

Bindungskonstanten, Bindungsenthalpien und Entropien für die nicht-kompetitive und die kompetitive Bindung von Acriflavin, Tetramethylacriflavin und Acridinorange an DNA

Binding Constants, Binding Enthalpies and Entropies of the Non-Competitive and the Competitive Binding of Acriflavine, Tetramethylacriflavine and Acridine Orange to DNA

Harald Wille, Jürgen Pauluhn und Herbert W. Zimmermann

Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg i. Br., Albertstr. 21, D-7800 Freiburg

Z. Naturforsch. **37 c**, 413–427 (1982); received February 26, 1982

Dye Binding to DNA, Intercalation, External Binding, Binding Constants, Binding Enthalpies, Binding Entropies, Acriflavine, Tetramethylacriflavine, Acridine Orange

The binding of the dye cations acriflavine AF, tetramethylacriflavine TMAF and acridine orange AO (scheme of structures) to calf thymus DNA has been investigated by means of absorption spectroscopy, Table I. In order to avoid dye association we used very low dye concentrations and sufficiently high DNA concentrations. In this case we got linear Scatchard isotherms. The formal Scatchard binding constant K strongly depends on the salt concentration C_S ($S = \text{NaCl}$) of the solution and the temperature T (278–303 K), $K(C_S, T)$. The average value of binding sites per mononucleotide is $n = 0.17$. It is independent of the dye species and of C_S and T .

The value of r (bound dye cations per mononucleotide) diminishes with growing salt concentration C_S ($C_S \gtrsim 1 \text{ M}$). At sufficiently high salt concentrations r is approximately constant ($C_S \gtrsim 1 \text{ M}$). Obviously there are two types of binding of the dye cations to DNA even in the domain of linear Scatchard isotherms. They can be distinguished experimentally with the competitive salt effect. To describe $r(C_S, T)$ or $K(C_S, T)$ we used a simple model with three equilibria: 1. Non-competitive binding 1 (intercalation) of dye cations to n_1 C_N binding sites (C_N = concentration of mononucleotides), equilibrium constant K_1 . 2. Competitive binding 2 (external binding) of dye cations to n_2 C_N binding sites, equilibrium constant K_2 . In contrast to type 1 binding, the dye cations in type 2 binding can be replaced by metal cations M of S ($M = \text{Na}^+$) at sufficiently high salt concentrations C_S . 3. Competitive binding 3 of M to the same sites of 2 and the dye cations as competitor, equilibrium constant K_3 . The model agrees very well with the experiments on the condition $n_1 = n_2 = n$. Therefore the dye can be bound to one of the n C_N binding sites either non-competitively or competitively. Type 1 and type 2 binding exclude one another at the same binding site in the domain of linear Scatchard plots.

The binding constants K_i ($i = 1, 2, 3$) have been determined by means of the competitive salt effect, Table II. They only are T dependent. From $K(T)_i$ we got the binding enthalpies ΔH_i^0 and binding entropies ΔS_i^0 , Table III.

AF and AO cations are bound non-competitively and competitively, TMAF only competitively. In comparison with AF or AO the competitive binding of TMAF is much weaker.

In the case of AF and AO K_1 is approximately one power of ten smaller than K_2 , $K_1 \ll K_2$! The binding enthalpies of the non-competitive and the competitive binding are nearly equal, $\Delta H_1^0 \cong \Delta H_2^0$. Therefore the difference in the binding constants K_1 , K_2 can be attributed to the difference in the binding entropies, $\Delta S_1^0 \ll \Delta S_2^0$. Thermodynamically type 2 binding (external binding) is preferred to type 1 binding (intercalation).

The binding enthalpy of Na^+ to DNA is in all cases nearly zero, $\Delta H_3^0 \cong 0$. Only the increase of entropy $S_3^0 > 0$ enables binding 3.

From the thermodynamic data follows that type 1 and type 2 binding of AF and AO are produced by electrostatic and hydrophobic interaction which are intensified by hydrogen bonding. In contrast to this the weaker competitive binding of TMAF is caused by electrostatic and hydrophobic interaction only. Our investigations agree with former works on ethidium bromide E and tetramethylethidium bromide TME (scheme of structures, Tables II and III). They are consistent with the assignment non-competitive binding = intercalation, competitive binding = external binding.

Einleitung

Zahlreiche Arbeiten sind der Bindung kationischer Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder Aminoacridine an DNA gewidmet [1, 2]. Zwei Bindungstypen werden unterschieden: 1. Intercalation von ebenen Molekülen zwischen die Basenpaare der DNA und 2. externe Bindung von Farbstoffkationen an die anionischen Bindungspositionen der Nucleinsäure. 1 hängt viel weniger von der Ionenstärke der Lösung ab als 2. Man nimmt deshalb an, daß 1 vorzugsweise auf hydrophobe, 2 auf elektrostatische Wechselwirkung zurückzuführen ist.

In der Regel geht man davon aus, daß die intercalative Bindung einen größeren Beitrag zur Bindungsstärke liefert als die externe Bindung. Die Bindungsstärke ergibt sich im einfachsten Fall aus dem Anstieg von Scatchard-Bindungsisothermen [3]. Der lineare, steile Ast wird deshalb den intercalierten, der gekrümmte Bereich bei hoher Farbstoffbelegung der DNA den extern gebundenen Molekülen zugeordnet [1, 2].

Gekrümmte Scatchard-Isothermen können aber viele Ursachen haben. Unterschiede in der Affinität zwischen gebundenen Molekülen und Bindungspositionen, die Wechselwirkung zwischen gebundenen Molekülen und die Bindung von Molekülen an mehrere Bindungspositionen werden diskutiert [1, 4–13]. Auch experimentelle Fehler können leicht Abweichungen von der Linearität der Bindungsisothermen vortäuschen. Die Vielzahl der Modelle und Deutungen zeigt, daß es schwierig ist, gekrümmte Scatchard-Isothermen eindeutig zu interpretieren. Die früher übliche Zuordnung Intercalation = starke Bindung, externe Bindung = schwache Bindung ist keineswegs zwingend.

Die Intercalation als möglicher Bindungstyp wurde bei Ethidiumbromid durch die Röntgenstrukturanalyse von Sobell *et al.* bewiesen [14–16]. Bemerkenswert ist darüber hinaus das Ergebnis einer anderen Röntgenstrukturanalyse, die Liebman *et al.* [17] an einem Ethidium-tRNA-Komplex ausführten. Die Farbstoffkationen waren hier extern gebunden, obwohl Intercalation in doppelhelicale Bereiche der verwendeten tRNA im Prinzip möglich gewesen wäre und auch erwartet wurde. Dieses überraschende Ergebnis hat Gewicht, weil Liebman *et al.* natürliche hochmolekulare tRNA einsetzten, während Sobell *et al.* eine künstliche, auf zwei Basenpaare extrem verkürzte Doppelhelix verwen-

deten. Es ist schwer abzuschätzen, wie weit Ergebnisse an einem niedermolekularen System, noch dazu im kristallinen Zustand, auf hochmolekulare natürliche DNA übertragbar sind. Beide Strukturuntersuchungen haben aber gezeigt, daß Intercalationen und externe Bindung mögliche Bindungstypen sind. Welcher Bindungstyp realisiert wird und welcher der stärkere ist, kann jedoch nicht ohne weiteres vorausgesagt werden.

Die Diskussion von zwei Bindungstypen verschiedener Stärke ist nur sinnvoll, wenn sich beide Bindungen experimentell unterscheiden lassen und ihre Stärke quantitativ gemessen werden kann. Als Maß für die Bindungsstärke dient in der Regel die Bindungskonstante K . Besser geeignet wären die Standardbindungsenthalpie ΔH° und Entropie ΔS° . Sie sind die physikalisch relevanten Größen. In der Literatur findet man zu diesem Thema – sehr zu unrecht – kaum vertiefende Arbeiten.

Kürzlich haben wir gezeigt, daß sich bereits im linearen Bereich von Scatchard-Isothermen zwei Bindungstypen 1 und 2 aufgrund des kompetitiven Salzeffekts unterscheiden lassen [18]. Ethidiumkationen werden aus der Bindung 2 (kompetitive Bindung) an DNA durch Salze wie NaCl, KCl, $MgCl_2$ verdrängt, nicht jedoch aus 1 (nicht-kompetitive Bindung). Es ist naheliegend anzunehmen, daß die nicht-kompetitiv gebundenen Moleküle 1 intercalieren, während die kompetitiv gebundenen Moleküle 2 einen elektrostatischen Wechselwirkungsterm aufweisen und extern gebunden sind. Diese Zuordnung wird durch polarisationsoptische, mikrospektrophotometrische Untersuchungen an hochorientierten Ethidium-DNA-Fäden gestützt, die aufgrund der Präparationstechnik nur Moleküle vom Typ 1 enthielten [19]. Aus den experimentellen Werten ergibt sich für den Grenzfall vollständiger Orientierung nach Korrektur auf Doppelbrechung ein dichroitisches Verhältnis $R_0 = 0,0$, das den Erwartungen für intercalierte Moleküle nach Lerman [1, 2, 20] entspricht (Achse der Doppelhelix steht senkrecht auf Ebene des Farbstoffheterocyclus).

Die Bindungsverhältnisse lassen sich in guter Näherung mit einem einfachen Gleichgewichtsmodell quantitativ beschreiben [18]. Am System Ethidiumbromid-Kalbsthymus DNA wurde gefunden, daß die Bindungskonstante $K_1 = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ für die nicht-kompetitive Bindung 1 (Intercalation) um mehr als eine Zehnerpotenz kleiner ist als die Bindungskonstante $K_2 = 5,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für die competi-

tive (externe) Bindung 2. Beide Bindungen haben innerhalb der Fehlergrenzen gleiche Bindungsenthalpien: $\Delta H_1^0 = -28$, $\Delta H_2^0 = -27$ kJ mol⁻¹. Sie unterscheiden sich aber stark in den Bindungsentropien: $\Delta S_1^0 = -20$, $\Delta S_2^0 = +18$ J K⁻¹ mol⁻¹. Der Unterschied zwischen K_1 und K_2 ist damit kein enthalpischer, sondern ein entropischer Effekt.

