

Centro per gli Studi di Enzimologia del Consiglio Nazionale
delle Ricerche, Roma
Istituto di Clinica Ortopedica dell'Università di Perugia, Italia

Defosforilazione e deaminazione di adenosin ed inosin derivati ed aminazione del glucosio nel midollo osseo *

di

Paolo Cerletti, Enrico Bucci e Pierluigi Ipata

La biosintesi delle purine nel midollo osseo è stata studiata da ABRAMS e BENTLEY (1) i quali hanno evidenziato l'ossidazione di inosina e IMP (°) a uno xantin derivato e la formazione a livello dei nucleotidi monofosfati della aminopurina dalla ossipurina corrispondente. Non si hanno però dati sul metabolismo dei nucleotidi polifosfati. D'altra parte, se il meccanismo di aminazione dei derivati purinici è stato parzialmente chiarito dagli studi sopra citati, nessuna ricerca è stata fatta per studiare, nel midollo osseo, la biosintesi di altri composti aminati, come, ad esempio, le esosamine. Abbiamo pertanto ritenuto interessante studiare sistematicamente le attività defosforilanti e deaminanti di varie frazioni del midollo osseo sui derivati dell'ipoxantina e dell'adenina parallelamente alla capacità delle stesse preparazioni midollari di aminare il glucosio.

I risultati sono riportati nel presente lavoro.

* Comunicación 6-9 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo 1959.

(°) Le abbreviazioni usate nel presente articolo sono : ATP = Adenosintrifosfato ; ADP = Adenosindifosfato ; AMP = Adenosinmonofosfato ; ITP = Inosintrifosfato ; IDP = Inosindifosfato ; IMP = Inosinmonofosfato ; DPN = difosfopiridinnucleotide ; TCA = Acido tricloroacetico.

Parte sperimentale

MATERIALI E METODI

ATP e ADP sono purificati dai prodotti commerciali mediante cromatografia su Dowex 1-X2 mesh 200-400 secondo COHN e CARTER (2). I composti eluiti sono separati dai sali inorganici per adsorbimento su Norite attivata ed eluzione con H₂O, etanolo, NH₃ (54 : 45 : 1) (3). L'ammoniaca, l'alcool e parte dell'acqua sono allontanati concentrando a pressione ridotta.

ITP, IDP, AMP (Sigma). Adenosina (Light and Co.). Inosina (Fluka). Glucosio, aspartato (Merck). Glutamina (Hoffman La Roche).

Il miscuglio di reazione standard per lo studio dell'attività defosforilante e deaminante contiene, in un volume finale di 0.5 ml, tampone dietilbarbiturato 0.014 M pH 7.4 substrato 0.002 M e una quantità di preparazione enzimatica misurata dal contenuto in proteine. Nelle esperienze in cui al mezzo di incubazione sopra descritto sono aggiunti altri componenti, il volume finale e la quantità di proteine sono raddoppiate, la molarità degli altri reagenti rimanendo la stessa. Le condizioni usate per lo studio dell'aminazione del glucosio sono riportate nella tabella 4.

La reazione è iniziata aggiungendo il preparato enzimatico al mezzo di incubazione equilibrato termicamente a 37° C, viene condotta per 8' con agitazione costante in bagno termostato a 37°C ed è arrestata scaldando 2' a 100° in bagno maria e raffreddando poi rapidamente.

Il pH è controllato all'inizio ed alla fine dell'incubazione. Ogni prova è condotta in triplo.

I campioni sono centrifugati e 0.1 ml del soprannatante limpido sono analizzati per cromatografia discendente. Per i derivati purinici i solventi usati sono: n propanolo, TCA 100 %, NH₃, H₂O (75 : 5 : 0.5 : 19.5) ovvero n propanolo, etanolo 95 %, acido formico, NH₃, H₂O (43 : 21 : 6 : 0.5 : 29.5). Ove si desidera una separazione netta tra AMP e inosina il cromatogramma, tagliato superiormente alle macchie dell'AMP viene sviluppato per via discendente, nello stesso senso della prima corsa, in n propanolo, butanolo, NH₃, H₂O (36 : 30 : 10 : 24). I prodotti di aminazione del glucosio sono separati in butanolo, etanolo, acido acetico, H₂O (4 : 1 : 1 : 2) evidenziati spruzzando con il reattivo di Ehrlich (4) e identificati per confronto con le sostanze pure.

