

30. G. SERLUPI-CRESCENZI e A. BALLIO. — Nucleotidi di microrganismi.
Nota III. La struttura di un nuovo piridin-nucleotide isolato
da *Penicillium chrysogenum* Thom. (*)

Riassunto. — Viene dimostrato che un nuovo piridin-nucleotide presente nel micelio del *Penicillium chrysogenum* è il desammido-difosfopiridin-nucleotide, cioè l'analogo del difosfopiridin-nucleotide in cui l'acido nicotinico sostituisce la nicotinammide.

Summary. — It is demonstrated that a new pyridine nucleotide present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum* is desamido-diphosphopyridine nucleotide, i.e. the analogue of diphosphopyridine nucleotide in which nicotinic acid has replaced nicotinamide.

Lo studio dei nucleotidi acido-solubili del micelio del *Penicillium chrysogenum* aveva condotto all'identificazione di vari derivati dell'adenosina, della guanosina, della citidina e dell'uridina, ed aveva dimostrato la presenza di alcuni composti la cui struttura non era riconducibile a nessun nucleotide noto (³, ⁴). Fra questi ultimi uno aveva uno spettro di assorbimento nell'ultravioletto tipico per un derivato adenosinico e dava luogo, dopo reazione con cianuro di potassio, ad un massimo di assorbimento a 315 m μ circa. Questo comportamento, tipico dei composti di piridinio, faceva pensare che il prodotto fosse un piridin-nucleotide, ma di tipo nuovo in quanto per altre proprietà si distingueva chiaramente sia dal difosfopiridin-nucleotide che dal trifosfopiridin-nucleotide. Esso infatti era incapace di fungere da coenzima tanto nell'ossidazione dell'alcool etilico con l'alcool-deidrogenasi, quanto in quella del glucosio-6-fosfato con la glucosio-6-fosfato-deidrogenasi; inoltre era eluito mediante acido formico da una colonna di resina scambiatrice di anioni dopo il difosfopiridin-nucleotide e prima del trifosfopiridin-nucleotide.

Questo lavoro descrive l'identificazione di questo composto come desammido-difosfopiridin-nucleotide, cioè dell'analogo del difosfopiridin-nucleotide in cui la nicotinammide è sostituita dall'acido nicotinico.

(*) Sullo stesso argomento sono state pubblicate due note preliminari (¹, ²). Il lavoro, completato nell'ottobre 1958, è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 280 (1959).

MATERIALI E METODI

1. REATTIVI E PRODOTTI. — Quando non indicato altrimenti questi erano gli stessi usati nei due precedenti lavori (⁴, ⁵). L'adenosindifosforibosio veniva preparato incubando il difosfopiridin-nucleotide con la difosfopiridin-nucleotidasi della milza di bue (⁶) ed era purificato mediante cromatografia di scambio ionico, nelle stesse condizioni usate in un precedente lavoro per il frazionamento dei composti ottenuti per azione dell'enzima della milza di bue su una miscela di acido nicotinico e difosfopiridin-nucleotide (⁷). Il nucleotide dava risultati esatti alle analisi per fosfato, ribosio e base. Dettagli sulla preparazione della difosfopiridin-nucleotidasi della milza di bue sono stati descritti in un precedente lavoro (⁷). La nicotinammide era un prodotto Hoffman-La Roche (Svizzera).

2. METODI ANALITICI.

a) *Chimici*. — Il fosforo totale ed il ribosio venivano dosati con i metodi precedentemente descritti (⁴). L'acido nicotinico era determinato con il metodo di BANDIER e HALD (⁸) dopo idrolisi del nucleotide con idrato di potassio 2 N (1 ora a 100°).