Diese Befunde zeigen, daß – abgesehen vom nicht-linearen Bereich – bereits im linearen Bereich von Scatchard-Isothermen zwei Bindungstypen unterschieden werden können, die mit der üblichen Auffassung Intercalation = starke Bindung, externe Bindung = schwache Bindung nicht im Einklang stehen. Im linearen Bereich verwendet man sehr verdünnte Farbstoff-DNA-Lösungen. Es gilt wenigstens näherungsweise die klassische Gleichgewichtsthermodynamik (siehe Diskussion). Damit sind die Bindungsverhältnisse besser überschaubar als im Bereich gekrümmter Isothermen. Die folgende Untersuchung ist auf den linearen Bereich von Scatchard-Isothermen beschränkt.

Auch bei Derivaten des Ethidiumbromids wurde übereinstimmend $K_1 \ll K_2$ gefunden [21, 22]. Ein Vergleich der Bindungskonstanten ergab, daß sowohl für die nicht-kompetitive Bindung 1 als auch für eine starke kompetitive Bindung 2 positive Ladung und mindestens eine Aminogruppe im Farbstoffmolekül erforderlich sind. Fehlt eine dieser Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen Farbstoff und DNA, so wird die Bindung entweder vollständig unterdrückt oder aber wesentlich geschwächt. Dieser Befund deutet darauf hin, daß an beiden Bindungen sowohl elektrostatische Wechselwirkung als auch Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Röntgenographisch konnten Wasserstoffbrücken bei intercalierten und extern gebundenen Molekülen nachgewiesen werden [14–17].

Bei der Diskussion der Farbstoff-DNA-Bindung sind damit mehrere Energie- und Entropieterme zu berücksichtigen. Entropieterme beschreiben maßgeblich die hydrophobe Wechselwirkung. In der Regel ist die hydrophobe Bindung mit einem Entropieanstieg verbunden. Das trifft für die Bindung 2 zwischen Ethidiumkationen und DNA zu, nicht jedoch für 1, obwohl gerade 1 (Intercalation) auf hydrophobe Wechselwirkung zurückgeführt wird [1, 2] (siehe Diskussion).

Die oben beschriebenen Bindungsstudien wurden an Ethidiumbromid und Derivaten ausgeführt, denen das Phenanthridingerüst gemeinsam ist. Diese Sub-

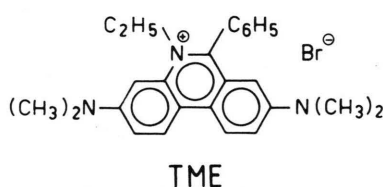
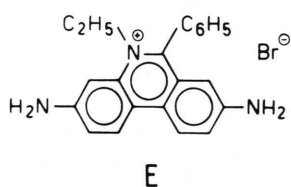
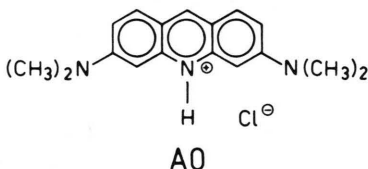
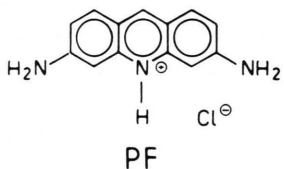
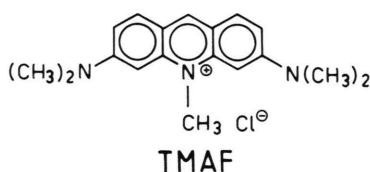
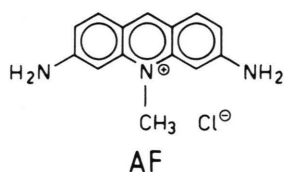
stanzklasse könnte einen Sonderfall darstellen. Deshalb wurden die Untersuchungen jetzt auf Aminoacridine ausgedehnt, die ebenfalls klassische Substanzen zum Studium der Bindung kleiner Moleküle an DNA sind [1, 2]. Drei Substanzen wurden ausgewählt: Acriflavin (AF), Tetramethylacriflavin (TMAF) und Acridinorange (AO).

Die Farbstoffe AF und TMAF enthalten ebenso permanente Farbstoffkationen wie Ethidiumbromid (E) und Tetramethylethidiumbromid (TME), die wir früher untersucht haben [18, 22]. Prototrope Reaktionen bei der Farbstoffbindung [21] sind hier auszuschließen. Deshalb haben wir auch Acriflavin dem häufig verwendeten Proflavin (PF) vorgezogen. Außerdem sind die Ergebnisse für die strukturell verwandten Farbstoffe AF, TMAF einerseits und E, TME andererseits besser vergleichbar.

Acridinorange ist eine starke Base, $pK_a = 10,45$ [23] und liegt bei dem von uns verwendeten pH = 7,7 ebenfalls als Kation vor. Es ist einer der wenigen Farbstoffe, der Kern und Chromosomen lebender Zellen fluorochromiert [1, 24]. Wir haben deshalb seine Bindung an DNA untersucht.

Über die Bindungsgeometrie von AF-DNA und TMAF-DNA liegen bisher keine Röntgenstrukturuntersuchungen vor. Demgegenüber gibt es Arbeiten zur Geometrie der strukturell verwandten Systeme PF-DNA [25–27] und AO-DNA [26, 28]. Die Röntgenstrukturuntersuchungen wurden wieder an kristallinen Komplexen aus Farbstoff und einer Miniaturdoppelhelix mit zwei Basenpaaren durchgeführt. Alle Arbeiten belegen die Intercalation. Während an der Bindung von PF Wasserstoffbrücken zwischen Aminogruppe(n) und Phosphodiesterrest(en) beteiligt sind, konnten bei AO keine Brückenbindungen – auch nicht zwischen Immoniumgruppe und Wassermolekülen im Kristallgitter – nachgewiesen werden. Neben intercalierten Molekülen findet man im Kristall auch nicht-intercalierten Farbstoff. Seine Bindungsgeometrie wird durch die Minimalisierung der Gitterenergie und die Bedingung der Elektroneutralität des Kristalls bestimmt. Sie kann nicht als Modell für extern gebundene Moleküle in Lösung dienen.

Die Untersuchung der Bindungsisothermen von Aminoacridinen in wäßrigem Medium wird – im Gegensatz zu Ethidiumderivaten – durch Farbstoffassoziation stark beeinträchtigt. Das gilt insbesondere für AO [23, 29–32] und TMAF [33]. Um die Farbstoffassoziation in Lösung und auf der DNA



vernachlässigen zu können, ist man genötigt, mit sehr verdünnten Farbstofflösungen bei hinreichendem DNA-Überschuß zu arbeiten, entsprechend den Bedingungen für den linearen Bereich von Scatchard-Isothermen.

Über die Bindung von AF [34–40], TMAF [35] und AO [1, 5, 35, 38, 41–50] an DNA gibt es zahlreiche Arbeiten, von denen eine Auswahl zitiert wurde, die den Zugang zur Originalliteratur eröffnet. In keiner der Untersuchungen wird der kompetitive Salzeffekt detailliert behandelt. Zwar findet man den Hinweis, daß die Farbstoffmoleküle bei großer Ionenstärke (0.1 M) nur intercalieren, bei kleiner Ionenstärke (0.001 M) dagegen nebeneinander intercalativ und extern gebunden werden. Aber erst die Quantifizierung des Effekts ermöglicht es, die Bindungskonstanten K_1 und K_2 getrennt zu bestimmen und die Eigenschaften beider Bindungen unabhängig zu diskutieren.

Materialien und Methoden

1. Experimentelles

Acriflavin wurde von der Fa. Serva bezogen. Das käufliche Produkt ist mit Proflavin stark verunreinigt. Reinigung des Rohprodukts erfolgte nach einer Vorschrift von Galliot [51]. Anschließend wurde das

Farbstoffchlorid umkristallisiert und auf Silicagel chromatographiert, Laufmittel Chloroform/Ethanol/Eisessig = 12:8:1.

Acridinorange wurde von der Fa. Merck bezogen. Zur Reinigung wurde aus der Base mit HBF_4 das Salz hergestellt, aus Methanol umkristallisiert, mit conc. HCl in das Hydrochlorid umgewandelt und anschließend auf Al_2O_3 (sauer) chromatographiert, Laufmittel Ethanol.

Tetramethylacriflavin haben wir nach einer modifizierten Vorschrift von Ullmann und Maric [52] durch Methylieren von Acridinorange mit Dimethylsulfat dargestellt. Statt dessen kann auch Acriflavin mit Methyljodid oder Trimethylphosphat methyliert werden. Die Reinigung erfolgte über das Tetrafluoroborat, das anschließend mit conc. HCl in das Farbstoffchlorid umgewandelt und auf Silicagel chromatographiert wurde, Laufmittel Chloroform/Ethanol/Eisessig = 12:8:1.

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich dünn-schichtchromatographisch einheitliche Farbstoffchloride eingesetzt, deren Elementaranalyse mit der Summenformel übereinstimmte.

Kalbthymus-DNA wurde von der Fa. Worthington bezogen. Der Proteingehalt nach Lowry *et al.* [53] war kleiner als 0,1%. Die Menge eingesetzter DNA haben wir nach Eibl und Lands [54] bestimmt. In Tris-HCl-Puffer, pH = 7,7, betrug der molare

Extinktionskoeffizient bei 260 nm $\varepsilon_N = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Alle Isothermen wurden in Tris-HCl-Puffer (0,041 M Tris + 1×10^{-3} M Na_2EDTA) bei pH = 7,7 gemessen. Bestimmung des pH-Werts erfolgte mit einem pH-Meter der Fa. Knick und einer Einstabmeßzelle HA 405-60 der Fa. Ingold.

Das Gleichgewicht zwischen freiem und an DNA gebundenen Farbstoff wurde absorptionspektroskopisch mit einem Spektrometer 555 der Fa. Perkin Elmer bestimmt. Die Temperaturmessung erfolgte in der Küvette mit einer Siliciumdiode bei digitaler Anzeige auf $\pm 0,2$ K.

2. Bindungsisothermen

Zur Bestimmung der Konzentrationen des freien (f) und des an Nucleinsäure (N) gebundenen (b) Farbstoffs (F) C_{Ff} und C_{Fb} , müssen die molaren Extinktionskoeffizienten ε_f , ε_b bei einer geeignet gewählten analytischen Wellenzahl $\tilde{\nu}_a$ bekannt sein. Bei unseren Untersuchungen entsprach $\tilde{\nu}_a$ dem Maximum der längstwelligsten Absorptionsbande des freien Farbstoffs, das durch die Eigenabsorption der Nucleinsäure in diesem Spektralbereich nicht verfälscht wird.

ε_f ist bei analysenreinen Substanzen aus Messungen bei Konzentrationen zugänglich, für die das Lambert-Beersche Gesetz gilt. Bei Substanzen, die in wässrigem Medium assoziieren, ergibt sich ε_f als Grenzwert für verschwindende Farbstoffkonzentration, $C_{\text{F}} \rightarrow 0$.

