

Physikochemische und cytochemische Untersuchungen zur Bindung von Ethidium- und Acridinfarbstoffen an DNA und an Organellen in lebenden Zellen

Von Herbert W. Zimmermann*

Ethidium- und Acridinfarbstoffe sind klassische Modellsubstanzen zum Studium der Bindung kleiner, pharmakologisch wirksamer Moleküle an DNA. Als wichtigster Bindungstyp wird stets die Intercalation zwischen die Basenpaare der DNA diskutiert. Nach unseren Untersuchungen gibt es aber zusätzlich zur Intercalation eine zweite Bindung, die ebenfalls im Bereich kleiner Konzentrationen gebundener Moleküle auftritt und hier externe oder prä-intercalative Bindung genannt werden soll. Aus den experimentellen Bindungsisothermen folgt, daß die Bindungskonstante der Intercalation 1 wesentlich kleiner ist als die Konstante der externen Bindung 2 ($K_{S1} \ll K_{S2}$). Dieser überraschende Befund ist nicht auf die Bindungsenthalpie ($\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0$), sondern auf die Bindungsentropie ($\Delta S_{S1}^0 \ll \Delta S_{S2}^0$) zurückzuführen. Wichtigster Bindungsbeitrag für 1 und 2 ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Farbstoff und DNA. Sie wird durch Wasserstoffbrücken und durch hydrophobe Wechselwirkung unterstützt. Die Bindung einer Substanz an DNA in vitro läßt keine zuverlässigen Voraussagen auf das Verhalten der gleichen Substanz in lebenden Zellen zu. Nur wenige Substanzen werden an die DNA des Kernchromatins in Zellkultur gebunden. Statt dessen beobachtet man häufig Farbstoffakkumulation in Lysosomen. In einigen Fällen wird der Farbstoff spezifisch und sehr effizient an die Mitochondrien der lebenden Zelle gebunden, dort insbesondere an die Membranen, an denen die oxidative Phosphorylierung abläuft.

1. Einleitung

Im Jahr 1961 publizierte *Lerman*^[1] seine grundlegenden Untersuchungen zur Bindung von Proflavin an DNA und begründete damit das Intercalationsmodell. Die Intercalation ist aber keineswegs auf Proflavin beschränkt, sondern wird bei zahlreichen, mehr oder weniger ebenen Kationen mit konjugierten π -Elektronensystemen beobachtet. Klassische Substanzen zum Studium der Intercalation sind z. B. Ethidiumsals und Aminoacridine, Substanzen, die man im Sinne von *Paul Ehrlich* als Farbstoffe mit pharmakolo-

gischer Wirksamkeit apostrophieren kann. Zu ihnen zählen Trypanocide, Antimalariamittel und andere Baktericide, aber auch Mutagene und Carcinogene. Von vielen Antibiotica nimmt man ebenfalls an, daß sie intercalieren. Es ist naheliegend, zwischen der pharmakologischen Wirkung einerseits und der Intercalation andererseits eine Brücke zu schlagen. Die Intercalation ist heute ein viel diskutiertes Modell zur Interpretation verschiedenartiger biologischer und pharmakologischer Phänomene. Das begründet auch das außergewöhnliche Interesse an diesem Bindungstyp, welches sich in einer kaum noch zu überblickenden Flut von Publikationen niederschlägt. Es ist hier nicht beabsichtigt, über diese weit gespannte und verzweigte Thematik zusammenfassend zu referieren. Dazu sei auf die Literatur verwiesen, z. B. auf die kompetenten Darstellungen

[*] Prof. Dr. H. W. Zimmermann
Institut für Physikalische Chemie der Universität
Albertstraße 21, D-7800 Freiburg

von *Peacocke*^[2] und *Waring*^[3], die dem Fernerstehenden den Zugang zu den älteren und jüngeren Originalarbeiten eröffnen. Vielmehr soll hier die Intercalation als ein spezieller und außergewöhnlicher Typ einer Nebenvalenzbindung diskutiert werden, den das Polyanion DNA mit Farbstoffkationen eingeht.

Bei der Intercalation wird das Molekül zwischen die Basenpaare der DNA eingeschoben und festgehalten. Die Doppelhelix muß sich dazu aufwinden, um Platz für das intercalierende Molekül zu schaffen. Diese Bindungsgeometrie ist ausgefallen. Ein unvoreingenommener Beobachter würde kaum wagen, sie vorauszusagen. Man kann sich einfachere Möglichkeiten für die Bindung eines Moleküls an das Polyanion DNA vorstellen. Warum werden sie nicht realisiert? Oder, wenn sie realisiert werden könnten, warum sind sie biologisch nicht relevant?

Es bedurfte vieler Anstrengungen, das Intercalationsmodell abzusichern. Für die Intercalation gibt es mehrere indirekte und direkte Beweise^[3]. Heute ist das Intercalationsmodell allgemein akzeptiert, wenn auch Detailfragen noch offen sind. Als schlagendster Beweis für die Intercalation gilt allgemein die Röntgen-Strukturuntersuchung von *Sobell et al.*^[4-6], die an niedermolekularen, kristallinen Ethidium-DNA-Komplexen durchgeführt wurde und die Intercalation augenfällig belegt. Diese Untersuchungen wurden später von anderen Forschern auf Komplexe aus niedermolekularer DNA und Aminoacridinen ausgedehnt^[3]. Stets wurde Intercalation gefunden, wobei die Bindungsgeometrie den wechselnden molekularen Gegebenheiten angepaßt ist. Ohne die großartige Leistung dieser Autoren schmälern zu wollen, muß doch erwähnt werden, daß die DNA dieser Komplexe mit nur zwei Basenpaaren extrem kurz war. Es ist deshalb die Frage erlaubt, ob die dabei gewonnenen Resultate bedenkenlos auf hochmolekulare DNA übertragen werden können. Ferner ist noch zu berücksichtigen, daß die Geometrie im Kristall durch die Bedingung der Elektroneutralität und die Minimierung der Gitterenergie bestimmt wird.

Es gibt auch einige ältere Röntgen-Strukturuntersuchungen an hochmolekularen Farbstoff-DNA-Fäden^[1,7]. Die Faserdiagramme dieser Komplexe sind aber nur begrenzt aussagefähig und lassen keinen detaillierten Schluß auf die Geometrie zu. In diesem Zusammenhang ist das Ergebnis einer Röntgen-Strukturuntersuchung besonders wertvoll, die von *Liebman et al.*^[8] an einem hochmolekularen, kristallinen Ethidium-tRNA-Komplex ausgeführt wurde. Die Autoren fanden, daß die Ethidium-Kationen extern an das Biopolymer gebunden sind, obwohl Intercalation in doppelhelicale Bereiche der verwendeten tRNA im Prinzip möglich gewesen wäre und auch erwartet wurde. Dieser Befund hat Gewicht, weil er an einem Komplex aus Farbstoff und natürlicher tRNA erhoben wurde. Leider haben die Untersuchungen von *Liebman et al.* keine Nachfolge gefunden.

Die beschriebenen Röntgen-Strukturuntersuchungen lassen den Schluß zu, daß Intercalation und externe Bindung mögliche Bindungstypen sind. Welche Bindung und welche Geometrie im speziellen Fall jedoch realisiert wird, kann nicht ohne weiteres vorausgesagt werden. Dadurch kompliziert sich unser Problem, weil wir jetzt nicht nur mit einer, sondern mindestens mit zwei Bindungen konfrontiert sind.

Die chemische Bindung kann durch thermodynamische Parameter charakterisiert werden, z. B. durch die Gleichgewichtskonstante (Bindungskonstante) zwischen gebundener und freier Spezies, durch die Bindungsenthalpie und die Bindungsentropie. Diese Parameter sind unabhängig vom Weg, auf dem die Bindung geknüpft wird. Über die Thermodynamik der Intercalation gibt es eine Reihe von Untersuchungen^[2,3], die aber in der Regel nur an einigen ausgewählten Molekülen durchgeführt wurden. Nur wenige Autoren haben sich der Mühe einer vergleichenden Bindungsstudie unterzogen, um herauszufinden, welche Strukturmerkmale ein Molekül aufweisen muß, damit es an DNA gebunden wird^[2,3,9,10]. Hier wäre eine ergänzende Untersuchung an einer Serie einfacher, systematisch abgewandelter Moleküle unter gleichen Versuchsbedingungen wünschenswert. Bemerkenswert gering war bisher auch das Interesse an Bindungsenthalpien und -entropien^[2,3,11-13]. Dabei sind gerade diese Parameter der thermodynamische Schlüssel zum Verständnis der chemischen Bindung und lassen für die Diskussion der Intercalation wertvolle Hinweise erwarten. Ursache für diese Informationslücke ist der erhebliche experimentelle Aufwand, der notwendig ist, diese Daten einigermaßen verläßlich zu gewinnen. Außerdem sind thermodynamische Untersuchungen spröde und gelten als unattraktiv. Jedoch ist die Intercalation ein ungewöhnlicher Bindungstyp, der schon wegen seiner Bedeutung in der Biologie und Pharmakologie genauer verstanden werden sollte. Wir haben deshalb nochmals Experimente zu dieser spröden Materie gemacht, die im Folgenden zusammenfassend diskutiert werden^[14-19]. Dabei haben wir uns nicht nur bemüht, die oben angedeuteten Lücken zu schließen, sondern zugleich versucht, ein weiteres Problem anzuschneiden: Es ist lange bekannt und von vielen Autoren belegt^[2,3], daß die Bindungskonstante von Farbstoffkationen an DNA stark von der Konzentration von Salzen in der Farbstoff-DNA-Lösung abhängt und mit steigender Salzkonzentration abnimmt. Dieser Befund wird stets als Hinweis auf die Beteiligung elektrostatischer Wechselwirkung an der Farbstoffbindung gewertet. Nach der Theorie der Kondensation von Gegenionen an Polyelektrolyte^[20,21], die heute allgemein akzeptiert wird, ist DNA aber bereits bei kleinen Salzkonzentrationen annähernd mit Gegenionen gesättigt^[21]. Eine starke Abhängigkeit der Bindungskonstante von der Salzkonzentration ist dann nicht leicht verständlich. Einige ergänzende Untersuchungen zu diesem Problem erschienen uns deshalb angebracht.

Experimenteller Zugang zur Bindungskonstante ist die Bindungsisotherme, deren einfachster Typ von *Scatchard*^[22] angegeben wurde. Die Scatchard-Isotherme ist nichts anderes, als eine lineare Darstellung der Langmuir-Adsorptionisotherme. Ihr liegt das Massenwirkungsgesetz zugrunde. Sie gilt – erstaunlich gut – immer dann, wenn an das Biopolymer nur relativ wenige Moleküle gebunden sind und die Wechselwirkung zwischen diesen Molekülen vernachlässigt werden kann. Bei höherer Belegung der DNA mit Farbstoff treten Abweichungen von der Linearität auf. Als Ursache diskutiert man z. B. verschiedene Sorten gebundener Moleküle, die sich in ihrer Affinität zum Substrat unterscheiden, Wechselwirkung der gebundenen Moleküle untereinander, die zu kooperativen Effekten führt, sowie Bindung von Molekülen, die gleichzeitig meh-

rere Bindungspositionen beanspruchen. Eine ganze Palette von Modellen wurde entwickelt, in denen die oben diskutierten Gesichtspunkte berücksichtigt sind^[2,3,23-33]. Gerade die Vielzahl der Modelle zeigt, daß es schwierig ist, gekrümmte Scatchard-Isothermen eindeutig zu interpretieren. Ganz abgesehen davon können auch experimentelle Fehler leicht gekrümmte Bindungsisothermen vortäuschen. Wir haben deshalb die im folgenden beschriebenen Untersuchungen auf den linearen Bereich der Scatchard-Isotherme beschränkt und damit auf kleine Konzentration gebundener Moleküle. Zwei Gründe waren dafür ausschlaggebend:

1. In vivo ist die Belegung von DNA mit einem Pharmakon begrenzt, weil auch die applizierte Menge begrenzt ist. Deshalb ist der lineare Bereich der Scatchard-Isotherme von primärem Interesse für die Diskussion der biologischen und pharmakologischen Bedeutung der Bindung. Im Folgenden soll gezeigt oder doch wenigstens wahrscheinlich gemacht werden, daß bereits der lineare Bereich der Scatchard-Isotherme von zwei verschiedenen Bindungen verursacht wird, nämlich von der Intercalation und von einer externen, prä-intercalativen Bindung. Obwohl die externe Bindung gegenüber der Intercalation thermodynamisch begünstigt ist, dürfte die Intercalation unter den Gegebenheiten in einer Zelle dominieren. Dabei wäre allerdings noch die Frage zu beantworten, ob das Pharmakon in lebenden Zellen tatsächlich an DNA gebunden wird.

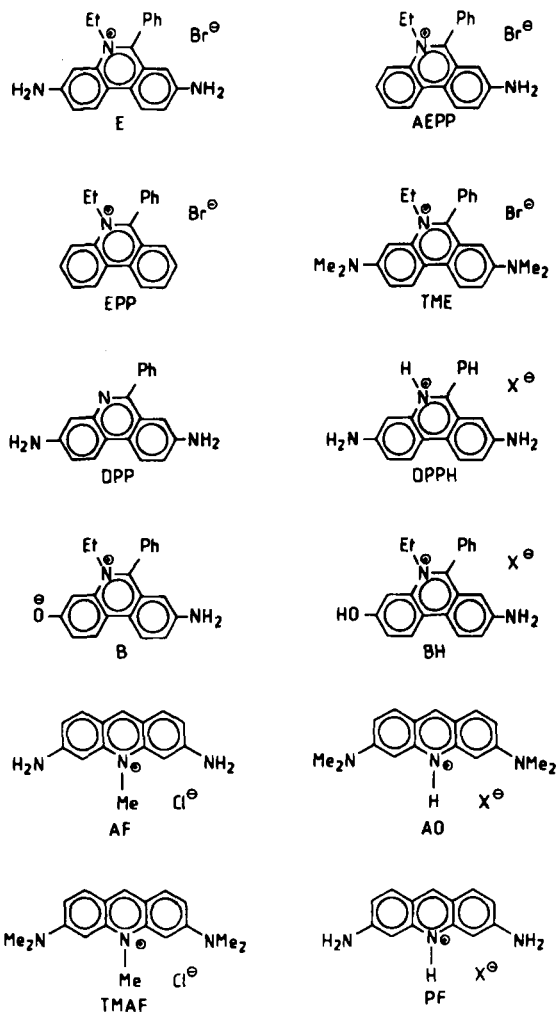
2. Im linearen Bereich der Scatchard-Isotherme gilt näherungsweise das Massenwirkungsgesetz. Die Diskussion der Bindung kann dann in der dem Chemiker vertrauten Sprache erfolgen, d.h. mit Bindungskonstanten (Gleichgewichtskonstanten), Bindungsenthalpien und -entropien.

Wir haben die Bindungsisothermen mehrerer ausgewählter Ethidium- und Acridinfarbstoffe an Kalbsthymus-DNA in wäßrigem Medium unter gleichen experimentellen Bedingungen bestimmt. Die ermittelten Bindungskonstanten, Enthalpien und Entropien sind damit untereinander direkt vergleichbar. Die Substanzen sind in Schema 1 zusammengestellt. Ein Vergleich der Bindungseigenschaften der Moleküle ermöglicht es, die Bedeutung von elektrostatischer Wechselwirkung, Wasserstoffbrücken und hydrophober Wechselwirkung für die Bindung zu erkennen.

