

16. Giovanni SERLUPI-CRESCENZI. — Studi spettrofotometrici sul desammido-difosfopiridin-nucleotide e su alcuni composti ad esso correlati. (*)

Riassunto. — Sono state studiate alcune reazioni del desammido-DPN che danno origine a composti con spettri di assorbimento caratteristici nell'ultravioletto. Viene paragonato il comportamento del desammido-DNP con quello del DPN e di altri composti piridinici ad essi correlati.

Summary. — Some reactions of desamido-DPN have been studied which give rise to compounds having characteristic ultra-violet absorption spectra. The behaviour of desamido-DPN is compared with that of DPN and other related pyridinic compounds.

Nel corso di ricerche sui nucleotidi acido-solubili del *Penicillium chrysogenum* ⁽¹⁾ era stato isolato un composto identificato successivamente ⁽²⁾ come desammido-DPN (**), cioè come l'analogo del DPN contenente nella molecola l'acido nicotinico al posto della nicotinammide. Lo stesso prodotto è stato in seguito ritrovato in *Fusarium sp.* ⁽³⁾ e ne è stato dimostrato il ruolo di intermedio, nella biosintesi del DPN a partire da acido nicotinico negli eritrociti umani ^(4, 5). PREISS e HANDLER ⁽⁵⁾ hanno inoltre dimostrato la presenza, nel lievito, di un enzima capace di trasformare il desammido-DPN in DPN.

Dato il crescente interesse biochimico di questo composto si è ritenuto opportuno studiare il suo comportamento con alcuni reattivi che nel caso del DPN sono capaci di dare prodotti di addizione caratterizzati da elevata fluorescenza e da massimi di assorbimento facilmente riconoscibili nell'ultravioletto.

E' la scuola di Kaplan che ha dato i maggiori contributi in questo campo, con lo studio dettagliato delle reazioni del DPN con vari composti carbonilici ⁽⁶⁾, con bisolfito ⁽⁷⁾ e con alcali concentrati ⁽⁸⁾.

Dallo studio di tali composti e delle loro reazioni con alcune deidrogenasi è stato possibile chiarire taluni aspetti del meccanismo con cui i piridin-nucleotidi trasportano gli elettroni nei processi biologici di ossido-riduzione. E' stato così dimostrato che tutte le reazioni di addi-

(*) Lavoro presentato all'8° Congresso Nazionale di Chimica - Torino, 26 maggio-2 giugno 1958.

(**) Le seguenti abbreviazioni sono state usate: DPN = difosfopiridin-nucleotide; desammido-DPN = desammido-difosfopiridin-nucleotide.

zione, come pure la riduzione dei piridin-nucleotidi, interessano la posizione 4 dell'anello piridinico (⁹).

Inoltre per le loro proprietà ottiche questi composti sono stati usati per l'identificazione e la determinazione quantitativa dei piridin-nucleotidi (⁸, ¹⁰, ¹¹).

