenu en ^{15}N était élevé.

La vitesse d'incorporation de l'azote dans le PNA, le DNA et les acides aminés était la plus élevée au cours de la phase de latence.

On discute les résultats.

Cette recherche a pu être effectuée grâce à l'aide de la Fondation Knut et Alice Wallenberg et de la Fondation Rockefeller.

Summary. — *E. coli* has been cultivated in volumes up to 1000 litres on a synthetic medium and in broth.

The amounts per cell of PNA, DNA and protein and the rates of cell fission showed no correlation. The agreement between this finding and the results obtained with regenerating liver was discussed.

The amounts of PNA and of protein per cell increased both in the lag and log phase.

The amount of DNA per cell was on the whole constant, showing an undulating run. In spite of this the incorporation of ^{15}N was very rapid particularly during the lag phase, indicating an active breakdown occurring simultaneously with a synthesis.

The low molecular compounds, related to nucleic acids, contributed only a few per cent of the polynucleotides.

The lipids increased in amount per cell during the lag phase and earliest log phase and showed high figures for ^{15}N .

The nitrogen incorporation rates in PNA, DNA and amino acids were highest in the lag phase.

The results are discussed.

This investigation was supported by the Knut and Alice Wallenbergs Stiftelse and The Rockefeller Foundation.

Zusammenfassung. — *E. coli* wurde in verschiedenen Mengen bis 1000 l., auf synthetischen Boden und in Bouillon kultiviert.

Der Gehalt an PNA, DNA und Protein per Zelle zeigte keine Abhängigkeit von der Spaltungsgeschwindigkeit der Zellen.

Die Uebereinstimmung zwischen diesen Resultaten und denen mit Leber in der Regenerationsphase erhaltenen wurde diskutiert. Der PNA-

und Protein-Gehalt per Zelle erhöhte sich in der Latenz- sowie in der logarithmischen Phase.

Der DNA Gehalt per Zelle blieb im allgemeinen konstant und zeigte einen wellenförmigen Verlauf. Trotzdem ging der Einbau des ^{15}N , besonders in der Latenzphase, sehr schnell vor sich, was auf einen aktive Abbau und gleichseitige Synthese hinweist.

Die niedermolekularen Substanzen, die mit Nukleinsäure in Beziehung stehen, stellten nur einen kleinen Prozentsatz der Polynucleotide dar.

Der Gehalt per Zelle an Lipiden, welche eine hohe Konzentration von ^{15}N zeigten, nahm während der Latenz- und am Anfang der logarithmischen Phase zu.

Die Einbaugeschwindigkeit des Stickstoffes in PNA, DNA und Aminosäuren war am höchsten während der Latenzphase.

Die Ergebnisse wurden diskutiert.

Diese Untersuchung wurde von der Knut und Alice Wallenbergs Stiftung und von der Rockefeller Foundation unterstützt.

La scoperta originale di Friedrich Miescher, verso il 1870, della formazione contemporanea di proteine e polinucleotidi è stata seguita da un gran numero di ricerche tendenti allo scopo di trovare qualche correlazione tra la sintesi dei polinucleotidi e quella delle proteine.

Durante il corso di ricerche condotte nel laboratorio di biochimica dell'Istituto Karolinska (Stoccolma) sull'incorporazione dell'azoto (glicina con ^{15}N) nei polinucleotidi e nelle proteine del fegato, venne studiata la probabile relazione tra questi due gruppi di sostanze ⁽¹⁾. Si trovò che i due massimi d'incorporazione dell'isotopo erano separati nel tempo, ma sembrò abbastanza dubbia un'esatta correlazione tra la quantità di acido ribonucleico (PNA) per peso secco e l'andamento della rigenerazione. In una ricerca successiva ⁽²⁾ non si riscontrò correlazione positiva tra l'andamento della sintesi proteica e la quantità di PNA (v. fig. 4); e neanche l'incorporazione di ^{15}N era direttamente proporzionale alla velocità di crescita (v. fig. 5).

Organi come il fegato presentano certe difficoltà: le cellule non sono omogenee dal punto di vista funzionale e morfologico, e la produzione

⁽¹⁾ ELIASSON N. A., HAMMARSTEN E., REICHARD P., ÅQVIST S., THORELL B. e EHRENSVÄRD G. - Acta Chem. Scand., 5: 431, 1951).

⁽²⁾ ANDERSON E. P., HAMMARSTEN E., ÅQVIST S. Non pubblicato.

di proteine citoplasmatiche rende impossibile il calcolo della proteina totale prodotta in un certo periodo di tempo. Tale organo inoltre non sembra molto adatto per esperimenti di inibizione. Per eliminare queste difficoltà abbiamo scelto un microorganismo, l'*Escherichia coli*.

L'importanza degli acidi nucleici nei microorganismi è stata messa in evidenza da molti ricercatori. A. BOIVIN⁽³⁾, E. CHARGAFF⁽⁴⁾ e M. STACEY⁽⁵⁾, hanno fatto rassegne dei lavori più antichi. A. BOIVIN e R. VENDRELY⁽⁶⁾ dimostrarono che il rapporto acido nucleico/proteina aumentava quando i batteri venivano trasferiti da un mezzo deficiente a uno ricco. Essi però non trovarono alcuna relazione tra il contenuto dei batteri in acido nucleico e la loro capacità di moltiplicazione. B. MALMGREN e C. G. HEDÉN⁽⁷⁾ nei loro studi con la tecnica della microspettrografia nell'ultravioletto, trovarono che il contenuto di sostanze con assorbimento a 2570 Å nelle cellule di diversi tipi di batteri cresceva di molte volte durante la fase latente della crescita batterica. Anche nelle generazioni seguenti non vi era una correlazione positiva fra la quantità di queste sostanze e l'andamento delle divisioni dei singoli batteri. Però la quantità di sostanze che assorbivano a quella lunghezza d'onda, calcolate come PNA formantesi durante la generazione, era chiaramente collegata con il tempo di generazione. Questo non accadeva per la prima generazione, inclusa la fase di latenza. Risultati in parte concordanti furono in seguito ottenuti da diversi autori usando metodi chimici^(8, 9, 10). P. MITCHELL e J. NOYLE⁽¹¹⁾, valutando i « nucleotidi totali » per mezzo di un metodo spettrofotometrico diretto e il DNA chimicamente, conclusero che è la sintesi del PNA che si accelera di più durante la fase di aumentata crescita cellulare. Nel 1950 P. C. CALDWELL e C. HINSHELWOOD⁽¹²⁾ e P. C. CALDWELL, E. L. MACKOR e C. HINSHELWOOD⁽¹³⁾ in esperimenti sul *B. lactis aerogenes* cresciuto in differenti mezzi di coltura, poterono dimostrare che il contenuto in DNA delle singole cellule rimaneva quasi costante malgrado sensibili variazioni nelle dimensioni delle cellule stesse. Il PNA d'altra parte mostrava notevoli variazioni, e i risultati suggerivano l'esistenza di una stretta relazione tra la velocità alla

⁽³⁾ Bull. Soc. Chem. Biol., 24: 134-143, (1942).

⁽⁴⁾ Symp. Quant. Biol., 12: 28-34, (1947).

⁽⁵⁾ Symp. Soc. Exp. Biol., 1: 86-100, (1947).

⁽⁶⁾ C. R. Soc. Bio., 137, 432-433, (1943).

⁽⁷⁾ Acta Path. Microbiol. Scand., 24: 417-504, (1947).

⁽⁸⁾ LEVY H. B., SKUTSCH E. T. e SCHADE A. L. - Arch. Biochem., 24, 199, (1949).

⁽⁹⁾ MORSE M. L. e CARTER C. E. - J. Bact., 153, 317, (1949).

⁽¹⁰⁾ GROS F., BELJANSKI M., MACHEBOEUF M. e GRUNBACH F. - C. R. Acad. Sc., 230: 875, (1950)

⁽¹¹⁾ J. gen. Microbiol., 5, 421-438, (1951).

⁽¹²⁾ J. Chem. Soc., 1415-1418, (1950).

⁽¹³⁾ Ibid., 3151-3153, (1950).

quale le cellule potevano crescere e l'andamento della sintesi di questo acido nucleico; si potè anche stabilire una relazione iperbolica tra il tempo medio di generazione e il contenuto in PNA. Risultati simili furono riportati da W. H. PRICE (14), il quale concluse che ciò potrebbe indicare l'esistenza di una relazione tra sintesi proteica e sintesi del PNA nelle condizioni sperimentali in questione. E. F. GALE e J. D. FOLKES (15, 16) studiando lo *Staph. aureus* trovarono che l'andamento della sintesi proteica era direttamente connesso con il contenuto delle cellule in acido nucleico.