I risultati delle analisi erano calcolati usando lo stesso coefficiente molare di assorbimento (α_M) del difosfopiridin-nucleotide a pH 7 (⁹).

b) *Spettrofotometrici*. — Gli spettri di assorbimento u. v. sono stati registrati con lo spettrofotometro Cary Mod. 11 sia in soluzione acquosa a pH 7, sia in soluzione idroalcoolica di cianuro di potassio. In quest'ultimo caso 0,1 micromoli circa di composto disciolto in 0,2 cm³ di acqua si portavano a 2 cm³ con cianuro di potassio M in alcool etilico al 50%.

c) *Cromatografici*. — Si sono usati carta Whatman 1 lavata con acido acetico 2 N e poi con acqua, ed i seguenti sistemi di solventi:

N. 1: Acetato ammonico M, pH 3,8 - alcool etilico (30:75);

N. 2: Acetato ammonico M, pH 7,5 - alcool etilico (30:75);

N. 3: Acido isobutirrico - ammonica N (100:60);

N. 4: Alcool propilico normale (20 cm³) - tampone di fosfati 0,1 M, pH 6,8 (1000 cm³) - solfato ammonico (600 g);

N. 5: Alcool propilico normale - acqua (60:40).

Si è usato lo sviluppo discendente, tranne che per il solvente 4, impiegato con sviluppo ascendente.

Le posizioni dei vari prodotti sui cromatogrammi era stabilita con i metodi ed i rivelatori descritti in un precedente lavoro (4).

d) *Elettroforetici*. — Si è usato un apparecchio analogo a quello descritto da MARKHAM e SMITH (10), con carta Whatman 1, un tampone di acetato ammonico 0,1 M a pH 5 ed un gradiente di potenziale di 25 V/cm.

3. IDROLISI.

L'idrolisi acida del nucleotide veniva eseguita nelle condizioni descritte in un lavoro precedente per l'idrolisi del desammido-difosfopiridin-nucleotide preparato per sintesi enzimatica (7), eccetto che il composto veniva riscaldato a 100° con acido cloridrico 0,1 N per 2,5 ore.

L'idrolisi enzimatica del nucleotide veniva eseguita con la difosfopiridin-nucleotidasi di milza bovina nelle identiche condizioni descritte in un lavoro precedente per l'idrolisi del desammido-difosfopiridin-nucleotide preparato per sintesi enzimatica (7).

4. ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE DEL NUOVO COMPOSTO.

Il nucleotide era ottenuto da estratti perclorici o idroalcoolici di micelio di *Penicillium chrysogenum* secondo le modalità descritte nella Nota I (4). La cromatografia di scambio ionico era eseguita con le modificazioni riportate nella Nota II (5), che permettevano una separazione molto soddisfacente del desammido-difosfopiridin-nucleotide dal riboside della 6-succinoaminopurina (acido adenosinosuccinico). Nel diagramma di eluizione dalla resina scambiatrice di anioni il nuovo piridin-nucleotide seguiva immediatamente l'adenosin-5'-monofosfato e precedeva l'acido adenosinosuccinico.

Il composto era purificato mediante cromatografia su carta, come è stato descritto per il desammido-difosfopiridin-nucleotide preparato per sintesi enzimatica (7). La soluzione acquosa ottenuta dopo eluizione dalla carta veniva conservata congelata a -20°. Si ottenevano circa 0,3 micromoli di prodotto per grammo di micelio secco.

RISULTATI

A) SPETTRI DI ASSORBIMENTO NELL'ULTRAVIOLETTO.

Nella figura 1 sono paragonati gli spettri ultravioletti del difosfopiridin-nucleotide e del nuovo composto. Dati più dettagliati sono riportati nella tabella 1 (*). E' evidente che lo spettro del nuovo composto è assai simile a quello del difosfopiridin-nucleotide, sia in presenza che

TABELLA 1

Confronto fra i dati spettrofotometrici del desammido-difosfopiridin-nucleotide isolato dal *P. chrysogenum* con quelli del difosfopiridin-nucleotide.

	Desammido-difosfopiridin-nucleotide	Difosfopiridin-nucleotide (*)
In soluzione acquosa a pH 7:		
massimo (m_{μ})	258	259
minimo (m_{μ})	230	231
E max: E min	2.19	2.22
$E_{250} : E_{260}$	0.86	0.83
$E_{270} : E_{260}$	0.74	0.72
$E_{280} : E_{260}$	0.28	0.22
$\alpha_m \times 10^{-3}$ a 258μ	18.75 (**)	18.00 (****)
	17.15 (***)	
In presenza di KCN alcoolico:		
massimo del 1° picco (m_{μ})	260	260
massimo del 2° picco (m_{μ})	316	327
minimo (m_{μ})	289	289
E max del 1° picco: E min	6.4	7.6
E max del 1° picco: E max del 2° picco	3.4	2.5
$E_{250} : E_{260}$	0.75	0.85
$E_{270} : E_{260}$	0.75	0.74
$E_{280} : E_{260}$	0.30	0.27

(*) Questi dati sono ricavati dagli spettri riportati in Pabst Laboratories Circular OR-10 (1956).

