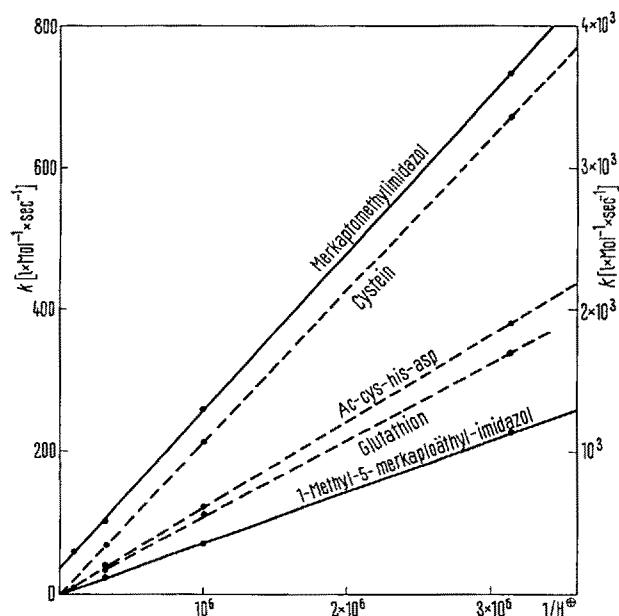


so erhält man

$$v = [\text{R'SH}] [\text{RSSR}] \left( k^{\text{R'SH}} + \frac{k^{\text{R'S}^-} K_D}{[\text{H}^+]} \right).$$

Daraus ergibt sich unmittelbar

$$k = k^{\text{RSH}} + \frac{k^{\text{RS}^-} \cdot K_D}{[\text{H}^+]}$$



pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Reaktion von SH-Verbindungen mit ELLMAN Reagenz (linke Ordinate für gestrichelte Geraden, rechte Ordinate für ausgezogene Geraden).

d.h., bei einer Auftragung von  $k$  gegen  $1/[\text{H}^+]$  liefert der Ordinatenabschnitt die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Reaktion von R'SH mit ELLMAN-Reagenz, und die Neigung erlaubt uns bei Kenntnis des  $pK_{\text{SH}}$ -Wertes die Berechnung von  $k^{\text{R'S}^-}$ .

Tabelle II enthält die Gleichungen der Geschwindigkeitskonstanten für eine Auswahl von SH-Verbindungen; diese erlauben die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für beliebige pH-Werte.

Die Gleichungen besagen, dass die undissoziierte Thiolgruppe nicht reagiert, sondern dass Thiolanion Reaktionspartner des ELLMAN-Reagenzes ist. Da Reaktionen mit diesem Reagenz meistens bei pH 8 durchgeführt werden, sind in der Tabelle auch die errechneten Geschwindigkeitskonstanten für diesen pH-Wert angegeben.

Die Gleichungen erlauben bei Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von ELLMAN-Reagenz mit SH-Gruppen von Enzymen auch die Errechnung der  $pK_{\text{HS}}$ -Werte der Enzyme<sup>12</sup>.

**Summary.** The rate of reaction of some derivatives and peptides of cysteine and a number of imidazole-SH-compounds with 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as well as the dependence of the reaction rate upon pH were investigated; for several compounds an equation is given, by which the rate constants and half reaction times can be estimated for various pH values. For some of the imidazole-SH-compounds studied the  $pK$  of the SH-group is no criterion of their reactivity with DTNB.

H. WENCK und FR. SCHNEIDER

Physiologisch-chemisches Institut der Universität,  
D-74 Tübingen (Deutschland), 3. August 1970.

<sup>12</sup> Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

## Hydratation und Sekundärstruktur doppelhelikaler synthetischer Polynukleotide

Die Hydratation der Desoxyribonukleinsäure (DNS) ist sowohl für die Konformation des DNS-Moleküls als auch für die Stabilität seiner Sekundärstruktur ein bestimmender Faktor<sup>1-3</sup>. Änderungen der Basenlagen relativ zur Helixachse sind durch Messungen des linearen Dichroismus (LD) in der UV-Absorptionsbande bei 260 nm nachweisbar<sup>3-5</sup> und an orientierten DNS-Filmen in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchte (RF) mehrfach beschrieben worden<sup>3,6,7</sup>. Dabei wurde im Dehydratations-Hydratations-Zyklus (94% RF  $\rightarrow$  0% RF  $\rightarrow$  94% RF) eine Strukturhysterese festgestellt<sup>6,7</sup>, und zwar auch bei DNS in situ<sup>8</sup>.

