

Komplexe von Desoxyribonucleinsäure mit Azoverbindungen und Diazinen, I

DNA und 2-Amio-benzo[c]cinnolin

Azo Compound and Diazine Complexes of Desoxyribonucleic Acid, I
DNA and 2-Amino-benzo[c]cinnoline

Hermann Rau und Gisela Schuster

Abteilung für Physikalische Chemie der Universität Hohenheim, Stuttgart

Herrn Prof. Dr. H. Hahn zum 60. Geburtstag gewidmet

(Z. Naturforsch. **30 c**, 29–32 [1975]; eingegangen am 5. September/21. Oktober 1974)

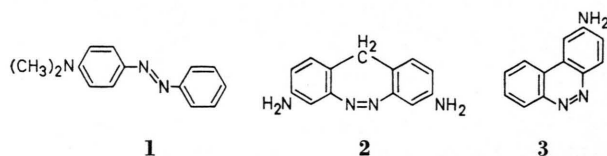
DNA, Azo Compounds, Charge Transfer Interaction, Diazines, Intercalation Complex

Complex formation of deoxyribonucleic acid and 2-amino-benzo[c]cinnoline is demonstrated by spectroscopic means. The small molecule though uncharged seems to intercalate between the base pairs of the deoxyribonucleic acid like the acridines. The complex constant, however, is smaller by about two orders of magnitude. The influence of salt concentration and temperature on the equilibrium is investigated. The involvement of charge-transfer contribution is suggested.

1. Einleitung

Dannenberg und Sonnenbichler¹ berichten über die Wechselwirkung einer Reihe von aromatischen Aminoverbindungen, die teilweise carcinogene Wirkung haben, mit Desoxyribonucleinsäure (DNA). Soweit wir die Literatur kennen, ist außer der nicht eindeutigen Beobachtung in¹ noch über keine Komplexbildung zwischen DNA und Azoverbindungen berichtet worden.

Wir haben solche Untersuchungen an drei strukturell verwandten Azoverbindungen begonnen, haben jedoch mit spektroskopischen Mitteln bei *p*-Dimethylaminoazobenzol (**1**) und *p,p'*-Diamino-*o,o'*-azodiphenylmethan (**2**) keine Wechselwirkung mit DNA feststellen können. Dagegen bildet 2-Amino-benzo[c]cinnolin (**3**), von dem nicht bekannt ist,



ob es cancerogen ist, einen Komplex mit DNA. Über die Untersuchung dieses Komplexes soll in dieser Arbeit berichtet werden.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Rau, Abteilung für Physikalische Chemie der Universität Hohenheim, D-7000 Stuttgart 70, Garbenstr. 17.

2. Experimentelles

2.1. Chemikalien

Als DNA-Komponente wurde das Natriumsalz von Kalbsthymus-DNS der Firma EGA-Chemie, Steinheim, ohne weitere Reinigung eingesetzt. **3** wurde nach der Literatur² hergestellt und chromatographisch gereinigt, Schmelzpunkt 239 °C. Als Lösungsmittel wurden Äthanol „Uvasol“ von Merck und einfach destilliertes Wasser benutzt, die verwendeten Salze hatten p.a.-Qualität.

2.2. Bereitung der Proben

Die DNA ließen wir vier bis fünf Tage bei 4 °C in wäßriger Salzlösung quellen. Normalerweise betrug die Salzkonzentration dieser Lösung $1,65 \cdot 10^{-3}$ M/l, für die Versuche zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten und der Zahl der Bindungsstellen war die Salzkonzentration der Quelllösung $2 \cdot 10^{-3}$ M/l, für die Proben zur Untersuchung des Einflusses der Salzkonzentration auf die Komplexeigenschaften wählten wir die Konzentrationen $1,65 \cdot 10^{-1}$ M/l, $1,65 \cdot 10^{-2}$ M/l, $1,65 \cdot 10^{-3}$ M/l und $1,65 \cdot 10^{-4}$ M/l. **3** wurde wegen seiner geringen Löslichkeit in Wasser/Äthanol-Mischung 10:1 gelöst. Die Untersuchungen des **3**-DNA-Komplexes wurden in Äthanol/Wasser 1:20 durchgeführt. Bei diesem Äthanolgehalt ist der Komplex, zumindest bei Proflavin, noch nicht merklich vom organischen Lösungsmittel beeinflusst³.