Nel seguente lavoro sono stati confermati i risultati di B. MALMGREN e C. G. HEDÉN (27), e si è arrivati inoltre a dimostrare, in esperimenti su *E. coli* della durata di quattro a sei ore, che non vi è proporzionalità diretta tra le quantità per cellula di PNA, di DNA e di proteine e l'andamento delle divisioni cellulari. Le quantità di PNA e di proteine aumentavano già durante la fase di latenza e i dati sull'andamento dell'incorporazione dell'azoto (ottenuti determinando le quantità di isotopo) nel PNA, nel DNA e nelle proteine non erano in nessuna fase proporzionali all'andamento della divisione cellulare.

PARTE SPERIMENTALE

CEPPO E MEZZO DI COLTURA. — Come colture di partenza per tutti gli esperimenti vennero usate colture essiccate dello stesso ceppo di *E. coli* B, che era già stato usato da C. G. HEDÉN (17) per i suoi lavori sul fago.

Il terreno principale, che indichiamo con FSA [per dettagli cf. (17)] era il mezzo sintetico di F. FRIEDLEIN (18), che contiene l'1% di lattato di sodio come sorgente di carbonio e l'1% di cloruro di ammonio come sorgente di azoto. I sali vennero sterilizzati separatamente dal grosso del terreno, perchè altrimenti venivano portati in soluzione ioni tossici dall'acciaio inossidabile del fermentatore. La loro influenza sulla crescita è dimostrata dall'esperimento A, nel quale il terreno completo fu sterilizzato nel fermentatore. La quantità di metalli pesanti che reagì con il solfuro di ammonio scese da $2.5 \cdot 10^{-5}$ a circa 10^{-6} moli quando i sali vennero sterilizzati separatamente in recipienti di vetro. Un esperimento (J) fu condotto in brodo (pH 7.2, peptone Witte 1%, estratto di carne argentina 0.5%, NaCl 0.3%, bollito per 10 minuti poi filtrato attraverso carta da filtro grossolana, indi sterilizzato per 20 minuti a 120°C). Con questo

(14) J. Gen. Phys., 35: 741-759, (1952).

(15) Biochem. J., 53, 483, (1953).

(16) Biochem. J., 53, 493, (1953).

(17) Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl., 88, (1951).

(18) Biochem. Ztschr., 194: 273, (1928).

terreno la formazione di schiuma doveva venir regolata per mezzo di silicone (antischiuma Dow-Corning). La temperatura di crescita fu di 37°C in tutti gli esperimenti.

Negli esperimenti A, B, e C, che furono effettuati a Roma, la coltura primaria essiccata fu sospesa in poche gocce di FSA e usata per inoculare 25 ml dello stesso mezzo in una beuta. Dopo 20 ore di crescita su di un agitatore rotante, la coltura fu trasferita in 37 litri di mezzo sintetico in un fermentatore di acciaio inossidabile della capacità di 90 litri, munito di sistema di aerazione a vortice (¹⁹). Dopo 20 ore di crescita i batteri furono raccolti per mezzo di una centrifuga Sharples sterile, trasferiti con circa 300 ml di soluzione fisiologica sterile in un omogeneizzatore Waring (recipiente di metallo, sterilizzato), che fu messo in movimento per 45'' a bassa velocità indi per pochi secondi alla massima velocità per assicurare la completa omogeneità della sospensione. Dopo aver contato i batteri presenti nella sospensione, si versò in un fermentatore d'acciaio inossidabile da 3.000 litri contenente 1.000 litri di FSA marcato con ¹⁵N una quantità sufficiente di questa sospensione per dare una densità di circa $6 \cdot 10^7$ batteri/ml. Il rimanente della sospensione venne analizzato come campione dell'ora zero. La crescita, ottenuta con aerazione e agitazione a vortice, fu seguita a brevi intervalli contando i batteri al microscopio a contrasto di fase.

Negli esperimenti D, F, G e J, che furono effettuati a Stoccolma, la prima precoltura fu fatta in tubi di agar e la seconda in una beuta da 5 litri, contenente 3 litri di mezzo di coltura. L'aerazione fu eseguita facendo gorgogliare nella coltura ca. 0.5 litri di aria/litro di mezzo di coltura/minuto attraverso un tubo di vetro terminante con un dischetto di vetro sinterizzato. Dopo 20 ore di crescita la coltura venne trasferita in un fermentatore di acciaio inossidabile da 100 litri (²⁰) contenente 75 litri di FSA. I batteri cresciuti in questa quantità venivano poi centrifugati, risospesi come già descritto e usati per inoculare 700 litri di terreno sintetico in un fermentatore da 1.000 litri simile a quello da 100.

PRESE DI CAMPIONI PER L'ANALISI. — Campioni di 50-250 litri venivano prelevati ad intervalli variabili dai 45 ai 70 minuti, raffreddati a + 2 — 3°C in un paio di minuti indi conservati a circa 0°C fino al momento della centrifugazione in una Sharples.

Le cellule così raccolte venivano lavate e centrifugate a 0°C, una vol-

(¹⁹) PALADINO S., UGOLINI F. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17, 1195 (1954).

(²⁰) HEDÉN C. G., MALMGREN B., SUNDSTRÖM K. E. e TÖRNQVIST B. - Acta Path. Microbiol. Scand., 30, 284, 1952.

La sorgente di azoto disponibile nel terreno era marcata con 4.07 atomi % in eccesso di ¹⁵N. Tutti i dati sono espressi in atomi % in eccesso di ¹⁵N. TAVOLA 1-a

SERIE	A						B						C					
	60	120	180	240	360	60	120	180	240	360	480	30	90	150	210	270	330	390
Tempo di crescita in minuti	60	120	180	240	360	60	120	180	240	360	480	30	90	150	210	270	330	390
Numero di cellule per ml 40 ^e	68	68	68	89	184	54	50	85	140	400	1030	57	55	107	175	330	655	725
DNA	Guanina	1.10	1.52	2.60	.81	1.46	2.14	2.45	3.39	1.54	1.54	2.29	2.68	2.72	3.40	3.65		
	Adenina	.98	1.41	2.59	.77	1.48	2.17	2.45	3.53	1.42	1.62	2.19	2.73	2.77	3.49	3.70		
	Citosina	.92	1.44	2.60	.71	1.48	1.81	2.91	3.29	1.09	1.50	2.40	2.55	2.85	3.05	3.58		
	Timina	1.00	1.03	2.40	.77	1.25	2.01	2.54	3.44	1.40	1.39	2.32	2.04					
PNA	Guanina	1.85	2.23	2.56	2.98	1.03	1.82	2.52	2.81	3.49	1.38	1.79	2.49	2.64	3.18	3.64		
	Adenina	1.77	2.20	2.57	3.23	1.08	1.88	2.61	2.88	3.00	1.51	1.95	2.60	2.90	3.19	3.60		
	Citosina	1.83	2.26	2.54	3.15	1.08	1.96	2.30	2.60	3.54	1.48	1.67	2.67	3.01	3.21	3.41		
	Uracile	1.68	2.43	2.73	2.81	1.18	1.95	2.57	2.76	3.54	1.34	1.95	2.57	2.95	3.50	3.75		
Proteina	Leucina		1.46	1.46		1.19	1.79			3.71	1.32							3.28
	Isoleucina			1.46		1.16	1.84			3.50	1.31							3.14
	Fenilalanina	.42	.72	1.51	2.44	1.10	1.76	2.65			3.76	1.35	2.65					4.03
	Valina	.48	.94	1.51		1.10	1.80	2.79			3.64	1.65	2.54					3.64
	Metionina	.35	.87	1.59	1.67	.95	1.75	2.59			3.66	1.50	2.46					3.64
	Tirosina	.42	.87	1.44		1.02	1.74	2.65			3.66	1.46	2.38					3.62
	Prolina	.47	.79	1.35	1.99	1.08	1.77	2.75			3.64	1.46	2.64					3.73
	Acido glutamico	.48	.94	1.47	1.66	1.15	1.81	2.70			3.68	1.42	2.64					3.84
	Alanina	.50	.90	1.49	1.98	1.11	1.82	2.95			3.87	1.53	2.65					
	Treonina	.47	.95	1.48		1.13	1.80	2.90			3.56							
	Acido aspartico	.48	.95	1.51		1.16	1.88	2.96			3.79							
	Serina	.44	.92	1.46		1.12	1.78	2.89			3.66	1.59	2.48					
	Glicina	.33	.85	1.52	1.79	1.09	1.77	2.85			3.73	1.59	2.55					
	Arginina	.45	.94	1.44		1.14	1.77	2.82			3.68	1.90	2.59					
Lisina	.47	.91	1.53	1.67	1.06	1.73	2.80			3.64	1.60	2.58						
Proteina in toto	.47	.94	1.48	1.89	2.53	1.11	1.78	2.48	3.23	3.74	1.62	2.58	3.04	3.37				
Lipidi					2.53	1.11	1.78	2.68			2.13	2.85	3.46	3.63	3.81	3.77		

ta con soluzione fisiologica e una volta con acqua. Venivano poi liofilizzate, e dal materiale secco omogeneizzato venivano presi campioni per la conta del numero di cellule, per la determinazione del peso secco (nel vuoto su P_2O_5 a $90^\circ C$), per l'estrazione dei lipidi e dei polinucleotidi e per la preparazione della frazione proteica grezza.

