

65. L. LONGINOTTI e F. POCCHIARI. — Preparazione di glucosio-6-fosfato uniformemente marcato con ^{14}C . (*)

Riassunto. — A partire da glucosio radioattivo è descritto un metodo di preparazione enzimatica di glucosio-6-fosfato uniformemente marcato con ^{14}C , ad alta attività specifica. La resa di trasformazione del glucosio negli esosofosfati è stata superiore al 95%.

Gli esosofosfati sono stati isolati e purificati mediante metodi cromatografici con una resa del 75%, della quale il glucosio-6-fosfato rappresenta l'81%.

Résumé. — On décrit une méthode de préparation enzymatique du glucose-6-phosphate uniformément marqué avec ^{14}C à activité spécifique élevée en partant du glucose radioactif. Le rendement de transformation du glucose en esosophosphates a été supérieur au 95%.

Les esosophosphates sont séparés et purifiés en se servant des méthodes chromatographiques avec un rendement du 75% duquel le glucose-6-phosphate représente le 81%.

Summary. — A method is described for the enzymatic preparation of glucose-6-phosphate uniformly marked with ^{14}C of high specific activity, starting with radioactive glucose. The yield of transformation of glucose into hexaphosphate was over 95 per cento.

The hexaphosphates were isolated and purified by chromatographic methods with a 75 per cento yield; 81 per cento of the yield was represented by glucose-6-phosphate.

Zusammenfassung. — Beschrieben wird ein Verfahren, um von radioaktiver Glukose ausgehend enzymatisch gleichmässig mit ^{14}C markiertes Glukose-6-Phosphat mit höher spezifischer Aktivität herzustellen. Die Ausbeute der Umwandlung der Glukose in Hexose-Phosphate war höher als 95%.

Die Hexose-Phosphate wurden mittels chromatographischer Verfahren isoliert und gereinigt, wobei die Ausbeute 75% betrug, wovon das Glukose-6-Phosphat 81% darstellt.

(*) Comunicazione al VII Congresso Nazionale di Chimica - Genova, 30 maggio-5 giugno 1954.

Nel corso dello studio sul metabolismo intermedio dei carboidrati si è trovato necessario preparare il glucosio-6-fosfato (*) radioattivo ad alta attività specifica.

La preparazione del G-6-P non radioattivo è stata effettuata da numerosi ricercatori; i metodi da loro impiegati non sono stati seguiti, però, nella preparazione del prodotto radioattivo perchè quelli chimici ⁽¹⁾ e quello di ROBISON ⁽²⁾ davano rese non superiori al 15% e quello enzimatico di COLWICK ⁽³⁾ perchè usava come prodotto di partenza il G-1-P.

E' d'altra parte noto che l'esochinasi, in presenza di ATP e di Mg^{++} , in pratica trasforma quantitativamente il glucosio in G-6-P, sebbene quest'ultimo prodotto non sia stato mai isolato dalla miscela di incubazione, ma soltanto messo in evidenza per mezzo delle sue caratteristiche.

Si è usata appunto questa reazione enzimatica per preparare il G-6-P radioattivo, prodotto che è stato poi isolato allo stato puro mediante metodi cromatografici.

PARTE SPERIMENTALE

PRODOTTI E METODI ANALITICI

D-glucosio uniformemente marcato ^{14}C è stato fornito, cromatograficamente puro, da « The Radiochemical Centre » di Amersham, con una attività specifica di circa 11,3 μ c/ μ M.

ATP della ditta Light, analizzata al momento dell'uso, più di un anno dopo l'arrivo del prodotto, conteneva circa il 31% di ATP ed il 34% di ADP. L'analisi è stata eseguita cromatografando su carta ⁽⁴⁾ μ l 5 di una soluzione preparata di fresco al 5%. Il solvente ⁽⁵⁾ costituito da metanolo-ammoniaca-acqua (6: 1: 3) è stato fatto passare per 80 ore sulla carta (sgocciolamento). Dopo essiccamento a temperatura ambiente, su una striscia del cromatogramma è stato rivelato il fosforo secondo C. S. HANES e F. A. ISHERWOOD ⁽⁶⁾ e quindi le zone corrispondenti dell'ATP e dell'ADP (rispettivamente cm 8-12 e cm 16-20 dalla partenza) sono state separate ed eluite con acqua. Sull'eluato è stato determinato il fosforo totale secondo I. BERENBLUM e E. CHAIN ⁽⁷⁾. Dai valori così ottenuti, è stata sottratta la quantità di fosforo proveniente dalla carta.

