

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

ALFREDO RUFFO

**Bioregolazione del ciclo citrico in culture cellulari**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 82 (1988), n.4, p. 805–818.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1988\\_8\\_82\\_4\\_805\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_4_805_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/>



ALFREDO RUFFO

## BIOREGOLAZIONE DEL CICLO CITRICO IN CULTURE CELLULARI (\*)

### INTRODUZIONE

L'ordine biologico per cui una cellula mantiene costante la sua composizione chimica e con essa il suo aspetto morfologico, malgrado le continue modificazioni metaboliche che subisce, dipende soprattutto dal meccanismo unitario con cui il ciclo citrico trasforma l'energia ricavata dall'ambiente in equivalenti adatti ad essere utilizzati col massimo rendimento nelle sintesi macromolecolari. Quindi la regolazione del flusso del ciclo nei vari distretti cellulari ha acquisito grande importanza teorica e sperimentale per valutare le correlazioni esistenti tra l'interruzione dell'apporto energetico e le varianti metaboliche connesse con la produzione di intermediari precursori di composti preziosi per l'autonomia cellulare, quali gli amminoacidi, gli acidi grassi ed il glicosio.

Siccome anni addietro noi trovammo [1] una nuova reazione fra ac. gliossilico ed ac. ossaloacetico, il ben noto «catalizzatore» che si riproduce alla fine della sequenza del ciclo con il compito di bruciare l'acetato, una serie di ricerche [2, 3, 4, 5] eseguite su mitocondri di fegato di ratto e rene di coniglio ci portò all'identificazione di un nuovo ac. tricarbossilico a 6 C, l'ac. ossalomalico (v. fig. 1) prodotto dalla sintesi spontanea degli ac. gliossilico ed ossaloacetico che avviene sia *in vitro* che *in vivo* in condizioni fisiologiche di temperatura e di pH. Il nuovo composto risultò essere un potente inibitore competitivo della aconitasi, enzima responsabile del decorso dell'intero ciclo, ponendo il problema del suo effetto sulla bioregolazione del ciclo a livello molecolare nei tessuti animali.

### CONTROLLO DEL CICLO DA OSSALOMALATO

A questo punto permettetemi di ringraziare il Presidente ed il Consiglio di Presidenza per avermi offerto la possibilità di riferire alcuni risultati più recenti ottenuti su culture cellulari che, ritengo, possano essere utilizzati per ampliare l'indagine sui cosiddetti «grandi» problemi della biologia quali l'accrescimento, la divisione e la differenziazione cellulare, introducendo una nuova tematica basata sullo studio di alcuni parametri metabolici in condizione di transitoria interruzione dell'apporto energetico, quale quella prodotta dall'ac. ossalomalico sul ciclo citrico. È infatti ben noto che in tali condizioni i composti che partecipano alla sequenza di reazioni che caratterizza il ciclo, invece di venire ossidati, subiscono una deviazione metabolica tramite reazioni dette «ancillari» capaci di fornire gli intermediari adatti che portano alla gluconeogenesi, alla urea- e lipogenesi.

Lo spunto programmatico delle ricerche che mi accingo a riferire deriva da una osservazione precedente relativa al meccanismo d'azione dell'ossalomalato sulla isocitri-

(\*) Conferenza tenuta nella seduta del 23 aprile 1988.

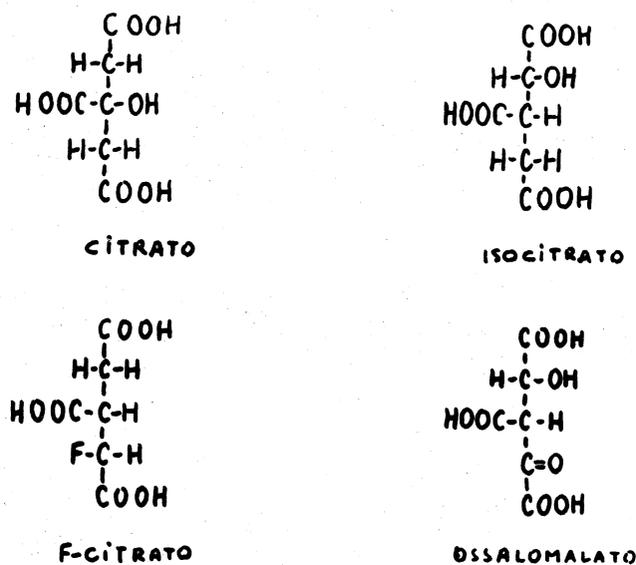


Fig. 1. — Analogia strutturale fra substrati ed inibitori.

co-deidrogenasi NADP<sup>+</sup>-dipendente [6]. Anche su quest'enzima, in modo analogo all'aconitasi, l'ossalomalato produce inibizione competitiva sull'ossidazione dell'isocitrato, ma saggiato sulla reazione inversa e cioè nelle condizioni in cui l'enzima riduce il chetoglutarato ed il CO<sub>2</sub> in ac. isocitrico, si osservò che l'ossalomalato veniva ridotto dal NADPH in un composto che perdeva il suo potere inibente. Il che da un lato dimostra che l'ossalomalato forma un complesso fra il suo gruppo chetonico (v. fig. 1) ed il sito attivo dell'enzima paragonabile a quello del substrato naturale e dall'altro indica che l'isocitrato-deidrogenasi, qualora legata con il NADP<sup>+</sup> allo stato ridotto, possiede anche la funzione di disattivare l'inibizione prodotta dall'ossalomalato sull'aconitasi.

