

CONFERENZE E SEMINARI

Metodi di studio della biosintesi del colesterolo

ENRICA GROSSI PAOLETTI †

Istituto di Farmacologia, Facoltà di Medicina, Università di Milano

La Prof.ssa Enrica Grossi Paoletti, Libero Docente di Farmacologia e Aiuto Ordinario dell'Istituto di Farmacologia dell'Università di Milano, è tragicamente scomparsa il 26 gennaio 1972, pochi giorni dopo l'invio del testo della conferenza tenuta nel nostro Istituto il 14 febbraio 1971 in occasione della VII Riunione del Gruppo di Ricerca sul Metabolismo Lipidico, del quale era Membro attivo sin dalla sua fondazione.

La pubblicazione integrale di questa conferenza intende essere un estremo omaggio dei Soci del Gruppo alla Sua Memoria.

R. ANGELICO

La biosintesi del colesterolo può essere studiata sia *in vivo* sia *in vitro* e le tecniche attualmente disponibili permettono di approfondire anche la conoscenza dei suoi meccanismi.

Studi di biosintesi del colesterolo *in vitro* a partire da precursori semplici vengono effettuati ogni qual volta se ne vogliono studiare i meccanismi fisiologici e patologici di regolazione. Questi risultano di difficile interpretazione se si tiene conto della esistenza di complessi problemi di compartimentazione. È tuttavia il caso di ricordare un problema di notevole importanza risolto soltanto attraverso ricerche *in vivo*, lo studio cioè del meccanismo di regolazione della colesterolemia nell'uomo. Si riteneva infatti che il meccanismo di « feedback » negativo, che regola la sintesi epatica del colesterolo nel ratto e nel cane (1), fosse operante anche nell'uomo, e che perciò poco significato potesse avere, dal punto di vista pratico, la riduzione dello apporto dietetico di colesterolo. Al contrario, accurati studi condotti somministrando acetato marcato hanno messo in evidenza l'esistenza di un pool endogeno di colesterolo (2) pari a 2/3, 3/4 del colesterolo totale. Ricerche effettuate con D₂O hanno permesso di chiarire che l'apporto esogeno di colesterolo nell'uomo non fa spostare il pool endogeno, mentre si verifica un effetto somma con aumento notevole della colesterolemia. Ciò ha fatto

pensare o che il « feedback » nel fegato umano non funzionasse, o che altri tessuti non sottoposti a « feedback » entrassero in gioco con un ruolo importante (3).

Gli studi *in vitro* sono molto avanzati: sappiamo che si possono isolare dal fegato complessi multienzimatici, che si trovano nelle frazioni microsomiale e solubile e che sono in grado di effettuare la biosintesi da MVA fino al colesterolo (4).

Diversi cofattori sono necessari: O_2 , Mg^{++} , ATP, NADH, NADPH. Le modalità di purificazione degli enzimi, la preparazione dei substrati e le condizioni ottimali di lavoro per studi di biosintesi del colesterolo sono state dettagliatamente descritte di recente da Popjak (4) e Dempsey (5).

Un aspetto importante della questione riguarda i tessuti nei quali può essere studiata la biosintesi del colesterolo. Il fegato è notoriamente il tessuto che dà il migliore rendimento. Altri tessuti, quali il muscolo e il rene, dimostrano scarsa attività. Un discorso a parte meritano la cute e il tessuto nervoso. Nella cute sono presenti steroli intermedi della biosintesi e, pur essendo la preparazione del tessuto un po' complessa, vi si possono studiare bene i problemi che riguardano i passaggi dopo la ciclizzazione dello squalene (6). Il tessuto nervoso sintetizza colesterolo in quantità assolutamente trascurabili nell'animale adulto. Durante la sua maturazione, invece, sintetizza attivamente steroli (7), con accumulo di prodotti intermedi della biosintesi, che ci è stato agevole identificare (8). Con maggiore difficoltà abbiamo invece identificato gli steroli precursori presenti nel cervello dell'uomo adulto (Tab. 1). Il riconoscimento degli steroli endogeni è reso più difficile nel fegato dalla presenza di steroli dietetici che complica l'interpretazione dei risultati.

Per esperienze di biosintesi del colesterolo, la scelta della marcatura è legata a vari fattori. La marcatura con ^{14}C , anche se più difficile da ottenere, è preferita, quando è possibile, per le maggiori garanzie di riproducibilità. Infatti, usando composti marcati con tritio si deve sempre controllare che non si abbiano perdite aspecifiche di 3H , ed è perciò necessario affiancare le esperienze con prove in bianco. Inoltre le elevate marcature specifiche dei composti tritati, se danno vantaggio in alcuni casi, rischiano però di accelerare la decomposizione delle molecole stesse durante la conservazione e richiedono perciò frequenti purificazioni del materiale.

Teoricamente tutti gli intermedi della biosintesi del colesterolo da acetato a desmosterolo possono essere utilizzati marcati per studi di biosintesi. In pratica sono disponibili precursori cosiddetti « lontani » quali acetato marcato con ^{14}C nel metile o nel COOH e mevalonato marcato con ^{14}C in 1 o 2, oppure con 3H in 2, 4 o 5.

L'uso di acetato o mevalonato si rende indispensabile quando si vogliono studiare i meccanismi di regolazione della sintesi, fisiologica o patologica, od il meccanismo di azione dei farmaci attivi sulla sintesi del colesterolo.

Oggi il mevalonato si può ottenere anche marcato stereospecificamente con ^3H , cioè si possono avere separate le due configurazioni possibili assunte a seconda della posizione dell' ^3H nella molecola (⁴). La marcatura stereospecifica permette di studiare più a fondo l'introduzione e la scomparsa

TABELLA I

Steroli identificati nel cervello umano adulto (*)

STEROLO	STEROLI µg/g tessuto	%
C 30 Δ^8	0,596	0,003
C 29 Δ^8	5,642	0,030
C 28 Δ^8	3,857	0,020
C 27 Δ^8	15,480	0,082
C 30 $\Delta^{8,24}$	0,708	0,004
C 29 $\Delta^{8,24}$	3,588	0,019
C 28 $\Delta^{8,24}$	3,064	0,016
C 27 $\Delta^{8,24}$	2,157	0,011
C 27 $\Delta^{5,24}$	3,838	0,020
C 27 Δ^5	18.660,000	99,090
C 27 Δ^{14}	3,835	0,020
C 27 Δ^5 (7 C=0)	1,626	0,009
C 27 Δ^0	54,750	0,291
Steroli identificati solo parzialmente	72,380	0,384

(*) Da Galli e coll. (8).

di H durante la sintesi biologica. Per marcare invece precursori che abbiano già la configurazione sterolica si ricorre in genere all'introduzione di ^{14}C nelle posizioni 1, 4, 26 e di ^3H in 2 per gli steroli da C²⁸ a C³⁰, in 2, 3, o 4 per quelli a 27 atomi di carbonio (⁵).

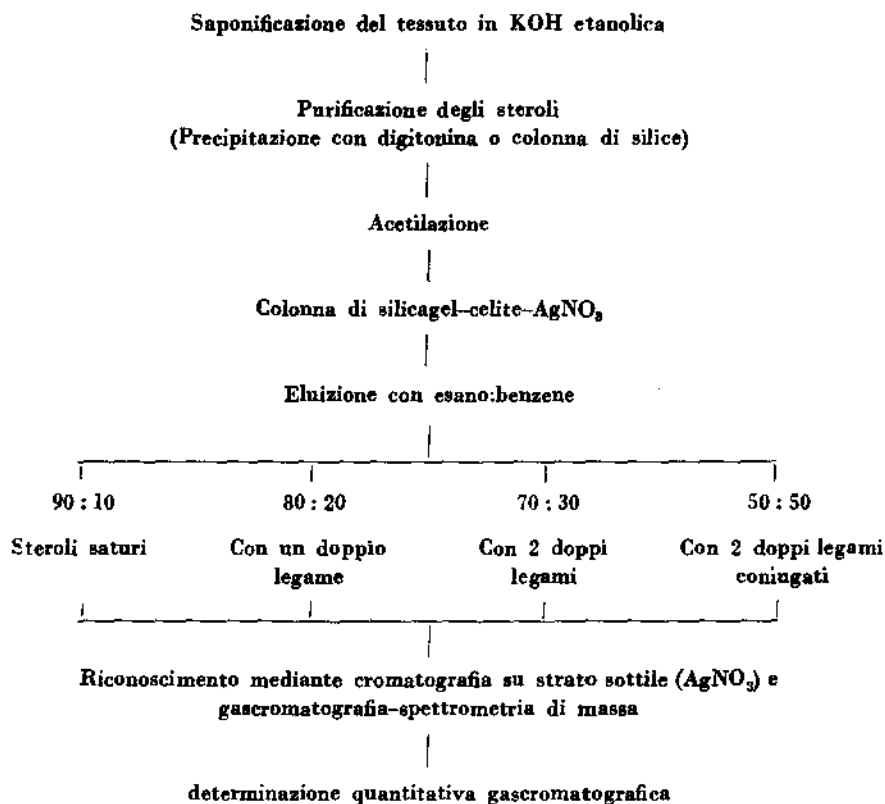
I problemi più complessi nello studio della biosintesi del colesterolo sono connessi ai metodi da usare per separare ed identificare i prodotti delle reazioni di biosintesi, sia che siano effettuate *in vivo* che *in vitro*, con la identificazione degli intermedi formati od eventualmente già presenti nel tessuto in esame.

Discuteremo soltanto della separazione degli intermedi di natura sterolica. Le tecniche di cromatografia su strato sottile, che sono le più semplici, non danno da sole risultati molto soddisfacenti, per lo scarso potere separatore, nei confronti degli steroli intermedi.