ANALISI. — Negli esperimenti sull'incorporazione dell'isotopo (serie A, B e C) le cellule venivano vibrare per nove giorni (100 escursioni di 1 mm ogni secondo) in una provetta a tappo smerigliato in presenza di polvere di vetro, di sferette di vetro di 6 mm di diametro e di alcool etilico assoluto. Questo trattamento conduceva ad una soddisfacente frammentazione meccanica delle cellule. L'alcool etilico veniva decantato dopo centrifugazione e l'estrazione dei lipidi veniva completata bollendo per due volte con una miscela di alcool-etero (3 a 2) per due ore ogni volta. Questi estratti venivano uniti insieme ed evaporati sotto

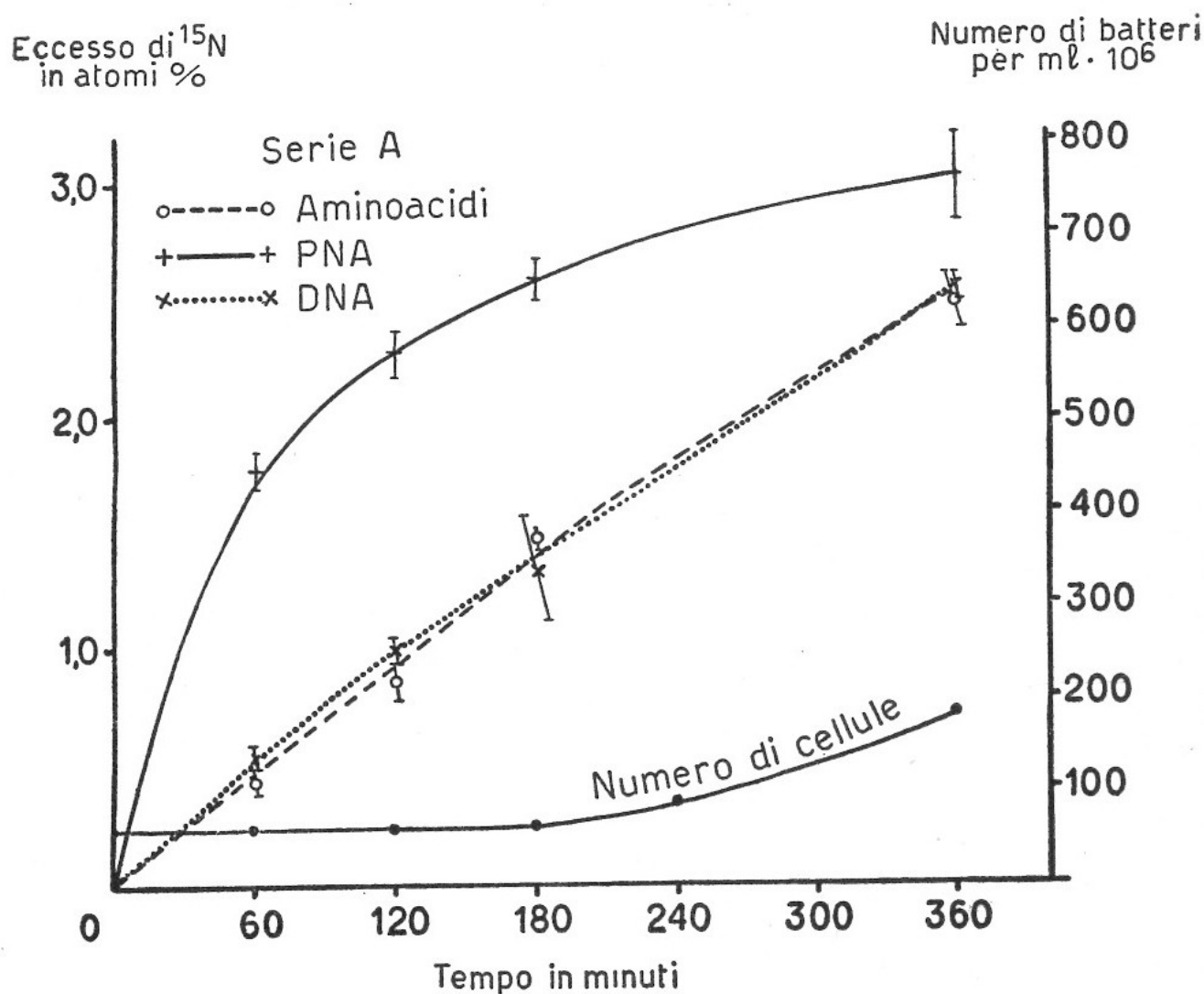


Fig. 4. - Curva di crescita e curva d'incorporazione dell' ^{15}N nelle proteine, nel PNA e nel DNA nell'esperimento A.

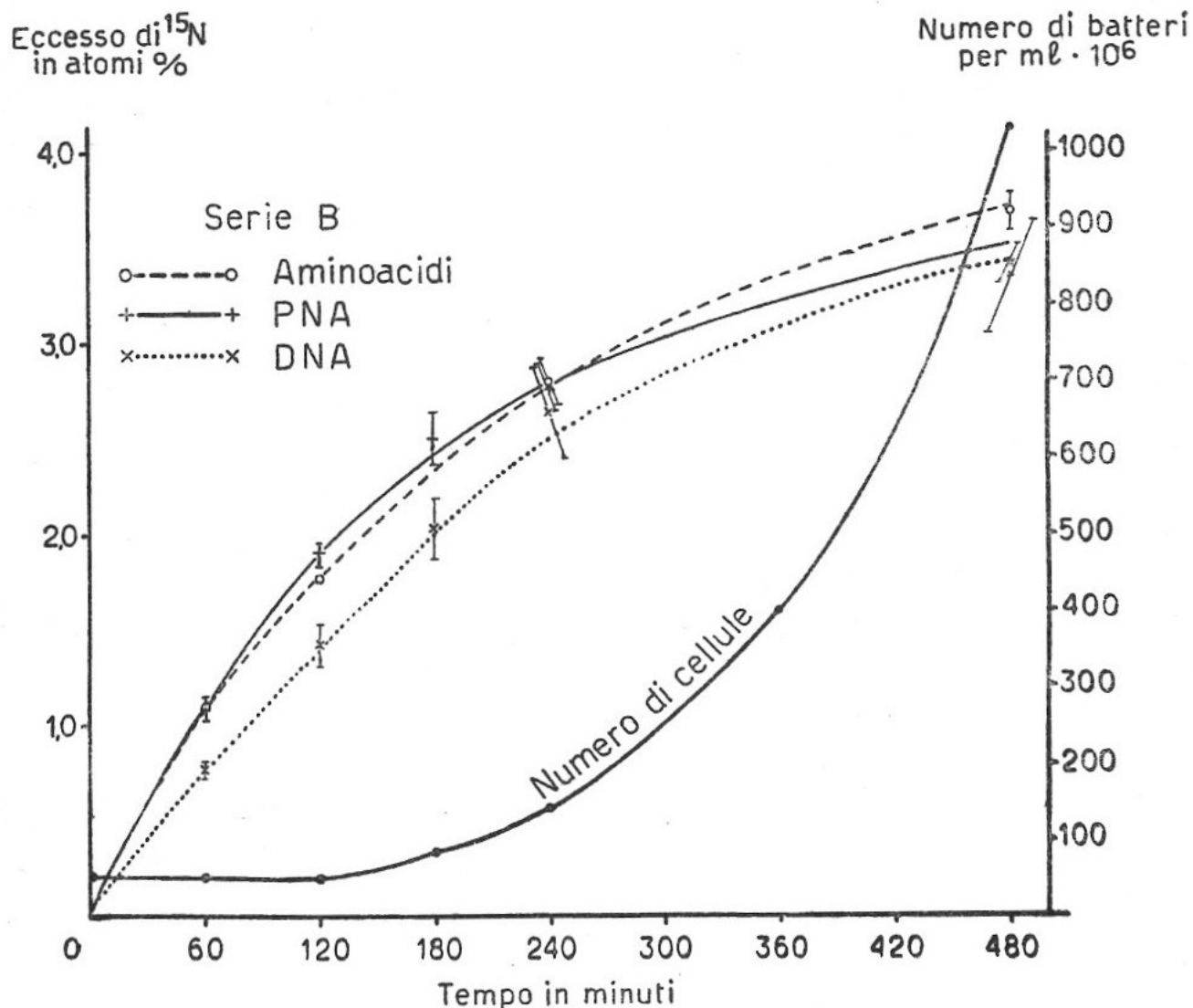


Fig. 2. - Curva di crescita e curva d'incorporazione dell' ^{15}N nelle proteine, nel PNA e nel DNA nell'esperimento B.