Dall'esame della fig. 1 risulta infatti l'analogia strutturale fra i primi 2 substrati del ciclo e l'ossalomalato, qui paragonato ad un altro famoso inibitore del ciclo il fluorocitrato, il quale si distingue per l'effetto alchilante del fluoro che, mentre inattiva irreversibilmente l'aconitasi, non agisce sulla isocitrato deidrogenasi. La somiglianza strutturale dell'ossalomalato con i primi 2 substrati del ciclo spiega senza bisogno di ulteriore commento la «specificità» della inibizione osservata sui primi 2 enzimi e suggerisce un meccanismo di regolazione selettivo a livello molecolare in cui, quando esso si forma per condensazione tra l'ac. gliossilico e l'ossalacetico, blocca un sito iniziale del ciclo per competizione sull'aconitasi dalla quale può venir rimosso ad opera della isocitrato-deidrogenasi a condizione che siano disponibili sufficienti quantità di NADPH. Inoltre a garanzia della reversibilità dell'inibizione è stato trovato nei mitocondri e nel supernatante di fegato di ratto un enzima [7], probabilmente una aldo-liasi, capace di scindere l'ossalomalato nei suoi componenti originari. Pertanto noi riteniamo [8] che il meccanismo di regolazione da ossalomalato abbia significato fisiologico e costituisca un mezzo selettivo per deviare nei tessuti animali il metabolismo del citrato

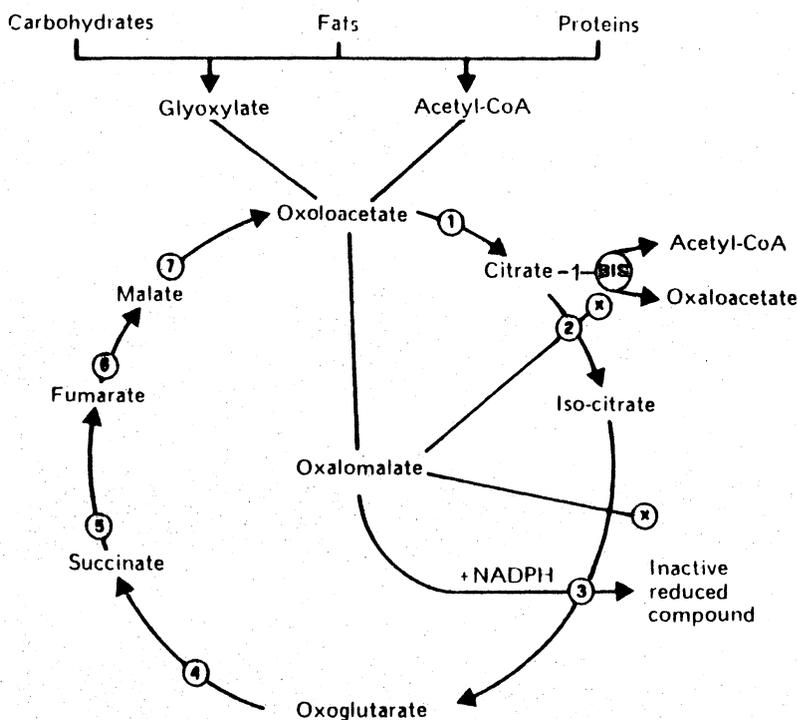


Fig. 2. - Ciclo citrico interrotto dell'ossalomalato. 1 = Citrato sintetasi; 1-bis = ATP-citrato liasi; 2 = Aconitasi; 3 = Isocitrato (NADP) deidrogenasi; 4 = Chetoglutarico-deidrogenasi; 5 = Succinico-deidrogenasi; 6 = Fumarasi; 7 = Malico-deidrogenasi. Le crocette indicano gli enzimi inibiti, spiegazione nel testo. (Da *Symp. on Macromolec. in Function. Cells*, «Pushino», 1982, II, pag. 31).

verso un destino metabolico alternativo come riportato schematicamente nella fig. 2.

Essa mostra che quando il gliossilato viene a contatto con il ciclo compete con l'acetyl-CoA per reagire con l'ossalacetato dando origine ad ossalomalato che blocca l'aconitasi con conseguente accumulo di citrato nei mitocondri dove, non potendo essere smaltito nel ciclo, viene trasferito nel citoplasma da traslocatori specifici. Qui trova l'ATP-citrato liasi, un enzima connesso con il metabolismo del citrato non inibito da ossalomalato, per cui si prevede che l'eccesso di citrato venga di nuovo scisso nei suoi componenti ossaloacetato e acetyl-CoA ben noti precursori rispettivamente di gluconeogenesi e di lipogenesi. La verifica sperimentale di quest'ultimo punto ci ha fornito risultati che confermano la relazione esistente tra l'accumulo di citrato e la formazione *de novo* di ac. grassi.

#### EXTRA-SINTESI DI ACIDI GRASSI

Il problema è stato affrontato dapprima iniettando a giovani ratti soluzioni equimolecolari dei 2 precursori gliossilato ed ossaloacetato e quindi determinando nel fegato il citrato con un metodo enzimatico e gli acidi grassi al gas-cromatografo.

I risultati mostrarono contemporaneamente ad accumulo di citrato incremento

della sintesi di ac. palmitico e stearico presi come «standard» di riferimento, che in alcuni casi superava di 10 volte i valori dei controlli. Incrementi analoghi si ottennero anche in sospensioni di fegato incubate in presenza di ossaloacetato per l'aggiunta di piccole quantità sia di gliossilato, sia di ossalomalato [9]. Per quanto riguarda la gluconeogenesi in vari esperimenti venne dosato anche il glicoso con la glicoso-ossidasi ma i risultati ottenuti, per quanto incoraggiati, meritano ulteriore verifica a causa delle molteplici variabili metaboliche cui è sottoposto il glicoso nei sistemi esaminati.

Per tali ragioni allo scopo di confermare la correlazione fra l'interruzione del flusso energetico del ciclo e la deviazione metabolica osservata, ci è apparso necessario ripetere il risultato relativo alla coincidenza tra l'accumulo di citrato e la sintesi *de novo* di palmitato e stearato, adoperando un modello con minori variabili, quale quello delle culture *in vitro* che nello stesso tempo ci avrebbe permesso di allargare l'indagine sull'accrescimento e sulla divisione cellulare.

#### EFFETTO DELL'OSSALOMALATO SULLA CRESCITA CELLULARE

Le prime culture esaminate sono state analizzate presso il Lab. di Biologia Molecolare e Cellulare dell'Istituto di Medicina Sperimentale del C.N.R. in Roma.