(**) Ricavato dall'analisi di ribosio.

(***) Ricavato dall'analisi di fosforo.

(****) Da KORNBERG e HORECKER (9).

(*) Questi dati sono in buon accordo con quelli riportati da LAMBORG e coll. in un lavoro (11) apparso dopo la pubblicazione delle nostre osservazioni preliminari sul desammido-difosfopiridin-nucleotide (1, 2).

in assenza di cianuro. Però il massimo che appare dopo l'aggiunta del cianuro al nuovo composto è più appiattito e spostato verso le basse lunghezze d'onda. Inoltre la velocità di reazione del cianuro col nuovo composto (determinata seguendo lo sviluppo del massimo a 316 mμ) è più lenta che con il difosfopiridin-nucleotide. Gli spettri ultravioletti indicavano che il nuovo composto era con probabilità un derivato di piridinio.

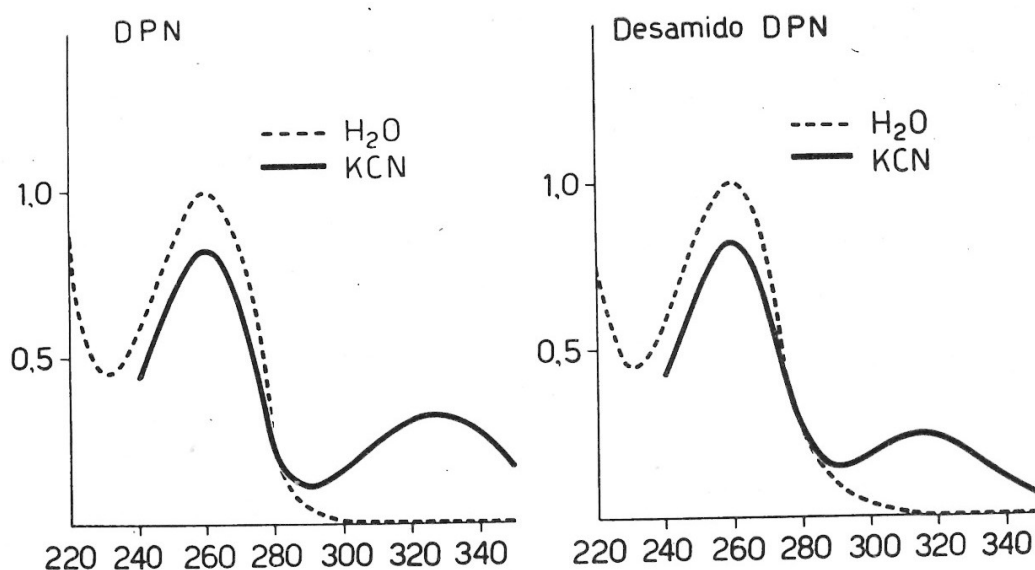


Fig. 1. Spettri d'assorbimento nell'ultravioletto del DPN e del desammido-DPN.

