
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

CARMELO RIGANO, VITTORIA DI MARTINO RIGANO,
VINCENZA VONA, GIOVANNI ALIOTTA, AMODIO FUGGI

**Inibizione della Crescita di *Cyanidium caldarium* da
Metionina Solfossimmina e Metionina Solfone. Due
Inibitori della Glutammina Sintetasi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.1-2, p.
141-148.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_1-2_141_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/>

Fisiologia vegetale. — *Inibizione della Crescita di Cyanidium caldarium da Metionina Solfossimmina e Metionina Solfone. Due Inibitori della Glutammina Sintetasi* (*). Nota (**) di CARMELO RIGANO, VITTORIA DI MARTINO RIGANO, VINCENZA VONA, GIOVANNI ALIOTTA e AMODIO FUGGI, presentata dal Corresp. E. MARRÈ.

SUMMARY. — The growth response of two strains of *Cyanidium caldarium*, grown in media containing ammonia or glutamate as the sole nitrogen source, to the inhibitory effect of methionine sulphoximine and methionine sulphone (which are strong specific inhibitors of glutamine synthetase) supports the claim that both strains assimilate ammonia by way of glutamine formation and that they form glutamate from glutamine.

Of the two strains, one possesses glutamate dehydrogenase whereas the other lacks this enzyme activity. It seems that glutamate dehydrogenase present in one of the two strains plays only a secondary role in ammonia assimilation.

Cyanidium caldarium è un'alga unicellulare appartenente alle *Rhodophyceae* [1] che vive negli ambienti vulcanici caldi ed acidi di ogni parte della terra [2].

Oggi sono numerosi i ceppi di *C. caldarium* isolati in coltura pura, e fra alcuni di essi si possono notare significative differenze di carattere nutrizionale e biochimico. Due ceppi studiati nel nostro laboratorio, ad esempio, differiscono per la capacità di utilizzare determinati substrati nutritivi [3]; essi differiscono inoltre per il possesso di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto inorganico, e precisamente: un ceppo possiede attività nitrato riduttasi e glutammato deidrogenasi, mentre l'altro ceppo manca di ambedue queste attività enzimatiche [3].

Data questa diversità per quanto riguarda la presenza o meno della glutammato deidrogenasi, ci è parso interessante studiare l'effetto della metionina solfossimmina e della metionina solfone sulla crescita dei due ceppi.

Metionina solfossimmina e metionina solfone sono due inibitori specifici della glutammina sintetasi; nel batterio *Klebsiella aerogenes* è stato trovato che queste due sostanze, mentre sono capaci di inibire la crescita di un ceppo mutante che manca di attività glutammato deidrogenasi ed assimila l'ammonio mediante il sistema glutammina sintetasi/glutammato sintasi, sono senza effetto sulla crescita del ceppo selvatico che può assimilare l'ammonio via glutammato deidrogenasi [5].

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Botanica, Fac. Scienze, dell'Università di Napoli, con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Pervenuta all'Accademia l'8 agosto 1977.

Con il presente lavoro ci si propone di ottenere informazioni preliminari sulle possibili vie di assimilazione dell'ammonio in *C. caldarium*, e sul possibile ruolo giocato dalla glutammato deidrogenasi trovata in uno dei due ceppi.

MATERIALE E METODI

Dei due ceppi di *C. caldarium* impiegati per questo studio, uno ci è stato fornito dal Prof. T. D. Brock dell'Università del Wisconsin (ceppo 0206 che possiede nitrato riduttasi e glutammato deidrogenasi), e l'altro dal Dr. W. E. Becker dell'Università di Tubinga (ceppo 1355/1 della collezione di Cambridge, che manca sia della nitrato riduttasi che della glutammato deidrogenasi).

C. caldarium era coltivato a pH 1,9 (i mezzi erano acidificati per aggiunta di acido solforico) ed alla temperatura di 42 °C come descritto precedentemente [3]. La crescita era misurata contando il numero delle cellule mediante l'impiego di un « coulter counter ».