vuoto ed il residuo estratto con cloroformio. La piccola quantità di sostanze insolubili in cloroformio veniva aggiunta al materiale rimasto dopo l'estrazione dei lipidi. In un esperimento (C) venne analizzato il contenuto in ^{15}N dei lipidi (tav. 1-a). Il materiale residuo dopo l'estrazione dei lipidi veniva lasciato seccare all'aria indi trattato secondo il metodo di E. HAMMARSTEN ⁽²¹⁾, per estrarre i polinucleotidi. Il residuo si trattò con acido tricloroacetico (TCA) al 5%, prima una volta a 0°C per eliminare i sali, indi due volte a 90°C per 10 minuti alla volta per allontanare eventuali tracce di polinucleotidi non estratte durante il trattamento precedente. Il residuo solido, seccato con alcool-etero, veniva considerato come proteina.

I polinucleotidi vennero separati in PNA e DNA, indi demoliti per

⁽²¹⁾ Acta Med. Scand. Suppl., 496: 634, (1947).

Eccesso di ^{15}N
in atomi %

Numero di batteri
per ml $\cdot 10^6$

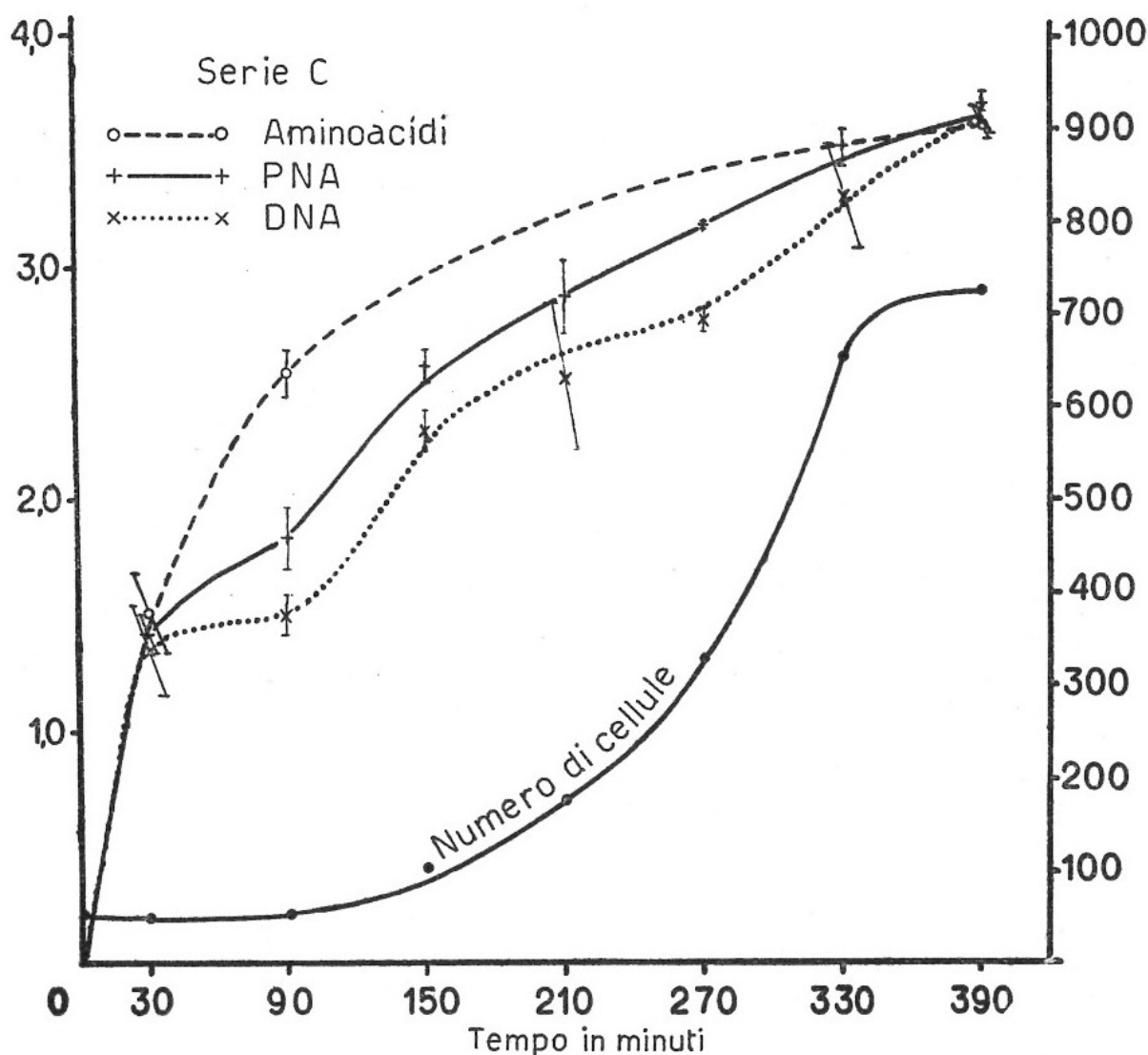


Fig. 3. - Curva di crescita e curva d'incorporazione dell' ^{15}N nelle proteine, nel PNA e nel DNA nell'esperimento C.

ottenere le singole basi azotate. Queste vennero analizzate riguardo al loro contenuto in ^{15}N usando metodi già pubblicati ^(21, 22, 23, 24, 25). Il residuo proteico venne idrolizzato, i singoli aminoacidi isolati e determinato il loro contenuto in ^{15}N ⁽²⁶⁾.

Nelle serie A, B, e C (fig. 1, 2, 3), non fu possibile effettuare determinazioni quantitative dei composti isolati, perchè i batteri erano troppo

⁽²²⁾ COHN W. E. - Science, 109, 377, (1949).

⁽²³⁾ EDMAN P., HAMMARSTEN E., LÖW B. e REICHARD P. - J. Biol. Chem, 178, 395, (1949).

⁽²⁴⁾ REICHARD P. - Acta Chem. Scand., 3: 422, (1949).

⁽²⁵⁾ VISCHER E. e CHARGAFF E. - J. Biol. Chem., 176: 715, (1948).

⁽²⁶⁾ ÅQVIST S. - Acta Chem. Scand., 5: 1031, (1951).

contaminati con ferro per permettere un'estrazione quantitativa dei polinucleotidi.

Nelle serie D, F, G e J non si usarono isotopi. Per eliminare per quanto possibile ogni sorgente di metallo, i cuscinetti della base delle centrifughe Sharples (cuscinetti di metallo autolubrificanti) vennero sostituiti con cuscinetti non metallici (antifrizione), e i fermentatori, lo scambiatore di calore ecc. furono accuratamente risciacquati: così si riuscì a mantenere la contaminazione di ferro nelle preparazioni entro limiti tali da non interferire con l'estrazione quantitativa dei polinu-

