

OSCILOGRAFICKÁ POLAROGRAFIE NUKLEOVÝCH KYSELIN

EMIL PALEČEK

Biofysikální ústav Československé akademie věd v Brně

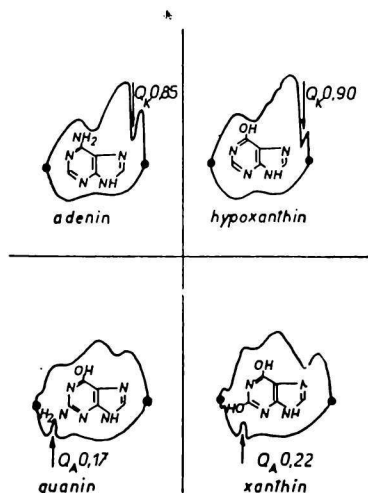
Byly nalezeny podmínky pro stanovení adeninu, guaninu, cytosinu, 5-methyleytosinu, thyminu, uracilu, hypoxanthinu atd. Oscilopolarograficky byla rovněž analysována vysoce polymerovaná kyselina desoxyribonukleová a některé její degradační produkty.

Polarografické chování basí nukleových kyselin zkoumal J. C. Heath [1], který zjistil, že všechny base kromě adeninu jsou polarograficky inaktivní. Zkoumali jsme tyto látky metodou oscilografické polarografie střídavým proudem a zjistili jsme, že všechny base — tedy adenin, guanin, cytosin, 5-methyleytosin, thymin, uracil, jakož i jim blízké látky hypoxanthin, xanthin a kyselina močová se projevují zářezy na křivkách $dE/dt = f_1(E)$ [2].

Většinu měření jsme prováděli na přístroji Polaroskop P 524 s rtuťovou kapkovou elektrodou. Jako základní elektrolyty jsme zvolili kyselinu sírovou, chlorid draselný, hydroxyd sodný a mravenčan amonný. Mravenčanu amonného se totiž používá buď samotného, nebo ve směsi s kyselinou mravenčí jako elučního činidla při dělení nukleotidů na anexech. Dále budeme hovořit o reaktivitě námi zkoumaných látek v takových prostředích, kde poskytují nejlépe analyticky použitelné zářezy.

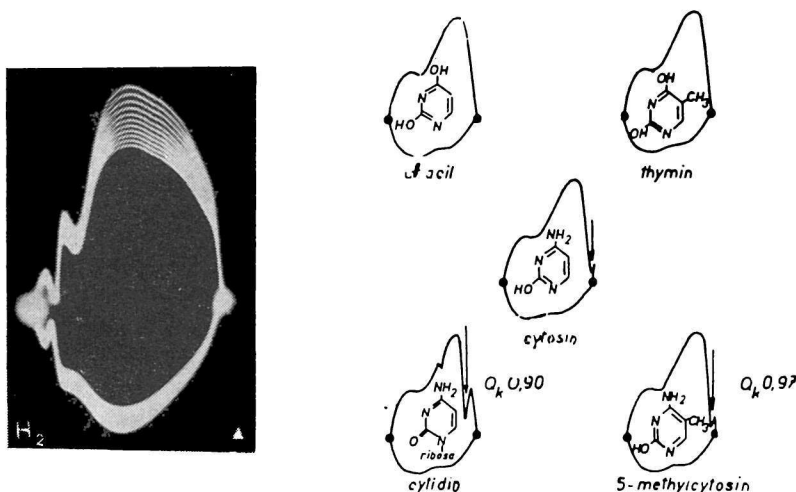
Výsledky a diskuse

Oscilogramy purinů jsou uvedeny na oscilogramu 1. Poloha zářezu adeninu a guaninu se nemění, je-li analysována volná base nebo odvozený nukleosid anebo nukleotid. Oscilo-



Oscilogram 1. Oscilopolarografické křivky $dE/dt = f_1(E)$ a strukturní vzorce purinů.