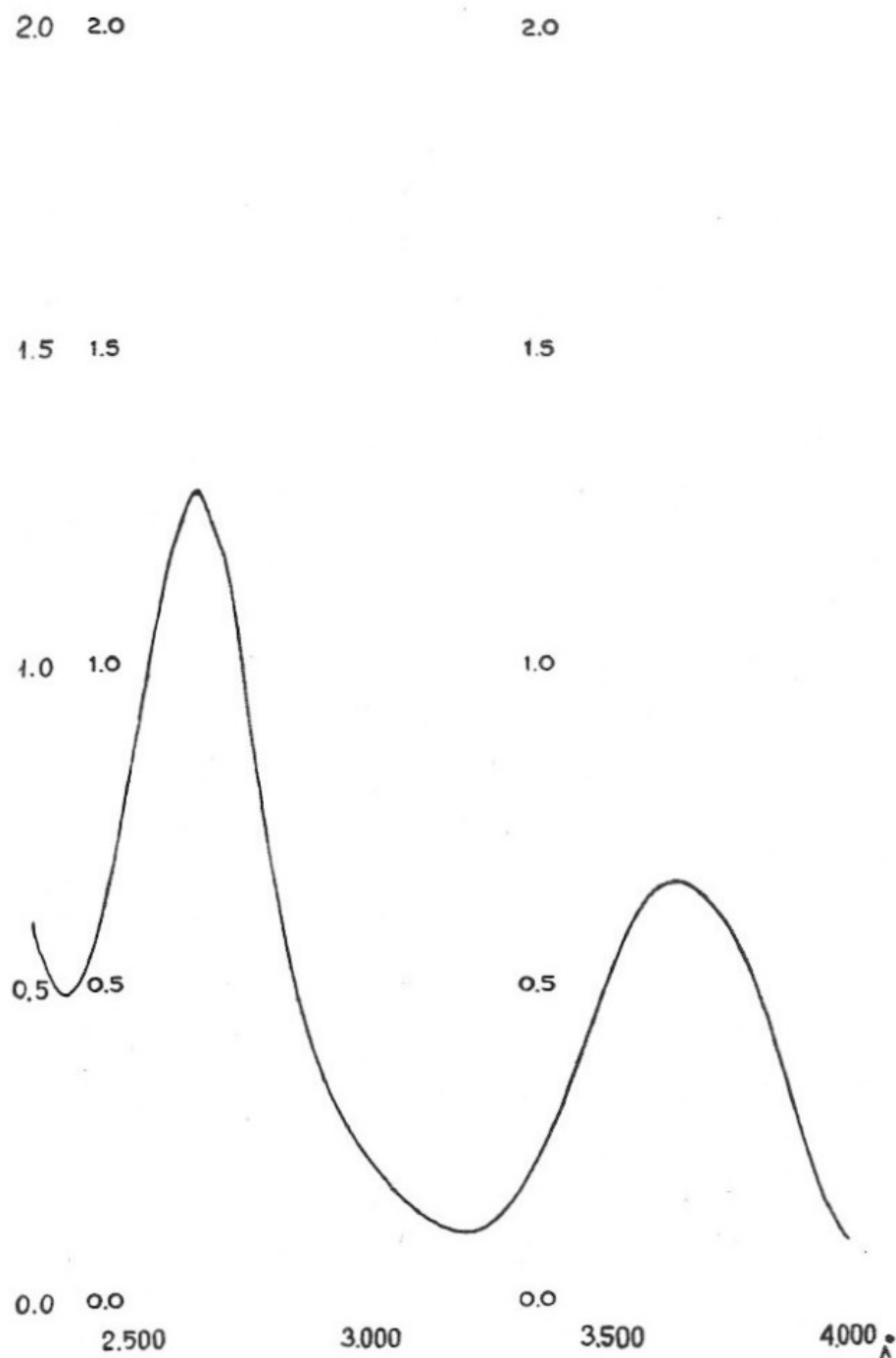


Fig. 1. - Spettro di assorbimento del desammido-DPN trattato con alcali concentrati.

Nel caso del desammido-DPN, scoperto solo da poco tempo, e di cui solo recentemente sono state descritte due sintesi (¹², ¹³), ben poco esiste in letteratura a questo riguardo. Solo in un recente lavoro sulla sintesi di questo composto LAMBORG, STOLZENBACH e KAPLAN (¹²) hanno dimostrato che esso, ridotto con idrosolfito, ha un massimo di assorbi-

mento a 3250 Å e una fluorescenza pari a circa 1/10 di quella del DPN ridotto. Nello stesso lavoro questi autori hanno mostrato che il desammido-DPN reagisce con cianuro di potassio dando un prodotto con un massimo di assorbimento a 3150 Å. Questa ultima reazione avviene lentamente in soluzione acquosa e può essere accelerata se si fa avvenire in soluzione alcoolica. Tale comportamento era stato osservato anche da noi nel corso di ricerche sul desammido-DPN isolato dal *Penicillium chrysogenum* (2).

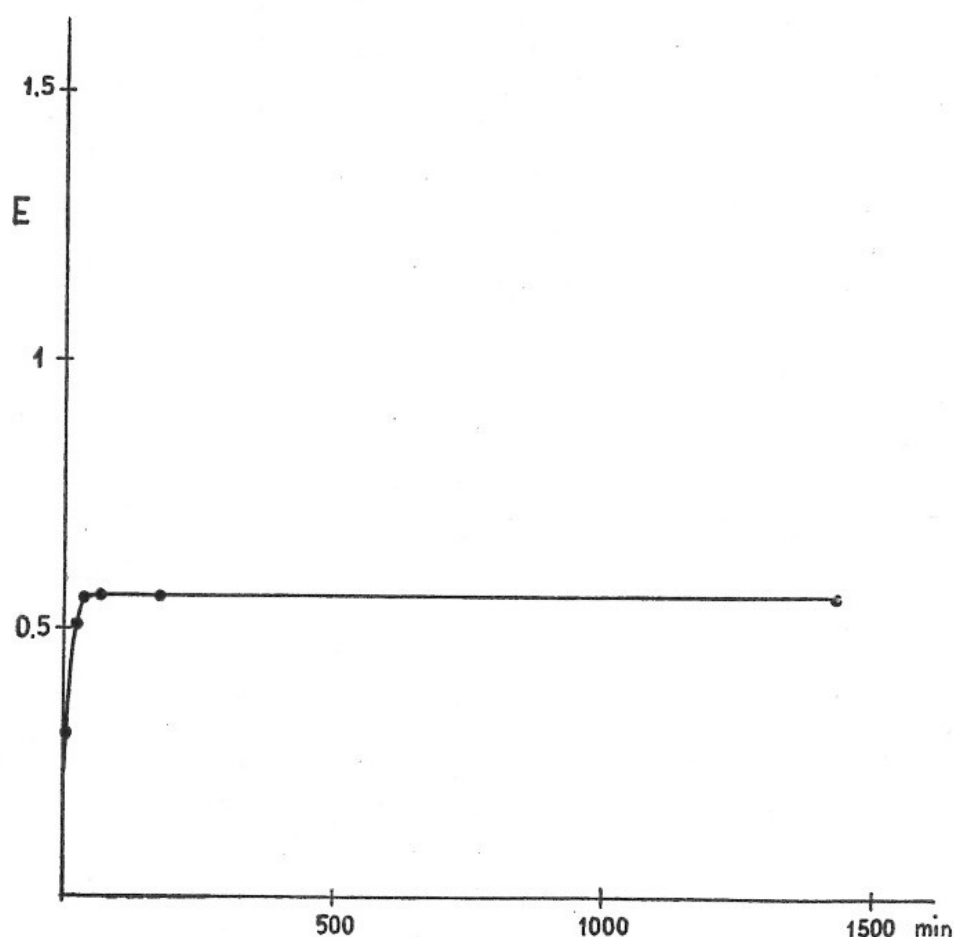


Fig. 2. - Variazione nel tempo dell'assorbimento a 3600 Å del desammido-DPN trattato con alcali concentrati.

