

144. DNA-Abbau und Oxydation von *o*-Phenylendiamin

Metallionen und H_2O_2 , 8. Mitteilung¹⁾

von R. Zell, H. Sigel und H. Erlenmeyer

(19. III. 66)

In Gegenwart von Metallionen vermag H_2O_2 , wie Untersuchungen am Cu^{2+} - und Ni^{2+} -Komplex des cyclischen Decapeptids Polymyxin B gezeigt haben [2], Polypeptide in einer Folge von spezifischen Reaktionen abzubauen. Wie neuere Versuche mit Adenin-Nucleotiden bestätigen [1], muss man annehmen, dass H_2O_2 bzw. HOO^- [3] [4] als Ligand in die Koordinationssphäre des Metallions eintritt und im Bereich dieser Koordinationssphäre spezifisch mit der abbaufähigen Ligandmolekel reagiert. Dieser spezifische Abbau ist demnach nicht zurückzuführen auf ein Auftreten von freien Radikalen wie $OH\cdot$, was zu einer starken Streuung der Angriffspunkte führen müsste, sondern beruht auf der Ausbildung ternärer Komplexe.

In neuerer Zeit haben PRIESS & ZILLIG [5] die Spaltung von *s*-RNA mit ca. $2 \cdot 10^2$ Molen H_2O_2 pro Mol Nucleinsäure-Baustein untersucht und neben anderen Reaktionen vorwiegend einen von Temperatur und pH abhängigen Angriff auf die Uracil-Bausteine der *s*-RNA beobachtet²⁾.

DNA hingegen erleidet durch H_2O_2 , wie z. B. die Versuche von BERNEIS *et al.* [6] mit dem bei der Autoxydation von Methylhydrazinen [7] erzeugten H_2O_2 gezeigt haben, eine Viskositätsabnahme, die vermutlich auf eine Spaltung der Zucker-Basen-Bindung³⁾ der DNA zurückzuführen ist [8].

Wir haben einige Abbauprobe mit DNA durchgeführt im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Eigenschaften der erwähnten carcinostatischen Methylhydrazin-Derivate [7], deren zu H_2O_2 führende Autoxydation nach unseren Ermittlungen [9] durch Metallionen beeinflusst wird. Die H_2O_2 -Bildung in diesen Systemen wird besonders durch Mn^{2+} gefördert und in Anwesenheit von $P_2O_7^{4-}$ noch weiter erhöht.

Wir fanden nun⁴⁾, dass die Viskositätsabnahme der DNA-Lösungen trotz Gegenwart des bei der Autoxydation der Methylhydrazine erzeugten H_2O_2 ausbleibt, wenn man dem System $P_2O_7^{4-}$ zusetzt, und dies sowohl in An- wie in Abwesenheit von Mn^{2+} (vgl. Figur). Die H_2O_2 -Konzentration wird auch in diesem System, wie Kontrollversuche ergaben, durch Zusatz von Mn^{2+} und $P_2O_7^{4-}$ erhöht.

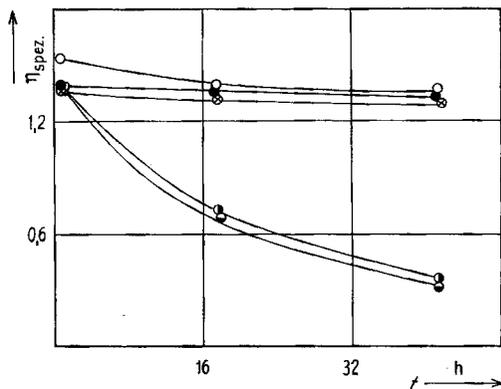
¹⁾ 7. Mitteilung: [1].

²⁾ Bei Untersuchungen spezifischer Abbaureaktionen sollte die H_2O_2 -Konzentration nicht um viele Zehnerpotenzen über der Komplexkonzentration liegen, da sonst unspezifische Reaktionen mit dem Substrat überwiegen können: Unveröffentlichte Versuche.

³⁾ Der spezifische Aufbau (Doppelhelix) der DNA schützt wohl deren Nucleotid-Basen vor dem Abbau [1]; vgl. auch [16].