2. Experimentelles

Es gibt viele Möglichkeiten zur experimentellen Bestimmung von Bindungsisothermen für die Bindung zwischen Farbstoffmolekülen F und Nucleinsäure N^[2,3]. Ziel aller Methoden ist die Ermittlung der Konzentration C des gebundenen (b) und freien (f) Farbstoffs C_F bzw. C_{Ff} bei verschiedenen Konzentrationen an Farbstoff $C_F = C_{Ff} + C_{Fb}$ und Nucleinsäure C_N . Das Problem erscheint einfach und fast trivial. Leider gibt es in der Praxis eine Fülle von Fallstricken, die die Ergebnisse verfälschen oder sogar unbrauchbar machen können. Ein Hinweis auf die experimentelle Methode ist deshalb unerlässlich.

Wir haben die Bindungsisothermen absorptionsspektroskopisch bestimmt. Bei der Bindung eines Farbstoffmoleküls an DNA wird die längstwellige Absorptionsbande von F in der Regel bathochrom verschoben. Außerdem



Schema 1. E Ethidiumbromid, AEPP 8-Amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid, EPP 5-Ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid, TME Tetramethylethidiumbromid, DPP 3,8-Diamino-6-phenylphenanthridin, DPPH protoniertes DPP, B 8-Amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-3-olat, BH protoniertes B, AF Acriflavin, AO protoniertes Acridinorange, TMAF Tetramethylacriflavin, PF protoniertes Proflavin.

nimmt ihre Intensität ab. Die Absorptionsspektren für verschiedene C_F und C_N schneiden sich im allgemeinen im Langwelligen in einem oder mehreren isosbestischen Punkten: Freier und gebundener Farbstoff stehen im thermodynamischen Gleichgewicht. Wir haben unsere Untersuchungen auf solche Systeme und Versuchsbedingungen beschränkt, bei denen das thermodynamische Gleichgewicht durch isosbestische Punkte belegt war. Im Kurzwelligen beobachtet man keine isosbestischen Punkte, weil zum freien und gebundenen Farbstoff die Nucleinsäure als weitere absorbierende Spezies hinzutritt.

Die Konzentrationen C_{Ff} und C_{Fb} sind aus dem gemessenen Extinktionskoeffizienten ϵ zugänglich.

$$\epsilon C_F = \epsilon_f C_{Ff} + \epsilon_b C_{Fb}$$

Dazu müssen außer C_F und C_N die molaren Extinktionskoeffizienten des freien und gebundenen Farbstoffs ϵ_f bzw. ϵ_b genau bekannt sein. Bereits kleine Fehler dieser experimentellen Größen können zu systematischen Abweichungen führen, die gekrümmte Scatchard-Bindungsisothermen

vortäuschen. Einige kritische Probleme sollen deshalb wenigstens angedeutet werden.

ϵ_f ist aus dem Absorptionsspektrum von Farbstofflösungen zugänglich, für die das Lambert-Beer-Gesetz gilt. Bei assoziierenden Substanzen, z. B. Aminoacridinen, treten Schwierigkeiten auf, die eine Extrapolation auf $C_F \rightarrow 0$ notwendig machen^[18].

ϵ_b ergibt sich als Grenzwert der Absorptionsspektren bei hohem Nucleinsäureüberschuß $C_N \rightarrow \infty$. Unter den üblichen Versuchsbedingungen kann dieser Grenzwert nur näherungsweise erreicht werden. Deshalb empfiehlt es sich, ein Extrapolationsverfahren anzuwenden, das zuerst von *Benesi und Hildebrand*^[34] angegeben und von uns an das vorliegende Problem adaptiert wurde^[14].

Die Bestimmung von C_F ist trivial, vorausgesetzt es liegt eine reine Farbstoffprobe vor. Viele Autoren, die ihre Farbstoffe unbesehen einsetzen, würden sich über das prächtige Farbenspiel wundern, das ihnen ein einfaches Dünnschichtchromatogramm beschert. Selbst chromatographisch einheitliche Substanzen können noch Lösungsmittelreste (Wasser, Alkohol usw.) hartnäckig festhalten, die sogar dem Trocknen im Hochvakuum widerstehen und die Einwaage verfälschen.

Die Konzentration an vorgelegten Mononucleotideinheiten C_N bestimmt man am zuverlässigsten durch Phosphatanalyse. Hier stehen mehrere Verfahren zur Verfügung^[35,36].

Selbst bei sorgfältigem Arbeiten und bei Beachtung aller Vorsichtsmaßregeln sind kleine statistische Fehler unvermeidlich. Sie können unter ungünstigen Bedingungen empfindliche Störungen verursachen. Das gilt insbesondere für die Scatchard-Darstellung der Bindungsisotherme, in die Differenzen großer Zahlen eingehen. Kleine Fehler werden dann stark vergrößert. Anstelle der erwarteten Folge aneinandergereihter Meßpunkte erhält man den gefürchteten Sternenhimmel. Hier hilft die Mittelung über viele unabhängige Einzelmessungen weiter, was jedoch mit großem Aufwand verbunden ist.

Eine andere Möglichkeit besteht im Glätten der experimentellen Meßwerte. Hat man z. B. in einer Meßreihe bei gegebenem C_F die Extinktion ϵ bei den verschiedenen Nucleinsäurekonzentrationen C_N ermittelt und trägt man ϵ gegen C_N auf, so erhält man im allgemeinen eine Schar von Meßpunkten, die nur sehr wenig von einer idealen Kurve abweicht. Trotzdem können diese kleinen Abweichungen größere Schwankungen in der Scatchard-Darstellung verursachen. Um die Fehler zu minimieren, kann man jetzt durch die Punkte in der ϵ - C_N -Darstellung eine empirisch geglättete Kurve legen und daraus neue, verbesserte Werte ermitteln. Die statistischen Fehler werden dadurch unterdrückt, systematische Abweichungen bleiben erhalten. Wir verwenden zum empirischen Glätten der Meßwerte ein Computerprogramm, das ursprünglich von *Weidner*^[37] für analoge Probleme bei der Röntgen-Strukturuntersuchung von Flüssigkeiten entwickelt wurde. Dieses automatisierte Verfahren ist dem Glätten „von Hand“ vorzuziehen.

Wegen der genannten experimentellen Schwierigkeiten darf man keine zu großen Erwartungen an die Genauigkeit der ermittelten Bindungskonstanten, Bindungsenthalpien und insbesondere Bindungsentropien stellen. Für die folgende vergleichende Diskussion sind die Daten jedoch eine brauchbare Grundlage.

3. Bindungsisotherme von *Langmuir* und *Scatchard*

Die Bindung von Farbstoffmolekülen F an das Biopolymer DNA kann im einfachsten Fall durch zwei Parameter charakterisiert werden: Die Bindungskonstante K und den Bruchteil n der vorgelegten Mononucleotide C_N , die zur Bindung befähigt sind. Beide Parameter können der Scatchard-Bindungsisotherme entnommen werden. Die Bindung von F an DNA verläuft nach Reaktion (a).



Wenn die Konzentration C_{Fb} der gebundenen Moleküle hinreichend klein ist, können kooperative Bindungsphänomene vernachlässigt werden. Für die Gleichgewichtskonzentrationen der freien und gebundenen Farbstoffmoleküle C_{Ff} bzw. C_{Fb} und der verfügbaren, freien Bindungspositionen der Nucleinsäure C_{Nf} gilt dann das Massenwirkungsgesetz (MWG) [Gl. (1)].

$$K = C_{Fb} / (C_{Nf} \cdot C_{Ff}) \quad (1)$$

Die Konzentration der vorgelegten Mononucleotide ist C_N , der vorgelegten Bindungspositionen $n C_N$. Der Faktor $0 < n < 1$ berücksichtigt, daß im Mittel nur ein Bruchteil n von C_N zur Bindung von F befähigt ist. Sind im Gleichgewicht bereits C_{Fb} Moleküle gebunden, so verbleiben noch

$$C_{Nf} = n C_N - C_{Fb}$$

frei verfügbare Bindungspositionen. Daraus folgt Gleichung (2).

$$K_S = C_{Fb} / [(n C_N - C_{Fb}) C_{Ff}] \quad (2)$$

Wie in Abschnitt 4 gezeigt wird, ist die Gleichgewichtskonstante $K = K_S$ an die genannte Zählung der Bindungspositionen nach *Scatchard* angepaßt. Mit $r = C_{Fb} / C_N$, der Zahl gebundener Moleküle pro Mononucleotideinheit, erhält man die Adsorptionsisotherme von *Langmuir* [Gl. (3)].

$$r = n K_S C_{Ff} / (1 + K_S C_{Ff}) \quad (3)$$

Durch einfache Umformung ergibt sich die Scatchard-Darstellung der Bindungsisotherme^[22] [Gl. (4)].

$$r / C_{Ff} = K_S (n - r) \quad (4)$$

Trägt man r / C_{Ff} gegen r auf, so erhält man bei Gültigkeit von Gleichung (4) eine abfallende Gerade. Sie schneidet die Abszisse bei $r = n$. Aus der Neigung der Gerade folgt K_S . Damit sind n und K_S bestimmt. Der extrapolierte Wert $r = n$ charakterisiert in dieser einfachsten Darstellung die maximale Zahl gebundener Farbstoffmoleküle pro Mononucleotid. Diese Interpretation kann zu Widersprüchen führen (Abschnitt 4). Besser ist es, $r = n$ als obere Grenze des Bereichs aufzufassen, innerhalb dessen wenigstens näherungsweise das MWG gilt und die Farbstoffmoleküle unabhängig voneinander an die Nucleinsäure gebunden werden.

Als Beispiel sind in Abbildung 1 Scatchard-Bindungsisothermen für das System Ethidiumbromid-DNA (E/DNA) bei kleinen Farbstoffkonzentrationen wiedergegeben^[14]. Die wäßrigen Lösungen enthalten außer E und DNA noch NaCl als Neutralsalz. Die Isothermen beziehen sich auf unterschiedliche Salzkonzentration C_S . Im Bereich kleiner r lassen sich alle Isothermen durch Geraden approximieren. Das MWG ist damit formal erfüllt. Bei größeren Werten von r treten positive Abweichungen von der Linearität auf. Dieser Bereich gekrümmter Scatchard-Isothermen soll hier – aus den oben genannten Gründen – nicht diskutiert werden.

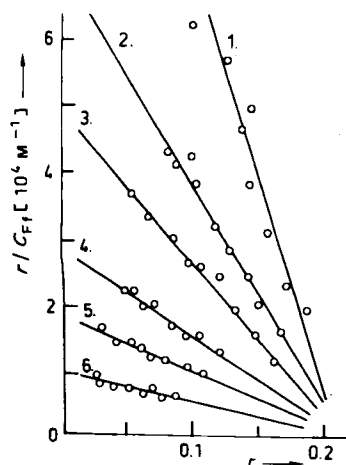


Abb. 1. Scatchard-Bindungsisothermen für das System E/DNA bei den Konzentrationen C_S des Kompetitorsalzes $S = \text{NaCl}$. 1. $C_S = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. 2. $0,05 \text{ M}$, 3. $0,1 \text{ M}$, 4. $0,25 \text{ M}$, 5. $0,5 \text{ M}$, 6. $1,0 \text{ M}$. $\text{pH} = 7,7$, $T = 298 \text{ K}$ [14].

Die Geraden für verschiedene C_S unterscheiden sich im Anstieg (Abb. 1). Unabhängig vom Anstieg schneiden sich aber alle extrapolierten Geraden innerhalb der Fehlergrenzen auf der Abszisse bei $n = 0,21$. n ist damit von der Salzkonzentration C_S annähernd unabhängig (Abb. 2). Das Gleiche beobachtet man bei KCl oder MgCl_2 ^[14]. n ist dann auch unabhängig von der Art des Salzes S (Abb. 2). Auch für verschiedene Temperaturen erhält man im Bereich kleiner r lineare Scatchard-Isothermen, die sich wieder unabhängig von S und C_S bei $n = 0,21$ auf der Abszisse schneiden^[14]. Damit ist n ein Parameter, der die Bindung des Farbstoffs an das Biopolymer charakterisiert.

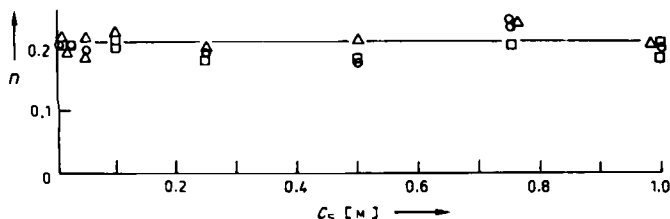


Abb. 2. Bindungsparameter n für das System E/DNA bei den Konzentrationen C_S der Kompetitorsalze $S = \text{NaCl}$ (o), KCl (□), MgCl_2 (Δ). $\text{pH} = 7,7$, $T = 298 \text{ K}$ [14].

Die Bestimmung von n aus dem extrapolierten Schnittpunkt der Scatchard-Geraden mit der Abszisse ist – wie alle Extrapolationen – problematisch. Es soll deshalb darauf hingewiesen werden, daß n am System E/DNA/NaCl

noch auf einem zweiten, unabhängigen Weg durch direkte Titration des vorgelegten Farbstoffs mit eingestellter DNA-Lösung bei spektroskopischer Indizierung des Endpunkts ermittelt werden kann^[14]. In die Titration gehen keine speziellen Voraussetzungen wie Gültigkeit des MWG, Extinktionskoeffizienten der freien und gebundenen Spezies usw. ein. Der so erhaltene Wert $n = 0,21$ ist in einem weiten Konzentrationsbereich unabhängig von C_S und mit dem extrapolierten Wert identisch.

Der Anstieg der Bindungsisothermen und damit die Bindungskonstante K_S hängen von der Temperatur T , aber auch von der Art des Salzes S und der Salzkonzentration C_S ab^[14]. $K_S = K_S(T, C)$ hat damit den Charakter einer scheinbaren Gleichgewichtskonstante. Abbildung 3 zeigt K_S als Funktion der Konzentration C_S der Salze NaCl, KCl und MgCl_2 bei der Standardtemperatur $T = 298 \text{ K}$. Mit steigendem C_S nimmt K_S ab, bei MgCl_2 sehr schnell, bei NaCl und KCl langsamer. Für hinreichend große C_S strebt K_S offenbar einem Grenzwert K_{S1} zu, der zwar klein, aber von null verschieden ist. Die Kurven in Abbildung 3 lassen sich durch Hyperbeln approximieren, die sich auf der Ordinate für $C_S = 0$ schneiden und für $C_S \rightarrow \infty$ die Asymptote K_{S1} erreichen (Abb. 3).

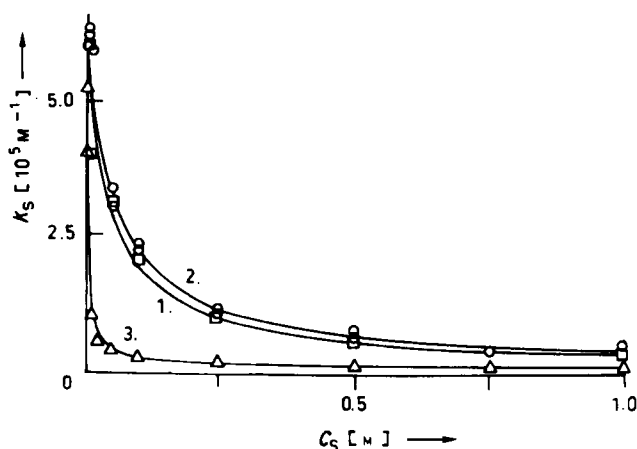


Abb. 3. Abhängigkeit der scheinbaren Scatchard-Bindungskonstante K_S des Systems E/DNA von der Konzentration C_S der Kompetitorsalze $S = \text{NaCl}$ (o), KCl (□), MgCl_2 (Δ). $\text{pH} = 7,7$, $T = 298 \text{ K}$. 1.-3. berechnete Kurven [Gl. (2)], Daten Tabelle I [14].

