

29. A. BALLIO e G. SERLUPI-CRESCENZI. — Nucleotidi di microrganismi.
Nota II. Isolamento dell'acido adenilosuccinico e dell'acido adenosinosuccinico dal micelio di *Penicillium chrysogenum* Thom. (*)

Riassunto. — Fra i nucleotidi del micelio di *Penicillium chrysogenum* erano stati riscontrati in un precedente lavoro due composti che non coincidevano con nessun derivato delle comuni basi presenti negli acidi nucleici. Si dimostra che uno di essi è il 5'-ribotide della 6-(1,2-dicarbossietilammino)purina, o acido adenilosuccinico, e l'altro il riboside corrispondente, o acido adenosinosuccinico.

Summary. — In a previous work two nucleotides from the mycelium of *Penicillium chrysogenum* were encountered which did not correspond to any derivative of the common bases present in the nucleic acids. It is shown that one of these is the 5'-ribotide of 6-(1,2-dicarboxyethylamino)purine, or adenylosuccinic acid, and the other the corresponding riboside, or adenosinosuccinic acid.

Nel corso dello studio dei nucleotidi acido-solubili estratti dal micelio del *Penicillium chrysogenum* (2, 3) eravamo riusciti ad identificare sedici composti ed a caratterizzarne parzialmente alcuni altri. Due di questi ultimi avevano uno stesso spettro di assorbimento nell'u. v., che si distingueva nettamente da quello dei nucleosidi e nucleotidi delle basi pirimidiniche e puriniche degli acidi nucleici. Per entrambi i composti la reazione con orcina e cloruro ferrico era positiva ed indicava perciò la presenza di un pentosio nella loro molecola; inoltre delle due sostanze soltanto una conteneva fosforo, precisamente quella eluita da una resina anionica a concentrazioni maggiori di acido formico, e questo fosforo si liberava sotto forma di acido fosforico per azione di una 5'-nucleotidasi specifica dando luogo ad un composto che risultava identico al prodotto non fosforilato isolato dalla muffa.

Questi primi risultati suggerivano la possibilità che i due composti fossero uno il nucleoside e l'altro il nucleotide di una stessa base. In

(*) Questi risultati sono stati in parte pubblicati in forma preliminare nel 1957 (1). Il lavoro, completato nel giugno 1958, è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 263 (1959).

questo lavoro si dimostra l'esattezza di tale supposizione e si riporta l'elucidazione della struttura dei due composti.

MATERIALI E METODI

1) REATTIVI E PRODOTTI.

Erano gli stessi usati nella precedente nota ⁽³⁾, a meno che non venga specificato diversamente.

La resina Dowex-50 $\times 8$, 50-100 mesh, era fornita dalla National Aluminate Corporation (U.S.A.) con il nome di Nalcite HCR. Il metaperiodato sodico era un prodotto della B.D.H. (Inghilterra), il boroidrurio sodico era della Fluka (Svizzera), il solfammato ammonico ed il bicloridrato della N-(1-naftil)-etilendiammina erano della Merck (Germania) ed il ribosio-5-fosfato era dei Laboratori Schwarz (U.S.A.).

2) METODI ANALITICI.

a) Chimici.

Sono gli stessi descritti nella nota precedente ⁽³⁾. Nel caso del nucleotide essi sono stati applicati a diluizioni appropriate di una soluzione ottenuta sospendendo il sale di bario in acqua ed agitando con una piccola quantità di Dowex-50 in forma H^+ . La formazione di ammine diazotabili è stata messa in evidenza con i reattivi descritti da CHAMBERLAIN e RAINBOW ⁽⁴⁾, eseguendo però la diazotazione e la copulazione su piastra di porcellana (spot test).

b) Spettrofotometrici.

Gli spettri ultravioletti sono stati registrati nel modo descritto nella nota precedente ⁽³⁾. Come coefficiente molare di assorbimento (α_M) del nucleotide a 267 m μ e a pH 7 è stato scelto il valore di $19,9 \times 10^3$, ricavato dai risultati del dosaggio del ribosio; esso corrisponde a quello calcolato da CARTER e COHEN per l'acido adenilosuccinico ⁽⁵⁾. Lo stesso valore è stato usato per il nucleoside.

c) Cromatografici.

