

Institut Chemii Podstawowych, Akademia Medyczna w Lublinie.
Zakład Chemii Fizjologicznej. Wydział Lekarski.
Kierownik: prof. dr med. Tomasz Borkowski

Zbigniew PRASAŁ

Aktywność oscylopolarograficzna niskocząsteczkowych komponent kwasów nukleinowych

Осциллополярографическая активность молекулярных компонентов в нуклеиновых кислот

Oscillopolarographic Activity of Low-Molecular Weight Nucleic Acid Components

Jak wiadomo, podstawowymi składnikami struktury kwasów nukleinowych są cztery zasady: adenina, cytozyna, tymina/uracyl i gwanina. Do niedawna sądzono (1), że spośród wymienionych zasad jedynie adenina jest polarograficznie aktywna. Ostatnio wykazano (9), że wszystkie zasady podlegają redukcji na kropłowej elektrodzie rtęciowej. Rozpoznanie tych zasad metodą oscylopolarograficzną jest również możliwe w nukleozydach i nukleotydach, ponieważ ryboza i dezoksyryboza oraz reszty fosforanowe nie ulegają redukcji w ugrupowaniu nukleotydom w warunkach polarograficznego pomiaru (5). Mogą one jedynie wpływać na gęstość elektronową, dyfuzję i adsorpcję nukleozydu lub nukleotydu i w konsekwencji nieco zmieniać ich oscylopolarograficzny profil.

Celem naszej pracy jest wykazanie aktywności oscylopolarograficznej niskocząsteczkowych komponent kwasów nukleinowych w różnych wartościach pH i temperatury.

MATERIAŁ I METODY

Stosowane w badaniach zasady pirymidynowe i purynowe, nukleozydy i nukleotydy (Calbiochem, Loewengraben, Szwajcaria) oraz jednorodne polinukleotydy: inozyny (poly I) i urydynowy (poly U) (Miles Chem. Comp. Corp., Indiana, USA) oznaczano w następujących roztworach podstawowych: 1) 0,1 M mrówczan amonu doprowadzony 0,017 M buforem fosforanowym (Na) do pH 7,0; 2) 1 N kwas siarkowy i 3) 1 N NaOH.

Stężenie wszystkich badanych składników za wyjątkiem polinukleotydów i DNA w odniesieniu do pojedynczej substancji wahało się w granicach $2,5 \cdot 10^{-4}$ — $3 \cdot 10^{-4}$ M. Stężenie polinukleotydu urydynowego (poly U) wynosiło 0,8 mg/ml, a stężenie polinukleotydu inozynowego (poly I) — 0,4 mg/ml.

Roztwór wysokopolimeryzowanego DNA z grasicy cięłej (Sigma Chem. Comp., St. Louis, USA) przygotowano w stężeniu 250 μ g/ml w 0,1 M mrówczanie amonu i 0,025 M buforze fosforanowym (Na) o pH 7.

