

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Pavia

Nucleotidi acido solubili nella parete aortica di vitello *

di

B. Bonferoni, S. Ronchi, V. Zambotti

La possibilità di separare i nucleotidi mediante cromatografia su colonna ha consentito in questi ultimi anni di stabilire la presenza degli stessi in vari tessuti e ha facilitato lo studio della natura e della proprietà chimiche e biologiche.

La conoscenza delle particolarif unzioni biochimiche svolte dai nucleotidi, sopra tutto di alcuni di essi, ha pure agevolato e ampliato la conoscenza del metabolismo peculiare di alcuni tessuti.

In quest'ordine di idee, dato che il metabolismo della parete dell'aorta é poco conosciuto, abbiamo ritenuto utile indagare quali nucleotidi fossero presenti in essa.

1) ESTRAZIONE, SEPARAZIONE E CONCENTRAZIONE DEI NUCLEOTIDI

La ricerca é stata condotta sull'aorta di vitello, prelevata immediatamente dopo l'uccisione dell'animale.

Quantità di tessuto pari a 30 g circa era omogenata in Wa-

* Comunicación 6-4 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas. Barcelona, mayo 1959.

ring Blendor con 60 ml di acido perclorico 0,6 N, alla temperatura di 0° C e per 4'.

L'omogenato era filtrato e strizzato attraverso mussola. Il residuo solido veniva recuperato e omogenato una seconda volta con 50 ml di acido perclorico 0,2 N per 4', sempre a 0° C. Il nuovo omogenato era filtrato ancora attraverso mussola e unito al precedente.

La miscela dei due filtrati era portata a pH 6,8 con KOH 6 N e posta in frigorifero a -3° C fino ad incipiente congelamento, per facilitare la precipitazione del perclorato di potassio, che poi veniva allontanato, assieme alle altre sospensioni, mediante centrifugazione a 0°, in centrifuga refrigerata.

Il supernatante era travasato in imbuto separatore e sbattuto con uguale volume di etere etilico allo scopo di allontanare i lipidi. Finita l'estrazione eterea, il liquido era fatto passare attraverso una colonna di cm 1 × 35 di resina Dowex 1 × 10 (200/400 mesh).

Successivamente la colonna era lavata con acqua fino a che la densità ottica dell'effluente, letto a 260 mμ, era inferiore a 0,050. In seguito si procedeva alla eluizione, che fu effettuata a gradiente, secondo il metodo di HURLBERT e POTTER (1), impiegando un miscelatore di 1000 ml e concentrazioni crescenti di acido formico e formiato di ammonio.

Inizialmente 500 ml di acqua furono posti nel miscelatore e HCOOH 1 N nella riserva. I solventi successivi furono: HCOOH 4 N e formiato d'ammonio 0,2 M, 0,4 M, 0,8 M in HCOOH 4 N.

Per mezzo dell'apposito apparecchio automatico sono state raccolte frazioni di 100 gocce, pari a 5 ml circa, alla velocità di 6 gocce al minuto primo.

Di ogni frazione si misurò, mediante lo spettrofotometro di Beckmann mod. Du e contro un bianco costituito da acqua, la densità ottica a 260 mμ (lunghezza d'onda alla quale quasi tutti i nucleotidi presentano un massimo di assorbimento). Le densità ottiche relative alle diverse frazioni sono riportate nella fig. n. 1.

Dopo la misura ottica, le frazioni corrispondenti ai vari picchi furono essicate nel vuoto, in presenza di CaCl₂ e NaOH (2:3).

Le frazioni più ricche di formiato di ammonio (0,4 e 0,8 M) furono riscaldate nel vuoto con raggi infrarossi (a temperatura non superiore a 40-50°), per eliminare l'eccesso di sale, che

poteva disturbare le successive operazioni di identificazione dei nucleotidi (HURLBERT e POTTER, 1).

Sui residui secchi, così ottenuti, si procedette alla identificazione dei nucleotidi corrispondenti a ciascun picco. L'identificazione fu effettuata con due metodi: spettrofotometrico e cromatografico su carta.

2) ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DEI NUCLEOTIDI

La tecnica spettrofotometrica di riconoscimento si fonda sullo studio dello spettro particolare dei nucleotidi nell'ultravioletto, spettro che varia al variare del pH del mezzo in cui sono sciolti.

Dati molto caratteristici (correlati alla base che entra nella costituzione del nucleotide) sono forniti dal rapporto fra i valori delle densità ottiche a 250 m μ e 260 m μ e fra 280 e 260 m μ (Circular N.° 10, Pabst Laboratories, 2; SCHMITZ, HURLBERT e POTTER, 3; DUDA e POGELL, 4).

