

relativement faible de déterminants génétiques pourra se traduire par des formes très différentes.

Ainsi, le mode de développement des Nématodes associé au jeu de leurs déterminations génétiques, peut les constituer en un système doué d'aptitudes évolutives remarquables, fondées sur une interaction complexe entre déterminants géniques, non géniques et facteurs du milieu. Il reste évidemment à savoir si une telle conception conserverait une signification en dehors de ce groupe zoologique particulier.

Summary. Free-living nematodes are endowed with a set of properties that make them specially attractive for experimental work. Geneticists and evolutionists may be especially interested in their easy cultivation, great fecundity and polymorphism. As an example, some results are brought concerning *Caenorhabditis elegans* and related species: (1) Sex determination

occurs as the expression of a genic balance involving differences in the number of chromosomes. The alternatives gynogenesis, amphimixis, or auto-heterofecundation take a prominent place in the reproductive processes of these species. (2) Polyploidy may be obtained by heat-shock, giving rise to individuals showing characteristic chromosomal unbalance and variability. (3) *C. elegans*, which cannot normally be raised at a higher temperature than 22°C, has been gradually adapted to temperatures up to 24.5°C. This acclimatization implies an adaptive transformation of the ovarian physiology; this effect is obtained after long training, taking more than 1000 generations. Study of the process of acclimatization shows that its genetical basis may be partly of a non-genic nature, partly of a genic type. Hypotheses are developed for explaining this phenomenon and for the understanding of the evolution from free-living to parasitic nematodes.

SPECIALIA

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – El responsable de los informes reducidos, está el autor.

Über Struktur und Aktivität der den H_2O_2 -Zerfall katalysierenden Cu^{2+} -Komplexe. – VI. Differenzierung von nativer RNS und nativer DNS bzw. denaturierter DNS auf Grund der katalytischen Eigenschaften^{1,2}

Für die Sekundär- bzw. Tertiär-Struktur von Desoxyribonukleinsäure (DNS) wurde von WATSON und CRICK auf Grund von Röntgendaten ein Modell entwickelt, das sich in der Folge durch weitere experimentelle Befunde stützen liess und das heute allgemein anerkannt ist^{3,4}. Diesem Strukturmodell liegt die Annahme zugrunde, dass je zwei Basen durch Wasserstoffbindungen miteinander in Beziehung stehen. Durch diese «Basenpaarung» werden zwei Polynukleotid-Stränge zusammengehalten und schraubenförmig miteinander verdreht. Ein solcher Aufbau der DNS bedingt, dass die Basenpaare im Innern der «Schraube» liegen, während die Desoxyribose- und Phosphatreste nach aussen zu liegen kommen.

In Analogie zur DNS ist auch bei der Ribonukleinsäure (RNS) eine räumlich geordnete Struktur zu erwarten. Bestimmte Anhaltspunkte sprechen dafür, dass auch hier schraubenartig aufgebaute Bezirke⁵, sowie in gewissen Bereichen Basenpaarungen auftreten. Letztere wurden von SEIDEL, CRAMER et al.^{6,7} mit Hilfe der N-Oxydation der Adenosin-Einheiten untersucht. Der Umfang der N-Oxydation wird durch die Basenpaarung herabgesetzt, wodurch sich Kenntnisse über den Basenpaarungsgrad von RNS gewinnen lassen. Diese «N-Oxydation von Adenosin» stellt somit eine Art molekulare «Sonde» zur Abtastung der RNS-Struktur dar.

Der von uns untersuchte «Metallionen-katalysierte H_2O_2 -Zerfall»⁷ lässt sich nun in ähnlicher Weise als molekulare «Sonde» bei der Aufklärung von Strukturen verwenden:

Früher haben wir gezeigt, dass die katalytische Aktivität von Cu^{2+} -Komplexen von der Zahl der «freien»⁸ Koordinationsstellen am Metallion abhängt. Cu^{2+} -Komplexe mit 2 bzw. 1 «freien» Koordinationsstelle sind katalytisch aktiv, solche ohne «freie» Koordinationsstellen dagegen inaktiv⁷. Auf Grund dieser Befunde lassen sich durch Messen der katalytischen Aktivität von Cu^{2+} -Komplexen unbekannter Struktur Rückschlüsse auf die Zahl der «freien» Koordinationsstellen in diesen Komplexen ziehen⁹.

¹ V. Mitteilung: S. PETRI, H. SIGEL und H. ERLNMEYER, *Helv. chim. Acta* **49**, 1778 (1966).