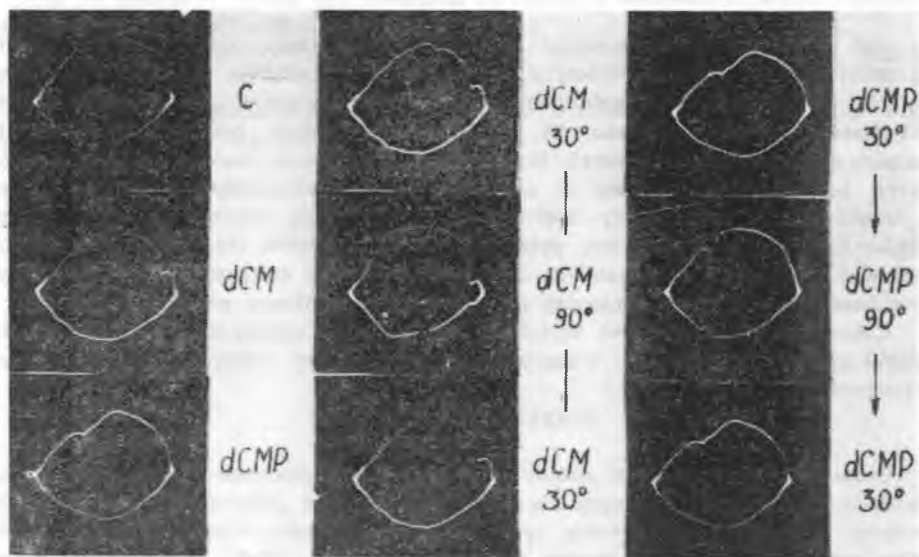
Roztwory przenoszono do termostatowanego naczynka polarograficznego z rtęciową anodą denną i po ustaleniu temperatury w granicach $\pm 0,1^\circ$ wysycano roztwór przez 10 min. strumieniem azotu uprzednio pozbawionym domieszek tlenu w płuczkach z płynem Fiesera. Obserwacji wcięć dokonywano na ekranie polaroskopu LF 600 (Laboratorni Přístroje, Praga, Czechosłowacja), a zdjęć oscylogramów z ekranu za pomocą aparatu Exacta Varex - 1000 na filmie o wysokiej czułości.

Szklane naczynko polarograficzne (wysokość 60 mm, średnica 15 mm) posiadało górne gumowe zamknięcie, przez które przechodziła kapilara (dł. 150 mm, średnica otworu 0,06—0,08 mm) kapiącej katody rtęciowej i plastikowa rurka o średnicy 1 mm, służąca do odprowadzania nadmiaru azotu. Dwie szklane rurki wlutowane do ściany bocznej naczynka poprzez płaszcz wodny służyły do doprowadzenia azotu i do usuwania roztworu po ukończonym doświadczeniu.

Czas trwania kropli rtęci wynosił 2 sek. i był regulowany automatycznie. Natężenie prądu zmiennego wynosiło 0,3 mA, czułość pozioma 5, czułość pionowa 1 : 3 lub 1 : 2.

WYNIKI BADAŃ

Obliczone na podstawie oscylogramów (ryc. 1, kolumna lewa) wartości Q^* wcięcia katodowego dla cytozyny (C), dezoksycytydyny (dCM) i kwa-



Ryc. 1. Wpływ temperatury na obraz oscylopolarograficzny pochodnych cytozyny przy pH 7,0; C — cytozyna, dCM — dezoksycytydyna, dCMP — kwas dezoksycytydino-5'-fosforowy

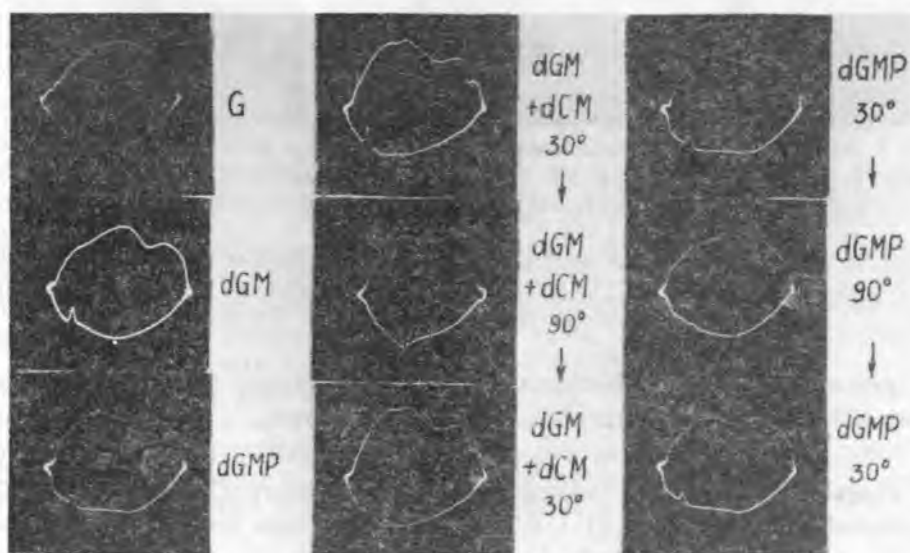
Effect of temperature on the oscillopolarographic behaviour of cytosine derivatives at pH 7,0; C — cytosine, dCM — deoxycytidine, dCMP — deoxycytidine-5'-monophosphate acid