I risultati riportati nella fig. 3 mostrano che l'ossalomalato aggiunto in concentrazioni tra 1 e 5 mM ad una linea di fibroblasti ottenuti da polmoni umani neonatali ne arresta la crescita mentre è privo di effetto sull'accrescimento di cellule Hela, notoriamente neoplastiche.

Risultati giudicati stimolanti perché suggeriscono che l'interruzione funziona solo su cellule che hanno un numero fisso di mitosi mentre è inefficace su quelle immortali come la Hela. Su quest'ultime è stato osservato un altro aspetto relativo alla sintesi proteica il cui caratteristico aumento conseguente all'inoculo [10] viene impedito in presenza di ossalomalato 5 mM, come appare dai dati riportati nella fig. 4.

Siccome in tali condizioni è stato trovato anche incremento della sintesi di ac. grassi, abbiamo voluto approfondire il problema della deviazione metabolica verso la lipogenesi scegliendo una linea derivata da fibroblasti di feti di topolino nota con la sigla 3T3-L1 di cui si è discusso molto in questi ultimi anni [11] per la loro proprietà di trasformarsi in adipociti dopo un lungo periodo di cultura, senza alcun altro intervento esterno e quindi senza neanche un'adeguata spiegazione.

Pertanto dopo aver confermato questi dati nel nostro laboratorio ed aver osservato che l'aggiunta di ossalomalato 2 mM al mezzo di cultura incrementava la sintesi di ac. palmitico e di altri ac. grassi rispetto ai controlli, abbiamo eseguito una serie di esperimenti su campioni coltivati in doppio allo scopo di poter osservare contemporaneamente l'effetto sulla crescita e sulla sintesi di ac. grassi a tempi varianti fra 2 e 12 giorni. Inoltre sui liquidi nutritivi, ottenuti per centrifugazione, si dosava con metodi enzimatici il citrato, l'ossalacetato ed il gliossilato.

I risultati sono riportati nelle fig 5 e 6 e nelle tabelle che seguono. I primi mostrano evidente effetto sulla crescita che viene addirittura arrestata (v. fig. 5) nei 2 esperimenti indicati con le lettere A e B in cui il contenuto di cellule all'inizio era piuttosto basso. Quelli riportati nella fig. 6 dove le cellule all'inizio erano molto più numerose in entrambi gli esperimenti mostrano minore, ma analoga inibizione della crescita e con-

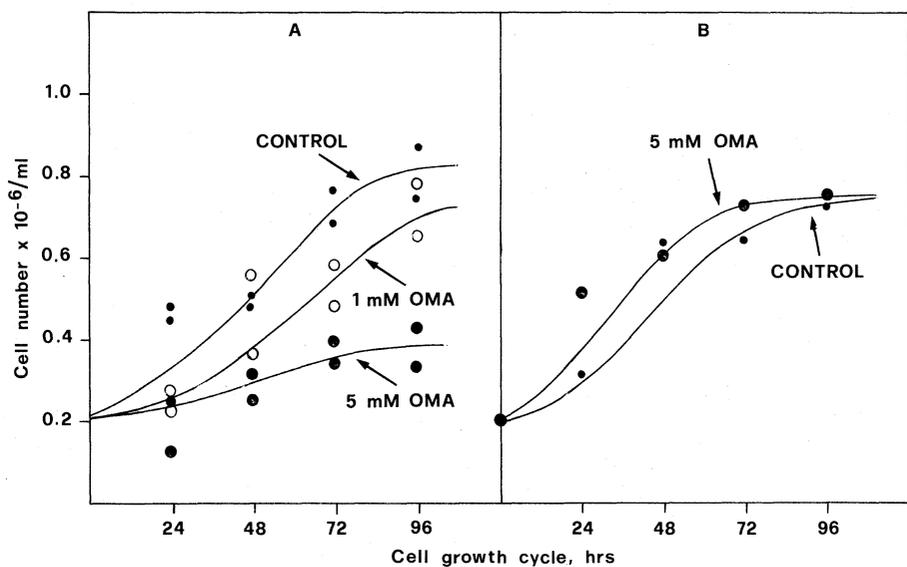


Fig. 3. - Effetto dell'ossalomalato sulla crescita di cellule di polmone umano neonatale coltivate in monostrato (A) in paragone a cellule HeLa coltivate in sospensione (B). (Risultati non pubblicati).

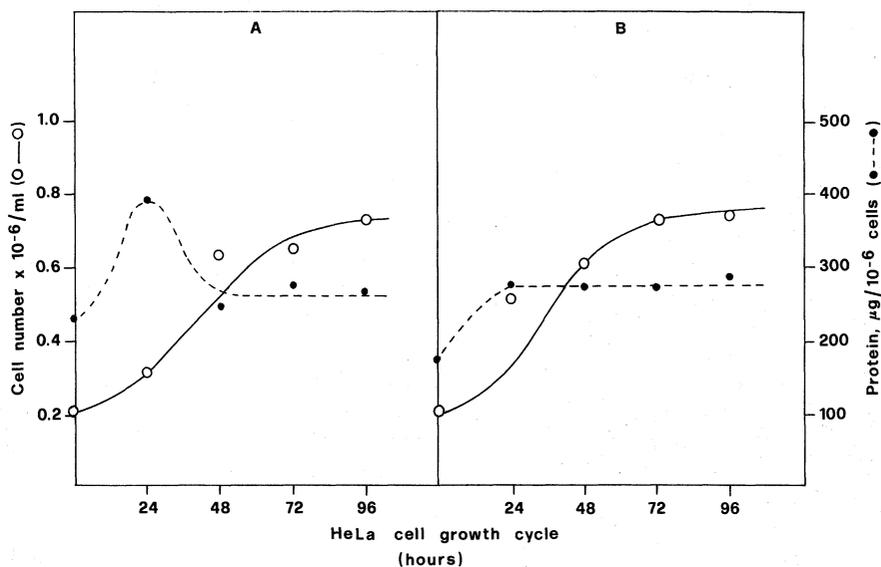


Fig. 4. - Effetto dell'ossalomalato sulla sintesi proteica di cellule HeLa coltivate in sospensione (A = Controllo; B = 5 mM di ossalomalato) (Risultati non pubblicati).

fermano al 7° giorno la reversibilità del fenomeno nella prova (in doppio, v. triangolino dell'esper. B) che dopo lavaggio con il liquido nutritivo viene incubata senza acido ossalomalico. La crescita riprende regolarmente come appare dalla dipendenza della curva pressoché parallela a quella del controllo.