Stark assoziierende Verbindungen wie AO und TMAF liegen auch in sehr verdünnter Lösung in der Regel nicht vollständig in monomerer Form vor. Reste von Assoziaten erniedrigen dann die Extinktion der Farbstoffbande der Monomeren. In diesem Fall empfiehlt es sich, das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Assoziaten in einem Bereich zu verfolgen, der spektroskopisch leicht zugänglich ist, die Gleichgewichtskonstante zu bestimmen und ε_f rechnerisch zu ermitteln. Dieses ε_f ist in der Regel größer als solche, die aus sehr verdünnten Lösungen bestimmt wurden. Bei assoziierenden Substanzen gilt deshalb die Faustregel, daß der höchste Extinktionskoeffizient im allgemeinen auch der beste ist.

Für die stark assoziierenden Substanzen AO und TMAF wurde ε_f bereits bestimmt. Die in Tab. I aufgeführten Daten sind die höchsten Literaturwerte [32, 33]. Für das weniger assoziierende AF haben wir ε_f neu ermittelt. Der aufgeführte Wert ist

Tab. I. Analytische Wellenzahl $\tilde{\nu}_a$ [cm^{-1}], molare dekadische Extinktionskoeffizienten von freiem und gebundenem Farbstoff ε_f , ε_b [$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$] bei $\tilde{\nu}_a$, Farbstoffkonzentration C_{F} [10^{-6} M], $T = 298$ K, pH = 7,7.

Substanz	$\tilde{\nu}_a$	ε_f	ε_b	C_{F}
AF	22 150	5,08	3,00	15,1
TMAF	20 200	6,75 [33]; (4,10)	3,34; (2,92)	8,43
AO	20 300	6,58 [32]; (5,60)	3,45; (3,18)	4,52

höher als der einzige uns bekannte Literaturwert [34].

ε_b ergibt sich als Grenzwert bei hoher Nucleinsäurekonzentration, $C_{\text{N}} \rightarrow \infty$. Unter den üblichen Versuchsbedingungen kann dieser Grenzwert nur näherungsweise erreicht werden. Zur Bestimmung von ε_b empfiehlt sich deshalb ein Extrapolationsverfahren, das von Benesi und Hildebrand [55] angegeben und an unser Problem adaptiert wurde [18]. Für das Gleichgewicht zwischen freien und an DNA gebundenen Farbstoffmolekülen



gilt im linearen Bereich von Scatchard-Isothermen das Massenwirkungsgesetz (MWG):

$$K = C_{\text{Fb}} / (n C_{\text{N}} - C_{\text{Fb}}) C_{\text{Ff}} \quad (2)$$

Im folgenden wird die DNA-Konzentration auf Mononucleotideinheiten (Phosphatgehalt) bezogen. n bedeutet den Bruchteil eingesetzter Mononucleotide, die zur Bindung von Farbstoffmolekülen befähigt sind, $0 < n < 1$. Mit $r = C_{\text{Fb}} / C_{\text{N}}$ (Konzentration gebundener Farbstoffmoleküle pro Mononucleotideinheit) erhält man [3]:

$$r / C_{\text{Ff}} = K(n - r) \quad (3)$$

Trägt man r / C_{Ff} über r auf (Scatchard-plot), so erhält man im Bereich der Gültigkeit des MWG eine abfallende Gerade, deren Anstieg und extrapolierte Abszissenabschnitt K und n ergeben.

Aus der totalen Farbstoffkonzentration $C_{\text{F}} = C_{\text{Ff}} + C_{\text{Fb}}$ und dem gemessenen Extinktionskoeffizienten ε der Mischung bei $\tilde{\nu}_a$, $\varepsilon C_{\text{F}} = \varepsilon_f C_{\text{Ff}} + \varepsilon_b C_{\text{Fb}}$ lassen sich C_{Ff} und C_{Fb} bestimmen, wenn ε_f und ε_b bekannt sind. Für großen Überschuß an Nucleotid, $C_{\text{N}} \gg C_{\text{F}}$, gilt näherungsweise $n C_{\text{N}} - C_{\text{Fb}} = n C_{\text{N}} - C_{\text{F}}$. Gl. (2) geht dann über in:

$$1/(\varepsilon_f - \varepsilon) = \{1/K(n C_{\text{N}} - C_{\text{F}}) (\varepsilon_f - \varepsilon_b)\} + \{1/(\varepsilon_f - \varepsilon_b)\} \quad (4)$$

Trägt man $1/(\varepsilon_f - \varepsilon)$ über $1/(n C_N - C_F)$ auf, so erhält man für hinreichend große C_N eine Gerade mit dem auf $C_N \rightarrow \infty$ extrapolierten Ordinatenabschnitt $1/(\varepsilon_f - \varepsilon_b)$, aus dem ε_b bei bekanntem ε_f bestimmt werden kann.

Die Unbekannten ε_b , K und n sind mit einem iterativen Verfahren gleichzeitig zugänglich. Zunächst wird ε_b in nullter Näherung bei großen C_N spektroskopisch bestimmt. Mit Gl. (3) erhält man K und n in nullter Näherung. Einsetzen in Gl. (4) ergibt ε_b in erster Näherung. Daraus folgt mit Gl. (3) K und n in erster Näherung, usw. Das Verfahren wird bis zur Selbstkonsistenz von ε_b , K und n fortgeführt. Die für AF, TMAF und AO ermittelten Werte von ε_b sind in Tab. I wiedergegeben.

Wegen der Assoziationstendenz der Aminoacridine sollte bei der Messung der Bindungsisothermen mit möglichst verdünnten Farbstofflösungen gearbeitet werden. Dann sind aber die beobachteten Extinktionsänderungen bei der Farbstoffbindung sehr klein und die Bindungsisothermen entsprechend ungenau. Um die Streuung der Meßwerte in Grenzen zu halten, haben wir deshalb als Kompromiß etwas erhöhte Farbstoffkonzentrationen verwendet, bei denen die Farbstoffmoleküle bereits in DNA-freier Lösung teilweise assoziiert sind. C_F und die zugehörigen ε_f (in Klammern) sind zum Vergleich ebenfalls in Tab. I aufgeführt. Trotzdem ist es auch unter diesen Versuchsbedingungen möglich, daß Gleichgewicht korrekt zu erfassen. Die Bindungskonstante K und der Parameter n ergeben sich formal aus Anstieg und Abszissenabschnitt der Tangente an die Scatchard-Isotherme im Bereich großen DNA-Überschusses, $C_N \gg C_F$, $r = C_{Fb}/C_N \rightarrow 0$. Dann ist der überwiegende Teil des eingesetzten Farbstoffs gebunden, die Gleichgewichtskonzentration des freien Farbstoffs in Lösung ist sehr klein und die nicht gebundenen Moleküle liegen praktisch nur noch als Monomere vor. Dieser Bereich der Scatchard-Isothermen ist linear und durch einen isobestischen Punkt in den Absorptionsspektren der Farbstoff-DNA-Lösungen gekennzeichnet, der das Gleichgewicht zwischen monomer gebundenen und monomeren freien Farbstoffmolekülen belegt. Bei unseren Experimenten haben wir das Verhältnis C_F/C_N etwa zwischen 0,03 und 3,0 variiert. Der Auswertung wurden nur diejenigen Spektren zugrunde gelegt, die durch einen isobestischen Punkt charakterisiert sind und zum linearen Bereich der Scatchard-Isothermen gehören.

Um eine Vorstellung vom Fehler in den Bindungsparametern zu gewinnen, die durch Ungenauigkeiten in der Bestimmung von ε_f und ε_b entstehen, haben wir als Extremfall die Auswertung ebenfalls mit den in Klammern in Tab. I angegebenen Werten durchgeführt, die durch Assoziation verfälscht sind. Die Bindungsparameter ändern sich nur innerhalb der Fehlerbreite, Größenordnung und Gang bleiben erhalten.

Die molaren Extinktionskoeffizienten ε_f und ε_b sind innerhalb der experimentellen Fehlerbreite von der Kompetitorkonzentration C_S ($S = \text{NaCl}$), $0 \leq C_S \leq 1 \text{ M}$, und der Temperatur $278 \text{ K} \leq T \leq 308 \text{ K}$, unabhängig.

Mit dem unten besprochenen Gleichgewichtsmodell können aus K die Bindungskonstanten K_i , Bindungsenthalpien ΔH_i^0 und Bindungsentropien ΔS_i^0 ($i = 1, 2, 3$) für die nicht-kompetitive und die kompetitive Bindung bestimmt werden. Die Fehlerbreite ist für diese Bindungsparameter aus den genannten experimentellen Gründen relativ groß. Sie läßt sich für die K_i , Tab. II, und die ΔH_i^0 , Tab. III, zu etwa $\pm 20\%$, für die weniger gut zugänglichen ΔS_i^0 , Tab. III, zu etwa $\pm 30\%$ abschätzen. Die Fehlerbreite von n beträgt ca. $\pm 5\%$. Die Daten für AF sind genauer als für AO und TMAF.

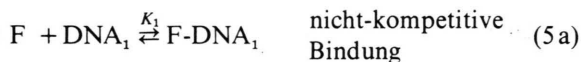
3. Gleichgewichtsmodell

Bei verdünnten AF-, TMAF- und AO-Lösungen beobachtet man bei hinreichendem DNA-Überschuß lineare Scatchard-Isothermen. Damit gilt formal das MWG. Die Gleichgewichtskonstante hängt aber nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Art S und der Konzentration C_S von Salzen in der F-DNA-Lösung ab, $K = K(C_S, T)$. Demgegenüber ist n von S , C_S und T unabhängig und stellt eine Größe dar, die für das Biopolymere und den Farbstoff charakteristisch ist [18]. K beschreibt das Gleichgewicht zwischen F und DNA nur formal und muß auf C_S erweitert werden.

Ein möglicher Ansatz ergibt sich aus der Beobachtung, daß r mit steigendem C_S zunächst rasch abfällt, sich aber dann einem Plateau nähert. Die Farbstoffkationen können durch Salze teilweise, aber nicht vollständig aus ihrer Bindung an DNA verdrängt werden. Es gibt die nicht-kompetitive und die kompetitive Bindung 1 und 2. Bei großem C_S wird F nur nicht-kompetitiv gebunden. Bei kleinem C_S liegen nicht-kompetitiv und kompetitiv gebun-

dene Farbstoffkationen nebeneinander vor. Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Salzen am Ethidium-DNA-System ergaben, daß die Metallkationen M von S der Kompetitor für F sein müssen [18].