Abbiamo già presentato altre volte le caratteristiche della tecnica da noi adottata per separare e riconoscere gli steroli intermedi della biosintesi del colesterolo nei tessuti (^{10,11}) ed i risultati ottenuti analizzando tessuti quali

fegato (¹²), cervello (⁸) ed i tumori cerebrali (¹³). Il metodo (Schema 1) è basato essenzialmente sulla separazione in colonna cromatografica di silicagel-celite-AgNO₃. Gli steroli da separare devono essere applicati come derivati acetilati (per mascherarne l'OH in 3).

La separazione è basata sulle differenze in posizione e numero dei doppi legami e viene controllata per gascromatografia.



SCHEMA 1. — Frazionamento ed identificazione di steroli da campioni biologici.
Da Galli e Grossi Paoletti (¹⁰).

Essa offre diversi vantaggi: 1) gli steroli sono protetti da degradazione od isomerizzazione dei doppi legami durante la cromatografia; 2) il recupero è completo; 3) è possibile ottenere separazione di steroli presenti in piccolissima quantità; a tale scopo può essere utile usare due colonne: una prima per allontanare la quota maggiore di colesterolo presente, ed una seconda per separare gli steroli presenti in piccola quantità.

Le frazioni steroliche eluite vengono successivamente analizzate per gascromatografia-spettrometria di massa, contro standards.

Nel cervello, come accennato precedentemente, abbiamo messo in evidenza con questo metodo la presenza di due serie di intermedi sterolici da 30 a 27 atomi di carbonio (Tab. I), una serie con doppio legame in catena laterale ed una senza. Questo risultato e l'uso di precursori marcati ci hanno permesso di stabilire che la via metabolica che mantiene il doppio legame in catena laterale è preferenziale nel tessuto nervoso (9). Abbiamo inoltre riconosciuto nel cervello la presenza di alcuni steroli che non sono previsti come intermedi normali di biosintesi, come ad esempio Δ^{11} colestanolo (13).

Analogamente Eneroth e coll. (14) hanno separato gli steroli del meconio mediante cromatografia su colonna. Gli steroli convertiti in trimetilsilil eteri sono poi stati riconosciuti mediante gascromatografia-spettrometria di massa.

Analizzando lo spettro di massa relativo al $C_{29}\Delta_8$ (Fig. 1) questi AA. hanno notato che, oltre al picco padre m/e 486 ed ai picchi caratteristici m/e 396, m/e 381 ed m/e 353 erano presenti picchi di discreta intensità m/e 484, m/e 394, m/e 379 ed m/e 351 indicativi della presenza contemporanea di uno sterolo con due doppi legami.

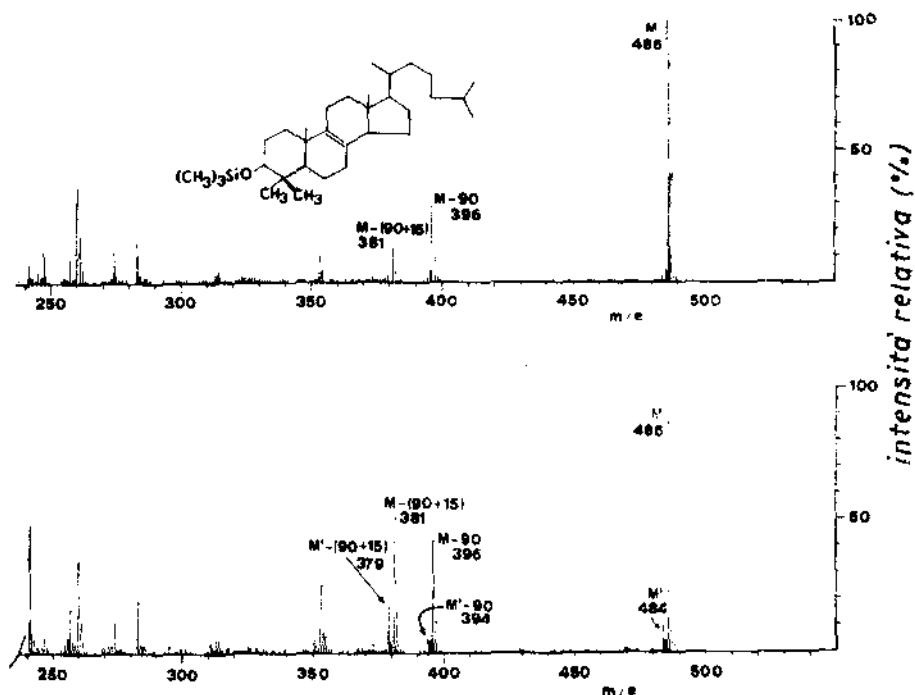
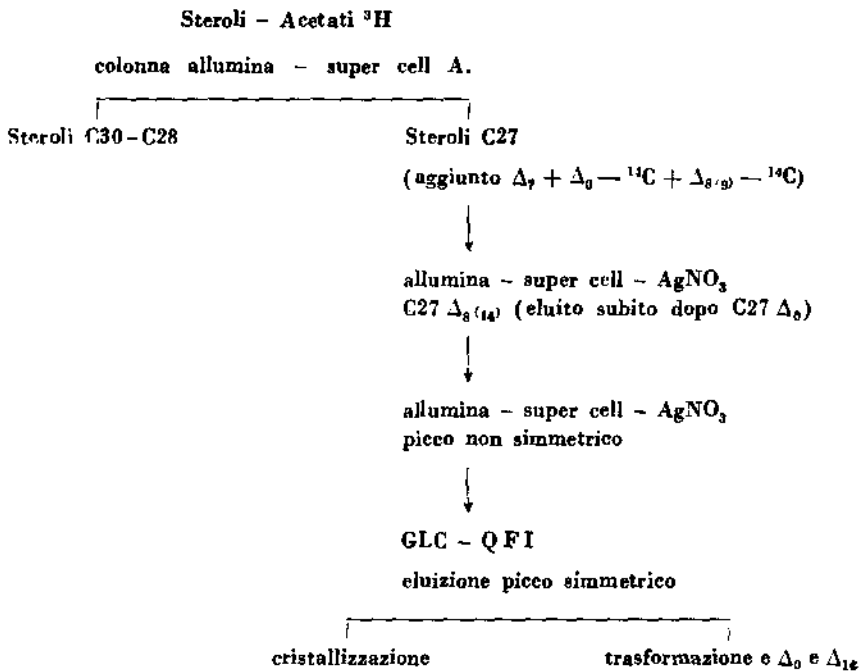


Fig. 1. — Spettro di massa relativo al $C_{29}\Delta_8$. Da Eneroth e coll. (14).

Questo sterolo è stato identificato da Eneroth e coll. (14) come $C_{29}\Delta_{8,10}$ in base alle caratteristiche di rottura ed alla identità con lo spettro, da noi pubblicato, del composto di sintesi (15).

Un metodo più complesso di identificazione di steroli sconosciuti è stato adottato da Lutsky e Schroepfer (16) per l'analisi di steroli della cute (Schema 2). Gli steroli purificati mediante precipitazione con digitonina,



SCHEMA 2. — Identificazione di $C_{27}\Delta_8(14)$ nella cute. Da Lutsky e Schroepfer (16).

vengono acetilati con anidride acetica 3H e sottoposti a separazione su colonne di acido silicico-super cell. Queste permettono la prima separazione degli steroli a 27 atomi di carbonio dagli altri (da C 28 a C 30). Gli steroli con 27 atomi di carbonio raccolti insieme, e con aggiunta di acetati di Δ^7 -colestonolo freddo, colestonolo ^{14}C e $C_{27}\Delta_8(9) ^{14}C$ sono stati passati in colonna di allumina-super cell- $AgNO_3$. Le frazioni corrispondenti allo sterolo del quale si vuole accertare la presenza, $C_{27}\Delta_8(14)$, eluìte subito dopo il colestonolo, vengono raccolte e riapplicate ad una colonna di allumina-super cell- $AgNO_3$ e successivamente in gascromatografia con colonna di QF 1,

Lo sterolo eluito da questa mostra coincidenza tra il picco di radioattività e quello di massa. La diluizione e la cristallizzazione a radioattività costante dello sterolo hanno portato gli AA. a riconoscere che si trattava del $C_{27}\Delta_8$ (14) atteso.

L'isolamento di composti puri radiochimicamente deve essere particolarmente accurato quando, anziché cercare la presenza di un intermedio nei tessuti, si vuole studiare il meccanismo di qualche passaggio della biosintesi. La presenza di impurezze altamente marcate deve sempre essere sospettata quando si parte da materiale di origine biologica ed il problema si presenta più complesso quando il precursore sia lontano come l'acido mevalonico. In questi casi, spesso, non è sufficiente ricorrere alla separazione cromatografica ed alle cristallizzazioni successive del prodotto desiderato, ma si deve aggiungere a questi procedimenti qualche reazione chimica specifica, che garantisca la purezza radiochimica del composto in esame.

Per il colesterolo, garanzia sufficiente di purezza si ottiene mediante la formazione del dibromuro (15). Il problema è invece più complesso quando si debba, ad esempio, sintetizzare $\Delta_{5,7}$ colestadienolo. Questo sterolo non si accumula normalmente nei tessuti, a meno che non si ricorra all'uso di farmaci, quale AY-9944, che ne impediscano la trasformazione a colesterolo (17). Ad esempio, incubando per un'ora omogenato di fegato con mevalonato $2-^{14}C$, il 50% della radioattività dell'insaponificabile appartiene a $\Delta_{5,7}$ acetato, separato in colonna di silicagel G- $AgNO_3$ (18).