Si è usata carta Whatman 1 lavata con acido acetico 2 N ed i seguenti sistemi di solventi:

- N. 1: acetato ammonico M, pH 7,5 - alcool etilico (30:75);
N. 2: acetato ammonico M, pH 3,8 - alcool etilico (30:75);
N. 3: acido isobutirrico-ammoniaca N (100:60);
N. 4: alcool propilico normale - ammoniaca ($d=0,88$) - etilendiamminotetracetato bisodico 0,02 M (60:30:10);
N. 5: alcool isoamilico - fosfato bisodico 5% (bifasico);
N. 6: alcool butilico normale - piridina - acqua (6:4:3);
N. 7: alcool butilico normale - acetone - acqua (2:7:1);
N. 8: acetato di etile - piridina - acqua (7:2:1);
N. 9: alcool etilico - acqua (7:3).

Tranne per il solvente n. 5, in tutti i casi si è usato lo sviluppo discendente. Il solvente n. 5 era preparato ed impiegato secondo le indicazioni di CARTER ⁽⁶⁾. La posizione dei vari prodotti sui cromatogrammi era stabilita con i metodi ed i rivelatori descritti nella precedente nota ⁽³⁾.

3) IDROLISI.

Le idrolisi in tubicini capillari sono state eseguite con il metodo descritto nella nota precedente ⁽³⁾. Anche le degradazioni ad ammine diazotabili si eseguivano in microscala in capillari, scaldando i composti con acido cloridrico 6 N per 30' a 100°.

PARTE SPERIMENTALE

1) PURIFICAZIONE MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI SCAMBIO IONICO.

I due composti sono stati isolati da estratti idroalcolici o perclorici di micelio di *Penicillium chrysogenum* mediante cromatografia di scambio ionico seguita da cromatografia su carta. Le tecniche di estrazione sono state esposte in dettaglio nella nota precedente ⁽³⁾. E' stato osservato che qualora l'eluizione venga effettuata con un gradiente di acido formico più ampio di quello precedentemente usato, la risoluzione dei composti è assai migliore e sia il nucleoside che il nucleotide si ottengono ben separati dagli altri prodotti. In pratica l'eluizione era realizzata con le seguenti modifiche, rispetto a quanto descritto nella precedente nota. Per ogni volume di resina il mescolatore conteneva 30 volumi di acqua, la riserva era costituita da 15 volumi di acido formico N, al termine del quale si aggiungevano 30 volumi di acido formico 4 N,

seguito poi da 25 volumi di una soluzione 4 N in acido formico e 0,2 M in formiato ammonico. In tal modo il nucleoside era eluito all'inizio dell'acido formico 4 N ed il nucleotide a cavallo fra la fine dell'acido formico 4 N e l'inizio dell'acido formico 4 N contenente formiato ammonico 0,2 M. Il nucleoside era contenuto in un picco che seguiva immediatamente quello del desammido-difosfopiridin-nucleotide e che precedeva quello del trifosfopiridin-nucleotide e dell'acido guanosin-5'-monofosforico. Il nucleotide invece era contenuto in un picco che seguiva quello dell'acido adenosin-5'-difosforico e precedeva quello del guanosindifosfomannosio. In base alla densità ottica dei picchi eluiti dalla resina si poteva stabilire che le quantità estraibili da 1 g di micelio (peso secco) erano di circa 0,5 micromoli sia per il nucleoside che per il nucleotide.

2. PURIFICAZIONE MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU CARTA.

I composti venivano purificati mediante cromatografia a banda su carta Whatman 3MM lavata con acido acetico 2 N, impiegando il solvente N. 2. Dopo lavaggio della carta con alcool etilico le sostanze si eluivano con acqua e venivano ricromatografate usando il solvente n. 1. Si lavava poi con alcool etilico la zona contenente la sostanza e questa si eluiva con acqua.

Il nucleoside si purificava ancora mediante cromatografia con il solvente n. 9 e si conservava in soluzione a -20° .