(*) In seguito verranno usate le seguenti abbreviazioni: G-6-P=glucosio-6-fosfato; G-1-P=glucosio-1-fosfato; F-6-P=fruttosio-6-fosfato; ATP=adenosintrifosfato; ADP=adenosindifosfato; AMP=adenosinmonofosfato.

Esochinasi da lievito cristallizzata, è stata fornita dalla Ditta Pabst; in essa, come sarà detto più oltre, nonostante lo stato cristallino, è stata dimostrata la presenza di isomerasi.

Carta Whatman 1, lavata con acido acetico 2N ⁽⁶⁾, è stata usata in tutte le cromatografie.

La formazione del G-6-P è stata seguita misurando la scomparsa del glucosio in campioni da cm³ 0,2 del liquido di incubazione deproteinizzati, secondo una lieve modifica del metodo di M. SOMOGYI ⁽⁸⁾, con cm³ 0,4 di Ba(OH)₂ e cm³ 0,4 di ZnSO₄; dopo aver portato a cm³ 2 con acqua, i campioni sono stati centrifugati e su cm³ 1 del soprastante, esente da G-6-P ⁽⁹⁾, è stato determinato il glucosio secondo il metodo di N. NELSON ⁽¹⁰⁾.

Misura della radioattività. — Tutte le misure radioattive sono state eseguite su carta, dopo cromatografia delle differenti sostanze, con un contatore Tracerlab TGC2 secondo il metodo descritto da A. BELOFF-CHAIN e coll. ⁽¹¹⁾.

PREPARAZIONE

Parte I. — Cm³ 2 di una soluzione a pH 8,2 contenenti mg 21 di ATP, mg. 1,6 di glucosio radioattivo, 100-200 γ di esochinasi e MgCl₂ ad una concentrazione finale di 0,01 M, sono stati incubati per 2 ore a 37°,5.

Il pH e la temperatura di incubazione sono stati scelti tenendo presente che il coefficiente di temperatura per la reazione (Q_{10}), è di circa 2 tra 0° e 30° ^(12 e 13) e che l'enzima pur avendo un pH optimum tra 8 e 9 è molto instabile a 38° per pH superiori a 7 ⁽¹⁴⁾.

La concentrazione del Mg++ è quella nota come optimum ⁽¹³⁾.

Nelle condizioni sperimentali da noi usate, è stato notato che l'uso del tampone non era necessario; il pH da 8,2 cadeva rapidamente, subito dopo i primi minuti di incubazione, a circa 7 rimanendo poi costante per il restante periodo dell'incubazione. Riportando continuamente il pH ad 8,2 non si notava alcun miglioramento nell'andamento della reazione; è stato quindi evitato l'uso del tampone per semplificare il metodo di purificazione dell'esosomonofosfato.

La quantità di ATP usata è stata un poco superiore a quella teorica, Sono in corso studi con ATP pura per accertare se questa maggiore quantità necessaria sia dovuta ad un effetto di inibizione competitiva dell'ADP, presente in quantità notevoli nella nostra ATP, effetto già dimostrato recentemente per l'esochinasi del cervello ⁽¹⁵⁾, ma escluso per l'esochinasi da lievito ⁽¹⁶⁾.

Dopo l'incubazione, dalla soluzione sono stati eliminati i cationi con Amberlite IR 120 e l'eluato è stato concentrato sotto vuoto ad una temperatura inferiore a 30°, fino a circa cm³ 1.

Come è chiaro dalla tabella I, l'attività ritrovata dopo questa prima parte, è di circa l'89% di quella iniziale; in determinazioni di attività su altri lavaggi della resina e del palloncino di distillazione, si ritrova un ulteriore 2% che viene ovviamente trascurato.

Parte II. — La soluzione in tal modo concentrata viene poi messa su carta per mezzo di una siringa Agla con micrometro, a μ l 1 per volta distanti cm 0,5 in modo da ottenere un banda omogenea, e cromatografata con metanolo-ammoniaca-acqua (6: 1: 3) ⁽⁵⁾ a 5° per 30 ore (sgocciolamento). Successivamente il cromatogramma, seccato a temperatura ambiente, viene messo a contatto per 2 ore con una lastra radiografica Ferrania tipo N.

Come è visibile dalla figura 1 la maggior parte dell'attività viene ritrovata nella zona corrispondente alla miscela degli esosofosfati (A) mentre sono visibili ancora la zona del glucosio rimasto come tale (B), quella iniziale, sempre presente nelle cromatografie di prodotti fosforilati ⁽⁶⁾, e zone intermedie, di trascurabile attività, forse dovute alla presenza dell'ATP, ADP ed eventualmente AMP ed ortofosfato, che molto probabilmente inglobano tracce di prodotto radioattivo.