² 12. Mitteilung über *Metallionen und H_2O_2* ; 11. Mitteilung: H. CH. CURTIUS, P. ANDERS, R. ZELL, H. SIGEL und H. ERLNMEYER, *Helv. chim. Acta* **49**, 2256 (1966).

³ P. KARLSON, *Biochemie* (G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1962).

⁴ P. A. EDWARDS und K. V. SHOOTER, *Q. Rev. chem. Soc.* **19**, 369 (1965).

⁵ H. SEIDEL und F. CRAMER, *Biochim. biophys. Acta* **108**, 367 (1965).

⁶ H. DOEPNER, H. SEIDEL und F. CRAMER, *Angew. Chem.* **78**, 601, 682 (1966).

⁷ H. SIGEL und U. MÜLLER, *Helv. chim. Acta* **49**, 671 (1966).

⁸ Unter «freien» Koordinationsstellen verstehen wir im folgenden solche, die entweder durch H_2O besetzt sind oder durch einen Liganden, der durch HOO^- verdrängt wird.

⁹ H. ERLNMEYER, U. MÜLLER und H. SIGEL, *Helv. chim. Acta* **49**, 681 (1966).

Eine für das uns hier interessierende Problem besonders interessante Möglichkeit, Aussagen über die Struktur von Komplexen – und damit über die entsprechenden Liganden – zu machen, beruht auf der Beobachtung, dass nur diejenigen Gruppen eines Liganden peroxydatisch angegriffen werden, die sich in der Koordinationssphäre des Metallions befinden.

So konnten wir beim Cu^{2+} -Komplex von Adenosin-5'-triphosphat, dessen Nukleotidbase sich in der Koordinationssphäre des Cu^{2+} befindet¹⁰, einen Abbau des Adeninsystems durch H_2O_2 nachweisen¹¹. Entsprechende Versuche am Cu^{2+} -DNS-System verliefen negativ, d.h. die gepaarten und daher nicht koordinierten Nukleotidbasen wurden in Übereinstimmung mit der WATSON-CRICK-Struktur nicht angegriffen, obwohl auch dieses System den H_2O_2 -Zerfall katalysiert¹¹.

Da nun bei RNS – im Gegensatz zu DNS – die Nukleotidbasen mindestens teilweise ungepaart vorliegen, sollte das Cu^{2+} -RNS-System eine peroxydatische Aktivität zeigen. Dies ist tatsächlich der Fall; die Nukleotidbasen im Cu^{2+} -RNS-System werden durch H_2O_2 abgebaut (Figur 1b)¹².

Dieser Abbau der Basen lässt sich an der UV-Absorptionsbande bei 260 nm verfolgen. Als Mass für die peroxydatische Aktivität diente die Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' pseudo-erster Ordnung in bezug auf die Ligandkonzentration, sie wurde nach

$$k' = (2,30/t) \cdot \log(E_0/E_t) \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

berechnet und in Abhängigkeit vom pH in Figur 1b dargestellt¹³.

Es ist nun interessant, dass auch im Cu^{2+} -DNS-System ein Nukleotidbasen-Abbau erhalten werden kann, nämlich dann, wenn man eine DNS-Lösung nach Zusatz von Cu^{2+} 1,5 Tage bei Zimmertemperatur stehen lässt, und erst dann auf ihre peroxydatische Aktivität untersucht (Figur 1b). Eine zum Vergleich untersuchte, gleich angesetzte DNS-Lösung, der das Cu^{2+} aber erst kurz vor der Messung zugesetzt wurde, ist hingegen peroxydatisch inaktiv, d.h. die Basen werden nicht abgebaut. Dies zeigt, dass Cu^{2+} bei längerer Einwirkung die WATSON-CRICK-Struktur destabilisiert (vgl. auch¹⁴) und in die Doppelhelix eindringt¹⁵. Von Metallionen ist ein derartiges Verhalten zu erwarten, da sie in der Lage sind, H-Brücken zu spalten und an den entsprechenden Stellen zu koordinieren.

Es war nun von Interesse, neben der peroxydatischen Aktivität dieser Systeme auch die Katalyse des H_2O_2 -Zerfalls zu untersuchen. In Figur 1a ist die katalytische Aktivität für die Cu^{2+} -Komplexe von nativer RNS bzw. DNS und durch Cu^{2+} denaturierter DNS in Abhängigkeit vom pH dargestellt¹⁷, gemessen als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 , $k = (2,30/t) \cdot \log([H_2O_2]_0/[H_2O_2]_t) \text{ (min}^{-1}\text{)}$.