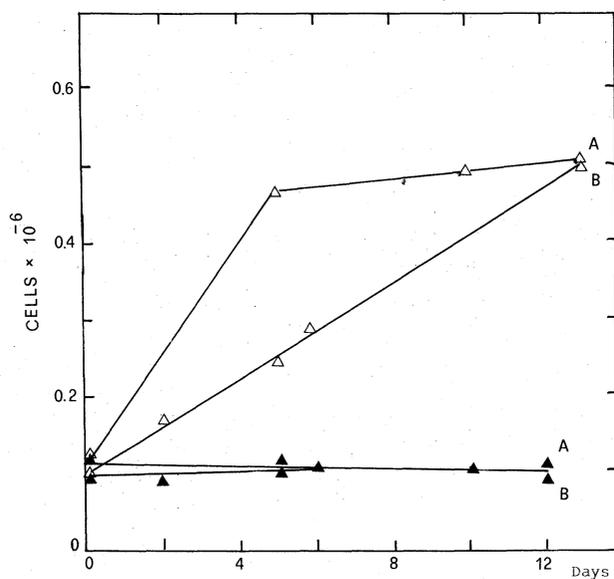


Fig. 5. — Effetto dell'ossalomalato sulla crescita di cellule 3T3-L1 coltivate in monostrato in 2 esperimenti A e B. (I simboli corrispondono a prove in doppio, quelli vuoti ai controlli, quelli pieni in presenza di ossalomalato 5 mM). (Risultati non pubblicati).

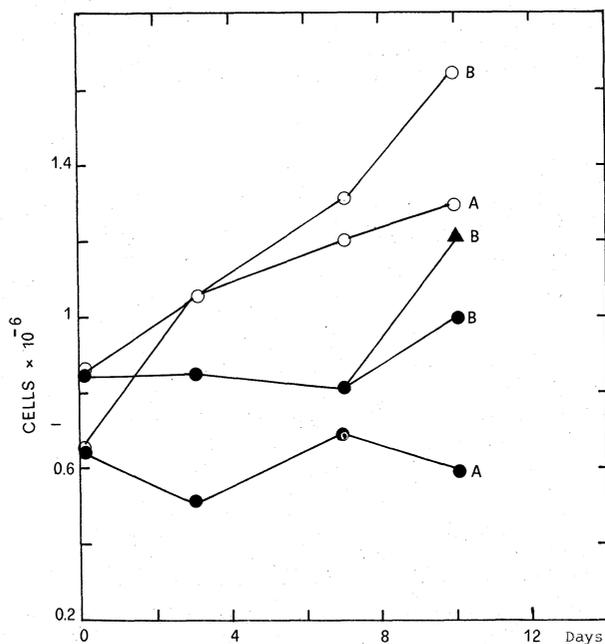


Fig. 6. — Reversibilità dell'inibizione della crescita di 3T3-L1 in culture monostrato. (I simboli corrispondono a prove in doppio, i vuoti ai controlli, i pieni in presenza di ossalomalato 5 mM. Al 7° giorno nello esp. B una delle prove contenente l'ossalomalato venne lavata e riportata in cultura: si osservi la ripresa della crescita contrassegnata dal triangolino pieno B). (Risultati non pubblicati).

## DEVIAZIONE METABOLICA VERSO LA LIPOGENESI

I dati riportati nelle tabelle I e II sono stati ottenuti dai campioni dopo la conta in seguito a centrifugazione con lo scopo di separare le cellule dal liquido nutritivo che veniva raccolto a parte. Le cellule venivano estratte con una miscela di cloroformio e metanolo da cui si separavano gli ac. grassi liberi che, dopo metilazione, venivano analizzati al gas-cromatografo in confronto ad una miscela tarata di ac. palmitico, stearico ed arachidonico che fungeva da *standard* interno.

I dati riportati nella tabella I relativi a 3 esperimenti interrotti ad intervalli diversi, mostrano in presenza di ossalomalato costante aumento del contenuto di ac. grassi liberi il cui valore da un minimo del 59% supera in alcuni casi il 300%, confermando quanto da noi osservato in precedenza nel fegato di ratto (l.c. 9).

Quelli riportati nella tabella II meritano un cenno a parte perché, dosando alcuni metaboliti del ciclo nei liquidi nutritivi in cui erano cresciute le cellule, ci siamo trovati di fronte ad un dato relativo alla presenza di quantità apprezzabili di gliossilato anche nelle prove non trattate con ac. ossalomalico che fungevano da controllo.

## LA QUESTIONE DEL GLOSSILATO

Esiste una profonda differenza sul ruolo metabolico attribuito al gliossilato nelle piante e nei microrganismi rispetto a quello dei tessuti animali. Infatti nei primi sono efficienti due enzimi (assenti negli animali) l'isocitrato-liasi che lo forma e la malato-sintasi che l'utilizza, per cui il gliossilato partecipa ad un ciclo collaterale al citrico, noto appunto come «ciclo del gliossilato» producendo una deviazione anabolica che, tramite il guadagno netto di una molecola di succinato per ogni giro del ciclo, porta a sintesi di glucosio [12, 13]. Pertanto il gliossilato è considerato giustamente un metabolita fondamentale in vari batteri e nelle piante in cui è contenuto. Invece è assente o scarsamente presente nelle cellule animali perché un enzima, la gliossilico-glutamminico-transaminasi (EC. 2.6.14) lo trasforma nella sua forma ridotta ed aminata di glicina. Inoltre è noto il suo effetto tossico dovuto all'elevata reattività del carbocatione aldeico che, però, scompare qualora viene somministrato a ratti in concentrazione equimolecolare con l'ossalacetato con cui, come abbiamo dimostrato [14], reagisce anche *in vivo* dando origine all'ossalomalato. Per tali ragioni il gliossilato non è considerato un metabolita abituale nei tessuti animali. Ma ciò non esclude che esso si possa formare, probabilmente sotto il controllo di un sistema non ancora esplorato, ad opera di un altro enzima abbondantemente diffuso nei tessuti animali la D-aminoacido-ossidasi (EC. 1.4.3.3.) capace di formarlo dalla glicina, giustificando in tal modo l'implicazione di questo amminoacido in una grave malattia genetica la cosiddetta «iperossaluria primaria» dovuta alla delezione di un enzima, la gliossilico-chetoglutarico-carbolicasi capace di trasformare il gliossilato quando si forma [15]. I dati analitici più recenti sul suo contenuto nei tessuti animali danno valori molto bassi circa 5 nanomoli per grammo di fegato di ratto determinati all'HPLC [16].