Per eseguire le varie misure ottiche, i residui dei singoli picchi, essiccati nel vuoto su CaCl₂ e NaOH, furono ripresi con le seguenti soluzioni:

Soluzione di HCl 0,1 N (pH=1)

Soluzione di HCl 0,01 N (pH=2)

Soluzione tampone fosfati sec. Sørensen 0,1 m (pH=7)

Soluzione di NaOH 0,001 N (pH=11).

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella n.° 1.

Il valore relativo all'ATP (*) riportato nella tabella differisce da quello dell'ATP puro. La differenza è imputabile verosimilmente a impurezze.

Ricordiamo infatti che le letture spettrofotometriche sono state eseguite direttamente sulle frazioni di eluito provenienti dalla colonna di resina.

In questo caso l'identificazione più significativa ai fini dell'identificazione del nucleotide è stata fornita dalla cromatogra-

* Il significato delle sigle usate in questo lavoro sono: AMP = Adenosinmonofosfato, ADP = Adenosindifosfato, ATP = Adenosintrifosfato, GMP = Guanossinmonofosfato, GTP = Guanossintrifosfato, IMP = Inossinmonofosfato, UMP = Uridinmonofosfato, UDP = Esosamina = Esosaminauridindifosfato, UDPG = Uridindifosfogluco, UTP = Uridintrifosfato.

fia su carta, la quale ha mostrato la perfetta identità di R_f del nucleotide puro e di quello in esame.

L'UDP-esosamina (picco n.° 6) è stata confermata anche attraverso la reazione di Schloss, eseguita direttamente sul residuo secco (5).

3) RICONOSCIMENTO DEI NUCLEOTIDI MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU CARTA

L'analisi cromatografica fu eseguita su carta Whatmann n.° 1, lavata preventivamente con acido acetico 2 N e quindi con acqua distillata fino a neutralità.

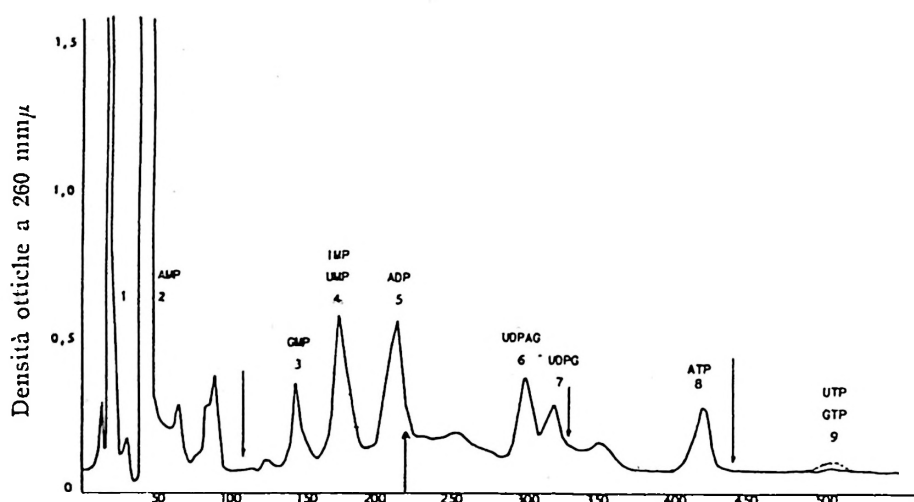


Diagramma di eluizione di estratto perclorico di aorta. La cromatografia è stata eseguita con una colonna di resina Dowex I formiata (200-400 mesh) di cm. 1×35 . La riserva era di ml 800, il miscelatore di ml 500. Le frecce indicano il cambio del tampone.

I solventi impiegati furono i seguenti:

solvente A: tampone fosfato 0,1 M a pH 6,7-ammonio solfato in cristalli-n-propanolo (100:60:2)

solvente B: etanolo 95 % -ammonio acetato 1 M a pH 7,5 (7:3).

Ad ambedue i solventi si aggiunse anche lo 0,1 % di etilendiamminotetracetato.

Per rendere il confronto più diretto, sia gli standard puri (forniti dalla Sigma Chemical Company) che i composti da

identificare furono posti sullo stesso foglio. Le macchie furono localizzate alla luce di Wood.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella n.° 1.