L'idrogenazione del doppio legame in 5 con catalizzatore opportuno (trifenilfosfina rodio ioduro, che evita isomerizzazioni) porta a formazione di $C_{27}\Delta_7$, che dimostra una riduzione del 50% della radioattività molare alla prima cristallizzazione ed ulteriori diminuzioni in cristallizzazioni successive.

Due tipi di contaminazioni radioattive possono essere presenti in questo caso:

a) steroli che co-cristallizzano;

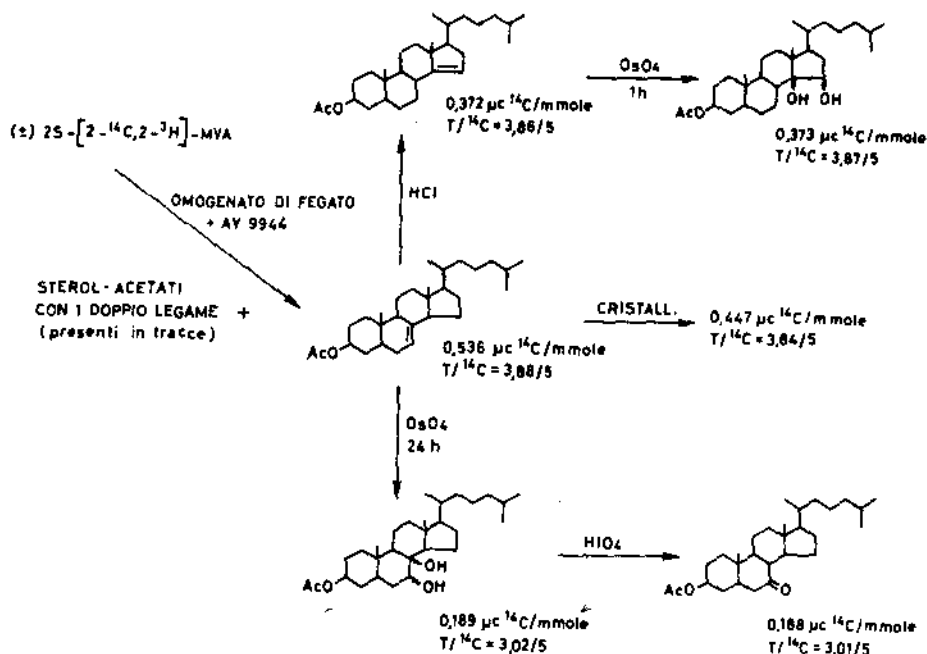
b) materiale non sterolico, formatosi durante la biosintesi, presente nella soluzione madre.

Si provvede perciò a purificare su colonna il Δ_7 colesteno ottenuto per idrogenazione, mentre un'aliquota di Δ_7 -acetato si fa reagire con OsO_4 a dare 7,8 diolo. La radioattività molare è identica a quella del Δ_7 -purificato su colonna (i prodotti che potrebbero reagire più lentamente sono eliminati se si sceglie un tempo di reazione opportuno). L'ulteriore purificazione del diolo a chetolo non porta a modificazione della radioattività molare, garantendo così l'isolamento del composto puro (19).

Quando si usi la doppia marcatura con mevalonato stereospecifico ^{14}C e $2S-^3H$ (Fig. 2), 6 molecole di mevalonato formano una molecola di lanosterolo, perciò in esso il rapporto $^3H/^{14}C$ è 6/6, mentre nella sua trasforma-

zione a colesterolo, per la perdita di 1 metile marcato il rapporto diventa 5/5. Inoltre durante il trasferimento del doppio legame da 8 a 7 e la formazione del doppio legame in 14, si ha perdita di H in 7 e 15 ed il rapporto $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ deve diventare 3/5 (¹⁹).

Si ricorre anche alla inibizione con AY-9944 quando si effettua la sintesi con mevalonato-2-3- ^3H o 2-S- ^3H , cioè con marcatura stereospecifica in omogenati di fegato e si voglia isolare γ -coletenolo (Schema 3). Alla fine



SCHEMA 3. — Biosintesi di steroli da ^3H -mevalonato stereospecifico.

dell'incubazione, separando gli steroli su colonna, si ottiene Δ_7 coletenolo, che sembra puro per GLC; cristallizzazioni successive dimostrano invece che nonostante non cambi il rapporto H/C si ha perdita di radioattività: perciò si devono eliminare gli eventuali contaminanti altamente marcati (¹⁹).

Si è pensato che questi fossero steroli con doppio legame in 8, poiché l'isomerizzazione a Δ_{14} faceva ridurre la radioattività molare, ma non faceva cambiare il rapporto H/C e lo stesso Δ_{14} trasformato in diolo non cambiava radioattività.

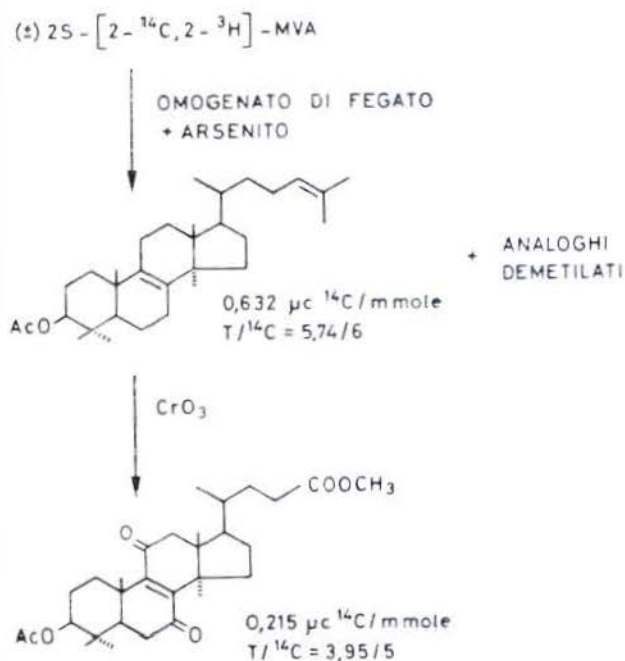
Invece il trattamento con OsO₄, che reagisce in tempi diversi in relazione con la posizione del doppio legame, formando diolo (infatti un Δ_{14}

reagisce in 1 ora, un Δ_7 reagisce in 36 ore, ed uno sterolo Δ_8 reagisce in 100 ore), fa ridurre di molto la radioattività molare, ma soprattutto chiarisce il rapporto H/C, che diventa esattamente 3/5.

La formazione successiva del 7-cheto con reazione molto specifica con HIO_4 dà lo stesso risultato.

Il 7-deidrocolesterolo purificato analogamente, dà un risultato simile ed ha permesso di confermare la perdita preconizzata dell'H in 15 (20) oltre che in 7 (19).

Un altro problema risolto con una purificazione adeguata riguarda il lanosterolo di origine biosintetica, pure derivato da MVA stereospecifico doppiamente marcato (Schema 4).



SCHEMA 4. — Biosintesi di lanosterolo da ^3H -mevalonato stereospecifico.

Per accumulare lanosterolo marcato in omogenati di fegato si è dovuto ricorrere all'uso di arsenito, che blocca le demetilazioni dell'anello steroideo (21). Tuttavia contaminanti sterolici, pure marcati, erano presenti e, per la purificazione, si doveva sfruttare la differenza tra questi ed il lanosterolo, che possiede un metile in 14 (20).

Mediante cromatografia su strato sottile di silica gel G- AgNO_3 , si è fatta una prima grossolana purificazione del lanosterolo sintetizzato che.

eluito dal piatto, è stato poi ossidato con acido cromico in acido acetico al suo dichetoderivato.

Si osserva una importante caduta della radioattività molare, dovuta quasi sicuramente a desmetilanaloghi C29 e C28, formatisi nel sistema, come si può dedurre dal basso rapporto C/H del lanosterolo prima della purificazione: dopo la purificazione il rapporto C/H diventa quello atteso, cioè 6/6.

Il problema è molto semplice quando si voglia invece controllare la purezza di uno sterolo derivato da un precursore vicino, perchè il numero dei possibili contaminanti che si formano nel tessuto è inferiore e di essi è molto più facile prevedere la natura. Così ad esempio, volendo studiare la trasformazione del C29 $\Delta_{8,14}$, al suo immediato successore (15), questo composto marcato è stato incubato con omogenato di fegato in anaerobiosi: l'isolamento degli steroli alla fine della reazione e la purificazione su colonna ha permesso di vedere quali steroli si formino in queste condizioni; la radioattività dell'insaponificabile è così ripartita (Tab. 2):

TABELLA 2

Conversione di C29 $\Delta_{8,14}$ - ^3H da parte di omogenato di fegato in anaerobiosi (*)

STEROLI	% INSAPONIFICABILE
C29 $\Delta_{8,14}$	26,4
C27 Δ^5	0,001
C29 $\Delta^8 + \Delta^7$	61,0
Altri steroli	8,0

(*) Da Canonica e coll. (15).

C29 $\Delta_{8,14}$ non reagito = 26,4 %; C29 $\Delta_8 + \Delta_7$ = 61,8 %; Δ_5 = 0,001 %; $\Delta_8 + \Delta_5$ = 8,0 %. Dal momento che il colesterolo non è marcato si può dedurre che la prima trasformazione subita dal C29 $\Delta_{8,14}$ in omogenati di fegato sia la perdita del doppio legame in 14.

Un ultimo caso che interessa la biosintesi in generale e quella del colesterolo in particolare si riferisce alla esclusione di un composto dal ruolo di intermedio.

Nel passaggio da Δ_7 a $\Delta_{5,7}$, ad esempio, è noto che i microsomi di fegato effettuano la trasformazione in atmosfera di O_2 e che sono necessari cofattori piridinici. Dal momento che in anaerobiosi non si ha reazione si è pensato alla esistenza di un intermedio ossigenato: perciò si è preconizzato il ruolo di un epossido.