$$Q^* = \frac{\text{odległość od lewego punktu końcowego do wierzchołka wcięcia}}{\text{odległość między obydwojma punktami końcowymi krzywej}}$$

su dezoksycytydino-5'-fosforowego (dCMP) wyniosły odpowiednio: 0,35, 0,89 i 0,37.

Podczas ogrzewania roztworów dCM i dCMP nastąpiło pogłębienie wcięcia katodowego i w temp. 90° przyrost głębokości wcięcia wyniósł 50% dla dCM i 21% dla dCMP. Ochłodzenie tych roztworów do temp. 30° spowodowało całkowity powrót kształtu krzywej i głębokości wcięcia do stanu pierwotnego.

Obserwowane wcięcia anodowe, symetryczne z katodowym na oscylogramie dCMP w temp. 90° i DNA w temp. 90° (ryc. 1 i ryc. 3, kolumny prawe) było wynikiem procesów elektrodowych, zachodzących poza powierzchnią elektrody kroplowej (7).

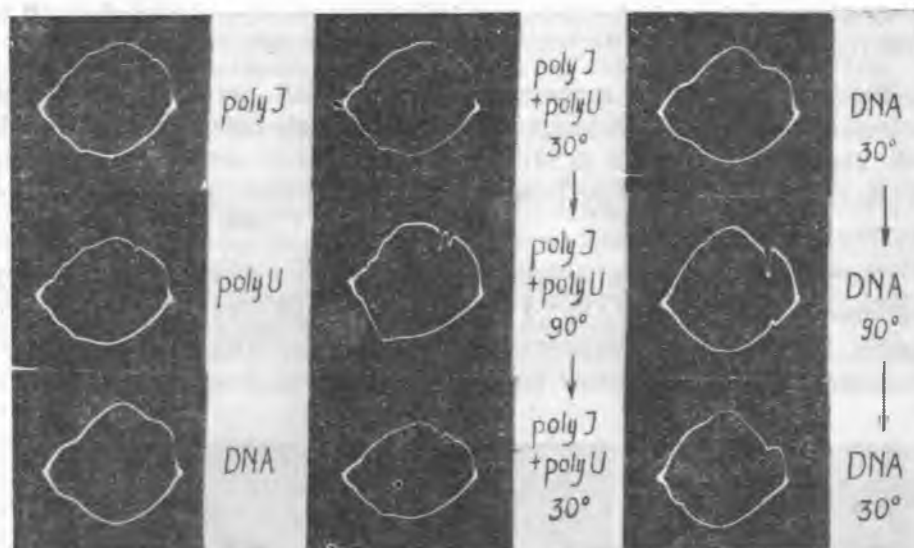


Ryc. 2. Wpływ temperatury na obraz oscylpolarograficzny pochodnych gwaniny i cytozyny przy pH 7,0; G — gwanina, dGM — dezoksygwanozyna, dGMP — kwas dezoksygwanozyno-5'-fosforowy, dCM — dezoksycytydina

Effect of temperature on the oscillographic behaviour of guanine and cytosine derivatives at pH 7,0; G — guanine, dGM — deoxyguanosine, dGMP — deoxyguanosine-5'-monophosphate acid, dCM — deoxycytidine

W szeregu gwaniny (ryc. 2, kolumna lewa) dezoksygwanozyna (dGM) i kwas dezoksygwanozyno-5'-fosforowy (dGMP) tworzyły ostre wcięcia anodowe o wartości Q równej 0,18. Oscylogram dGMP różnił się od dGM płytkim wcięciem katodowym o wartości $Q = 0,81$.