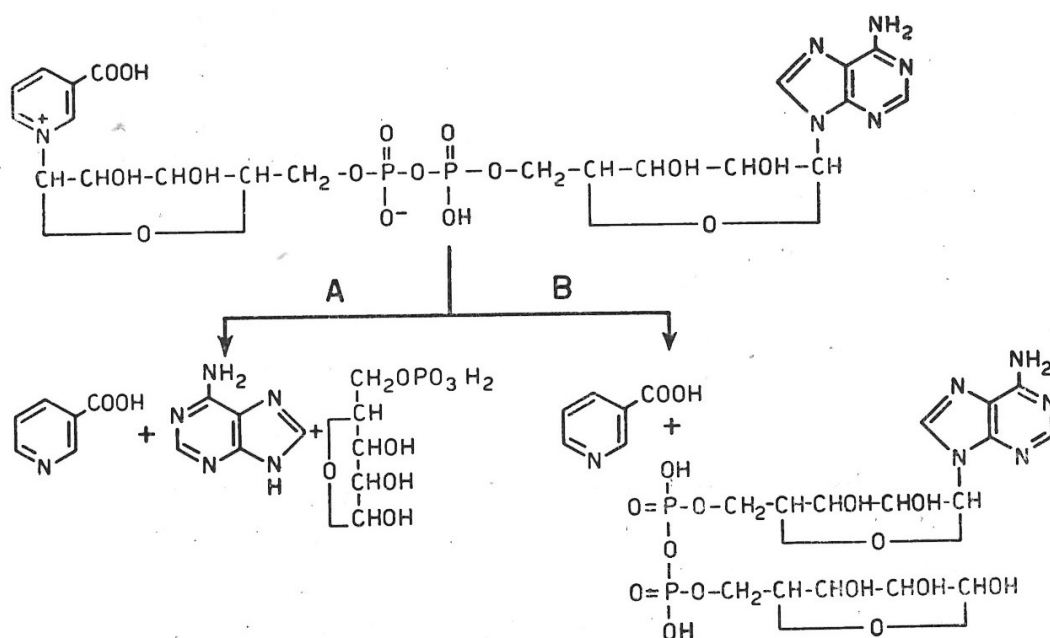


Fig. 2. - Idrolisi del desammido-difosfopiridin-nucleotide:
A) con acidi; B) con difosfopiridin-nucleotidasi.

B) CROMATOGRAFIA ED ELETTROFORESI SU CARTA.

Come mostrato nella tabella 2, il nuovo composto può essere differenziato facilmente sia dal difosfopiridin-nucleotide che dal trifosfopiridin-nucleotide. All'elettroforesi mostra una carica negativa maggiore del difosfopiridin-nucleotide.

C) PRODOTTI DI IDROLISI.

L'idrolisi acida del nuovo composto liberava acido nicotinico in condizioni in cui il difosfopiridin-nucleotide dava nicotinammide.

L'idrolisi enzimatica del nuovo composto con la difosfopiridin-nucleotidasi della milza di bue dava di nuovo acido nicotinico e adenosindifosforibosio, mentre il difosfopiridin-nucleotide dava in queste condizioni nicotinammide e adenosindifosforibosio.

TABELLA 2

Mobilità su carta del desammido-difosfopiridin-nucleotide isolato dal *P. chrysogenum*, del difosfopiridin-nucleotide e del trifosfopiridin-nucleotide.

	Cromatografie				Elettroforesi
	Solvente n. 2 $R_{\text{adenosina}}$ (*)	Solvente n. 3 R_F	Solvente n. 4 R_F	Solvente n. 5 R_F	Mobilità relative al difosfo- piridin- nucleotide
Desammido-difosfopiridin-nucleotide	0.24	0.33	0.28	0.41	1.60
Difosfopiridin-nucleotide	0.26	0.47	0.29	0.40	1.00
Trifosfopiridin-nucleotide	0.05	0.32	0.45	0.35	—

(*) Mobilità relative all'adenosina.

L'identificazione cromatografica di questi prodotti di demolizione è mostrata nelle tabelle 3 e 4. La figura 2 mostra schematicamente l'andamento delle degradazioni.

L'analisi del nuovo composto rispetto al ribosio, fosforo totale e acido nicotinico dimostrava che questi sono presenti approssimativamente nei rapporti molari 2:2:1 (tabella 5).

TABELLA 3

Cromatografia su carta dei prodotti dell'idrolisi acida del desammido-difosfopiridin-nucleotide isolato dal *P. chrysogenum* e del difosfopiridin-nucleotide.

Composti	R _{adenosina} (*) con il solvente n. 2			
Desammido-difosfopiridin-nucleotide	0.26			
Idem dopo idrolisi acida		0.62	1.05	1.27
Difosfopiridin-nucleotide	0.32			
Idem dopo idrolisi acida		0.63	1.05	1.35
Ribosio-5-fosfato		0.62		
Adenina			1.04	
Acido nicotinico				1.26
Nicotinammide				1.34

(*) Mobilità relative all'adenosina.