3. PREPARAZIONE DEL SALE DI BARIO DEL NUCLEOTIDE.

Il nucleotide veniva precipitato come sale di bario nel modo seguente: la soluzione acquosa ottenuta dai cromatogrammi si liofilizzava fino ad una concentrazione di circa 0,1 millimoli/cm³, si aggiungeva 1/10 del volume di cloruro di bario M ed un volume di alcool etilico assoluto; il precipitato bianco voluminoso ottenuto si centrifugava dopo soggiorno di una notte a 5° e si lavava con alcool etilico al 50% e poi con etere. Il sale di bario, seccato sotto vuoto, risultava puro al 60% circa, in base alle analisi di ribosio, fosforo totale e fosforo inorganico liberato mediante la 5'-nucleotidasi del liquido seminale di toro, nonché in base alla densità ottica al massimo di assorbimento.

4. TRASFORMAZIONE DEL NUCLEOTIDE NEL NUCLEOSIDE.

Una soluzione di nucleotide (cm^3 0,4 contenenti 0,2 micromoli), preparata dal sale di bario con Dowex-50, veniva incubata a 37° con la 3'-nucleotidasi del liquido seminale di toro (cm^3 0,1) in presenza di cloruro di magnesio 0,1 M (cm^3 0,1) e di tampone di glicocollo M a pH 8,5 (cm^3 0,1). Dopo 30' si aggiungevano cm^3 0,1 di acido tricloroacetico al 20% e si dosava l'ortofosfato liberato, che corrispondeva al 91% del valore teorico. La stessa reazione, eseguita in tubicino capillare su un volume minore di una soluzione più concentrata del nucleotide, serviva per l'esame cromatografico.

5. PREPARAZIONE DELLA BASE DEL NUCLEOTIDE E DEL NUCLEOSIDE.

Esperienze preliminari effettuate in tubicini capillari su quantità di circa 0,5 micromoli avevano permesso di stabilire che il nucleotide era completamente idrolizzato a base e ribosio-5-fosfato dopo riscaldamento di 5 ore a 60° con acido cloridrico N.

Milligrammi 4,13 di sale di bario del nucleotide (puro al 60% circa) venivano riscaldati 5 ore a 60° con cm^3 1 di acido cloridrico N; terminato il riscaldamento la soluzione si portava a pH 8 con idrato sodico 10 N, si diluiva con acqua fino a cm^3 5 e si versava su un colonna (diametro cm. 1,0) contenente cm^3 6 di Dowex-50 in forma H^+ , il cui flusso era regolato in modo da raccogliere cm^3 0,5 al minuto. Dopo avere percolato la soluzione, si lavava la colonna con cm^3 25 di acqua seguendo la densità ottica a 270 m μ ; sia il percolato che i lavaggi avevano d_{270} inferiore a 0,1. Si iniziava allora l'eluizione con un gradiente di acido cloridrico realizzato impiegando un mescolatore con cm^3 250 di acqua ed una riserva con cm^3 250 di acido cloridrico 3 N (sistema chiuso con mescolatore a volume costante). Si raccoglievano frazioni di cm^3 5 ogni 10'; la sostanza era eluita fra la frazione 20 e la frazione 36. A parità di volume la densità ottica recuperata in questo intervallo corrispondeva al 94% di quella della soluzione iniziale del composto. Dopo concentrazione a pressione ridotta la sostanza veniva purificata mediante cromatografia su carta con il solvente n. 1 e si determinava il suo spettro u.v. a vari pH, la sua mobilità su carta e la sua capacità a formare un'ammina diazotabile.

L'idrolisi con acido cloridrico N (5 ore a 60°) si eseguiva pure su una soluzione concentrata del nucleoside; si faceva seguire la cromatografia su Dowex-50 nelle stesse condizioni descritte per l'idrolisi del nucleotide e si determinavano infine gli spettri u.v. a vari pH, la mo-

bilità su carta e la capacità a formare un'ammina diazotabile, dopo purificazione mediante cromatografia con il solvente n. 1.