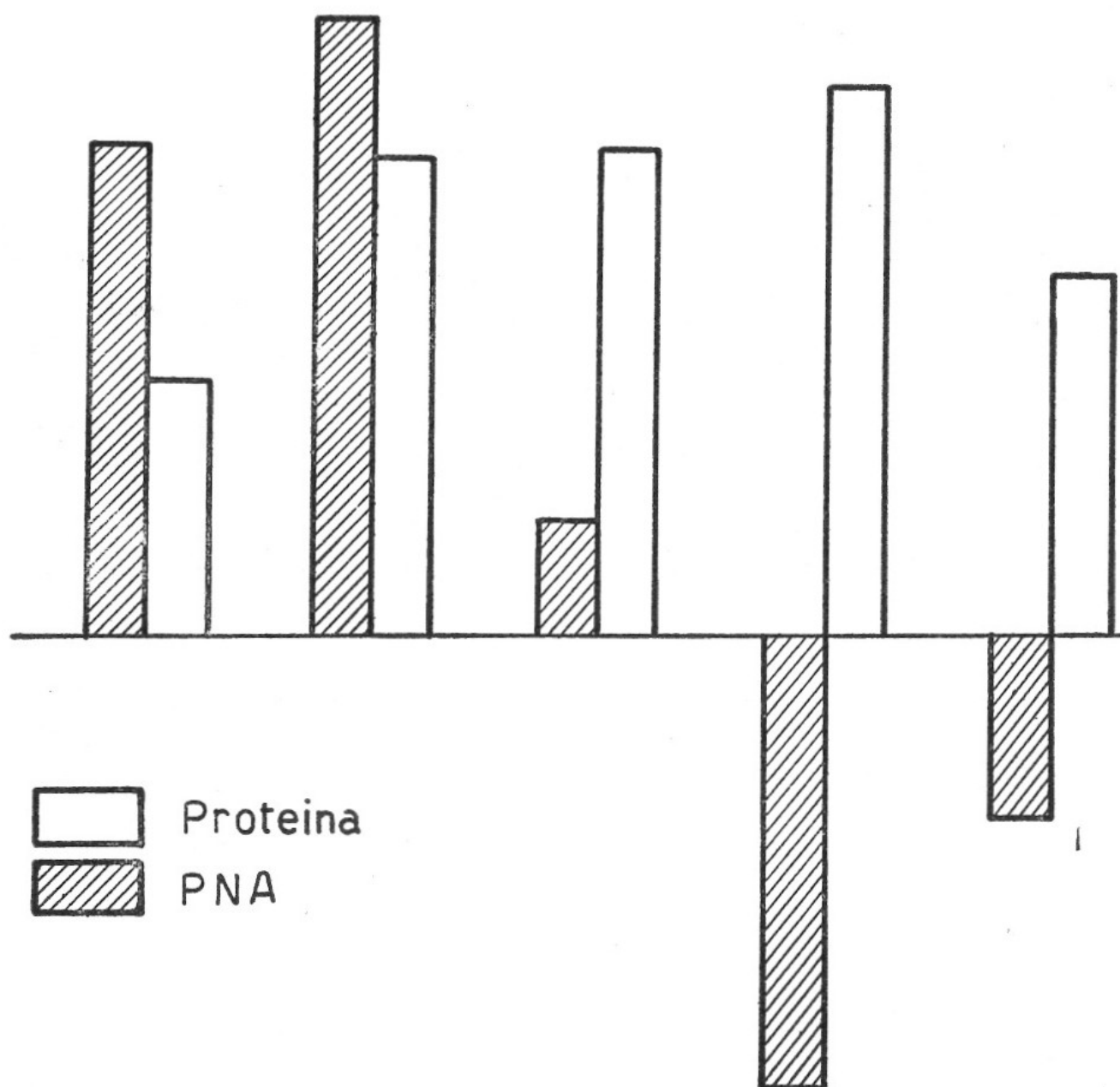


Fig. 4. - Valori relativi dei cambiamenti nell'andamento della crescita ad intervalli di 10 ore (espressi come log della quantità di azoto proteico formato) e dei cambiamenti nel fosforo del PNA in rapporto all'azoto durante lo stesso periodo. Esperimento su fegato di ratto in rigenerazione dopo epatectomia parziale. Le differenti colonne corrispondono, da sinistra verso destra, a un periodo di tempo di 0-20, 20-30, 30-40, 40-60, 60-80 ore dopo l'epatectomia parziale.

Variazioni relative
nell'N proteico(TCA)
prodotto in un'ora

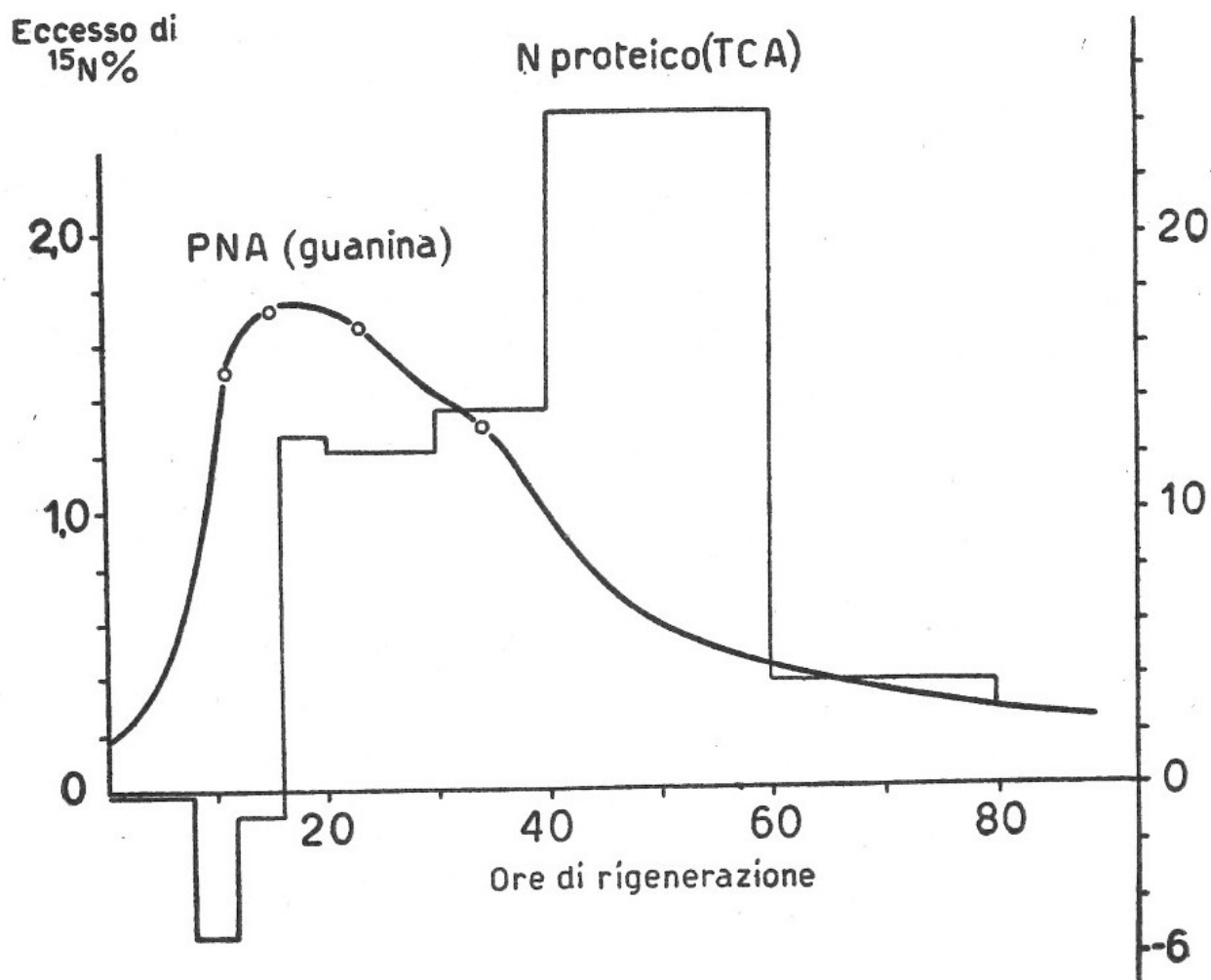


Fig. 5. - Confronto tra la variazione dell'azoto proteico (TCA) prodotto ogni ora e l'incorporazione di ^{15}N (precursore la glicina marcata con ^{15}N) nella guanina del PNA citoplasmatico di fegato in rigenerazione.

cleotidi. Nelle serie su menzionate anche la frammentazione delle cellule fu condotta in modo leggermente diverso, e cioè con l'aiuto di minute sferette di vetro ⁽²⁷⁾. 4.5 g di batteri secchi venivano mescolati con 10 ml di *Ballotini* di pyrex (diametro 0.28 mm) e vibrati per 12-24 ore a -15°C per mezzo di un agitatore per « microid flask », in una miscela alcool etilico-acqua (3 a 7). L'operazione veniva condotta in un tubo di pyrex a pareti spesse e tappo smerigliato, affinché tutti i trattamenti successivi potessero esser fatti nello stesso recipiente. Dopo la frammentazione il materiale veniva liofilizzato, indi estratto due volte, per due ore alla

⁽²⁷⁾ KING H. K. e ALEXANDER H. - J. gen. Microbiol., 2, 315, (1948).

volta, con alcool-etero (3 a 2) allo scopo di rimuovere i lipidi. Sia l'estratto lipidico che il residuo nel tubo furono sottoposti ai trattamenti già descritti per gli esperimenti con isotopi.