Im folgenden wird über hydratationsabhängige Sekundärstrukturänderungen der doppelhelikalen Polynukleotide Poly (rA + rU)<sup>9</sup> und Poly (rA + rA)<sup>9</sup> berichtet, deren Sekundärstruktur bekannt ist<sup>10-12</sup>.

**Material und Methode.** Verwendet wurden Kalbsthy-mus-DNS geeigneter Präparation<sup>7</sup>, Polyriboadenylsäure  $\times$  K-Salz und Polyribouridylsäure  $\times$  NH<sub>4</sub>-Salz (SERVA). Aus den synthetischen Polynukleotiden wurden unter geeigneten Bedingungen<sup>13-17</sup> Gele doppelhelikaler Moleküle Poly (rA + rU) und Poly (rA + rA) hergestellt. An orientierten Filmen aus DNS und den doppelhelikalen

Polynukleotiden wurde das dichroitische Verhältnis  $D = E_{\parallel}/E_{\perp}$  ( $E_{\parallel}$ ,  $E_{\perp}$  sind die Extinktionen parallel und senkrecht zur Vorzugsrichtung der Helixachsen linear polarisierter Strahlung) als Funktion der RF<sup>18</sup> bestimmt. Eine Änderung von  $D = f(\text{RF})$  zeigt eine Veränderung der Basenorientierung relativ zur Helixachse an. Messmethodik und Kontrolle des Gleichgewichts zwischen RF und Hydratation der Messproben wurden bereits beschrieben<sup>7</sup>.

**Ergebnisse und Diskussion.** Bei der Dehydratation der DNS (Figur 1) tritt eine zunehmende Desorientierung der Basen zwischen 65% und 0% RF auf. Bei Hydratation bleibt  $D$  bis etwa 50% RF konstant und verringert sich dann stark innerhalb eines engen RF-Bereiches (Wiederaufbau der geordneten DNS-Sekundärstruktur). Eine Deutung der Strukturhysterese als Funktion der RF erfolgte bereits<sup>7</sup>. Grundlage hierfür war die Annahme, dass zwischen den im DNS-Molekül vorhandenen H-Donator- und -Akzeptorgruppen Wasserbrücken unterschiedlicher Bindungsstärke auftreten<sup>19</sup>. Bei der Hydratation werden zunächst die Phosphatgruppen hydratisiert und dann die Ringsauerstoffe der Desoxyribose<sup>3</sup>. Bedingt durch den bereits erreichten Hydratationsgrad setzt bei

etwa 50% RF ein kooperativer Prozess der Basenrückorientierung ein, in dessen Verlauf sich durch Aufnahme weiterer Wassermoleküle zwischen den im DNS-Molekül vorhandenen H-Donator- und -Akzeptorstellen Wasserbrücken bilden.

Die Poly-(rA+rU)-Sekundärstruktur zeigt auch die erwähnte Hysterese (Figur 1). Ein charakteristischer Unterschied zur DNS bei der Hydratation ist, dass D bereits zwischen 0 und 50% RF abnimmt, d.h. die Rückorientierung der Basen beginnt. Folgende Deutung ist möglich: Poly (rA+rU) enthält Ribofuranose, DNS hingegen Desoxyribofuranose.

Nach MAURIZOT, BRAHMS und ECKSTEIN<sup>20</sup> ist zwischen der 2'-Hydroxylgruppe der Ribofuranose und der Phosphatgruppe bei Dinukleosidphosphaten vom Typ rAprA und rApdA eine stabilisierende Wasserbrücke möglich (Figur 2).