Wcięcie anodowe charakteryzujące dGM i dGMP w podwyższonej temp. 90° zanikło i po ochłodzeniu roztworu do temp. 30° powróciło



Ryc. 3. Wpływ temperatury na obraz oscylopolarograficzny polinukleotydów i kwasu dezoksyrybonukleinowego przy pH 7,0; poly I — polinukleotyd inozynowy, poly U — polinukleotyd urydynowy, DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy z grasicj cielęcej

Effect of temperature on the oscilopolarographic behaviour of polinucleotides and deoxyribonucleic acid at pH 7,0; poly I — polyinosinic acid, poly U — polyuridylic acid, DNA — deoxyribonucleic acid from calf thymus

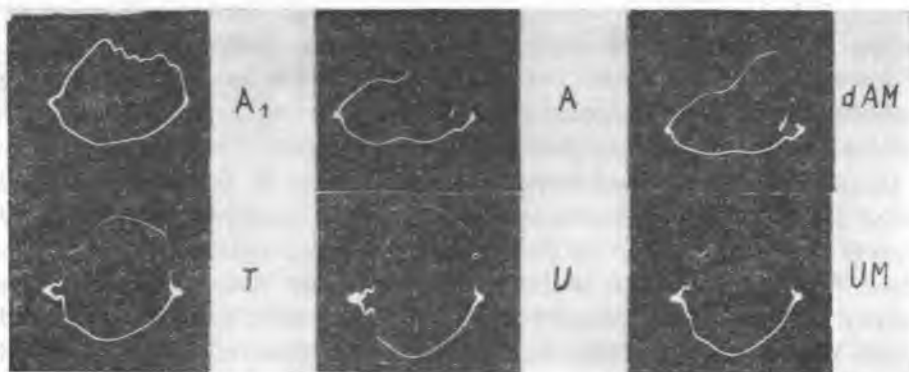
do pierwotnego stanu. Natomiast wcięcie katodowe dCM i dCMP w temp. 90° pogłębiło się (ryc. 2, kolumna środkowa).

Polinukleotyd inozynowy (poly I) i polinukleotyd urydynowy (poly U) charakteryzowały się jednym wcięciem katodowym o wartościach Q odpowiednio równych: 0,81 i 0,70 (ryc. 3, kolumna lewa). Wcięcia polinukleotydów w temp. 90° uległy ponad 3-krotnemu pogłębieniu i po ochłodzeniu do temp. 30° powróciły do stanu wyjściowego.

DNA natywny w danych warunkach nie tworzył wcięć na krzywej oscylopolarograficznej lecz w miarę ogrzewania zaczęło powstawać wcięcie katodowe, które w temp. 90° osiągnęło największą głębokość w porównaniu z niskocząsteczkowymi składnikami. Po ochłodzeniu roztworu DNA do temp. 30° wcięcie powyższe zmalało, lecz nie powróciło do swego pierwotnego stanu (ryc. 3, kolumna prawa).

Adenina (A₁) przy pH 7,0 tworzyła pięć płytkich wcięć katodowych i jedno anodowe (ryc. 4, kolumna lewa). W środowisku kwaśnym na oscylogramie adeniny (A) i dezoksyadenozyny (dAM) powstało wcięcie katodowe o prawie tej samej wartości Q: 0,82 (A) i 0,81 (dAM) (ryc. 4, kolumna środkowa i kolumna prawa).

Tymina (T), uracyl (U) i urydyna (UM) (ryc. 4) dopiero w środowisku alkalicznym tworzyły wcięcia w katodowej i anodowej części krzywej w pobliżu lewego punktu końcowego. Dwa, chociaż słabo zaznaczone wcięcia katodowe uracylu (U) w porównaniu z jednym wcięciem tyminy (T) pozwoliły na odróżnienie tych dwóch zasad od siebie. Brak wcięcia anodowego na oscylogramie urydyny (UM) umożliwiał odróżnienie tej ostatniej od uracylu (U).