Gli estratti acellulari erano preparati mediante rottura delle cellule alla pressa di French e successiva centrifugazione a 27.000 g. Il contenuto proteico degli estratti era determinato con il metodo di Lowry *et al.* [6]. L'attività glutammata sintetasi era saggiata con il metodo γ -glutamyl trasferasi [7]. L-metionina DL-solfossimmina e L-metionina DL-solfone erano comprati dalla Sigma.

RISULTATI

Effetto della metionina solfossimmina e della metionina solfone sulla crescita del ceppo 1355/1.

Come riportato sopra, questo ceppo di *C. caldarium* manca di attività glutammato deidrogenasi. Esso utilizza benissimo il glutammato come sola sorgente d'azoto; può addirittura usarlo come sola sorgente di carbonio e di energia per la crescita al buio [3].

Come è mostrato nella fig. 1 A, la crescita di tale ceppo 1355/1 in terreni di coltura contenenti ammonio come sola sorgente d'azoto è totalmente inibita sia da metionina solfossimmina (1 mM) che da metionina solfone (1 mM). L'inibizione permane per un periodo di 100 e 160 ore rispettivamente, dopodiché la crescita riprende normalmente.

In terreni di coltura, invece, che contengono glutammato come sorgente d'azoto, la crescita non è assolutamente inibita da metionina solfone (10 mM) ed è inibita solo del 25 % da metionina solfossimmina (1 mM). Con metionina solfossimmina 10 mM la crescita è inibita del 90 % (fig. 1 B).

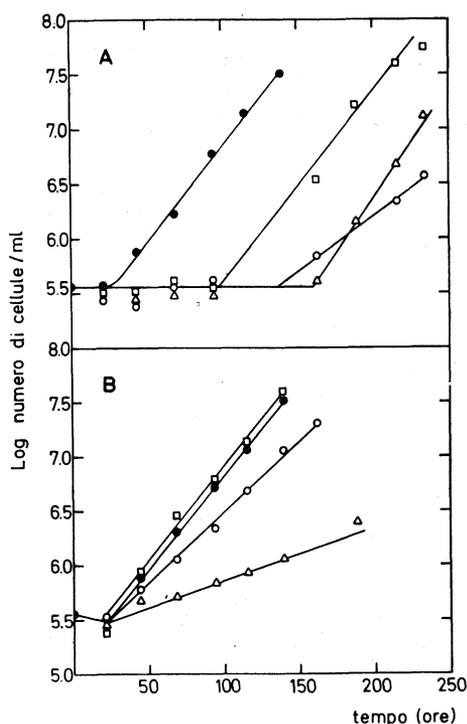


Fig. 1. — Effetto sulla crescita di *C. caldarium*, ceppo 1355/1, della metionina solfossimmina e della metionina solfone in mezzi di coltura contenenti 10 mM $(NH_4)_2SO_4$ (A) o 10 mM glutammato (B). Simboli: (●—●), crescita nel controllo senza inibitore; (□—□) crescita nelle colture con metionina solfone 1 mM (A) e 10 mM (B); (○—○), crescita nelle colture con metionina solfossimmina 1 mM (A e B); (△—△), crescita nelle colture con metionina solfossimmina 10 mM (A e B). Tutte le colture erano effettuate alla luce a 42 °C ed erano insufflate con aria arricchita di CO_2 al 5%.

Effetto della metionina solfossimmina e della metionina solfone sulla crescita del ceppo 0206.

Questo ceppo di *C. caldarium* possiede attività glutammato deidrogenasica.

In un precedente lavoro [8] è stato riportato che tale ceppo 0206 utilizza poco il glutammato come sorgente d'azoto, cosa che è stata interpretata come una scarsa permeabilità dell'alga per l'amminoacido. Successivamente è stato visto che il ceppo 0206 non è in grado di utilizzare numerosi composti organici (che normalmente sono utilizzati dal ceppo 1355/1), cosa che suggerisce che esso non è permeabile alle sostanze organiche in genere [3].