In mancanza di altri dati nella letteratura, si è voluto esaminare il comportamento del desammido-DPN nei confronti di qualche altro reattivo. Si è stabilito che il desammido-DPN non dà origine a prodotti caratterizzabili per l'assorbimento nell'ultravioletto, nè con acetone, nè con metil-etil-chetone, nè con bisolfito. Trattato invece con alcali concentrati questo piridin-nucleotide si trasforma in un prodotto con un massimo di assorbimento a 3300 Å.

Nelle condizioni usate da KAPLAN e coll. (8) per il DPN (idrato potassico 5 N), tale reazione avviene solo in maniera incompleta; essa è favorita dall'aumento della concentrazione di alcali, e raggiunge il suo

optimum in alcali 10 N. In considerazione di ciò sono stati studiati in queste condizioni sia il comportamento del desammido-DPN che quello del DPN e di alcuni composti ad essi correlati.

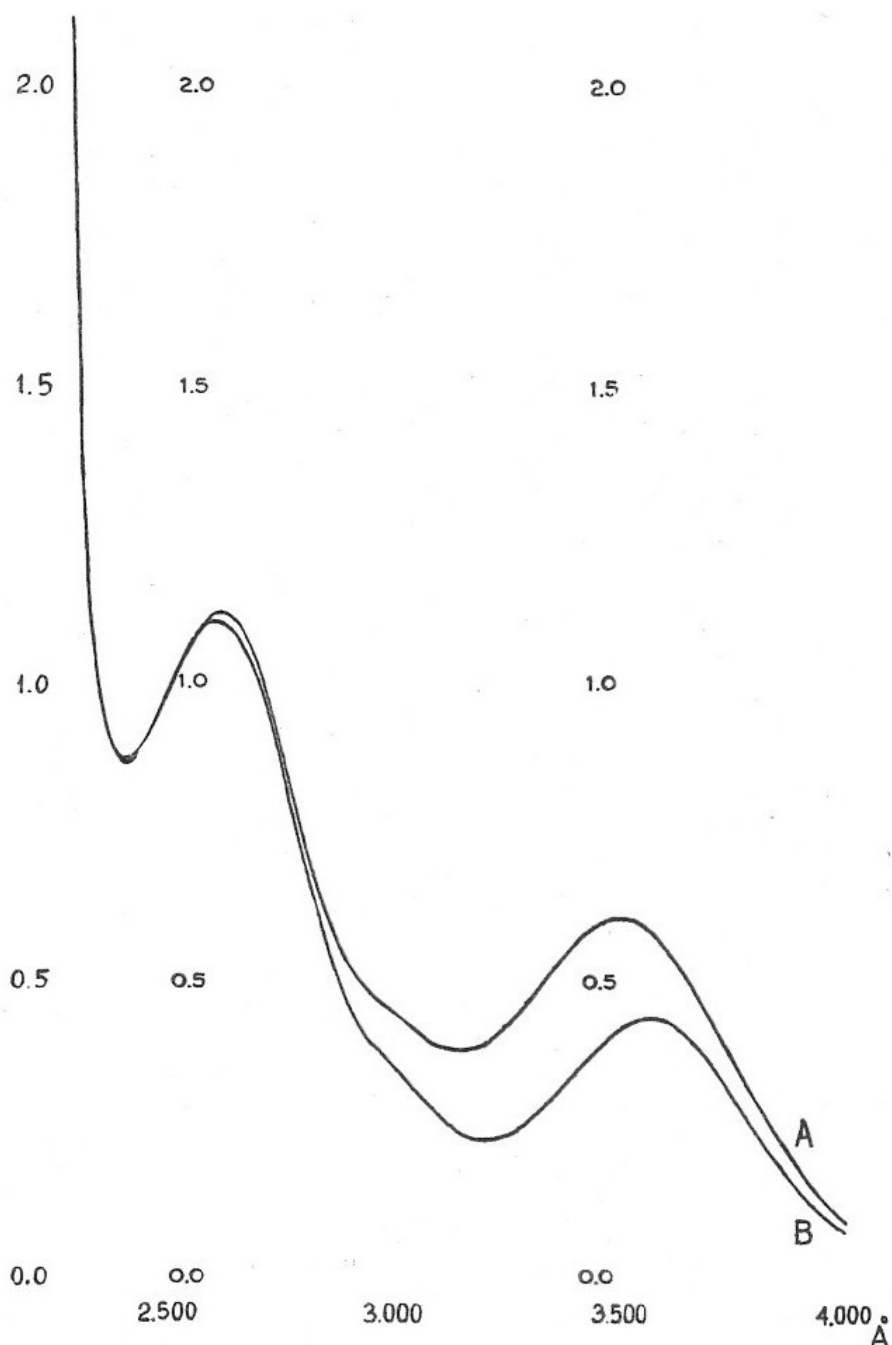


Fig. 3. - Spettri di assorbimento del DPN trattato con alcali concentrati. La curva superiore si riferisce al primo prodotto, quella inferiore al prodotto finale.

MATERIALI E METODI.

Il DPN usato in questo lavoro era un prodotto commerciale della Pabst Laboratories, Milwaukee, Wisc. U.S.A. e l'acido N-metil-nicotinico della Hoffmann-La Roche di Basilea.