È stato sintetizzato epossido 7α marcato (22). Questo sterolo, che in atmosfera di O_2 si trasforma attivamente a colesterolo, in anaerobiosi è convertito solo a Δ_7 -colesterolo (Tab. 3).

TABELLA 3

**Incorporazione di 7α , 8α epossido
da parte di omogenati di fegato**

ATMOSFERA	Δ_7 COLESTENOLO % INSAP.	COLESTEROLO % INSAP.
N_2	67,49	0,79
O_2	—	45,30

Si dimostra pertanto che:

a) il composto non è un intermedio obbligato tra Δ_7 -coletenolo e 7-deidrocoletenolo;

b) dal momento che il sistema biologico può convertirlo a Δ_7 , esso potrebbe appartenere a qualche via collaterale di biosintesi, dimostrandosi così la capacità del tessuto di riportarlo nelle vie naturali di sintesi.

Mentre è relativamente facile ottenere una risposta positiva nel ritrovamento di un intermedio vero, è molto più difficile stabilire il significato eventuale di vie secondarie di biosintesi.

Ad esempio il Δ_8 (14) coletenolo, che pure è stato isolato marcato dai tessuti (16) ed è trasformato a colesterolo in atmosfera di O_2 (23), ha dato risultati negativi in esperimenti di trappola (24). Ha posto così seri dubbi all'ipotesi che si tratti di un intermedio obbligato delle biosintesi del colesterolo.

Vorrei concludere sottolineando che se i metodi di cromatografia su strato sottile (e quelli gascromatografici di controllo) sono i più semplici per lo studio della biosintesi del colesterolo, i risultati più convincenti e rigorosi si ottengono soltanto combinando queste due tecniche con la cromatografia su colonna, la spettrometria di massa e le trasformazioni chimiche, che permettono di garantirsi da errori dovuti alla presenza di impurezze radiochimiche.

Con l'impiego di queste metodiche è così possibile arrivare a:

- conoscere l'entità di biosintesi del colesterolo nei tessuti;
- identificare steroli ignoti e steroli presenti nei tessuti in piccolissime quantità;
- stabilire il ruolo di intermedi di nuovi composti;
- studiare inibitori delle tappe enzimatiche capaci di realizzare un blocco delle sintesi endogene del colesterolo dell'organismo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) TAYLOR, C. B. & R. G. GOULD. *Circulation*, **2**, 467 (1950).
- (2) COX, G. E., C. B. TAYLOR, D. PATTON, G. B. DAVIS JR. & N. BLANDIN. *Arch. Pathol.* **76**, 60 (1963).
- (3) TAYLOR, C. B., B. MIKKELSON, J. A. ANDERSON, D. T. FORMAN, A. K. ASDEL & K. J. HO. *Med. Time*, **95**, 489 (1967).
- (4) POPJAK, G. *Methods Enzymol.* **15**, 393 (1969).
- (5) DEMPSEY, M. E. *Methods Enzymol.* **15**, 501 (1969).
- (6) GAYLOR, J. L., *Advan. Lipid Res.*, **10**, (1972) in corso di stampa.
- (7) GROSSI-PAOLETTI, E. & R. PAOLETTI. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.* **66**, 564 (1958).
- (8) WEISS, J. F., G. GALLI & E. GROSSI-PAOLETTI. *J. Neurochem.*, **15**, 563 (1968).
- (9) GALLI, G., E. GROSSI-PAOLETTI & J. F. WEISS. *Science*, **162**, 1495 (1968).
- (10) GALLI, G. & E. GROSSI-PAOLETTI. *Lipids*, **2**, 72 (1967).
- (11) GALLI, G. & E. GROSSI-PAOLETTI. *Lipids*, **2**, 84 (1967).
- (12) GALLI, G., R. FUMAGALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *Intern. Conference on Radioactive Isotopes in Pharmacology*, Geneve, P. G. Waser and B. Glasson, Eds., Wiley Interscience, London, 1967, p. 279.
- (13) PAOLETTI, R., G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI, A. FIECCHI & A. SCALA. *Lipids*, **6**, 134 (1971).
- (14) ENEROTH, P., J. A. GUSTAFSSON & E. NYSTROM. *Europ. J. Biochem.*, **11**, 456 (1969).
- (15) CANONICA, L., A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6532 (1968).
- (16) LUTSKY, B. N. & G. J. SCHROEPFER JR. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6449 (1970).
- (17) DVORNIK, D., M. KRAML, J. DUBUC, M. GIVNER, & R. GAUDRY. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3309 (1963).
- (18) FIECCHI, A., G. GALLI, M. GALLI-KIENLE & A. SCALA. *Progr. Biochem. Pharmacol.*, **5**, 11 (1969).
- (19) CANONICA, L., A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *Steroids*, **11**, 749 (1968).
- (20) CANONICA, L., A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2597 (1968).
- (21) MOLLER, M. L. & T. T. TCHEN. *J. Lipid Res.*, **2**, 342 (1961).
- (22) FIECCHI, A., M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *J. Biol. Chem.*, 1972 (in corso di stampa).
- (23) HUI LEE, W., B. N. LUTSKY & G. J. SCHROEPFER JR. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5440 (1969).
- (24) FIECCHI, A., A. SCALA, F. CATTABENI & E. GROSSI-PAOLETTI. *Life Sciences* **9**, 1201 (1970).

Alcuni aspetti del meccanismo d'inibizione della colesterologenesi (*)

GIUSEPPE PORCELLATI, ALBERTO GAITI, LUCIANO BINAGLIA
e GIANFRANCO GORACCI

Istituto di Chimica Biologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Perugia

L'argomento di questa relazione riguarda principalmente la biosintesi del colesterolo *in vitro* nei tessuti animali e la possibilità di modificarla. Influenzare il processo metabolico della biosintesi del colesterolo è problema di grande ambizione e di grande difficoltà, e la difficoltà maggiore, direi, proviene dal notevole numero di reazioni enzimatiche da cui si parte per poter giungere dal metabolita iniziale, l'acetato attivo, al prodotto finale, il colesterolo. Altro ostacolo proviene, a mio avviso, dalla difficoltà di isolamento e di purificazione dei singoli enzimi interessati nel processo metabolico, difficoltà che spesso impedisce di individuare a quale livello l'inibizione della sintesi del colesterolo abbia luogo e quindi di studiare più da vicino il meccanismo dell'inibizione.

A quest'ultimo proposito, occorre specificare che le nostre sperimentazioni hanno un duplice aspetto: il primo riflette un lato meramente applicativo che può o meno condurre a risultati positivi, dei quali nessuno negherebbe l'importanza, il secondo, di maggiore interesse biochimico, sfrutta il modello sperimentale per esaminare il meccanismo d'inibizione, e quindi il meccanismo d'azione dell'enzima interessato. L'inibitore è cioè adoperato quale mezzo di studio per indagare sulla struttura e sul funzionamento dell'enzima.

Non sempre un processo di inibizione evidenziato *in vitro* con tessuti integri, fettine d'organo, preparazioni subcellulari, complessi multi-enzimatici ed enzimi purificati, è ugualmente osservabile *in vivo* nell'animale trattato per periodi più o meno lunghi con determinati prodotti. Questo fenomeno, che trova numerosi esempi nella biochimica farmacologica e

(*) Relazione tenuta a Roma dal Prof. G. Porcellati il 13 febbraio 1971 in occasione della VII Riunione del Gruppo di Ricerca sul Metabolismo Lipidico - Lavoro eseguito con il contributo C.N.R. (contratto n. 70.01810.04.115.3381).

nella farmacodinamia moderna, e che può esser dovuto a vari e disparati fattori, spesso convergenti verso uno stesso effetto (veloce metabolizzazione dell'inibitore *in vivo*, difficoltà da parte dell'inibitore di influenzare processi metabolici già a loro volta regolati da meccanismi di controllo neuro-ormonale, scarsa penetrabilità del prodotto a livello delle superfici di membrana, ecc.), complica i risultati finali e le considerazioni che ne scaturiscono, in quanto non può sempre dirsi che un risultato di sicura inibizione *in vitro* rappresenti l'effettiva traduzione in un meccanismo di inibizione *in vivo* dello stesso processo metabolico.

In questi ultimi anni sono stati presi in esame nel nostro laboratorio alcuni interessanti composti, derivati aromatici degli acidi butirrico e valerianico, che si sono dimostrati notevoli inibitori della sintesi del colesterolo *in vitro* in preparazioni costituite da fettine di fegato di ratto o da frazioni subcellulari epatiche (^{1,4}). Questi derivati, l'acido β -benzal butirrico (acido 3-metil-4-fenil butenoico, BBA), l'acido α -idrossi- β -benzal butirrico (acido 2-idrossi-3-metil-4-fenil butenoico, HBBA), l'acido α -metil- γ -fenilbutirrico (acido 2-metil-4-fenil butanoico, MPBA), l'acido β -fenilisovalerianico (acido 3-fenil-*iso*-pentanoico, PVA) e la β -benzalbutirramide (3-metil-4-fenil-3-butenamide, BBAM), in particolare il BBA, mostrano infatti di possedere *in vitro* un sicuro effetto inibitorio sui processi di sintesi del colesterolo a partire da acetato-2-¹⁴C (^{1,2}), come mostra la Fig. 1 nel caso del BBA.