Als einfachster Ansatz zur quantitativen Beschreibung des kompetitiven Effekts bietet sich ein Modell mit drei Gleichgewichten an [18]:



Gl. (2) ist jetzt durch drei Gleichungen mit Gleichgewichtskonstanten K_1 , K_2 , K_3 , zu ersetzen, die die nicht-kompetitive Bindung von F an $n_1 C_N$ Bindungspositionen und die kompetitive Bindung von F bzw. M an $n_2 C_N$ Bindungspositionen der DNA beschreiben:

$$K_1 = C_{Fb1}/(n_1 C_N - C_{Fb1}) C_{Ff} \quad (6a)$$

$$K_2 = C_{Fb2}/(n_2 C_N - C_{Fb2} - C_{Mb}) C_{Ff} \quad (6b)$$

$$K_3 = C_{Mb}/(n_2 C_N - C_{Mb} - C_{Fb2}) C_{Mf} \quad (6c)$$

Es bedeuten: $C_F = C_{Fb} + C_{Ff}$, $C_{Fb} = C_{Fb1} + C_{Fb2}$, $C_M = C_{Mf} + C_{Mb}$, $r = r_1 + r_2 = (C_{Fb1} + C_{Fb2})/C_N$.

Nach einigen Umformen erhält man:

$$r = n_1 K_1 C_{Ff}/(1 + K_1 C_{Ff}) + n_2 K_2 C_{Ff}/(1 + K_2 C_{Ff} + K_3 C_{Mf}) \quad (7)$$

Für die Diskussion bringen wir Gl. (7) auf Scatchard-Form:

$$r/C_{Ff} = K_1(n_1 - r) + K_2(n_2 - r)/(1 + K_3 C_{Mf}) + K_1 K_2(n_1 + n_2 - r) C_{Ff}/(1 + K_3 C_{Mf}) \quad (8)$$

Im Bereich hinreichend kleiner C_{Ff} , $C_N \gg C_F$, ist der dritte Term rechts Gl. (8) zu vernachlässigen. Die Scatchard-Isotherme ist linear. Ist n unter den gewählten Versuchsbedingungen unabhängig von S, C_S bzw. C_M , so gilt $n_1 = n_2 = n$. Um den kompetitiven Salzeffekt zu realisieren, muß man bei hohen Kompetitorkonzentrationen C_S bzw. C_M arbeiten. Dann gilt $C_N \ll C_M$ und $C_{Mb} \ll C_{Mf} \cong C_M$. Gl. (8) nimmt jetzt die Form an:

$$r/C_{Ff} = \{K_1 + K_2^*/(1 + K_3 C_M)\} (n - r) \quad (9)$$

Die effektive Bindungskonstante $K_2^* = K_2(1 + G)$ unterscheidet sich für kleine C_{Ff} nur sehr wenig von

K_2 . Die Funktionswerte $G = K_1 C_{Ff}[1 + n/(n-r)]$ sind dann klein gegen 1, und G kann entweder vernachlässigt oder durch seinen Mittelwert \bar{G} ersetzt werden.

Alle Scatchard-Isothermen schneiden sich unabhängig von S, C_S und T bei $r = n$ auf der Abszisse. Vergleich von Gl. (2) mit Gl. (9) ergibt jetzt die C_M -abhängige formale Bindungskonstante:

$$K = K_1 + K_2^*/(1 + K_3 C_M) \quad (10)$$

K_1 , K_2 und K_3 hängen nur noch von T ab. Für den Kompetitor NaCl, der in den folgenden Experimenten verwendet wird, ist $C_M = C_S$.

n , der extrapolierte Schnittpunkt der linearen Scatchard-Isothermen mit der Abszisse r , ist die maximale Farbstoffkonzentration, die im Mittel an eine Mononucleotideinheit DNA aus verdünnter Farbstofflösung gebunden werden kann, $r_{\max} = (C_{Fb}/C_N)_{\max} = n$. n kann in günstigen Fällen noch auf einem zweiten unabhängigen Weg direkt durch Titration von vorgelegtem Farbstoff mit eingestellter DNA-Lösung bei spektroskopischer Endpunkts-induzierung bestimmt werden. Am System Ethidium-DNA wurde früher gezeigt, daß beide Methoden zum gleichen Resultat führen [18]. Der Parameter n gewinnt dadurch an physikalischer Glaubwürdigkeit.

Bei hoher Farbstoffkonzentration C_{Ff} ist G nicht vernachlässigbar und kann auch näherungsweise nicht durch \bar{G} ersetzt werden. Man muß dann mit positiven Abweichungen von der Linearität der Scatchard-Isothermen rechnen, die auch beobachtet werden können. Es ist jedoch schwer zu entscheiden, ob diese Abweichungen nur auf G oder noch auf andere Effekte zurückzuführen sind. Wir haben deshalb unsere Untersuchungen auf den linearen Bereich der Isothermen beschränkt.

Schließlich soll noch das formale Grenzverhalten der Isotherme Gl. (8) für $C_{Ff} \rightarrow \infty$, $C_F \gg C_N$, diskutiert werden. Jetzt dominiert der dritte Term rechts. Erster und zweiter Term sind zu vernachlässigen. Die Isotherme ist nicht mehr linear. Ihr Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt sich formal zu $r = n_1 + n_2$.

Ergebnisse

1. Acriflavin

Titriert man eine sehr verdünnte wäßrige AF-Lösung mit Kalbsthymus-DNA, so beobachtet man

im Absorptionsspektrum eine langwellige Verschiebung der längstwelligsten Bande des Farbstoffs von 22150 auf 21550 cm^{-1} . Gleichzeitig nimmt die Intensität der Bande ab. Ein isosbestischer Punkt bei 21650 cm^{-1} zeigt, daß freier und gebundener monomerer Farbstoff im Gleichgewicht stehen. Banden-

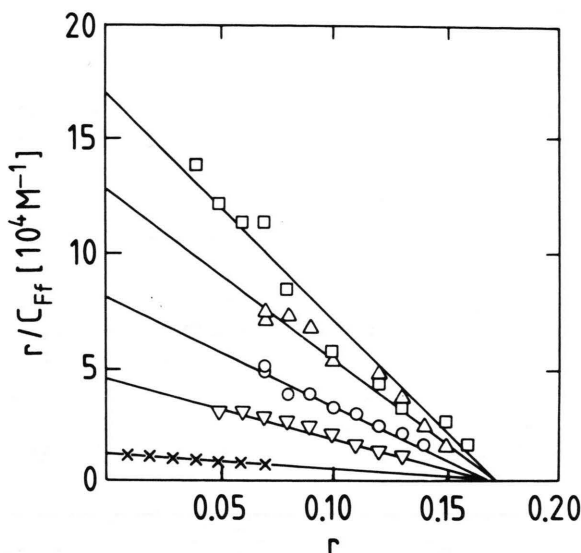


Abb. 1. Scatchard-Isothermen für das System AF/DNA bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen C_S , Tris-Puffer pH = 7,7, $T = 298\text{ K}$; $C_S = 2,0 \times 10^{-3}\text{ M}$ (□), $0,012\text{ M}$ (Δ), $0,052\text{ M}$ (○), $0,10\text{ M}$ (▽), $1,0\text{ M}$ (x).

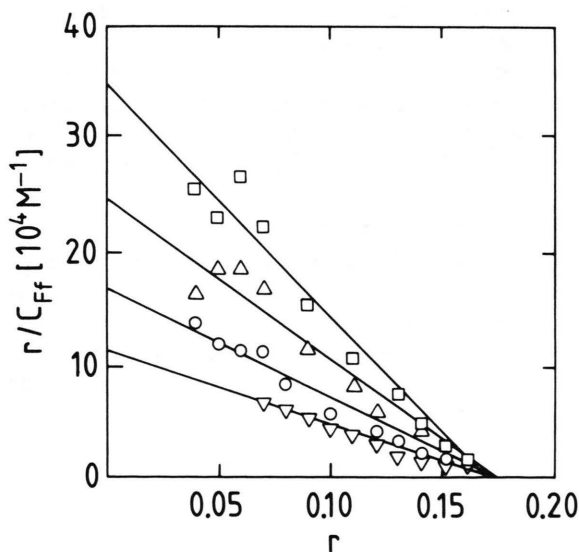


Abb. 2. Scatchard-Isothermen für das System AF/DNA bei verschiedenen Temperaturen, T , Tris-Puffer pH = 7,7, $C_S = 2,0 \times 10^{-3}\text{ M}$; $T = 278\text{ K}$ (□), 288 K (Δ), 298 K (○), 308 K (▽).

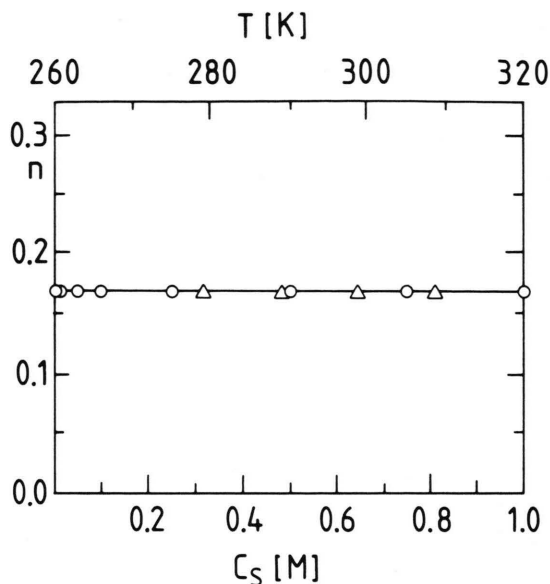


Abb. 3. Maximale Zahl von Bindungspositionen pro Mononucleotideinheit, n , für das System AF/DNA bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen C_S (○) und Temperaturen T (Δ), Tris-Puffer pH = 7,7.

lage und isosbestischer Punkt werden – ebenso wie ε_t und ε_b – durch den Kompetitor NaCl nicht signifikant verändert. Nicht-kompetitiv und kompetitiv gebundene Farbstoffkationen sind absorptionsspektroskopisch ununterscheidbar.

Abb. 1 und 2 zeigen Scatchard-Isothermen für verschiedene Kompetitorkonzentrationen und Temperaturen. Sie sollen beispielhaft die unvermeidliche Streuung der Meßwerte bei kleinen Farbstoffkonzentrationen verdeutlichen. Ausgleichsrechnungen ergeben für alle Isothermen im untersuchten Konzentrationsbereich Gerade, die sich innerhalb der Streubreite unabhängig von C_S und T im gleichen extrapolierten Punkt auf der Abszisse $r = n = 0,17$ schneiden, Abb. 3. Die erste Voraussetzung von Gl. (9) $n_1 = n_2 = n$ ist damit erfüllt.