I lipidi solubili in cloroformio vennero distrutti e si determinò il loro contenuto in fosforo. I polinucleotidi vennero separati in PNA e DNA nel modo solito e le quantità relative calcolate in base a determinazioni del contenuto in fosforo. Per controllo, le quantità di PNA e di DNA furono anche determinate con un metodo colorimetrico, misurando il loro contenuto in pentosio (²⁸). In alcuni casi la quantità di PNA fu anche calcolata dai dati analitici ottenuti per gli acidi uridilico e citidilico, e per la guanina e l'adenina, isolati dalla demolizione del PNA secondo il metodo di COHN (²²). I dati ottenuti basandosi sul contenuto in fosforo e su quello in pentosio sono in buon accordo (²⁹). Con il metodo di COHN la concordanza arriva al 90-95% sempre come mononucleotidi pirimidinici e come basi puriniche.

Per comprovare che con il metodo usato l'estrazione dei polinucleotidi era completa, il materiale rimasto indisciolto dopo l'estrazione fu lavato con TCA al 5% a 0°C fino a scomparsa di sali e in un estratto con TCA bollente del residuo venne determinato il fosforo rimanente. Lo stesso controllo fu inoltre effettuato secondo il metodo di GRAFF-MACULLA (³⁰) determinando la quantità di purine. I valori ottenuti con la determinazione del fosforo nell'estratto in TCA furono più elevati di quelli ottenuti secondo GRAFF-MACULLA, e si può concludere che con il metodo di HAMMARSTEN si arriva ad isolare almeno il 90-95% dei polinucleotidi presenti.

Nelle serie D, F, G, e J si determinò quantitativamente il residuo insolubile in TCA trattando il materiale con TCA secondo SCHNEIDER (³¹) direttamente dopo l'estrazione dei lipidi, e determinando il contenuto in azoto del residuo totale.

Le basi azotate, i nucleosidi e i nucleotidi che non precipitano come composti di rame col metodo di HAMMARSTEN, furono determinati approssimativamente misurando il loro assorbimento caratteristico nell'ultravioletto, e per brevità furono detti « frazione a basso peso molecolare ».

(²⁸) BRODY S - Acta Chem. Scand., 7: 495-502, (1953).

(²⁹) BRODY S. - Acta Chem. Scand., 7: 407, (1953).

(³⁰) GRAFF S. e MACULLA A. - J. Biol. Chem., 110: 71, (1953).

(³¹) SCHNEIDER W. C. - J. Biol. Chem., 161: 239, (1945).

RISULTATI.

Venne scelto un tempo di coltivazione piuttosto breve (4-6 ore) perchè sembra che in tale periodo gli scambi metabolici vadano principalmente dal terreno alle cellule. Ciò è comprovato dai valori dell'azoto (tav. 2) e dell'assorbimento nell'ultravioletto (nessun aumento) del terreno, e dal fatto che la concentrazione di isotopo nel mezzo non si abbassava. Da questo punto di vista le condizioni sono più semplici di quelle nel fegato.

Per semplicità nella tav. 1-b sono riportate le medie dei valori dell'incorporazione dell'azoto (tav. 1-a) rispettivamente per i quattro composti azotati degli acidi nucleici e per i quindici aminoacidi delle proteine. Le deviazioni talvolta rilevanti non sono dovute a errori analitici o a impurezze dei composti, ma potrebbero indicare differenze biologica-

Tav. 1-b - Valori medi e deviazioni dalla media dell'eccesso di atomi di $^{15}\text{N}\%$ nell'insieme degli amino acidi e dei composti azotati dei polinucleotidi.

Serie	Tempo di crescita in minuti	Amino acidi	PNA	DNA
A	60	.44 ± .05	1.78 ± .08	.55 ± .05
	120	.87 ± .08	2.28 ± .10	1.00 ± .06
	180	1.48 ± .05	2.60 ± .09	1.35 ± .22
	240	1.79 ± .04		
	360	2.50 ± .12	3.04 ± .19	2.57 ± .05
B	60	1.10 ± .06	1.09 ± .06	.77 ± .04
	120	1.77 ± .02	1.90 ± .06	1.42 ± .11
	180		2.50 ± .14	2.03 ± .16
	240	2.79 ± .12	2.76 ± .12	2.63 ± .24
	480	3.68 ± .09	3.34 ± .30	3.41 ± .10
C	30	1.52 ± .17	1.43 ± .08	1.36 ± .19
	90		1.84 ± .13	1.51 ± .09
	150	2.55 ± .10	2.58 ± .07	2.30 ± .09
	210		2.88 ± .16	2.53 ± .32
	270		3.19 ± .01	2.78 ± .05
	330		3.52 ± .08	3.31 ± .23
	390	3.63 ± .08	3.72 ± .05	3.64 ± .06

Tav. 2. - Variazioni quantitative delle cellule e dei componenti cellulari durante differenti esperimenti delle serie senza isotopo.

Serie	Tempo di crescita in minuti	Numero di cellule per ml. $\cdot 10^6$	Peso secco medio di una cellula in mg. $\cdot 10^{-10}$	Mg di azoto per litro nel mezzo di coltura		Azoto proteico per cellula in mg. $\cdot 10^{-12}$	Fosforo dei polinucleotidi per cellula in mg. $\cdot 10^{-12}$		Aumento relativo dei componenti cellulari per volume unitario di coltura		
				distillato a pH 10	in legame organico		PNA	DNA	Proteina	PNA	DNA
D	0	65	1.60	—	—	20.0	—	.485	1.0	—	1.0
	60	65	2.00	234.6	0.42	22.5	.742	.532	1.1	1.0	1.1
	120	80	1.80	—	0.090	20.1	1.260	.462	1.2	2.1	1.2
	180	143	2.30	231.2	0.024	25.9	1.367	.519	2.9	4.1	2.4
	240	206	2.40	234.4	0.034	27.1	1.855	.526	4.3	7.9	3.4
F	0	65	1.64	—	—	17.6	.727	.752	1.0	1.0	1.0
	70	60	3.03	209.8	4.0	17.6	1.966	.788	—	2.5	1.0
	140	120	2.70	212.6	6.0	23.4	2.736	.841	2.5	6.9	2.1
	210	360	2.75	203.0	6.0	23.5	2.935	.673	7.4	22.3	5.0
	280	830	2.91	183.8	6.0	27.3	3.173	.722	19.8	55.7	12.3
G	0	103	1.81	—	—	17.4	1.267	.865	1.0	1.0	1.0
	70	96	2.90	244.4	0.060	23.4	2.879	.755	1.3	2.1	0.8
	140	185	3.53	244.8	0.066	28.2	4.368	.946	2.9	6.2	2.0
	210	459	4.31	236.8	0.066	39.7	4.890	1.370	10.2	17.2	7.1
	280	1076	3.73	208.6	0.012	35.3	3.623	.831	21.2	29.9	10.0
J	0	60	1.95	—	—	21.4	1.377	.575	1.0	1.0	1.0
	45	54	3.82	—	—	35.5	5.104	1.070	1.5	3.3	1.7
	135	231	3.89	—	—	34.1	6.580	1.112	6.1	18.2	7.4
	180	580	4.07	—	—	37.1	6.460	1.208	16.6	45.0	20.1
	360	1000	4.19	—	—	39.2	6.318	1.224	30.2	75.8	35.2

mente importanti nell'andamento della formazione dei diversi composti, fatto che comunque non dovrebbe impedire l'uso dei valori medi per confrontare l'andamento delle divisioni cellulari con quello dell'incorporazione dell'azoto.

La velocità d'incorporazione dell'azoto era massima durante la fase di latenza, quando cioè la quantità di PNA per cellula era in aumento. Il DNA invece, pur essendo incorporato nella fase di latenza con andamento simile al PNA, rimaneva praticamente invariato come quantità per cellula sia durante la fase di latenza che in quella logaritmica, con delle oscillazioni caratteristiche (fig. 6).