Ryc. 4. Aktywność oscylopolarograficzna niektórych zasad i ich nukleozydów w różnych wartościach pH i temperaturze 30°; A — adenina w 1 N H₂SO₄, A₁ — adenina w 0,1 M mrówczanie amonu i 0,017 M buforze fosforanowym o pH 7,0, dAM — dezoksyadenozyna w 1 N H₂SO₄, T — tymina w 1 N NaOH, U — uracyl w 1 N NaOH, UM — urydyna w 1 N NaOH

Oscilloscopic activity of some bases and their nucleosides in different values of pH and temperature 30°; A — adenine in 1 N H₂SO₄, A₁ — adenine in 0,1 M ammonium formate with 0,017 M sodium phosphate buffer (pH 7,0), dAM — deoxyadenosine in 1 N H₂SO₄, T — thymine in 1 N NaOH, U — uracil in 1 N NaOH, UM — uridine in 1 N NaOH

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Wykazanie aktywności oscylopolarograficznej składników kwasów nukleinowych starano się w miarę możliwości przeprowadzić w środowisku o pH 7,0, ażeby później w doświadczeniach termicznych w środowisku o tym samym pH porównać zachowanie się tych składników z zachowaniem DNA. Mrówczan amonu łącznie z buforem fosforanowym okazały się dogodnym medium podstawowym (10) do badania aktywności kwasów nukleinowych i ich strukturalnych składników przy pH 7,0.

W środowisku przy pH 7,0 ulegały redukcji: cytozyna, dezoksytydyna, kwas dezoksytydyno-5'-fosforanowy (ryc. 1), dezoksygwanozyna, kwas dezoksygwanozyno-5'-fosforanowy (ryc. 2) i polinukleotydy jednorodne: inozynowy i urydynowy (ryc. 3). Wymaga wyjaśnienia pochodzenie wcięcia anodowego dezoksygwanozyny, która nie wykazywała

wcięcia katodowego charakteryzującego redukcję, lecz wcięcie anodowe świadczące o utlenieniu. Zgodnie z danymi Janika i wsp. (4) wcięcie anodowe pochodnych gwaniny ma charakter artefaktu. Jest ono bowiem następstwem redukcji pierścienia gwaninowego przy potencjale w prawym punkcie końcowym, kolejnej adsorpcji zredukowanej postaci pierścienia gwaninowego na elektrodzie kroplowej podczas jej polaryzacji do dodatnich potencjałów i w końcu utlenienia w pobliżu lewego punktu. Pochodne puryny o podstawnikach w miejscach 2 i 6 i wolnych pozycjach 7 i 8 np. 2,6-dwuoksypuryna (ksantyna), 2-metylo-6-hydroksypuryna i 2,6-dwuoksy-3-metylopuryna (teofilina) dają podobne wcięcia anodowe o potencjale nieco bardziej dodatnim. Nie tworzą wcięcia anodowego 6-oksypuryna (hipoksantyna), 2,6-dwuoksy-3,7-dwumetylopuryna (kofeina) i 6-aminopuryna (adenina).

Podczas redukcji nukleozydów gwaniny (ryc. 2) i adeniny (ryc. 4) reszty dezoksyrybozy i fosfodezoksyrybozy nie miały wpływu na przesunięcie potencjału wcięcia. Natomiast w szeregu cytozyny (ryc. 1, kolumna lewa) stwierdzono wybitny wpływ reszty dezoksyrybozy i nieznaczny reszty fosfodezoksyrybozy na to przesunięcie. Mniejsza odległość reszty dezoksyrybozy od miejsc redukcji w pierścieniu pirymidynowym cytozyny w porównaniu z pierścieniem purynowym gwaniny i adeniny ułatwiała odciążenie elektronów (electron-withdrawing effect) z miejsc redukcji przez pierścień beta-furanozowy pentozy (5).

