
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

LUIGI MUSAJO, GIOVANNI RODIGHIERO

**I vari modi di legarsi covalentemente delle
furocumarine fotosensibilizzatrici cutanee al DNA
per azione dell'ultravioletto lungo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.2, p. 197–204.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_2_197_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.

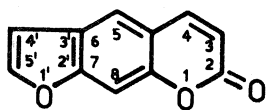
*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

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

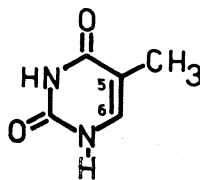
Chimica biologica. — *I vari modi di legarsi covalentemente delle furocumarine fotosensibilizzatrici cutanee al DNA per azione dell'ultravioletto lungo.* Nota di LUIGI MUSAJO e GIOVANNI RODIGHIERO, presentata (*) dal Corrisp. L. MUSAJO.

SUMMARY. — For several years the Authors have found that the skin-photosensitizing furocoumarins photoreact with the nucleic acids, especially with native DNA, by irradiation at 365 nm. The studies of these photoreactions revealed that a C₄-cyclo-addition reaction takes place between pyrimidine bases and furocoumarins. Pyrimidine bases photoreact always with their 5,6-double bond, while furocoumarins can covalently bind engaging either their 4', 5'- or their 3,4-double bond or both the 4',5'- and 3,4-double bonds.

Il comportamento delle furocumarine sotto l'azione delle radiazioni ultraviolette è stato studiato da vari Autori [1, 2, 3, 4, 5, 6]: irradiate allo stato solido o sciolte in vari solventi o in matrice di ghiaccio, esse danno luogo a C₄-ciclo-dimeri, nella formazione dei quali sono costantemente impegnate le posizioni 3 e 4; non si conoscono dimeri in cui siano impegnate le posizioni 4' e 5'.



I
Psoralene



II
Timina

Invece per irradiazione in presenza di altri composti, le furocumarine possono dare prodotti di cicloaddizione con questi ultimi; C₄-ciclo-addotti al doppio legame 3,4 sono stati ottenuti con alcune olefine, mentre con alcuni chinoni si sono ottenuti sia C₄ - che C₃O-ciclo-addotti al doppio legame 4', 5' - delle furocumarine [4].

Particolarmente studiate da noi sono state in questi ultimi anni le fotoreazioni tra alcune furocumarine e le basi pirimidiniche che si trovano negli acidi nucleici (timina, citosina, uracile). Infatti alcuni anni fa [7, 8], dopo lunghe ricerche rivolte a studiare il meccanismo dell'attività fotobiologica

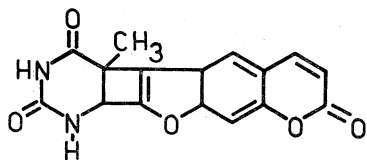
(*) Nella seduta del 20 febbraio 1971.

di un numeroso gruppo di furocumarine (le cosiddette furocumarine fotosensibilizzatrici cutanee), abbiamo trovato che queste sostanze per irradiazione a 365 nm danno una stabile combinazione con gli acidi nucleinici ed in particolare con DNA nativo (la reattività con RNA ribosomico è minore). La fotoreazione consiste in una C₄-ciclo-addizione delle furocumarine alle basi pirimidiniche del DNA [9, 10].

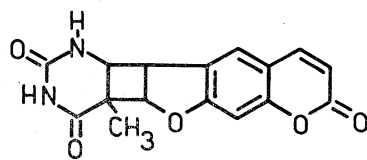
Le fotoreazioni tra furocumarine e basi pirimidiniche sono state quindi studiate sia usando le sostanze semplici, sia a livello degli acidi nucleinici. Sono state individuate varie modalità di dare la C₄-ciclo-addizione che portano alla formazione di diversi tipi di fotoaddotti.

Le basi pirimidiniche (sia isolate che nel DNA) fotoreagiscono sempre col doppio legame 5,6. Le furocumarine invece possono reagire o col doppio legame 4',5' (A) o con quello 3,4 (B); pertanto si possono avere due distinti tipi di fotoaddotti originati da una molecola di furocumarina ed una di base. Un terzo tipo è quello derivante dalla possibilità della furocumarina di reagire con due molecole di base pirimidinica (C).