Die formale Gleichgewichtskonstante K hängt stark von C_S und T ab, Abb. 4. Die in Abb. 4 eingezeichneten Kurven wurden mit Gl. (10) durch Ausgleichsrechnung ermittelt. Angepaßte Parameter sind K_1 , K_2^* , K_3 , die damit bei verschiedenen Temperaturen zugänglich sind. Die Übereinstimmung zwischen berechneten Kurven und experimentellen Werten ist gut. Aus den extrapolierten K -Werten für $C_S \rightarrow 0$ bzw. ∞ ergeben sich $K_1 + K_2^*$ und K_1 , aus der Krümmung der Hyperbel folgt K_3 . Die Gleich-

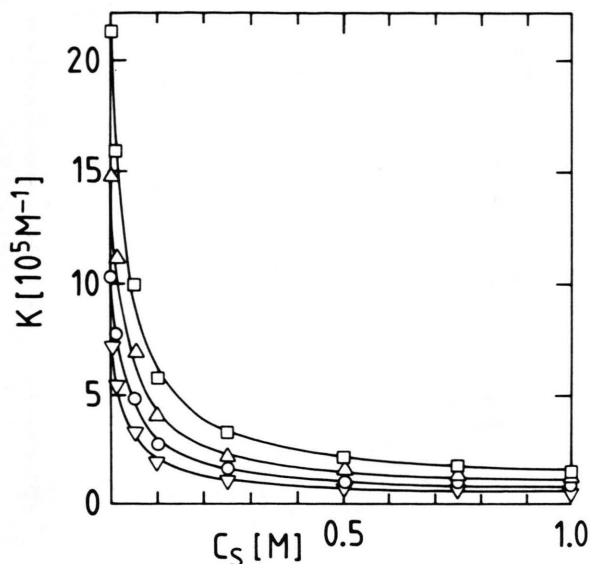


Abb. 4. Abhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungskonstante K für das System AF/DNA von der NaCl-Konzentration C_S und der Temperatur T , Tris-Puffer pH = 7,7; $T = 278$ K (\square), 288 K (\triangle), 298 K (\circ), 308 K (∇); berechnete Kurven Gl. (10), Bindungskonstanten K_1 , K_2 , K_3 für 298 K in Tab. II.

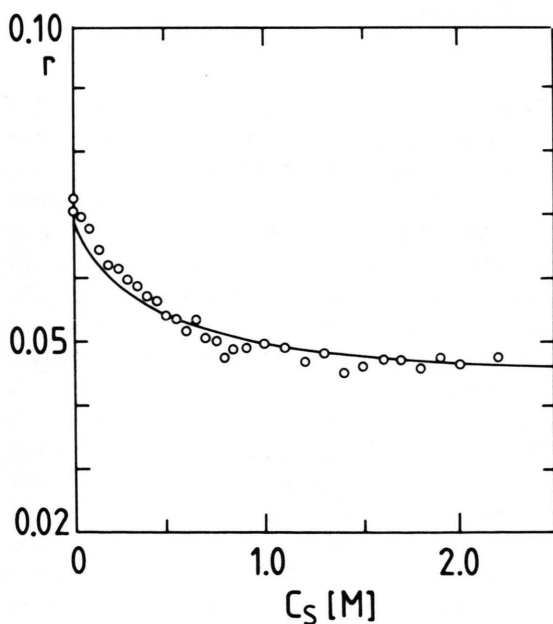


Abb. 5. Zahl gebundener AF-Moleküle pro Mononucleotideneinheit DNA, $r = C_{FB}/C_N$, als Funktion der NaCl-Konzentration C_S , Tris-Puffer pH = 7,7, $T = 298$ K, Farbstoffkonzentration $C_F = 1,4 \times 10^{-5}$ M, Nucleinsäurekonzentration $C_N = 2,0 \times 10^{-4}$ M; berechnete Kurve Gl. (7), optimierte Bindungsparameter: $n = 0,17$, $K_1 = 4,2 \times 10^4$ M $^{-1}$, $K_2 = 1,0 \times 10^6$ M $^{-1}$, $K_3 = 30$ M $^{-1}$. Die iterativ bestimmten Bindungsparameter stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den Parametern der Scatchard-plots Tab. II überein.

gewichtskonstanten für $T = 298$ K sind in Tab. II zusammengestellt. K_1 ist sehr viel kleiner als K_2^* bzw. K_2 . Das folgt auch ohne Rechnung aus Abb. 4. Die Gleichgewichtskonzentration C_{FF} ist unter unseren Versuchsbedingungen sehr klein, $\bar{G} \ll 1$. Innerhalb der Meßgenauigkeit gilt in guter Näherung $K_2^* = K_2$. Damit ist auch die zweite Voraussetzung von Gl. (9) erfüllt.

In unabhängigen Rechnungen haben wir auch aus der C_S -Abhängigkeit von r die Bindungskonstanten K_1 , K_2 , K_3 für $T = 298$ K ermittelt, Abb. 5. Die mit Gl. (7) iterativ bestimmten Werte unterscheiden sich innerhalb der Fehlerbreite nicht von den in Tab. II aufgeführten Konstanten. Damit beschreibt auch Gl. (7) die Experimente zufriedenstellend. Auf geringe systematische Abweichungen bei kleinen C_S gehen wir in der Diskussion ein.

Die Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_i ($i = 1, 2, 3$) folgt der Beziehung von van't Hoff, Abb. 6:

$$\ln K_i = -\Delta H_i^0/RT + \Delta S_i^0/R. \quad (11)$$

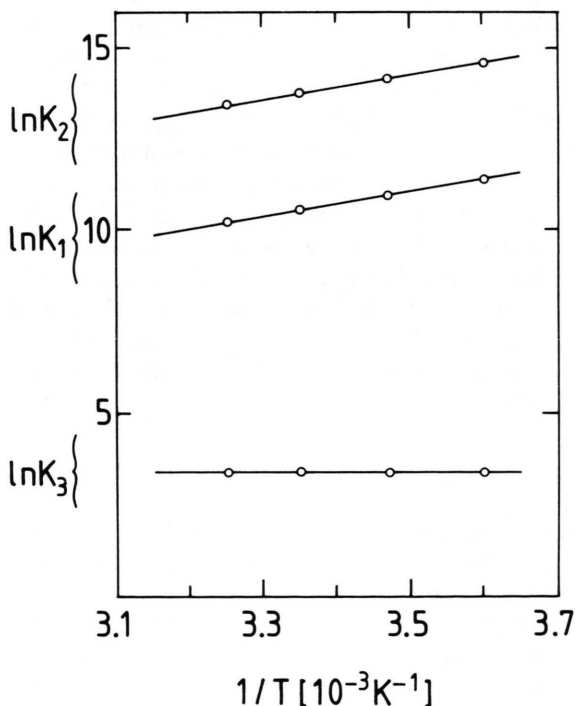


Abb. 6. Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_1 , K_2 , K_3 für das System AF/DNA, Tris-Puffer pH = 7,7; die Bindungskonstanten K_i ($i = 1, 2, 3$) wurden aus den Meßwerten Abb. 4 mit Gl. (10) durch Optimierungsrechnung bestimmt; Kompetitor $S = \text{NaCl}$; Bindungsenthalpien ΔH_i^0 und Bindungsentropien ΔS_i^0 Tab. III.

Das zugängliche Temperaturintervall $T=278-308\text{ K}$ ist wegen der Instabilität der DNA sehr klein. Um die Genauigkeit zu steigern, mußten zahlreiche Messungen durchgeführt werden. Die ermittelten Standardbindungsenthalpien ΔH_i^0 und Entropien ΔS_i^0 sind in Tab. III zusammengefaßt.

2. Acridinorange

Auch bei Titration einer sehr verdünnten wäßrigen AO-Lösung mit Kalbsthymus-DNA wird die Farbbande des AO-Kations langwellig von $20\,300$ nach $19\,900\text{ cm}^{-1}$ verschoben. Gleichzeitig nimmt ihre Intensität ab. Bei $19\,950\text{ cm}^{-1}$ beobachtet man einen isosbestischen Punkt. Freie und gebundene monomere Farbstoffkationen stehen bei genügend hoher DNA-Konzentration miteinander im Gleichgewicht. Ebenso wenig wie bei AF können bei AO nicht-kompetitiv und kompetitiv gebundene monomere Moleküle spektroskopisch unterschieden werden.

Die Scatchard-Isothermen sind im diskutierten Konzentrationsbereich linear. Ausgleichsrechnungen ergeben den extrapolierten Schnittpunkt mit der Abszisse $n = 0,17$, der von C_S und T unabhängig ist. Demgegenüber hängt der Anstieg der Isothermen stark von C_S und T ab. Die Abhängigkeit der formalen Gleichgewichtskonstante K von der NaCl-Konzentration wird bei allen Temperaturen ebenso wie bei AF durch Gl. (10) beschrieben, Abb. 7. Die durch Ausgleichsrechnung für $T = 298\text{ K}$ ermittelten Bindungskonstanten K_1 , $K_2^* = K_2$, K_3 sind in Tab. II zusammengestellt. Aus der Temperaturabhängigkeit der K_i ($i = 1, 2, 3$), Abb. 8, ergeben sich die entsprechenden Bindungsenthalpien und Entropien, Tab. III.

3. Tetramethylacriflavin

Die Bindung von monomerem TMAF an Kalbsthymus-DNA verursacht eine bathochrome Verschiebung der Farbbande von $20\,200$ auf $19\,900\text{ cm}^{-1}$ bei gleichzeitigem hypochromen Effekt. Ein isosbestischer Punkt bei $19\,950\text{ cm}^{-1}$ belegt das Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen monomeren Farbstoffmolekülen. Die spektralen Effekte bei der Farbstoffbindung sind insgesamt kleiner als bei AF und AO. Es war deshalb schwierig, die Bindungskonstanten absorptionsspektroskopisch zu bestimmen.