gram adeninu a hypoxanthinu je zaznamenán v prostředí kyseliny sírové, guaninu a xanthinu v mravenčanu amonném. Adenin lze takto dokazovat v koncentraci nižší než 10^{-6} M, ostatní base řádově v koncentraci 10^{-5} M. Na oscilogramu 1 můžeme rovněž pozorovat určitý vztah mezi strukturou látky a oscilopolarografickou křivkou závislosti $dE/dt = f_1(E)$ — výměna aminoskupiny za hydroxylovou vede k malému posunutí zářezu k negativnějším hodnotám, substituce v poloze 2 způsobuje vznik anodického zářezu. Všechny hlavní zářezy se projevují i na křivkách s tryskovou elektrodou a na první křivce. Kyselina močová (2,6,8-trioxypurin) se svými oscilogramy podobá xanthinu a hypoxanthinu, typický oscilogram poskytuje však v prostředí hydroxydu sodného (oscilogram 2).



Oscilogram 2. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ kyseliny močové. 50 μ g kyseliny močové/ml 1 M-NaOH; $i = 0,4$ mA. — Oscilogram 3. Oscilopolarografické křivky $dE/dt = f_1(E)$ a strukturní vzorce pyrimidinů.

Na oscilogramu 3 jsou znázorněny oscilogramy pyrimidinových látek. Zatím co se uracil a thymin v prostředí kyseliny sírové neprojevují, cytosin se projevuje slabým, velmi negativním zářezem; zářez 5-methylcytosinu je již o něco pozitivnější (oscilogram 4) a cytidin, kyselina cytidylová i kyselina desoxycytidylová dávají dobře měřitelný zářez, jehož pomocí lze uvedené látky dokazovat ještě v koncentraci 10^{-5} M. Uvedené pyrimidinové base poskytují zářezy v prostředí NaOH.

Všechny zmíněné látky lze úspěšně analysovat ve směsi: guanosin vedle xanthinu (oscilogram 5), hypoxanthin vedle adeninu (oscilogram 6). Jsou možné i jiné kombinace látek — přítomnost nadbytku uracilu a thyminu neruší.

Ve snaze charakterisovat elektrodové děje odpovědné za vznik pozorovaných zářezů zjistili jsme závislost hloubky zářezů na teplotě (graf 1) a jejich frekvenční charakteristiku. Zářezy kyseliny guanylové a xanthinu považujeme za kapacitní, čemuž nasvědčuje rovněž větší hloubka zářezu méně rozpustného guanosinu než kyseliny guanylové v ekvimolární koncentraci, přesahování křivky základního elektrolytu křivkou s aktivní látkou v okolí zářezu při vyšší koncentraci, tvar zářezu při maximální koncentraci látky a závislost na stejnosměrné složce. Zářezy cytidinu a hypoxanthinu nelze zařadit do žádné

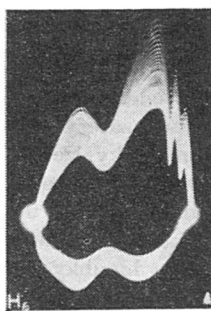
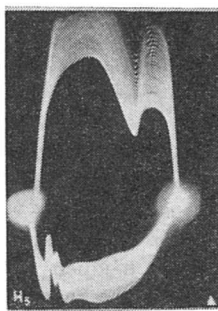
ze známých skupin elektrodoových dějů. Jde o látky podle literatury [1, 3, 4, 5] polarograficky neredukovatelné, jejichž zářezy v katodické větvi nejsou působeny artefakty; žádná z jejich charakteristik nenasvědčuje tomu, že jde o zářezy kapacitní.



Oscilogram 4. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ 5-methylcytosinu v mravenčanu amonném. 100 μg 5-methylcytosinu/ml 1 M- HCOONH_4 ; $i = 0,6$ mA.

