
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIOVANNI RODIGHIERO, FRANCESCO DALL'ACQUA,
GIANFRANCO CHIESA

**Ricerche sul comportamento del bergaptene di fronte
ad acidi ribonucleici**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.4, p. 510-514.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_4_510_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_4_510_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Chimica. — *Ricerche sul comportamento del bergaptene di fronte ad acidi ribonucleici*^(*). Nota di GIOVANNI RODIGHIERO, FRANCESCO DAL'ACQUA e GIANFRANCO CHIESA, presentata^(**) dal Corrisp. L. MUSAJO.

SUMMARY. — Bergapten (5-methoxy-psoralen), which forms complexes in darkness with native DNA and, by irradiation at 3.655 Å, photoreacts giving a C₄-cyclo-addition reaction with the pyrimidine bases of the macromolecule, forms complexes and photoreacts only in an extremely reduced extent with the ribosomal RNA (having mainly a random coil structure) and also with s-RNA, which rather has a completely ordered double helix structure, but structural parameters different from those of native DNA. It is evident that furocoumarins for making complexes and for photoreacting with nucleic acids need critical structural parameters of the macromolecule, such as those present in the B-form of native DNA.

Nelle ricerche sulle fotoreazioni tra furocumarine fotosensibilizzatrici ed acido desossiribonucleico (DNA), che da tempo vengono condotte in questo Istituto [1, 2, 3], è stato trovato che le furocumarine addizionate ad una soluzione acquosa di DNA nativo formano dei complessi di scarsa stabilità, che vengono completamente decomposti precipitando con alcool etilico il DNA dalla soluzione [4, 5]. In seguito ad irradiazione a 3.655 Å avviene invece una fotoreazione che porta ad una C₄-cicloaddizione delle furocumarine alle basi primidiniche (timina e citosina) del DNA [5, 6, 7]. Il comportamento delle furocumarine appare condizionato dalla struttura della macromolecola. Entrambi gli eventi su accennati si realizzano in misura ben evidente con DNA nativo che, come è noto, possiede una struttura secondaria a doppia elica, mentre avvengono in misura molto ridotta con DNA denaturato, in cui la struttura è disordinata, ed anche con acido ribonucleico (RNA) ribosomico, che ha pure una struttura in gran parte disordinata [5].

Pertanto abbiamo ritenuto di grande utilità studiare il comportamento di una furocumarina fotosensibilizzatrice (bergaptene, o 5-metossi-psoralene) sia al di fuori di ogni irradiazione che per irradiazione a 3.655 Å, di fronte all'acido ribonucleico solubile (s-RNA), che possiede una struttura in massima parte ordinata a doppia elica, pur avendo parametri strutturali diversi e peso molecolare molto più piccolo rispetto al DNA [8, 9].

RISULTATI.

Interazioni non fotochimiche. — Le ricerche sono state condotte usando i procedimenti già da noi seguiti in precedenti ricerche sulle interazioni tra furocumarine e DNA [4] ed usati anche da altri Autori nello studiare le inte-

(*) Ricerche condotte nell'Istituto di Chimica farmaceutica dell'Università di Padova, Cattedra di Chimica Farmaceutica applicata.

(**) Nella seduta dell'8 aprile 1967.

razioni tra idrocarburi aromatici policiclici e DNA [10, 11, 12]. Abbiamo precisamente determinato la solubilizzazione del bergaptene in acqua e nelle soluzioni di acido ribonucleico ed inoltre abbiamo studiato l'influenza della presenza dell'acido ribonucleico sulle caratteristiche spettrofotometriche del bergaptene. Sono stati usati due campioni di s-RNA, uno, indicato con I, estratto da lievito ed uno, indicato con II, estratto da *E. Coli* ⁽¹⁾ ed inoltre, per confronto, un campione di RNA ribosomico, estratto dal lievito secondo Chrestfield et al. [13]. I dettagli sperimentali dei procedimenti usati sono stati descritti in altro lavoro [4]; i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella I. Da essi appare chiaramente che entrambi i campioni di s-RNA saggiati, come anche il campione di RNA ribosomico, hanno una scarsissima capacità di legare il bergaptene; infatti le quantità di questa furocumarina solubilizzata più che in acqua sono molto piccole ed i rapporti fra numero di nucleotidi presenti nell'RNA e numero di molecole di bergaptene solubilizzate più che in acqua sono alti (da 191 a 1417 secondo il campione di RNA e la presenza o meno di sali; vedi Tabella I). Ricordiamo che con DNA nativo tale rapporto era circa 40, e si manteneva costante con il variare della concentrazione del DNA [4].

TABELLA I.

Solubilizzazione del bergaptene in soluzioni acquose 0,1 % di acidi ribonucleici.