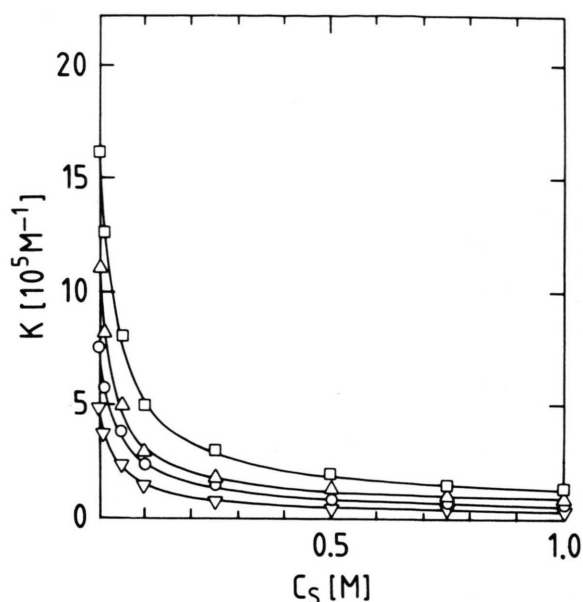


Abb. 7. Abhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungskonstante K für das System AO/DNA von der NaCl-Konzentration C_S und der Temperatur T , Tris-Puffer pH = 7,7; $T = 278\text{ K}$ (\square), 288 K (\triangle), 298 K (\circ), 308 K (∇); berechnete Kurven Gl. (10); Bindungskonstanten K_1 , K_2 , K_3 für 298 K Tab. II.

Ebenso wie bei AF und AO erhält man bei hinreichend hohen DNA-Konzentrationen lineare Scatchard-plots mit dem Abszissenabschnitt $n = 0,17$, der von C_S und T unabhängig ist. Die Abhängigkeit der formalen Bindungskonstante K von der NaCl-Konzentration ist für $T = 298\text{ K}$ in Abb. 9 der iterativ berechneten Kurve gegenübergestellt, Gl. (10), Bindungskonstanten Tab. II. Zum Vergleich sind ebenfalls die Kurven für AF und AO aufgeführt. Man erkennt unmittelbar, daß TMAF wesentlich schwächer gebunden wird als AF und AO.

Der iterativ berechnete Betrag von $K_1 = 4 \times 10^3\text{ M}^{-1}$ ist ca. eine Zehnerpotenz kleiner als bei AF und AO und liegt innerhalb der Fehlerbreite. Damit ist die nicht-kompetitive Bindung von TMAF an DNA gegen die kompetitive Bindung vernachlässigbar und die formale Bindungskonstante ergibt sich zu $K = K_2/(1 + K_3 C_M)$. Der Grenzwert von K für $C_M \rightarrow 0$ beträgt $K = K_2$. Um einen möglichst großen Meßeffect zu erzielen, wurde die Temperaturabhängigkeit von K_2 bei der sehr kleinen Na^+ -Konzentration $C_M = 2 \times 10^{-3}\text{ M}$ bestimmt, die durch den Na_2EDTA -Zusatz gegeben ist, Abb. 8. Damit sind ΔH_2^0 und ΔS_2^0 für TMAF näherungsweise zugäng-

lich. Wegen der kleinen Meßeffekte konnten ΔH_3^0 und ΔS_3^0 aus der Temperaturabhängigkeit von K_3 nicht bestimmt werden.

Diskussion

Das Gleichgewichtsmodell beschreibt die Bindungsverhältnisse bei den genannten Acridinderivaten im Bereich kleiner r zufriedenstellend. Ebenso wie bei den früher untersuchten Ethidiumderivaten findet man lineare Scatchard-Isothermen, deren Anstieg von der Kompetitorkonzentration abhängt. Nicht-kompetitive und kompetitive Farbstoffbindung liegen nebeneinander vor. Aus der C_S -Abhängigkeit von K können die Bindungskonstanten K_1 , K_2 , K_3 experimentell bestimmt werden.

Wegen der hohen negativen Überschußladung der DNA würde man erwarten, daß die Konzentration von F- und M-Kationen in der Umgebung des Polyanions höher ist als im Volumen der Lösung.

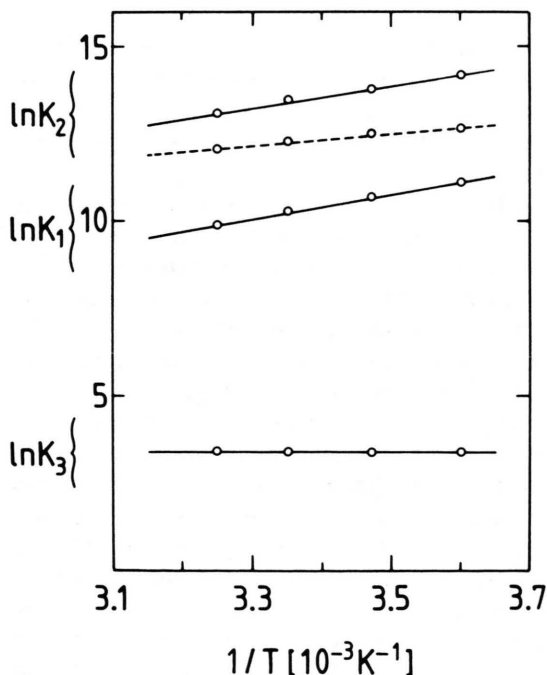


Abb. 8. Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_1 , K_2 , K_3 für das System (AO/DNA (ausgezogene Kurven), Tris-Puffer pH = 7,7, Kompetitor $S = \text{NaCl}$; Bindungsenthalpien ΔH_i^0 und Bindungsentropien ΔS_i^0 ($i = 1, 2, 3$) Tab. III. Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstante K_2 für das System TMAF/DNA (gestrichelte Kurve), Tris-Puffer pH = 7,7; Bindungsenthalpie ΔH_2^0 und Bindungsentropie ΔS_2^0 Tab. III.

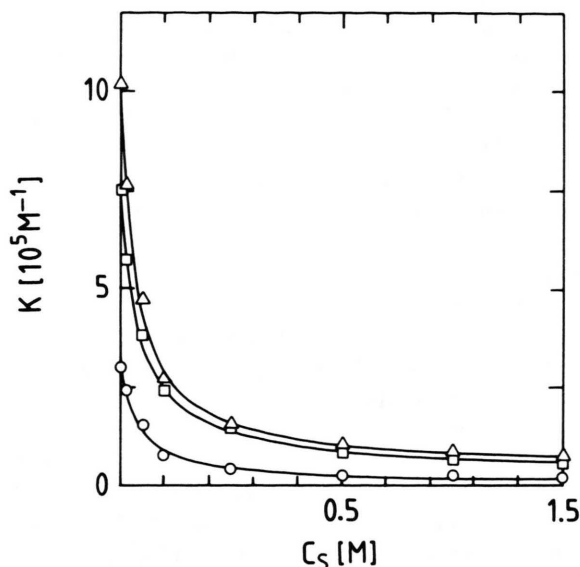


Abb. 9 Abhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungskonstante K für die Systeme TMAF/DNA (\circ), AF/DNA (Δ), AO/DNA (\square) von der NaCl-Konzentration C_S , Tris-Puffer pH = 7,7, $T = 298 \text{ K}$; berechnete Kurven Gl. (10); Bindungskonstanten Tab. II.

Dann sollten bei der kompetitiven Farbstoffbindung drastische Abweichungen vom MWG auftreten, die aber in dem von uns untersuchten großen C_M -Intervall nicht beobachtet wurden. Offenbar ist unter unseren Versuchsbedingungen, $C_M \gg C_N$, die Nucleinsäure mit gebundenen Kompetitorkationen M weitgehend gesättigt und die Wolke der Gegenionen um die DNA abgebaut. Bei der kompetitiven Farbstoffbindung wird dann lediglich M durch F ersetzt, eine Substitution, die dem MWG folgt und formal durch Gl. (6b) und (6c) beschrieben wird. Bei kleinen C_M ist dagegen die Ladungskompensation unvollständig, und man findet eine geringe positive Abweichung von $r = r(C_M)$, Abb. 5.

Der Bruchteil $n = 0,17$ der zur Bindung befähigten Mononucleotide ist für AF, TMAF und AO gleich. Er entspricht etwa $n = 1/6 = 0,167$. Im Grenzfall entfallen im Mittel auf ein gebundenes Farbstoffkation ca. sechs Mononucleotideinheiten oder drei Basenpaare. Das gilt sowohl für nicht-kompetitiv als auch für kompetitiv gebundene Farbstoffmoleküle, da n von C_M bzw. C_S unabhängig ist und damit vom Verhältnis

$$r_1/r_2 = (K_1/K_2) (1 + K_2 C_{Ft} + K_3 C_M) / (1 + K_1 C_{Ft}) \approx (K_1/K_2) (1 + K_3 C_M) \quad (12)$$

Gl. (12) unten gilt für $C_{Ft} \rightarrow 0$ bzw. $C_F \rightarrow 0$.

Auch nach dem nearest-neighbour-exclusion-Modell von Crothers [8] erhält man für den Grenzfall verschwindender Kooperativität bei kleinen r (linearer Scatchard-Bereich) $n = 1/6$ [18]. Es werden dann – im Widerspruch zum Namen des Modells – nicht nur die Nachbarbindungspositionen um ein gebundenes Farbstoffkation von weiteren Bindungen ausgeschlossen, sondern auch die übernächsten Positionen.

Bei allen von uns untersuchten Acridin- und Ethidiumderivaten, die zur Bindung 1 und 2 befähigt sind, gilt in guter Näherung $n_1 = n_2 = n$. Danach kann ein Farbstoffmolekül an eine der $n C_N$ Bindungspositionen der DNA entweder nicht-kompetitiv oder kompetitiv gebunden werden. Die Bindungen 1 und 2 schließen sich am gleichen Ort gegenseitig aus. Wird eine der beiden Bindungen realisiert, so verändert sich die Bindungsposition, und die alternative Bindung kann nicht mehr eingegangen werden. Unter der Bindungsposition muß man sich einen räumlich ausgedehnten DNA-Abschnitt vorstellen, der drei Basenpaare und die zugehörigen Phosphodiester- und Desoxyribosereste umfaßt. Der elektrostatische Bindungsanteil zwischen F und DNA erstreckt sich dann auch nur auf die Coulombwechselwirkung zwischen Farbstoff und den anionischen Phosphodiesterresten dieses Abschnitts. Die Wechselwirkung von F mit weiter entfernten DNA-Abschnitten ist im linearen Scatchard-Bereich vernachlässigbar.