Metody bylo použito v našich laboratořích při analýze nukleotidových frakcí získaných z kolonek iontoměniče a k identifikaci neznámých skvrn na chromatogramu. Kromě toho jí použil D. Kaláb [6] při řešení důležitých otázek v mikrobiologii.

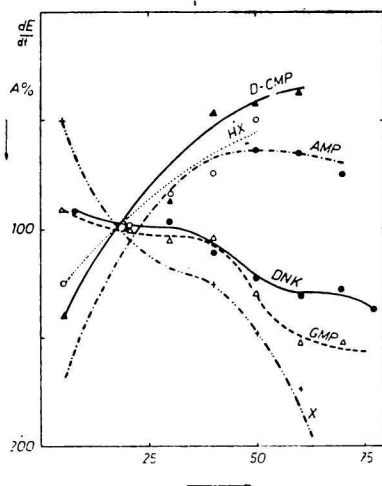
Další pozornost jsme věnovali oscilografické polarografii vysoce polymerované kyseliny desoxyribonukleové (dále DNK). DNK jsme isolovali z telecího thymu a z krysích slezin metodou J. M. Gullanda a spol. a E. R. M. Kaye a spol. [7, 8]. Kromě vlastních preparátů jsme měli k dispozici DNK z ascites tumoru, z thymu a slezin krys z Onkologického ústavu v Bratislavě, které nám poskytli dr. Hnilica a dr. Holoubek. Jako základního



Oscilogram 5. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ guanosinu a xanthinu v mravenčanu amonném. 50 μg xanthinu + 40 μg guanosinu/ml 1 M- HCOONH_4 s 0,01 M- HCOOH ; $i = 0,4$ mA. — Oscilogram 6. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ adeninu a hypoxanthinu v kyselině sírové. 2,5 μg adeninu + 10 μg hypoxanthinu/ml 2 M- H_2SO_4 .

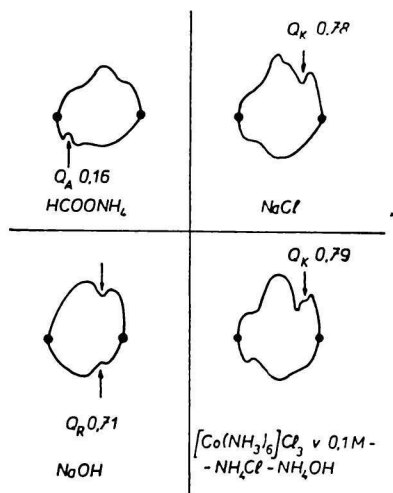
Graf 1. Závislost hloubky zářezu na teplotě.

D-CMP — kyselina desoxycytidylová, HX — hypoxanthin, AMP — kyselina adenylová, GMP — kyselina guanylová, X — xanthin, DNK — kyselina desoxyribonukleová, A — vzdálenost od osy spojující oba krajní body oscilogramu k hrotu zářezu, $A\%$ — A vyjádřeno v %, za 100 % považována hodnota A příslušného zářezu při 20 °C.



elektrolytu jsme použili stejných roztoků jako při analýze složek nukleových kyselin s výjimkou kyseliny sírové.

Oscilogramy DNK v různých prostředích jsou na oscilogramu 7. Pomocí měření hloubky zářezů DNK v mravenčanu amonném a chloridu sodném jsme sledovali denaturaci DNK — denaturaci se hloubka zářezů zvětšuje. Naopak zářez vznikající v prostředí louhu, s časem, při teplotě 37 °C, mizí. Vzhledem k tomu, že za těchto podmínek nemůže