Ebenso wie die Bindungskonstante K_S nimmt auch die Zahl r der gebundenen Farbstoffmoleküle pro Mononucleotideinheit mit steigender Salzkonzentration C_S ab (Abb. 4)^[14]. Offensichtlich wird der Farbstoff aus seiner Bindung an das Biopolymer verdrängt. Die Abnahme von r ist wieder bei MgCl_2 viel stärker als bei NaCl. Aber selbst bei der extrem hohen Salzkonzentration $C_S = 2 \text{ M}$ gelingt es nicht, den Farbstoff E vollständig aus seiner Bindung an DNA zu lösen. Vielmehr deuten die Kurven in Abbildung 4 an, daß r , ebenso wie K_S , bei großem C_S einem Grenzwert zustrebt, der bei MgCl_2 schneller erreicht wird als bei NaCl. Untersuchungen bei sehr großem C_S sind nur begrenzt interpretierbar, weil sich schwer überschaubare Phänomene wie Aussalzeffekte, Denaturierung des Biopolymers usw. dem kompetitiven Salzeffekt überlagern. Wir haben deshalb unsere Messungen zum kompetitiven Effekt im allgemeinen auf Konzentrationen $C_S \leq 1 \text{ M}$ beschränkt.

Aus der Temperaturabhängigkeit der Scatchard-Bindungskonstante K_S können die Standardbindungsenthal-

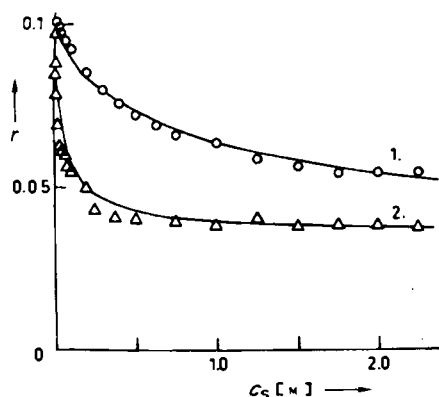


Abb. 4. Zahl $r = C_{\text{geb}}/C_N$ gebundener Farbstoffmoleküle pro Mononucleotideinheit DNA des Systems E/DNA als Funktion der Konzentration C_S der Kompetitorsalze $S = \text{NaCl}$ (○), MgCl_2 (Δ). Farbstoffkonzentration $C_F = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, DNA-Konzentration $C_N = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. pH = 7.7, $T = 298 \text{ K}$. 1. und 2. berechnete Kurven [Gl. (18), Daten Tabelle 1] [14].

die ΔH_S^0 und -entropie ΔS_S^0 mit der Beziehung von *van't Hoff* ermittelt werden [Gl. (5)].

$$\ln K_S = -\Delta H_S^0/RT + \Delta S_S^0/R \quad (5)$$

Für die Bestimmung von ΔH_S^0 und ΔS_S^0 steht nur ein sehr kleines Temperaturintervall zur Verfügung, weil bei zu hohen bzw. zu tiefen Temperaturen entweder die DNA denaturiert bzw. die Lösung erstarrt. Um die experimentellen Fehler in Grenzen zu halten, sind deshalb sehr viele Einzelmessungen erforderlich. In Abbildung 5 ist die Tem-

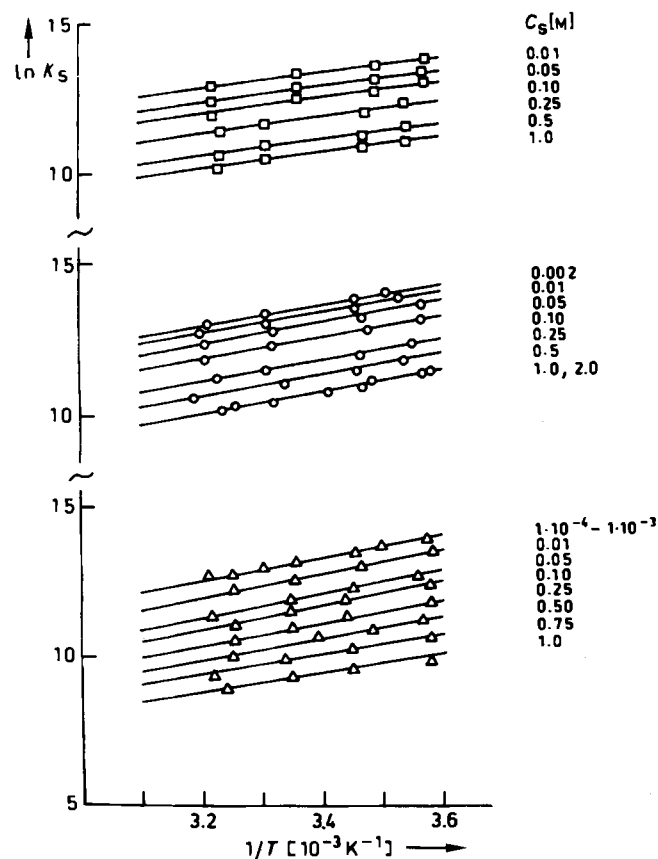


Abb. 5. Temperaturabhängigkeit der scheinbaren Scatchard-Bindungskonstante K_S des Systems E/DNA für verschiedene C_S der Kompetitorsalze $S = \text{NaCl}$ (○), KCl (□), MgCl_2 (Δ). pH = 7.7 [14].

peraturabhängigkeit von K_S in van't-Hoff-Darstellung für das System E/DNA bei verschiedenen Konzentrationen C_S der Kompetitorsalze NaCl , KCl und MgCl_2 aufgetragen^[14]. Man erkennt Scharen von annähernd parallelen Geraden. Damit ist die scheinbare Bindungsenthalpie ΔH_S^0 von S und C_S weitgehend unabhängig (Abb. 6), während sich die Abhängigkeit der Bindungskonstante K_S von S und C_S im Gang der scheinbaren Bindungsentropie ΔS_S^0 widerspiegelt (Abb. 7).

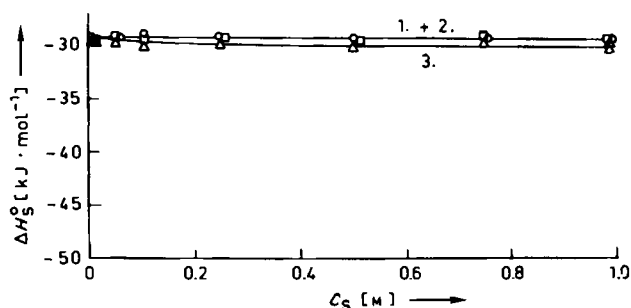


Abb. 6. Abhängigkeit der scheinbaren Scatchard-Bindungsenthalpie ΔH_S^0 des Systems E/DNA von der Konzentration C_S der Kompetitorsalze $S = \text{NaCl}$ (○), KCl (□), MgCl_2 (Δ). pH = 7.7. 1.–3. berechnete Kurven [Gl. (21) und (5), Daten Tabelle 1 und 2] [14].

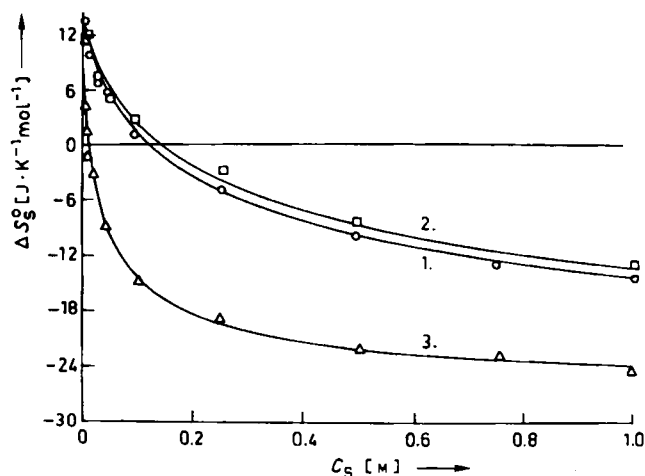


Abb. 7. Abhängigkeit der scheinbaren Scatchard-Bindungsentropie ΔS_S^0 des Systems E/DNA von der Konzentration C_S der Kompetitorsalze $S = \text{NaCl}$ (○), KCl (□), MgCl_2 (Δ). pH = 7.7. 1.–3. berechnete Kurven [Gl. (21) und (5), Daten Tabelle 1 und 2] [14].

Abschließend möchte ich nicht versäumen, auf die Pionierarbeiten von *Waring*^[38] und von *LePecq* und *Paoletti*^[12] hinzuweisen, die 1965 bzw. 1967 in breit angelegten Studien die Bindung von Ethidiumbromid an DNA untersuchten. Sie beschrieben lineare Scatchard-Isothermen mit $n = 0.2$, die von der Basenzusammensetzung der DNA unabhängig waren. Danach besteht keine ausgeprägte Basenspezifität der Bindung von E an DNA. Sie fanden darüber hinaus, daß die Bindungskonstante K_S mit steigender Salzkonzentration abnimmt und bei großen C_S einem Plateau zustrebt. Die Menge des gebundenen Farbstoffs war dann konstant und annähernd unabhängig von der Salzkonzentration C_S . *LePecq* und *Paoletti* haben als erste die Temperaturabhängigkeit von K_S beschrieben und machten den Versuch, aus Messungen bei 23 und 37°C, ΔH_S^0 und ΔS_S^0 für verschiedene NaCl -Konzentrationen zu bestimmen. Qualitativ gibt es viele Parallelen zwischen den Be-

funden dieser Autoren und unseren Messungen. Quantitativ sind teilweise jedoch erhebliche Unterschiede zu verzeichnen, insbesondere in der Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter K_S , ΔH_S^0 und ΔS_S^0 von der Salzkonzentration C_S . Wir führen sie auf experimentelle Schwierigkeiten zurück und haben uns bemüht, diese in unseren Untersuchungen zu überwinden.

4. Bindungsisotherme von Crothers, das Massenwirkungsgesetz und die Zählung der Bindungspositionen

Bei der Ableitung der Bindungsisotherme von Scatchard geht man formal davon aus, daß von C_N eingesetzten Mononucleotiden nur $n C_N$ zur Bindung mit einem Molekül F befähigt sind. Ein freies Molekül in der Lösung „sieht“ $C_{Nf} = n C_N - C_{Fb}$ freie Bindungspositionen und „entscheidet sich“ für eine davon, um eine Bindung einzugehen. Die Zahl der freien Positionen der DNA wird dann um eine verringert. Die Gleichgewichtskonstante K_S ist an diese Zählweise der Bindungspositionen adaptiert.

Nach den Untersuchungen von Waring^[38] sowie LePecq und Paoletti^[12] gibt es keine basenspezifische Präferenz der Bindung von E an DNA. Dann sollte aber z. B. Intercalation zwischen alle benachbarte Basenpaare der DNA in gleicher Weise möglich sein. Der experimentelle Wert des Bindungsparameters $n \approx 0.2$ ist aber zu klein und entspricht nicht dieser Erwartung. Um der Gleichwertigkeit der Bindungspositionen Rechnung zu tragen, haben Armstrong et al.^[39] und Crothers et al.^[27, 40] eine andere Zählung der Bindungspositionen vorgeschlagen, die als „nearest neighbour exclusion-Prinzip“ in die Literatur eingegangen ist. Danach ist Intercalation zwischen allen benachbarten Basenpaaren der DNA im Prinzip möglich. Alle Bindungspositionen sind gleichwertig. Ist eine der Positionen besetzt, wird die Bindung an den benachbarten Positionen verhindert. Crothers et al.^[40] haben auf der Basis dieses Ausschlußprinzips mit Hilfe der Matrixmethode folgende Bindungsisotherme abgeleitet [Gl. (6)]:

$$r'/C_{Ff} = K_C(1-2r')^2/(1-r') \quad (6)$$

r' bezieht sich auf die Konzentration von Basenpaaren $C'_N = C_N/2$ und beträgt $r' = C_{Fb}/C'_N = 2r$. Die Bindungskonstante K_C beschreibt die Bindung von F an die ungestörten Bindungspositionen der DNA, d. h. für kleine r' gilt Gleichung (7).

$$\lim_{r' \rightarrow 0} K_C = C_{Fb}/(C'_N C_{Ff}) \quad (7)$$

Gleichung (6) enthält den Bindungsparameter n nicht mehr. Er ist durch den Formalismus festgelegt. Wir untersuchen das Grenzverhalten von Gleichung (6) für $r' < 1$, das uns im Folgenden alleine interessiert. Mit der unendlichen geometrischen Reihe

$$1/(1-r') = 1 + r' + r'^2 + \dots$$

erhalten wir aus Gleichung (6) Gleichung (8).

$$r'/C_{Ff} = K_C(1 - 3r' + r'^2 + \text{höhere Glieder}) \quad (8)$$

Bei hinreichend kleinen r' können wir die Entwicklung in Gleichung (8) näherungsweise nach dem linearen Glied in r' abbrechen. Führen wir wieder die Konzentration C_N an Mononucleotiden ein, so geht Gleichung (8) in (9) über.

$$r/C_{Ff} = 3 K_C [(1/6) - r] = K_S(n-r) \quad (9)$$

Für kleine r ist damit die Bindungsisotherme von Crothers ebenfalls vom Scatchard-Typ. Durch Koeffizientenvergleich erhalten wir $K_S = 3 K_C$ und $n = 1/6 = 0.17$. Bei den von uns untersuchten Aminoacridinen wurde in der Tat der Bindungsparameter $n = 0.17$ in Übereinstimmung mit der Theorie gefunden; bei Ethidiumbromid und Derivaten ist der experimentelle Wert $n = 0.21$ etwas höher. Sofern man sich auf den linearen Teil der Bindungsisotherme beschränkt, gilt auch für das nearest neighbour exclusion-Modell formal das MWG. Der Unterschied zur Scatchard-Isotherme besteht in der Zählung der Bindungspositionen.

Das von Armstrong et al. und Crothers et al. vorgeschlagene Ausschlußprinzip von Bindungspositionen ist physikalisch sinnvoll. Wir wollen diese Zählung der Bindungspositionen in das MWG einführen. Die Konzentration der eingesetzten Mononucleotide sei wieder C_N . Ein Bruchteil $p C_N$ repräsentiere mögliche Bindungspositionen. Bei Bindung eines Moleküls F sollen jetzt im Mittel q benachbarte Positionen der DNA blockiert werden. Die Konzentration der freien Bindungsstellen ist dann $C_{Nf} = p C_N - q C_{Fb}$ und mit Gleichung (1) folgt Gleichung (10) oder (11).

$$K_Z = C_{Fb}/[(p C_N - q C_{Fb}) C_{Ff}] \quad (10)$$

$$r'/C_{Ff} = q K_Z [(p/q) - r] = K_S(n-r) \quad (11)$$

Der Koeffizientenvergleich mit der Scatchard-Isotherme ergibt $K_S = q K_Z$ und $n = p/q$. Für das nearest neighbour exclusion-Modell gilt z. B. $C'_N = p C_N = C_N/2$, $p = 1/2$. Vergleicht man Gleichung (11) mit (9), so erkennt man, daß die Bindung eines Moleküls F an eine Bindungsposition der DNA im linearen Bereich der Crothers-Isotherme bei kleinen r drei Basenpaare ($q = 3$) blockiert. Dann werden – entgegen dem Namen des Modells – nicht nur die Nachbarpositionen, sondern auch die übernächsten Positionen von Bindungen ausgeschlossen. An dieser Stelle soll nochmals daran erinnert werden, daß dieser Wert $q = 3$ in günstigen Fällen direkt durch Titration ermittelt werden kann und nicht nur durch Extrapolation des linearen Bereichs von Bindungsisothermen. Bei der Titration ändern sich die Eigenschaften des Systems in der Nähe des Endpunkts „diskontinuierlich“. n ist deshalb ein physikalisch relevanter Parameter und charakterisiert den Gültigkeitsbereich des MWGs.