6. IDENTIFICAZIONE DEL PENTOSIO DEL NUCLEOTIDE E DEL NUCLEOSIDE.

Il percolato ed i lavaggi della resina su cui si era versata la soluzione idrolizzata del nucleotide (v. paragrafo precedente) venivano liofilizzati ed il residuo ripreso con poca acqua si cromatografava in piccola quantità in parallelo ad un campione di ribosio-5-fosfato nei sistemi di solventi 2 e 6. Un'altra aliquota della soluzione si trattava con orcina e cloruro ferrico con le modalità impiegate per il dosaggio dei pentosi e si registrava lo spettro di assorbimento nel visibile della soluzione verde ottenuta, in parallelo ad un campione di acido adenosin-5'-monofosforico trattato nello stesso modo. Una terza aliquota si incubava con la 5'-nucleotidasi del liquido seminale di toro, con le stesse modalità riportate precedentemente per l'idrolisi del nucleotide a nucleoside, eccetto che il tempo di incubazione era di 14 ore; la miscela di reazione si cromatografava poi in parallelo a D-ribosio, L-arabinosio, D-xilosio e D-lixosio nei solventi 2, 6 e 7.

Il percolato ed i lavaggi, raccolti dalla resina su cui si era versata la soluzione del nucleoside idrolizzato (v. paragrafo precedente) si liofilizzavano, il residuo si riprendeva con poca acqua e si cromatografava in parallelo a D-ribosio, L-arabinosio, D-xilosio e D-lixosio con i solventi 2, 6 e 7. Una soluzione del nucleoside si trattava con orcina e cloruro ferrico (con le stesse modalità usate per il dosaggio dei pentosi) e si registrava lo spettro di assorbimento nel visibile della soluzione verde ottenuta, in parallelo a quella preparata da un campione di adenosina trattato analogamente.

7. DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA FURANOSIDICA DEL RIBOSIO.

Si è applicato il metodo di VISCONTINI, HOCH e KARRER (⁷), opportunamente modificato in microscala, che consiste nel riconoscimento cromatografico dei prodotti ottenuti da un riboside dopo ossidazione con periodato sodico, seguita da riduzione con boroidrurio sodico e da idrolisi acida. Dopo tali trattamenti i ribofuranosidi danno glicerina, mentre i ribopiranosidi danno etilenglicol. In pratica si è operato nel modo seguente: ad una soluzione di nucleoside (0,5 micromoli in 0,1 cm³ di

acqua) si aggiunge una soluzione di periodato sodico (4 micromoli in 0,1 cm³ di acqua); la miscela si mantiene per 16 ore al buio, si tratta poi con una soluzione acquosa di boroidruro sodico preparata al momento (0,6 mg in 0,1 cm³) e dopo 24 ore a temperatura ambiente si porta a secco a pressione ridotta a 30°; il residuo si riscalda 15' a 100° con 0,1 cm³ di acido cloridrico 0,5 N, dopo raffreddamento si porta quasi a secco sotto vuoto in essiccatore contenente idrato potassico ed infine si cromatografa su carta con il sistema di solventi n. 8, usando lo sviluppo discendente, che ci ha dato una migliore risoluzione di quello ascendente adottato da VISCONTINI, HOCH e KARRER (7).

La stessa serie di operazioni è stata eseguita in modo perfettamente uguale su un campione puro di adenosina (0,5 micromoli).

RISULTATI

A) IDENTITÀ DEGLI SPETTRI U. V. DEL NUCLEOSIDE E DEL NUCLEOTIDE.

La tabella 1 mostra che i massimi ed i minimi caratteristici del nucleoside e del nucleotide sono circa identici fra loro, indicando la

TABELLA 1

Dati spettrofotometrici del nucleoside e del nucleotide isolati dal *P. chrysogenum* e delle corrispondenti basi.

Composto	λ max			λ min		
	acido	neutro	alcalino	acido	neutro	alcalino
Nucleoside	267	268	269	235	232	234
Nucleotide	267	267	269	234	233	234
Base del nucleoside	276	269	274 ~ 282	235	235	243
Base del nucleotide	276	270	274 ~ 282	235	233	241

presenza dello stesso cromoforo nei due composti. Ciò è ulteriormente confermato dall'identità degli spettri delle basi ottenute da essi per idrolisi acida.

B) DIMOSTRAZIONE DELLA POSIZIONE DEL GRUPPO FOSFORICO NEL NUCLEOTIDE.