Der Komplex wurde nach folgendem Verfahren hergestellt: Zu einer definierten Menge an **3**-Lösung wurde eine definierte Menge DNA-Lösung gegeben. Die Mischungen wurden in bezug auf das Verhältnis Wasser:Äthanol und in bezug auf die Salzkonzentration



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

zentration eingestellt und über Nacht im Dunkeln inkubiert.

2.3. Geräte

Absorptionsspektren wurden mit einem Shimadzu UV-200 Spektralphotometer bei Raumtemperatur registriert, die Absorptionsmessungen bei höherer Temperatur mit einem Zeiss PM QII-Spektralphotometer mit temperierbarem Küvettenhalter Punkt für Punkt ausgeführt. Für die Fluoreszenzmessungen stand ein Aminco-Keirs-Spektralfluorimeter zur Verfügung, die Circular-Dichroismus-(CD-) Spektren wurden mit einem Cary 60-Spektralphotometer mit CD-Zusatz 6002 gemessen*.

3. Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 1 a sind die Absorptionsspektren von DNA und **3** dargestellt. Abb. 1 b zeigt die Spektren von **3** mit steigenden Konzentrationen von DNA. Es

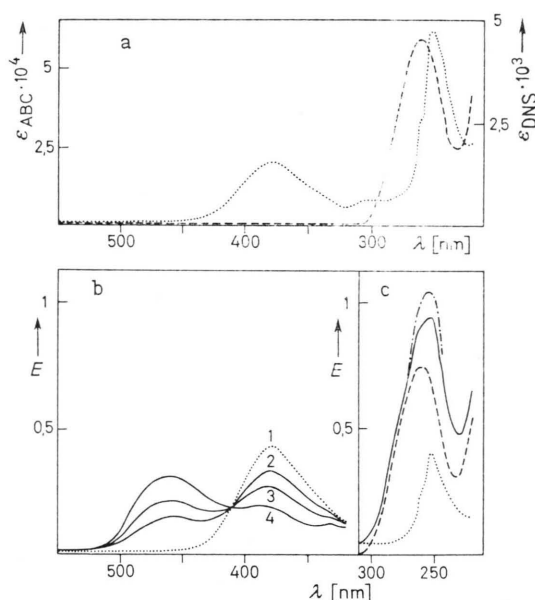


Abb. 1. a. Absorptionsspektren von \cdots **3**, $---$ DNA. EtOH/H₂O 1:20, $7,5 \cdot 10^{-4}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-5}$ M NaCitrat, pH 6,2; b. Absorptionsspektren von vier Lösungen verschiedenen 3-DNA-Verhältnisses. $c_3 = 3 \cdot 10^{-5}$ M, (1) $c_N = 0$ M, (2) $c_N = 1,62 \cdot 10^{-4}$ M, (3) $c_N = 3,26 \cdot 10^{-4}$ M, (4) $c_N = 6,52 \cdot 10^{-4}$ M, EtOH/H₂O 1:20, $7,5 \cdot 10^{-4}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-5}$ M NaCitrat, pH 6,2; c. Hypochromie einer 3-DNA-Mischung. \cdots **3**, $---$ DNA, $---$ 3-DNA-Mischung, $---$ Summenspektrum von **3** und DNA; $c_3 = 10^{-5}$ M, $c_N = 1,63 \cdot 10^{-4}$ M, EtOH/H₂O 1:20, $7,5 \cdot 10^{-4}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-5}$ M NaCitrat, pH 6,2.

* Diese Messungen wurden im Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim durchgeführt, wofür wir Herrn Prof. Dr. F. Lingens und Herrn Dr. A. Bacher danken.

bildet sich bei 455 nm ein neues Maximum aus, das wir einem DNA-**3**-Komplex zuschreiben. Bei 410 nm beobachtet man einen isosbestischen Punkt. Ein niedriges Maximum erscheint bei 332 nm.

Ein Extinktionsdifferenzendiagramm⁴ ergibt eine Gerade, die durch den Nullpunkt geht: Im beobachteten Konzentrationsbereich stellt sich das Gleichgewicht einer „einheitlichen“ Reaktion ein. Damit beträgt der Extinktionskoeffizient bei 455 nm

$$\varepsilon_{455 K} = \frac{E_{455}}{c_b} = \frac{E_{455}}{\Delta E_{455}} (\varepsilon_{378 F} - \varepsilon_{378 K}),$$

wobei c_b die Konzentration des gebundenen **3**, E_λ die Extinktion, ΔE_λ die Extinktionsdifferenz bei der Wellenlänge λ und $\varepsilon_{378 F}$ bzw. $\varepsilon_{378 K}$ die Extinktionskoeffizienten des freien **3**-Farbstoffs bzw. des Komplexes bedeuten.