La determinazione quantitativa dei derivati purinici separati cromatograficamente è fatta secondo quanto descritto in altro lavoro (5). La determinazione delle esosamine è fatta su 0.3 ml

del sopranatante con la reazione di Elson Morgan modificata da BLIX (6).

Per quanto riguarda defosforilazioni e deaminazioni prove di controllo senza l'aggiunta dell'enzima non hanno evidenziato scissione non enzimatica dei substrati, mentre in controlli senza il substrato non è stato possibile individuare alcuna traccia dei composti studiati. Controlli più complessi sono stati necessari per le esperienze di aminazione del glucosio: infatti prove contenenti solo il preparato enzimatico senza substrato (E) o l'enzima ed uno solo dei substrati [glucosio (G) o aminante (A)] danno reazione di Elson Morgan debolmente positiva. Cromatograficamente non è possibile evidenziare esosamine nella prova E, mentre tracce debolissime sono osservabili nelle prove A e G.

PREPARAZIONI ENZIMATICHE

Metacarpi e metatarsi di agnello di meno di 40 giorni prelevati immediatamente dopo la morte dell'animale vengono raffreddati a -20°C e liberati delle parti molli e del periostio. L'osso viene poi interrotto a livello della cartilagine articolare distaccando così la spongiosa epifisaria che viene liberata dalle cartilagini articolare e di accrescimento.

La parte spongiosa del residuo diafisario dell'osso viene separata con un taglio che non leda il canale midollare (Spongiosa metafisaria). Il canale midollare viene poi aperto con uno scalpello e si preleva il midollo (midollo diafisario).

Tutte le operazioni vengono eseguite tra 0 e -5°C .

Centrifugando a $18000 \times g$ tra 0 e 5°C la spongiosa frammentata sostenuta da un imbutino di plastica privo di gambo contenuto nella provetta da centrifuga, il midollo viene espulso dagli spazi intertrabecolari e si raccoglie sul fondo della provetta (Midollo della spongiosa epifisaria e midollo della spongiosa metafisaria).

Le frazioni midollari sono separatamente omogenate in poca H_2O e successivamente vengono centrifugate a $18000 \times g$ tra 0 e $+5^{\circ}\text{C}$. Il grasso si separa in uno strato semisolido che viene allontanato meccanicamente. Conservando una notte a 0°C , i residui di grasso liquido emulsionati si separano alla superficie e vengono allontanati, ed i frustoli d'osso si raccolgono al fondo e sono separati per decantazione.

Le varie frazioni vengono poi convenientemente diluite con H_2O dopo aver dosato le proteine con la reazione del biureto secondo la tecnica di MEHL (7) che evita la precipitazione in TCA — si è infatti osservato che con le nostre preparazioni la preci-

pitazione delle proteine in TCA non è quantitativa — e sono conservate a — 20°C, divise in aliquote che vengono scongelate al momento dello uso.

Risultati

I metodi cromatografici impiegati permettono di accertare il destino di ciascuno dei nucleotidi e nucleosidi adeninici e ipoxantinici, seguendo le loro interconversione o scomparsa. È possibile pertanto ricercare la presenza delle seguenti attività enzimatiche: defosforilazione dei nucleotidi, formazione delle basi puriniche dal nucleoside, trasferimento di radicali fosforici tra nucleotidi e nucleosidi, interconversione di derivati adenosinici e inosinici per deaminazione od aminazione.

I risultati sono esposti nelle tabelle 1, 2 e 3.

TABELLA 1

Attività defosforilante dei midolli sui nucleotidi adenosinici

1,5 mg proteine, substrato 1 μ mole, tampone dietilbarbiturato pH 7.4.0,014 M, volume finale 0,5 ml. 8' a 37° C. Reazione arrestata scaldando 2' a 100° C.

	μ moli	residue		formate			residue		
		ATP	ADP	AMP	ADP	AMP	adeno- sina	ADP	adeno- sina
Midolli	diafisario	0,64	0,32	—	0,41	0,34	—	0,69	—
	della spongiosa metafisaria	0,28	0,29	0,28	0,26	0,43	tracce	0,64	0,26
	della spongiosa epifisaria	0,78	0,26	—	0,27	0,25	—	0,69	—

Come si vede oltre al substrato residuo è in genere determinabile un solo prodotto di reazione: infatti i brevi periodi di incubazione adottati fanno sì che non abbiano tempo di svilupparsi in modo apprezzabile reazioni secondarie che modifichino i composti che si formano direttamente dal substrato.