Die Crothers-Isotherme strebt erst für $C_{Ff} \rightarrow \infty$ dem Grenzwert $(1-2r') = 0$ zu und erreicht dann den Höchstwert gebundener Moleküle $r' = C_{Fb}/C'_N = 1/2$ oder $C_{Fb} = C'_N/2$. In Übereinstimmung mit dem nearest neighbour exclusion-Prinzip wird bei Sättigung der DNA mit F im Mittel an jedes zweite Basenpaar ein Farbstoffmolekül gebunden ($q = 2$).

Gleichung (11) ist gegenüber (9) flexibler in der Anwendung, da p/q nicht durch ein Modell fixiert und q – als Mittelwert – nicht nur ganzzahlige, sondern auch gebrochene Werte annehmen kann. Aus dem Experiment sind

aber nur die beiden Konstanten $K_S = qK_Z$ und $n = p/q$ direkt zugänglich. Ohne zusätzliche Annahmen über p oder q können daraus nicht die drei Unbekannten K_Z , p und q bestimmt werden. Damit ergeben sich prinzipielle Schwierigkeiten bei der Diskussion der Bindungskonstanten. Den Gleichgewichtskonstanten K_S und K_Z liegen verschiedene Zählungen der Bindungspositionen zugrunde. Der Unterschied geht in die Bindungsentropie, nicht jedoch in die Bindungsenthalpie ein. Mit $K_S = qK_Z$ und Gleichung (5) folgen Gleichung (12) und (13).

$$\Delta H_S^0 = \Delta H_Z^0 \quad (12)$$

$$\Delta S_S^0 = \Delta S_Z^0 + R \ln q \quad (13)$$

Wir verfolgen hier nicht das Ziel, eine Theorie der Bindung zwischen Farbstoff und DNA aufzustellen. Vielmehr beabsichtigen wir, unsere experimentellen Befunde zu beschreiben und zu interpretieren. Dabei ist es zweckmäßig, sich zunächst alleine auf experimentell zugängliche Daten zu stützen. Deshalb sind wir genötigt, mit der Scatchard-Isotherme vorlieb zu nehmen, eingedenk der Tatsache, daß ihr eine falsche Zählung der Bindungspositionen zugrunde liegt. Da sich ΔS_S^0 und ΔS_Z^0 nur um eine additive Konstante unterscheiden, ist eine qualitative vergleichende Diskussion aber bereits auf dieser Ebene möglich. Die oben beschriebenen Isothermen können leicht ineinander umgerechnet werden. Dann ist es auch jederzeit möglich, mit Hilfe spezieller Annahmen über p oder q von der Scatchard-Isotherme zu einer anderen Bindungsisotherme überzugehen.

5. Einfaches Gleichgewichtsmodell zur Beschreibung des kompetitiven Effekts, $K_S = K_S(T, C_S)$

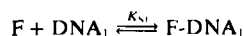
Nach Abbildung 3 und 4 nehmen K_S und r mit steigender Konzentration C_S zuerst rasch ab, streben aber dann bei großem C_S einem Grenzwert zu. Es liegt ein kompetitiver Salzeffekt vor. Die Metall-Ionen M der Salze S verdrängen die Farbstoffkationen F aus ihrer Bindung an DNA. Aber selbst bei sehr großer Kompetitorkonzentration beobachtet man im allgemeinen noch einen Rest gebundener Farbstoffkationen^[3,14]. Demgegenüber ist der Bindungsparameter n von S und C_S praktisch unabhängig (Abb. 2)^[3,14]. Zur Beschreibung dieser Befunde sollen zwei Modelle gegenübergestellt werden.

1. Es gibt zwei Bindungen (Bindung 1 und 2) von F an DNA, die sich durch den kompetitiven Effekt unterscheiden lassen. Bindung 1 ist beständig gegen Kompetitorsalze. Sie bleibt bei hoher Salzkonzentration erhalten (nicht-kompetitive Bindung). Demgegenüber wird F aus Bindung 2 durch Kompetitoren M verdrängt (kompetitive Bindung). Record et al.^[12] haben mit der Theorie der Kondensation von Gegenionen gezeigt, daß ca. 88% der negativen Ladung des Polyanions DNA durch „Bindung“ von Metall-Ionen M wie Na^+ oder K^+ in wäßriger Lösung kompensiert wird. Die Ladungskompensation ist in weiten Grenzen von der Konzentration der Kationen M in der Lösung unabhängig. Nach den theoretischen Untersuchungen von Manning^[20] ist diese Ladungskompensation zur Stabilisierung des Polyanions unerläßlich. Man kann davon ausgehen, daß auch die Farbstoffkationen zur La-

dungskompensation der DNA beitragen und damit gebunden werden. Der kompetitive Effekt von Metall-Ionen M auf Farbstoffkationen F ist dann als Austausch dieser Ionen an DNA zu interpretieren.

2. Es gibt nur eine Sorte gebundener Farbstoffmoleküle, dafür aber zwei Beiträge zur Bindungsenergie: Einen elektrostatischen Anteil der Wechselwirkung zwischen Farbstoffkation F und Polyanion DNA und einen zweiten Beitrag, der π -Elektronenwechselwirkung mit den Basenpaaren der DNA, Wasserstoffbrücken usw. umfaßt. Nach dieser Vorstellung, die von Fromherz^[41] vertreten wird, ist der kompetitive Salzeffekt auf die Kompensation des elektrostatischen Anteils durch Bindung von Kompetitorkationen M zurückzuführen, während der zweite Anteil davon unberührt bleibt. Dieses Modell hat zweifellos interessante Aspekte, ist aber mit der Theorie der Kondensation von Gegenionen nur schwer in Einklang zu bringen. Da die Menge gebundener Gegenionen M am Polyanion DNA nicht nur sehr hoch, sondern auch von der Kompetitorkonzentration in der Lösung unabhängig ist, müßte der elektrostatische Bindungsanteil immer weitgehend kompensiert sein und wäre außerdem durch Variation von C_S nicht zu beeinflussen. Wegen dieses Widerspruchs geben wir im Folgenden dem ersten Modell den Vorzug.

Die Scatchard-Isothermen sind im Bereich hinreichend kleiner r für alle Kompetitorkonzentrationen C_S in guter Näherung Geraden (Abb. 1). Dann gilt – wenigstens approximativ – das MWG. Die nicht-kompetitive Bindung 1



werde durch die Bindungskonstante K_{S1} und den Bindungsparameter n_1 beschrieben [Gl. (14)].

$$K_{S1} = C_{Fb1} / [(n_1 C_N - C_{Fb1}) C_{F1}] \quad (14)$$

Bei der kompetitiven Bindung 2 muß man berücksichtigen, daß ca. 88% der negativen Ladung von DNA durch Gegenionen M kompensiert sind, aber höchstens ca. 20% der Mononucleotide Farbstoff binden. Dann kann man für den kompetitiven Effekt in Vereinfachung einer Gleichung von Record et al.^[12] Reaktionsgleichung (b) aufstellen.



Wir zerlegen Reaktion (b) in die Teilreaktionen (c) und (d)



denen formal die Bindungskonstanten K_{S2} bzw. K_{S3} für die Bindung von F bzw. M an DNA zugeordnet sind. Mit dem Bindungsparameter n_2 ergibt sich Gleichung (15) bzw. (16).

$$K_{S2} = C_{Fb2} / [(n_2 C_N - C_{Fb2} - C_{Mb}) C_{F1}] \quad (15)$$

$$K_{S3} = C_{Mb} / [(n_2 C_N - C_{Fb2} - C_{Mb}) C_{M1}] \quad (16)$$

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Zerlegung von Reaktion (b) in die Teilschritte (c) und (d) und

damit Gleichung (15) und (16) nur den Austausch der Kationen F und M an DNA betrifft. Dieser Austausch möge näherungsweise dem MWG gehorchen. Die Kondensation der Gegenionen M an das Polyanion DNA folgt nicht dem MWG. Für den Ionenaustausch [Reaktion (b)] erhält man Gleichung (17).

$$K_{S4} = K_{S2}/K_{S3} = C_{Fb2} C_{Mf}/(C_{Ff} C_{Mb}) \quad (17)$$

K_{S4} ist als Bindungskonstante von F an DNA bei Gegenwart von M aufzufassen. Mit

$$\begin{aligned} C_F &= C_{Fb} + C_{Ff} \\ C_{Fb} &= C_{Fb1} + C_{Fb2} \\ C_M &= C_{Mf} + C_{Mb} \\ r &= r_1 + r_2 = (C_{Fb1} + C_{Fb2})/C_N \end{aligned}$$

gewinnt man Gleichung (17)^[14].

$$r = n_1 K_{S1} C_{Ff}/(1 + K_{S1} C_{Ff}) + n_2 K_{S2} C_{Ff}/(1 + K_{S2} C_{Ff} + K_{S3} C_{Mf}) \quad (18)$$

Das ist eine Erweiterung der Langmuir-Isotherme auf zwei Bindungstypen, wie sie im Prinzip bereits von *Peacocke et al.*^[23] vorgeschlagen und hier auf den kompetitiven Effekt erweitert wurde. Wir bringen Gleichung (18) auf Scatchard-Form [Gl. (19)]^[14].

$$r/C_{Ff} = K_{S1}(n_1 - r) + K_{S2}(n_2 - r)/(1 + K_{S3} C_{Mf}) + K_{S1} K_{S2}(n_1 + n_2 - r) C_{Ff}/(1 + K_{S3} C_{Mf}) \quad (19)$$

Für den Grenzfall $C_F \ll C_N$ gilt $C_F/C_N \rightarrow 0$, $C_{Ff} \rightarrow 0$ und $r \rightarrow 0$. Der dritte Term rechts in Gleichung (19) ist dann zu vernachlässigen. Die Scatchard-Isotherme zerfällt in zwei additive, voneinander unabhängige, lineare Anteile, die die nicht-kompetitive und die kompetitive Bindung beschreiben. Man kann abschätzen, daß lineare Scatchard-Isothermen aber auch noch bei etwas erhöhtem Konzentrationsverhältnis C_F/C_N zu erwarten sind. Der Bindungsparameter n ist nach unseren Experimenten im Bereich kleiner r innerhalb der Fehlergrenzen von S , C_S oder C_M unabhängig. Offenbar gilt näherungsweise $n = n_1 = n_2$. Um den kompetitiven Salzeffekt zu realisieren, muß man außerdem relativ hohe Kompetitorkonzentrationen einsetzen. Dann ist $C_N \ll C_M$ und $C_{Mb} \ll C_{Mf} \approx C_M$. Unter diesen Voraussetzungen kann man Gleichung (19) zu (20) umformen^[14].

$$r/C_{Ff} = \{K_{S1} + K_{S2}^*/(1 + K_{S3} C_M)\}(n - r) \quad (20)$$

Die experimentell zugängliche effektive Bindungskonstante $K_{S2}^* = K_{S2}(1 + G)$ unterscheidet sich unter unseren Versuchsbedingungen von K_{S2} nur sehr wenig. Die Funktion

$$\begin{aligned} G &= K_{S1} C_{Ff}[1 + 1/(1 - u)] = K_{S1} C_{Ff}[2 + u + u^2 + \dots] \\ u &= r/n < 1 \end{aligned}$$

kann für hinreichend kleine C_{Ff} und r entweder gegen 1 vernachlässigt oder durch ihren Mittelwert \bar{G} ersetzt werden. Dann beschreibt Gleichung (20) näherungsweise Scatchard-Isothermen, die sich – in Übereinstimmung mit dem Experiment – unabhängig von S , C_S und T bei $r = n$ auf der

Abszisse schneiden. Vergleicht man Gleichung (20) mit (4), so erhält man die scheinbare Scatchard-Gleichgewichtskonstante $K_S = K_S(T, C_S)$ in der Form von Gleichung (21)^[14].

$$K_S = K_{S1} + K_{S2}^*/(1 + K_{S3} C_M) \quad (21)$$

Bei Molekülen, die nur kompetitiv gebunden werden ($K_{S1} = 0$) gilt Gleichung (22).

$$K_S = K_{S2}/(1 + K_{S3} C_M) \quad (22)$$

Für die Kompetitorsalze NaCl, KCl und MgCl₂ ist $C_M = C_S$. Analoga zu Gleichung (22) sind bekannt^[12,42,43].

Gleichung (21) und (22) sind Gleichungen von Hyperbeln. Sie beschreiben die Abhängigkeit der Scatchard-Bindungskonstante K_S von der Kompetitorkonzentration $C_M = C_S$. Für das System E/DNA wurden die Kurven in Abbildung 3 mit Gleichung (21) berechnet und die Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2}^* , K_{S2} und K_{S3} durch Ausgleichrechnung bestimmt (Tabelle 1). Mit diesen Konstanten und mit Gleichung (18) wurden schließlich die Bindungsisothermen in Abbildung 4 ermittelt^[14]. Die Übereinstimmung zwischen berechneten Kurven und experimentellen Werten ist überraschend gut. Dabei muß man die teilweise rigorosen Vereinfachungen berücksichtigen, die der Ableitung zugrunde liegen.

Tabelle 1. Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2}^* , K_{S2} und K_{S3} [M^{-1}] für das System E/DNA und die Kompetitorsalze NaCl, KCl, MgCl₂; $T = 298$ K [14].

Kompetitor	K_{S1}	K_{S2}^*	K_{S2}	K_{S3}
NaCl	$1.0 \cdot 10^4$	$6.2 \cdot 10^5$	—	22
KCl	$1.1 \cdot 10^4$	$6.5 \cdot 10^5$	—	19
MgCl ₂	$1.2 \cdot 10^4$	$7.0 \cdot 10^5$	—	350
Mittel	$1.1 \cdot 10^4$	$6.6 \cdot 10^5$	$5.6 \cdot 10^5$	—

Die Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2}^* und K_{S2} sind erwartungsgemäß – innerhalb der Fehlerbreiten – unabhängig von der Art des Kompetitors. Die Individualität des Kompetitors spiegelt sich in der Bindungskonstante K_{S3} wider. Danach ist Mg²⁺ ein viel stärkerer Kompetitor als Na⁺ oder K⁺.

Im Gegensatz zu K_S hängen die unabhängigen Konstanten K_{Si} , $i = 1-3$, nur noch von T ab. Aus der Temperaturabhängigkeit von K_{Si} können in üblicher Weise mit Hilfe der Beziehung von *van't Hoff* die Standardbindungsenthalpien ΔH_{Si}^0 und -entropien ΔS_{Si}^0 bestimmt werden. Als Beispiel ist in Abbildung 8 die Temperaturabhängigkeit von K_{Si} in van't-Hoff-Darstellung für das System E/DNA wiedergegeben. Die ermittelten ΔH_{Si}^0 - und ΔS_{Si}^0 -Werte findet man in Tabelle 2. Wieder sind die Bindungsenthalpien und -entropien der nicht-kompetitiven und der kompetitiven Bindung 1 bzw. 2 innerhalb der – relativ großen – Fehlerbreiten von der Art des Kompetitors unabhängig. Die individuellen Eigenschaften des Kompetitors werden durch die thermodynamischen Parameter der Bindung 3 beschrieben^[14].