Acidi nucleici	Solvente	Bergaptene solubilizzato più che in acqua		Fosforo nucleico contenuto nella soluzione m μ M/ml (cP)	$\frac{cP}{cBerg}$	ϵ_{313} del bergaptene nelle soluzioni
		μ g/ml	m μ M/ml (cBerg)			
—	acqua	—	—	—	—	15.250
—	soluz. salina (*)	—	—	—	—	15.250
s-RNA I . . .	acqua	2,05	9,50	2887	304	13.185
s-RNA I . . .	soluz. salina (*)	0,44	2,04	2887	1417	15.250
s-RNA II . . .	acqua	1,68	7,76	2416	311	13.080
s-RNA II . . .	soluz. salina (*)	0,59	2,73	2416	884	15.250
RNA ribosomico	acqua	2,84	13,10	2505	191	12.530

(*) Soluzione acquosa contenente NaCl 10^{-2} M e MgCl₂ 10^{-2} M.

Anche le lievi modificazioni delle proprietà spettrofotometriche del bergaptene indicano la scarsa entità delle interazioni. Abbiamo osservato infatti solo deboli diminuzioni dei valori di ϵ_{313} del bergaptene e nessuno spostamento del massimo di assorbimento (313 m μ).

(1) Ci sono stati forniti entrambi dalla Ditta Calbiochem, Los Angeles, California (U.S.A.).

I saggi in presenza di $\text{NaCl } 10^{-2} \text{ M}$ e di $\text{MgCl}_2 10^{-2} \text{ M}$ sono stati condotti per operare nelle condizioni in cui secondo Seidel e Cramer [14] la struttura a doppia elica dell's-RNA è più stabile. In queste condizioni però, come mostra la Tabella I, noi abbiamo osservato non un aumento, ma una diminuzione della capacità dell's-RNA di legare il bergaptene; questo effetto è d'altra parte analogo a quello che si osserva anche nel DNA, quando la forza ionica della soluzione viene aumentata [5].

Fotoreazioni a 3.655 Å. - Anche in questo caso sono stati seguiti dei procedimenti già da noi usati per studiare le fotoreazioni tra DNA e furocumarine [5]. La lunghezza d'onda impiegata è stata quella di 3.655 Å, di uso comune nelle ricerche di fotosensibilizzazione con furocumarine, con la quale nella fotoreazione tra DNA e bergaptene è stata ottenuta la più alta resa quantica [16]. È stato usato bergaptene- O^{14}CH_3 , marcato cioè al carbonio del metossile, da noi preparato [5], con una radioattività specifica di $8,5 \cdot 10^8 \text{ dpm/mM}$.

Le soluzioni acquose 0,1 % degli acidi ribonucleici (3 ml), addizionate di 5 $\mu\text{g/ml}$ di bergaptene marcato, poste entro cristallizzatori di vetro del diametro di cm 3, erano irradiate con una lampada Philips HPW 125, che emette quasi esclusivamente a 3.655 Å, posta alla distanza di 16 cm.

Dopo l'irradiazione la soluzione veniva addizionata di cloruro sodico fino a concentrazione 1 M e l'acido nucleico veniva precipitato con 2 vol. di alcool etilico, lavato ancora con alcool etilico e ripreso con 3 ml di acqua. Questa soluzione (0,2 ml), addizionata di alcool assoluto (3 ml) e di soluzione toluenica di scintillatore (3 ml), veniva usata per la determinazione della radioattività mediante un contatore a scintillazione liquida SELO, Milano. In base ai dati ottenuti, si è potuto calcolare la quantità di bergaptene legata all'acido nucleico per effetto dell'irradiazione.

Per determinare la resa quantica delle fotoreazioni, le soluzioni (2 ml) venivano poste entro vaschette di quarzo per spettrofotometro, con cammino ottico di 1 cm, filtrandole preventivamente su Millipore SM-5 μ (2) e misurandone la trasmittanza a 3.655 Å. L'irradiazione delle soluzioni veniva compiuta con la stessa lampada Philips HPW 125, usando un numero complessivo di quanti uguale a $6,2 \cdot 10^{19}$. Le determinazioni attinometriche erano eseguite con il metodo al ferriossalato potassico di Hatchard e Parker [15]. Le soluzioni irradiate venivano quindi trattate come detto più sopra. La resa quantica è stata calcolata come rapporto fra il numero di molecole di bergaptene legate al DNA dopo l'irradiazione ed il numero di quanti assorbiti dalla soluzione in tutto il periodo di irradiazione.

I risultati sono riportati nella Tabella II.

Appare evidente che la fotoreattività dei due campioni di s-RNA è simile a quella dell'RNA ribosomico. Essa è molto inferiore a quella del DNA nativo,

(2) Per ovviare all'adsorbimento dovuto alla membrana filtrante si scartavano i primi 10 ml di soluzione filtrata.