La N-metil-nicotinammide è stata sintetizzata, a partire dalla nico-

tinammide col metodo di KARRER e coll. (¹³). Il desammido-DPN è stato sintetizzato enzimaticamente col metodo descritto in un precedente lavoro (¹⁴).

I ribotidi dell'acido nicotinico e della nicotinammide sono stati gentilmente forniti dal Prof. A. BALLIO di questo laboratorio.

La reazione con metil-etil-chetone è stata eseguita col metodo de-

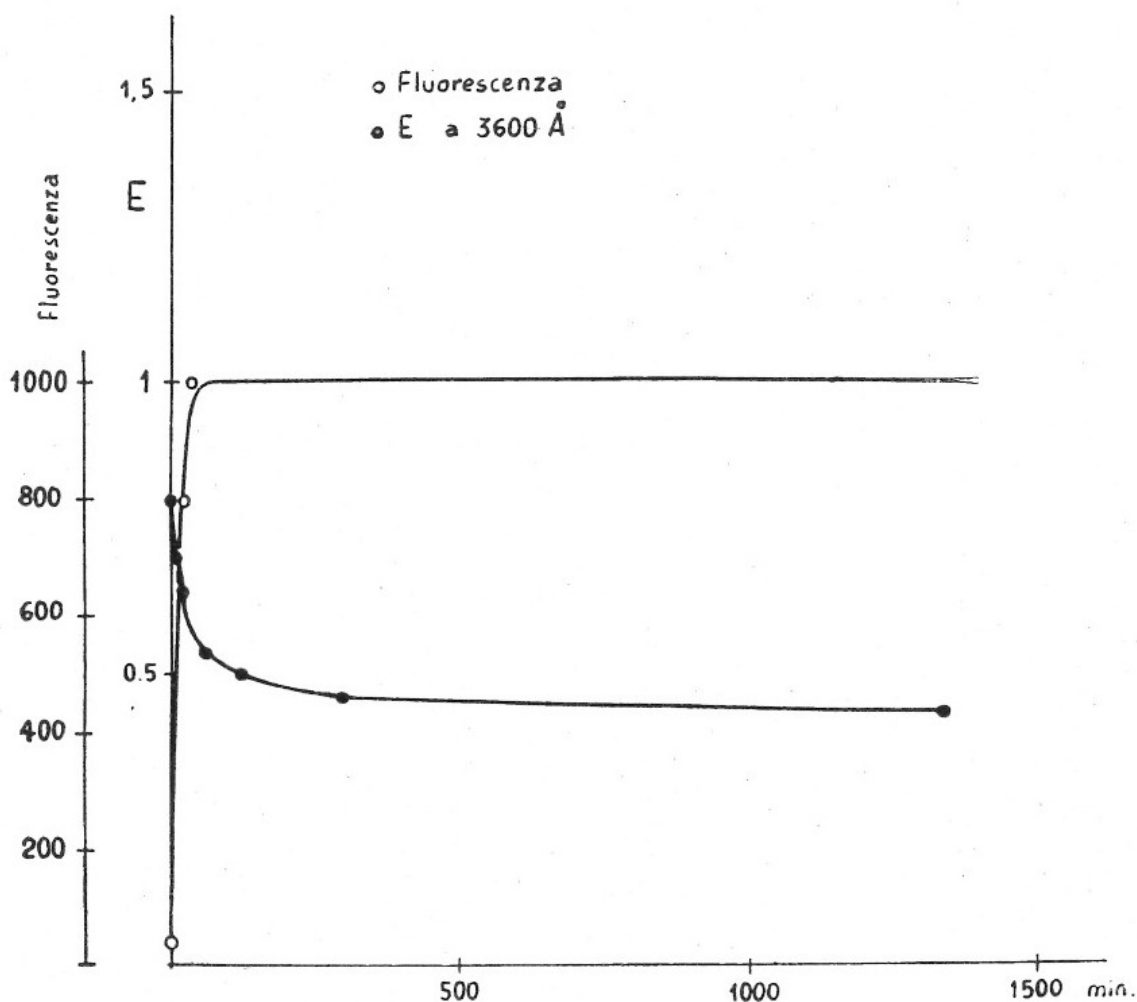


Fig. 4. - Variazione nel tempo dell'assorbimento a 3600 Å e della fluorescenza del DPN trattato con alcali concentrati.

scritto da LEVITAS et al. (¹⁰), mentre per la reazione con bisolfito si sono seguite le prescrizioni di COLOWICK et al. (⁷). Per la reazione con alcali si preparavano soluzioni dei vari prodotti di concentrazione dieci volte superiore a quella necessaria per la registrazione dello spettro. Tali soluzioni venivano diluite dieci volte con una soluzione di idrato sodico 11 N, e dopo il tempo necessario se ne registrava lo spettro e se ne misurava la fluorescenza.