Unter der Annahme, daß $\varepsilon_{378 K}$ gegenüber $\varepsilon_{378 F} = 14200$ l/M cm zu vernachlässigen sei, errechnet sich der Extinktionskoeffizient des Komplexes zu $\varepsilon_{455 K} = 17600$ l/M cm. Dies ist eine Obergrenze, sie dürfte auf ca. 20% richtig sein. Das damit ermittelte c_b wird im folgenden benutzt.

Abb. 1 c zeigt den Bereich zwischen 210 und 310 nm für zwei willkürlich gewählte Konzentrationen von **3** und DNA: Den Spektren der Einzellösungen ist ein Summenspektrum und das Spektrum der Mischung der **3**- und DNA-Lösungen nach Berücksichtigung der Verdünnung gegenübergestellt. Man sieht, daß die Mischung eine kleinere Extinktion aufweist als das Summenspektrum. Diese Hypochromie ist ebenfalls ein Hinweis auf die Komplexbildung.

Die Komplexbildungskonstante ist unter der Annahme einer reversiblen Bildungsreaktion $\mathbf{3} + \text{DNA} \rightleftharpoons \text{Komplex}$ definiert als

$$K_c = \frac{c_b}{c_f (B' - c_b)}.$$

Dabei ist c_f die Konzentration des freien **3**, B' die Zahl der Bindungsstellen an der DNA. Die Konstante K_c ist nicht die thermodynamische Gleichgewichtskonstante, da in der Bestimmungsgleichung die Konzentrationen, nicht die Aktivitäten stehen. K_c ist von der Salzkonzentration abhängig (Abb. 3). Man kann die Gleichung für K_c umformen⁶

$$r/c_f = K_c B - K_c r,$$

wobei $r = c_b/c_N$ und c_N die Konzentration der monomeren Nucleotideinheiten bedeuten. Zur Berechnung

von c_N benutzen wir die Tatsache, daß die Adenin-Thymin- und Guanin-Cytosin-Nukleotidpaare bis auf weniger als ein Prozent dasselbe Molekulargewicht haben. Aus der Einwaage und diesem Molekulargewicht erhält man die Konzentration der Nukleotidpaare, die Konzentration der monomeren Nukleotide ist doppelt so groß. $B = B'/c_N$ ist die Zahl der Bindungsstellen pro monomerer Nucleotid-einheit an der DNA.

Abb. 2 zeigt r/c_t aufgetragen gegen r für eine Natriumacetatkonzentration von 10^{-3} M. Die Punkte liegen annähernd auf einer Geraden. Aus der Stei-

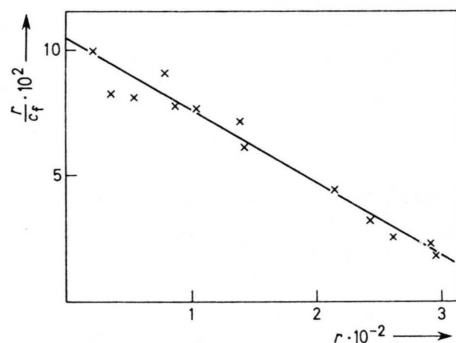


Abb. 2. Zur Bestimmung der Bindungsparameter K und B . $c_N = 3,26 \cdot 10^{-4}$ M, c_3 variiert von $2,8 \cdot 10^{-6}$ M bis $1,68 \cdot 10^{-4}$ M EtOH/H₂O 1:20, 10^{-3} M NaAcetat, pH 6,2.

gung der Geraden erhält man eine Komplexbildungskonstante in der Größenordnung von $5 \cdot 10^4$, aus dem Ordinatenabschnitt eine Bindungsstelle auf 25 ± 10 Basenpaare. Die Bindungskonstante ist um eine bis zwei Größenordnungen kleiner als z. B. die des 3,8-Di-amino-5-äthyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid)-DNA-Komplexes⁷. Dieser Unterschied ist meßtechnisch relevant. Die Komplexbildungskonstante K_c nimmt mit steigender Salzkonzentration stark ab (Abb. 3).