In Tab. II sind die Bindungskonstanten K_1 , $K_2^* = K_2$ und K_3 von AF, TMAF und AO für 298 K zusammengestellt. Zum Vergleich wurden ebenfalls die Konstanten von E und TME aufgeführt. Zunächst fällt auf, daß K_3 für AF, TMAF, AO und ebenso für E, TME und die anderen, früher untersuchten Ethidiumderivate [18, 21, 22] innerhalb der Fehlergrenzen den gleichen Betrag hat, obwohl sich

die Farbstoffe in den Bindungskonstanten K_1 und K_2 teilweise erheblich unterscheiden. Dieser Befund belegt das Gleichgewichtsmodell, nach dem die Gleichgewichte (5a–c) näherungsweise unabhängig voneinander sind.

Die von uns ermittelten Werte für $K_3 = 22 - 30 \text{ M}^{-1}$ korrespondieren gut zur Bindungskonstante $K = 36 \text{ M}^{-1}$ von Na^+ und DNA, die Ross und Scuggs [56] aus der elektrophoretischen Beweglichkeit von DNA, $C_N = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$, bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen, $C_S = 0,01 - 0,03 \text{ M}$, mit Hilfe des MWG bestimmt haben. Die Gesamtionenstärke wurde bei diesen Experimenten durch Zusatz von Tetramethylammoniumchlorid zur Meßlösung auf $0,2 \text{ M}$ eingestellt. Im Gegensatz zu Na^+ wird $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ nur sehr schlecht an DNA gebunden. Die im Vergleich zu C_N hohe Gesamtkonzentration an Kationen sorgt für den Abbau der spezifischen Na^+ -Ionenwolke um das Polyanion. Es ist bemerkenswert, daß in beiden Fällen annähernd gleiche Bindungskonstanten gefunden wurden, obwohl die Experimente grundlegend verschieden sind. Ross und Scuggs untersuchten die Bewegung von DNA im elektrischen Feld, deren Ladung durch gebundene Na^+ -Ionen verändert wird. Grundlage unserer Experimente ist der kompetitive Salzeffekt, d.h. die Verdrängung gebundener Farbstoffkationen durch Na^+ -Ionen.

Tab. II zeigt, daß für alle untersuchten Farbstoffe $K_1 \ll K_2$ ist. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit unseren früheren Beobachtungen an Ethidiumderivaten [18, 21, 22]. Damit bestätigt sich, daß die nicht-kompetitive Bindung bei kleinen Salzkonzentrationen C_S nicht der dominierende Bindungseffekt ist. Für $C_S = C_M \rightarrow 0$ gilt nach Gl. (12) $r_1/r_2 \approx K_1/K_2$. Bei sehr hohen Salzkonzentrationen, $C_M \rightarrow \infty$, bei denen die kompetitiv gebundenen Farbstoffkationen bereits verdrängt werden, liegen demgegenüber nur noch nicht-kompetitiv gebundene Moleküle vor, $r_2 \rightarrow 0$. In physiologischer Kochsalzlösung z. B., $C_S = 0,15 \text{ M}$, sind die kompetitiv gebundenen Moleküle bereits weitgehend verdrängt, Abb. 9. Die intercalierten Moleküle dominieren dann. Man beachte den steilen Abfall von $K(C_S)$ mit steigender Salzkonzentration im Bereich kleiner C_S .

Instruktiv ist ein Vergleich der Bindungskonstanten K_1 und K_2 von AF, TMAF einerseits und E, TME andererseits, Tab. II. Man erkennt, daß bei Ersatz der Aminogruppen (AF, E) durch Dimethyl-

Tab. II. Bindungskonstanten $K_i [\text{M}^{-1}]$ der nicht-kompetitiven und der kompetitiven Bindung ($i = 1, 2, 3$), Kompetitor $S = \text{NaCl}$, $T = 298 \text{ K}$, $\text{pH} = 7,7$.

Substanz	K_1	K_2	K_3
AF	$4,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	30
TMAF	—	$3,0 \times 10^5$	25
AO	$3,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^5$	24
E [18]	$1,0 \times 10^4$	$5,6 \times 10^5$	22
TME [22]	—	$1,6 \times 10^5$	30

aminogruppen (TMAF, TME) die Fähigkeit zur Ausbildung der nicht-kompetitiven Bindung verschwindet (bzw. drastisch reduziert wird). Gleichzeitig wird die kompetitive Bindung stark geschwächt. Offensichtlich kann es sich hierbei nicht um einen sterischen Effekt handeln, da AO beide Bindungen eingeht. Vielmehr zeigt der Befund, daß für die nicht-kompetitive und die kompetitive Bindung von AF und E die Aminogruppen erforderlich sind, was auf die Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen hinweist.

Aus dem Rahmen fällt AO, das als Dimethylaminoverbindung nicht-kompetitiv und kompetitiv gebunden wird, mit Bindungskonstanten, die sich nicht wesentlich von AF und E unterscheiden. Nun haben die Röntgenstrukturuntersuchungen an kristallinen Miniatur-DNA-AO-Komplexen ergeben, daß die Immoniumgruppe des Farbstoffkations keine Wasserstoffbrücken zur DNA ausbildet [26, 28]. Andererseits wird aber bei Ersatz der Immoniumgruppe von AO durch eine Methylimmoniumgruppe (Übergang von AO zu TMAF) die Bindungsfähigkeit drastisch reduziert, was die Bedeutung der Immoniumgruppe für die Bindung von AO hervorhebt. Auch hier kann es sich kaum um einen sterischen Effekt handeln, da AF – das ebenfalls eine Methylimmoniumgruppe enthält – beide Bindungen 1 und 2 eingeht. Am einfachsten lassen sich die Befunde unter der Annahme verstehen, daß – im Gegensatz zu den oben genannten Kristallstrukturuntersuchungen – auch an der Bindung von AO an hochmolekulare DNA in wäßrigem Milieu Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Die Bindungen 1 und 2 von AF, AO und E erfolgen dann einheitlich unter Beteiligung von Brückenbindungen, die die elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkung unterstützen. Demgegenüber sind an der schwachen kompetitiven Bindung von TMAF und TME nur elektrostatische und hydrophobe Kräfte beteiligt, die offenbar nicht mehr in der Lage sind, eine nennenswerte, nicht-kompetitive Bindung zu realisieren.

Genaueren Einblick in die Bindung als Bindungskonstanten gewähren Bindungsenthalpien ΔH_i^0 und Entropien ΔS_i^0 ($i = 1, 2, 3$). In Tab. III sind die Werte für AF, AO, TMAF und die früher bestimmten von E [18] zusammengestellt. Wegen der ungünstigen experimentellen Voraussetzungen (kleine Farbstoffkonzentration, kleines Temperaturintervall) mußten trotz ausgedehnter Meßreihen größere Fehlerbreiten in Kauf genommen werden. Das gilt insbe-

Tab. III. Bindungsenthalpien ΔH_i^0 [kJ mol⁻¹] und Bindungsentropien ΔS_i^0 [J K⁻¹ mol⁻¹] der nicht-kompetitiven und der kompetitiven Bindung ($i = 1, 2, 3$), Kompetitor S = NaCl, pH = 7,7.

Substanz	ΔH_1^0	ΔH_2^0	ΔH_3^0	ΔS_1^0	ΔS_2^0	ΔS_3^0
AF	-26	-26	~ 0	-2	+28	+29
TMAF	-	-15	-	-	+54	-
AO	-30	-28	~ 0	-15	+20	+23
E [18]	-28	-27	~ 0	-21	+21	+28

sondere für die Bindungsentropien. Die Daten sind aber genau genug, um allgemeine Trends diskutieren zu können.

Die ΔS_i^0 in Tab. III sind an die Zählung der Bindungspositionen nach Scatchard adaptiert. Bei anderer Zählung verändern sich die Werte um ein additives Glied. Die ΔH_i^0 sind von der Zählung unabhängig [18].

Die Bindungsenthalpien ΔH_1^0 und ΔH_2^0 sind für AF, AO und E negativ und innerhalb der Fehlergrenzen jeweils gleich, $\Delta H_1^0 \cong \Delta H_2^0$. Sie unterscheiden sich bei den verschiedenen Farbstoffen nicht signifikant. Der Unterschied in den Bindungskonstanten K_1 und K_2 ist dann auf das Entropieglied zurückzuführen. Während die Entropie bei Ausbildung der kompetitiven Bindung im allgemeinen stark zunimmt, $\Delta S_2^0 > 0$, ist die Entropieänderung ΔS_1^0 für die nicht-kompetitive Bindung entweder negativ (AO, E) oder nahe null (AF). Übereinstimmend gilt $\Delta S_1^0 \ll \Delta S_2^0$. Thermodynamisch ist damit die kompetitive Bindung vor der nicht-kompetitiven Bindung begünstigt, $K_1 \ll K_2$.

Auch die kompetitive Bindung von TMAF ist mit einer negativen Enthalpie- und positiven Entropieänderung verbunden. Beides ist thermodynamisch günstig. Die Enthalpieänderung ist jedoch wesentlich kleiner, die Entropieänderung wesentlich größer als bei AF, AO und E.

Die Bindungsenthalpie ΔH_3^0 für die Na⁺-Ionen an DNA ist bei allen untersuchten Substanzen nahezu null, $\Delta H_3^0 \cong 0$. Die Bindung wird erst durch den thermodynamisch günstigen Entropieanstieg $\Delta S_3^0 > 0$ ermöglicht und ist damit ein entropischer Effekt. Die Bindungsentropien sind erwartungsgemäß für alle untersuchten Systeme innerhalb der Fehlergrenzen gleich.

Bisher wurden die Bindungen wertneutral nicht-kompetitiv und kompetitiv genannt. Es soll diskutiert werden, ob aus den experimentellen Befunden

die Zuordnung nicht-kompetitive Bindung = Intercalation, kompetitive Bindung = externe Bindung plausibel gemacht werden kann.

Für die elektrostatische Bindung 3 zwischen einem Metallkation M und einen anionischen Phosphodiesterrest der DNA hätte man eine negative Bindungsenthalpie und negative Bindungsentropie erwartet, da sich entgegengesetzt geladene Ionen anziehen und bei der Bindung Bewegungsfreiheitsgrade verloren gehen. Der beobachtete experimentelle Befund widerspricht diesen Erwartungen. Er kann unter Berücksichtigung der Ionen und Wassermoleküle des Systems verstanden werden.