In Übereinstimmung mit früheren Befunden^{7,11} ist auch in diesen Fällen die katalytische Aktivität vom Auftreten gelber ternärer Cu^{2+} -Peroxokomplexe begleitet, die sich an einer Absorptionsschulter bei ca. 360 nm nachweisen lassen. Diese Extinktion verläuft in Abhängigkeit vom pH für das Cu^{2+} -RNS-System und das mit Cu^{2+} denaturierte DNS-System ähnlich den in Figur 4 dargestellten Kurven; auf die Wiedergabe wurde deshalb verzichtet.

Die hier beschriebene Untersuchung von RNS bzw. DNS zeigt einerseits, wie empfindlich unsere Methode auf die Möglichkeit der Koordination des Cu^{2+} an die Nukleotidbasen anspricht. Andererseits ist bekannt, dass z.B. thermisch denaturierte DNS ihre Extinktion bei 260 nm^{14,16} ändert, ausserdem nimmt die Viskosität einer derartigen Lösung ab¹⁶. Die Extinktionszunahme

(Hyperchromie⁶) bei Denaturierung der DNS wird darauf zurückgeführt, dass die Paarung der Nukleotidbasen teilweise aufgehoben wird; dieser Vorgang sollte sich somit auch in der peroxydatischen Aktivität äussern.

Wir stellten DNS-Lösungen her, denaturierten sie durch Erhitzen (vgl. z.B. ¹⁴), fügten Cu^{2+} zu und untersuchten auf peroxydatische Aktivität. Es wurden folgende DNS-Lösungen untersucht: (a) nicht denaturiert (zum Vergleich), (b) auf 50°C erwärmt, (c) auf 95°C erwärmt und 1 min so belassen, (d) auf 95°C erwärmt und

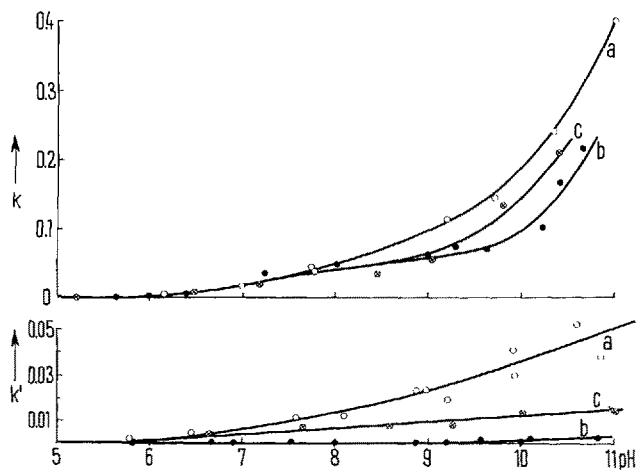


Fig. 1a. Katalytische Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe von nativer RNS (a) und DNS (b), sowie von durch Cu^{2+} denaturierter DNS (c) in Abhängigkeit vom pH, bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante $k \text{ (min}^{-1}\text{)}$ des H_2O_2 -Zerfalls einer Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 .

Fig. 1b. Peroxydatische Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe von nativer RNS (a) und DNS (b), sowie von durch Cu^{2+} denaturierter DNS (c) (gemessen in 1-mm-Quarzkuvetten) in Abhängigkeit vom pH, bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante $k' \text{ (min}^{-1}\text{)}$ des Nukleotidbasen-Abbaues (pseudo-erster Ordnung).

¹⁰ P. W. SCHNEIDER, H. BRINTZINGER und H. ERLÉNMEYER, *Helv. chim. Acta* 47, 992 (1964).

¹¹ H. SIGEL und H. ERLÉNMEYER, *Helv. chim. Acta* 49, 1266 (1966).

¹² In Metall-freiem Milieu haben H. PRIESS und W. ZILLIG mit 6 M H_2O_2 bei pH 10,0 ebenfalls einen Basenabbau von RNS festgestellt, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 342, 73 (1965); vgl. auch Y. UCHIDA, H. SHIGEMATU und K. YAMAFUJI, *Enzymologia* 29, 369 (1965); K. YAMAFUJI und Y. UCHIDA, *Nature* 209, 301 (1966).

¹³ Konzentrationen der Messlösungen: $[\text{Cu}^{2+}] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{RNS}] = [\text{DNS}] = 0,04\%$; auf ein Cu^{2+} kommen somit ca. 2,5 Nukleotid-Einheiten. Auf die Stabilisierung der Lösungen durch NaCl wurde verzichtet, um die Ausbildung von Chlorokomplexen zu vermeiden (vgl. auch ¹¹). RNS (highly polymerised; from Salmon Testes) und DNS (highly polymerised; from Yeast) wurden von The British Drug Houses Ltd., Poole (England) bezogen.