Ecco la ragione per cui noi siamo rimasti sorpresi allorché considerando i risultati riportati nella tabella II relativi all'analisi con metodi enzimatici dei supernatanti delle nostre culture, abbiamo rilevato che il gliossilato era contenuto in tutte le prove controllo in concentrazioni dell'ordine di frazioni micromolecolari e cioè tra 10 e 40 volte

TABELLA 1. — *Acidi grassi determinanti in cellule 3T3-L1.*

N° esperimento	Giorni di cultura	$\mu\text{g}/10^6$ di cellule			
		Palmitato	$\Delta\%$	Stearato	$\Delta\%$
1.1 Controllo + OMA 5 mM	3	1.64	—	2.9	—
	3	5.90	+ 259	11.3	+ 289
1.2 Controllo + OMA 5 mM	7	3.62	—	6.2	—
	7	6.92	+ 91	9.9	+ 59
1.3 Controllo + OMA 5 mM	10	2.61	—	3.6	—
	10	7.28	+ 180	13.1	+ 260
2.1 Controllo + OMA 5 mM	4	0.92	—	0.99	—
	4	3.75	+ 307	4.23	+ 327
2.2 Controllo + OMA 5 mM	10	0.9	—	2.2	—
	10	2.9	+ 222	9.4	+ 327
2.2 Controllo + OMA 5 mM	12	2.1	—	2.9	—
	12	5.3	+ 152	6.9	+ 138
3.1 Controllo + OMA 5 mM	10	0.9	—	1.6	—
	10	1.9	+ 111	4.2	+ 162

TABELLA 2. — *Determinazione degli acidi glicosilico, ossaloacetico e citrico nel medium di cultura ( $\mu\text{moli}/10^6$  cellule).*

N° esperimento	Giorni di cultura	Acido ossaloacetico	Acido glicosilico	Acido citrico
1.1 Controllo + OMA 5 mM	3	0.38 $\Delta$	0.13 $\Delta$	0.21 $\Delta$
	3	1.92 + 1.5	0.89 + 0.76	0.78 + 0.57
1.2 Controllo + OMA 5 mM	7	0.32 $\Delta$	0.10 $\Delta$	0.09 $\Delta$
	7	0.92 + 0.6	0.37 + 0.27	0.46 + 0.37
1.3 Controllo + OMA 5 mM	10	0.18 $\Delta$	0.18 $\Delta$	0.26 $\Delta$
	10	1.13 + 0.95	0.96 + 0.78	1.86 + 1.6
2.1 Controllo + OMA 5 mM	3	0.08 $\Delta$	0.18 $\Delta$	0.07 $\Delta$
	3	0.75 + 0.67	0.76 + 0.58	0.36 + 0.29
2.2 Controllo + OMA 5 mM	7	0.07 $\Delta$	0.16 $\Delta$	0.08 $\Delta$
	7	0.82 + 0.75	0.76 + 0.60	0.75 + 0.66
2.3 Controllo + OMA 5 mM	10	0.05 $\Delta$	0.05 $\Delta$	0.03 $\Delta$
	10	0.28 + 0.23	0.26 + 0.21	0.45 + 0.42

più elevate di quanto era noto finora essere presente nei tessuti animali. Un dato questo che merita la massima attenzione ed incita ad ulteriori ricerche per un'adeguata spiegazione.

Per quanto riguarda gli altri risultati riportati nella tabella II l'aumento del gliossilato che si osserva nelle prove addizionate da ossalomalato è ben comprensibile in quanto dovuto probabilmente all'azione dello stesso enzima contenuto nel fegato di ratto (l.c. 7) capace di scindere l'ossalomalato nei suoi componenti gliossilato ed ossaloacetato. Infatti dalla tabella II risulta che entrambi aumentano in proporzione pressoché stechiometrica nelle prove contenenti ossalomalato. Infine dall'ultima colonna della tabella si osserva costante aumento del contenuto di citrato a conferma dell'inibizione prodotta dallo ossalomalato sull'aconitasi anche nelle cellule 3T3.

#### STIMOLO SULLA DIFFERENZIAZIONE

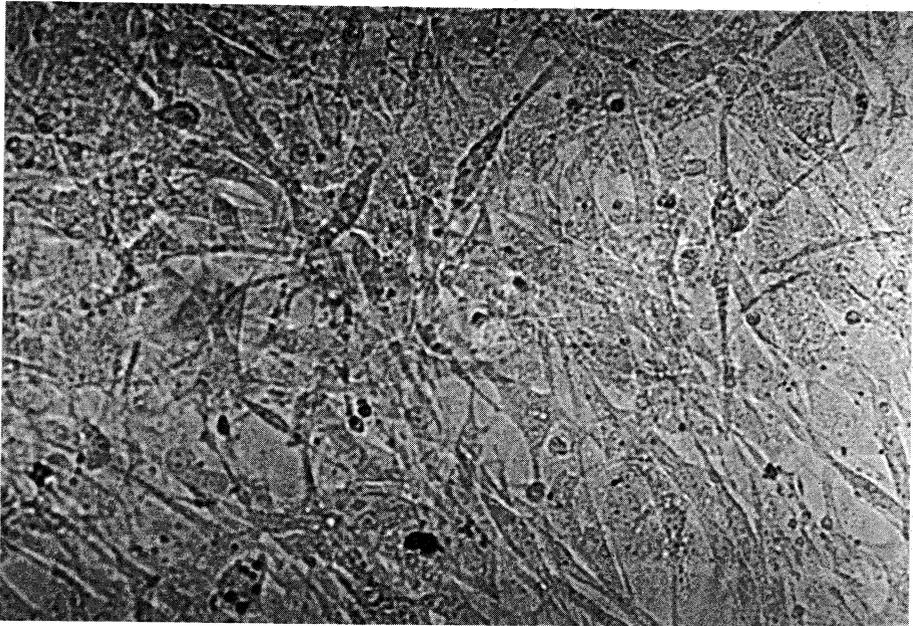
Nel corso degli esperimenti sul controllo della crescita abbiamo osservato una profonda differenza dell'aspetto morfologico delle cellule trattate con l'ossalomalato già ben evidente dopo appena 96 ore di incubazione.