⁴⁾ Herkunft der Präparate: DNA: B.D.H., Poole (England); $K_4P_2O_7$, $3H_2O$: BENDER & HOBEIN AG., Zürich; Pyridin-2,6-dicarbonsäure und *o*-Phenylendiamin: FLUKA AG, Buchs (St. Gallen); $FeSO_4$, $MnSO_4$: E. MERCK AG, Darmstadt (Deutschland); Stabilisator-freies H_2O_2 : DEGUSSA, Frankfurt/Main (Deutschland).

Auf Grund der Erfahrungen mit Polypeptiden bzw. mit Modellsubstanzen [10], wonach die Ausbildung ternärer Komplexe Voraussetzung ist für einen peroxydatischen Abbau, wäre dieses Ergebnis so zu verstehen, dass der reaktive ternäre Komplex aus HOO^- , Metall-Ion und DNA in Gegenwart von $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ nicht entstehen kann,



Zeitliche Änderung der spezifischen Viskosität wässriger 0,05-proz. DNA-Lösungen (○) bei Zusatz von $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Methylhydrazin (●), $6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ MnSO_4 (⊗), $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Methylhydrazin + $6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ MnSO_4 (◐), sowie $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Methylhydrazin + $6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ MnSO_4 + 10^{-2} M $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (●).

da letzteres die katalytisch wirksamen Metall-Ionen bindet. Andererseits deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass beim Abbau der DNA durch H_2O_2 ohne besonderen Zusatz von Metall-Ionen diese aus den DNA-Präparaten [11] oder auch z. B. aus den Glasgefäßen [12] in genügender Menge in das Reaktionsmilieu gelangen.

Als weiteres Beispiel einer Reaktion, die durch solche Spuren von Metall-Ionen erst ermöglicht und durch $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ gehemmt wird, sei die von FALLAB & MEFFERT [13] untersuchte Oxydation von *o*-Phenylendiamin ($1,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) durch H_2O_2 angeführt, die nach Zusatz von Pyridin-2,6-dicarbonsäure eintritt, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit stark von der Konzentration an letzterer abhängt⁵⁾. Wird die verwendete Pyridin-2,6-dicarbonsäure ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) über einem stark sauren Ionenaustauscher gereinigt, so sinkt, wie wir fanden, die Oxydationsgeschwindigkeit um einen Faktor von ca. 2 bis 3⁶⁾.

Cu^{2+} (10^{-6} bis 10^{-4} M) katalysiert diese Oxydation von *o*-Phenylendiamin bei pH 2 praktisch nicht (vgl. auch [15]), während Fe^{2+} in einer Konzentration von 10^{-6} M ihre Geschwindigkeit ca. verfünffacht⁷⁾.

Gereinigte Pyridin-2,6-dicarbonsäure, deren wässrige Lösung anschliessend einige Tage mit älterem Glas in Berührung gewesen war, führte zu gleichen Reaktionsgeschwindigkeiten, wie sie durch Fe^{2+} -Zusatz erreicht worden waren. In Pyrex-Gefäßen gelagerte «gereinigte» Pyridin-2,6-dicarbonsäure zeigte keine erhöhte Wir-

⁵⁾ Erwähnt sei, dass Pyridin-2-carbonsäure mit H_2O_2 ein kristallines 1:1-Addukt [14] aufbaut, das sich aus Äthanol umkristallisieren lässt. In Lösung ist diese Anlagerungsverbindung nicht nachweisbar, so dass die Beobachtung einer Katalyse mit der homologen Dicarbonsäure für dieses Problem von Interesse war.

⁶⁾ Sämtliche Oxydationsversuche mit *o*-Phenylendiamin wurden bei pH 2 durchgeführt.

⁷⁾ 10^{-6} M Fe^{2+} ohne Pyridin-2,6-dicarbonsäure-Zusatz zeigte keine katalytische Wirkung.

kung, d. h. in Pyrexglas findet keine «Verunreinigung» des Präparates durch Metall-Ionen aus den Gefässwänden statt.