Poiché era da presumere che il ceppo 0206 fosse poco permeabile anche alla metionina solfossimmina ed alla metionina solfone, le colture per gli esperimenti di inibizione della crescita erano separatamente insemensate sia con cellule precedentemente coltivate su ammonio, sia con cellule precedentemente coltivate su glutammato immaginando che queste ultime, già adattate ad utilizzare il glutammato (anche se scarsamente), fossero meglio permeabili anche all'inibitore. C'è da aggiungere che le cellule coltivate su glutammato hanno lo stesso livello di attività specifica glutammato deidrogenasica delle cellule cresciute su ammonio [4].

Nelle colture insemensate con cellule precedentemente cresciute su ammonio non c'è inibizione né da metionina solfossimmina né da metionina solfone. Solo ad elevate concentrazioni di metionina solfossimmina si può notare una

leggera inibizione della crescita (non mostrato). Nelle colture (sempre contenenti ammonio come sorgente d'azoto) insemenate con cellule provenienti da glutammato, invece, metionina solfossimmina (1 mM) inibisce totalmente la crescita mentre metionina solfone (10 mM) è apparentemente senza effetto alcuno (fig. 2).

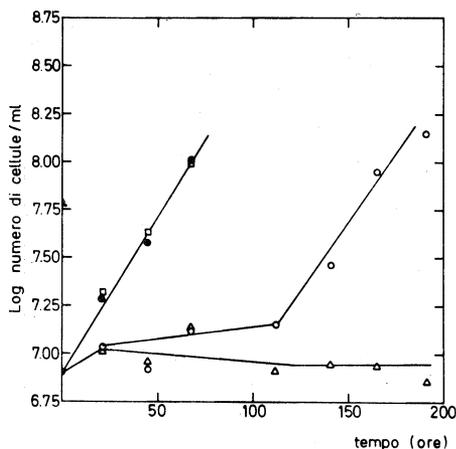


Fig. 2. - Effetto della metionina solfossimmina e della metionina solfone sulla crescita di *C. caldarium*, ceppo 0206, in mezzi di coltura contenenti ammonio (20 mM) come sola sorgente d'azoto. Simboli: (●-●), crescita del controllo; (□-□), crescita in presenza di metionina solfone 10 mM; (○-○), crescita in presenza di metionina solfossimmina 1 mM; (△-△), crescita in presenza di metionina solfossimmina 5 mM. Come inoculum sono state utilizzate cellule precedentemente coltivate su glutammato. Per le procedure di coltivazione ved. legenda della fig. 1.

Effetto della metionina solfossimmina e della metionina solfone sulla glutammina sintetasi in vivo.

Quando metionina solfossimmina è iniettata in animali vi è un drastico decremento dell'attività glutammina sintetasi del fegato e del cervello che è alla base dell'effetto convulsivante di questa sostanza [9]. Similmente le cellule di un'alga blu-verde, *Anabaena cylindrica*, perdono l'attività glutammina sintetasi per effetto della metionina solfossimmina [10].

Il meccanismo di inibizione della glutammina sintetasi da metionina solfossimmina e da metionina solfone è stato studiato nel cervello di animali [11]; è stato accertato che in presenza di ATP e magnesio, per azione della glutammina sintetasi la metionina solfossimmina viene trasformata in un derivato fosforilato che si lega irreversibilmente alla glutammina sintetasi stessa inibendone l'attività. Invece la metionina solfone, che pure è un potente inibitore della glutammina sintetasi [11], non si lega stabilmente all'enzima.

Conformemente a tali risultati riportati in letteratura, l'aggiunta di metionina solfossimmina ad una sospensione di cellule di *C. caldarium* del ceppo 1355/1, porta ad una rapida perdita di attività della glutammina sintetasi. Questa perdita di attività si ha tanto in cellule risospese su ammonio quanto in cellule risospese su glutammato (Tabella I); tuttavia, dopo 5 ore, mentre su ammonio la perdita di attività è totale, su glutammato vi è ancora un'attività che, rispetto al controllo, è del 50%. Anche dopo 22 ore di incubazione si può misurare un'attività residua del 14%.