Come dimostra la tabella 2 la quantità del fosfato totale nel nucleotide corrisponde a quella liberata per azione della 5'-nucleotidasi del liquido seminale di toro (tabella 2); il nucleotide quindi è un 5'-fosfato. Nella tabella 2 sono anche riportati i risultati delle analisi di ribosio eseguite sul nucleoside e sul nucleotide.

TABELLA 2

Risultati delle analisi di ribosio, fosfato totale e fosfato inorganico liberato per azione della 5'-nucleotidasi del liquido seminale di toro, eseguite sul nucleoside e sul nucleotide isolati dal *P. chrysogenum*.

Composto	E ₂₇₆	α_M	Ribosio (moli per mole di base)			Fosfato totale (moli per mole di base)			Ortofosfato liberato dalla 5-nucleotidasi (moli per mole di base)		
			μg	trov.	calc.	μg	trov.	calc.	μg	trov.	calc.
Nucleotide	3.86	19.9×10^3	28.10	0.97	1.00	0	0	0	—	—	0
Nucleoside	5.30	19.9×10^3	40.00	1.00	1.00	8.10	0.98	1.00	7.50	0.91	1.00

C) IDENTITÀ DEL NUCLEOSIDE ISOLATO DAL « P. CHRYSOGENUM » CON QUELLO OTTENUTO MEDIANTE IDROLISI ENZIMATICA DEL NUCLEOTIDE.

Il confronto cromatografico del nucleoside isolato dalla muffa e di quello preparato dal nucleotide per azione della 5'-nucleotidasi del li-

TABELLA 3

Confronto fra le mobilità su carta del nucleoside isolato dal *P. chrysogenum* e del nucleoside ottenuto per idrolisi enzimatica del nucleotide.

Composto	Solvente 1 R _F	Solvente 2 R _{Adenosina} (*)	Solvente 3 R _F	Solvente 4 R _F	Solvente 5 R _F
Nucleoside del <i>P. chrysogenum</i>	0.52	1.06	0.52	0.45	0.81
Nucleoside preparato per idrolisi enzimatica del nucleotide del <i>P. chrysogenum</i>	0.51	1.07	0.52	0.46	0.80

(*) Mobilità relative all'adenosina.

quido seminale di toro dimostra che i due composti sono identici (tabella 3).

D) IDENTITÀ DELLA BASE PREPARATA DAL NUCLEOSIDE E DAL NUCLEOTIDE CON LA 6-(1,2-DICARBOSSIETILAMMINO)PURINA.

I dati spettrofotometrici indicavano che la base era un'adenina monosostituita nel gruppo amminico. La natura purinica di questa base era anche indicata dalla relativa facilità con cui essa veniva liberata per idrolisi acida dai due composti naturali.

Il fatto che il nucleoside era eluito da una resina anionica mediante acido formico di concentrazione superiore a quella necessaria per l'eluizione dell'acido adenosin-5'-monofosforico ed appena inferiore a quella necessaria per l'eluizione dell'acido guanosin-5'-monofosforico ⁽³⁾, dimostrava che nella molecola doveva essere presente un sostituito di natura acida.

Queste considerazioni, assieme ai dati riportati in una breve nota di CARTER e COHEN sulla sintesi enzimatica dell'acido adenilosuccinico ⁽⁸⁾ apparsa mentre il nostro lavoro era in corso, ci indussero a confrontare le proprietà della base purinica ottenuta per idrolisi acida dai due composti naturali con quelle della 6-(1-carbossietilammino)purina, della 6-(2-carbossietilammino)purina, della 6-(1,2-dicarbossietilammino)purina

TABELLA 4

Confronto fra le mobilità su carta delle basi puriniche ottenute per idrolisi del nucleoside e del nucleotide isolati dal *P. chrysogenum* e di alcune purine 6-amminosostituite sintetiche