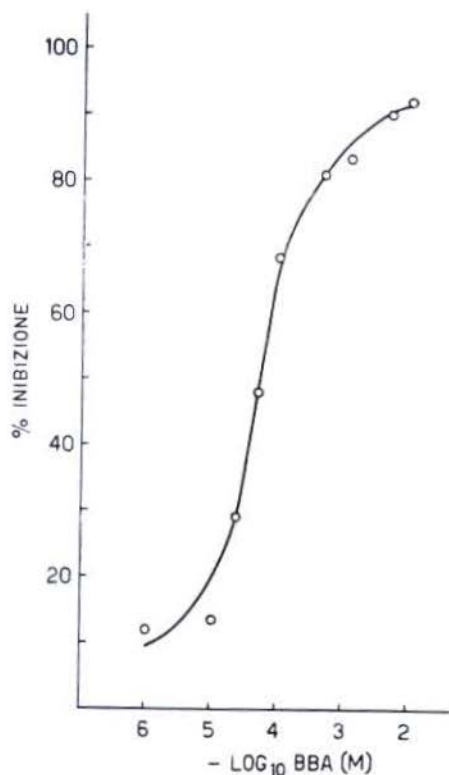
Simile effetto inibitorio è stato posto in evidenza da noi anche impiegando HBBA, che rappresenta un metabolita del BBA (^{5,6}), che si forma *in vivo* dopo somministrazione di quest'ultimo.

Per quanto riguarda la BBAM, nel nostro laboratorio sono stati eseguiti studi volti ad indagare la possibilità, da parte di tale composto, di inibire la sintesi del colesterolo *in vitro* da acetato-2-¹⁴C in un sistema ricostruito, utilizzando la sola frazione microsomale epatica addizionata con il proprio soprannatante. È noto infatti che dal punto di vista della compartimentalizzazione subcellulare la sintesi del colesterolo avviene in due compartimenti cellulari: quello costituito dal reticolo endoplasmatico e quello formato dalla « frazione solubile cellulare ». Orbene, anche in questo tipo di esperimento, la velocità di sintesi del colesterolo è risultata sensibilmente inibita (⁴), a conferma del fatto che il processo metabolico, inizialmente esaminato a livello di fettine di fegato (^{1,2,7}) ed influenzato dagli inibitori su menzionati, è perfettamente paragonabile a quello rappresentato dal sistema ricostituito microsomi-soprannatante.

Il BBA e gli altri composti esaminati inibiscono la velocità di sintesi del colesterolo solo a partire da acetato-2-¹⁴C (^{1,4}), ma non quando si adoperi come precursore radioattivo mevalonato-2-¹⁴C (^{1,4}) che, come è noto, è posto a valle dell'acetato nella sequenza dei metaboliti della sintesi colesterolica. Solo l'MPBA ha mostrato di possedere un sicuro effetto ini-

Fig. 1. — Inibizione della sintesi del colesterolo da BBA *in vitro*.

I risultati sono espressi come valori percentuali di inibizione (0 = valori di controllo). Essi sono calcolati sulla base di $m\mu$ mol di colesterolo sintetizzate da $2\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato per 60 minuti e per mg di colesterolo (valore medio controllo in 8 esperimenti \pm S.E.M. = $0,83 \pm 0,15$). Gli esperimenti, eseguiti con fettine di fegato, erano 6 per ogni valore di concentrazione di BBA.



bente anche a partire dal mevalonato (Fig. 2), svelando così un secondo livello di inibizione della sintesi del colesterolo, oltre quello rappresentato dalle tappe enzimatiche che intercorrono tra l'acetato ed il mevalonato.

Ritorniamo più avanti sul problema della inibizione da parte del MPBA sulla sintesi colesterolica da mevalonato. Vogliamo concentrare per ora la nostra attenzione sugli enzimi interessati nella conversione dell'acetato in mevalonato, e sulla possibilità che essi possano essere inibiti *in vitro* dai derivati butirrici su menzionati. Sono stati esaminati l'acetato-CoA ligasi (E.C.6.2.1.1), che forma acetil-CoA dall'acetato, l'acetil-CoA acetil trasferasi (E.C.2.3.1.9), che produce acetoacetil-CoA da 2 molecole di acetil-CoA, l'idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintetasi (E.C.4.1.3.5), necessario per la sintesi di HMG-CoA da acetoacetil-CoA ed acetil-CoA, ed infine l'HMG-CoA reduttasi (E.C.1.1.1.34), che forma il mevalonato dall'HMG-CoA mediante un meccanismo di riduzione essenzialmente irreversibile.

I dati relativi alle prime due attività enzimatiche hanno indicato che l'acetato-CoA ligasi è scarsamente inibita dal BBA e dal HBBA o è inibita solo a concentrazioni molto elevate (^{1,4}), come indicano i dati

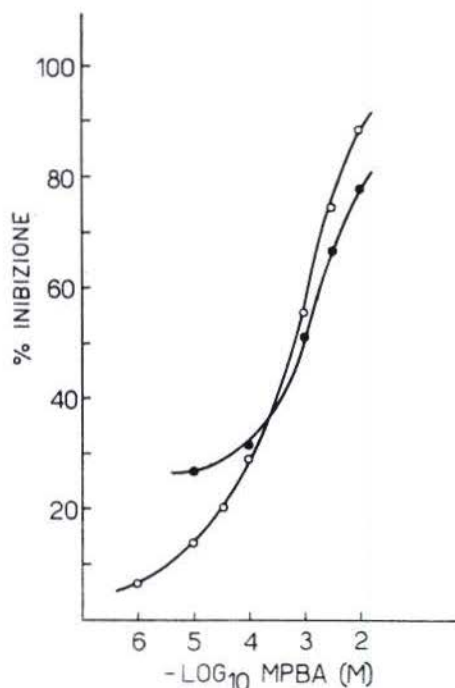


Fig. 2. — Inibizione da MPBA della sintesi del colesterolo *in vitro* partendo da 2-¹⁴C-acetato (O—O—O) o da 2-¹⁴C-mevalonato (●—●—●). Gli esperimenti (8 per l'acetato, 6 per il mevalonato) sono stati eseguiti come descritto in Fig. 1. Valori medi controllo per l'incorporazione dell'acetato e del mevalonato (in μ mol di colesterolo sintetizzate per 60 minuti e per mg di colesterolo \pm S.E.M.) pari a 0,78 \pm 0,13 e 14,7 \pm 1,10, rispettivamente.

esposti nella Fig. 3, mentre l'acetil-CoA acetil trasferasi è insensibile anche ad elevate concentrazioni di BBA o di altri derivati simili (¹). Con successivi esperimenti (⁸) si è indicato che l'enzima che produce l'HMG-CoA dall'acetil-CoA, cioè l'HMG-CoA sintetasi, non è praticamente influenzato dai suddetti composti.

I dati finora riportati ci inducono a concludere che il sito di inibizione esistente tra acetato e mevalonato non deve risiedere verosimilmente a livello della tappa catalizzata dell'acetato-CoA ligasi, in quanto l'inibizione di quest'ultimo enzima è evidente solo a concentrazioni troppo elevate di BBA ed HBBA (Fig. 3), e quindi non può di per sè costituire la tappa interessata nel processo di inibizione della sintesi del colesterolo (Fig. 1) osservata a partire da acetato-2-¹⁴C in fettine d'organo (¹⁻⁴), e prodotto da concentrazioni di BBA ben più basse di quelle inibenti l'acetato-CoA ligasi.

È chiaro che un'altra attività enzimatica dovrà essere interessata, ed in modo più sensibile, per rendere conto della inibizione globale del processo di sintesi del colesterolo esistente tra acetato e mevalonato. Per tale ragione abbiamo voluto esaminare l'attività HMG-CoA reduttasica preparata da fegato. Quest'enzima è indicato quasi universalmente come il più importante fattore, se non l'unico, capace di regolare *in vivo* lo intero processo di sintesi del colesterolo (⁹⁻¹¹), in quanto è influenzato dal

colesterolo stesso, dal digiuno, dalla dieta e da fattori ambientali (¹²). Un suo studio pertanto, in relazione all'effetto di BBA e composti correlati, risultava di notevole interesse. Gli esperimenti sono stati eseguiti con BBA, HBBA, MPBA, PVA e BBAM sia sull'enzima estratto dal reticolo endoplasmatico e poi solubilizzato e semipurificato, sia sull'enzima «nativo», ancora legato alle strutture microsomiali, adoperando direttamente, in questo caso, microsomi epatici di ratto. I risultati hanno dimostrato che l'HMG-CoA reduttasi semipurificata dal fegato di ratto è notevolmente inibita da tali composti (⁸), in modo particolare da MPBA e BBA, a livelli di concentrazione tali da poter da sola essere responsabile del blocco dell'intero processo biosintetico, osservato in fettine e frazioni subcellulari di fegato di ratto (¹⁴). Negli esperimenti eseguiti impiegando direttamente membrane del reticolo endoplasmatico intatte (⁸), sono stati però ottenuti risultati contraddittori, nel senso che il BBA ed i composti correlati, anziché inibire, stimolano l'attività reduttasica, specialmente quando vengono pre-incubati con le membrane microsomiali per 10 minuti prima dell'aggiunta del substrato (HMG-CoA). Questi dati, che portano ad escludere l'effetto inibitorio della reduttasi in questione sulle membrane

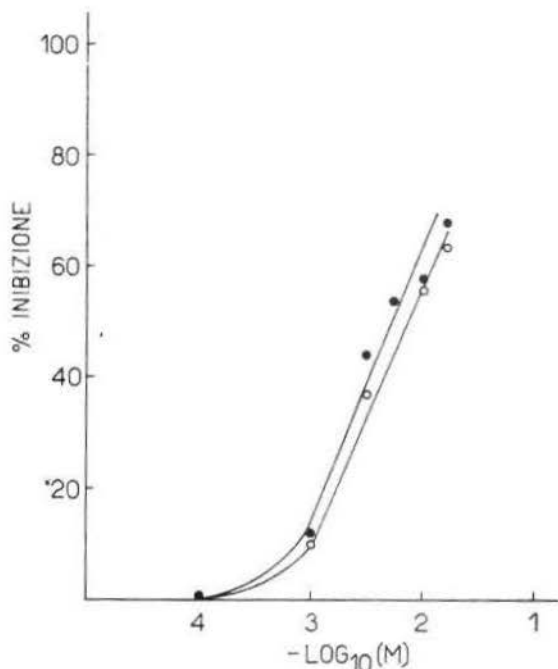


Fig. 3. — Effetto del BBA (●-●-●) e dell'HBBA (○-○-○) sull'acetato-CoA ligasi preparata da fegato di piccione. In ascisse: concentrazione molare di BBA o HBBA (in valori logaritmici); in ordinata: percentuale di inibizione.

integre, sono stati interpretati da noi ammettendo che i derivati butirrici esercitano a livello di membrana un effetto, probabilmente aspecifico, che porta ad una sua maggiore permeabilità a substrati aggiunti dallo esterno (nel caso specifico all'HMG-CoA), con il risultato di stimolare l'attività enzimatica, che pur risultava chiaramente inibita *in vitro* in sistemi non compartimentalizzati. Questo effetto aspecifico sulle membrane sarà confermato dai risultati che esporremo più avanti.

