

ОСЦИЛЛОПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ДЕЗОКСИГУАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ДРУГИХ ПУРИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Э. ПАЛЕЧЕК, Б. ЯНИК

Институт биофизики Чехословацкой академии наук в Брно

Aby mohla být blíže objasněna oscilopolarografická reakce desoxyribonukleové kyseliny, bylo sledováno oscilopolarografické chování desoxyguanylové kyseliny a některých jejích derivátů.

В наших предыдущих работах мы использовали метод осциллографической полярографии [1—6] для изучения нуклеиновых кислот. Свое внимание мы обратили на активность ДНК в среде HCOONH_4 . В настоящее время считают, что ДНК состоит из двух спиралей, взаимно соединенных водородными связями посредством парных оснований, состоящих из аденина с тиминем и гуанина с цитозином. В среде HCOONH_4 ДНК образует зубец в анодной области кривой, который обусловлен, как мы определили, дезоксигуаниловой кислотой, связанной в молекуле ДНК. Свободная дезоксицитидиловая кислота дает в той же среде катодный зубец, который у нативной ДНК не наблюдается. Только тогда, когда из молекулы удалим пурины, или когда тепловой денатурацией разделим обе спирали, можно наблюдать зубец дезоксицитидиловой кислоты (рис. 1). Это явление можно объяснить тем, что часть оставшегося гуанина

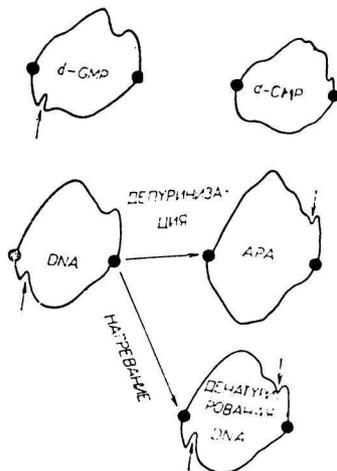


Рис. 1. $dE/dt = f_1(E)$ кривая дезоксирибонуклеиновой и апуриновой кислот и дезоксиинуклеотидов в среде 1 м- HCOONH_4 .

d-GMP	дезоксигуаниловая кислота (д-ГМФ)
d-CMP	дезоксицитидиловая кислота (д-ЦМФ)
DNA	дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)
АРА	апуриновая кислота

находится вблизи поверхности молекулы ДНК; в то время как та же часть д-ЦМФ стерически блокирована.

Для уточнения нашей рабочей гипотезы нам нужно знать механизм электродного процесса, вызывающий анодный зубец д-ГМФ и катодный зубец д-ЦМФ (рис. 2).

Из прежних наблюдений мы знаем, что анодный и катодный зубцы д-ГМФ и д-ЦМФ возникают не только на ртутном капельном электроде, но также и на струйчатом электроде и на первой кривой. Второй катодный зубец д-ЦМФ, наоборот, на струйчатом электроде и первой кривой не наблюдается.

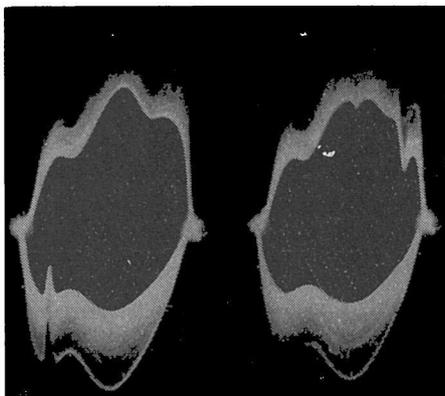


Рис. 2. $dE/dt = f_1(E)$ кривая дезоксигуалиновой и дезоксицитидиловой кислот.
 а) $40 \mu_2$ д-ГМФ (мл 1 м- HCOONH_4);
 б) $110 \mu_2$ д-ЦМФ (мл 1 м- HCOONH_4).

Остановимся на осциллографическом поведении д-ГМФ. Анодный зубец на осциллограмме д-ГМФ возникает также и на первой кривой (рис. 3), но когда электрод не поляризован до потенциала крайней отрицательной точки, зубец исчезает. Поэтому мы считаем, что при этом потенциале на электроде возникает вещество, которое в ходе дальнейшей поляризации на нем адсорбируется и дает анодный зубец. Это означает, что мы имеем дело с осциллографическим артефактом. Затем мы изучали влияние

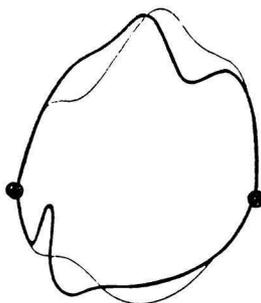


Рис. 3. $dE/dt = f_1(E)$ кривая дезоксигуалиновой кислоты и основного электролита.