Pertanto abbiamo eseguito microfotografie sia sulle culture adoperate negli esperimenti precedenti, sia su campioni trattati allo stesso modo, ma coltivati in appositi contenitori di volume minore allo scopo di poter essere esaminati a maggiore ingrandimento. I risultati sono riportati nelle Tavole I-II. Quelli della Tav. I sono relativi all'esperimento indicato con la lettera A nella fig. 6 e corrispondono alle prove incubate per 10 giorni. Appare chiaramente la prevalenza di fibroblasti nella cultura controllo e di adipociti in quella trattata con ossalomalato. Ad ingrandimento maggiore la Tav. II mostra l'aspetto di un singolo fibroblasto del controllo rispetto a tre cellule in stadio avanzato di differenziazione riprese dalla prova con ossalomalato.

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

A me sembra che l'insieme dei risultati ottenuti sulle culture cellulari trattate con ossalomalato abbiano sufficientemente dimostrato l'esistenza di un rapporto diretto tra l'interruzione del ciclo a livello dell'aconitasi ed il sistema di reazioni responsabili della suddivisione e differenziazione delle cellule 3T3, probabilmente dovuto alla inversione metabolica subita dal citrato quando devia dalla sequenza ossidativa endomitocondriale verso la lipogenesi citoplasmatica.

Infatti, ad eccezione delle cellule Hela, notoriamente neoplastiche, si è osservato inibizione della crescita sia in fibroblasti di polmone umano, sia in culture di 3T3-L1, associata in entrambi i casi ad extra-sintesi di ac. palmitico e stearico, ben noti precursori di lipogenesi (v. Tab. I). A conferma della loro origine dal citrato, i dati della tabella II mostrano il suo evidente accumulo in presenza di ossalomalato nei supernatanti delle stesse culture in cui era stato trovato aumento di ac. grassi (v. tabella I). Inoltre le Tavole I-II mostrano chiaramente l'effetto stimolante il processo di differenziazione dei fibroblasti in adipociti prodotto dall'ossalomalato. Ricordando infine che l'inibizione sull'aconitasi è competitiva e quindi reversibile, come è confermato dalla