L'effetto che il BBA svolge a livello dell'acetato-CoA ligasi (inibizione dell'attività enzimatica solo a concentrazioni molto elevate), illustrato prima, è stato argomento di interessante discussione per poter collegare tali dati con quelli ottenuti sull'inibizione del processo globale di sintesi del colesterolo. Si è osservato che lo studio di una reazione, come quella catalizzata dall'acetato-CoA ligasi, la quale porta alla formazione dell'acetyl-CoA dall'acetato, non era molto logico, nel quadro di uno studio sui processi enzimatici intercalati lungo l'arco biosintetico che conduce a formazione di colesterolo, poichè la maggior parte del *pool* cellulare di acetyl-CoA proviene *in vivo* non dalla trasformazione dell'acetato in acetyl-CoA, bensì dall'ossidazione intramitocondriale del piruvato. È l'ossidazione del piruvato intramitocondriale che fornisce un *pool* attivo di acetyl-CoA da indirizzare verso una sintesi extramitocondriale efficiente di colesterolo e di composti ad esso correlati. Sono stati pertanto eseguiti studi sull'effetto che il BBA svolge sull'ossidazione del piruvato, dimostrandosi *in vitro* che mitocondri purificati di fegato di ratto, pre-incubati con BBA, ossidano il piruvato a velocità veramente ridotte, e contemporaneamente formano citrato in quantità minime (13), come dimostra la Tab. 1. Da questa si osserva che l'effetto del BBA ha luogo a concentra-

TABELLA I

Effetto del BBA sull'ossidazione del piruvato e sulla formazione del citrato in mitocondri epatici

BBA (μ mol)	CONSUMO DI OSSIGENO (*)	PIRUVATO (μ mol) (**)	CITRATO (μ mol) (**)
—	11,2	— 6,40	+ 1,80
100	0,8 (93)	— 0,70 (89)	+ 0,10 (94)
1,0	1,0 (91)	— 0,80 (87)	+ 0,10 (94)
0,1	1,5 (87)	— 0,80 (87)	+ 0,11 (94)

Incuazione condotta con mitocondri purificati di fegato di ratto (1 mg circa di azoto proteico) per 30 minuti a 30°C. Il BBA è stato pre-incubato in tutti gli esperimenti per 15 minuti con i mitocondri, prima dell'aggiunta del substrato.

(*) Risultati riportati in μ g di atomi di O_2 /mg azoto proteico/30 minuti. Tra parentesi è indicato il grado di inibizione.

(**) I dati rappresentano la scomparsa di piruvato o l'aumento di concentrazione del citrato nella miscela di incubazione. Tra parentesi è indicato il grado di inibizione.

zioni veramente basse (μM), e che è simile sia nei riguardi dell'ossidazione del piruvato che della formazione del citrato. È quindi chiaro che il BBA deve influenzare in qualche modo la formazione di un *pool* attivo di acetil-CoA cellulare, forse portando a diminuzione il *pool* dell'acetil-CoA intramitocondriale mediante inibizione del sistema piruvico-ossidativo. In altre parole l'acetil-CoA non può funzionare efficientemente per le sintesi steroliche se non raggiunge nel citosol una concentrazione attiva, e questa deve ottenersi dal *pool* intramitocondriale di acetil-CoA; è chiaro quindi che, influenzando quest'ultimo, sarà praticamente influenzata, anche se in via indiretta, la sintesi del colesterolo stesso.

In esperimenti successivi si è dimostrato anche che il piruvato, quando è presente nella pre-incubazione insieme con il BBA, protegge quasi totalmente il sistema mitocondriale dall'inibizione della respirazione da parte del BBA (13), come dimostra la Tab. 2. Il valore di inibizione diminuisce

TABELLA 2

Effetto protettivo del substrato sull'ossidazione del piruvato in mitocondri epatici in presenza di BBA

PRE-INCUBAZIONE	CONSUMO DI OSSIGENO (*)	CITRATO (μmoli) (**)
nessuna	10,2	+ 1,40
BBA (100 μmoli)	1,9 (81)	+ 0,20 (85)
BBA (100 μmoli) + piruvato (100 μmoli)	7,3 (29)	+ 0,98 (30)

Preincubazione condotta sia con BBA da solo o con BBA e piruvato insieme, per 15 minuti a 30°C, prima di aggiungere 16 μmoli di fumarato.

(*) Risultati riportati in μg di atomi di O_2/mg azoto proteico/30 minuti. Tra parentesi è indicato il grado di inibizione.

(**) I dati rappresentano l'aumento di concentrazione del citrato nella miscela d'incubazione. Tra parentesi è indicato il grado di inibizione.

infatti fino al 30 % circa, quando il piruvato è pre-incubato con il BBA. Questo risultato, mentre pone secondo noi i mitocondri in condizioni di normali efficienze ossidative, dall'altro può ancora spiegare, pur in presenza di concentrazioni fisiologiche di substrati protettivi (come continuamente accade in un ambiente cellulare *in vivo*), l'effetto inibitorio del BBA sulla sintesi citoplasmatica del colesterolo acetil-CoA-dipendente, in quanto il grado del potenziale trasferimento di acetil-CoA dal mitocondrio al citoplasma potrebbe sempre essere gravemente affetto.

Quale è il meccanismo dell'inibizione dell'ossidazione del piruvato? Questo interrogativo ci ha condotto ad una lunga serie di esperimenti, che hanno portato a risultati di un certo interesse (13,14). Si è cioè dimostrato

che il BBA agisce a livello delle membrane mitocondriali permettendo la fuoriuscita del NAD dall'interno del mitocondrio, senza d'altra parte produrre alcun rigonfiamento a carico dello stesso (14). Tale fuoriuscita costituisce il fattore più importante al quale è legato il processo di inibizione dell'ossidazione del piruvato e quindi della sintesi dell'acetil-CoA. Con altri esperimenti (13,14) abbiamo potuto infatti dimostrare direttamente la fuoriuscita del NAD, l'effetto protettivo su tale fenomeno da parte dell'acido etilen-diammino-tetraacetico o EDTA (noto agente stabilizzante delle membrane), l'effetto riattivante svolto dal NAD aggiunto dall'esterno al sistema d'incubazione, l'effetto del BBA di facilitare il fenomeno del rigonfiamento mitocondriale da parte di sicuri agenti rigonfianti (il BBA labilizza le membrane, preparandole così all'effetto rigonfiante), l'effetto protettivo svolto dal piruvato e dai metaboliti del ciclo di Krebs aggiunti dall'esterno verso la fuoriuscita del NAD e quindi verso l'inibizione del processo di ossidazione. Quest'ultimo dato è spiegabile alla luce delle nozioni relative al comportamento intramitocondriale del NAD ossidato e ridotto (NADH). È noto che l'NADH è legato molto più fortemente del NAD alle strutture mitocondriali (15), e non è quindi facilmente allontanabile da esse, quando qualche agente labilizzante le membrane (BBA) o gli agenti rigonfianti agiscono sul mitocondrio. Poichè, tramite l'ossidazione intramitocondriale dei metaboliti aggiunti dall'esterno, si produce una notevole quantità di NADH a spese del NAD, si ottiene una protezione nei riguardi della fuoriuscita di quest'ultimo dal mitocondrio.

Molti dei dati ottenuti sull'ossidazione del piruvato ci hanno condotto alla convinzione che il BBA, come gli altri derivati, possiede un effetto aspecifico a livello di membrana, a conferma di quanto era stato osservato nello studio dell'attività HMG-CoA reduttasica prima menzionato. Questo effetto, di difficile interpretazione, è evidenziabile *in vitro* ed è probabilmente presente *in vivo*, poichè *in vivo* l'attività di membrana è più logicamente rappresentata. Tale fenomeno è efficientemente controbilanciato *in vitro* dalla presenza di metaboliti protettori, e ciò spiega il perchè della completa atossicità del BBA e di altri agenti ipocolesterolemici del tipo del BBA.

