

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Pavia

Nucleotidi purinici e pirimidinici nella cartilagine di ossificazione*

di

B. de Bernard, L. Bianco e V. Zambotti

Recentemente avevamo dimostrato (BIANCO e coll., 1) la presenza nella cartilagine metafisaria di alcuni nucleotidi e derivati nucleotidici: ATP, UTP, UMP, UDPG e UDP-N-acetilesosamina (°).

Nelle stesse ricerche avevamo anche intravisto la probabile esistenza di altri nucleotidi, per cui abbiamo ritenuto opportuno ripetere gli esperimenti, partendo da quantità maggiori di tessuto, per tentare di identificare i nucleotidi rimasti sconosciuti e, nello stesso tempo, confermare i precedenti.

Nelle attuali ricerche siamo partiti da 150 g di cartilagine metafisaria, prelevata dalle estremità prossimali e distali delle ossa lunghe di 80 maialini di 2-3 giorni di vita.

I nucleotidi furono estratti con il procedimento illustrato nel precedente lavoro (l.c., 1). In breve, la cartilagine veniva omogenizzata, deproteinizzata e centrifugata; il supernatante, privato del glicogeno e del condroitinsolfato, veniva addizionato

* Comunicación 6-5 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo 1959.

(°) Abbreviazioni usate: ATP (adenosintrifosfato), ADP (adenosindifosfato), AMP (adenosinmonofosfato), UTP (uridintrifosfato), UMP (uridinmonofosfato), UDPG (uridindifosfoglicucio), UDPGA (acido uridinfosfoglicurico), GTP (guanosintrifosfato), GDP (guanosindifosfato), GMP (guanosinmonofosfato), CTP (citidintrifosfato), CMP (citidinmonofosfato), TPNH (trifosfopiridinnucleotide ridotto).

di acetato di bario, che faceva precipitare i nucleotidi. Questi, raccolti come sale di bario, venivano ridisciolti in HCl, la soluzione portata a pH 9.0 e addizionata di alcool etilico; ciò consentiva di ottenere tre frazioni di nucleotidi, sotto forma di sale di bario.

I nucleotidi così frazionati, liberati del bario, vennero separati ulteriormente mediante cromatografia bidimensionale, eseguita su carta Whatman n. I, impiegando i seguenti solventi: acetato di ammonio M di pH 7,4 e etanolo 95 % (30 : 75) (2) e soluzione satura di solfato di ammonio, isopropanolo e acqua (79 : 2 : 19) (3).

TABELLA

Rapporti tra le densità ottiche a 250 e 260 m μ e a 280 e 260 m μ e lunghezze d'onda corrispondenti ai minimi e massimi di assorbimento (λ min. ass. e λ mass. ass.) dei nucleotidi adeninico, guaninico, uracilico e citosinico, estratti dalla cartilagine.

Composto	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$	pH	λ min. ass.	λ mass. ass.
ATP standard (Sigma)	0,84	0,23	2	230-231	257
	0,79	0,17	7	227-228	259
Nucleotide adeninico	0,84	0,26	2	229	257
	0,79	0,17	7	226-227	259-260
GTP standard (Sigma)	0,97	0,70	2	229	256
	1,13	0,68	7	224	253-254
	1,03	0,66	9	229	255
Nucleotide guaninico	0,97	0,69	2	227	256
	1,10	0,66	7	224	254
	1,00	0,65	9	229-230	255
UTP standard (Sigma)	0,74	0,37	7	230	262
	0,78	0,45	9	233-234	261
Nucleotide uracilico (°)	0,80	0,48	7	233-234	262-263
	0,84	0,50	9	237	264
CTP standard (Sigma)	0,44	2,10	2	242	280
	0,81	1,06	7	248-249	272
Nucleotide citosinico (°)	0,61	1,45	2	240	277-278
	0,82	0,90	7	243	270

I dati corrispondenti ai nucleotidi segnati con (°) differiscono in più o in meno dai valori forniti dai nucleotidi standard. Riteniamo che la differenza sia imputabile alla reciproca contaminazione dei nucleotidi uracilici e citosinici, dovuta all'insufficiente potere separatore, nei confronti di questi nucleotidi, del sistema di solventi usato per cromatografia.

Le singole macchie, evidenziate mediante esposizione del foglio ad una sorgente di luce ultravioletta, furono eluite con acqua distillata e indagate attraverso lo studio dello spettro di assorbimento nella regione dell'ultravioletto e le modificazioni dello stesso al variare del pH.

Particolare attenzione è stata rivolta alla misura delle densità ottiche (D.O.) a 250 e 260 e 280 m μ , perchè i rapporti fra le D.O. a 250 e 260 m μ e a 280 e 260 m μ sono molto significativi ai fini del riconoscimento del composto. Questi rapporti sono riportati nella Tabella, nella quale sono segnati anche i dati dei nucleotidi standard.

In più sono state determinate le modificazioni degli spettri di assorbimento in seguito alla bromurazione, eseguita secondo la tecnica di SUZUKI e ITO (4), che permettono di distinguere le basi puriniche e pirimidiniche. (I dettagli di queste analisi, nonchè le caratteristiche cromatografiche e spettroscopiche di ciascun nucleotide, vengono descritti in esteso in una nota pubblicata a parte).