природы фона на осциллографические зубцы д-ГМФ и определили, что анодный зубец возникает также в среде HCOOLi , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, CH_3COOLi и в фосфатном буфере; в то время как в небуферной среде NaCl , KCl , и в Na_2SO_4 мы его не наблюдаем. Однако его можно наблюдать в 1 м- H_2SO_4 , где мы наблюдаем еще катодный зубец,

до потенциала которого нужно поляризовать электрод, чтобы возник анодный зубец. Анодный зубец наблюдается в довольно широком диапазоне рН; при более высоком рН этот зубец сдвигается к более положительным потенциалам, а его глубина уменьшается, при рН 9 анодный зубец исчезает. С повышением температуры глубина зубца уменьшается.

Для того, чтобы определить, какие группы молекул гуанина обуславливают осциллографический зубец, мы изучили осциллографическое поведение ряда пуриновых производных, некоторые из которых мы приготовили сами (рис. 4). На рис. 4 видно, что

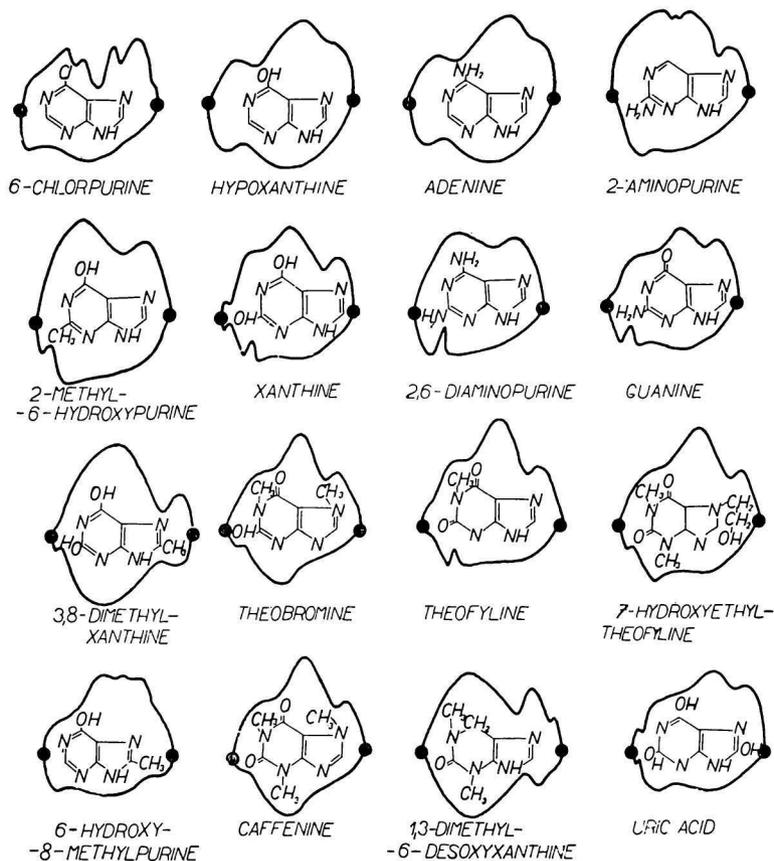


Рис. 4. Структурные формулы и осциллограммы производных пурина в среде 1 м- HCOONH_4 .

для образования анодного зубца требуется присутствие заместителя, находящегося в положении 2 и 6. При этом не важно является ли им $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, или CH_3 ; качественное изменение заместителя приводит только к перемещению потенциала зубца. При этом необходимо, чтобы положения 7 и 8 остались свободными. Когда заместители находятся в положении 1, 3 и 9, течение реакции не нарушается. Мы пробовали определить каким образом восстанавливается гуанин при потенциале отрицательной крайней точки и какой процесс обуславливает анодный зубец: имеем ли мы дело только с десорбцией продукта восстановления или также с его окислением. Прежде всего мы

приготовили восстановленный гуанин и теофиллин электролизом в 1 м- H_2SO_4 на свинцовом и ртутном катоде. Мы получили несколько продуктов восстановления, которые не дали ожидаемого анодного зубца. Мы определили, что в результате электровосстановления теофиллина возникает 2-дезокситеофиллин (рис. 4), и аналогичный продукт, вероятно, возникает при восстановлении гуанина.