L'effetto protettore svolto da vari metaboliti conduce però a modici effetti inibitori sulla velocità di formazione di acetil-CoA e di mevalonato, contrariamente a quanto si osserva con gli enzimi estratti e purificati o con lo studio delle attività enzimatiche determinate in assenza di substrati protettori. Ci si può domandare, a questo punto, se tale effetto protettore non sia responsabile della mancata dimostrazione *in vivo* di un sicuro effetto di inibizione della sintesi del colesterolo in ratti (16), mentre i numerosi esperimenti *in vitro* hanno sempre dimostrato effetti sicuri di inibizione. Oltre che alle ragioni su esposte, la mancanza di un effetto inibente

in vivo potrebbe anche esser dovuta ad un rapido metabolismo di tali composti i quali non raggiungerebbero negli organi livelli sicuramente inibenti. A questo scopo sono stati condotti esperimenti di somministrazione in ratti di BBA e BBAM marcati in posizione 1 con ^{14}C . Somministrando 200 mg/kg di BBA per via endovenosa od intramuscolare o 200 mg/kg di BBAM *per os* in ratti Sprague-Dawley maschi (150-200 g), e dosando a vari tempi la concentrazione dei due prodotti nel sangue e nel fegato, si è dimostrato (¹⁷) che la concentrazione ematica del BBA è molto più elevata nelle prime quattro ore dopo somministrazione endovenosa od intramuscolare rispetto a quella ottenibile con la somministrazione di BBAM *per os*, e che inoltre le concentrazioni nel fegato di BBA e BBAM con le tre vie di somministrazione non sono molto diverse tra loro; tra 30 minuti ed 8 ore dalla somministrazione, sono valutabili a circa 10^{-4}M rispetto al peso del fegato fresco. Tale concentrazione risulta inibitrice della biosintesi del colesterolo, sulla base delle notizie prima riportate (¹⁻⁴).

È stato condotto uno studio anche sulla distribuzione nelle varie frazioni subcellulari epatiche (nuclei, mitocondri, microsomi, frazione solubile) di BBA e BBAM radioattivi, somministrati *in vivo* a ratti maschi Sprague-Dawley. I risultati, che sono riportati nelle Tab. 3 e 4, per quanto riguarda la BBAM ed il BBA, rispettivamente, indicano che la loro distribuzione nelle varie subfrazioni avviene in modo non caratteristico. Il 50 % circa del composto è infatti presente nella « frazione solubile » cellulare, il 20-25 % nei nuclei (35-40 % nel caso del BBA, Tab. 4) ed il rimanente (20 % circa nel caso del BBAM e 10-12 % nel caso del BBA) distribuito in parti pressochè eguali tra frazione mitocondriale e microsomiale. A quest'ultimo riguardo c'è da aggiungere che la frazione microsomiale, la quale rappresenta la sede delle più importanti reazioni enzimatiche deputate alla sintesi del colesterolo, conserva, per il periodo tra i 30 minuti e le 16 ore dalla somministrazione di BBAM, sempre il 10 % circa della radioattività del fegato *in toto*. Tale percentuale nei microsomi è intorno al 5 % nel caso di somministrazione di BBA e rimane tale fino alle 8 ore (Tab. 4). Probabilmente una maggiore lipofilia del BBAM rispetto al BBA potrebbe rendere conto della più elevata percentuale di BBAM, potendo quest'ultima essere più facilmente assunta dalle membrane microsomiali.

Nell'aspetto generale della distribuzione delle quantità assolute in funzione del tempo, tali prove risultano alquanto simili a quelle del fegato integro (¹⁷). Inoltre, differenze tra le prove di somministrazione di BBA e BBAM esistono solo nel senso che il primo prodotto risulta presente in elevate quantità a livello delle frazioni subcellulari solo fino alle 4 ore dalla somministrazione, decadendo nettamente alle 8 ore (pur mantenendo la stessa percentuale dell'omogenato), mentre la quantità di BBAM rimane

elevata in esse anche dopo 8 ore dalla sua introduzione, decadendo solo alle 16 ore, ma anche in questo caso mantenendo la stessa percentuale dell'omogenato.

In termini di concentrazioni subcellulari dei prodotti radioattivi, le Tab. 3 e 4 indicano che alle 4 ore dalla somministrazione di BBAM, si raggiunge nei microsomi una concentrazione di circa 5×10^{-5} M, mentre nel caso del BBA tale concentrazione è di circa 2×10^{-4} M.

TABELLA 3

Distribuzione e concentrazione di BBAM in frazioni subcellulari di fegato di ratto dopo somministrazione del prodotto marcato

Intervallo dalla somministrazione (min)	Radioattività determinata in toto e in frazioni (nc) (*)					Concentrazione (M) calcolata in	
	Totale	Nuclei	Mitocondri	Microsomi	Sopranatante	Mitocondri (**)	Microsomi (**)
1	6,25	1,73 (26)	1,02 (15,3)	1,14 (16,6)	2,80 (42,1)	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
1	14,60	3,66 (22,6)	1,55 (9,5)	2,18 (13,5)	8,80 (54,3)	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^{-5}$
30	59,49	12,70 (23,6)	7,02 (13,1)	4,60 (8,6)	29,46 (54,8)	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$
30	18,19	5,54 (22,1)	1,22 (6,4)	1,47 (7,4)	10,81 (56,7)	$1 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
60	19,07	4,29 (25,2)	0,70 (4,1)	2,12 (12,5)	9,92 (58,2)	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
60	33,04	5,88 (20,1)	3,10 (10,5)	1,98 (6,7)	18,39 (62,8)	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$
240	19,90	4,64 (22,5)	2,28 (11,1)	2,15 (10,5)	11,51 (56,0)	$7,6 \cdot 10^{-5}$	$4,9 \cdot 10^{-5}$
240	13,51	3,24 (27,7)	0,96 (8,2)	0,80 (6,9)	6,69 (57,2)	$5,3 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$
480	20,60	5,20 (25,1)	2,18 (10,5)	1,85 (8,9)	11,46 (54,4)	$5,8 \cdot 10^{-5}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$
480	9,57	1,43 (16,8)	0,79 (9,3)	0,96 (11,2)	5,34 (62,7)	$5,2 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$
960	6,10	1,57 (25,8)	0,47 (7,8)	0,59 (9,7)	3,44 (56,7)	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
960	4,65	1,09 (24,7)	0,25 (5,6)	0,45 (10,2)	2,63 (59,5)	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$

BBAM-¹⁴C veniva somministrata per os (100 mg/kg, attività specifica pari a 76,81 nc/mg), sospesa in gomma arabica (10 ml/kg). Le subfrazioni erano preparate con metodi convenzionali, agli intervalli determinati. La BBAM era recuperata dalle subfrazioni dissolvendo il materiale fresco, preventivamente pesato, con Soluene-100 (Packard Instrument, S.p.A., Italia) a 60°C (1 ml/100mg). Una aliquota era quindi contata per scintillazione liquida con metodi convenzionali. Del supernatante veniva letta direttamente una frazione nota dopo aggiunta di una miscela scintillante contenente Triton X-100 (44% v/v).

(*) Per radioattività totale si intende quella presente nell'omogenato del fegato in toto. La percentuale di radioattività corrispondente ad ogni frazione relativamente al totale di radioattività recuperata è indicata tra parentesi. La somma di tali percentuali non era mai inferiore al 95% della radioattività dell'omogenato in toto.

(**) Calcolata sulla base del peso delle frazioni, equiparando 1 g ad 1 ml di frazione.

Distribuzione e concentrazione di BBA in frazioni subcellulari di fegato di ratto dopo somministrazione del prodotto marcato

Intervallo dalla somministrazione (min)	Radioattività determinata in toto e in frazioni (nc)					Concentrazione (M) calcolata in	
	Totale	Nucl-i	Mitocondri	Microsomi	Supranatante	Mitocondri	Microsomi
1	13,61	5,63 (43,1)	1,03 (7,9)	0,53 (4,1)	5,86 (44,9)	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$7,1 \cdot 10^{-5}$
1	15,09	6,38 (42,7)	1,19 (8,0)	0,60 (4,0)	6,76 (45,3)	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$7,3 \cdot 10^{-5}$
30	14,18	5,96 (43,2)	1,30 (9,3)	0,47 (3,4)	6,08 (44,1)	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$
30	14,20	5,61 (40,1)	1,14 (8,1)	0,56 (4)	6,69 (47,7)	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$
60	19,03	5,50 (30,7)	1,78 (9,9)	0,58 (3,2)	10,08 (56,2)	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$0,8 \cdot 10^{-4}$
60	18,92	6,90 (36,7)	1,69 (9,0)	0,75 (4,0)	9,45 (50,3)	$3 \cdot 10^{-4}$	$0,7 \cdot 10^{-4}$
240	18,54	6,66 (36,2)	1,85 (10,1)	0,59 (3,2)	9,31 (50,5)	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$
240	19,91	7,01 (35,2)	1,65 (8,3)	0,61 (3,1)	10,62 (53,4)	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$
480	3,80	1,39 (37,5)	0,38 (10,4)	0,25 (6,6)	1,68 (45,4)	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$
480	3,27	1,26 (38,1)	0,29 (8,9)	0,19 (5,9)	1,55 (47,0)	$4,6 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$

BBA - ^{14}C somministrato *per os* (100 mg/kg, attività specifica pari a 76,81 nc/mg). Procedimenti sperimentali ed indicazioni dei dati simili a quelli riportati in Tab. 3.

Tali concentrazioni, specialmente quelle del BBA, risultano inibitrici della biosintesi del colesterolo, sulla base delle notizie prima riportate ($^{1-4}$), e quindi indicherebbero che effettivamente si possono raggiungere *in vivo* concentrazioni tali di BBA da poter influenzare le reazioni enzimatiche microsomiali alla base del processo di biosintesi del colesterolo.

Prima di terminare questa parte dell'esposizione, dobbiamo menzionare che le prove relative alla distribuzione subcellulare del BBA e del BBAM non sono state influenzate da possibili fenomeni di redistribuzione dei prodotti, che possono accadere durante le manipolazioni delle frazioni e le varie centrifugazioni. Tutti i controlli effettuati hanno infatti dimostrato che nessuna redistribuzione apprezzabile dei composti ha luogo tra le varie subfrazioni in tutte le prove eseguite. Pertanto i dati ottenuti riflettono le reali distribuzioni dei composti menzionati ottenibili *in vivo* a livello delle varie subfrazioni esaminate.