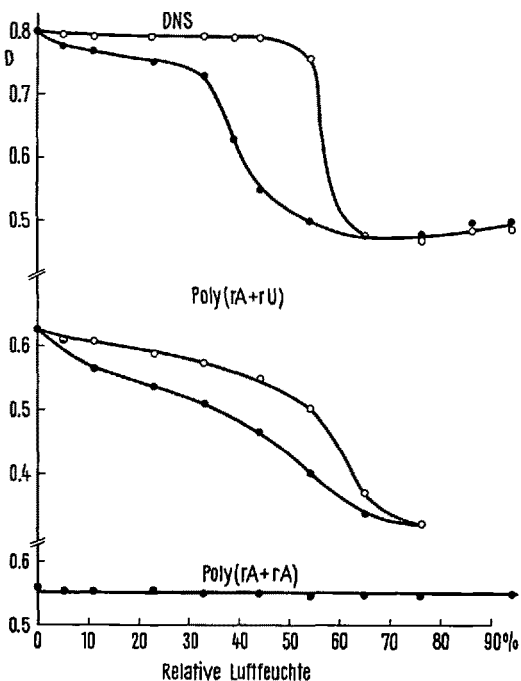


Fig. 1.  $D = f(RF)$  für einen DNS-, einen Poly-(rA+rU)- und einen Poly-(rA+rA)-Film. (●) Dehydratation; (○) Hydratation.

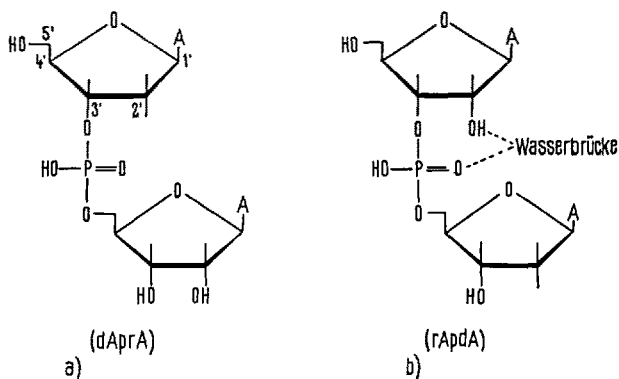


Fig. 2. Stabilisierung von Dinukleosidphosphaten des Typs rAprA und rApdA (b) durch eine Wasserbrücke. Diese Wasserbrücke ist bei Dinukleosidphosphaten des Typs dAprA (a) und dApdA nicht möglich (MAURIZOT, BRAHMS und ECKSTEIN<sup>20</sup>).

FALK<sup>21,22</sup> fand, dass auch bei synthetischen Polynukleotiden die Phosphatgruppen bei der Hydratation zuerst hydratisiert werden. Man kann also annehmen, dass sich zwischen den Phosphatgruppen und den 2'-Hydroxylgruppen der Ribofuranose der einzelnen Nukleotide von Poly rA und Poly rU derartige Wasserbrücken ausbilden, die eine Rückorientierung der Basen zur geordneten Sekundärstruktur der Poly (rA+rU) schon zwischen 0 und 50% RF bewirken.

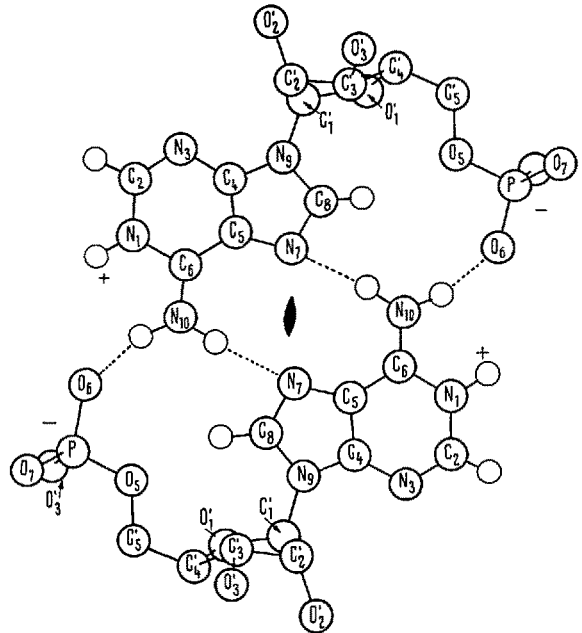


Fig. 3. Bindungsverhältnisse zwischen den Adeninbasen und dem Zucker-Phosphatgerüst bei Poly (rA+rA) (RICH, DAVIES, CRICK und WATSON<sup>11</sup>).