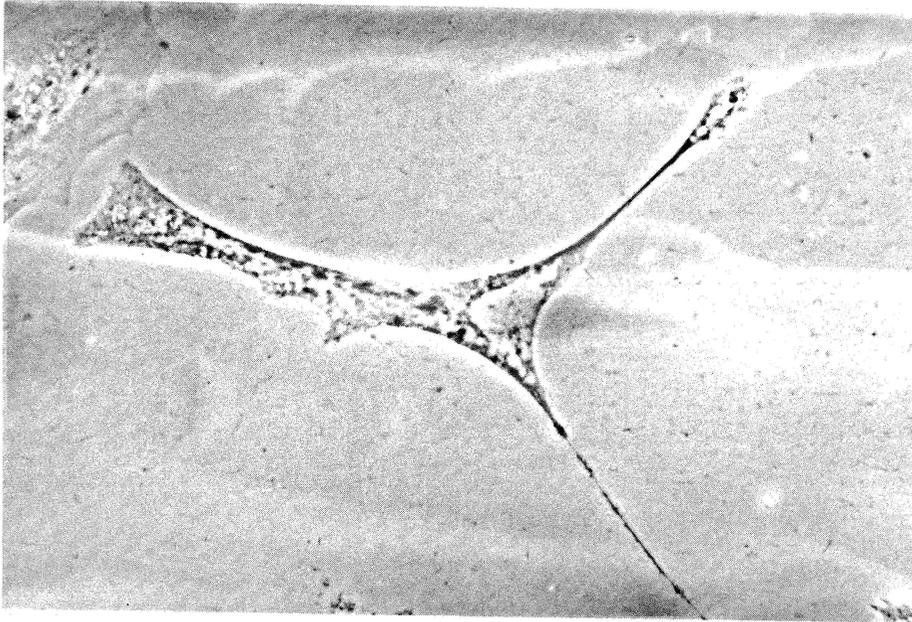


*a)*

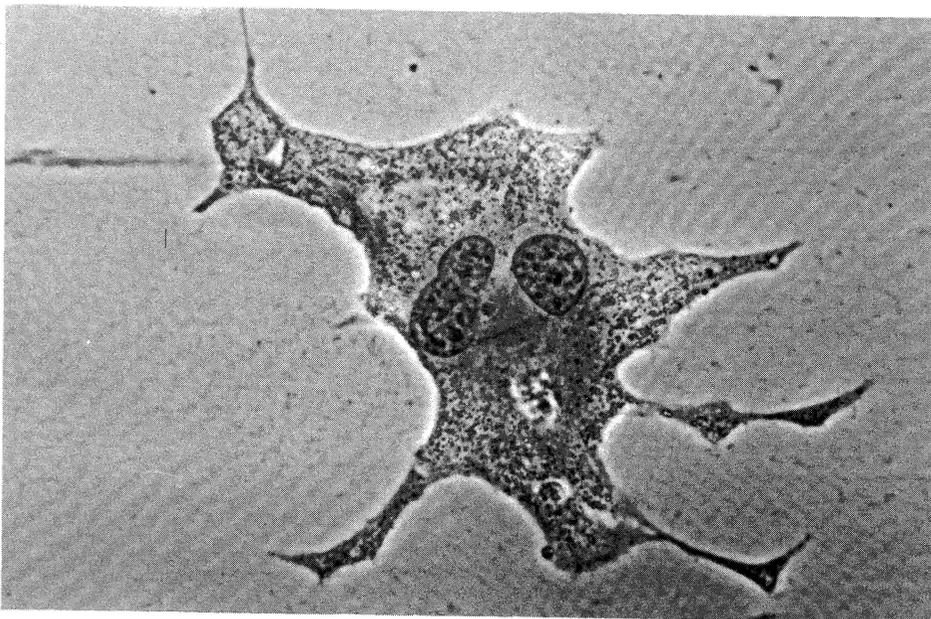


*b)*

Tav. I. — Microfotografie di cellule 3T3-L1 dopo 10 giorni di cultura eseguite al microscopio Zeiss invert. ingr.  $\times 10$ : *a*, controllo; *b* ossalomalato 5 mM. (Risultati non pubblicati.)

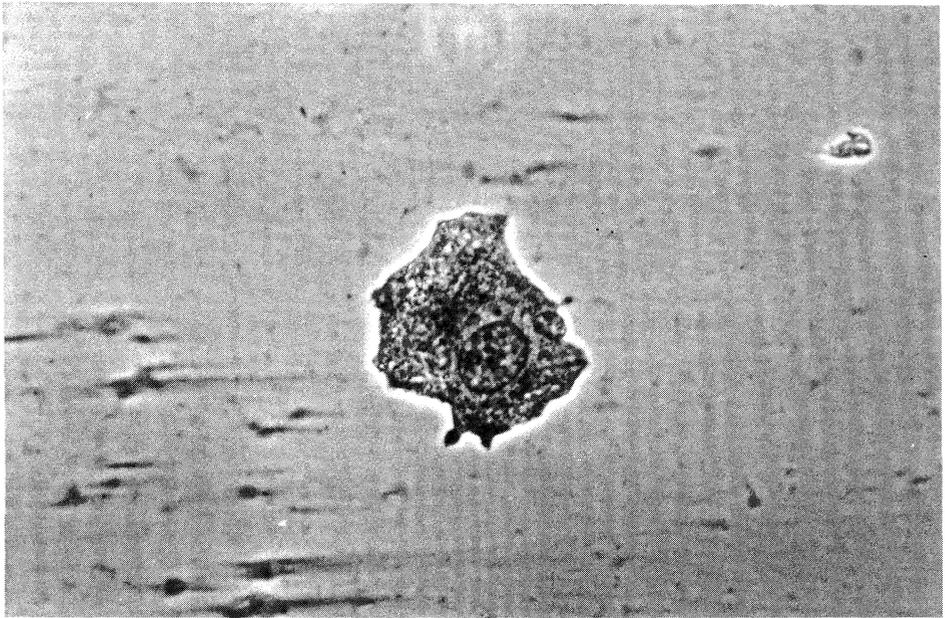


a)

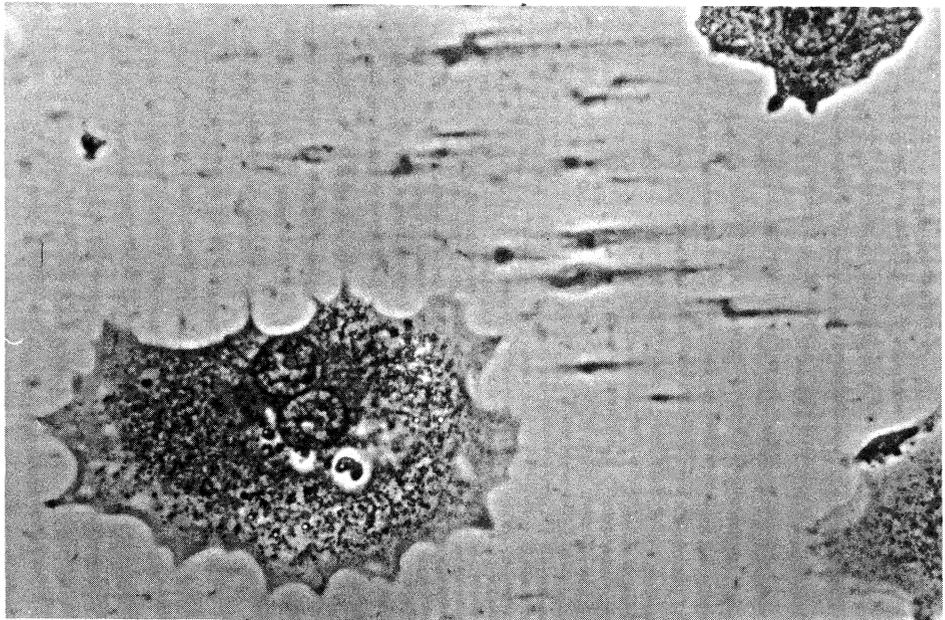


b)

Tav. II. - Paragone tra un fibroblasta della cultura controllo (a) e tre cellule (b, c e d) differenziate della cultura trattata per 10 giorni con ossalomalato 5 mM (Microsc. Zeiss invert. ingr.  $\times 40$ .) (Risultati non pubblicati.)