A) *Fotoaddotti-4',5'*. La furocumarina impegna in questi il suo doppio legame 4',5'.



III



IV

Fotoaddotto-4', 5' psoralene-timina

Le due formule III e IV derivano dalla doppia possibilità della addizione tra le due molecole; inoltre va tenuto presente che ognuna delle due strutture riportate può esistere in una forma *sin* ed in una forma *anti* rispetto al piano definito dall'anello del ciclobutano. Pertanto quattro strutture isomere sono possibili per questo tipo di fotoaddotto.

Vari fotoaddotti di questo tipo sono stati isolati in seguito ad irradiazione a 365 nm di soluzioni acquose congelate delle sostanze: psoralene-timina, psoralene-uracile, bergaptene-timina, psoralene-timidina; si è constatato che il fotoaddotto psoralene-citosina subisce molto facilmente una deaminazione idrolitica trasformandosi nel fotoaddotto psoralene-uracile [9]. La costituzione di questi fotoaddotti è stata stabilita in base, oltre che all'analisi elementare, alle proprietà spettrofotometriche U.V. e R.M.N. [9].

Lo spettro u.v. del fotoaddotto-4',5' psoralene-timina è riportato nella fig. 1; esso indica che a 365 nm la sostanza ha ancora una certa capacità di assorbimento. La sostanza, osservata alla luce di Wood (365 nm), mostra una forte fluorescenza violetta. Irradiata a questa lunghezza d'onda essa

non subisce alcuna decomposizione; irradiata invece a lunghezze d'onda minori (254 nm) subisce una completa scissione ridando le sostanze di partenza, cioè la furocumarina e la base pirimidinica [9].

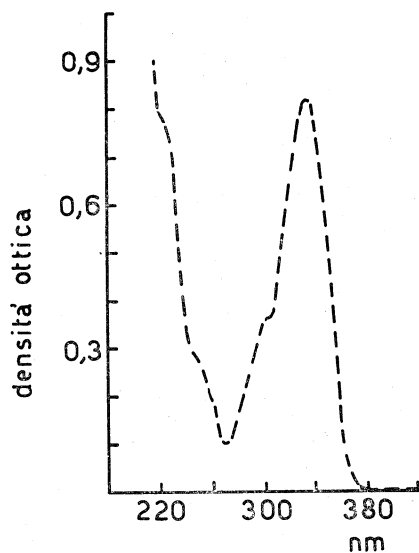


Fig. 1. - Spettro di assorbimento u.v. del fotoaddotto-4',5' psoralene-timina.

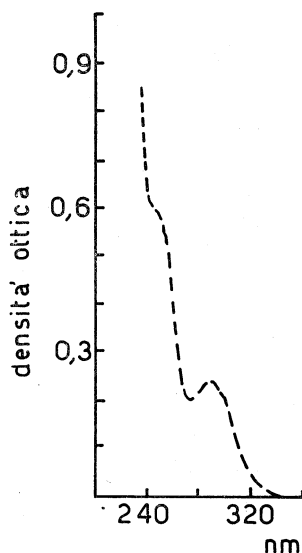
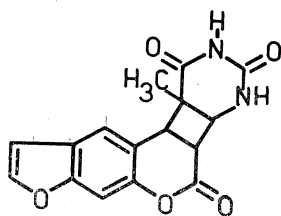
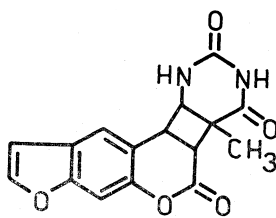


Fig. 2. - Spettro di assorbimento u.v. del fotoaddotto-3,4 psoralene-timina.

B) *Fotoaddotti-3,4*. Un secondo tipo di fotoaddotti è quello in cui la furocumarina impegna le posizioni 3,4.



V



VI

Fotoaddotto-3,4 psoralene-timina

Anche in tal caso, come per il fotoaddotto-4',5', sono possibili quattro strutture isomere.

Il fotoaddotto-3,4 psoralene-timina è stato isolato [11] dopo irradiazione a 365 nm di una soluzione acquosa di timina e psoralene; il suo spettro ultravioletto è riportato nella fig. 2: esso mostra che il composto non presenta assorbimento sopra 320 nm; osservato alla luce di Wood (365 nm) pertanto esso non è fluorescente.