L'incubazione, invece, con metionina solfone non produce perdita significativa di attività anche nelle cellule risospese su ammonio.

TABELLA I

Effetto della metionina solfossimmina (MSX) e della metionina solfone (MSF) in vivo sulla glutammina sintetasi di cellule di C. caldarium (ceppo I355/X).

Azoto nelle sospensioni di cellule	Inibitore	Attività specifica della glutammina sintetasi		
		Tempo		
		0	5 ore	22 ore
Ammonio 20 mM . . .	—	0,34	0,30	0,25
Ammonio 20 mM . . .	MSX 1 mM	0,34	0,0	0,0
Ammonio 20 mM . . .	MSF 10 mM	0,34	0,25	0,22
Glutammato 10 mM . .	—	0,34	0,25	0,14
Glutammato 10 mM . .	MSX 1 mM	0,34	0,12	0,02
Glutammato 10 mM . .	MSF 10 mM	0,34	0,27	0,14

Le cellule per quest'esperimento provenivano da una coltura su ammonio. Dopo raccolta e lavaggio per centrifugazione, le cellule venivano risospese in nuovi mezzi di coltura contenenti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glutammato, MSX ed MSF, come indicato nelle colonne 1 e 2. Le sospensioni erano tenute alla luce a 42 °C ed erano insufflate con aria arricchita del 5% di CO_2 . Al tempo zero, dopo 5 e 22 ore, venivano prelevati campioni di cellule con le quali venivano preparati estratti nei quali era dosata l'attività glutammina sintetasi. L'attività specifica è espressa come μmoli di idrossammato formato/min/mg di proteine.

TABELLA II

Effetto della metionina solfossimmina (MSX) in vivo sulla glutammina sintetasi di cellule di C. caldarium, ceppo 0206, cresciute su ammonio o su glutammato.

Provenienza delle cellule	Azoto nelle sospensioni	Inibitore	Attività specifica della glutammina sintetasi		
			Tempo		
			0	5 ore	22 ore
Culture su ammonio . . .	ammonio	—	0,58	—	0,62
Culture su ammonio . . .	ammonio	MSX 10 mM	0,58	—	0,50
Culture su glutammato . .	ammonio	—	2,2	—	2,0
Culture su glutammato . .	ammonio	MSX 1 mM	2,2	0,0	—

Le cellule utilizzate per questo esperimento provenivano da colture su ammonio o da colture su glutammato. Dopo raccolta e lavaggio per centrifugazione le cellule erano risospese in nuovi mezzi con ammonio ai quali era aggiunto MSX 1 mM o 10 mM come indicato nella colonna 3. Per la procedura vedi Legenda della Tabella I. Le cellule di questo ceppo cresciute su glutammato contengono molta più attività glutammina sintetasi rispetto alle cellule cresciute su ammonio [4].

Nel ceppo di *C. caldarium* 0206 l'aggiunta di metionina solfossimmina a cellule provenienti da colture su ammonio produce una leggera perdita di attività glutammina sintetasi. L'aggiunta, invece di metionina solfossimmina a cellule provenienti da colture su glutammato produce una rapida e totale perdita di attività (Tabella II). Questo risultato rafforza l'ipotesi che le cellule coltivate su ammonio sono poco permeabili alla metionina solfossimmina e che le cellule coltivate su glutammato sono permeabili a questa sostanza.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti mostrano innanzitutto che la crescita dei due ceppi di *C. caldarium* è fortemente inibita da metionina solfossimmina. Poiché, come è stato ampiamente dimostrato, questa sostanza è un inibitore specifico della glutammina sintetasi e non di altri sistemi enzimatici (tra cui alcune ammino trasferasi), è evidente che l'inibizione della crescita è dovuta primariamente alla impossibilità delle cellule di fare glutammina.