Adenina ulegała redukcji w środowisku kwaśnym (1) (ryc. 4). Pięć słabo zaznaczonych wcięć katodowych i jedno anodowe wcięcie adeniny przy pH 7,0 miały charakter pojemnościowo-dyfuzyjny. Przemawiało za tym pogłębienie wcięcia anodowego i trzeciego wcięcia katodowego (licząc od prawego punktu końcowego) w temp. 90° i zanik reszty wcięć w tej temperaturze (obserwacje nie zostały zilustrowane oscylopolarogramem). Czy sześć wcięć adeninowych przy pH 7,0 sygnalizowały sześcieelektronowy mechanizm elektroredukcji adeniny sugerowany przez Smitha i wsp. (13), czy była to tylko przypadkowa zbieżność, trudno rozstrzygnąć.

Oprócz adeniny nie udało się wykazać aktywności oscylopolarograficznej przy pH 7,0 również dla tyminy i uracylu. Tymina i uracyl badane polarograficznie nie ulegają redukcji lecz w środowisku alkalicznym tworzą fałę anodową uwarunkowaną powstaniem połączeń z rtęcią (8). Zgodnie z tym na oscylogramach tych zasad powstawały wcięcia w anodowej i katodowej części krzywej w pobliżu lewego punktu końcowego (ryc. 4). Dezoksyurydyna, kwas urydylowy, tymidyna i kwas tymidylowy nie dają takich wcięć (6), natomiast urydyna (UM) (ryc. 4) tworzyła jedno wcięcie katodowe położone blisko lewego punktu końcowego.

Przy ocenie procesów elektrodowych konieczne jest stwierdzenie, czy wcięcia na oscylogramie są następstwem dyfuzji, efektów pojemnościowych lub kinetycznych. Badanie zależności zachowania się wcięcia od temperatury i częstotliwości prądu zmiennego umożliwia ustalenie charakteru wcięcia (2).

W pracy niniejszej zajmowano się badaniem zależności głębokości wcięcia od temperatury. Zauważono, że w temp. 90° (ryc. 2 — kolumna środkowa) głębokość wcięcia pochodnych cytozyny wzrastała, a pochodnych gwaniny ulegała likwidacji w tej temperaturze. Silny wzrost głębokości wcięcia wraz ze wzrostem temperatury dowodzi charakteru kinetycznego wcięcia, natomiast słaby wzrost głębokości wcięcia wraz ze wzrostem temperatury — charakteru dyfuzyjnego. Spadek głębokości wcięcia wraz ze wzrostem temperatury świadczy o pochodzeniu pojemnościowym wcięcia uwarunkowanym wielkością adsorpcji substancji na elektrodzie kroplowej (3). Przy założeniu, że wzrost albo spadek rozpuszczalności badanych pochodnych cytozyny i gwaniny ze wzrostem temperatury jest tego samego rzędu, wcięciu katodowemu pochodnych cytozynowych należałoby przypisać charakter dyfuzyjny, a wcięciu anodowemu pochodnych gwaniny charakter pojemnościowy. Założenie powyższe wydaje się słuszne z dwóch powodów: po pierwsze, rozpuszczalność w wodzie w temp. 25° dezoksycytydyny i kwasu dezoksycytydyno-5'-fosforowego nie wiele jest większa od analogicznych pochodnych gwaniny (12), a po drugie roztwór w temp. 90° nie wykazywał objawów np. zmętnienia, które mogłyby świadczyć o zmniejszeniu rozpuszczalności badanych substancji i tym samym wzroście ich adsorpcji na powierzchni elektrody kroplowej.