Irradiato a 254 nm esso si decompone facilmente ridando la base e la furocumarina di partenza. Di questo fatto si è profittato per metterlo in

evidenza nella cromatografia su carta o su strato sottile: ad una prima osservazione in luce di Wood esso non è fluorescente, quindi non si rivela; se però lo si espone anche brevemente alle radiazioni di 254 nm, esso decomponendosi libera la furocumarina, la quale è fluorescente; la macchia del composto risulta quindi rivelabile con una seconda osservazione in luce di Wood [11].

Entrambi questi due tipi di fotoaddotti, oltre che essere stati ottenuti per irradiazione di furocumarine con basi semplici, sono stati anche isolati per idrolisi del DNA irradiato sempre a 365 nm in presenza di psoralene. Sono stati precisamente isolati 2 fotoaddotti-4',5' e cioè quello derivante da psoralene e timina e quello da psoralene e uracile, formatosi quest'ultimo, come già accennato, dal fotoaddotto psoralene-citosina, ed inoltre un fotoaddotto-3,4 psoralene-timina [12]. Risultava con ciò dimostrato che entrambi questi due tipi di fotoaddotti si formano anche quando la furocumarina fotoreagisce col DNA. Inoltre è stato accertato ancora che si formano anche quando la furocumarina fotoreagisce col DNA all'interno delle cellule; infatti dal DNA isolato da cellule del tumore ascitico di Ehrlich addizionate di psoralene ed irradiate a 365 nm, dopo idrolisi acida è stato possibile riconoscere la presenza del fotoaddotto-4',5' psoralene-timina [13].

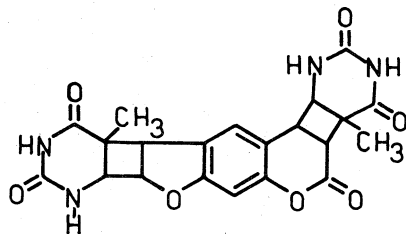
La formazione preferenziale dell'uno o dell'altro tipo di fotoaddotto nella fotoreazione tra furocumarine e basi pirimidiniche dipende dalle condizioni sperimentali in cui viene eseguita l'irradiazione. Ricerche approfondite sono state condotte sulla fotoreazione psoralene-timina, con l'uso di sostanze marcate [14]; si è visto che l'irradiazione a 365 nm in soluzione acquosa a temperatura ambiente porta alla formazione solo di fotoaddotti-3,4; tre diversi fotoaddotti di questo tipo sono stati sicuramente individuati, mentre un quarto è stato intravisto solo in tracce. Invece l'irradiazione delle sostanze in matrice di ghiaccio ha portato alla formazione sia di un fotoaddotto-4',5' che degli stessi tre (più un quarto in tracce) fotoaddotti-3,4 che si formano in soluzione acquosa non congelata.

Bevilacqua e Bordin [15] hanno inoltre studiato l'influenza della presenza di ossigeno sulle fotoreazioni tra psoralene e varie basi pirimidiniche in soluzione acquosa, seguendo per via spettrofotometrica gli andamenti cinetici delle fotoreazioni: è risultato che la presenza dell'ossigeno ha un effetto di « quenching » sulle fotoreazioni. Lo stesso effetto è stato ottenuto anche eliminando l'ossigeno dalle soluzioni ed aggiungendo ioni paramagnetici (Co^{++} , Ni^{++} , Mn^{++}). Questi risultati indicano che lo stato eccitato della furocumarina che è interessato nelle fotoreazioni è il tripletto.

Per quanto riguarda la formazione dei due tipi di fotoaddotti nelle fotoreazioni con DNA, è stato trovato [16] che nel DNA irradiato in presenza di psoralene tritiato, i fotoaddotti-4',5' sono presenti in quantità 3 volte superiore a quella dei fotoaddotti-3,4.

C) *Fotodiaddotti-4',5'; 3,4*. Esiste la possibilità di formazione di un terzo tipo di fotoaddotto, e cioè quello in cui una molecola di furocumarina è legata a due molecole di base pirimidinica, impegnando contemporanea-

mente le posizioni 4',5' e 3,4. A rigore si potrebbe anche fare una distinzione fra diaddotti in cui le due basi pirimidiniche sono uguali e diaddotti in cui sono diverse. Le costituzioni prevedibili per questi diaddotti sono naturalmente numerose; una di esse è rappresentata dalla formula VII.