Gli spettri sono stati registrati con uno spettrofotometro Cary Modello XI della Applied Physics Corporation. Le misure di fluorescenza sono state eseguite con un fluorimetro Coleman con i filtri della tiamina.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Nella figura 1 è mostrato lo spettro di assorbimento del prodotto che si forma a partire dal desammido-DPN, mentre nella figura 2 è mostrata la variazione col tempo dell'assorbimento a 3600 Å. La reazione è praticamente completa dopo circa 30 minuti, dopo di che l'assorbimento

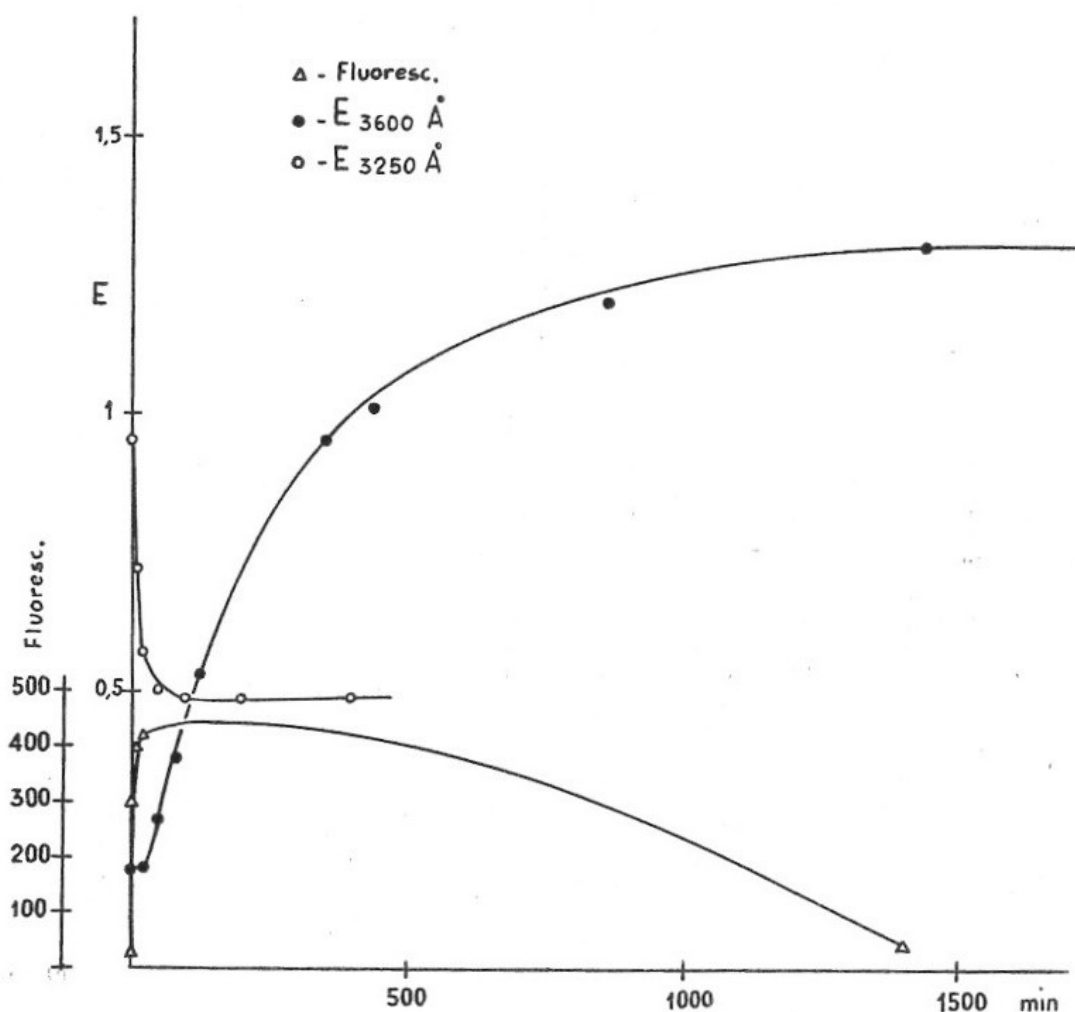


Fig. 3. - Variazione nel tempo degli assorbimenti a 3250 e 3600 Å e della fluorescenza della N-metil-nicotinammide trattata con alcali concentrati.

rimane costante per lungo tempo. Il prodotto che si forma in queste condizioni non è fluorescente.

Questo comportamento si allontana notevolmente da quello del DPN, che nelle stesse condizioni dà origine a due composti, come si rileva dagli spettri di assorbimento riportati nella figura 3. Il primo composto con un massimo di assorbimento a 3500 Å, si forma quasi istantaneamente, e si trasforma poi nel secondo che ha un massimo di assorbimento a 3600 Å. Come si può vedere nella figura 4, dove è riportata la variazione nel tempo dell'assorbimento a 3600 Å, in queste

condizioni la reazione è completa dopo circa 30'. Contemporaneamente a questa reazione si ha lo sviluppo di una forte fluorescenza. L'assorbimento a 3600 Å e la fluorescenza in queste condizioni sono stabili per lungo tempo. Dopo quindici ore la diminuzione non supera il 12 per cento.