Il fatto poi che il glutammato protegge la crescita dalla inibizione suggerisce che le cellule mancano della capacità di fare glutammato, oltre che glutammina. Se esse potessero formare glutammato, infatti, la loro crescita sarebbe protetta contro l'inibizione da metionina solfossimmina così come è protetta dal glutammato aggiunto alle colture. Questa loro apparente incapacità di formare glutammato può essere dovuta al fatto che quest'amminoacido si forma dalla glutammina dimodochè in presenza di metionina solfossimmina che inibisce la glutammina sintetasi, le cellule non potendo formare glutammina non possono formare neppure glutammato.

Se il glutammato si forma dalla glutammina, come pare, allora significa che nei due ceppi di *C. caldarium* l'assimilazione dell'ammonio avviene ad opera della glutammina sintetasi e la formazione del glutammato avviene ad opera di una glutammato sintasi che catalizza il trasferimento riduttivo dell'azoto amidico della glutammina alla posizione 2-cheto del 2-chetoglutarato.

Nei batteri, dove è stata per primo messa in evidenza, la glutammato sintasi utilizza piridin nucleotidi ridotti come potere riducente [12]. In *C. caldarium* non è stato possibile dimostrare l'esistenza di una NADH- o NADPH glutammato sintasi [4]. È sempre possibile però che sia presente una glutammato sintasi dipendente da ferridossina simile a quella recentemente messa in evidenza in alcuni organismi fotosintetici [13].

L'aggiunta di metionina solfossimmina a sospensioni di cellule di *C. caldarium* produce una perdita di attività glutammina sintetasi che però non è mai totale in presenza di glutammato come invece lo è in assenza di glutammato, questo significa che il glutammato protegge la crescita contro l'inibizione in due modi: 1) fornendo azoto organico alle cellule le quali possono così crescere anche se la via di organicazione dell'azoto è fortemente inibita; 2) proteggendo la glutammina sintetasi contro la completa inibizione da metionina solfossimmina (purchè la concentrazione di tale sostanza non sia troppo

elevata) in maniera che una pur minima attività residua sia sufficiente a fornire alle cellule la quantità di glutammina necessaria per formare i composti azotati che dalla glutammina si formano.

Con metionina solfone si sono ottenuti risultati diversi nei due ceppi e poiché uno di questi possiede una glutammato deidrogenasi e l'altro no, è bene parlarne separatamente.

Anche la metionina solfone è un inibitore specifico della glutammina sintetasi ma, contrariamente alla metionina solfossimmina, non si lega irreversibilmente all'enzima [11]. Sicuramente dipenderà da questo se l'inibizione della crescita da metionina solfone è facilmente e totalmente soppressa dal glutammato, anche quando la concentrazione dell'inibitore è molto elevata. Il fatto che la crescita del ceppo 1355/1 su ammonio è totalmente inibita da metionina solfone 1 mM significa che la glutammina sintetasi è del 100% inattiva, e questo suggerisce che le cellule non sono in grado di produrre per altra via glutammato neppure in piccola quantità sufficiente ad indurre una pur minima protezione della glutammina sintetasi. Questo avvalorava l'ipotesi che, almeno nel ceppo 1355/1, l'unica via di assimilazione dell'ammonio è la glutammina sintetasi e che una via alternativa a questa non esiste. Risulta rafforzata inoltre l'ipotesi che il glutammato si forma dalla glutammina.

Metionina solfone invece non inibisce la crescita del ceppo 0206 il quale, come già detto, possiede una glutammato deidrogenasi. Questa mancanza di inibizione può anche dipendere dal fatto che la metionina solfone non penetri nelle cellule; può anche significare però che via glutammato deidrogenasi (quest'enzima in *C. caldarium* come pure in altri organismi non è inibito da metionina solfossimmina e da metionina solfone) venga prodotto glutammato in quantità sufficiente a proteggere la glutammina sintetasi, e quindi la crescita dell'alga, contro la inibizione da metionina solfone che apparentemente è un inibitore meno forte della metionina solfossimmina e la sua inibizione è facilmente e totalmente soppressa da glutammato.