VII

Finora nessun fotoaddotto di questo tipo è stato isolato ed analizzato; tuttavia sono state ottenute sicure prove sperimentali che essi si formano quando si irradia a 365 nm DNA nativo in presenza di determinate furocumarine.

Se si osservano gli spettri u.v. dei fotoaddotti, si vede che il fotoaddotto-4',5' (fig. 1) presenta un certo assorbimento a 365 nm; quindi esso, una volta formatosi nel DNA, per successiva irradiazione a 365 nm può ancora venir eccitato e può quindi ancora fotoreagire col doppio legame 3,4. Invece il fotoaddotto-3,4 (fig. 2), non presentando alcun assorbimento a 365 nm, non può ulteriormente fotoreagire per irradiazione a questa lunghezza d'onda.

Vari dati sperimentali recentemente ottenuti da Dall'Acqua, Marciani e Rodighiero [17] indicano la possibilità di questa doppia fotoreazione. Infatti:

a) Il DNA, irradiato in presenza di psoralene, acquista una fluorescenza violetta, dovuta alle molecole di furocumarina legate in 4',5'. Nel primo periodo di irradiazione si ha un aumento pressochè parallelo della quantità di psoralene legato al DNA e della fluorescenza dello stesso DNA; continuando l'irradiazione invece, mentre la quantità di psoralene legato continua ad aumentare i valori relativi alla intensità della fluorescenza dapprima divengono costanti e poi decrescono.

Un campione di DNA, irradiato in presenza di psoralene fino a raggiungere la massima intensità di fluorescenza e separato quindi dall'eccesso di psoralene che non aveva reagito, è stato irradiato di nuovo a 365 nm: mentre la quantità di psoralene legato è rimasta costante, i valori di intensità della fluorescenza hanno avuto un rapido decadimento, come è mostrato dalla fig. 3.

Questo comportamento della fluorescenza può essere spiegato ammettendo che alcune molecole di psoralene legate in 4',5' per successiva irradiazione abbiano reagito con un'altra base pirimidinica impegnando anche il doppio legame 3,4. Anche se nessun diaddotto è stato ancora isolato, in base alle proprietà dei fotoaddotti-3,4, è possibile prevedere che essi non siano fluorescenti se osservati a 365 nm; pertanto in questa esperienza la sua formazione può spiegare la caduta della fluorescenza.

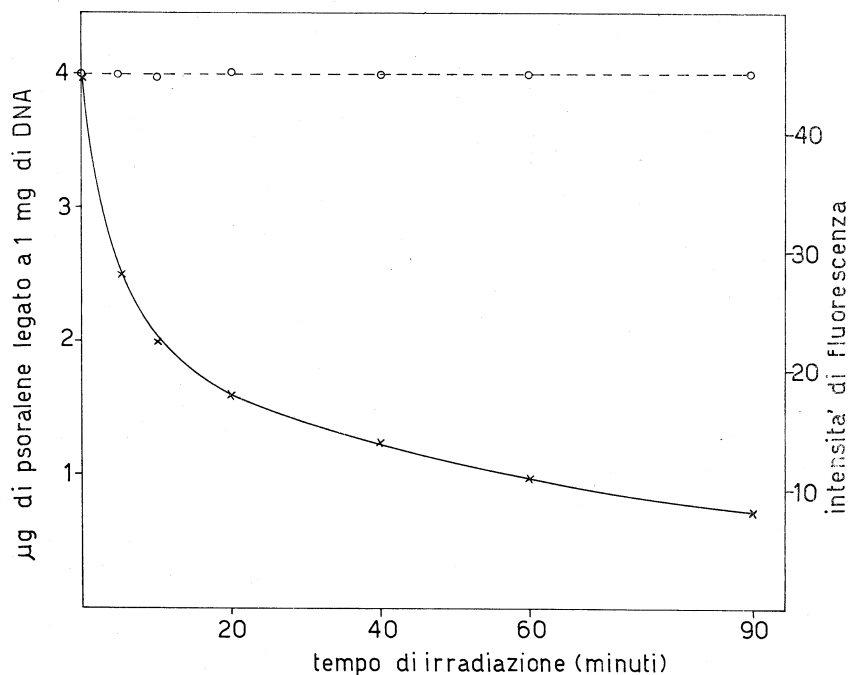


Fig. 3. - Risultati ottenuti irradiando a 365 nm un campione di DNA previamente irradiato alla stessa lunghezza d'onda in presenza di ^3H -psoralene ed isolato dall'accesso di furocumarina: --o--o-- quantità di ^3H -psoralene legato al DNA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DNA); --x--x-- intensità della fluorescenza (λ eccitante: 330 nm; λ max di fluorescenza: 400 nm).