Wzrost głębokości wcięcia w temp. 90° widoczny na oscylogramach polinukleotydów i DNA (ryc. 3) wskazywał również na dyfuzyjny charakter tych wcięć. Składniki strukturalne kwasów nukleinowych ogrzane do temp. 90° i z powrotem ochłodzone do temp. wyjściowej 30° nie uległy żadnym zmianom w przeciwieństwie do DNA. Ogrzanie roztworu DNA grasiczego do temp. 90° utrwaliło bowiem zmiany podenaturacyjne niezależnie od szybkości ochładzania roztworu (ryc. 3, kolumna prawa).

Jak wspomniano wyżej, wcięcia o charakterze kinetycznym pogłębiają się podczas wzrostu temperatury w znacznie większym stopniu niż wcięcia dyfuzyjne. Jest to spowodowane przyspieszającym wpływem temperatury na szybkość reakcji warunkującą w otoczeniu elektrody wyższy gradient stężeń produktów reakcji. Wcięcia kinetyczne występują np. w procesie redukcji formaldehydu (2) lub elektroredukcji hydrolizatu glukozocyklooctoetanu etylu (11) badanych oscylopolarograficznie.

Reasumując należy stwierdzić, że z niskocząsteczkowych komponent kwasów nukleinowych są wykrywalne oscylopolarograficznie cytozyna i pochodne gwaniny przy pH 7,0, adenina w środowisku kwaśnym, a tymina i uracyl w zasadowym. Obecność reszty cukrowej w strukturze nukleozydu danych zasad w pH 7,0 wpływa najbardziej na przesunięcie potencjału wcięcia w szeregu cytozynowym. Stwierdzono charakter dyfuzyjny wcięcia dezoksycytynowego i pojemnościowy wcięcia dezoksygwanozynowego. Wzrost temperatury powodował nieodwracalność obrazów oscylopolarograficznych DNA po ochłodzeniu do temp. wyjściowej w przeciwieństwie do badanych nukleozydów, mono- i polinukleotydów jednorodnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Heath J. C.: *Nature* **158**, 23—25, 1946.
2. Heyrovsky M.: *Die Depolarisationswirkung der Aluminiumionen*. Diplomarbeit, Karls-Universität, Prag, 1957.
3. Heyrovsky J., Kalvoda R.: *Oszillographische Polarographie mit Wechselstrom*, Akademie-Verlag, Berlin 1960, str. 64.
4. Janik B., Paleček E.: *Z. Naturforsch.*, **21b**, 1117—1118, 1966.
5. Janik B., Elving P. J.: *Chem. Rev.*, **68**, 295—299, 1968.
6. Luthy N. G., Lamb B.: *J. Pharm. Pharmacol.*, **8**, 410—414, 1956.
7. Mairanovskij S. G.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **120**, 1294—1297, 1958.
8. Manousek O., Zuman P.: *Chem. Listy*, **49**, 669—672, 1955.
9. Paleček E.: *Collection Czech. Chem. Commun.*, **25**, 2283—2285, 1960.
10. Paleček E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 293—301, 1965.
11. Prasał Z.: *Roczniki Chem.*, **46**, 649—659, 1972.
12. Schindler O.: *Helv. Chim. Acta*, **32**, 979—983, 1949.
13. Smith D. L., Elving P. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2741—2747, 1962.

Otrzymano 4.III.1972

РЕЗЮМЕ

Обнаружена осциллополярографическая активность четырех нуклеиновых оснований. Установлено наибольшее влияние сахаристого остатка на перемещение потенциала вреза в цитозиновом ряду. В термических исследованиях выявлен диффузионный характер дезоксицитинового вреза и объемный характер дезоксигванозинового вреза.

SUMMARY

The different activity of four nucleic acid bases have been shown oscillopolarographically. The sugar residue mostly influenced the shift of the indentation potential in the cytosine series. Thermal experiments have pointed out that the deoxycytidine and deoxyguanosine indentations were of a diffusive and capacitive character, respectively.