L'incorporazione di ^{15}N negli amino acidi era quasi direttamente proporzionale all'andamento dell'incorporazione nel PNA e nel DNA (tav. 1-a e 1-b). I componenti che aumentavano in quantità per cellula erano PNA e proteina. L'aumento iniziava già nella fase di latenza quan-

Serie G

Fosforo dei polinucleotidi
per singolo batterio in
 $\text{mg} \cdot 10^{-14}$

Numero di batteri
per $\text{ml} \cdot 10^6$

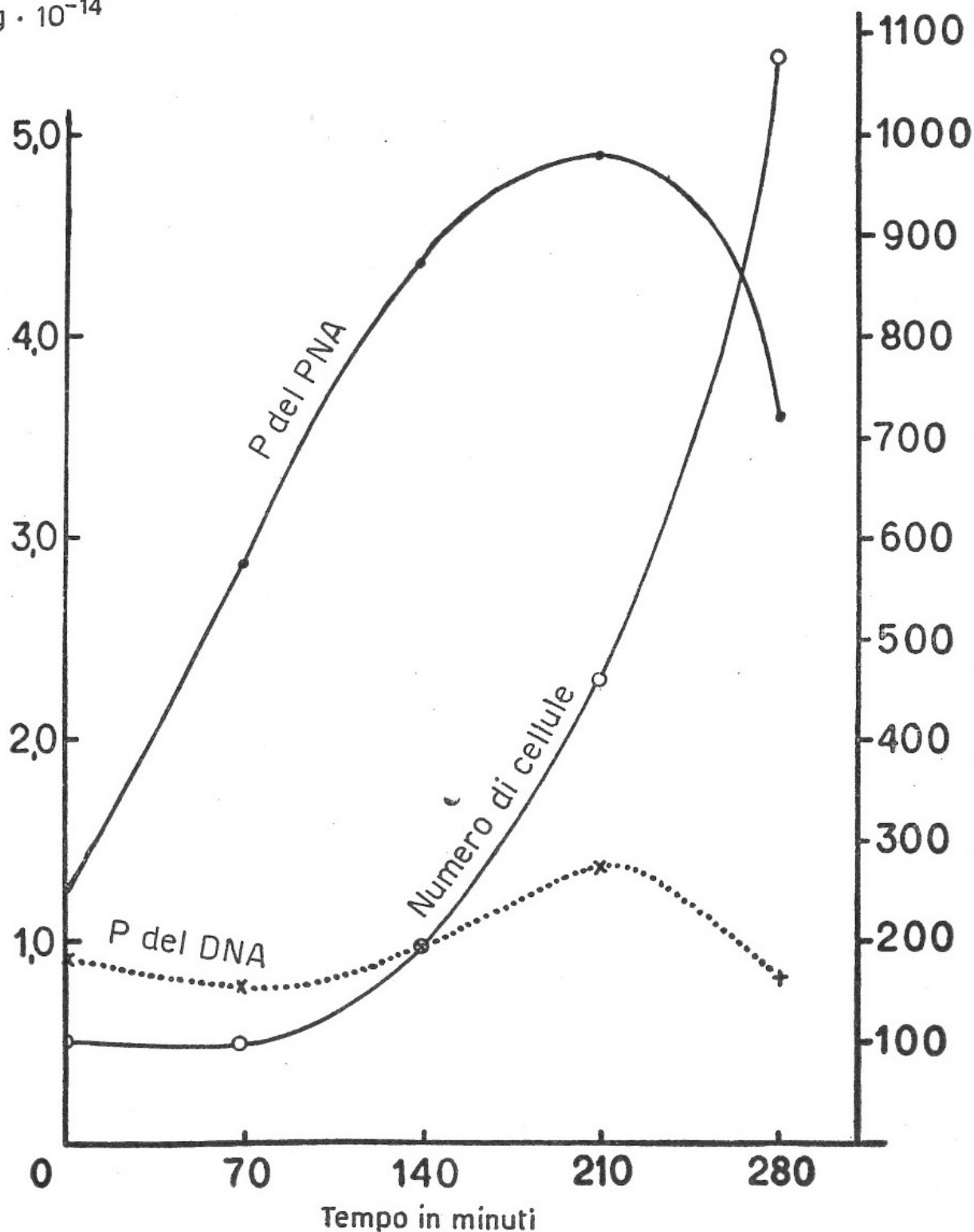


Fig. 6. - Variazioni del P del DNA e di quello del PNA durante la fase logaritmica di crescita.

do non c'era proliferazione cellulare ma solo un aumento nel peso delle singole cellule.

La « frazione a basso peso molecolare » (pag. 1296) ammontava solo al 2.5-4% dei polinucleotidi.

Nella fase di latenza e all'inizio di quella logaritmica l'aumento della quantità di lipidi per cellula e, come chiaramente si vede dalla tav. 1-a, la loro incorporazione di isotopo sono più rapidi di quelli del PNA, del DNA e delle proteine. L'azoto nella frazione lipidica è molto probabilmente in buona parte a carattere non fosfolipidico perchè in troppo grande eccesso sul fosforo. E' così anche nel fegato, nel quale si trovò che i fosfolipidi erano fortemente contaminati sia dal precursore che da altri composti azotati che non si conosce entrino in genere nella costituzione dei fosfolipidi (³²). Perciò non si può dire con sicurezza che il valore piuttosto elevato del ¹⁵N riportato in tav. 1-a indichi un'attività metabolica particolarmente intensa nei fosfolipidi.

DISCUSSIONE.

I risultati ottenuti non dimostrano alcun rapporto costante e positivo tra la quantità di ¹⁵N o l'andamento della sua incorporazione nei differenti costituenti cellulari e l'andamento della crescita (fig. 7). I risultati dello studio sul fegato in rigenerazione (²) che hanno importanza a questo riguardo sono riassunti ed esemplificati per il PNA in fig. 4. Essi dimostrano una simile assenza di correlazione, fatto questo che corrobora l'ipotesi che non ci sia un rapporto di immediato significato biologico tra la quantità totale o l'andamento del ricambio di questi composti e l'andamento della crescita.

Un paragone ulteriore con i risultati ottenuti sul fegato è più difficile. Nel fegato l'andamento dell'incorporazione (precursore la glicina marcata con ¹⁵N) negli acidi nucleici, esemplificato in fig. 5 con i valori della guanina proveniente dal PNA citoplasmatico, e l'andamento della crescita misurato dall'aumento dell'azoto proteico non corrono parallelamente. Durante il massimo d'incorporazione nel PNA la proteina ha un valore basso e solo più tardi, quando la prima decresce essa raggiunge il suo massimo. Vi sono dunque due massimi ben separati, ma non essendo in grado di determinare le perdite di proteine plasmatiche prodotte durante lo stadio di rigenerazione, ci riesce difficile interpretare questo dato nei suoi dettagli. Comunque i dati disponibili sull'in-

(³²) Aqvist S. - Comunicazione personale.

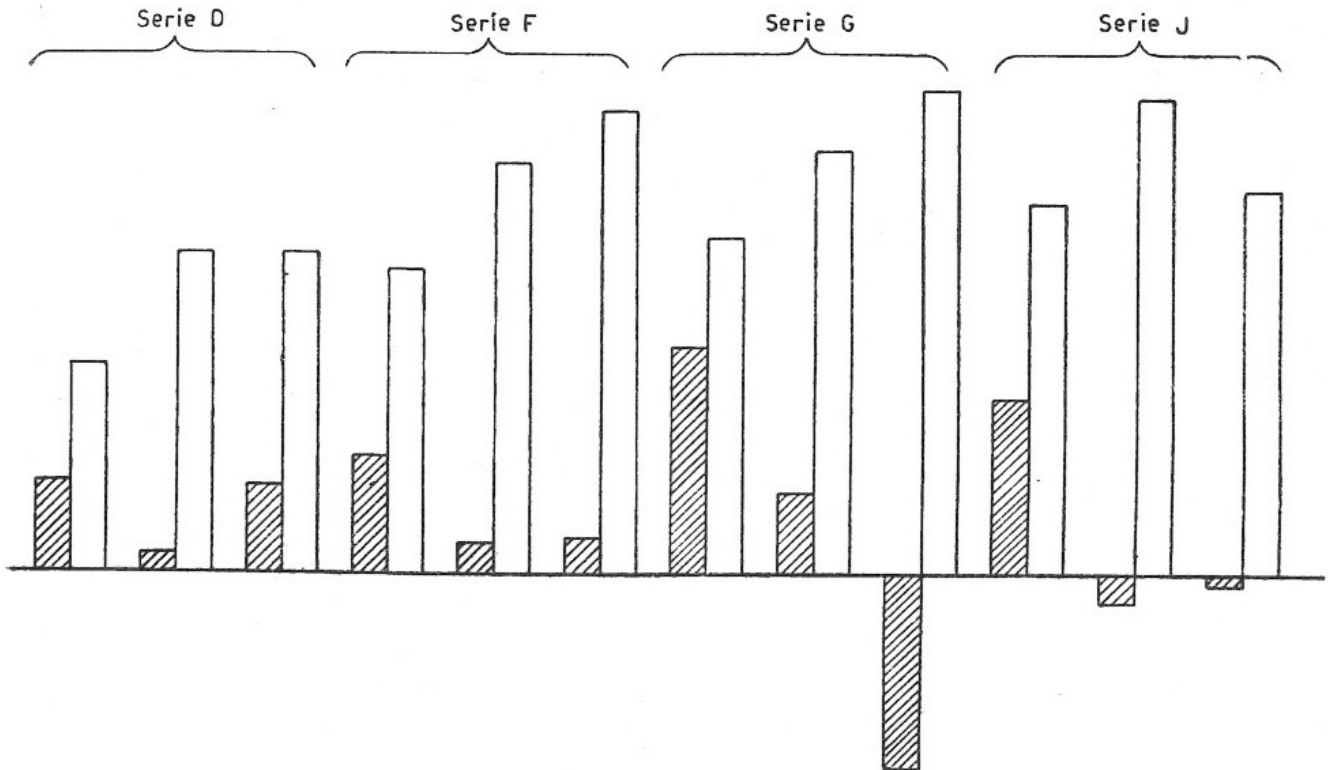


Fig. 7. - Valori relativi (calcolati dalla tav. 2) delle variazioni nell'andamento della crescita (espressi come log del numero di cellule formate in questo periodo) e del PNA per cellula (in mg $\cdot 10^{-12}$) a intervalli di 60 minuti.

corporazione di isotopo in proteine plasmatiche durante differenti stadi di rigenerazione ⁽³³⁾ non corroborano l'ipotesi che la differenza osservata possa essere eliminata dalla formazione di proteine che lasciano il fegato.