In base alle caratteristiche degli spettri di assorbimento determinati a vari pH e dopo bromurazione, considerati i valori dei rapporti tra le D.O. alle lunghezze d'onda di 250 e 260 m μ e di 280 e 260 m μ , abbiamo concluso che nella cartilagine di coniugazione sono presenti nucleotidi adeninici, guaninici, uracilici e citosinici.

E' possibile aggiungere che in base ai dati cromatografici i nucleotidi adeninici erano rappresentati probabilmente da ATP, ADP, e AMP; i guaninici verosimilmente da GTP, GDP e GMP; gli uracilici da UTP, UMP, UDPG e UDP-N-acetilesosamina; i citosinici verosimilmente da CTP e CMP.

Concludendo, le presenti ricerche da una parte confermano la presenza nella cartilagine di accrescimento dei nucleotidi adeninici e uracili, già da noi segnalati nel 1958 (1 l.c.), dall'altra svelano per la prima volta la contemporanea presenza di nucleotidi guaninici e citosinici, per cui è possibile affermare che la cellula cartilaginea possiede un corredo praticamente completo di tali composti, come le cellule di altri tessuti.

Sul probabile significato dei nucleotidi adeninici e uracilici, e in particolare dell'ATP nella cartilagine di ossificazione ci siamo soffermati nel lavoro precedente (1 l.c.).

Qui conviene aggiungere che la presenza dei nucleotidi uracilici (UMP e UTP) e di alcuni derivati (UDPG e UDP-N-acetilesosamina) suffraga l'ipotesi che nella cartilagine metafisaria abbia luogo realmente la biosintesi dei mucopolisaccaridi e in particolare del condroitinsolfato (Zambotti e de Bernard, 5) di cui la cartilagine è molto ricca. Ricordiamo ancora che

CASTELLANI e coll. nel 1957 (6) hanno provato che la cartilagine metafisaria è capace di sintetizzare l'UDPG partendo dal glucosio-1-fosfato e da UTP. L'UDPG è ossidato a sua volta dalla cartilagine ad UDPGA (l.c. 6), che è uno dei precursori delle unità fondamentali del condroitinsolfato.

Per quanto concerne le funzioni biochimiche generali dei nucleotidi guaninici, esse sono note. Aggiungiamo che GINSBURG (7) ha scoperto molto recentemente (1958) che essi intervengono anche, insieme al TPNH, nella conversione del mannosio in fucosio, zuccheri trovati nella cartilagine da GLEGG e coll. (8).

Riassunto

Cartilagine di ossificazione di maiali appena nati venne omogenizzata e deproteinizzata. Dopo centrifugazione il supernatante venne privato del contenuto di glicogeno e di mucopolisaccaridi acidi (condroitinsolfato). Successivamente mediante precipitazione frazionata con acetato di bario e alcool etilico si ottennero tre precipitati distinti (sali di bario dei vari nucleotidi).

I nucleotidi furono separati mediante cromatografia bidimensionale su carta. I singoli nucleotidi, dopo eluizione dai rispettivi cromatogrammi, vennero sottoposti ad analisi spettrofotometrica, eseguita in differenti condizioni di pH e anche dopo trattamento con acqua di bromo.

Le analisi compiute hanno consentito di accertare la presenza, nella cartilagine di ossificazione di maiale, di nucleotidi adeninici, guaninici, citosinici e uracilici.

Summary

Purine and pyrimidine nucleotides in the ossification cartilage

Ossifiable cartilage of new-born pigs was homogenized, set free of proteins and centrifuged. The supernatant was freed of glycogen and of acid mucopolysaccharides (chondroitinsulphates), fractionated with barium acetate and ethanol: three different precipitates were so obtained (barium salts of different nucleotides).

Nucleotides were separated by paper chromatography with two-dimensional technique. Each nucleotide, eluted from its own chromatogram, was analyzed with Beckman spectrophotometer and spectra were recorded at different pH and after addition of bromine water.

Results were obtained showing that in ossifiable cartilage of pigs adenine, guanine, cytosine and uracil nucleotides are present.

Bibliografia

- (1) BIANCO, L., CASTELLANI, A. A., de BERNARD, B. e ZAMBOTTI, V. : *G. Biochimica*, **7**, 57, 1958.
- (2) PALADINI, A. C. e LÉLOIR, L. F. : *Bochem. J.*, **51**, 426, 1952.
- (3) BERGKVIST, R. e DEUTSCH, A. : *Acta chem, Scand.*, **9**, 1.938, 1955.
- (4) SUZUKI, T. e ITO, E. : *J. Biochem. (Jap.)*, **45**, 403, 1958.
- (5) ZAMBOTTI, V. e de BERNARD, B. : *Acta Vitam.*, **12**, 229, 1958.
- (6) CASTELLANI, A. A., de BERNARD, B. e ZAMBOTTI, V. : *Nature*, **180**, 859, 1957.
- (7) GINSBURG, V. : *J. A. C. S.*, **80**, 4.426, 1958.
- (8) GLEGG, R. E., RIDINGER, D. e LEBLOND, C. P. : *Science*, **120**, 839, 1954.