Die Daten in Tabelle 2 wurden dazu verwendet, mit Gleichung (21) und der Beziehung von *van't Hoff* [Gl. (5)] die Abhängigkeit der scheinbaren Bindungsenthalpien ΔH_S^0 und -entropien ΔS_S^0 von der Kompetitorkonzentra-

tion C_S zu berechnen^[14]. Für das System E/DNA sind die berechneten Kurven in Abbildung 6 und 7 eingezeichnet. Die Übereinstimmung zwischen experimentellen Werten und theoretischen Kurven ist im ganzen Konzentrationsbereich gut und bestätigt nochmals die Brauchbarkeit des beschriebenen Gleichgewichtsmodells.

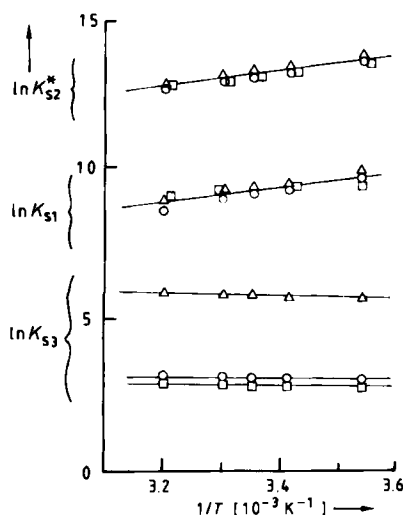


Abb. 8. Temperaturabhängigkeit der wirklichen Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} und K_{S3} des Systems E/DNA, Kompetitorsalze S = NaCl (○), KCl (□), $MgCl_2$ (Δ). pH = 7.7 [14].

Tabelle 2. Bindungsenthalpien ΔH_{Si}^0 [kJ mol⁻¹] und Bindungsentropien ΔS_{Si}^0 [J K⁻¹ mol⁻¹] der nicht-kompetitiven und der kompetitiven Bindung i = 1–3. System E/DNA, Kompetitorsalze NaCl, KCl, $MgCl_2$ [14].

Kompetitor		K_{S1}	K_{S2}^*	K_{S2}	K_{S3}
NaCl	ΔH_{S1}^0	-28	-29	—	+ 1.7
	ΔS_{S1}^0	-21	+ 13	—	+ 28
KCl	ΔH_{S1}^0	-27	-29	—	+ 0.4
	ΔS_{S1}^0	-17	+ 17	—	+ 21
$MgCl_2$	ΔH_{S1}^0	-29	-30	—	+ 2.1
	ΔS_{S1}^0	-21	+ 17	—	+ 42
Mittel	ΔH_{Si}^0	-28	-29	-27	—
	ΔS_{Si}^0	-20	+ 16	+ 18	—

6. Nicht-kompetitiv gebundene Farbstoffkationen intercalieren

Die Bindungskonstanten K_{S1} und K_{S2} der nicht-kompetitiven und der kompetitiven Bindung von Ethidium-Ionen an DNA unterscheiden sich um mehr als eine Zehnerpotenz (Tabelle 1, $K_{S1} \ll K_{S2}$). Ähnliches beobachtet man auch bei anderen Farbstoffen (Tabelle 3). Die intercalierten Moleküle sind nun durch die benachbarten Basenpaare der DNA und die anionischen Phosphodiesterreste – einschließlich kondensierter Gegenionen – von ihrer Umgebung weitgehend abgeschirmt. Veränderungen der Kompetitorkonzentration sollten dann ihre Bindung nur sehr wenig beeinflussen. Es ist deshalb naheliegend, den intercalierten Farbstoffkationen die nicht-kompetitive Bindung mit der Bindungskonstante K_{S1} zuzuordnen. Dann wären aber – wegen $K_{S1} \ll K_{S2}$ – die intercalierten Moleküle viel schwächer gebunden, als man es üblicherweise annimmt. Um diese Diskrepanz zu klären, haben wir polarisationsoptische Untersuchungen zur Bindungsgeometrie von

nicht-kompetitiv gebundenen Ethidium-Ionen an DNA durchgeführt.

Zahlreiche Autoren haben Versuche beschrieben, in denen die Orientierung intercalierter Farbstoffmoleküle in mechanisch ausgerichteten Farbstoff-DNA-Präparaten mit Hilfe der Absorption von linear polarisiertem Licht ermittelt wurde (vgl. ^[17]). Zur mechanischen Ausrichtung der hochmolekularen Farbstoff-DNA-Präparate stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wie Ziehen und Verspinnen von Fäden und Filmen, Recken von Polyvinylalkoholfolien mit Nucleinsäure, Strömungsorientierung von Lösungen etc. Bei allen Methoden nimmt man an, daß die lange Achse der Doppelhelix in die mechanische Vorzugsrichtung \vec{k} orientiert wird.

Als Maß für die Güte der Orientierung dient das dichroitische Verhältnis der Lichtabsorption [Gl. (23)].

$$R = A_{\parallel} / A_{\perp} \quad (23)$$

A_{\parallel} und A_{\perp} sind die Extinktionen der Farbstoffbande des Präparats bei Polarisatorstellung e_{\parallel} parallel bzw. senkrecht zu \vec{k} . Sind die Farbstoffmoleküle statistisch gleichverteilt, so ist $A_{\parallel} = A_{\perp}$ und $R = 1$. Bei vollständiger Ausrichtung nimmt das dichroitische Verhältnis einer Bande, die in oder senkrecht zur Vorzugsrichtung \vec{k} polarisiert ist (A_{\perp} bzw. $A_{\parallel} = 0$), die Grenzwerte $R = \infty$ oder $R = 0$ an. In der Regel werden für Intercalationsversuche Farbstoffe mit ebenem Chromophor verwendet. Das Übergangsmoment \vec{m} der langwelligen Farbstoffbande liegt dann in der Molekülebene. Jedoch ist die Molekülebene intercalierter Farbstoffe nach Lerman senkrecht zur langen Achse der DNA orientiert. Für ideal geordnete Farbstoff-DNA-Präparate gilt dann $\vec{m} \perp \vec{k}$, $A_{\parallel} = 0$ und $R = 0$. An verschiedenen, mechanisch orientierten Farbstoff-DNA-Präparaten wurden dichroitische Verhältnisse zwischen 0.25 und 0.50 gemessen (vgl. ^[17]). Die Werte sind zwar deutlich kleiner als 1, dem Wert für statistische Gleichverteilung. Das dichroitische Verhältnis $0 < R < 1$ weist auch in die Richtung auf die Intercalation. Überzeugen können die Werte aber nicht. Für intercalierte Farbstoffmoleküle sollte das experimentelle dichroitische Verhältnis nur sehr wenig von $R = 0$ abweichen. Mit $0 < R < 1$ sind demgegenüber auch andere Molekülanordnungen zu vereinbaren.

Um zu eindeutigen Ergebnissen zu gelangen, haben wir die experimentelle Methodik in drei Punkten verbessert^[17]:

1. In älteren Arbeiten wurden Farbstoff-DNA-Präparate untersucht, in denen der Farbstoff nicht-kompetitiv und kompetitiv gebunden war. Da hier nur die Geometrie der nicht-kompetitiv gebundenen Farbstoffspezies interessiert, haben wir durch Zusatz von Kompetitorsalz dafür Sorge getragen, daß die Präparate frei von kompetitiv gebundenen Molekülen sind. Bei geeigneter Präparationstechnik gelingt es, hochviskose Farbstoff-DNA-Gele herzustellen, aus denen sehr dünne, vorzüglich orientierte Fäden gezogen werden können. Diese Fäden sind doppelbrechend, um so stärker, je besser die mechanische Orientierung ist. Unter dem Polarisationsmikroskop kann man dann die Stellen bester Orientierung für die polarisationsoptischen Messungen auswählen.

2. Bisher wurden für die Untersuchung des linearen Dichroismus stets makroskopisch orientierte Proben ver-

wendet. Es läßt sich kaum vermeiden, daß die mikroskopische Ordnung dieser Präparate uneinheitlich ist. Bei der Messung mittelt man dann über alle mikroskopischen Zustände. Das Meßergebnis wird dadurch verschlechtert und R in Richtung auf die statistische Gleichverteilung verschoben. Deshalb haben wir unsere Messungen an mikroskopischen Proben mit einem Mikrospektralphotometer ausgeführt, das mit Polarisator und Analysator ausgerüstet war. Anhand der Doppelbrechung der Farbstoff-DNA-Fäden konnten die Stellen bester Orientierung im Präparat aufgesucht und polarisationsoptisch untersucht werden.

3. Die Farbstoff-DNA-Fäden sind dichroitisch und doppelbrechend. Wir haben einen Formalismus entwickelt, der Dichroismus und Doppelbrechung der Probe berücksichtigt und es ermöglicht, aus dem experimentellen Material das auf Doppelbrechung korrigierte dichroitische Verhältnis R_0 zu bestimmen.

Als Beispiel haben wir einen hochorientierten E/DNA-Faden untersucht^[17]. Innerhalb des Präparats schwankt R_0 beträchtlich und nimmt Werte zwischen $R_0=0.03$ und 0.5 an. Um die Intercalation zu beweisen, wird man geneigt sein, dem kleinsten Wert $R_0=0.03$ die höchste Präferenz zu geben. Das ist jedoch problematisch. Besser ist es, mit Hilfe eines unabhängigen Kriteriums die Güte der Ausrichtung der untersuchten Stelle des Präparats zu charakterisieren. Wir haben ein indirektes Auswahlkriterium verwendet. Man kann davon ausgehen, daß die mechanische Orientierung des Fadens um so besser gelingt, je dünner das Präparat ist. Die Schichtdicke d ist nun einem experimentell zugänglichen Faktor $K=K(d)$ ^[17] direkt proportional. Trägt man R_0 gegen $K(d)$ auf, so kann man eine Korrelation erwarten, aus der für $K(d) \rightarrow 0$ und damit $d \rightarrow 0$ der Grenzwert von R_0 für eine ideal orientierte Probe ermittelt werden kann. Natürlich darf man an die Korrelation nicht zu hohe Anforderungen stellen. In sie geht die schwer überschaubare Beziehung zwischen Schichtdicke und Güte der Ausrichtung ein, d. h. das experimentelle Geschick des Präparators. In Abbildung 9 ist die Korrelation für den untersuchten E/DNA-Faden wiedergegeben. Sie ist besser,

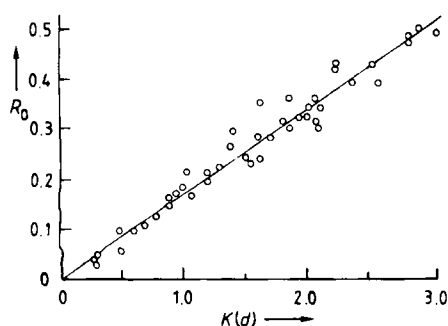


Abb. 9. Korrelation zwischen dem korrigierten dichroitischen Verhältnis R_0 und dem Schichtdickenparameter $K(d)$ für das System E/DNA/MgCl₂ [17].

als man zunächst erhoffen konnte. Legt man durch die Meßpunkte eine Ausgleichsgerade, so ergibt die Extrapolation auf $K(d)=0$ das dichroitische Verhältnis einer idealen Probe zu $R_0=0.00$. Damit findet man genau den Wert, der nach dem Intercalationsmodell von Lerman zu erwarten ist. Wir nehmen deshalb an, daß die nicht-kompetitiv

gebundenen Ethidium-Ionen – die nach der Präparationsmethode nur noch anwesend sind – in der Tat intercalieren. Die kleinere Bindungskonstante K_{S1} ist dann den intercalierten Molekülen zuzuordnen. Man darf annehmen, daß Gleiches auch für andere intercalierte Farbstoffe gilt.

Die Extrapolation $K(d) \rightarrow 0$ umfaßt nur ein sehr kleines Intervall, nämlich vom kleinsten gemessenen Wert $R_0=0.03$ auf $R_0=0.00$. Bei den älteren Arbeiten wurde von $R=0.25$ bis 0.5 auf $R=0.0$ extrapoliert. Die Verbesserung der Methode ist unverkennbar.

7. Strukturmerkmale intercalierter und extern gebundener Farbstoffkationen

Die intercalierten Farbstoffkationen sind im Inneren der Doppelhelix gegen die Einwirkung von Kompetitoren weitgehend geschützt. Demgegenüber können die kompetitiv gebundenen Moleküle durch Kompetitorkationen verdrängt werden. Offenbar sind die Moleküle weiter außen an die DNA gebunden. Diese externe Bindung darf man sich aber nicht als elektrostatischen 1:1-Komplex zwischen Farbstoffkationen und anionischen Phosphodiestergruppen der DNA vorstellen. Solche Komplexe sind zwar ebenfalls bekannt und wurden bereits von Feulgen^[44] beschrieben. Sie entstehen bei hohem Konzentrationsverhältnis C_F/C_N und sind in der Regel schwerlöslich. Es ist $n=1$ und $r \approx 1$. Unsere Experimente wurden hingegen bei $C_F/C_N \ll 1$ durchgeführt ($r \ll 1$). Nun sind nach unseren Untersuchungen die Bindungsparameter der nicht-kompetitiven und der kompetitiven Bindung näherungsweise gleich ($n_1=n_2=n$). Für die untersuchten Ethidiumderivate beträgt $n=0.21$, für die Acridinderivate $n=0.17$. Damit ist die externe Bindung mit $n \approx 0.2$ ein eigener Bindungstyp, der sich vom 1:1-Komplex mit $n=1$ experimentell unterscheiden läßt.

Die externe Bindung erfüllt mit $n_1=n_2$ auch ein Merkmal der Intercalation. Vielleicht ist die kompetitive Bindung eine Vorstufe der Intercalation, bei der z. B. die gebundenen Moleküle nur partiell zwischen die Basenpaare von DNA eingeschoben sind. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß bereits früher Gursky^[45] und Peacocke et al.^[24,46] andere Bindungsgeometrien für DNA-gebundene Farbstoffkationen vorgeschlagen haben, die vom klassischen Intercalationsmodell abweichen^[3]. Die Vorstellung, daß bei kleinen r -Werten mehrere Bindungstypen realisiert sein können, die sich in ihrer Geometrie unterscheiden, ist deshalb keineswegs abwegig. Untersuchungen zur Geometrie der externen oder prä-intercalativen Bindung stehen noch aus.

Im Bereich hinreichend kleiner r – auf den wir uns beschränken – erfolgen Intercalation und externe Bindung unabhängig voneinander und stören sich gegenseitig nur wenig. Die Scatchard-Isotherme [Gl. (10)] zerfällt deshalb mit $n_1=n_2=n$ formal in zwei additive Anteile $K_{S1}(n-r)$ und $K_{S2}^*(n-r)/(1+K_{S3}C_M)$, die sich auf die Intercalation und die externe Bindung beziehen. Wegen der in Abschnitt 4 beschriebenen Schwierigkeiten soll auf eine weitergehende Diskussion der Bindungsparameter verzichtet werden. Die Beziehung $n_1=n_2=n$ gilt hier als experimenteller Befund.

Weiteren Einblick in Intercalation und externe Bindung bietet eine vergleichende Studie der Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} und K_{S3} an einer Serie systematisch abgewandelter Farbstoffe (vgl. Schema 1). Die Moleküle wurden unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen untersucht und die Bindungskonstanten mit dem beschriebenen Modell ermittelt (Tabelle 3)^[14–16, 18, 19].

Tabelle 3. Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S3} [M^{-1}], Gleichgewichtskonstante K_{S4} für Systeme aus Farbstoff F, DNA und Kompetitorsalz S; $T=298\text{ K}$.