Le zone del glucosio e quelle degli esosomonofosfati vengono tagliate, la prima per essere eluita onde recuperare, come diremo più avanti, il prodotto che non ha reagito, la seconda per essere ricromatografata in modo da separare la miscela degli esosomonofosfati. A tal fine la striscia di carta sulla quale sono gli esosomonofosfati, viene cucita sui lati più lunghi della striscia, cioè sui lati paralleli all'ex fronte del solvente, a due pezzi di carta di larghezza uguale a quella della striscia e di lunghezza tale che quello superiore (cm 7 circa), una volta messo nella vaschetta del solvente, permetta una conveniente distanza tra il solvente stesso e gli esosomonofosfati presenti sulla carta, e quello inferiore (cm 30 circa), permetta che il componente più veloce della miscela degli esosofosfati possa rimanere sulla carta anche alla fine del tempo necessario per la separazione. Le carte cucite con filo di cotone sottile, sono sovrapposte per circa mm 2.

Il nuovo foglio di carta così ottenuto, viene cromatografato per 5 giorni (sgocciolamento) a 20°, usando come solvente ⁽⁶⁾ butanolo terziario-acqua-acido picrico (cm³ 80: cm³ 20: g 4). Dopo questo tempo la cromatografia viene seccata a temperatura ambiente e posta a contatto di una lastra radiografica come descritto precedentemente.

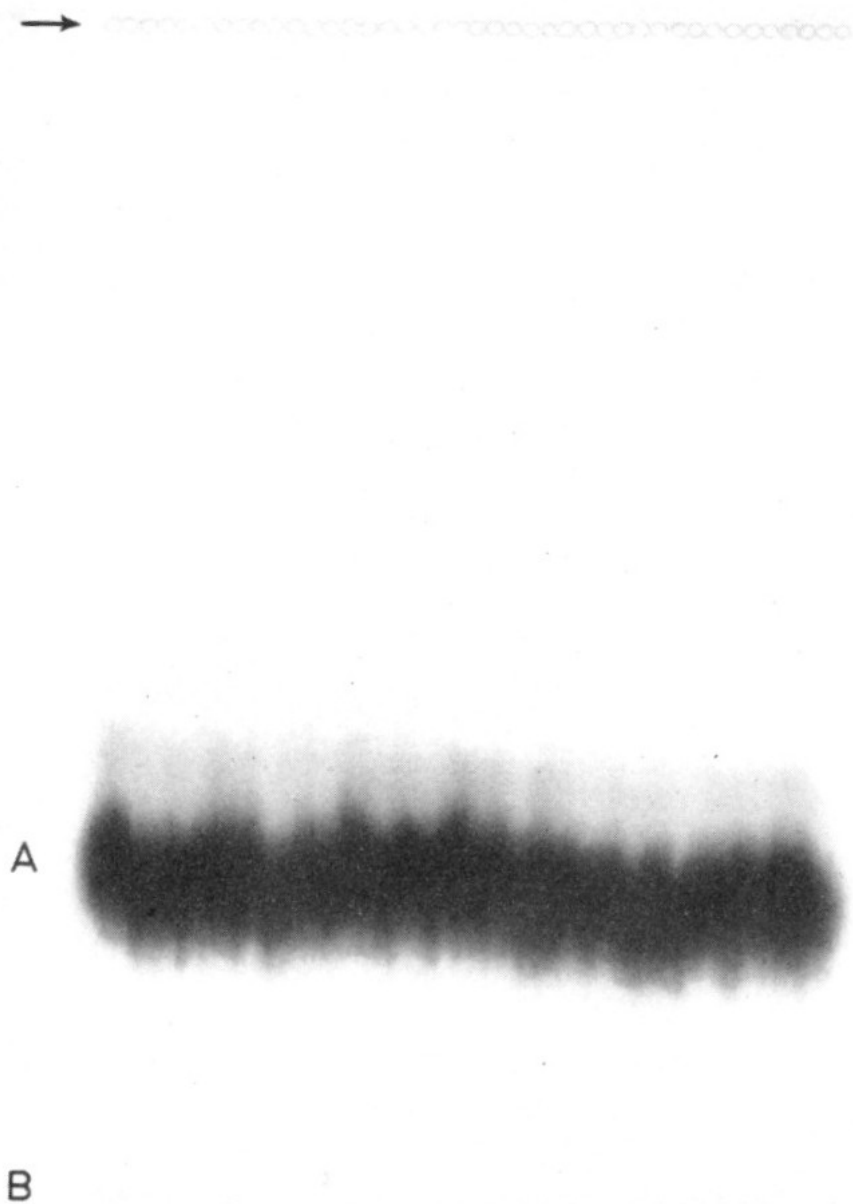


Fig. 1. - Radioautografia del cromatogramma della miscela d'incubazione.
A = Esosomonofosfati; B = Glucosio.