Il midollo della spongiosa metafisaria defosforila tanto i nucleotidi inosinici quanto gli adenosinici: tra questi l'AMP viene defosforilato assai più lentamente dei polifosfati omologhi e dell'IMP.

Il midollo diafisario e quello della spongiosa epifisaria hanno azione defosforilante per quanto debole sui polifosfati adenosinici ed inosinici. Ambedue questi midolli poi, pur trasforman-

TABELLA 2

Attività defosforilante dei midolli sui nucleotidi inosinici

1 mg proteine, substrato 1 μ mole, tampone dietilbarbiturato pH 7,4 0,014 M, volume finale 0,5 ml, 8' a 37° C. Reazione arrestata scaldando 2' a 100° C.

	μ moli	resi- due			formate		resi- due IMP	formate inosina
		ITP	IDP	IMP	IDP	IMP		
Midolli	diafisario	0,67	0,22	0,10	0,96	0,05	0,60	0,38
	della spongiosa metafisaria	0,62	0,22	0,17	0,83	0,17	0,55	0,36
	della spongiosa epifisaria	0,70	0,26	—	0,85	0,14	0,61	0,41

do l'IMP in inosina, sono privi di attività defosforilante sull'AMP.

Le esperienze con ITP, IMP e inosina sono state ripetute in presenza di NH_4Cl , glutammina, aspartato 0.04 M, riconfermando i risultati sopra riportati.

TABELLA 3

Attività deaminante dei midolli sui nucleotidi e nucleosidi adenosinici

1.5 mg proteine, substrato 1 μ mole, tampone dietilbarbiturato pH 7,4 0,014 M, volume finale 0,5 ml, 8' a 37° C. Reazione arrestata scaldando 2' a 100° C.

	μ moli	resi- due			formate		residue adeno- sina	formate inosina
		ADP	IDP	IMP	AMP	IMP		
Midolli	diafisario	0,41	0,21	0,09	0,69	0,26	0,39	0,50
	della spongiosa metafisaria	0,26	0,16	0,15	0,64	—	0,83	—
	della spongiosa epifisaria	0,27	0,27	0,22	0,69	0,21	0,46	0,42

Come risulta dalla tabella 3 il midollo della spongiosa metafisaria è privo di attività deaminante sull'AMP e sull'adenosina ed ha scarsa attività sull'ADP. I midolli diafisario e della spongiosa epifisaria mostrano invece netta attività deaminante sull'AMP ed adenosina ed hanno verso l'ADP attività più marcata del midollo della spongiosa metafisaria.

Esperienze in cui al substrato inosinico si è aggiunto una sostanza contenente gruppi aminici (NH_4Cl , glutammina, aspartato 0.004 M) non hanno evidenziato formazione del composto adenosinico corrispondente. Aminazione non si è realizzata neppure

aggiungendo oltre l'aspartato DPN 0.002 M o DPN piú ATP 0.002 M.

I risultati relativi alle esperienze di aminazione del glucosio sono riportati nella tabella 4. Per ovviare a ogni possibile interferenza di reazioni che si svolgano senza la aggiunta contemporanea di tutti due i substrati (glucosio e aminante), ogni gruppo di prove complete (C) era accompagnato da prove contenenti enzima e solo glucosio (G), enzima e solo aminante (A), ed enzima solo (E). Se C, G, A, E, indicano i valori rispettivamente determinati in ogni tipo di prova, i risultati corretti utilizzati per la tabella, sono dati da $C - (G + A) + E$. Aggiungendo oltre al glucosio glutammina o un nucleotide o nucleoside adenosinico si ha un forte aumento nella produzione di glucosamina, che non si osserva associando al glucosio ITP o inosina.

TABELLA 4

Aminazione del glucosio a opera di midolli

tampone dietilbarbiturato pH 7.1, 0,014 M, glucosio 0,001 M, glutammina o ATP o ADP o AMP o adenosina 0,001 M, 2 mg proteine, volume finale 1.2 ml. 8' a 38° C. Reazione arrestata scaldando 2" a 100° C.

aminante aggiunto		glutammina	ATP	ADP	AMP	Adenosina
μmoli glucosamina formate	Midollo della spongiosa metafisaria	0,170	0,168	0,106	0,078	0,051
	Midollo della spongiosa epifisaria	0,162	0,158	0,088	0,060	0,044

In nessun caso si è riscontrata presenza di glucosaminafosfato, acetilglucosamina, acetilglucosaminafosfato.