Следующий опыт мы провели в той же среде с помощью висящей ртутной капли, которую мы катодно поляризовали в течение 10—20 секунд напряжением, соответствующим началу выделения водорода. Затем мы зарегистрировали анодную полярографическую кривую. Дезоксигуалиновая кислота, в этих условиях, дает хороший пик; потенциал которого приблизительно соответствует потенциалу анодного зубца. Когда напряжение, необходимое для электролиза, было повышено или понижено приблизительно на 300 мВ, пик исчез. Таким же образом реагировала в среде HCOONH_4 высокополимерная ДНК. Нужно отметить, что ни 2,6-диаминопурин, ни ксантин, ни теофиллин этих явлений не давали.

Таким образом нам удалось доказать, что при электролизе д-ГМФ в узкой области потенциалов на висящей капли ртути возникает вещество, окисляющееся при анодном процессе. Можно считать, что такой же процесс протекает на ртутном капельном электроде при его поляризации переменным током. Эти результаты также объясняют наши неудачи в опытах по изолированию продукта восстановления гуанина при макроэлектролизе, когда налагаемое напряжение было слишком высоким.

На основании полученных результатов мы делаем заключение, что процессы на электродах протекают, вероятно, следующим образом. При потенциале крайней отрицательной точки образуется продукт восстановления гуанина, в котором сохраняются оба гетероциклические кольца и который при анодной поляризации адсорбируется на электроде а затем окисляется, давая анодный зубец.

В последнее время Р. Калвода и другие [7, 8] нашли, что анодный зубец, похожий на зубец д-ГМФ, дают также вещества, не содержащие пуринового ядра. Результаты исследования Калводы показывают, что при отрицательных потенциалах возникает соединение со ртутью (напр. в случае ацетона), который затем окисляется [7]. Возможно, что д-ГМФ реагирует подобным же образом.

Autoři děkují dr. R. Kalvodovi za cenné rady a připomínky, dr. A. Černému z VÚFB, Praha za poskytnutí 2-methyl-6-hydroxypurinu a firmě California Corporation for Biochemical Research za vzorek 2-aminopurinu.

Выводы

С целью ближе объяснить осциллополярографическую реакцию дезоксирибонуклеиновой кислоты, исследовалось осциллополярографическое поведение дезоксигуаниловой кислоты и некоторых ее производных.

OSZILLOPOLAROGRAPHISCHES VERHALTEN DER DESOXYGUANYLSÄURE UND ANDERER PURINDERIVATE

E. PALEČEK, B. JANÍK

Biophysikalisches Institut an der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften
in Brno

Um das oszillopolarographische Verhalten der Desoxyribonucleinsäure näher klären zu können, wurden oszillopolarographisch die Desoxyguanylsäure und einige ihrer Derivate untersucht.

LITERATURA

1. Paleček E., Naturwiss. 45, 186 (1958). — 2. Paleček E., Collection 25, 2283 (1960). — 3. Paleček E., Nature 188, 656 (1960). — 4. Paleček E., Biochim. 25, 803 (1960). — 5. Paleček E., Chem. zvesti 14, 798 (1960). — 6. Paleček E., Biochim. Biophys. Acta 51, 1 (1961). — 7. Kalvoda R., Chem. zvesti 16, 245 (1962). — 8. Molnár L., Molnárová K., Benická E., Chem. zvesti 14, 783 (1960).

Dr. Emil Paleček, Brno, Královopolská 135, Biofyzikální ústav ČSAV.

Diskussionsbeiträge

H. Berg erwähnt, dass bei den Verbindungen vom kleinen Molekulargewicht die Kurven gut reproduzierbar sind. Jedoch bei den Verbindungen mit hohem Molekulargewicht ist immer eine gewisse Vorsicht bei der Interpretation der Ergebnisse notwendig, da die DNC eine sehr komplizierte Verbindung von einem Molekulargewicht grösserem als $2 \cdot 10^6$ ist, deren Zusammensetzung variieren kann. Es wurde weiter gefragt, ob Unterschiede in den Oszillopolarogrammen der DNK beobachtet wurden, die aus verschiedenem Material hergestellt wurde.

E. Paleček antwortet, dass bei den Versuchen mit der DNS, die aus den bakteriellen Kulturen oder verschiedenen Tiergeweben vorbereitet wird, qualitativ immer dieselbe Kurve bekommen wurde; der Einschnitt ist durch die Desoxyguanylsäure, die in allen Proben anwesend ist, verursacht.