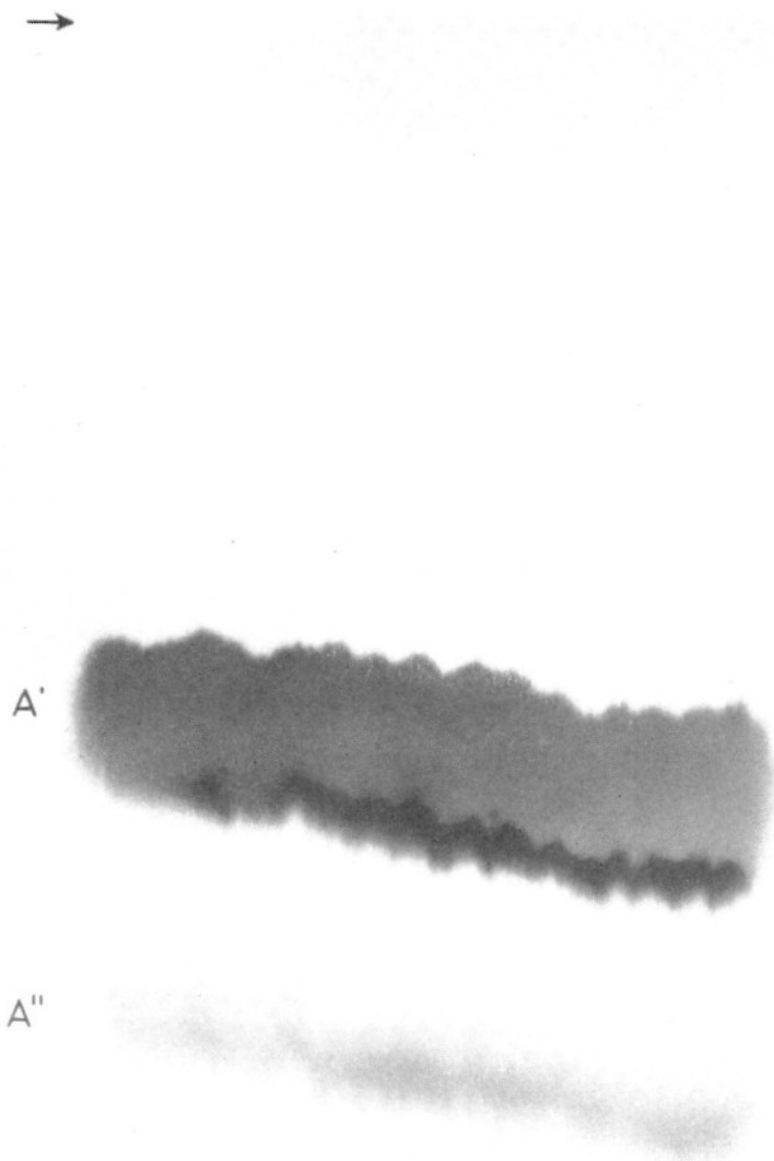


Fig. 2. - Radioautografia del cromatogramma degli esosomonofosfati.

$A' = \text{G} - 6 - \text{P}$; $A'' = \text{F} - 6 - \text{P}$.

Si può osservare dalla figura 2 che la banda dapprima unica della figura 1 (A) si è separata in due bande distinte che sono state dimostrate, mediante cromatografie dei prodotti inerti, essere G-6-P (A') e F-6-P (A'') (*).

Le bande così individuate vengono tagliate e ricucite separatamente, una per ogni foglio di carta, secondo la tecnica precedentemente descritta, e quindi ambedue ricromatografate, onde togliere l'acido picrico rimasto sulla carta, con butanolo-acido acetico-acqua (4: 1: 5) per 40 ore (sgocciolamento). In questa maniera, mentre il G-6-P ed il F-6-P non camminano sensibilmente, l'acido picrico viene spostato col fronte del solvente.

I prodotti così purificati vengono eluiti a 5° con acqua, fino a raccogliere circa cm³ 5 di eluato; analogamente si opera per l'eluizione dal primo cromatogramma del glucosio rimasto tale e quale dopo l'incubazione.