Discussione

La presenza in ogni singola frazione midollare di molteplici attività enzimatiche tali che ogni substrato può subire contemporaneamente trasformazioni diverse, e i prodotti di reazione stessi vengono ulteriormente trasformati, rende difficile seguire quantitativamente ogni reazione ed identificare gli enzimi. Tuttavia abbreviando il tempo di incubazione ed adoperando

volta a volta come substrato i possibili prodotti delle singole reazioni studiate è possibile seguire le tappe della degradazione di ogni sostanza.

D'altra parte i metodi di analisi impiegati consentono di determinare i vari composti che si formano nella trasformazione di ogni substrato e permettono quindi di seguire anche più di una reazione contemporaneamente.

Il midollo della spungiosa metafisaria è quello dotato di maggiore attività defosforilasica. E' osservabile attività ATPasica, ADPasica ed AMPasica. ITPasi, IDPasi, ed IMPasi sono anche presenti. La velocità di defosforilazione dei polifosfati è maggiore per gli adenosinici che per gli inosinici mentre l'opposto si verifica con il monofosfato.

Queste caratteristiche delle defosforilasi si riscontrano anche negli altri due midolli; è da osservare che nel midollo diafisario i trifosfati vengono defosforilati più rapidamente del difosfato corrispondente, mentre il contrario si verifica nel midollo della spungiosa epifisaria. E' da notare anche che l'IMP è defosforilato mentre l'AMP non lo è affatto.

Le deaminasi sono più attive nei midollo diafisario e della spungiosa epifisaria ed agiscono tanto sui nucleotidi quanto sui nucleoside. Il midollo della spungiosa metafisaria sembra invece non possedere adenilico ed adenosin deaminasi. Pertanto si possono prospettare in esso due vie per la degradazione dell'ATP: defosforilazione fino al nucleoside ovvero deaminazione prima della formazione di AMP e successiva defosforilazione dell'inosinderivato. Nelle altre due frazioni midollari studiate il distacco dell'ultimo radicale fosforico si ha tramite la deaminazione dell'AMP: che questa sia la via seguita è suggerito anche dalla considerevole attività IMPasica.

ABRAMS e BENTLEY (1) hanno osservato che il DPN è indispensabile per la ossidazione degli ipoxantinderivati a xantinderivati in estratti dializzati di midollo, mentre la aminazione delle ossipurine avviene solo se all'appropriato donatore di N si associano Mg^{2+} , PO_4^{2-} ed un fosfato ricco di energia. Per l'aminazione dell'IMP, fosfoglicerato e fosfopiruvato sono i composti richiesti. La mancata formazione di adeninderivati riscontrata nei nostri esperimenti anche in presenza di ATP e DPN è in buon accordo con i risultati negativi ottenuti dai suddetti autori quando usavano ATP al posto del fosfoglicerato.

La formazione di esosamina da glucosio-6-fosfato a glutamina, tramite esosamina fosfato è stata evidenziata con preparazioni enzimatiche di *Neurospora crassa* (8) ed in omogenati di cartilagine di accrescimento, cartilagine costale, fegato e polmoni (9). Nelle nostre condizioni sperimentali si ottiene pro-

duzione di glucosamina in presenza di un qualsiasi nucleotide o nucleoside adenosinico senza un donatore di gruppi aminici, ovvero con glutammina senza aggiunta di ATP.

E' pertanto assai probabile che il nucleotide direttamente o mediatamente agisca da donatore di aminogruppi, e che non sia necessaria preventiva fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato. A conferma di ciò stanno sia il fatto che l'aminazione è possibile anche in presenza di adenosina, mentre non si verifica con ITP ed inosina, sia il mancato reperimento di glucosammmina fosfato composto che, ove l'aminazione del glucosio fosse preceduta dalla sua fosforilazione, dovrebbe essere evidenziabile. D'altra parte il possibile ruolo di donatori di aminogruppi e di ATP «endogeni» cioè contenuti nelle preparazioni di tessuto, oltre ad essere irrilevante date le modeste quantità di preparazione enzimatica usate, sembra escluso dal procedimento utilizzato per il calcolo dei risultati. E' da notare che sottraendo al valore determinato sulla prova di incubazione completa (C) quelli delle due prove parziali (enzima e solo glucosio G, enzima e solo aminante A) si viene a sottrarre due volte il valore di esosamine determinabile sulla sola preparazione enzimatica, e pertanto questo valore, determinato a parte, è addizionato a C nel calcolo dei risultati.