TABELLA 4

Cromatografia su carta dei prodotti dell'idrolisi enzimatica del desammido-difosfopiridin-nucleotide isolato dal *P. chrysogenum* e del difosfopiridin-nucleotide.

Composii	R _{adenosina} (*) con il solvente n. 2			R _{adenosina} (*) con il solvente n. 3		
Desammido-difosfopiridin-nucleotide	0.24			0.44		
Idem dopo idrolisi enzimatica		0.41	1.27		0.45	0.95
Difosfopiridin-nucleotide	0.26			0.64		
Idem dopo idrolisi enzimatica		0.39	1.33		0.45	1.04
Adenosindifosforibosio		0.41			0.45	
Acido nicotinico			1.25			0.95
Nicotinammide			1.35			1.01

(*) Mobilità relative all'adenosina.

TABELLA 5

Rapporti molari del ribosio, fosforo totale e acido nicotinico rispetto alla base, nel desammido-difosfopiridin-nucleotide isolato dal *P. chrysogenum*.

	E ₂₅₈	α_M	Ribosio			Fosforo totale			Acido nicotinico		
			μg	moli per moli di adenina		μg	moli per moli di adenina		μg	moli per moli di adenina	
				trov.	calc.		trov.	calc.		trov.	calc.
Desammido-difosfopiridin-nucleotide	1 65	18 · 10 ³	26 4	1 92	2 00	5 95	2 09	2 00	9 6	0.85	1 00

DISCUSSIONE

Tutti i risultati ottenuti indicano chiaramente che il nuovo nucleotide isolato dal *Penicillium chrysogenum* è il desammidodifosfopiridin-nucleotide. La sua identità col desammido-difosfopiridin-nucleotide preparato enzimaticamente ⁽⁷⁾ non lascia dubbi sulla sua struttura. Lo stesso composto è stato recentemente preparato da LAMBORG e collaboratori ⁽¹¹⁾. L'isolamento di questo nuovo piridin-nucleotide da un organismo vivente solleva la questione della sua funzione metabolica.

Sembra ora assai probabile che questo composto rappresenti l'immediato precursore del difosfopiridin-nucleotide negli eritrociti umani, nel fegato di ratto e nel lievito. Esso è stato infatti isolato da eritrociti umani incubati con acido nicotinico ^(12, 13), e gli enzimi che catalizzano la sua sintesi dall'acido nicotinico, attraverso la formazione intermedia del ribotide corrispondente, sono stati ottenuti da questo tessuto, come pure dal fegato di ratto e dal lievito. Infine è stato purificato da un autolisato di lievito l'enzima che trasforma il desammido-difosfopiridin-nucleotide in difosfopiridin-nucleotide (DPN-sintetasi) ⁽¹⁴⁾. La presenza del composto non solo nel *Penicillium chrysogenum*, ma anche in un *Fusarium*, dove è accompagnato dall'acido nicotinico e dal suo ribotide ⁽¹⁵⁾, sembra indicare che lo stesso processo metabolico abbia luogo anche nelle muffe.

Le notizie relative alla capacità che ha il desammido-difosfopiridin-nucleotide di servire da substrato in reazioni enzimatiche sono ancora piuttosto incomplete. A parte la ammidazione a difosfopiridin-nucleotide, testè ricordata, esso è risultato incapace di funzionare da accettore di elettroni con la alcool-deidrogenasi del lievito ^(3, 11), con la glucosio-6-fosfato-deidrogenasi del lievito ⁽³⁾, con la glicerolo deidrogenasi di *Aerobacter aerogenes* ⁽¹⁴⁾ e con la lattico deidrogenasi di *Leuconostoc mesenteroides* ⁽¹¹⁾. Esso non è scisso dalla difosfopiridin-nucleotidasi del cervello di maiale ^(7, 11), nè da quella di *Neurospora crassa* ⁽¹¹⁾, mentre è degradato, come è stato detto in precedenza, da quella della milza bovina. Recentemente abbiamo osservato che la pirofosfatasi di patata scinde con ottima resa il desammido-difosfopiridin-nucleotide in adenosin-5'-monofosfato e 5'-ribotide dell'acido nicotinico ⁽¹⁶⁾.