b) È stata messa in evidenza la formazione di legami crociati fra i due fili del DNA quando il psoralene ed altre furocumarine vengono addizionate a DNA nativo ed irradiate a 365 nm. Infatti dallo studio delle curve di denaturazione termica e di renaturazione del DNA si è notato che, come mostra la fig. 4, mentre il DNA non irradiato, una volta denaturato per azione del calore e riportato gradualmente a temperatura ambiente, si renatura solo in piccola parte, dopo irradiazione in presenza di psoralene esso non solo si denatura ad una temperatura più alta, ma, riportato a temperatura ambiente, subisce una pressochè completa renaturazione. Tale comportamento è considerato come indice della formazione di legami crociati. Infatti possiamo pensare che nella denaturazione del DNA non trattato i due fili si separano completamente e quindi una loro riorganizzazione per assumere la configurazione originaria non è molto facile. Se esistono invece dei legami crociati tra i due fili, questi possono svolgersi, ma non separarsi completamente, per cui la loro riorganizzazione diviene molto più facile.

c) La formazione di legami crociati è stata posta in evidenza anche da Cole [18], osservando che la quantità di DNA a singolo filo che egli riusciva ad ottenere dal DNA termicamente denaturato diveniva molto piccola dopo irradiazione in presenza di 4,5',8-trimetil-psoralene.

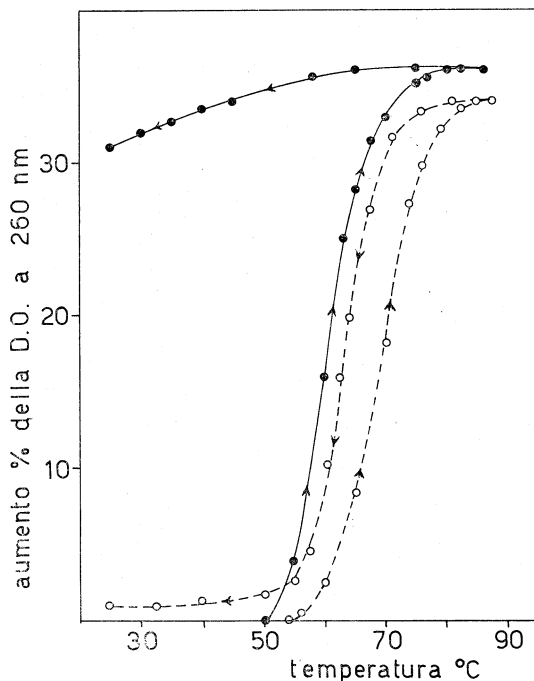


Fig. 4. — Risultati ottenuti misurando la densità ottica di soluzioni di DNA 0,05% contenenti NaCl 2 mM e 10 μ g/ml di psoralene aumentando progressivamente e poi diminuendo la temperatura: ●—● soluzione non irradiata; ○—○ soluzione irradiata 10 minuti a 365 nm (complessivamente $2,9 \times 10^{16}$ quanti/sec su 2 cm di soluzione).

d) Poiché la formazione di un legame crociato può essere ottenuto solo con un reattivo bifunzionale è chiaro che la sua formazione dimostra che la furocumarina reagisce con entrambi i suoi doppi legami.