F	K_{S1}	K_{S2}	S	K_{S3}	K_{S4}
E [14]	$1.1 \cdot 10^4$	$5.6 \cdot 10^5$	NaCl	22	$2.5 \cdot 10^4$
DPPH [15]	$0.9 \cdot 10^4$	$7.5 \cdot 10^5$	MgCl ₂	350	$1.6 \cdot 10^3$
			NaCl	25	$3.0 \cdot 10^4$
AEPP [15]	$0.8 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^5$	MgCl ₂	380	$2.0 \cdot 10^3$
			NaCl	30	$1 \cdot 10^4$
BH [19]	$0.9 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^6$	NaCl	33	$3.0 \cdot 10^4$
AF [18]	$4.2 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^6$	NaCl	30	$3.3 \cdot 10^4$
AO [18]	$3.0 \cdot 10^4$	$7.0 \cdot 10^5$	NaCl	24	$2.9 \cdot 10^4$
EPP [15]	≈ 0	$5 \cdot 10^4$	NaCl	30	$2 \cdot 10^3$
TME [16]	≈ 0	$1.6 \cdot 10^5$	NaCl	30	$5.3 \cdot 10^3$
TMAF [18]	≈ 0	$3.0 \cdot 10^5$	NaCl	25	$1.2 \cdot 10^4$
DPP [15]	≈ 0	≈ 0			
B [19]	≈ 0	≈ 0			

Schon früher wurde auf die Bedeutung von elektrostatischer Wechselwirkung, von Wasserstoffbrücken und hydrophober Wechselwirkung für die Bindung von Farbstoffmolekülen an DNA hingewiesen^[2,3,10,12]. Nach unseren Untersuchungen lassen sich drei Gruppen von Molekülen unterscheiden (siehe Schema 1 auf S. 117).

1. Farbstoffe, die intercalieren und extern gebunden werden (E, AEPP, DPPH, BH, AF, AO). Die Farbstoffe sind Kationen. Sie enthalten NH_2 -, NH - und OH -Gruppen, die als Protonendonoren in Wasserstoffbrücken zwischen Farbstoff und DNA wirken können. Elektronendor der Brückenbindung ist sehr wahrscheinlich der Phosphodiesterrest der DNA. Für alle Moleküle gilt $K_{S1} \ll K_{S2}$. Die Bindungskonstante der Intercalation ist sehr viel kleiner als die Konstante der externen Bindung. Bei den Molekülen unterscheiden sich die Bindungskonstanten K_{S1} sowie K_{S2} nur wenig ($K_{S1} = 1 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^4\text{ M}^{-1}$, $K_{S2} = 4 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$).

2. Farbstoffe, die extern gebunden werden, aber nicht intercalieren (EPP, TME, TMAF). Die Farbstoffe sind Kationen. Sie enthalten keine funktionellen Gruppen, die als Protonendonoren von Wasserstoffbrücken zwischen Farbstoff und DNA wirken können. Die Moleküle werden durch Kompetitorsalze aus ihrer Bindung an DNA verdrängt. Innerhalb der experimentellen Fehlerbreite sind intercalierte Moleküle nicht nachweisbar ($K_{S1} \approx 0$). Die Bindungskonstante der externen Bindung schwankt zwischen $K_{S2} = 5 \cdot 10^4$ und $3 \cdot 10^5\text{ M}^{-1}$. Sie ist kleiner als bei den Grundkörpern E und AF. Die Farbstoffe von Gruppe 2 zeigen, daß die externe Bindung als eigener Bindungstyp neben der Intercalation existiert.

3. Farbstoffe, die weder intercalieren noch extern gebunden werden (DPP, B). Die Moleküle sind elektrisch neutral. Sie enthalten funktionelle Gruppen, die Wasserstoffbrücken zur DNA bilden könnten. Trotzdem ist es nicht gelungen, experimentell eine Bindung an DNA nachzuweisen ($K_{S1} \approx 0$, $K_{S2} \approx 0$). Sterische Hinderung kann dafür nicht der Grund sein, denn bei Protonierung entstehen

die Farbstoffkationen DPPH und BH, die zur Intercalation und externen Bindung befähigt sind.

Die Bindungskonstante K_{S3} der Kompetitorkationen an DNA schwankt bei den Farbstoffen nur innerhalb enger Grenzen, die durch die experimentelle Genauigkeit und die Näherungen im Formalismus vorgegeben sind. Für das Kompetitorsalz NaCl gilt $K_{S3} = 2 \cdot 10^1 - 3 \cdot 10^1\text{ M}^{-1}$, für $MgCl_2$ $K_{S3} = 4 \cdot 10^2\text{ M}^{-1}$. Erwartungsgemäß ist zweiwertiges Magnesium ein stärkerer Kompetitor als einwertiges Natrium.

Die Gleichgewichtskonstante K_{S4} [Gl. (17)] für den Austausch der Farbstoff- und Kompetitorkationen F und M an DNA ist ebenfalls in Tabelle 3 aufgeführt. Für das häufig verwendete Kompetitorsalz NaCl hat K_{S4} die gleiche Größenordnung wie die Bindungskonstante K_{S1} der Intercalation. Das dürfte einer der Gründe sein, warum bisher im Bereich kleiner r zwischen Intercalation und externer Bindung nicht streng unterschieden wurde.

Der Vergleich der Bindungskonstanten K_{S1} und K_{S2} (Tabelle 3) zeigt, daß der wesentliche Bindungsanteil für Intercalation und externe Bindung die elektrostatische Wechselwirkung ist, die durch Wasserstoffbrücken unterstützt wird (Gruppe 1). Fehlt die Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken, so beobachtet man nur noch eine geschwächte externe Bindung (Gruppe 2). Fehlt jedoch die Möglichkeit zur elektrostatischen Wechselwirkung, so wird keine Bindung eingegangen, auch dann nicht, wenn das Molekül Wasserstoffbrücken bilden könnte (Gruppe 3). Gegenüber der elektrostatischen Wechselwirkung scheint die hydrophobe Wechselwirkung – ebenso wie Wasserstoffbrücken – nur untergeordnete Bedeutung zu haben. Wäre sie dominant, so sollte sie die Bindung von DPP und B an DNA erzwingen. Beide Moleküle dürften stärker hydrophob sein als die Kationen DPPH und BH, die bei Protonierung von DPP und B entstehen und problemlos an DNA gebunden werden. Trotzdem sind hydrophobe Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken am Bindungs geschehen beteiligt (siehe Abschnitt 8).

Die Diskussion der Bindungskonstanten ergibt insgesamt ein einheitliches Bild über die Wechselwirkungsbeiträge, die zur Intercalation und zur externen Bindung führen. Man darf jedoch nicht übersehen, daß wir einfache Moleküle untersucht haben, deren Bindung dann auch mit einem einfachen Modell näherungsweise beschrieben werden kann. Bei komplizierteren Molekülen muß man auf kompliziertere Theorien zurückgreifen. Bereits bei Proflavin (PF), einem klassischen intercalierenden Acridinfarbstoff, muß man mit Komplikationen rechnen. PF enthält ähnliche Strukturmerkmale wie Acridin (AF) und Acridinorange (AO), nämlich zwei NH_2 -Gruppen in 3,6-Stellung und eine NH -Gruppe in 10-Stellung (Schema 1). Letztgenannte entsteht durch Protonierung der starken Base am Azastickstoffatom. Bei AF und AO erfolgt Intercalation und externe Bindung unter Beteiligung von Wasserstoffbrücken. Das verwandte Molekül Tetramethylacridin (TMAF), das sich von AF oder AO durch Ersatz der NH_2 - bzw. NH -Gruppen durch $N(CH_3)_2$ - bzw. NCH_3 -Gruppen ableiten läßt und zur Bildung von Wasserstoffbrücken nicht befähigt ist, intercaliert nicht und geht nur eine geschwächte externe Bindung ein. Wegen der verschiedenen Stellungen der NH_2 - und NH -Gruppen in AF und AO kann man davon ausgehen, daß sich die Bin-

dungsgeometrie dieser Moleküle an DNA unterscheidet. PF vereinigt nun in sich die Strukturmerkmale von AF und AO. Es ist deshalb denkbar, daß verschiedene intercalierte und extern gebundene Molekülspezies bei der Bindung von PF an hochmolekulare DNA auftreten, die sich in ihrer Geometrie und den thermodynamischen Parametern unterscheiden. Hier sind weitere Untersuchungen abzuwarten^[47].

8. Thermodynamische Benachteiligung der Intercalation gegenüber der externen Bindung

Die Bindungskonstanten in Tabelle 3 zeigen, daß im Bereich kleiner r die Intercalation gegenüber der externen Bindung benachteiligt ist ($K_{S1} \ll K_{S2}$). Dieser Befund überrascht und widerspricht üblichen Vorstellungen. Um genaueren Einblick in die Bindungsverhältnisse zu gewinnen, haben wir bei E, AF, AO und TMAF die Bindungsenthalpien ΔH_{Si}^0 und -entropien ΔS_{Si}^0 ($i = 1-3$) bestimmt (Tabelle 4)^[14, 18]. Auf die experimentellen Schwierigkeiten bei den Messungen und die damit verbundenen Fehler, insbesondere bei den Bindungsentropien, wurde bereits in Abschnitt 2 hingewiesen. Die Werte sind jedoch für die folgende qualitative Diskussion hinreichend genau.

Tabelle 4. Bindungsenthalpien ΔH_{Si}^0 , [kJ mol⁻¹] und Bindungsentropien ΔS_{Si}^0 , [J K⁻¹ mol⁻¹] der Bindungen $i = 1-3$ für Systeme aus Farbstoff F, DNA und Kompetitorsalz S.

F	ΔH_{S1}^0	ΔH_{S2}^0	ΔS_{S1}^0	ΔS_{S2}^0	S	ΔH_{S3}^0	ΔS_{S3}^0
E [14]	-28	-27	-20	+18	KCl	+0.4	+21
					NaCl	+1.7	+28
					MgCl ₂	+2.1	+42
AF [18]	-26	-26	-2	+28	NaCl	≈ 0	+29
AO [18]	-30	-28	-15	+20	NaCl	≈ 0	+23
TMAF [18]	—	-15	—	+54	—	[a]	[a]

[a] Experimentell nicht bestimmt [18].

Die Bindungsenthalpien ΔH_{S1}^0 und ΔH_{S2}^0 der Intercalation und externen Bindung von E, AF und AO an DNA sind negativ und innerhalb der Fehlergrenzen jeweils gleich ($\Delta H_{S1}^0 = \Delta H_{S2}^0 < 1$). Sie unterscheiden sich bei den Farbstoffen praktisch nicht. Der Unterschied in den Bindungskonstanten K_{S1} und K_{S2} ist dann auf die Bindungsentropie zurückzuführen. Die Entropie nimmt bei Bildung der externen Bindung zu ($\Delta S_{S2}^0 > 0$). Demgegenüber ist die Entropieänderung ΔS_{S1}^0 bei Intercalation entweder negativ (E, AO) oder nahe null (AF). Übereinstimmend gilt $\Delta S_{S1}^0 \ll \Delta S_{S2}^0$. Da eine Entropiezunahme thermodynamisch günstig ist, dominiert die externe Bindung vor der Intercalation ($K_{S2} \gg K_{S1}$).

Auch bei der externen Bindung von TMAF an DNA beobachtet man eine negative Bindungsenthalpie ΔH_{S2}^0 und positive Bindungsentropie ΔS_{S2}^0 . Beides ist thermodynamisch günstig. Die Enthalpieänderung ist jedoch wesentlich kleiner, die Entropieänderung wesentlich größer als bei der externen Bindung von E, AF oder AO an DNA.

Die Bindungsenthalpie aller Kompetitorkationen ist nahezu null ($\Delta H_{S3}^0 \approx 0$). Die Bindung wird erst durch den thermodynamisch günstigen Entropieanstieg ermöglicht ($\Delta S_{S3}^0 > 0$). Sie ist damit ein entropischer Effekt. Die Bin-

dungsentropie hängt innerhalb der Fehlergrenzen nur vom Kompetitorkation, aber nicht vom Farbstoff ab.

Die Werte der Bindungsenthalpie und -entropie ΔH_{S3}^0 und ΔS_{S3}^0 der Kompetitorkationen sind typisch für hydrophobe Wechselwirkung. Magnesium-, Natrium- und Kalium-Ionen sind sogenannte strukturbildende Ionen, Mg^{2+} stärker als Na^+ und Na^+ wieder stärker als K^+ ^[48, 49]. Die Wassermoleküle in der Hydrathülle strukturbildender Ionen sind fester und starrer gebunden als im umgebenden Wasservolumen. Diese Strukturbildung bewirkt eine thermodynamisch ungünstige Entropieabsenkung. Bei der Bindung der Kompetitorkationen an DNA müssen aus sterischen Gründen Wassermoleküle aus der Hydrathülle in das Wasservolumen überführt werden. Die erforderliche Energie kann aus der elektrostatischen Wechselwirkungsenergie gedeckt werden. Deshalb ist die Bindungsenthalpie der Kompetitorkationen nicht negativ, sondern nahe null ($\Delta H_{S3}^0 \approx 0$). Die überführten Wassermoleküle gewinnen Bewegungsfreiheitsgrade und zwar um so mehr, je starrer und fester sie vorher gebunden waren. Aber auch die in der Hydrathülle verbliebenen Wassermoleküle gewinnen Bewegungsfreiheitsgrade, da bei der Ionenpaarbildung zwischen Kompetitorkation und anionischer Bindungsposition der DNA eine partielle Ladungskompensation eintritt. Durch den Gewinn an Bewegungsfreiheitsgraden insgesamt wird ein thermodynamisch günstiger Entropieanstieg erzielt, der den Entropieabfall infolge der Immobilisierung der gebundenen Ionen überkompensiert. Dieser Entropieanstieg ($\Delta S_{S3}^0 > 0$) ist die treibende Kraft für die Bindung der Kationen durch hydrophobe Wechselwirkung und nimmt erwartungsgemäß in Richtung steigender Strukturbildung zu ($K^+ < Na^+ < Mg^{2+}$, Tabelle 4).

Auch Farbstoffkationen sind strukturbildende Ionen^[14]. Im Gegensatz zu den kleinen Metall-Ionen sind die Wassermoleküle an die großen organischen Moleküle lockerer gebunden. Bei TMAF benötigt man deshalb weniger Energie, um ein Wassermolekül aus der Hydrathülle des Farbstoffkations in das Wasservolumen zu überführen. Die Energiebilanz bleibt insgesamt negativ ($\Delta H_{S2}^0 < 0$). Der Entropiezuwachs ($\Delta S_{S2}^0 > 0$) ist wieder für hydrophobe Wechselwirkung charakteristisch. Er ist bei der externen Bindung von TMAF wegen der fünf Methylgruppen des Moleküls besonders groß.

Bei der externen Bindung von E, AF und AO ist die Energiebilanz noch stärker negativ als bei TMAF, weil jetzt zusätzlich Wasserstoffbrücken zwischen Farbstoff und DNA gebildet werden ($\Delta H_{S2}^0 < 0$). Im übrigen bewirkt die hydrophobe Wechselwirkung wieder einen Entropieanstieg ($\Delta S_{S2}^0 > 0$).

Bei Intercalation und externer Bindung beobachtet man annähernd gleiche Bindungsenthalpien ($\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0$). Offenbar sind die Moleküle bei beiden Bindungen bestrebt, die ihnen zur Verfügung stehenden Valenzen in gleicher Weise abzusättigen. Dann wird auch verständlich, daß sich die Absorptionsspektren der intercalierten und extern gebundenen Farbstoffkationen praktisch nicht unterscheiden. Die spektralen Veränderungen sind bei beiden Bindungen annähernd gleich.