Composto	Solvente 1 R _F	Solvente 2 R _{Adenosina} (*)	Solvente 3 R _F	Solvente 4 R _F	Solvente 5 R _F
Base del nucleoside del <i>P. chrysogenum</i>	0.44	1.01	0.61	0.35	0.74
Base del nucleotide del <i>P. chrysogenum</i>	0.44	1.02	0.60	0.34	0.73
6-(1,2-dicarbossietilammino)purina . .	0.44	1.01	0.61	0.36	0.74
6-(1,3-dicarbossipropilammino)purina .	0.48	1.04	0.67	0.43	0.73
6-(1-carbossietilammino)purina . . .	0.64	1.27	0.84	0.58	0.65
6-(2-carbossietilammino)purina . . .	0.60	1.10	0.79	0.62	0.59

(*) Mobilità relative all'adenosina.

e della 6-(1,3-dicarbossipropilammino)purina, che furono preparate per condensazione della 6-cloropurina rispettivamente con l' α -alanina, la β -alanina, l'acido aspartico e l'acido glutammico (*). Tutti questi composti davano una reazione positiva per le ammine diazotabili dopo trattamento energico con acido, esattamente come la base preparata dal nucleoside e dal nucleotide. Come mostra la tabella 4 la mobilità su carta della base liberata per idrolisi acida sia dal nucleoside che dal nucleotide corrispondeva in cinque solventi con quella della 6-(1,2-dicarbossietilammino)purina sintetica.

E) IDENTIFICAZIONE DELL'IDRATO DI CARBONIO NEL NUCLEOSIDE E NEL NUCLEOTIDE.

La tabella 5 dimostra che sia il nucleoside che l'estere fosforico dello zucchero ottenuto per idrolisi del nucleotide davano gli spettri caratteristici dei pentosi dopo reazione con orcina e cloruro ferrico. Inoltre il pentosio-fosfato preparato dal nucleotide per idrolisi acida aveva una mobilità su carta identica a quella del ribosio-5-fosfato ed il confronto

TABELLA 5

Identificazione del pentosio del nucleoside e del nucleotide isolati dal *P. chrysogenum*.

Composto	Cromatografie			Reazione con orcina e FeCl ₃ λ max (m μ)
	Solvente 2 Ribosio(*)	Solvente 6 Ribosio(*)	Solvente 7 Ribosio(*)	
Nucleoside				433 662
Pentosio del nucleoside (idrolisi acida) . . .	1.00	0.98	1.01	
Pentosio-fosfato del nucleotide (idrolisi acida) .	0.83	0.00		431 662
Pentosio dal pentosio-fosfato del nucleotide (idrolisi enzimatica)	1.01	1.00	1.00	
Adenosina				432.662
D-Ribosio-5-fosfato	0.82	0.00		433,662
D-Ribosio	1.00	1.00	1.00	
L-Arabinosio	0.94	0.81	0.78	
D-Lixosio	0.96	0.90	0.89	
D-Xilosio	0.96	0.87	0.82	

(*) Mobilità relative al ribosio.

cromatografico del pentosio, ottenuto per via enzimatica dall'estere fosforico corrispondente, con i quattro aldopentosi dimostrava l'identità con il ribosio.

Analogamente era evidente l'identità del pentosio ottenuto per idrolisi acida del nucleoside con il ribosio.

F) STRUTTURA FURANOSIDICA DELLA PARTE RIBOSIDICA.

La tabella 6 dimostra che la degradazione con il metodo di VISCONTINI, HOCH e KARRER ⁽⁷⁾ sia del nucleoside che dell'adenosina (usata per controllo) conduce alla formazione di glicerina, che rappresenta appunto il prodotto che si deve ottenere per degradazione di un ribofuranoside.

TABELLA 6

Dimostrazione con il metodo di Viscontini, Hoch e Karrer della struttura furanosidica del nucleoside isolato dal *P. chrysogenum*.

Composto	Cromatografia nel solvente 8 R _F
Nucleoside degradato	0.42
Adenosina degradata	0.41
Glicerina	0.43
Etilenglicol	0.57

G) IDENTITÀ DEL NUCLEOTIDE CON L'ACIDO ADENILOSUCCINICO.

Il confronto degli spettri u. v. del nucleoside e del nucleotide con quelli delle 6-metilamminopurine 7- e 9-metilsostituite ^(10, 11) rendeva altamente probabile che la base fosse unita al ribosio mediante l'azoto in 9.