La possibilità che questa doppia fotoreazione abbia luogo è messa in evidenza dalla fig. 5 (ricavata da modelli molecolari della Crystal Structure Limited, Inghilterra) che mostra una molecola di psoralene intercalata fra due

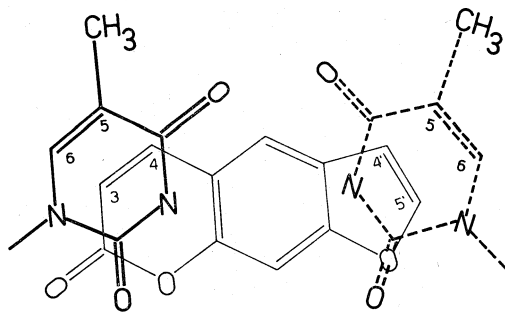


Fig. 5. — Rappresentazione di una molecola di psoralene intercalata tra due paia di basi nel DNA. Per semplicità sono riportate solo due timine appartenenti ai due opposti fili, tralasciando le due basi puriniche complementari. A motivo dell'intercalazione della molecola del psoralene, che ha provocato un allontanamento delle due coppie di basi, le due timine sono ruotate di 24°, anziché di 36°, come sono normalmente nel DNA.

coppie di basi nella struttura a doppia elica del DNA nativo; entrambi i doppi legami 4',5' e 3,4 risultano allineati con i doppi legami 5,6 di due timine appartenenti ai due fili opposti; la doppia fotoreazione può avvenire comportando solo piccoli spostamenti della normale struttura del DNA.

e) Anche altre furocumarine possono dare legami crociati; la facilità però con cui questi vengono formati varia molto da sostanza a sostanza, in dipendenza della loro struttura e delle relazioni spaziali che le molecole hanno con i doppi legami delle basi pirimidiniche quando esse sono intercalate nel DNA. Le furocumarine a struttura angolare, come angelicina e allo-psoralene, non formano legami crociati.

La formazione di diaddotti sembra si possa avere anche per irradiazione di furocumarine e basi pirimidiniche libere; si è visto infatti che nel corso della irradiazione a 365 nm di psoralene e timina in matrice di ghiaccio, la fluorescenza ha un andamento analogo a quello osservato nel DNA: l'intensità dapprima aumenta e poi diminuisce. Abbiamo in corso ricerche anche in questa direzione con lo scopo di isolare il o i diaddotti psoralene-timina.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. WESSELY e K. DINJASKI, «Monatsh.», 64, 131 (1934).
- [2] F. WESSELY e J. KOTLAN, «Monatsh.», 86, 430 (1955).
- [3] G. RODIGHIERO e V. CAPPELLINA, «Gazz. Chim. Ital.», 91, 103 (1961).
- [4] C. H. KRAUCH e S. FARID, «Chem. Ber.», 100, 1685 (1967).
- [5] G. RODIGHIERO, F. DALL'ACQUA e G. CHIMENTI, «Ann. Chimica», 58, 551 (1968).
- [6] S. MARCIANI, F. DALL'ACQUA, P. RODIGHIERO, G. CAPORALE e G. RODIGHIERO, «Gazz. Chim. Ital.», 100, 435 (1970).
- [7] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO e F. DALL'ACQUA, «Experientia», 21, 24 (1965).
- [8] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO, A. BRECCIA, F. DALL'ACQUA e G. MALESANI, «Photochem. Photobiol.», 5, 739 (1966).
- [9] L. MUSAJO, F. BORDIN, G. CAPORALE, S. MARCIANI e G. RIGATTI, «Photochem. Photobiol.», 6, 711 (1967).
- [10] L. MUSAJO e G. RODIGHIERO, «Photochem. Photobiol.», 11, 27 (1970).
- [11] L. MUSAJO, F. BORDIN e R. BEVILACQUA, «Photochem. Photobiol.», 6, 927 (1967).
- [12] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO, F. DALL'ACQUA, F. BORDIN, S. MARCIANI e R. BEVILACQUA, «Rend. Accad. Naz. Lincei», 42, 457 (1967).
- [13] L. MUSAJO, F. BORDIN, F. BACCICHETTI e R. BEVILACQUA, «Rend. Accad. Naz. Lincei», 43, 442 (1967).
- [14] F. DALL'ACQUA, S. MARCIANI, F. BORDIN e R. BEVILACQUA, «Ricerca scientifica», 38, 1094 (1968).
- [15] R. BEVILACQUA e F. BORDIN, in corso di stampa.
- [16] F. BORDIN, L. MUSAJO e R. BEVILACQUA, «Z. Naturforsch.», 24 b, 691 (1969).
- [17] F. DALL'ACQUA, S. MARCIANI e G. RODIGHIERO, «FEBS Letters», 9, 121 (1970).
- [18] R. S. COLE, «Biochim. Biophys. Acta», 217, 30 (1970).