Überraschend ist der Befund $\Delta S_{S1}^0 \ll \Delta S_{S2}^0$. Man muß aber berücksichtigen, daß bei der Intercalation die Doppelhelix versteift wird^[3] und der Verlust an Bewegungsfreiheitsgraden von DNA und intercaliertem Farbstoff

eine Entropieabnahme gegenüber der externen Bindung verursacht. Bei der Intercalation muß diese thermodynamisch ungünstige Entropieabnahme dann durch eine entsprechend starke Enthalpieabsenkung wettgemacht werden.

Für die Bindung von Farbstoff- und Kompetitorkationen F bzw. M an DNA spielt die Bindungsentropie eine entscheidende Rolle. In die Bindungsentropie geht nach Gleichung (13) die Zählung der Bindungspositionen ein, nicht jedoch in die Bindungsenthalpie [Gl. (12)]. Wir wollen die Größenordnung des Effekts abschätzen. In Erweiterung von Gleichung (13) gilt mit $n_1 = n_2 = n = p_i/q_i$ ($i = 1-3$) Gleichung (24).

$$\Delta S_{Zi}^0 = \Delta S_{Si}^0 - R \ln q_i \quad (24)$$

Bei der Intercalation kann man davon ausgehen, daß im Mittel auf jedes Basenpaar eine potentielle Bindungsposition entfällt. Dann ist $p_1 = 1/2$ und $q_1 = 1/2n$. Nehmen wir an, daß für die externe Bindung von F oder M jede anionische Phosphodiestergruppe der DNA eine potentielle Bindungsposition ist, so beträgt $p_{2,3} = 1$ und $q_{2,3} = 1/n$. Bei den untersuchten Ethidium- und Acridinfarbstoffen (in Klammern) ist $n = 0.21$ (0.17), $R \ln q_1 = 7$ (9) und $R \ln q_{2,3} = 13$ (15) $\text{JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$. Die ΔS_{Zi}^0 -Werte sind gegenüber den ΔS_{Si}^0 -Werten abgesenkt. Obwohl sich die Bindungsentropien verändern, bleibt unsere vergleichende, qualitative Diskussion bestehen. Damit sind Bindungskonstanten, Enthalpien und Entropien in einem einheitlichen Rahmen anschaulich interpretierbar.

9. Biologische und pharmakologische Aspekte der Farbstoffbindung

Nach unseren Untersuchungen ist die Bindungskonstante der Intercalation 1 sehr viel kleiner als die Konstante der externen Bindung 2 ($K_{S1} \ll K_{S2}$): In vitro ist damit die Intercalation gegenüber der externen Bindung thermodynamisch benachteiligt. Verursacht wird dieser Unterschied in den Bindungskonstanten durch die Bindungsentropie ($\Delta S_{S1}^0 \ll \Delta S_{S2}^0$), während die Bindungsenthalpien von 1 und 2 annähernd gleich sind ($\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0$). Die lebende Zelle enthält nun zahlreiche anorganische Salze in komplizierter Komposition. Ein einfaches Äquivalent dafür ist physiologische Kochsalzlösung, deren NaCl-Konzentration $C_s \approx 0.15 \text{ M}$ beträgt. Nach Gleichung (21) (Abb. 3) fällt die scheinbare Bindungskonstante K_s im Bereich kleiner C_s mit wachsender Salzkonzentration steil ab. Die kompetitiv gebundenen Moleküle 2 sind bei $C_s = 0.15 \text{ M}$ bereits weitgehend verdrängt, während die nicht-kompetitiv gebundenen, intercalierten Moleküle 1 der Einwirkung des Kompetitors widerstehen. Man kann deshalb abschätzen, daß die Intercalation in vivo gegenüber der externen Bindung dominiert ($r_1 > r_2$) oder doch beide Bindungen vergleichbare Anteile haben ($r_1 \approx r_2$).

Acridin- und Ethidiumderivate sind mutagen^[2,3,50]. Daher müssen sie in die Zelle gelangen und mit DNA in Wechselwirkung treten. Jedoch sind Stoffaufnahme und Stofftransport in lebenden Zellen sehr komplexe und auch selektive Prozesse. Es ist deshalb die Frage zu stellen, ob die biologische und pharmakologische Wirkung dieser

Substanzen alleine durch ihre Bindung an DNA verstanden werden kann, oder ob die Bindung an DNA eher ein Nebeneffekt ist und das Gros der Farbstoffmoleküle in anderer Weise wirksam wird. Es sollen deshalb abschließend noch einige Versuche beschrieben werden, in denen der Ort bevorzugter Farbstoffakkumulation in der lebenden Zelle direkt sichtbar gemacht wird.

Die diskutierten Acridin- und Ethidiumderivate sind gute Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome). Sie können mit dem Fluoreszenzmikroskop in der Zelle sehr empfindlich nachgewiesen werden. Die niedrigen, fluoreszenzmikroskopisch detektierbaren Farbstoffkonzentrationen sind für die Zelle im allgemeinen nicht oder nur begrenzt toxisch. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, den Weg des Fluorochroms in einer lebenden Zelle zu verfolgen und den Ort der Farbstoffakkumulation zu erkennen.

Als Zellmaterial verwenden wir in unseren Modellversuchen Gewebekulturen von HeLa- und LM-Zellen (Mäusefibroblasten), die experimentell relativ leicht in gleichbleibender Qualität zugänglich sind. Gewebekulturen haben den Vorteil, daß die Zellen in einer Monoschicht auf der Unterlage (Deckgläschen) wachsen und dann leicht mikroskopisch beobachtet werden können. Zur Inkubation werden die Zellen mit der Unterlage in eine Farbstofflösung der Konzentration C_F getaucht (37°C) nach der Inkubationszeit τ_i in Hanks-Lösung gespült, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, und anschließend der mikroskopischen Beobachtung zugeführt.

Fixierte und lebende Zellen verhalten sich bei der Fluorochromierung verschieden. Wir betrachten zunächst eine Gewebekultur Ethanol-fixierter HeLa-Zellen, die mit dem Fluorochrom AO gefärbt wurde. Der Kern der Zellen fluoresziert intensiv grün-gelb, das Cytoplasma und die Nucleoli intensiv orange. Aus spektroskopischen Untersuchungen ist bekannt, daß AO mit steigender Konzentration in wäßriger Lösung assoziiert^[51,52]. Dabei verändern sich die Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Die Fluoreszenzfarbe der Monomere ist nun ebenfalls grün-gelb, der Dimer orange. Danach liegt AO im Kern bevorzugt monomer, im Cytoplasma und Nucleoli dimer vor. Aus enzymatischen Abbauversuchen kennt man auch die Substrate, an die der Farbstoff in der Zelle gebunden ist. Es sind die Nucleinsäuren DNA und RNA. Baut man die DNA des Kerns oder die RNA im Cytoplasma oder Nucleolus ab, so verschwindet die entsprechende Färbung. Der Farbstoff kann damit auch als analytisches Reagens auf DNA oder RNA eingesetzt werden. Die Fluorochromierung von cytologischem Material mit AO haben von Bertalanffy et al.^[53] zu einer Diagnostik maligner Tumoren ausgebaut. Das gleiche fluoreszenzmikroskopische Bild zeigen aber auch andere Zellen, die sich rasch teilen.

Nach der Vitalfluorochromierung von HeLa-Zellen mit AO beobachtet man ebenfalls grün fluoreszierende Kerne; die Fluoreszenz ist jedoch relativ schwach. Bei Zellen in Mitose werden die Chromosomen fluorochromiert. Es ist deshalb naheliegend anzunehmen, daß der Farbstoff an die DNA gebunden wird, die im Kern und den Chromosomen lokalisiert ist. Die Funktion der vital gefärbten Zellen ist nicht nennenswert beeinträchtigt^[54]. Besonders eindrucksvoll gelingt die Vitalfluorochromierung von Chromosomen mit dem basischen Acridinfarbstoff 3-Amino-6-methoxy-9(2-hydroxy-ethyl-amino)acridin, den wir kürz-

lich untersucht haben (Abb. 10)^[55]. Hohe Farbstoffkonzentration und lange Inkubationszeiten werden von der Zelle ohne nachweisbare Verringerung der Atmungsaktivität getragen.

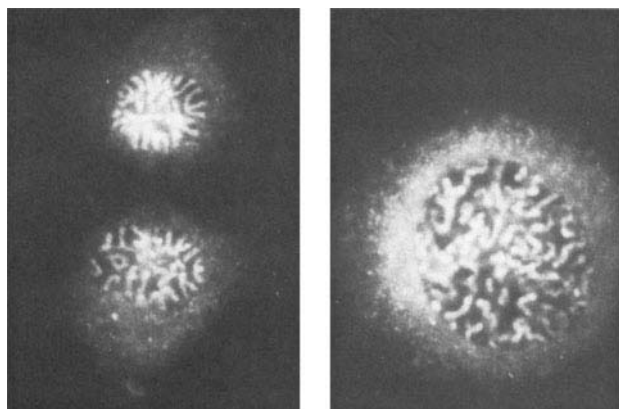


Abb. 10. Chromosomen in mitotischen LM-Zellen nach Vitalfluorochromierung mit 3-Amino-6-methoxy-9(2-hydroxy-ethyl-amino)acridin. Farbstoffkonzentration $C_F = 1 \cdot 10^{-3}$ M, Inkubationszeit $t_i = 45$ min, Vergrößerung 1000fach [55]. Links Telophase; rechts Prophase.

Die Vitalfluorochromierung des Kernchromatins ist jedoch keineswegs die Regel, sondern eine seltene Ausnahme. Im Regelfall ist der Kern lebender Zellen praktisch fluoreszenzfrei, eine Eigenschaft, die als Kriterium für gesunde Gewebekulturen gilt. Statt dessen kann man im Cytoplasma unter geeigneten Bedingungen zahlreiche, intensiv fluoreszierende kleine Organellen beobachten, die in der Kernbucht angehäuft sein können. Es handelt sich um Lysosomen, in denen jetzt der Farbstoff akkumuliert wird. Bei der Vitalfluorochromierung mit AO ist das Cytoplasma mit orange fluoreszierenden Lysosomen geradezu übersät^[56, 57]. Aber auch zahlreiche andere Farbstoffe werden in den Lysosomen lebender Zellen akkumuliert, wie das basische Fluorochrom 3-Dimethylamino-6-methoxyacridin, das mit AO eng verwandt ist (Abb. 11). Bei fixierten Zellen erzeugt der gleiche Farbstoff wieder eine der Bertalanffy-Färbung analoge Fluorochromierung von DNA und RNA im Kern und Cytoplasma bzw. Nucleolus^[58].

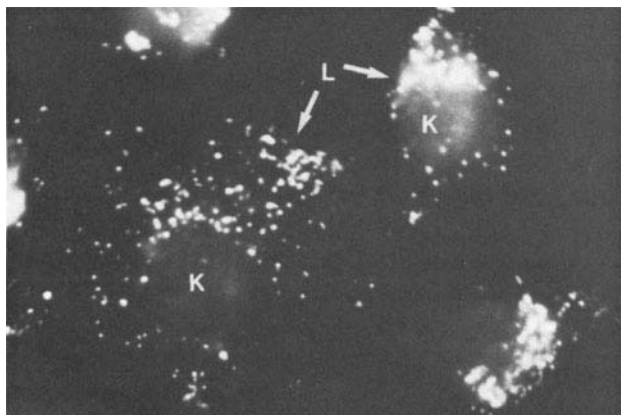


Abb. 11. Lysosomen L im Cytoplasma von LM-Zellen nach Vitalfluorochromierung mit 3-Dimethylamino-6-methoxyacridin. Farbstoffkonzentration $C_F = 1 \cdot 10^{-5}$ M, Inkubationszeit $t_i = 4.5$ h, Vergrößerung 1000fach. Die intensiv fluoreszierenden Lysosomen sind entweder im Cytoplasma verteilt oder in der Kernbucht angehäuft. Der Zellkern K fluoresziert sehr schwach, das Cytoplasma praktisch nicht. Es ist deshalb fluoreszenzmikroskopisch nicht dargestellt [55].

Lysosomen enthalten keine Nucleinsäure. Vielmehr sind sie die Verdauungsorganellen der Zelle. Sie haben die Aufgabe, höhermolekulare Substanzen in der Zelle enzymatisch zu spalten und die Spaltstücke dem Stoffwechsel zuzuführen. Farbstoffe sind schwer verdaulich. Sie können in den Lysosomen – auf einem noch nicht genau bekannten Weg – in so hoher Konzentration angereichert werden, daß der Farbstoff assoziiert. Sind die Lysosomen jedoch nicht mehr in der Lage, weiteren Farbstoff zu speichern, so gelangt das Fluorochrom in den Kern, was im allgemeinen zum Zelltod führt. Der Zelltod ist jetzt an einer sehr intensiven Fluoreszenz des Zellkerns zu erkennen. Sehr wahrscheinlich wird der Farbstoff an die DNA des Kernchromatins gebunden. Offenbar hat die Farbstoffakkumulation in den Lysosomen auch eine Schutzfunktion, nämlich zu verhindern, daß der Farbstoff mit den lebenswichtigen Nucleinsäuren in Wechselwirkung tritt.

Bereits kleine Veränderungen in der Molekülstruktur genügen, um die Zelle zu einer ganz anderen Antwort auf die Einwirkung eines Fluorochroms zu veranlassen. AO z. B. ist eine starke Base, die bei $\text{pH} = 7$ praktisch vollständig am Ringstickstoffatom in 10-Stellung protoniert ist und als Kation in den Lysosomen akkumuliert wird. Alkyliert man AO, so gelangt man zu verwandten 10-Alkylacridinium-orange-Kationen (Alkyl-AOs), die – ebenso wie der Grundkörper AO – intensiv fluoreszieren und mit steigender Konzentration in wäßrigem Medium assoziieren^[59]. Wir haben $n\text{-C}_m\text{H}_{2m+1}\text{-AOs}$ ($m = 1\text{--}9$) untersucht. Für $m > 9$ sind die Substanzen in Wasser schwerlöslich. Methyl-AO verhält sich bei der Vitalfluorochromierung von HeLa- oder LM-Zellen noch ähnlich wie AO. Man beobachtet Farbstoffakkumulation in Lysosomen, daneben schwach in Mitochondrien. Aber bereits bei Ethyl-AO verändert sich das mikroskopische Bild drastisch. Jetzt wird der Farbstoff bevorzugt an die Mitochondrien der Zelle gebunden^[60]. Die Vitalfärbung der Mitochondrien wird mit steigender Kettenlänge des Alkylrests immer prägnanter (Abb. 12)^[61]. Bei Nonyl-AO z. B. erkennt man unter dem Fluoreszenzmikroskop praktisch nur noch fluoreszierende Mitochondrien. Weder Lysosomen noch Kernchromatin oder Cytoplasma werden fluorochromiert. Dabei kann man mit dem gleichen Farbstoff bei fixierten Zellen wieder eine der Bertalanffy-Färbung analoge Färbung erzeugen,

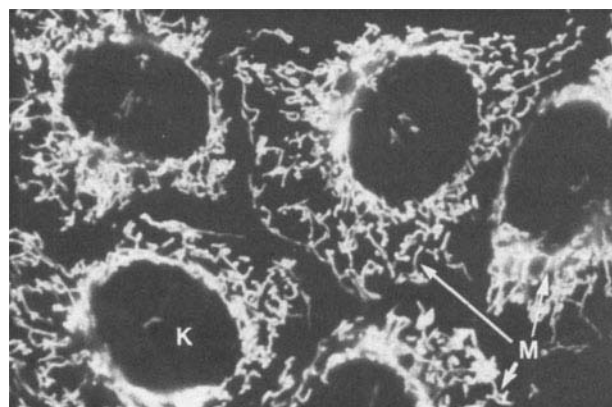


Abb. 12. Filamentöse Mitochondrien M im Cytoplasma von HeLa-Zellen nach Vitalfluorochromierung mit 10-*n*-Nonyl-acridiniumorange-chlorid. Farbstoffkonzentration $C_F = 5 \cdot 10^{-7}$ M, Inkubationszeit $t_i = 10$ min, Vergrößerung 1000fach. Weder Zellkern K noch Cytoplasma sind fluoreszenzmikroskopisch dargestellt [61, 63].

wobei das Fluorochrom an DNA und RNA im Kern und Cytoplasma gebunden wird.