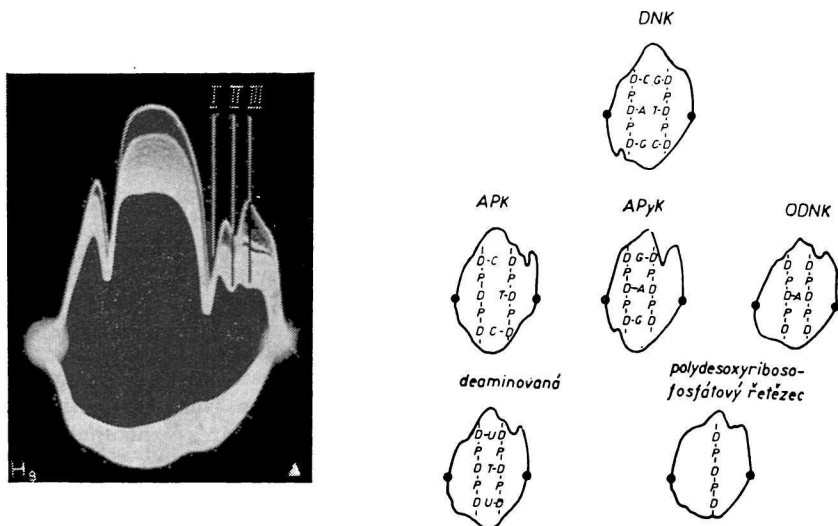


Oscilogram 7. Oscilopolarografické křivky $dE/dt = f_1(E)$ kyseliny desoxyribonukleové v různých základních elektrolytech.

dojít k porušení žádné z basí ani k větší hydrolyse, předpokládáme, že pro vznik tohoto zářezu je třeba určité neporušené jemné struktury DNK. Reaktivity DNK v prostředí nikelnaté a Brdičkovy kobaltité soluce jsme využili pro důkaz DNK a bílkovin vedle sebe. Bílkoviny reagují, jak zjistil D. Kaláb [9, 10], v uvedených prostředích již ve vel-

mi nízké koncentraci; zjistili jsme, že přítomnost nadbytku DNK tuto reakci neruší, takže lze stanovit velmi malá množství bílkoviny v preparátech DNK (oscilogram 8).

Všimněme si nyní více oscilogramů DNK v prostředí mravenčanu amonného (oscilogram 9) — na první pohled je patrné, že anodický zářez se velmi podobá zářezu kyseliny guanylové v téže prostředí (oscilogram 1). Shoduje se však nejen poloha obou zářezů, ale i závislost na teplotě (graf 1), na koncentraci základního elektrolytu a na stejnosměrné



Oscilogram 8. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ kyseliny desoxyribonukleové a bílkoviny v Brdičkově kobaltité soluci. 900 μg kyseliny desoxyribonukleové + 5 μg albuminu z plasmu/ml 10^{-3} M- $[\text{CO}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ v 0,1 M- $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$. I — zářez kobaltu, II — zářez kyseliny desoxyribonukleové, III — zářez bílkoviny. — Oscilogram 9. Oscilopolarografické křivky $dE/dt = f_1(E)$ kyseliny desoxyribonukleové a jejich degradačních produktů v prostředí mravenčanu amonného.

DNK — kyselina desoxyribonukleová, APK — kyselina apurinová, APyK — kyselina apirimidinová, ODNK — oxydovaná kyselina desoxyribonukleová.

Uvnitř oscilogramů je schematicky znázorněna struktura analysované látky.

A — adenin, G — guanin, C — cytosin, T — thymin, D — desoxyribosa, P — kyselina fosforečná.

složce. Tyto údaje nasvědčují tomu, že anodický zářez DNK je způsoben kyselinou desoxyguanylovou vázanou v molekule DNK. Abychom si mohli tento názor potvrdit, odstranili jsme z molekuly DNK puriny, tedy adenin a guanin metodou C. Tamma a spol. [11] za velmi mírných podmínek (pH 1,6; 37 °C; 20 hod.). Na oscilogramu 8 takto vzniklé apurinové kyseliny se anodický zářez neprojevil. Vznikly však nové zářezy v katodické větvi, z nichž nejnegativnější se velmi podobá zářezu kyseliny cytidylové. Po deaminaci apurinové kyseliny působením kyseliny dusité za pokojové teploty tento zářez vymizel (oscilogram 8). Positivnější zářez pozorovatelný na oscilogramu této deaminované kyseliny se s klesajícím pH posunuje k negativnějšímu potenciálu, takže kolem pH 3 není již pozorovatelný, kdežto negativnější zářez je za těchto podmínek dobře měřitelný, stejně jako zářez kyseliny cytidylové. Podle předběžného sdělení S. Takemury [12] vypracovali jsme metodu přípravy apyrimidinové kyseliny, souhrn