Tuttavia, anche se glutammato è prodotto dalla glutammato deidrogenasi, sembra sia da escludere che questa possa costituire una via efficiente di assimilazione dell'ammonio in alternativa alla glutammina sintetasi. Infatti il glutammato prodotto dalla glutammato deidrogenasi apparentemente non raggiunge mai nelle cellule concentrazioni elevate: se così fosse infatti la crescita del ceppo 0206 sarebbe protetta anche contro l'inibizione da metionina solfossimmina così come, d'altra parte, è protetta la crescita del ceppo 1355/1 dal glutammato aggiunto ai terreni di coltura. Che la glutammato deidrogenasi di *C. caldarium*, ceppo 0206, non possa costituire una via efficiente di assimilazione dell'ammonio, d'altra parte, si può desumere anche dal fatto che essa presenta un elevato valore di K_m (3 mM) per l'ammonio (non pubblicato).

Ringraziamenti. Ringraziamo sentitamente il Prof. T. D. Brock ed il Dr. W. E. Becker per averci fornito i ceppi di *C. caldarium* utilizzati per questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. SECKBACH e R. IKAN (1972) - *Sterol and chloroplast structure of Cyanidium caldarium*, « *Plant. Physiol.* », 49, 457-459.
- [2] W. N. DOEMEL e T. D. BROCK (1971) - *The physiological ecology of Cyanidium caldarium*, « *J. Gen. Microbiol.* », 67, 17-32.
- [3] C. RIGANO, A. FUGGI, V. DI MARTINO RIGANO e G. ALIOTTA (1976) - *Studies on utilization of 2-ketoglutarate, glutamate and other amino acids by the unicellular alga Cyanidium caldarium*, « *Arch. Microbiol.* », 107, 133-138.
- [4] C. RIGANO, G. ALIOTTA e V. DI MARTINO RIGANO (1975) - *Observations on enzymes of ammonia assimilation in two different strains of Cyanidium caldarium*, « *Arch. Microbiol.* », 104, 297-299.
- [5] J. E. BRENCHLEY (1973) - *Effect of methionine sulphoximine and methionine sulphone on glutamate synthesis in Klebsiella aerogenes*, « *J. Bact.* », 114, 666-673.
- [6] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR e R. J. RANDALL (1951) - *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, « *J. Biol. Chem.* », 193, 265-275.
- [7] B. M. SHAPIRO e E. R. STADTMAN (1970) - *Glutamine synthetase (Escherichia coli)*, « *Methods in Enzymology* », 17 A, Academic press, 910-922.
- [8] C. RIGANO, G. ALIOTTA e U. VIOLANTE (1974) - *Presence of high levels of nitrate reductase activity in Cyanidium caldarium grown on glutamate as the sole nitrogen source*, « *Plant Sci. Letters* », 2, 277-281.
- [9] W. B. ROWE e A. MEISTER (1970) - *Identification of L-methionine-S-Sulfoximine as the convulsivant isomer of methionine sulfoximine*, « *Proc. Nat. Acad. Sci.* », 66, 500-506.
- [10] W. D. P. STEWART e P. ROWELL (1975) - *Effects of L-methionine DL-sulphoximine on the assimilation of newly fixed NH₃, acetylene reduction and heterocyst production in Anabaena cylindrica*, « *Biochem. Biophys. Res. Commun.* », 65, 846-855.
- [11] R. A. RONZIO e W. B. ROWE e A. MEISTER (1969) - *Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine*, « *Biochemistry* », 8, 1066-1075.
- [12] J. MEERS, D. TEMPEST e C. BROWN (1970) - *Glutamine (amide): 2-oxo-glutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria*, « *J. Gen. Microbiol.* », 64, 187-194.
- [13] B. J. MIFLIN e P. J. LEA (1976) - *The path of ammonia assimilation in the plant kingdom*, « *Trends in Biochemical Sciences* », 1, 103-106.