Le proprietà spettrofotometriche del desammido-difosfopiridin-nucleotide meritano qualche commento. La sostituzione del gruppo ammidico del difosfopiridin-nucleotide con un gruppo carbossilico determina una minore reagibilità col cianuro di potassio. Infatti la velocità di reazione con una soluzione acquosa di cianuro di potassio è bassa, mentre

è quasi istantanea con una soluzione contenente il 45% di alcool etilico o, come hanno osservato LAMBORG e coll. ⁽¹⁷⁾, se si usa alcool metilico. Questo comportamento corrisponde a quello di due modelli semplificati: la 1-metil-nicotinammide e l'acido 1-metil-nicotinico (trigonellina) che sono strutturalmente correlati rispettivamente con il difosfopiridin-nucleotide e con il desammido-difosfopiridin-nucleotide. Solo il primo di questi due modelli reagisce con cianuro di potassio in soluzione acquosa, mentre ambedue danno rapidamente il composto di addizione con una soluzione alcoolica di cianuro di potassio ⁽¹⁷⁾. Anche nella reazione di addizione con alcali concentrati ⁽¹⁸⁾ il difosfopiridin-nucleotide si comporta differentemente dall'analogo nicotinico. Uno studio dettagliato di questa reazione ha infatti mostrato che nel caso del difosfopiridin-nucleotide si forma un composto che è caratterizzato da un massimo di assorbimento a 335 m μ e che è fluorescente. Nel caso del desammido-difosfopiridin-nucleotide si ottiene anche un composto di addizione, ma questo ha un massimo a 365 m μ e non è fluorescente ⁽¹⁹⁾.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internazionale di Chimica Microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- ⁽¹⁾ SERLUPI-CRESCENZI G. e BALLIO A. - *Nature*, 180: 1203 (1957).
- ⁽²⁾ BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 33: 1744 (1957).
- ⁽³⁾ BALLIO A., CASINOVİ C. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Biochim. biophys. Acta*, 20: 444 (1956).
- ⁽⁴⁾ BALLIO A., CASINOVİ C. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Rend. Ist. sup. Sanità*, 24: 299 (1961).
- ⁽⁵⁾ BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Rend. Ist. sup. Sanità*, 24: 321 (1961).
- ⁽⁶⁾ ZATMAN L. J., KAPLAN N. O. e COLOWICK S. P. - *J. biol. Chem.*, 200: 197 (1953).
- ⁽⁷⁾ SERLUPI-CRESCENZI G. e BALLIO A. - *Gazz. chim. ital.*, 88: 320 (1958).
- ⁽⁸⁾ UMBREIT W. W., BURRIS R. H. e STAUFFER J. F. - *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis p. 192 (1949).
- ⁽⁹⁾ KORNBERG A. e HORECKER B. - *Biochem. Prep.*, 3: 23 (1953).
- ⁽¹⁰⁾ MARKHAM R. e SMITH J. D. - *Biochem. J.*, 52: 552 (1952).
- ⁽¹¹⁾ LAMBORG M., STOLZENBACH F. E. e KAPLAN N. O. - *J. biol. Chem.*, 231: 685 (1958).
- ⁽¹²⁾ BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Atti Accad. naz. Lincei, Rend.*, (8), 23: 275 (1957).
- ⁽¹³⁾ PREISS J. e HANDLER P. - *J. am. chem. Soc.*, 79: 4246 (1957).
- ⁽¹⁴⁾ HANDLER P. - 4th International Congress of Biochemistry, Vienna 1958.
- ⁽¹⁵⁾ BALLIO A., RUSSI S., SERLUPI-CRESCENZI G. e TONOLO A. - In preparazione.
- ⁽¹⁶⁾ BALLIO A. e RUSSI S. - Risultati non pubblicati.
- ⁽¹⁷⁾ LAMBORG M. R., BURTON R. M. e KAPLAN N. O. - *J. am. chem. Soc.*, 79: 6173 (1957).
- ⁽¹⁸⁾ KAPLAN N. O., COLOWICK S. P. e BARNES C. C. - *J. biol. Chem.*, 191: 461 (1951).
- ⁽¹⁹⁾ SERLUPI-CRESCENZI G. - *Rend. Ist. sup. Sanità*, in corso di stampa.