Wegen $\Delta H_3^0 \cong 0$ ist zu erwarten, daß bei der Ionenbindung in wäßrigem Medium energieverbrauchende Prozesse eine Rolle spielen. Aus sterischen Gründen müssen bei Näherung der Ionen Wassermoleküle aus den Hydrathüllen in das Volumenwasser überführt werden. Die Wassermoleküle sind an die Ionen fest gebunden. Ihre Überführung erfordert Energie, die aus der Bindungsenergie gedeckt wird. Gleichzeitig gewinnen diese Wassermoleküle Bewegungsfreiheitsgrade. Der damit verbundene Entropieanstieg überkompensiert die eigentlich zu erwartende Entropieabnahme. Der diskutierte Gewinn an Bewegungsfreiheitsgraden wird durch kernrelaxationsspektroskopische Untersuchungen gestützt, nach denen Na^+ zu den strukturbildenden Ionen zu zählen ist [57, 58]. Die Wassermoleküle in der Hydrathülle haben dann weniger Bewegungsfreiheitsgrade als im Volumenwasser. Für die Phosphodiesterreste liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor.

Für die elektrostatische Bindung 2 von TMAF an DNA beobachtet man eine negative Bindungsenthalpie, $\Delta H_2^0 < 0$. Die Hydratwassermoleküle sind an das große Farbstoffkation lockerer gebunden als an Na^+ . Für die Überführung der Wassermoleküle in das Volumenwasser benötigt man deshalb auch weniger Energie. Die Energiebilanz bleibt erwartungsgemäß negativ. Der Entropiezuwachs $\Delta S_2^0 > 0$ ist für hydrophobe Wechselwirkung charakteristisch. Er ist bei TMAF wegen der fünf Methylgruppen des Moleküls besonders groß.

Die externe Bindung 2 von AF, AO und E unterscheidet sich von TMAF durch eine verstärkt negative Energiebilanz, die auf die zusätzliche Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Farbstoff

und DNA zurückgeführt werden kann. Der Befund spricht für die Annahme, daß an der externen Bindung von AO an DNA ebenso wie bei AF und E Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Wäre das nicht der Fall, sollte die Bindungsenthalpie von AO entsprechend kleiner sein. Auch bei AF, AO und E bewirkt die hydrophobe Wechselwirkung einen Entropieanstieg.

Energetisch ähnliche Verhältnisse wie bei 2 sind auch bei der intercalativen Bindung 1 zu erwarten, da Moleküle im allgemeinen bestrebt sind, die ihnen zur Verfügung stehenden Valenzen abzusättigen. Daraus folgt $\Delta H_1^0 \cong \Delta H_2^0$. Außerdem wird verständlich, daß sich die Absorptionsspektren der gebundenen Farbstoffmoleküle 1 und 2 nicht signifikant unterscheiden. Die spektralen Veränderungen sind bei beiden Bindungstypen annähernd gleich.

Überraschend ist der Befund $\Delta S_1^0 \ll \Delta S_2^0$. Man muß aber berücksichtigen, daß bei der Intercalation die Doppelhelix versteift wird und der Verlust an Bewegungsfreiheitsgraden von DNA und intercaliertem Farbstoff eine Entropieabnahme gegenüber 2 verursacht.

Qualitativ stehen damit die thermodynamischen Parameter mit der getroffenen Zuordnung im Einklang. Kehren wir abschließend nochmals zum Ausgangspunkt unserer Untersuchung zurück. Nach den älteren Vorstellungen werden die Farbstoffmoleküle bei kleinen Konzentrationen C_F nur intercalativ gebunden. Um den kompetitiven Salzeffekt verständlich zu machen, müßte man dann annehmen, daß der Farbstoff durch Salze teilweise verdrängt wird. Ein Teil $n_2 C_N$ der möglichen $n C_N = (n_1 + n_2) C_N$ Bindungspositionen für F wäre dann durch die Eigenschaft ausgezeichnet, bei Einwirken von M den Farbstoff F freizusetzen, während eine zweiter Teil $n_1 C_N$ diese Eigenschaft nicht besitzt. Dann müßte aber der gemessene Parameter n von der Salzkonzentration abhängen, weil bei hoher Salzkonzentration weniger Bindungspositionen für den Farbstoff zur Verfügung stehen. Das widerspricht jedoch dem experimentellen Befund $n = \text{const.}$

Danksagung

Dem Bundesminister für Forschung und Technologie danken wir für eine Sachbeihilfe, Herrn J.-R. Grezes für seine Hilfe bei der Farbstoffsynthese und Reinigung.

- [1] Zusammenfassende Darstellung: A. R. Peacocke in R. M. Acheson, *Acridines*, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto, 2nd Ed. 1973, Chap. XIV, S. 723 u. f.
- [2] Zusammenfassende Darstellung: E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond u. M. J. Waring, *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, J. Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto, 2nd Ed. 1981, Chap. 5.C.1, S. 274 u. f.
- [3] G. Scatchard, *Ann. New York Acad. Sci.* **51**, 660 (1949).
- [4] A. R. Peacocke u. J. N. H. Skerrett, *Trans Faraday Soc.* **52**, 261 (1956).
- [5] A. Blake u. A. R. Peacocke, *Biopolymers* **6**, 1225 (1968).
- [6] A. V. Hill, *J. Physiol. (London)* **40**, 4 (1910).
- [7] J. Wylman Jr., *Adv. Prot. Chem.* **19**, 223 (1964).
- [8] D. M. Crothers, *Biopolymers* **6**, 575 (1968).
- [9] G. Schwarz, *Biophys. Struct. Mechanism* **2**, 1 (1976).
- [10] G. Schwarz, *Biophys. Chem.* **6**, 65 (1977).
- [11] J. D. McGhee u. P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86**, 469 (1974).
- [12] A. S. Zasedatelev, G. V. Gurskii u. M. V. Volkenshtein, *Mol. Biol. (Russisch)* **5**, 245 (1971); *Chem. Abstr.* 15042n, **75**, 19 (1971).
- [13] J. Ramstein, M. Leng u. N. R. Kallenbach, *Biophys. Chem.* **5**, 319 (1976).
- [14] H. M. Sobell, C. C. Tsai, S. G. Gilbert, S. C. Jain u. T. D. Sakore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3068 (1976).
- [15] C. C. Tsai, S. C. Jain u. H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* **114**, 301 (1977).
- [16] S. C. Jain, C. C. Tsai u. H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* **114**, 317 (1977).
- [17] M. Liebmann, J. Rubin u. M. Sundaralingam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4821 (1977).
- [18] J. Pauluhn u. H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **82**, 1265 (1978).
- [19] E. Ohmes, J. Pauluhn, J.-U. Weidner u. H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **84**, 23 (1980).
- [20] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3**, 18 (1961).
- [21] J. Pauluhn u. H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **83**, 76 (1979).
- [22] J. Pauluhn, R. Grezes u. H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **83**, 708 (1979).
- [23] V. Zanker, *Z. Phys. Chem.* **199**, 225 (1952).
- [24] R. B. Hill, K. G. Bensch u. D. W. King, *Nature* **184**, 1429 (1959).
- [25] S. Neidler, A. Achari, G. L. Taylor, H. M. Bergman, H. L. Carell, J. P. Glusker u. W. C. Stallings, *Nature* **269**, 304 (1977).
- [26] B. S. Reddy, T. P. Seskardi, T. D. Sakore u. H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* **135**, 787 (1979).
- [27] E. Westhof u. M. Sundaralingam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1852 (1980).
- [28] A. H. J. Wang, G. J. Quigley u. A. Rich, *Nucleic Acids Research* **6**, 3879 (1979).
- [29] M. E. Lamm u. D. M. Neville jr., *J. Phys. Chem.* **69**, 3872 (1965).
- [30] T. Kurucsev u. U. P. Strauss, *J. Phys. Chem.* **74**, 3081 (1970).
- [31] B. H. Robinson, A. Löffler u. G. Schwarz, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **69**, 56 (1973).
- [32] V. von Tscharner u. G. Schwarz, *Biophys. Struct. Mechanism* **5**, 79 (1979).
- [33] V. Vitagliano, L. Constantino, N. Staiano, O. Ortona u. S. Wurzbürger, *Adv. Mol. Relax. Interact. Processes* **12**, 251 (1978).
- [34] R. K. Tubbs, W. E. Ditmars Jr. u. Q. van Winkle, *J. Mol. Biol.* **9**, 545 (1964).
- [35] G. Löber u. G. Achterer, *Biopolymers* **8**, 595 (1969).
- [36] L. M. Chan u. Q. van Winkle, *J. Mol. Biol.* **40**, 491 (1969).
- [37] L. M. Chan u. J. A. McCarter, *Biochem. Biophys. Acta* **204**, 252 (1970).
- [38] J. P. Schreiber u. M. P. Daune, *J. Mol. Biol.* **83**, 487 (1974).
- [39] E. B. Moroshkina, A. K. Shistov, M. A. Krivtsova, N. N. Zhadin u. E. V. Frisman, *Mol. Biol. (Russisch)* **9**, 836 (1975); *Chem. Abstr.* 39831 f., **84**, 138 (1976).
- [40] G. Duportail, Y. Mauss u. J. Chambron, *Biopolym.* **16**, 1397 (1977).
- [41] D. F. Bradley u. M. K. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 944 (1959).
- [42] A. L. Stone u. D. F. Bradley, *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 3627 (1961).
- [43] D. M. Neville Jr. u. D. R. Davies, *J. Mol. Biol.* **17**, 57 (1966).
- [44] B. J. Gardener u. S. F. Mason, *Biopolymers* **5**, 79 (1967).
- [45] S. Ichimura, M. Zama, H. Fujita u. T. Ito, *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 116 (1969).
- [46] R. W. Armstrong, T. Kurucsev u. U. P. Strauss, *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 3174 (1970).
- [47] M. Zama u. S. Ichimura, *Biopolymers* **9**, 53 (1970).
- [48] E. Fredericq u. C. Haussier, *Biopolymers* **11**, 2281 (1972).
- [49] W. Müller u. M. Crothers, *Eur. J. Biochem.* **54**, 267 (1975).
- [50] D. Formasiero u. T. Kurucsev, *J. Phys. Chem.* **85**, 613 (1981).
- [51] P. Galliot, *Bull. Soc. Chim. France* **1934**, 796.
- [52] F. Ullmann u. A. Maric, *Ber. Chem. Ges.* **34**, 4315 (1901).
- [53] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- [54] H. Eibl u. E. M. Lands, *Analyt. Biochem.* **30**, 51 (1969).
- [55] H. A. Benesi u. J. H. Hildebrand, *J. Amer. Chem. Soc.* **71**, 2703 (1949).
- [56] P. D. Ross u. R. L. Scruggs, *Biopolymers* **2**, 79, 231 (1964).
- [57] H. G. Hertz, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **67**, 311 (1963).
- [58] E. Wicke, *Angew. Chem.* **78**, 1 (1966).