z referátu C. R. Bayleyho a A. S. Jonese [13] nám sloužil za základ pro vypracování metody přípravy oxydované DNK. Na oscilogramu DNK zbavené thyminu a cytosinu můžeme pozorovat anodický zářez kyseliny desoxyguanylové — naproti tomu zářez kyseliny desoxycytidylové není přítomen (oscilogram 9). Oscilogram oxydované DNK připravené oxydací manganistanem draselným v prostředí kyselého uhličitanu sodného, v níž byly všechny base kromě adeninu oxydativně odbourány, potvrzuje rovněž náš předpoklad, že anodický zářez DNK je působen vázanou kyselinou desoxyguanylovou a katodický zářez apurinové kyseliny kyselinou desoxycytidylovou [10]. Podobně oscilogram pouhého polydesoxyribofosfátového řetězce (oscilogram 9), který jsme sestrojili podle námi vypracovaného postupu z oxydované DNK.

Všechny zmíněné látky i řetězce jsme oscilopolarografovali rovněž v ostatních základních elektrolytech — své výsledky zde však pro přehlednost neuvádíme.

Podívejme se nyní, jaký význam mohou mít naše výsledky pro bližší poznání struktury DNK. Na oscilogramu 9 jsou znázorněny některé naše oscilogramy, o nichž jsme již hovořili, a schéma polynukleotidového řetězce. Vidíme, že v neporušené DNK je schopna se oscilopolarograficky projevovat pouze kyselina desoxyguanylová, zatím co kyselina desoxycytidylová vázaná v její molekule je inaktivní. Tento fakt lze snad vysvětlit tak, že část purinového kruhu guaninu, která je pro vznik anodického zářezu velmi důležitá, je v molekule v blízkosti jejího povrchu, kdežto analogická část cytosinu v povrchu není přítomna. Pro vznik anodického zářezu kyseliny desoxyguanylové je důležitá aminoskupina v poloze 2, o níž se předpokládá, že se neúčastní tvorby vodíkových můstků [14]. Naproti tomu aminoskupina cytosinu v poloze 6, která je velmi důležitá pro vznik katodického zářezu, tvoří v DNK vodíkový můstek. V apurinové kyselině, kde je dvojspirálovitá struktura úplně porušena, není kyselina desoxycytidylová nijak stericky blokována, takže se může projevit její oscilopolarografická aktivita. Oscilogramy ostatních degradačních produktů naší domněnku potvrzují. Adenin ani thymin v mravenčanu amonném zářezy neposkytují, takže z uvedených oscilogramů nelze usuzovat na jejich polohu v molekule DNK.

ОСИЛЛОГРАФИЧЕСКАЯ ПОЛЯРОГРАФИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ЕМИЛ ПАЛЕЧЕК

Биофизический институт Чехословацкой академии наук
в Брно

Выводы

Основания нуклеиновых кислот аденин, гуанин, цитозин, 5-метилцитозин, тимин, урацил и пуриновые вещества, гипоксантин, ксантин и мочевая кислота были исследованы методом осциллографической полярографии переменным током в среде $1\text{ M-H}_2\text{SO}_4$, HCOONH_4 , KCl и NaOH . Все приведенные вещества дают на кривых $dE/dt = f_1(E)$ зубцы. Большинство из них, как и производные нуклеозиды и нуклеотиды можно определить отдельно или в смесях при концентрациях 10^{-5} M даже 10^{-6} M .