*c)*



*d)*

Tav. II. — Paragone tra un fibroblasta della cultura controllo (*a*) e tre cellule (*b*, *c* e *d*) differenziate della cultura trattata per 10 giorni con ossalomalato 5 mM (Microsc. Zeiss invert. ingr.  $\times 40$ .) (Risultati non pubblicati.)

ripresa della crescita per sottrazione dell'ossalomalato dal mezzo di cultura (fig. 6 Esp. B), si è indotti a ritenere che l'ossalomalato, tramite il controllo diretto sul ciclo citrico, estenda il suo effetto sulla regolazione dell'intero ciclo cellulare. Quindi acquistano importanza fisiologica le reazioni che ne provocano la formazione e la demolizione. Per quanto riguarda la prima, mentre è ben dimostrata la sintesi chimica tra gli ac. gliossilico ed ossaloacetico, dal punto di vista biologico è tuttora incerto il meccanismo di produzione di gliossilato nei tessuti animali (v. il parag. «La questione del gliossilato»). Noi riteniamo che vi si trovi nella sua forma «mascherata» di glicina e da essa si possa produrre transitoriamente, quando richiesto, ad opera dei 2 enzimi preposti al suo metabolismo, la D-amminoacido-ossidasi che lo forma e la glutammico-transaminasi che lo ritrasforma in glicina.

Un argomento questo che merita ulteriore indagine sperimentale specie dopo la nostra recente osservazione del suo contenuto relativamente elevato nel mezzo nutritivo delle culture adoperate come controlli, non solo nelle cellule 3T3 (tabella II), ma anche in quelle di polmone umano neonatale e soprattutto di Hela, dove il gliossilato è stato ritrovato in concentrazione ancora maggiore. Tornando all'ossalomalato la sua demolizione è assicurata da un enzima presente oltre che nel fegato di ratto (l.c. 7) anche nelle cellule 3T3, come è apparso dai dati della tabella II che mostrano aumento circa stechiometrico degli ac. ossaloacetico e gliossilico nelle culture incubate con ac. ossalomalico. Inoltre avevamo già descritto (l.c. 6) l'effetto prodotto dalla isocitrato-deidrogenasi legata al NADPH che provoca la riduzione del gruppo chetonico in un composto che perde il suo potere inibente (v. fig. 2).

A questo punto ci sembra possibile concludere che l'interruzione transitoria dell'apporto energetico prodotta dall'ac. ossalomalico sul ciclo citrico rappresenti un mezzo adatto a raccogliere ulteriori informazioni sulle variazioni dei parametri metabolici, alcuni dei quali, come la lipogenesi nelle cellule 3T3, è apparso correlato con i complessi meccanismi che portano alla suddivisione ed alla differenziazione. Un esempio che suggerisce un confronto più ampio tra i problemi della bioenergetica e quelli della bioingegneria e che permette la proposta di adoperare ac. ossalomalico, in opportune condizioni, per ulteriori ricerche su culture cellulari quale «modello sperimentale» per allargare l'indagine sulla regolazione dell'intero ciclo cellulare, ad iniziare dalla espressione del genoma sino alle sue più evidenti conseguenze, la suddivisione e la differenziazione cellulare.

La speranza è di trovare tra le piccole molecole del metabolismo terminale quei «segnali» che finora sono sfuggiti ad una indagine condotta su programmi di ricerca privi di un reciproco confronto tra i risultati ottenuti in bioenergetica ed in bioingegneria. In tale prospettiva se il «modello dell'ossalomalato» funzionerà anche in altre culture cellulari, sarò lieto di averlo proposto quale mezzo d'incontro in campi di ricerca solo apparentemente divergenti ma di fatto complementari ed interdipendenti.

#### RICONOSCIMENTO

Gli esperimenti sopra riportati sono stati finanziati dal Ministero della Pubblica Istruzione (Fondi 40%) e dall'Università di Napoli (Fondi 60%). Ringraziamo la Prof.ssa G. Misuraca, la Dott.ssa M. Festa e la Sig.na A. Angiolillo del Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università di Napoli ed

i Proff. P. Volpe, T. Eremenko e la Dr.ssa L. Trionfetti del Laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare presso l'Istituto di Medicina Sperimentale del C.N.R. di Roma, per la valida collaborazione e proficua discussione dei risultati.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] D'ABRAMO F., ROMANO M. e RUFFO A. (1958) - «Biochem J.» 68, 270.
- [2] RUFFO A., TESTA E., ADINOLFI A. and PELIZZA G. (1962) - «Biochem. J.» 85, 588.
- [3] RUFFO A., ADINOLFI A., BUDILLON G. and CAPOBIANCO G. (1962) - «Biochem. J.» 85, 593.
- [4] ADINOLFI A., MORATTI R., OLEZZA S. and RUFFO A. (1969) - «Biochem. J.» 114, 513.
- [5] ADINOLFI A., GUARRIERA-BOBILEVA V., OLEZZA S. and RUFFO A., (1971) - «Biochem J.» 125, 537.
- [6] ADINOLFI A., MENNA G. and RUFFO A. (1981) - «Rend. Accad. Naz. Lincei» 69, 264.
- [7] FESTA M., LAUDADIO G. and RUFFO A. (1984) - Atti 30° Congresso SIB. Lacco Ameno (Ischia) pag. 379.
- [8] RUFFO A. (1982) - Symposium on Macromolecules in Functioning Cells, (A. A. Bayev Edt.) Book II, pag. 31, Nauka Publish. Moscow.
- [9] FESTA M. and RUFFO A. (1986) - «Rend. Accad. Naz. Lincei» 80, 238.
- [10] VOLPE P. and EREMENKO T. (1970) - «Europ. Jour. of Biochem» 12, 195.
- [11] RONCARI D.A.K. (1984) - «Trends. Biochem. Sci.» 9, 486.
- [12] KREBS H.A. and LOWENSTEIN J.M. (1960) - *Metabolic Pathways*, vol. I, pag. 129, Academic Press N.Y. and London.
- [13] KORNBERG H. L. and ELSDEN S.R. (1961) - «Advanc. in Enzymol» 33, 401.
- [14] ROMANO M., RUFFO A. and ADINOLFI A. (1960) - «Rev. Espan. Fisiol.» 16, Suppl. II, 133.
- [15] WILLIAMS H.E. and SMITH L.H. (1978) - «Primary Iperoxaluria», in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (J.B. Stanbury et al. Ediths.) Chap. 9, IV Edit., pag. 183, Mc. Graw Hill Book Co. Inc. USA.
- [16] FUNAY T. and ICAIYAMA A. (1986) - «J. Biochem. (Japan)» 99, 579.