La prova definitiva della struttura del nucleoside e del nucleotide si aveva dal confronto cromatografico in cinque diversi solventi: a) del nucleotide isolato dal *P. chrysogenum* con un campione di acido adenilosuccinico preparato enzimaticamente e gentilmente inviato dal Dr. C. E. CARTER; b) del nucleoside isolato dal *P. chrysogenum* con quello ottenuto per azione della 5'-nucleotidasi del liquido seminale di toro sullo stesso campione dell'acido adenilosuccinico; c) delle basi preparate

TABELLA 7

Confronto fra le mobilità su carta del nucleotide isolato dal *P. chrysogenum* e di alcuni suoi prodotti di degradazione e quelle dell'acido adenilosuccinico e dei corrispondenti prodotti di degradazione.

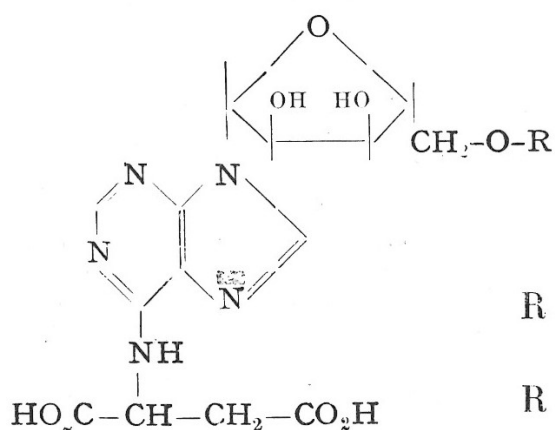
Composto	Solvente 1 R _F	Solvente 2 R _{Adenosina} (*)	Solvente 3 R _F	Solvente 4 R _F	Solvente 5 R _F
1) Nucleotide del <i>P. chrysogenum</i>	0.34	0.80	0.26	0.16	0.86
2) Acido adenilosuccinico	0.33	0.80	0.27	0.15	0.86
3) Nucleoside del <i>P. chrysogenum</i>	0.52	1.06	0.52	0.45	0.81
4) N. 2 dopo idrolisi enzimatica	0.52	1.06	0.53	0.48	0.80
5) N. 1 dopo idrolisi acida	0.45	1.02	0.60	0.34	0.73
6) N. 2 dopo idrolisi acida	0.45	1.01	0.60	0.34	0.74
7) 6-(1,2-dicarbossietilammino)purina sintetica .	0.45	1.01	0.61	0.36	0.74

(*) Mobilità relative all'adenosina.

dal nucleoside e dal nucleotide con la 6-(1,2-dicarbossietilammino)purina sintetica. I risultati sono raccolti nella tabella 7, che indica chiaramente l'identità del nucleotide isolato dalla muffa con quello preparato per via enzimatica da CARTER.

DISCUSSIONE

I dati raccolti in questo lavoro permettono di concludere che il nucleoside ed il nucleotide in esame sono rispettivamente il 9-D-ribofuranoside della 6-(1,2-dicarbossietilammino)purina, o acido adenosinosuccinico, e il 5'-monofosfato corrispondente, o acido adenilosuccinico. Le loro formule sono



R = H = Acido adenosinosuccinico

R = PO₃H₂ = Acido adenilosuccinico

Sulla base dei risultati finora ottenuti non si può decidere se i composti abbiano la configurazione α o β , ma è molto probabile, per analogia con la maggior parte dei nucleosidi e nucleotidi riscontrati in natura e per la correlazione metabolica con l'acido inosin-5'-monofosforico e con l'acido adenosin-5'-monofosforico, che essi siano gli anomeri β .

Prima della sua identificazione nel *P. chrysogenum* l'acido adenosinosuccinico non era stato mai riscontrato in natura; successivamente alla nostra nota preliminare ⁽¹⁾ WHITFELD ha riportato la sua comparsa, accanto alla base corrispondente, in un mutante di *Neurospora crassa* che richiede per lo sviluppo l'adenina ⁽¹²⁾.