Была приготовлена высоко полимерная десоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) в различных средах и ее осциллополярографическое поведение исследовано в средах HCOONH_4 , NaCl , NaOH в растворе кобальта по Брличке и в соли двухвалентного никеля. Было определено, что во всех приведенных средах ДНК проявляется характеристическими зубцами. В растворах кобальта и никеля возможно определить белки

и ДНК возле себя даже при большом избытке ДНК. Анализ ДНК в остальных средах дает возможность следить за ходом её денатурации. Для выяснения, которые группы в молекуле ДНК ответственны за возникновение зубца, приготовилось несколько продуктов деградации ДНК (апуриновая кислота, апириимидиновая кислота, окисленная ДНК ит. д.) и исследовалась их осциллополярографическая активность. Определилось, что анодный зубец возникающий в среде HCOONH_4 причинен десокси-гуаниловой кислотой, соединенной в молекуле ДНК, и он емкостного происхождения. На основании приобретенных данных было высказано предположение о некоторых деталях строения десоксирибонуклеовой кислоты.

OSZILLOGRAPHISCHE POLAROGRAPHIE DER NUCLEINSÄUREN

EMIL PALEČEK

Biophysikalisches Institut

an der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften in Brno

Zusammenfassung

Oszillographisch wurden die Basen der Nucleinsäuren Adenin, Guanin, Cytosin, 5-Methylcytosin, Thymin, Uracil und Purinstoffe, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure in Milieu von 1 M- H_2SO_4 , HCOONH_4 , KCl und NaOH untersucht. Alle hier erwähnten Substanzen bieten an der Kurve $dE/dt = f_1(E)$ Einschnitte. Die Mehrzahl dieser Verbindungen, sowie auch abgeleitete Nucleoside und Nucleotide, können auch in Mischungen im Konzentrationsbereich von 10^{-5} M bis 10^{-6} M bestimmt werden.

Es wurde eine hoch polymerisierte Desoxyribonucleinsäure aus verschiedenen Quellen hergestellt und ihr Verhalten in HCOONH_4 , NaCl, NaOH, Brdička Co(III)-Lösung und Ni-Lösung studiert. Es wurde festgestellt, dass DNK in allen Lösungen charakteristische Einschnitte bietet. In Co(III)- und Ni-Lösung kann der Beweis der Proteine neben DNK auch bei grösserem Überschuss von DNK durchgeführt werden. Die Analyse der DNK in anderen Grundlösungen ermöglicht das Verfolgen ihrer Denaturation. Um die Erklärung zu finden, welche Gruppe in der DNK die Bildung des Einschnittes verursacht, wurden einige Degradationsprodukte der DNK (Apurinsäure, Apyrimidinsäure, oxydierte DNK, usw.) hergestellt und ihre oszillographische Aktivität untersucht. Es wurde festgestellt, dass der anodische Einschnitt, der in Ammoniumformiat sichtbar ist kapazitiven Ursprung hat und dass er durch die Desoxyguanylsäure, die im Molekül der DNK gebunden ist, verursacht ist. Auf Grund der festgestellten Tatsache wurde eine Annahme über einige Details der Struktur der Desoxyribonucleinsäure ausgesprochen.

OSCILLOGRAPHIC POLAROGRAPHY OF NUCLEIC ACIDS

EMIL PALEČEK

Biophysical Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, Brno

Summary

The bases of nucleic acids adenine, guanine, cytosine, 5-methylcytosine, thymine, uracil and purine derivatives, hypoxanthine, xanthine and uric acid were examined by

means of the oscillopolarographic method with a. c. current in the medium of 1 M- H_2SO_4 , HCOONH_4 , KCl and NaOH. All of the mentioned substances yield incisions on the curves $dE/dt = f_1(E)$ and the majority of them, as well as the derived nucleosides and nucleotides, can be determined alone or in mixtures in the concentration range from 10^{-5} M to 10^{-8} M.