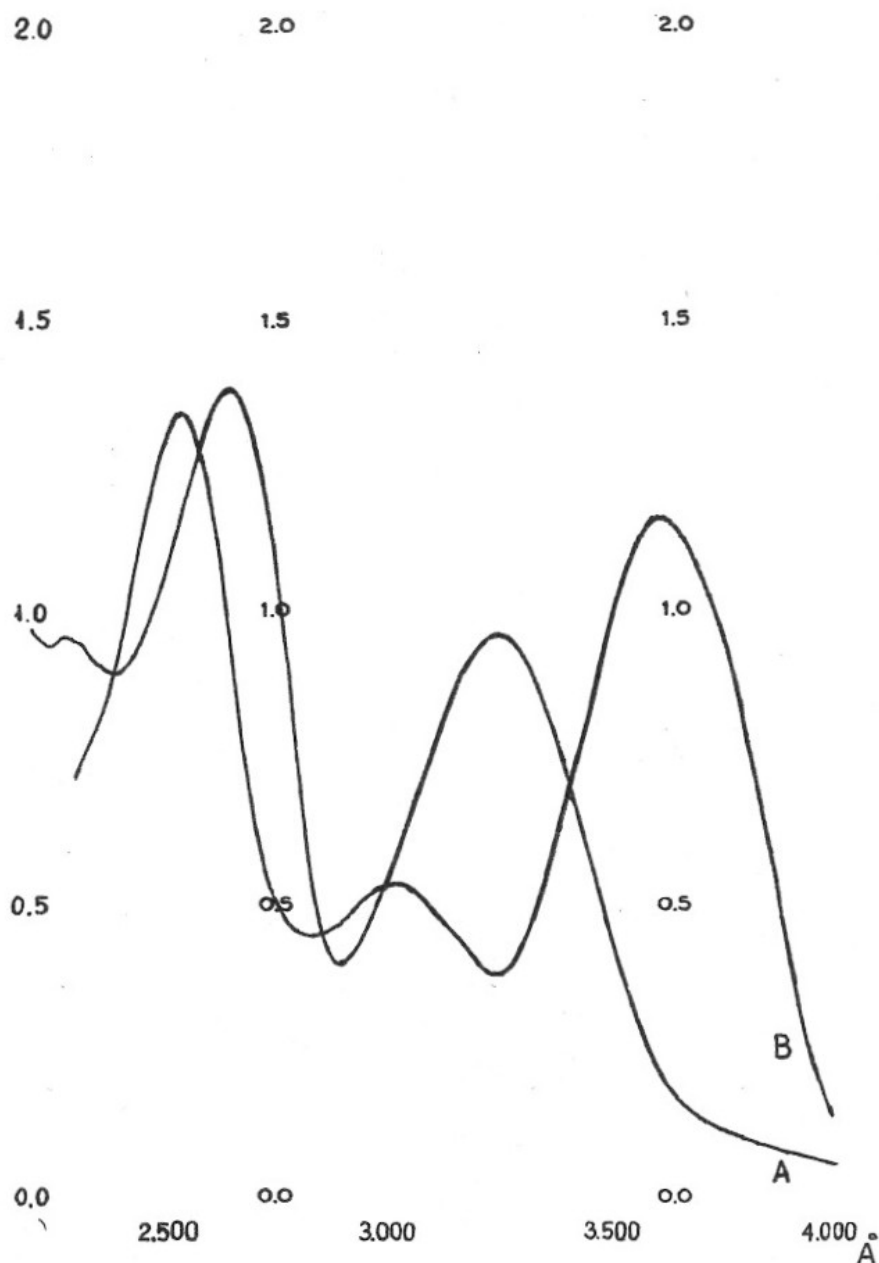


Fig. 6. - Spettri di assorbimento della N-metil-nicotinammide trattata con alcali concentrati. La curva più bassa a 4000 Å si riferisce al prodotto iniziale, l'altra al prodotto finale.

La differenza di comportamento del DPN e del desammido-DPN nei confronti degli alcali concentrati trova una certa corrispondenza in quello della N-metil-nicotinammide e dell'acido N-metil-nicotinico che riproducono la struttura della porzione piridinica della molecola. La N-metil-nicotinammide, nelle condizioni indicate, dà origine ad un composto con un massimo di assorbimento a 3250 Å, che si forma quasi istanta-

neamente. Successivamente l'assorbimento a 3250 Å comincia a diminuire fino a raggiungere un valore costante, mentre contemporaneamente si sviluppa una fluorescenza pari a circa un decimo di quella del DPN a pari molarità. Dopo un ritardo iniziale di venti minuti circa si