4) CONCLUSIONI

I risultati ottenuti stanno ad indicare che nella parete aortica esistono i seguenti nucleotidi: AMP, ADP, ATP, GMP, GTP, IMP, UMP, UDP-esosamina, UDPG, UTP.

TABELLA n. 1

Numero del picco	Rapporti dei nu- cleotidi standard		Rapporti dei nu- cleotidi in esame		pH	Solvente usato per l'identifica- zione cro- matografica	Composto corrispon- dente
	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$			
2	0,84	2,22	0,84	0,22	1	A	AMP
	0,79	0,16	0,79	0,16	7		
3	0,96	0,67	0,95	0,65	1	A	GMP
	1,16	0,66	1,10	0,64	7		
	0,90	0,61	0,94	0,56	11		
5	0,85	0,21	0,85	0,25	2	A	ADP
	0,78	0,16	0,80	0,21	7		
6	0,74	0,38	0,79	0,39	2	B	UDP-Eso- samina (*)
	0,75	0,34	0,80	0,38	7		
	0,69	0,38	0,78	0,33	11		
7	0,81	0,37	0,77	0,42	2	B	UDPG
	0,75	0,35	0,78	0,42	7		
	0,70	0,38	0,80	0,41	11		
8	0,85	0,22	0,83	0,28	2	A	ATP
	0,80	0,15	0,79	0,28	7		

Solvente A: Tampone fosfato 0,1 M a pH 6,7-Ammonio solfato-n- Propanolo (100:60:2).

Solvente B: Etanolo 95 % Ammonio acetato 1 M a pH 7,5 (7:3).

(*) I valori sono stati determinati impiegando uridindifosfo-N-acetilglucosamina della Sigma Chemical Company.

I composti AMP, ADP, ATP, GMP, UDP-esosamina, UDPG sono stati identificati sia spettrofotometricamente che cromatograficamente; invece i nucleotidi IMP, UMP, UTP, GTP sono stati identificati soltanto cromatograficamente (solvente A), a causa della scarsa quantità di sostanza estratta.

Per quanto riguarda il significato biologico dei nucleotidi trovati, ci limiteremo a ricordare soltanto che l'UTP é necessario per la formazione dell'uridindifosfo-N-acetilesosamina e dell'uridindifosfoglucosio, destinato a diventare acido uridindifosfoglucuronico.

Ora é noto che l'uridindifosfo-N-acetilesosamina e l'acido uridindifosfoglucuronico sono precursori obbligati nella biosintesi dei mucopolisaccaridi.

Pertanto la presenza dei nucleotidi uridinici (UMP, UTP) e delle combinazioni UDPG e UDP-esosamina é da considerarsi un indice significativo che la parete aortica é in grado di sintetizzare i propri mucopolisaccaridi.

Riassunto

La parete aortica contiene i seguenti nucleotidi e derivati: AMP, GMP, UMP, IMP, ADP, UDP-esosamina, UDPG, ATP, UTP, GTP.

La presenza degli stessi é stata dimostrata, previa estrazione e separazione su resina, per via spettrofotometrica e per via cromatografica (su carta).

I risultati ottenuti sono interpretati come un indice che la parete aortica é in grado di sintetizzare i propri mucopolisaccaridi.

Summary

Acid soluble nucleotides in the aortic wall of the calf

The presence in the aortic wall of mucopolisaccharides suggested the presence in the same of enzymatic systems and specially of uridinic coenzymes involved in the biosynthesis of these compounds.

The acid soluble nucleotides, extracted from calf aortic wall homogenates, have been adsorbed on formolated Dowex-1 resin columns, after HURLBERT and POTTER, and succesively eluted with formic acid and ammonium formate.

The nucleotids present in the various fractions of the eluate were identified by the ultraviolet absorption spectres, and reconfirmed by paper chromatography compared with pure nucleotides standard.

Bibliografia

- (1) HURLBERT, R. B., SCHMITZ, H., BRUMM, A. F. and POTTER, V. R.: *J. Biol. Chem.*, **209**, 23, 1954.

- (2) Circular N. OR-10, p. 21. Pabst Laboratories, Div. of Pabst Brewing Company, Milwaukee, Wisconsin, 1956.
- (3) SCHMITZ, H., HURLBERT, R. B. and POTTER, V. R. : *J. Biol. Chem.*, **209**, 41, 1954.
- (4) DUDA, H. e POGELL, B. M. : *Arch. Bioch. Bioph.*, **73**, 100, 1958.
- (5) SCHOLSS, B. : *Anal. Chem.*, **23**, 1321, 1951.