Die Bildung des bei 455 nm absorbierenden DNA-3-Komplexes ist an die native Konfiguration des DNA gebunden. Denaturiert man die mit **3** beladene DNA durch Erhitzen, so verschwindet die Komplexbande. Beim Mischen von Lösungen von **3** und denaturierter DNA bleibt das **3**-Spektrum unverändert.

Abb. 4 zeigt die thermische Denaturierung der mit **3** beladenen DNA. Die Hyperchromie der Absorptionsbande im ultravioletten (UV) Spektralbereich bei 260 nm hat zwei Ursachen: 1. die Dissoziation des Komplexes (vgl. Abb. 1 c), 2. die Entspiralisierung der DNA. Bei ca. 40 °C ist der Kom-

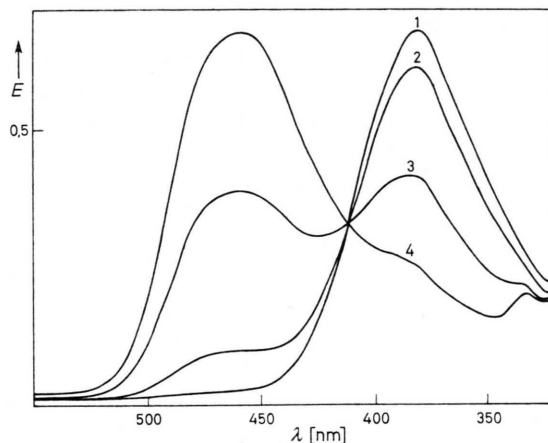


Abb. 3. Absorptionsspektren einer 3-DNA-Mischung bei verschiedenen Salzkonzentrationen. $c_3 = 5 \cdot 10^{-5}$ M, $c_N = 8,14 \cdot 10^{-4}$ M, EtOH/H₂O 1:20. (1) $7,5 \cdot 10^{-2}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-3}$ M NaCitrat, (2) $7,5 \cdot 10^{-3}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-4}$ M NaCitrat, (3) $7,5 \cdot 10^{-4}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-5}$ M NaCitrat, (4) $7,5 \cdot 10^{-5}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-6}$ M NaCitrat.

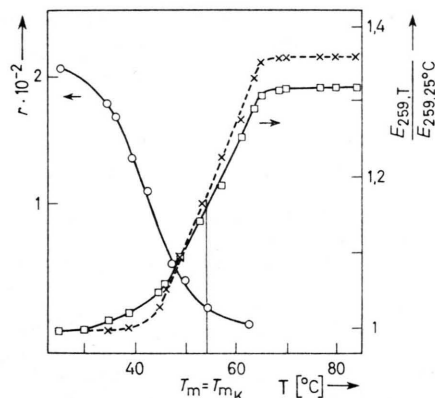


Abb. 4. (○), Komplexbildung in Abhängigkeit von der Temperatur $r = f(T)$ für $c_3 = 4 \cdot 10^{-5}$ M, $c_N = 5,5 \cdot 10^{-5}$ M, EtOH/H₂O 1:20, $7,5 \cdot 10^{-4}$ M NaCl, $7,5 \cdot 10^{-5}$ M NaCitrat, pH 6,2. (□), Schmelzkurve einer 3-DNA-Mischung für $c_3 = 6,5 \cdot 10^{-6}$ M, $c_N = 1,5 \cdot 10^{-4}$ M, EtOH/H₂O 1:20, $4,5 \cdot 10^{-4}$ M NaCl, $4,5 \cdot 10^{-5}$ M NaCitrat, (×), Schmelzkurve der DNA allein unter gleichen Bedingungen.

plex zur Hälfte zerfallen, wie die Abnahme der Komplexbande bei 455 nm zeigt, die Dissoziation ist nahezu vollständig, bevor der Schmelzvorgang der DNA richtig einsetzt. Deshalb ist die Schmelztemperatur für DNA und den DNA-3-Komplex gleich.

3 fluoresziert mit einer Quantenausbeute von ca. 40%⁸. Diese Fluoreszenz verschwindet, wenn die **3**-Molekel in den Komplex eingebaut wird. Die Fluoreszenz der Komplexlösungen ist auf den Anteil an ungebundenem **3** zurückzuführen, wie die spektrale Lage der Fluoreszenz und das Anregungsspektrum beweisen.