Die Vitalfärbung der Mitochondrien mit Nonyl-AO ist sehr spezifisch und effizient^[61]. Sie gelingt noch bei einer Farbstoffkonzentration $C_F = 1 \cdot 10^{-8}$ M im Inkubationsmedium. Diese Konzentration ist eine Zehnerpotenz kleiner als die Wasserstoffionenkonzentration im reinsten Wasser. Bei $5 \cdot 10^{-7}$ M kann man die fluoreszierenden Mitochondrien bereits bei einer Inkubationszeit $\tau_1 < 1$ min beobachten. Bei $C_F \geq 1 \cdot 10^{-7}$ M und $\tau_1 = 10$ min wird der Farbstoff in so hoher Konzentration an die Mitochondrien gebunden, daß er dimerisiert. Die Retentionszeit des Farbstoffs an den Mitochondrien von Zellen, die nach der Vitalfärbung in farbstofffreiem Medium weitergezüchtet wurden, ist länger als eine Woche.

In den Mitochondrien findet der gesamte Energiestoffwechsel der Zelle statt: Atmung, Elektronenübertragung und Synthese des lebenswichtigen ATP. Ein großer Teil der Enzyme, die die oxidative Phosphorylierung bewirken, ist an der inneren Mitochondrienmembran und den Membranen der Cristae lokalisiert. Unsere Untersuchungen weisen nun darauf hin, daß Nonyl-AO durch hydrophobe Wechselwirkung an diese Membranen gebunden wird^[61]. Ein Maß für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien ist die Atmungsaktivität. Bei HeLa-Zellen wird bis zu $C_F \leq 5 \cdot 10^{-7}$ M und $\tau_1 = 10$ min weder der Sauerstoffverbrauch noch die Ultrastruktur der Mitochondrien beeinflusst. Bei höherer Farbstoffkonzentration und längerer Inkubationszeit beobachtet man eine Hemmung der Atmung und parallel dazu Veränderungen der Ultrastruktur, insbesondere an der inneren Mitochondrienmembran und bei den Membranen der Cristae^[61,62]. Im Endstadium ($5 \cdot 10^{-6}$ M und 30–60 min) werden die Mitochondrien unter der Einwirkung der hydrophoben Farbstoffkationen in mehrschalige Liposomen und bizarre Myelinkörper umgewandelt. Es ist bemerkenswert, daß diese dramatischen Veränderungen der Ultrastruktur unter dem Elektronenmikroskop nur bei den Mitochondrien beobachtet werden können. Die anderen Membranen der Zelle, z. B. die Kernmembran, scheinen der Einwirkung des Farbstoffs standzuhalten. Es ist auch nicht gelungen, die Farbstoffbindung an die Kernmembran fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. Hydrophobe Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Mitochondrienmembranen tragen zur Bindung bei^[61,63]. Sie wird aber offensichtlich durch einen anderen Mitochondrien-spezifischen Beitrag ergänzt^[61].

Nicht nur Alkyl-AOs, sondern auch andere Farbstoffe wie E, TME und BH, die in vitro an DNA gebunden werden, verursachen in der lebenden Zelle drastische Veränderungen der Ultrastruktur der Mitochondrien^[64–66]. Die höchste Wirkung hat TME, das von den genannten Ethidiumderivaten auch am stärksten hydrophob ist. Wir nehmen deshalb an, daß die Veränderung der Ultrastruktur wieder auf hydrophobe Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Mitochondrienmembranen zurückgeführt werden kann.

Diese wenigen Beispiele mögen genügen, um darzulegen, daß die Bindung von Acridin- und Ethidiumderivaten an DNA in vitro keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Bindung und den Ort der Akkumulation der gleichen Substanz in lebenden Zellen zuläßt. Ganz offensichtlich hat die lebende Zelle mit der Farbstoffakkumulation in Lyso-

somen einen Mechanismus zur Verfügung, der das Kernchromatin schützt und verhindert, daß toxische Substanzen an die DNA gebunden werden. Es ist noch nicht genau bekannt, unter welchen Bedingungen dieser Mechanismus umgesteuert wird und stattdessen Farbstoffbindung an Mitochondrien stattfindet. Die spezifische Bindung von Substanzen an die Membranen, die die oxidative Phosphorylierung bewirken, darf allgemeines Interesse beanspruchen, da man auf diesem Weg direkt oder indirekt in den Energiestoffwechsel eingreifen kann. Dieses Prinzip pharmakologisch nutzbar zu machen, erscheint als lohnendes Ziel.

Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Unterstützung dieser Untersuchungen gedankt. Mein besonderer Dank gilt meinen Mitarbeitern – sie sind im Literaturverzeichnis zitiert – für ihren tatkräftigen Einsatz und für fruchtbare Diskussionsbeiträge.

Eingegangen am 30. April 1985 [A 565]

- [1] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 18.
- [2] A. R. Peacocke in R. M. Acheson (Hrsg.): *Acridines*, 2. Aufl., Wiley, New York 1973, S. 723 ff.
- [3] M. J. Waring in E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, M. J. Waring (Hrsg.): *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, 2. Aufl., Wiley, New York 1981, S. 273 ff.
- [4] H. M. Sobell, C. C. Tsai, S. G. Gilbert, S. C. Jain, T. D. Sacore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3068.
- [5] C. C. Tsai, S. C. Jain, H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* 114 (1977) 301.
- [6] S. C. Jain, C. C. Tsai, H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* 114 (1977) 317.
- [7] W. Fuller, M. J. Waring, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 68 (1964) 805.
- [8] M. Liebman, J. Rubin, M. Sundaralingam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 4821.
- [9] G. Löhr, G. Achterer, *Biopolymers* 8 (1969) 595.
- [10] L. P. G. Wakelin, M. J. Waring, *Mol. Pharmacol.* 10 (1974) 544.
- [11] J. Chambron, M. Daune, C. Sadron, *Biochim. Biophys. Acta* 123 (1966) 306.
- [12] J. B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* 27 (1967) 87.
- [13] S. Ichimura, M. Zama, H. Fujita, T. Ito, *Biochim. Biophys. Acta* 190 (1969) 116.
- [14] J. Pauluhn, H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 82 (1978) 1265.
- [15] J. Pauluhn, H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 83 (1979) 76.
- [16] J. Pauluhn, R. Grezes, H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 83 (1979) 708.
- [17] E. Ohmes, J. Pauluhn, J.-U. Weidner, H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 84 (1980) 23.
- [18] H. Wille, J. Pauluhn, H. W. Zimmermann, *Z. Naturforsch. C* 37 (1982) 413.
- [19] J. Röding, H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 86 (1982) 729.
- [20] G. S. Manning, *Q. Rev. Biophys.* 11, 2 (1978) 179.
- [21] M. T. Record, T. M. Lohman, P. de Haseth, *J. Mol. Biol.* 107 (1976) 107.
- [22] G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660.
- [23] A. R. Peacocke, J. N. H. Skerrett, *Trans. Faraday Soc.* 52 (1956) 261.
- [24] A. Blake, A. R. Peacocke, *Biopolymers* 6 (1968) 1225.
- [25] A. V. Hill, *J. Physiol. (London)* 40 (1910) 4.
- [26] J. Wylman, Jr., *Adv. Protein Chem.* 19 (1964) 223.
- [27] D. M. Crothers, *Biopolymers* 6 (1968) 575.
- [28] G. Schwarz, *Biophys. Struct. Mech.* 2 (1976) 1.
- [29] G. Schwarz, *Biophys. Chem.* 6 (1977) 65.
- [30] J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 469.
- [31] A. S. Zasedatelev, G. V. Gurskii, M. V. Volkenshtein, *Mol. Biol.* 5 (1971) 245; *Chem. Abstr.* 75 (1971) 15042n.
- [32] J. Ramstein, M. Leng, N. R. Kallenbach, *Biophys. Chem.* 5 (1976) 319.
- [33] W. D. Wilson, I. G. Lopp, *Biopolymers* 18 (1979) 3025.
- [34] H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703.
- [35] C. H. Fiske, Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.* 66 (1925) 375.
- [36] H. Eibl, W. E. M. Lands, *Anal. Biochem.* 30 (1969) 51.
- [37] J.-U. Weidner, persönliche Mitteilung.
- [38] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 269.
- [39] R. W. Armstrong, T. Kurucsev, U. P. Strauss, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 3174.

- [40] J. L. Bresloff, D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* 95 (1975) 103.
 [41] P. Fromherz, *Chem. Phys. Lett.* 109 (1984) 407.
 [42] G. Schwarz, *Eur. J. Biochem.* 12 (1970) 442.
 [43] G. Schwarz, W. Balthasar, *Eur. J. Biochem.* 12 (1970) 461.
 [44] R. Feulgen, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 84 (1913) 309.
 [45] G. V. Gursky, *Biofizika* 11 (1966) 737.
 [46] N. J. Pritchard, A. Blake, A. R. Peacocke, *Nature (London)* 212 (1966) 1360.
 [47] B. Marcandalli, C. Winzek, J. K. Holzwarth, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 88 (1984) 368.
 [48] H. G. Hertz, M. D. Zeidler, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 68 (1964) 821.
 [49] E. Wicke, *Angew. Chem.* 78 (1966) 1; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5 (1966) 106.
 [50] A. Albert: *The Acridines*, 2. Aufl., Edward Arnold, London 1966.
 [51] V. Zanker, *Z. Phys. Chem.* 199 (1952) 225.
 [52] V. Zanker, *Z. Phys. Chem.* 200 (1952) 250.
 [53] L. von Bertalanffy, F. D. von Bertalanffy, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 84 (1960) 225.
 [54] R. B. Hill, K. B. Bensh, D. W. King, *Nature (London)* 184 (1959) 1429.
 [55] K. Petschel, A. Naujok, H. W. Zimmermann, *Histochemistry* 76 (1982) 219.
 [56] H. Koenig, *J. Cell Biol.* 19 (1963) 87.
 [57] D. Wittekind, *Acta Histochem. (Suppl.)* 1 (1958) 247.
 [58] K. Petschel, A. Naujok, P. Kempter, W. Seiffert, H. W. Zimmermann, *Histochemistry* 80 (1984) 311.
 [59] M. Septinus, W. Seiffert, H. W. Zimmermann, *Histochemistry* 79 (1983) 443.
 [60] U. Erbrich, A. Naujok, K. Petschel, H. W. Zimmermann, *Histochemistry* 74 (1982) 1.
 [61] M. Septinus, T. Berthold, A. Naujok, H. W. Zimmermann, *Histochemistry* 82 (1985) 51.
 [62] U. Erbrich, T. Berthold, H. W. Zimmermann, *Histochemistry* 76 (1982) 211.
 [63] U. Erbrich, M. Septinus, A. Naujok, H. W. Zimmermann, *Histochemistry* 80 (1984) 385.
 [64] E. Heinen, A. Lepoint, R. Bassleer, G. Goessens, *Beitr. Pathol.* 153 (1974) 353.
 [65] G. Soslau, M. M. K. Nass, *J. Cell Biol.* 51 (1971) 514.
 [66] J. H. Röding, A. Naujok, H. W. Zimmermann, *Histochemistry*, im Druck.

Resonanz-Raman-Spektroskopie und ihre Anwendung in der Anorganischen Chemie

Von Robin J. H. Clark* und Trevor J. Dines

Neue analytische
Methoden (27)

Resonanz-Raman-Spektren werden erhalten, wenn die Wellenzahl der (monochromatischen) Anregungsstrahlung annähernd oder vollständig mit der eines Elektronenübergangs der streuenden Spezies übereinstimmt. Normalerweise sind derartige Spektren durch eine sehr große Intensitätszunahme bestimmter Raman-Banden charakterisiert; manchmal treten auch noch intensive Ober- und Kombinationsschwingungsbanden auf. Die Methode liefert detaillierte Informationen über angeregte Elektronenzustände, da nur die zu den Chromophoren gehörenden Schwingungszustände Resonanz-Raman-aktiv sind. Hinzu kommt die hohe Empfindlichkeit dieser Technik, die es ermöglicht, Verbindungen sogar noch in Konzentrationen von 10^{-6} mol/L nachzuweisen. Die Resonanz-Raman-Spektroskopie eignet sich deshalb vor allem auch zum Studium von Chromophoren in biochemisch wichtigen Molekülen.

1. Einleitung

Theorie und Praxis der Resonanz-Raman(RR)-Spektroskopie haben sich innerhalb der letzten zehn Jahre so weit entwickelt, daß nun ein abgerundetes Bild gezeichnet werden kann. Ziel der vorliegenden Übersicht ist es, dies in verständlicher Weise zu tun und darüber hinaus die Anwendung der Methode auf dem weiten Feld der Anorganischen Chemie zu besprechen. Zu diesem Zweck befaßt sich Abschnitt 2 mit der Entwicklung der Theorie bis zum heutigen Stand. Dabei werden die Beziehung zwischen normaler Raman-Streuung und RR-Streuung aufgezeigt sowie die Natur der A-, B-, C- und D-Term-Streuung und die Streuung sowohl durch vollsymmetrische als auch durch nicht vollsymmetrische Moden. Außerdem wird die Bedeutung des Depolarisationsgrades einer Raman-Bande

auseinandergesetzt, und zwar hinsichtlich der Zuordnung von Schwingungs- und Elektronenübergangsbanden.

Im Anschluß an eine Diskussion der experimentellen Aspekte in Abschnitt 3 werden die Ergebnisse vieler Untersuchungen anorganischer Verbindungen besprochen – von zweiatomigen Spezies über zunehmend komplizierte Systeme bis hin zu Metallporphyrinen und verwandten Verbindungen. Wir beschränken uns dabei auf RR-Studien, die nach 1977 durchgeführt wurden, da eine Zusammenstellung früherer Arbeiten vorliegt^[1]. Die Untersuchungen an kleinen Molekülen (Abschnitt 4) werden eingehender behandelt, da sie maßgeblich zum Verständnis des RR-Effekts beigetragen haben. Die Untersuchungen an größeren Molekülen (Abschnitt 5) werden an einigen anschaulichen Beispielen diskutiert; der Leser sei auf Übersichten verwiesen, die Spezies mit Metall-Metall-Bindungen^[2], gemischtvalente Moleküle^[3,4] und Metallporphyrine^[5] behandeln. Andere Übersichten betreffen RR-Untersuchungen an Halbleitern^[6], elektronische Raman-Streuung^[7] sowie zeitaufgelöste Resonanz-Raman(TR³)-

[*] Prof. Dr. R. J. H. Clark, Dr. T. J. Dines
Christopher Ingold Laboratories, University College London
20 Gordon Street, London WC1H 0AJ (Großbritannien)