¹⁴ G. L. EICHHORN, P. CLARK und E. D. BECKER, *Biochemistry*, N.Y. 5, 245 (1966).

¹⁵ Dieses Ergebnis ergänzt die Befunde von HIR¹⁶, der fand, dass Cu^{2+} die thermische Denaturierung von DNS fördert. – Zur Zahl der verfügbaren Bindungsstellen in DNS vgl. die NMR-Untersuchungen von J. EISINGER, R. G. SHULMAN und B. M. SZYMANSKI, *J. chem. Phys.* 36, 1721 (1962); J. EISINGER, F. FAWAZ-ESTRUP und R. G. SHULMAN, *J. chem. Phys.* 42, 43 (1965).

¹⁶ S. HIR, *J. molec. Biol.* 11, 672 (1965).

¹⁷ Zur Verfolgung der H_2O_2 -Abnahme in den Messlösungen wurden Proben mit Titanyl-sulfat in 3 N H_2SO_4 versetzt und so photometrisch bei 410 nm die H_2O_2 -Konzentration bestimmt (vgl. auch ⁷).

5 min so belassen, (e) auf 95°C erwärmt und 15 min so belassen. Sämtliche Lösungen wurden nach dem Erwärmen sofort wieder auf 20°C abgekühlt.

Die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung für den Basenabbau, d.h. die peroxydatische Aktivität, sind in Figur 2 in Abhängigkeit vom pH wiedergegeben. Mit zunehmender Denaturierung der DNS nimmt – wie erwartet – die peroxydatische Aktivität zu.

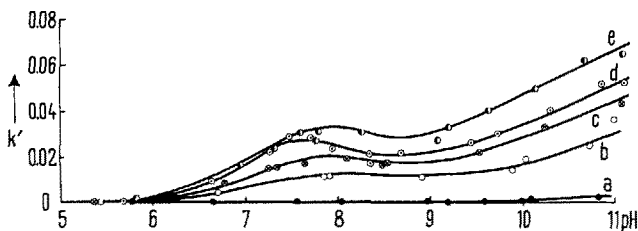


Fig. 2. Peroxydatische Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe von thermisch denaturierter DNS – bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' (min^{-1}) des Nukleotidbasen-Abbaues (pseudo-erster Ordnung), gemessen in 1-mm-Quarzküvetten. DNS-Lösungen (Figuren 2–4): (a) nicht denaturiert (\bullet) (als Vergleich); (b) auf 50°C erwärmt (\circ); (c) auf 95°C erwärmt und 1 min so belassen (\oplus); (d) auf 95°C erwärmt und 5 min so belassen (\odot); (e) auf 95°C erwärmt und 15 min so belassen (\ominus).

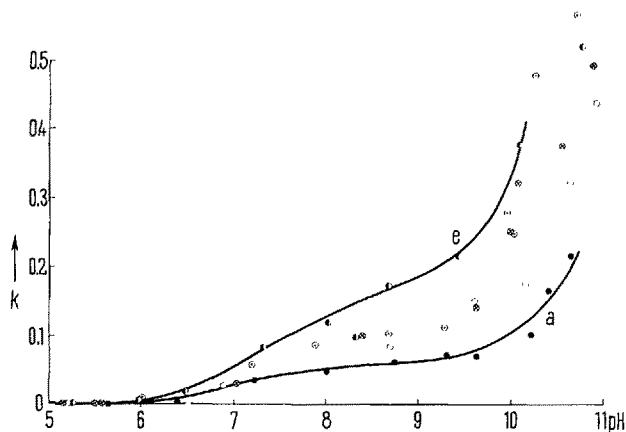


Fig. 3. Katalytische Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe von thermisch denaturierter DNS in Abhängigkeit vom pH – bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (min^{-1}) des H_2O_2 -Zerfalls (vgl. Legenden zu Figuren 1a und 2).