TABELLA II.

Fotoreazioni fra bergaptene e acidi ribonucleici.

Acido nucleico	Solvente	µg di bergaptene legati ad 1 mg di acido nucleico		Resa quantica della fotoreazione
		dopo 2 ore di irradiazione	dopo 4 ore di irradiazione	
s-RNA-I	acqua	0,090	0,180	$1,45 \cdot 10^{-4}$
s-RNA-I	soluzione salina (*)	0,041	0,087	$0,87 \cdot 10^{-4}$
s-RNA-II	acqua	0,155	0,340	$2,80 \cdot 10^{-4}$
s-RNA-II	soluzione salina (*)	0,032	0,057	$0,70 \cdot 10^{-4}$
RNA ribosomico .	acqua	0,075	0,155	$1,35 \cdot 10^{-4}$

(*) Soluzione acquosa contenente NaCl 10^{-2} M e MgCl₂ 10^{-2} M.

che abbiamo studiato in precedenti ricerche. Ricordiamo che la resa quantica della fotoreazione tra DNA e bergaptene, determinata in analoghe condizioni sperimentali [5, 16] è risultata circa 10 volte più grande di quelle trovate per i due campioni di s-RNA e di RNA ribosomico in soluzione acquosa.

La presenza di sali ha anche in questo caso influenza negativa, cioè diminuisce sia la quantità di bergaptene che si lega, sia la resa quantica.

CONCLUSIONI.

Dai risultati ottenuti appare chiara la scarsa capacità del bergaptene di formare complessi con gli acidi ribonucleici ed anche di fotoreagire con essi, non solo quando essi hanno una struttura disordinata (RNA ribosomico), ma anche quando hanno una struttura ordinata a doppia elica (s-RNA). Occorre concludere che per la formazione del complesso è necessaria non solo la presenza di una struttura ordinata a doppia elica, ma anche di parametri strutturali ben determinati, come quelli che sono presenti nel DNA nativo (forma B) e che sono diversi da quelli presenti nell's-RNA.

Le nostre ricerche precedenti hanno mostrato che gli effetti fotosensibilizzanti delle furocumarine sono legati ad una fotoreazione con DNA; i presenti risultati ci portano a concludere che in tali effetti fotosensibilizzanti gli acidi ribonucleici, nelle loro varie forme, non sembrano essere direttamente interessati.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] L. MUSAJO e G. RODIGHIERO, « *Experientia* », *18*, 153 (1962).
- [2] L. MUSAJO, *Proceedings of the III International Congress of Radiation Research, Cortina d'Ampezzo, 26 giugno–2 luglio 1966*, in corso di stampa.
- [3] L. MUSAJO e G. RODIGHIERO, « *Rend. Accad. Naz. Lincei* », *38*, 591 (1965).
- [4] F. DALL'ACQUA e G. RODIGHIERO, « *Rend. Accad. Naz. Lincei* », *40*, 411 (1966).
- [5] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO, A. BRECCIA, F. DALL'ACQUA e G. MALESANI, « *Photochemistry and Photobiology* », *5*, 739 (1966).
- [6] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO e F. DALL'ACQUA, « *Experientia* », *21*, 24 (1965).
- [7] L. MUSAJO, F. BORDIN, G. CAPORALE, S. MARCIANI e G. RIGATTI, « *Photochemistry and Photobiology* », in corso di stampa.
- [8] M. SPENCER, W. FULLER, M. H. F. WILKINS e G. L. BROWN, « *Nature* », *194*, 1014 (1962).
- [9] R. LANGRIDGE e P. I. GOMATOS, « *Science* », *141*, 694 (1963).
- [10] E. BOYLAND e B. GREEN, « *Brit. J. Cancer* », *16*, 347, 507 (1962).
- [11] A. M. LIQUORI, R. DE LERMA, F. ASCOLI, C. BOTRÈ e M. TRASCIATTI, « *J. Mol. Biol.* », *5*, 521 (1962).
- [12] J. K. BALL, J. A. MCCARTER e M. F. SMITH, « *Biochim. Biophys. Acta* », *103*, 275 (1965).
- [13] A. M. CRESTFIELD, K. C. SMITH, e F. W. ALLEN, « *J. Biol. Chem.* », *216*, 185 (1955).
- [14] H. SEIDEL e F. CRAMER, « *Biochim. Biophys. Acta* », *108*, 367 (1965).
- [15] C. G. HATCHARD e C. A. PARKER, « *Proc. Roy. Soc. (London)* », *235*, 518 (1956).
- [16] F. DALL'ACQUA, S. MARCIANI e G. RODIGHIERO, « *Photochemistry and Photobiology* », in corso di stampa.