Interessant ist nun, dass durch Zusatz von $P_2O_7^{4-}$ ($2 \cdot 10^{-4}$ bis $3 \cdot 10^{-3} M$) die Oxydationsgeschwindigkeit um einen Faktor 2 bis 6 herabgesetzt wird, d. h. $P_2O_7^{4-}$ übt auch hier eine «Schutzwirkung» aus, ähnlich wie sie beim erwähnten DNA-Abbau durch H_2O_2 aus autoxydablen Methylhydrazinen beobachtet wurde, ein weiterer Hinweis für die Annahme, dass auch beim DNA-Abbau Metall-Ionen beteiligt sind.

Der Firma HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel, danken wir für die Überlassung von Präparaten und für Unterstützung dieser Untersuchungen. Wir danken den Herren Prof. Dr. S. FALLAB und Dr. A. MEFFERT für ihr Interesse an dieser Arbeit. Herrn A. TALOS sind wir für die sorgfältige Hilfe bei den Experimenten und Herrn Dr. B. PRIJS für solche bei der Abfassung des Manuskriptes dankbar.

SUMMARY

In earlier papers it has been stated, that the catalytic activity of several metal complexes in H_2O_2 decomposition is caused by the formation of ternary HOO^-Me^{2+} -ligand complexes. The present investigation deals with the effect of traces of metal ions on two other reactions. The degradation of DNA by autoxidizable, H_2O_2 producing methylhydrazines is stopped by $P_2O_7^{4-}$. This effect is shown to be due to complex formation of the metal ions with $P_2O_7^{4-}$, preventing the formation of the catalytically active ternary complex. The catalysis of the H_2O_2 oxidation of *o*-phenylenediamine by pyridine-2,6-dicarboxylic acid is dependent on traces of Fe^{2+} ions; this latter effect is equally suppressed by $P_2O_7^{4-}$.

Institut für anorganische Chemie,
Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. SIGEL & H. ERLLENMEYER, *Helv.* **49**, 1266 (1966).
- [2] H. ERLLENMEYER, H. BRINTZINGER, H. SIGEL & H. CH. CURTIUS, *Experientia* **21**, 371 (1965); H. ERLLENMEYER, H. SIGEL, H. CH. CURTIUS & P. ANDERS, *Helv.* **49**, 19 (1966).
- [3] R. ZELL & H. SIGEL, *Helv.* **49**, 870 (1966).
- [4] H. BRINTZINGER & H. ERLLENMEYER, *Helv.* **48**, 826 (1965).
- [5] H. PRIESS & W. ZILLIG, *Z. physiol. Chem.* **342**, 73 (1965).
- [6] K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Experientia* **19**, 132 (1963).
- [7] P. ZELLER, H. GUTMANN, B. HEGEDÜS, A. KAISER, A. LANGEMANN & A. MÜLLER, *Experientia* **19**, 129 (1963); K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, P. ZELLER, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Helv.* **46**, 2157 (1963).
- [8] H. SCHWEITZ & D. LUZZATI, *J. Chim. phys.* **60**, 1173 (1963).
- [9] H. BRINTZINGER, R. ZELL & H. ERLLENMEYER, *Helv.* **47**, 1642 (1964).
- [10] H. SIGEL & U. MÜLLER, *Helv.* **49**, 671 (1966); H. ERLLENMEYER, U. MÜLLER & H. SIGEL, *Helv.* **49**, 681 (1966).
- [11] K. BERNEIS, *Helv.* **46**, 57 (1963).
- [12] O. WARBURG, «Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten», Verlag Dr. W. Saenger, Berlin 1946.
- [13] S. FALLAB & A. MEFFERT, unveröffentlichte Ergebnisse; A. MEFFERT, Dissertation, Basel 1966.
- [14] Unveröffentlichte Ergebnisse. Vgl. auch *Brit. Pat.* 858848; *Chem. Abstr.* **55**, 14484 g (1961).
- [15] K. WÜTHRICH & S. FALLAB, *Helv.* **47**, 1440, 1609 (1964).
- [16] G. L. EICHHORN, E. CLARK & E. D. BECKER, *Biochemistry* **5**, 245 (1966).