L'acido adenilosuccinico, antecedentemente alla nostra nota preliminare sul suo isolamento dal *P. chrysogenum* ⁽¹⁾, era stato ottenuto per via enzimatica da CARTER e COHEN ⁽⁸⁾ e da LIEBERMAN ⁽¹³⁾; i primi lo avevano preparato dall'acido adenosin-5'-monofosforico e acido fumarico mediante una frazione purificata di un autolisato di lievito ^(5, 8); il secondo invece dell'acido inosin-5'-monofosforico e acido aspartico mediante un estratto purificato di *Escherichia coli* ^(13, 14). La sua presenza in natura è stata dimostrata, indipendentemente da noi, da Joklik che lo ha isolato dal fegato di topo e di coniglio ^(15, 16). La funzione biologica dell'acido adenilosuccinico è molto probabilmente quella di intermedio nella trasformazione dell'acido inosin-5'-monofosforico ad acido adenosin-5'-monofosforico, come è indicato dai lavori di CARTER e COHEN ^(5, 8), di ABRAMS e BENTLEY ⁽¹⁷⁾ e di LIEBERMAN ^(13, 14). Essa è resa manifesta anche dagli studi di WHITFELD ⁽¹²⁾ e di PARTRIDGE e GILES ^(18, 19), i quali hanno dimostrato che in vari ceppi mutanti di *Neurospora crassa* che richiedono per lo sviluppo adenina, ma che sono incapaci di crescere in presenza di ipoxantina, si accumula la 6-(1,2-dicarbossietilammino)purina, cioè la base dell'acido adenilosuccinico; in questi ceppi l'enzima adenilosuccinasi, che catalizza la trasformazione dell'acido adenilosuccinico in acido adenosin-5'-monofosforico, è assente o ha attività fortemente ridotta.

L'isolamento dal fegato di salmone di alcuni derivati dell'acido adenilosuccinico che per idrolisi blanda liberano acido solforico e amminoacidi, sembra suggerire qualche nuova funzione metabolica del composto ⁽²⁰⁾.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Nature* 179: 154 (1957).
 - (²) BALLIO A., CASINOVİ C. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Biochim. biophys. Acta*, 20: 444 (1956).
 - (³) BALLIO A., CASINOVİ C. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Rend. Ist. sup. Sanità*, 24: 299 (1961).
 - (⁴) CHAMBERLAIN N. e RAINBOW C. - *J. gen. Microbiol.*, 11: 180 (1954).
 - (⁵) CARTER C. E. e COHEN L. H. - *J. biol. Chem.*, 222: 17 (1956).
 - (⁶) CARTER C. E. - *J. am. chem. Soc.*, 72: 1466 (1950).
 - (⁷) VISCONTINI M., HOCH D. e KARRER P. - *Helv. chim. Acta*, 38: 642 (1955).
 - (⁸) CARTER C. E. e COHEN L. H. - *J. am. chem. Soc.*, 77: 499 (1955).
 - (⁹) BALLIO A. e DI VITTORIO V. - *Gazz. chim. ital.*, 90: 501 (1960).
 - (¹⁰) PRASAD R. N. e ROBINS R. K. - *J. am. chem. Soc.*, 79: 641 (1957).
 - (¹¹) ROBINSON R. K. e LIN H. H. - *J. am. chem. Soc.*, 79: 490 (1957).
 - (¹²) WHITFIELD P. R. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 65: 585 (1956).
 - (¹³) LIEBERMAN I. - *J. am. chem. Soc.*, 78: 251 (1956).
 - (¹⁴) LIEBERMAN I. - *J. biol. Chem.*, 223: 327 (1956).
 - (¹⁵) JOKLIK W. K. - *Biochim. biophys. Acta*, 22: 241 (1956).
 - (¹⁶) JOKLIK W. K. - *Biochem. J.*, 66: 333 (1957).
 - (¹⁷) ABRAMS R. e BENTLEY M. - *J. am. chem. Soc.*, 77: 4179 (1955).
 - (¹⁸) PARTRIDGE C. W. H. e GILES N. H. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 67: 237 (1957).
 - (¹⁹) GILES N. H., PARTRIDGE C. W. H. e NELSON N. J. - *Proc. nat. Acad. Sci.*, 43: 305 (1957).
 - (²⁰) TSUYUKI H. e IDLER D. R. - *J. am. chem. Soc.*, 79: 1774 (1957); *Canad. J. Biochem.*, 36: 465 (1958).
-