- <sup>1</sup> R. E. FRANKLIN und R. G. GOSLING, *Acta Cryst.* 6, 673 (1953).
- <sup>2</sup> M. H. F. WILKINS, *Science* 140, 941 (1963).
- <sup>3</sup> M. FALK, K. A. HARTMAN JR. und R. C. LORD, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 387; 391 (1963).
- <sup>4</sup> W. E. SEEDS, *Prog. Biophys. and Biophys. Chem.* 3, 27 (1953).
- <sup>5</sup> A. RICH und M. KASHA, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 6197 (1960).
- <sup>6</sup> D. M. GRAY und I. RUBENSTEIN, *Biopolymers* 6, 1605 (1968).
- <sup>7</sup> R. WETZEL, D. ZIRWER und M. BECKER, *Biopolymers* 8, 391 (1969).
- <sup>8</sup> R. WETZEL, W. SCHÄLIKE, E. BUDER und D. ZIRWER, *Z. Naturforsch.* 24b, 1488 (1969).
- <sup>9</sup> Abkürzungen: RA, Riboadenylsäure; rU, Ribouridylsäure.
- <sup>10</sup> S. ARNOTT, W. FULLER, A. HODGSON und J. PRUTTON, *Nature* 220, 561 (1968).
- <sup>11</sup> A. RICH, D. R. DAVIES, F. H. C. CRICK und J. D. WATSON, *J. Mol. Biol.* 3, 71 (1961).
- <sup>12</sup> D. R. DAVIES, *Ann. Rev. Biochem.* 36/I, 321 (1967).
- <sup>13</sup> C. L. STEVENS und G. FELSENFELD, *Biopolymers* 2, 293 (1964).
- <sup>14</sup> R. F. BEERS und R. F. STEINER, *Nature* 179, 1076 (1957).
- <sup>15</sup> R. F. STEINER und R. F. BEERS, *Polynucleotides: Natural and Synthetic Nucleic Acids*, Amsterdam 1961.
- <sup>16</sup> V. SASISEKHARAN und P. B. SIGLER, *J. Mol. Biol.* 12, 296 (1965).
- <sup>17</sup> A. MICHELSON, J. MASSOULIE und W. GUSCHLBAUER, in *Progress in Nucleic Acid Research* (Academic Press, New York 1967), Vol. 6, p. 83.
- <sup>18</sup> J. F. YOUNG, *J. Appl. Chem.* 17, 241 (1967).
- <sup>19</sup> S. LEWIN, *J. Theoret. Biol.* 17, 181 (1967).
- <sup>20</sup> J. C. MAURIZOT, J. BRAHMS und F. ECKSTEIN, *Nature* 222, 559 (1969).
- <sup>21</sup> M. FALK, *Canad. J. Chem.* 43, 314 (1965).
- <sup>22</sup> M. FALK, *Canad. J. Chem.* 44, 1107 (1966).

Bei Poly (rA + rA) (Figur 1) bleibt D in den Grenzen der Messgenauigkeit ( $\pm 2\%$ ) bei der Dehydratation konstant. Änderungen der Basenorientierungen relativ zur Helixachse treten also nicht auf, wie auch aus Röntgenbeugungsuntersuchungen an Poly (rA + rA) hervorgeht<sup>11</sup>. Dieses Verhalten wird auf die Bindungsverhältnisse zwischen den Adeninbasen und dem Zucker-Phosphatgerüst zurückgeführt (Figur 3).

Die Adeninbasen sind durch 2 Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Zusätzlich bildet jede Adeninbase mit einem Sauerstoffatom einer Phosphatgruppe des gegenüberliegenden Strangs eine dritte Wasserstoffbrücke ( $N_{10}-H \dots O_6$  in Figur 3). Ausserdem sind die  $N_1$ -Atome der Adeninbasen protoniert. Durch die elektrostatische Wechselwirkung der Protonen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Gerüststränge wird der Molekülkomplex in hohem Masse stabilisiert. Daher

bleibt die geordnete Sekundärstruktur von Poly (rA + rA) auch bei vollständiger Dehydratation der Proben erhalten.

**Summary.** LD measurements on poly (rA + rU) show a hysteresis of conformational changes within the dehydration-hydration cycle. The different conformational changes of poly (rA + rU) and DNA during hydration are discussed. With poly (rA + rA) no conformational changes could be detected during dehydration.