A highly polymerized desoxyribose nucleic acid was prepared from different sources and its oscillopolarographic behaviour was examined in the medium of HCOONH_4 , NaCl, NaOH, Brdička's cobaltic solution and in a nickel II-salt. It was found that in all the mentioned media DNK yields characteristic incisions. In the cobalt(III)- and nickel(II)-solution both the proteins and DNK can be proved even in a great excess of DNK. The analysis of DNK in the other media enables us to follow the course of its denaturation. In order to elucidate which groups in the DNK molecule are responsible for the formation of the incisions, several degradation products of the DNK were prepared (apurinic acid, apyrimidinic acid, oxidized DNK etc.) and their oscillopolarographic activity was followed. It was found that the anodic incision observed in the ammonium formate solution is caused by the desoxyguanylic acid bound in the DNK molecule, and is of the capacity nature. On the basis of these observations a hypothesis concerning some details of the structure of the desoxyribose nucleic acid was made.

LITERATURA

1. Heath J. C., *Nature* 158, 23 (1946). — 2. Paleček E., *Naturwiss.* 45, 186 (1958). — 3. Cavaliere L. F., Lowy B. A., *Arch. Biochem. Biophys.* 35, 83 (1952). — 4. Götz-Luthy N., Lamb R., *J. Pharm. Pharmacol.* 8, 410 (1956). — 5. Březina M., Zuman P., *Polarografie v lékařství, biochemii a farmácii*, Praha 1952, 375. — 6. Kaláb D., *Chem. zvesti* 14, 823 (1960). — 7. Gulland J. M., Jordan D. O., Threllfall C. J., *J. Chem. Soc.* 1947, 1129. — 8. Kay E. R. M., Simmons N. S., Dounce A. L., *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1724 (1952). — 9. Kaláb D., *Naturwiss.* 44, 350 (1957). — 10. Kaláb D., Spisy Přírodovědecké fakulty Masarykovy university, Brno, No 387, 1957, 1—15. — 11. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.* 195, 49 (1952). — 12. Takemura S., *Biochim. Biophys. Acta* 29, 447 (1958). — 13. Bayley C. R., Jones A. S., *Trans. Faraday Soc.* 55, 492 (1959). — 14. Chargaff E., Davidson J. N., *The Nucleic Acids*, New York 1955, 480.

Diskusní příspěvky

P. Zuman znovu zdůrazňuje názor, že klasická a oscillografická polarografie se mají a musí doplňovat. Oběma metodami se má pracovat paralelně. U purinových látek, kde nebyly zjištěny kapacitní efekty, nedoporučuje spoléhat na údaje z klasické polarografie podle Heathe, nýbrž uvážít i práci Lambové, která zjistila katodické vlny u $-1,5$ V. Považuje za nutné prostudovat chování desoxyribonukleových kyselin v přítomnosti kobaltu a bílkovin klasickou polarografií.

E. Paleček odpovídá, že u purinů šlo jen o jeden, a to hypoxanthin, dále zkoumali cytidin, a to jak oscillografickou polarografií s vnuceným proudem, tak i s vnuceným napětím. Výsledky jsou ve shodě. Chování nukleových kyselin v přítomnosti bílkovin a kobaltu studoval pomocí klasické polarografie H. Berg a G. Ruttkay-Nedecký. Autora zajímají především praktické aplikace v biochemii.

R. Kalvoda praví, že snižování kapacitních zářezů s teplotou je nejistým kritériem, neboť například u papaverinu byla zjištěna opačná závislost.

P. Zuman vybízí k prostudování mechanismu redukce adeninu, který v kyselých roztocích nemá dávat polarografickou vlnu. Přednášející odpovídá, že pěkný zářez se tvoří v roztocích H_2SO_4 a mizí kolem pH 3.

Adresa autora:

Prom. chemik Emil Paleček, C. Sc., Brno, Královopolská 135, Biofysikální ústav ČSAV.