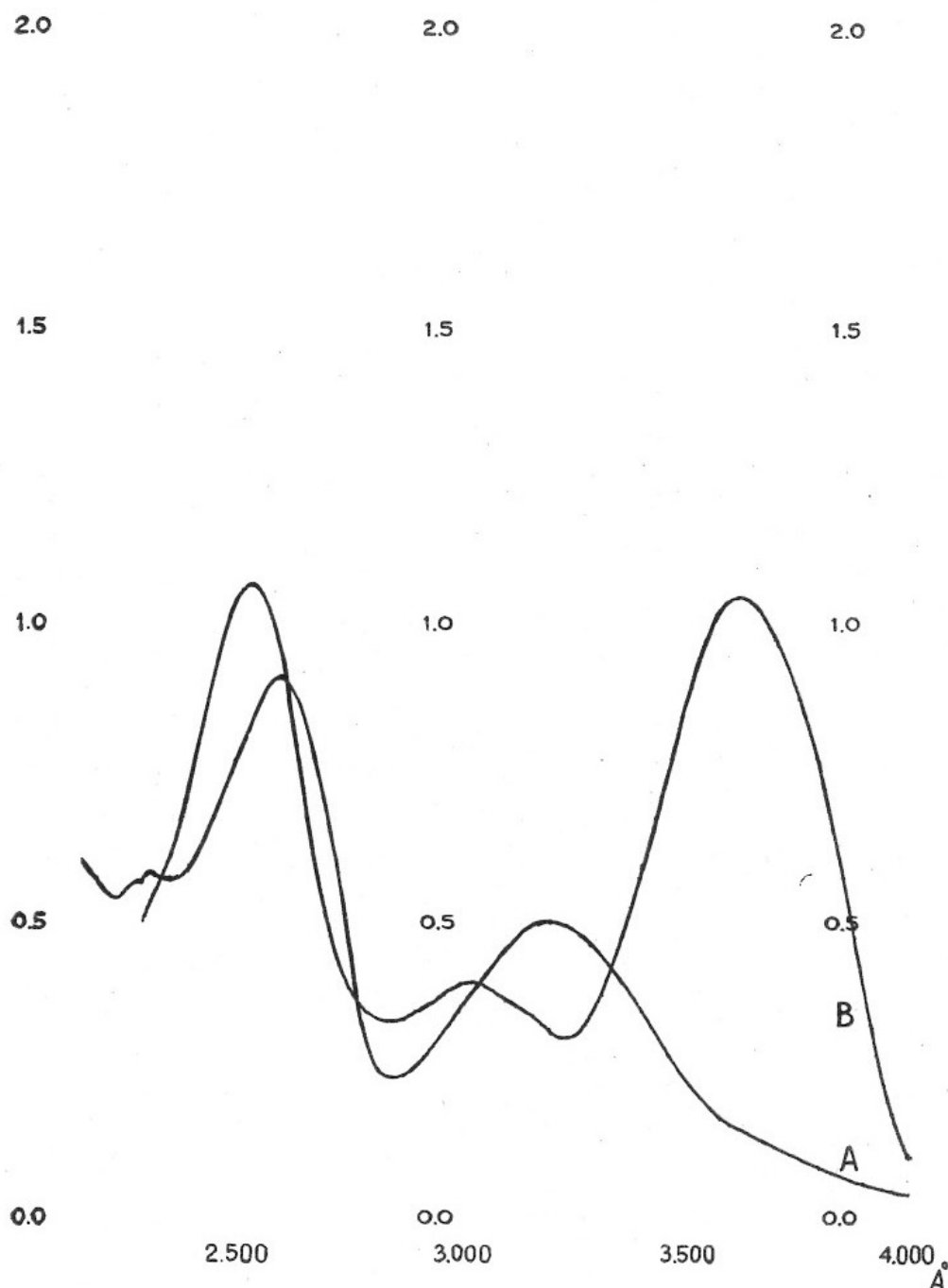


Fig. 7. - Spettri di assorbimento dell'acido N-metil-nicotinico trattato con alcali concentrati. La curva più bassa si riferisce al prodotto iniziale, l'altro al prodotto finale.

nota la formazione di un composto con due massimi a 3030 e a 3630 Å; la reazione si completa in circa 24 ore. Contemporaneamente la fluorescenza diminuisce e in 20 ore è ridotta al 10% del valore massimo. L'andamento di queste reazioni è mostrato nella figura 5 dove sono riportati

gli andamenti nel tempo dell'assorbimento a 3250 e 3600 Å e della fluorescenza, mentre nella figura 3 sono riportati gli spettri del primo e dell'ultimo prodotto che si formano.

L'acido N-metil-nicotinico dà origine anch'esso a due composti i cui spettri sono riportati nella figura 7, ma l'assorbimento a 3250 Å è

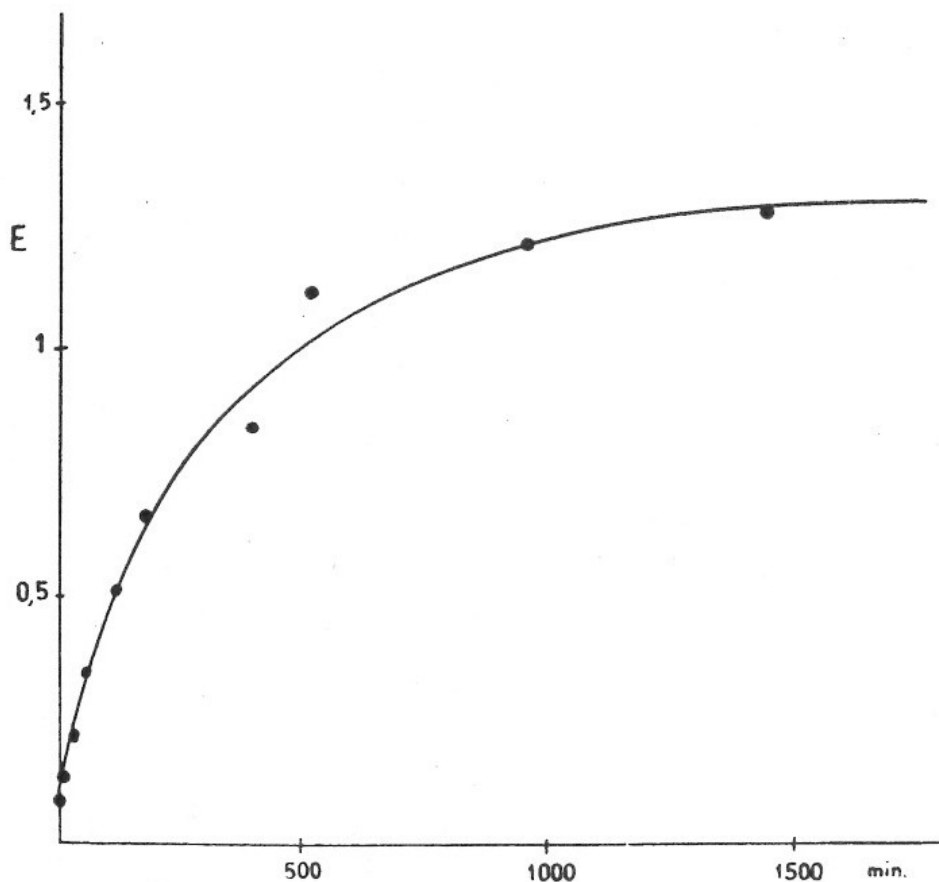


Fig. 8. - Andamento nel tempo dell'assorbimento a 3600 Å dell'Acido N.-metil-nicotinico trattato con alcali concentrati.

assai più basso e varia assai poco nel tempo, e il secondo composto, simile a quello che si forma a partire dalla nicotinammide, con due massimi rispettivamente a 3030 e 3630 Å, si forma immediatamente senza ritardo iniziale, come si può vedere dall'andamento nel tempo dell'assorbimento a 3600 Å, riportato nella figura 8. Analogamente al desamido-DPN l'acido N.-metil-nicotinico non dà luogo a prodotti fluorescenti in alcali concentrati.