Ci è sembrato particolarmente interessante, alla luce dei dati esposti nelle Tab. 3 e 4, indagare sul fenomeno della peculiare concentrazione di BBA e BBAM a livello della frazione nucleare. Mediante lo studio della distribuzione di BBA e BBAM in estratti contenenti RNA e DNA si è potuto osservare che non vi è una loro elettiva concentrazione a livello di questi due acidi nucleici.

Successivi studi sono stati eseguiti sul comportamento di BBAM a livello della mucosa intestinale, dove è noto avvenire una buona parte della sintesi del colesterolo *in vivo* (11). Le tecniche adoperate sono state identiche a quelle adottate per lo studio della distribuzione di BBAM a livello delle subfrazioni epatiche (Tab. 3). I dati ottenuti, non riportati in tabella per brevità, hanno dimostrato che anche a livello dei microsomi della mucosa intestinale si raggiunge *in vivo* una concentrazione massima di BBAM tra le 4 e le 8 ore dalla somministrazione, ma che tale

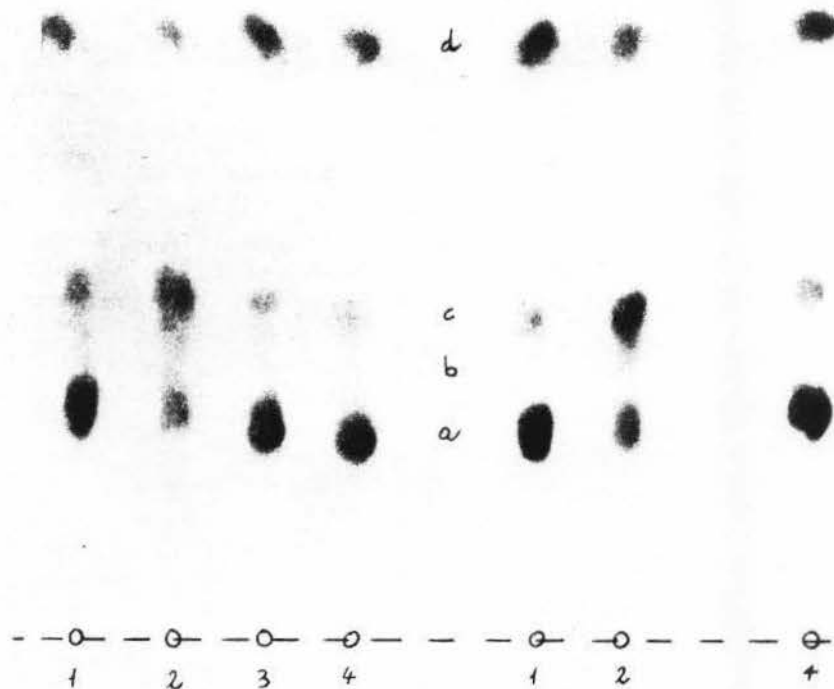


Fig. 4. — Radioautografia (1) su strato sottile di steroli marcati dopo incubazione di fettine di fegato di ratto con mevalonato-2-¹⁴C, eseguita come descritto in precedenti esperimenti (3). 1) nessuna aggiunta di MPBA; 2) MPBA, 0,1 mM, aggiunto; 3) MPBA, 0,01 mM, aggiunto; 4) MPBA, 0,001 mM, aggiunto. a) colesterolo; b), ?; c) lanosterolo; d) squalene.

concentrazione è più bassa di quella osservata in analoghe frazioni epatiche, essendo dell'ordine di 8×10^{-6} M. Interessante è anche notare che dopo 16 ore dalla somministrazione di BBAM è possibile ancora porre in evidenza una apprezzabile radioattività a livello microsomiale.

TABELLA 5

Effetto dell'acido α -metil γ -fenil butirrico (MPBA) sulla isopentenil pirofosfato isomerasi isolata e purificata da fegato di ratto (18)

Esperimento, n.	Senza MPBA	Con MPBA, 1 mM	Con MPBA, 0,1 mM
1	27,1	25,4	28,8
2	29,4	33,2	27,5
3	30,7	25,8	31,2
4	26,2	25,4	28,5
5	27,4	29,6	24,9

L'attività isopentenil pirofosfato isomerasica era determinata per scintillazione liquida sec. Holloway e Popják (18). I dati sono espressi in unità/mg di proteine. La frazione attiva corrisponde a quella «G-200-2» di Holloway e Popják (18).

TABELLA 6

Effetto dell'acido α -metil γ -fenil butirrico (MPBA) sulla 3,3-dimetilallil trasferasi e sulla geranil trasferasi isolata e purificata dal fegato di ratto

Esperimento n. 1	(a)	71,2	MPBA (1 mM)	MPBA (0,1 mM)
			75,4	68,6
Esperimento n. 2	(b)	69,3	62,4	75,6
	(c)	79,4	72,4	73,9
	(a)	104,2	94,2	91,2
Esperimento n. 2	(b)	98,4	93,2	92,7
	(c)	107,6	100,7	97,3

Gli esperimenti del n. 1 si riferiscono a dosaggi dell'attività dimetilalliltrasferasica (19), mentre quelli del n. 2 a dosaggi dell'attività geranil-trasferasica (19). La prima era saggiata con dimetil-allilpirofosfato + $1\text{-}^{14}\text{C}$ -isopentenil pirofosfato; la seconda con geranil pirofosfato + $1\text{-}^{14}\text{C}$ -isopentenil pirofosfato. I dati sono espressi in unità/mg di proteine. La frazione attiva corrisponde alla «DEAE Fraction» di Holloway e Popják (19).

Vogliamo concludere questa nostra relazione esponendo alcuni dati relativi allo studio della inibizione della sintesi colesterolica da MPBA, che abbiamo trattato prima. Tale composto risulta inibitore, non solo adoperando l'acetato- $2\text{-}^{14}\text{C}$ come precursore del colesterolo, ma anche il mevalonato- $2\text{-}^{14}\text{C}$ (3). Il risultato indica che l'MPBA svolge un ruolo inibitorio anche a livello di tappe enzimatiche poste tra il mevalonato ed il cole-

sterolo. La Fig. 4 dimostra appunto che un'evidente inibizione della sintesi del colesterolo da mevalonato avviene ad una concentrazione di MPBA pari a 10^{-4} M.

Sono stati pertanto esaminati due importanti enzimi connessi con queste fasi metaboliche, la isopentenil pirofosfato isomerasi e la geranyl trasferasi, ambedue isolate dal fegato di ratto e purificate (18,19). I dati delle Tab. 5 e 6 indicano però che nessuna delle due attività enzimatiche esaminate risulta inibita da MPBA, a concentrazioni 1 e 0,1 mM, e pertanto non sono queste attività responsabili della inibizione del processo metabolico che conduce dal mevalonato al colesterolo.

Poichè con esperimenti precedenti (1-4) era stato dimostrato che nessuna sostanziale inibizione occorre per i processi metabolici intercorrenti tra squalene e colesterolo, nè ad opera di MPBA nè di BBA o BBAM, ne risulta che l'inibizione deve avvenire, per quanto riguarda MPBA, solo tra mevalonato e squalene, oltre quella già documentata (3) occorrente prima del mevalonato. Uno studio più approfondito delle attività enzimatiche esistenti tra questi due ultimi metaboliti risulta di notevole importanza, ed i nostri sforzi in futuro sono volti anche a cercare di risolvere quest'ultimo problema.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SPERANZA, M. L., G. PORCELLATI & M. C. ZAPPONI. *Giorn. Arter.*, **2**, 292 (1967).
- (2) PORCELLATI, G., D. GIORGINI & E. TOJA. *Lipids*, **4**, 190 (1969).
- (3) PORCELLATI, G. & D. GIORGINI. *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 625 (1969).
- (4) GIORGINI, D. & G., PORCELLATI. *Il Farmaco, Ed. Sci.* **24**, 392 (1969)
- (5) CANONICA, L., P. MANITTO, U. VALCAVI & N. ZONTA. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1645 (1968).
- (6) VALCAVI, U. & N. ZONTA. *Giorn. Arter.*, **5**, 356 (1967).
- (7) GIORGINI, D. & G. PORCELLATI. *Giorn. Biochim.*, **16**, 335 (1967).
- (8) GAITI, A., R. NESSI, M. L. SPERANZA, I. MONTANINI & G. PORCELLATI. *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, **79**, 555 (1971).
- (9) BUCHER, N. L. R., P. OVERATH & F. LYNEN. *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 491 (1960).
- (10) SIPERSTEIN, M. D. & V. M. FAGAN. *J. Biol. Chem.*, **241**, 602 (1966).
- (11) DIETSCHY, J. M. *J. Clin. Invest.*, **47**, 286 (1968).
- (12) HAMPRECHT, B. C. NÜSSLER & F. LYNEN. *Febs Letters*, **4**, 117 (1969).
- (13) SPERANZA, M. L., A. GAITI, G. E. DE MEDIO, I. MONTANINI & G. PORCELLATI. *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2737 (1970).
- (14) SPERANZA, M. L., A. GAITI, R. NESSI, L. BINAGLIA & G. PORCELLATI. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 2477 (1971).
- (15) CHANCE, B. & H. BALTSCHIEFFSKY. *J. Biol. Chem.*, **233**, 736 (1958).
- (16) Dati non pubblicati.
- (17) CAPONI, R., A. GAITI, U. VALCAVI & N. BOLEGO-ZONTA. *Atti Accad. Med. Lombarda*, **23**, 1 (1968).
- (18) HOLLOWAY, H. & G. POPJÁK. *Biochem. J.*, **106**, 835 (1968).
- (19) HOLLOWAY, H. & G. POPJÁK. *Biochem. J.*, **104**, 57 (1967).