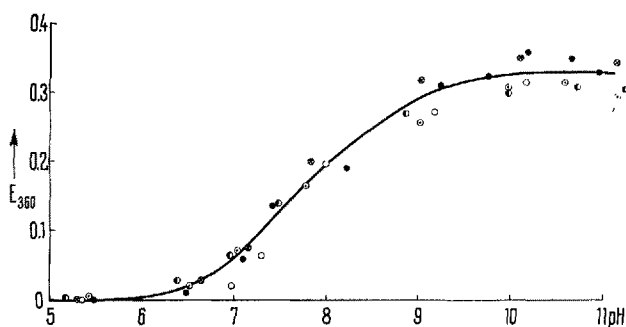


Fig. 4. Ausbildung ternärer Cu^{2+} -Peroxo-Komplexe mit thermisch denaturierter DNS in H_2O_2 -haltigem Milieu (gemessen in 1-cm-Quarzküvetten); vgl. Legende zu Figur 2.

Diese Aktivitätszunahme zeigt unmittelbar, dass die zunehmende Denaturierung mit dem Öffnen der Helix gekoppelt ist und hierdurch die Basen freigelegt werden, was Komplexbildung mit Cu^{2+} zur Folge hat. Die Untersuchung der peroxydatischen Aktivität eines Cu^{2+} -DNS-Systems ist somit als Methode zur Unterscheidung von nativer und denaturierter DNS geeignet¹⁸.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden beobachteten wir in den Lösungen von (a) bis (e) eine Zunahme der Extinktion bei 260 nm und eine Abnahme der Viskosität (vgl. auch ^{14, 16}).

Wie Figur 3 zeigt, nimmt die katalytische Aktivität in Abhängigkeit vom pH mit zunehmender Denaturierung ebenfalls zu, und zwar offenbar mehr als es dem H_2O_2 -Verbrauch infolge zunehmender peroxydatischer Aktivität entspricht; dies bedeutet wohl, dass auch die Katalyse des H_2O_2 -Zerfalls als Folge der Denaturierung steigt¹⁹. Der Verlauf der ternären Peroxokomplexe anzeigenden Extinktion bei 360 nm ist ebenfalls in Abhängigkeit vom pH in Figur 4 dargestellt; die Denaturierung ist hier praktisch ohne Einfluss²⁰.

Das beschriebene unterschiedliche Verhalten von nativer DNS einerseits und denaturierter DNS bzw. nativer RNS andererseits zeigt sehr deutlich, dass beide Reaktionen, die peroxydatische und die katalytische²¹, innerhalb der Koordinationssphäre des Metallions vor sich gehen. Wahrscheinlich verlaufen beide Reaktionen über einen «Zwischenkomplex» (vgl. ¹¹), der unter dem Einfluss äußerer Faktoren entweder in der einen oder anderen Weise zu reagieren vermag²².

Summary. The catalysis of H_2O_2 decomposition by Cu^{2+} -complexes of RNA and DNA has been investigated. It is shown that both complexes decompose H_2O_2 , but only the Cu^{2+} -RNA-system shows peroxidative activity too, e.g. only in this case the nucleotide bases are degraded. Thermal denaturation of DNA also leads to a Cu^{2+} -complex with peroxidative activity, the latter being dependent on the degree of denaturation.

H. SIGEL, B. PRIJS
und H. ERLNMEYER

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel
(Schweiz), 6. Dezember 1966.

¹⁸ Eine andere Methode wurde kürzlich von CH. SINGH und J. MISRA beschrieben, *Experientia* 22, 599 (1966).

¹⁹ Wahrscheinlich hängt dies mit der früheren Beobachtung zusammen, dass N-Chelate katalytisch aktiver sind als O-Chelate, vgl. H. BRINTZINGER und H. ERLNMEYER, *Helv. chim. Acta* 48, 826 (1965); R. ZELL und H. SIGEL, *Helv. chim. Acta* 49, 870 (1966).

²⁰ Der ungefähre parallele Verlauf der peroxydatischen Aktivität mit der katalytischen²¹ – d.h. dem H_2O_2 -Zerfall – bedeutet nicht, dass die Reaktion über freie Radikale verläuft (vgl. hierzu auch ¹¹), wie zunächst vermutet werden könnte, vgl. auch G. A. HAMILTON et al., *J. Am. chem. Soc.* 88, 5266 (1966). Wäre dies nämlich der Fall, so müsste auch beim Cu^{2+} -Komplex mit nativer DNS ein Nukleotidbasen-Abbau eintreten, da von freien Radikalen – wie z.B. OH^\bullet – anzunehmen ist, dass sie in die Doppelhelix bis zu den Basen eindringen würden.

²¹ Katalytische Aktivität = peroxydatische + katalytische Aktivität = gemessene H_2O_2 -Abnahme.

²² Herrn W. VAN DE VOORT danken wir für die sorgfältige Hilfe bei der experimentellen Durchführung dieser Arbeit. Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sei für Unterstützung unserer Arbeiten gedankt.