Confrontando i dati d'incorporazione dell'azoto si dimostrò ^(1, 2, 33) che i massimi erano separati nel tempo, quello degli acidi nucleici precedendo quello delle proteine. Non è però possibile con i dati attualmente disponibili analizzare più da vicino la relazione tra l'incorporazione negli acidi nucleici e nelle proteine e l'andamento della crescita.

Il fatto che nel fegato in rigenerazione l'aumento del ricambio degli acidi nucleici incominci prima di quello delle proteine potrebbe però stare ad indicare che i primi rivestono una parte di primaria importanza in una postulabile interrelazione tra i due. Nell'*E. coli* non è ancora stato possibile dimostrare questo sfasamento nel tempo per le proteine, poichè i processi cellulari sono ovviamente più rapidi che nel fegato in rigenerazione.

I risultati dell'esperimento A, nel quale la crescita era inibita, rassomigliano sotto un aspetto a quelli descritti da LEVY e coll. ⁽⁸⁾ per

⁽³³⁾ HAMMARSTEN E. - Isotopes in Biochemistry (Ciba Found. Conf.) London (1954), 203.

l'inibizione da cobalto del *B. proteus*. Nei loro esperimenti la quantità di PNA non era alterata dall'inibizione della crescita. Noi abbiamo trovato che il ricambio del PNA era inalterato laddove era molto marcata l'inibizione del ricambio del DNA e delle proteine. Non ci è riuscito di riprodurre questi fenomeni di inibizione aggiungendo solfato ferrico-ammoniacale al mezzo di coltura.

I risultati ottenuti sui batteri certo non depongono contro l'ipotesi che gli acidi nucleici possano agire da attivatori per la sintesi degli aminoacidi e / o delle proteine, ma ben poco ci illuminano nel tentativo di rivelare la natura di una tale interazione. Essi sembrerebbero indicare che in un probabile processo di attivazione sono interposte una o più reazioni che rendono più complessa la relazione.

Tentativi di correlare l'incorporazione dell' ^{15}N nel PNA con il tempo di generazione non hanno condotto ad alcun risultato probante (v. fig. 8, 9 e 10). Per definire questo punto sono in corso ulteriori esperimenti, specialmente in coltura continua.

Se in un diagramma « andamento dell'incorporazione/tempo » ($d \text{ PNA}/dt$) si riporta il numero di batteri in progressive generazioni ($n, 2n, 4n$ ecc.) lungo l'asse dei tempi, si potrà calcolare il numero totale di incorporazioni che avvengono durante una generazione proiettando i punti $2n, 4n$ ecc. sulla curva $d \text{ PNA}/dt$ e misurando la superficie dell'area delimitata dalle proiezioni e dalla curva stessa. Se ciò si fa per

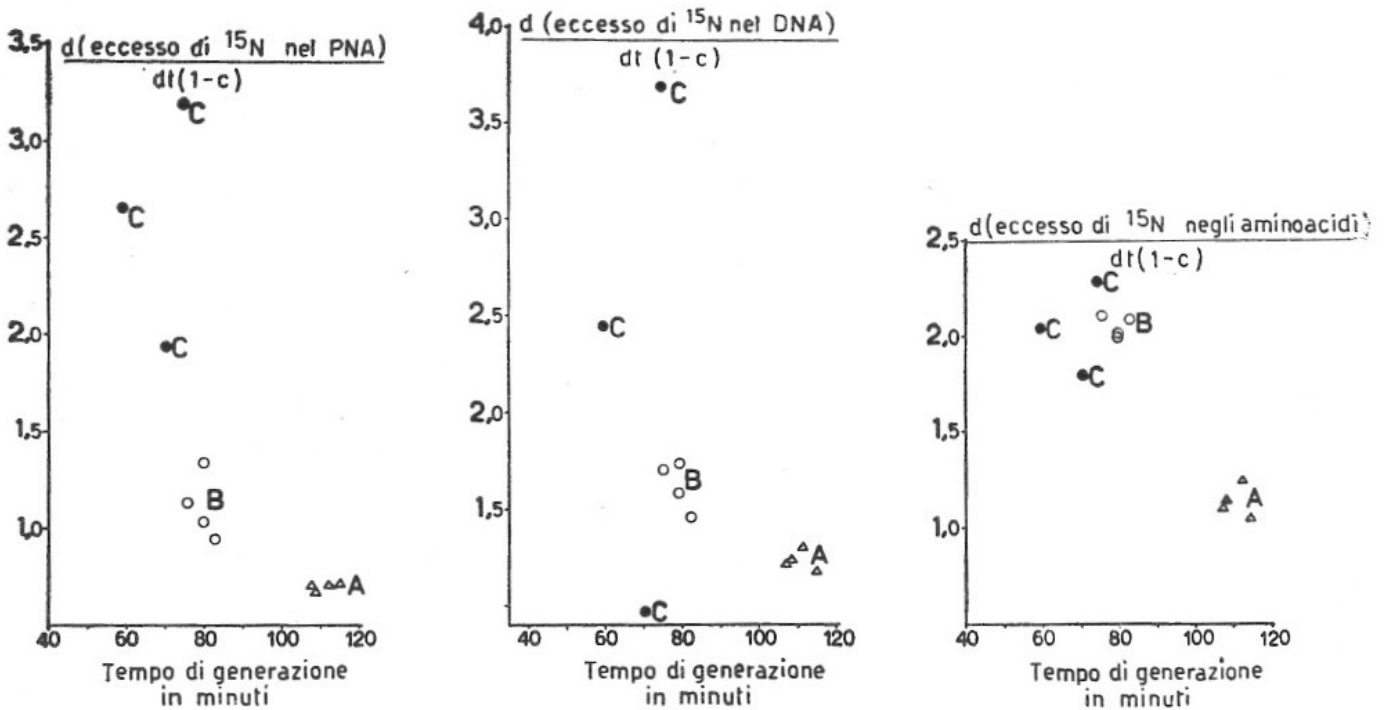


Fig. 8, 9 e 10. - Relazione tra andamento dell'incorporazione dell' ^{15}N (d eccesso di ^{15}N nel metabolita) nel PNA, nel DNA e negli aminoacidi e tempo di generazione ($dt(1-c)$).

la prima generazione (misurando l'area tra la curva e le proiezioni n e $2n$) si trova che il numero totale di incorporazioni rimase abbastanza costante nei diversi esperimenti (250, 280, 280), indipendentemente dalla lunghezza del tempo di generazione che variò da 155 a 300 minuti.

I punti sulla curva di PNA/dt corrispondenti ai valori medi delle generazioni seguenti la prima vennero corretti sulla base delle seguenti considerazioni (per le quali ringraziamo il sig. A. Vestermark). Nella espressione che indica il cambiamento in eccesso di ^{15}N dei componenti batterici in ogni fase particolare della curva di crescita bisogna considerare accanto al valore dell'eccesso in ^{15}N del mezzo e ai valori delle quantità assolute dei componenti batterici, un fattore $1-c$. In questo fattore, c rappresenta quella frazione dell'eccesso di ^{15}N del mezzo che l'eccesso di ^{15}N dei componenti batterici raggiunge al tempo in questione. Quindi il cambiamento in eccesso dei componenti batterici in diversi punti della curva di crescita è funzione del reale eccesso di ^{15}N del componente stesso in quel punto. Per poter paragonare l'andamento dei cambiamenti dei differenti valori in eccesso durante le differenti generazioni, le espressioni delle loro derivate rispetto al tempo devono essere divise per questo valore $1-c$ che corrisponde al valore medio della generazione in questione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro internazionale di chimica microbiologica.