I nostri risultati sono confrontabili con quelli di LOWTHER e ROGERS (10) che hanno ottenuto sintesi di glucosamina da glucosio e glutammina con sospensioni di cellule integre di *Streptococcus haemolyticus*.

Dai dati di COSSANO e SIVA SANKAR (11) su omogenati di fegato di ratto risulta che oltre che da attivatore degli NH_4^+ l'ATP direttamente o indirettamente può funzionare da donatore di aminogruppi permettendo la trasformazione di acido cheotoglutarico in glutammico anche senza aggiunta di NH_4^+ . I nostri risultati sembrano però indicare che anche derivati adeninici non portatori di radicali fosforici ricchi di energia possano agire da donatori di gruppi aminici per lo meno per quanto riguarda la aminazione del glucosio.

Riassunto

Nei midolli della spongiosa epifisaria e metafisaria e del canale diafisario si è studiata la defosforilazione e deaminazione dei nucleotidi e nucleosidi ipoxantinnici ed adeninici e la aminazione del glucosio.

Il midollo della spongiosa metafisaria dimostra attività ATPasica, ADPasica, AMPasica, ITPasica, IDPasica, IMPasica, ed ADPdeaminasica, ma non deamina l'AMP e l'adenosina. I midolli della spongiosa epifisaria e del canale diafisario possiedono più debole attività defosforilante e man-

cano AMPase, ma deaminano rapidamente tutti i nucleotidi adeninici e l'adenosina. In presenza di glutammina o di un nucleotide e nucleoside adeninico, il glucosio viene rapidamente aminato dai midolli delle due spongiose. Sembra probabile che la formazione della glucosamina non avvenga tramite la fosforilazione dell'osso.

Summary

Dephosphorylation and deamination of adenosine and inosine derivatives and glucose amination in the bone marrow.

The dephosphorylation and deamination of hypoxanthine and adenine nucleotides and nucleosides has been separately studied in preparations of bone marrow of the epiphyseal and metaphyseal spongiosa and of the diaphyseal channel. A stronger dephosphorylating activity is shown by the marrow of metaphyseal spongiosa, which has ATPase, ADPase, AMPase, ITPase, IDPase, IMPase, ADPdeaminase but lacks adenylate and adenosine deaminases. The marrows of epyphyseal spongiosa and from the diaphysis lack AMPase and show the other dephosphorylating activities at a lower degree, but actively deaminate all adenine nucleotides and the nucleoside. Glucose is aminated by either glutamine, adenosine or an adenine nucleotide in presence of the same marrow preparations. It seems likely that the synthesis of glucosamine is not preceded by the phosphorylation of the hexose.

Bibliografía

- (1) ABRAMS, R. A., and BENTLEY, M. : *J. Am. Chem. Soc.*, **7**, 4189, 1955.
- (2) COHN, W. E. and CARTER, C. E. : *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4273, 1950.
- (3) CERLETTI, P. ATIBISCHER, M. L., e FRONTICELLI, C. : *La Ricerca Scient. (Roma)*, **28**, 2052, 1958.
- (4) PARTRIDGE, S. M., and WESTALL, R. G. : *Biochem. J.*, **42**, 238, 1948.
- (5) CERLETTI, P., e FRONTICELLI, C. : *Atti delle V Giornate Biochimiche Latine*, Barcellona, 1959, in corso di stampa.
- (6) BLIX, G. : *Acta Chem. Scand.*, **2**, 467, 1948.
- (7) MEHL, J. W. : *J. Biol. Chem.*, **157**, 173, 1944.
- (8) LÉLOIR, L. F., and CARDINI, C. E. : *Biochim. Biophys. Acta*, **12**, 15, 1953.
- (9) CASTELLANI, and ZAMBOTTI, V. : *Nature*, **178**, 324, 1956.
- (10) LOWTHER, D. A. and ROGERS, H. J. : *Biochem. J.*, **62**, 304, 1956.
- (11) COSSANO, B. J., and SIVA SANKAR, D. V. : *Experientia*, **15**, 186, 1959.