Dai dati su riferiti appare che la N-metil-nicotinammide trattata con alcali concentrati si trasforma immediatamente in un primo prodotto non fluorescente il quale lentamente dà origine ad un secondo prodotto fluorescente che a sua volta dà luogo al terzo prodotto non fluorescente.

Anche nel DPN si avrebbe la formazione dei due primi prodotti, sia

pure con uno spostamento della lunghezza d'onda dei massimi di assorbimento, il secondo dei quali, responsabile della fluorescenza, sarebbe stabilizzato dalla presenza del gruppo dell'adenosin-difosforibosio e non sarebbe più capace di subire ulteriori modificazioni. Il comportamento del ribotide della nicotinammide è identico a quello del DPN, mostrando così che, come già notato da KAPLAN ⁽¹³⁾, la stabilizzazione del prodotto fluorescente sarebbe dovuta a « una condensazione fra l'anello piridinico e il ribosio adiacente, senza rottura del legame nicotinamide-ribosio ».

Nel caso dell'acido N-metil-nicotinico sembrerebbe che il primo prodotto si trasformi direttamente nel secondo più stabile senza dar origine all'intermedio fluorescente, e la presenza del ribosio nel desamido-DPN e nel ribotide nicotinico stabilizzerebbe il primo prodotto. Nel desamido-DPN il composto formatosi, come si vede nella Tabella 1, ha un

TABELLA 1

	Coefficienti di assorbimento molare		
	Derivati della Nicotinammide		Derivati dell'acido nicotinico
	a 3500 Å	a 3600 Å	a 3600 Å
N-metil derivato	—	8,4	8,54
Mononucleotide	—	7 (*)	17,75
Dinucleotide	10,35	5,7	11,9

(*) da KAPLAN *et al.* ⁽¹²⁾.

coefficiente di assorbimento molare dello stesso ordine di grandezza del primo prodotto che si forma a partire dal DPN, benchè la lunghezza d'onda del massimo sia spostata da 3500 a 3600 Å.

Il ribotide dell'acido nicotinico si comporta in modo analogo al desammido-DPN, ma il coefficiente di assorbimento molare è molto più alto.

L'assorbimento a 3600 Å e la fluorescenza del DPN e del ribotide della nicotinammide sono distrutti dalla luce ultravioletta mentre questa non ha influenza sull'assorbimento a 3600 Å degli analoghi nicotinici.

Dati i valori piuttosto alti dei coefficienti di assorbimento molare ri-

portati nella Tabella 1, questa reazione può essere usata come un metodo assai sensibile per la determinazione del desammido-DPN e del ribotide dell'acido nicotinico. Sfruttando inoltre la differenza di comportamento con gli analoghi derivati della nicotinammide sarà forse possibile determinare tutti questi composti in presenza l'uno dell'altro.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BALLIO A., CASINOVİ C. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Biochim. biophys. Acta*, 20: 414 (1956).
- (²) SERLUPI-CRESCENZI G. e BALLIO A. - *Nature (London)*, 179: 154 (1957).
- (³) BALLIO A., SERLUPI-CRESCENZI G., RUSSI S. e TONOLO A. - Risultati non pubblicati.
- (⁴) BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - *Rend. Accad. Lincei* (8), 23: 275 (1957).
- (⁵) PREISS J. e HANDLER P. - *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 1514 (1957); *ibid.*, 79: 4246 (1957).
- (⁶) BURTON R. M. e KAPLAN N. O. - *J. biol. Chem.*, 206: 283 (1954).
- (⁷) COLOWICK S. P., KAPLAN N. O. e CIOTTI M. M. - *J. biol. Chem.*, 191: 447 (1951).
- (⁸) KAPLAN N. O., COLOWICK S. P. e BARNES C. C. - *J. biol. Chem.*, 191: 461 (1951).
- (⁹) KAPLAN N. O. - *Record of chem. Progress*, 16: 177 (1955).
- (¹⁰) LEVITAS N., ROBINSON J., ROSEN F. e PERLZWEIG W. A. - *J. biol. Chem.*, 167: 169 (1947).
- (¹¹) HUFF J. W. e PERLZWEIG W. A. - *J. biol. Chem.*, 167: 511 (1958).
- (¹²) LAMBORG M., STOLZENBACH F. E. e KAPLAN N. O. - *J. biol. Chem.*, 231: 685 (1958).
- (¹³) KARRER P., SCHWARZENBACH G., BENZ F. e SOLMSEN V. - *Helv. chim. Acta.*, 19: 811 (1936).
- (¹⁴) SERLUPI-CRESCENZI G. e BALLIO A. - *Gazz. chim. ital.*, 88: 320 (1958).