Im Komplex mit DNA zeigt **3** optische Aktivität. Die Banden des CD-Spektrums können mit der gebotenen Vorsicht^{9,10} denen des Elektronenspektrums zugeordnet werden. Die Meßgröße θ ist wegen der hohen Absorption des Komplexes klein, die molare Elliptizität ist im Bereich der Komplexbande maximal $[\theta] = 2600 \text{ grad} \cdot \text{cm}^2/\text{mol}$. Da im Komplex eine induzierte optische Aktivität beobachtet wird, kann man auf eine Fixierung der Komplexpartner relativ zueinander schließen.

Die beobachteten Eigenschaften des DNA-**3**-Komplexes entsprechen weitgehend denen der eingehend untersuchten Acridinorange- oder Ethidiumbromid-DNA-Komplexe, für die das Intercalationsmodell gesichert ist⁵. Für die Intercalation des kleinen flachen aromatischen Azomoleküls **3** sprechen die bathochrome Verschiebung der langwelligen $\pi \rightarrow \pi^*$ -Bande des **3** bei Komplexbildung, die Titrationskurve, die eine einfache Sättigungskurve ist, die induzierte optische Aktivität, die Hypochromie der UV-Bande bei 260 nm bei Komplexbildung und die Zerstörung des Komplexes bei Denaturierung der DNA.

Ethidiumbromid und **3** sind strukturell ähnlich, beide haben ein Phenanthren-Grundgerüst. Im Ethidiumion ist jedoch das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms im Ring blockiert wie in den meisten intercalierenden Molekülen. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Azogruppe mit ihrer hohen Elektronendichte die Komplexbildung nicht verhindert, solange das einzulagernde Molekül eben ist und die richtigen Dimensionen hat. Die n-Elektronen treten bei der Komplexbildung nicht in Erscheinung. Sie könnten jedoch beteiligt sein, wenn ein Ladungsaustausch zwischen **3** und den Basenpaaren einen Beitrag zur Komplexbildung liefert. Die spektralen Eigenschaften des **3**-DNA-Komplexes lassen die Annahme einer Charge-Transfer-Wechselwirkung zu.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen. Herrn Dr. A. Bacher danken wir besonders für wertvolle Kritik und Diskussion.

¹ H. Dannenberg u. J. Sonnenbichler, Z. Krebsforsch. **67**, 127 [1965].

² G. M. Badger, C. P. Joshua u. G. E. Lewis, Aust. J. Chem. **18**, 1639 [1965].

³ G. Löber, H. Schütz u. V. Kleinwächter, Biopolymers **11**, 2439 [1972].

⁴ H. Mauser, Z. Naturforsch. **23b**, 1025 [1968].

⁵ L. S. Lermann, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **49**, 94 [1963]; D. M. Revet, M. Schmir u. J. Vinogradov, Nature New Biol. **229**, 10 [1971]; D. S. Drummond, W. F. W. Simpson-Gildemeister u. A. R. Peacocke, Biopolymers **3**, 135 [1965]; J. Chambron, M. Daune u. C. Sandron, Biochim. Biophys. Acta **123**, 306 [1966].

⁶ A. Blake u. A. R. Peacocke, Biopolymers **6**, 1225 [1968].

⁷ M. J. Waring, J. Mol. Biol. **13**, 269 [1965].

⁸ E. M. Kreidler, Dissertation Stuttgart 1966.

⁹ H. Rau, O. Schuster u. A. Bacher, J. Amer. Chem. Soc. **96**, 3955 [1974].

¹⁰ H. Harders, S. Förster, W. Voelter u. A. Bacher, Biochemistry **13**, 3360 [1974].

¹¹ K. Yamaoka, Biopolymers **11**, 2537 [1972].

¹² H. M. Sobell, Progr. Nucl. Acid Res. **13**, 153 [1973].

¹³ J. C. Wang, Biochim. Biophys. Acta **232**, 246 [1971].

¹⁴ W. Müller u. D. M. Crothers, J. Mol. Biol. **35**, 251 [1968].

¹⁵ E. Fredericq u. C. Houssier, Biopolymers **11**, 2281 [1972].

¹⁶ R. K. Tubbs, W. F. Ditmars u. Qu. van Winkle, J. Mol. Biol. **9**, 545 [1964].