I tubicini contenenti il G-6-P, il F-6-P ed il glucosio ormai puri, vengono quindi posti in un essiccatore sotto vuoto su P₂O₅, dove le varie soluzioni vengono concentrate fino al volume richiesto (**).

TABELLA I.

DISTRIBUZIONE DELLA RADIOATTIVITÀ NELLE VARIE FRAZIONI

(I risultati sono espressi in c.p.m. $\times 10^{-3}$ a = radioattività perduta nella prima cromatografia; b = radioattività perduta nelle altre cromatografie).

Frazioni	Prima della incubazione	Dopo l'incubazione	
		Parte I	Parte II
Glucosio	6.700	—	170
G-6-P	—	} 5.950	4.115
F-6-P	—		920
a	—	—	390
b	—	—	230
Totale	6.700	5 950	5.825

(*) La formazione del F-6-P è dovuta alla fosfoisomerasi presente nell'esochinasi cristallina usata. Ciò si è potuto dimostrare facendo due incubazioni parallele del tutto simili tra di loro ed a quella precedentemente descritta ma usando come substrato, invece di glucosio, G-6-P in concentrazione equivalente; solo in una di queste incubazioni è stata aggiunta esochinasi. I due liquidi alla fine dell'incubazione sono stati trattati in modo totalmente uguale a quello già descritto fino alla cromatografia in acido picrico, che spruzzata ha dato luogo alle bande del G-6-P e del F-6-P per l'incubazione con l'esochinasi, ed alla sola banda del G-6-P per l'incubazione senza esochinasi.

(**) In alcune preparazioni, si è notato che dopo la concentrazione dell'eluato rimangono tracce minime di acido picrico, che possono essere facilmente eliminate con carbone animale lavato.

Il G-6-P così ottenuto, con attività specifica/mole naturalmente uguale a quella del glucosio di partenza, risulta, da prove eseguite, cromatograficamente puro.

Come appare chiaro dalla tabella 1 il G-6-P ottenuto è il 61,5% del glucosio di partenza; un altro 13,8% è stato isolato come F-6-P. Il 10% circa della radioattività iniziale è perduta nella parte I della preparazione; un altro 6% circa è perduto nella prima cromatografia per le ragioni precedentemente esposte; la rimanente perdita del 3% è dovuta ad una leggera diffusione della radioattività sulla carta delle cromatografie.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica biologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) LEVENE P. A. e RAYMOND A. L. - J. Biol. Chem., 92: 757 (1934); LARDY H. A. e FISCHER H.O.L. - J. Biol. Chem., 164: 513 (1946); ATHERTON F. R., HOWARD H. T. e TODD A. R. - J. Chem. Soc., 1106 (1948); LAMPSON G. P. e LARDY H. A. - J. Biol. Chem., 181: 693 (1949); SEEGMILLER J. E. e HORECKER B. L. - J. Biol. Chem., 192: 175 (1951); VISCONTINI M. e OLIVER C. - Helvetica chim. Acta, 36: 466 (1953).
- (²) ROBISON R. e MORGAN W. T. J. - Biochem. J., 24: 119 (1930).
- (³) COLOWICK S. P. e SUTHERLAND E. W. - J. Biol. Chem., 144: 423 (1942).
- (⁴) COHN W. E. e KARTER C. E. - J. Am. Chem. Soc., 72: 4273 (1950).
- (⁵) BANDURSKI R. S. e AXELROD B. - J. Biol. Chem., 193: 405 (1951).
- (⁶) Nature, 164: 1107 (1949).
- (⁷) Biochem. J., 32: 295 (1938).
- (⁸) J. Biol. Chem., 160: 69 (1945).
- (⁹) COLOWICK S. P., CORI G. T. e SLEYN M. W. - J. Biol. Chem., 168: 533 (1947).
- (¹⁰) J. Biol. Chem., 153: 375 (1944).
- (¹¹) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I., POCCHIARI F. e ROSSI C. Proc. Roy. Soc., 143: 481 (1954-55).
- (¹²) KUNITZ M. e MC. DONALD M. - J. Gen. Physiol., 29: 393 (1946).
- (¹³) BERGER L., SLEYN M. W., COLOWICK S. P. e CORI C. F. - J. Gen. Physiol., 29: 379 (1946).
- (¹⁴) DIXON M. e NEEDHAM D. M. - Nature, 158: 432 (1946).
- (¹⁵) SOLS A. e CRANE R. K. - J. Biol. Chem., 206: 925 (1954).
- (¹⁶) COLOWICK S. P. e KALCKAR H. M. - J. Biol. Chem., 148: 117 (1943).