D. ZIRWER und M. BECKER

*Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Biophysik, Berlin-Buch (DDR-1115), 10. Juni 1970.*

## Ethanol Increases Liver Uridine-Diphosphate-Glucuronyltransferase

The chronic administration of ethanol to humans and animals has been shown to induce proliferation of the smooth endoplasmic reticulum of the liver parenchymal cell<sup>1-4</sup>, and to enhance some liver microsomal drug-metabolizing enzymes<sup>5-10</sup>. WALTMAN et al.<sup>11</sup> have lately reported a statistically significant reduction of serum bilirubin levels in new-born babies whose mothers had been given ethanol before delivery.

A possible explanation is that ethanol induces liver uridine-diphosphate-glucuronyltransferase (UDPG-transferase, E.C. 2.4.1.17), which is a microsomal enzyme necessary for the conjugation of free bilirubin. In order to test this hypothesis, the behaviour of UDPG-transferase was studied in the liver of rats chronically treated with ethanol. Aniline hydroxylase (E.C. 1.14.1.1) and nitroreductase (E.C. 1.6.6.2), microsomal enzymes, which are well known to be induced by ethanol<sup>7</sup>, were also studied to provide a comparison with UDPG-transferase variations.

Moreover, the effect of ethanol administration on bilirubinaemia and liver UDPG-transferase values was studied in a young man with congenital Gilbert's type jaundice, which was found to be associated with low levels of liver UDPG-transferase activity<sup>12,13</sup>.

**Materials and methods.** 20 male Wistar rats, weighing about 250 g, and fed with standard laboratory diet, were studied. 10 rats were treated daily for 15 days with ethanol (3 g/kg of body wt.). Ethanol was diluted 40% v/v with physiological saline and administered by gastric intubation. Each rat fed ethanol was matched with a control rat that received an isocaloric amount of glucose.

After the treatment, the animals were fasting for 12 h before being killed by exsanguination. Portions of the livers were homogenized in 0.25 M sucrose + 1 mM EDTA, 20% w/v. Microsomes were isolated according to STRITTMATTER<sup>14</sup>. Enzyme assays were carried out on whole homogenates as well as on washed microsomes.

Aniline hydroxylase was assayed according to IMAI et al.<sup>15</sup>. Nitroreductase was determined as described by FOUTS and BRODIE<sup>16</sup>. UDPG-transferase was assayed according to VAN ROY and HEIRWEGH<sup>17</sup> and HEIRWEGH and MEUWISSEN<sup>18</sup>, using unconjugated bilirubin as substrate. Total protein in whole homogenates and in washed microsomes was measured according to LOWRY et al.<sup>19</sup>.

As far as the experiment in man is concerned, ethanol (1.5 g/kg body wt./day) was diluted with 900 ml of physiological saline, and administered i.v. at a rate of 2 ml/min. The ethanol administration was repeated daily for a week. Liver needle biopsies were taken before and after the treatment, and the specimens were used for UDPG-transferase assays and light microscopy study. The specimens were homogenized 8% weight per volume, as described for rat livers. Enzyme assays were carried out on the homogenates by the same method used for rat livers. Bilirubinaemia was assayed every other day.

**Results and discussion.** The mean aniline hydroxylase activity was strikingly increased in rat livers after ethanol administration; that of nitroreductase was significantly increased in washed microsomes only (Table). These data are in agreement with those of RUBIN et al.<sup>7</sup>.

Liver UDPG-transferase activity was markedly enhanced in rats given ethanol; significant increases were

Mean hepatic activity ( $\pm$  S.E.) of aniline hydroxylase, nitroreductase and UDPG-transferase in control rats and in rats given 3 g/kg of ethanol/day for 15 days

Samples	Rats	Aniline hydroxylase	Nitroreductase	UDPG transferase
Whole homogenate	Controls	57.3 $\pm$ 5.3	176 $\pm$ 25	246 $\pm$ 16
	Treated	123.3 $\pm$ 11.9	244 $\pm$ 31	439 $\pm$ 41
Washed microsomes	Controls	219.6 $\pm$ 21	46 $\pm$ 7	590 $\pm$ 69
	Treated	495.9 $\pm$ 83	160 $\pm$ 33	1337 $\pm$ 230

Enzyme activities expressed as nmoles of *p*-aminophenol, *p*-aminobenzoic acid and conjugated bilirubin respectively formed per g of liver protein or microsomal protein per min at 37°C.