

João Ruggiero Neto

**Explorando Contribuições Entrópicas e
Eletrostáticas em Interações de Ligantes
com Ácidos Nucleicos**



TESE DE LIVRE DOCÊNCIA

**EXPLORANDO CONTRIBUIÇÕES ENTRÓPICAS E ELETROSTÁTICAS EM
INTERAÇÕES DE LIGANTES COM ÁCIDOS NUCLEICOS**

Professor Doutor João Ruggiero Neto

Departamento de Física

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Câmpus de São José do Rio Preto - SP

1996



787/98



Agradecimentos

aos amigos do Departamento de Física, pelo apoio e amizade inestimáveis durante estes anos,

ao amigo Márcio Colombo pelas discussões, apoio e incentivo recebidos, estas discussões foram importantes na concepção que tenho hoje de Biofísica Molecular,

ao José (Ruggiero) meu irmão pelo apoio nos momentos mais delicados e ao Marcelo (Fossey), que estiveram sempre muito próximos e com quem dividi minhas angústias e alegrias e que muito me ensinaram,

ao Jorge (Chahine) e Augusto (Agostinho) pelas discussões que mantivemos,

à Ilva, pelo apoio na organização dos projetos de pesquisa e ao Paulinho e Barbosa nossos funcionários pela ajuda nos laboratórios,

aos amigos da Biologia pela acolhida e apoio no retorno do pós-doutorado,

aos amigos da USP de São Carlos: Marcel Tabak, Otaciro Nascimento e Rosemary Sanchez pela minha formação e pelo apoio que ainda me dão,

aos amigos da Universidade de Trieste Franco Quadrifoglio, Giorgio Manzini, Luigi (Gigi) Xodo, Attilio Cesaro e Sérgio Paoletti pelas discussões que mantivemos sobre a Física Química de Macromoléculas,

às agências nacionais Dedico este trabalho à CT das quais tenho recebido apoio financeiro sem o qual teria sido impossível este trabalho.

Marta, Milena e Giovanni



Agradecimentos

aos amigos do Departamento de Física, pelo apoio e amizade inestimáveis durante estes anos,

ao amigo Márcio Colombo pelas discussões, apoio e incentivo recebidos, estas discussões foram importantes na concepção que tenho hoje de Biofísica Molecular,

ao José (Ruggiero) meu irmão pelo apoio nos momentos mais delicados e ao Marcelo (Fossey), que estiveram sempre muito próximos e com quem dividi minhas angustias e alegrias e que muito me ensinaram,

ao Jorge (Chahine) e Augusto (Agostinho) pelas discussões que mantivemos,

à Ilva, pelo apoio na organização dos projetos de pesquisa e ao Paulinho e Barbosa nossos funcionários pela ajuda nos laboratórios,

aos amigos da Biologia pela acolhida e apoio no retorno do pós-doutorado,

aos amigos da USP de São Carlos: Marcel Tabak, Otaciro Nascimento e Rosemary Sanches pela minha formação e pelo apoio que ainda me dão,

aos amigos da Universidade de Trieste Franco Quadrifoglio, Giorgio Manzini, Luigi (Gigi) Xodo, Attilio Cesàro e Sérgio Paoletti pelas discussões que mantivemos sobre a Física Química de Macromoléculas,

às agências nacionais FAPESP, CNPq e PADCT das quais tenho recebido apoio financeiro sem o qual teria sido impossível ter progredido nestes anos,



ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	01
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO	03
CAPÍTULO II	
DESCRIÇÃO DA DUPLA HÉLICE COMO UM POLIELETROLITO	05
A-MODELO DE CONDENSAÇÃO DE CONTRAÍONS	05
B-MODELO DE CELA	06
C-LIGAÇÃO DE ÍONS COM DNA	07
C1-ENERGIA DA TRANSIÇÃO B Z INDUZIDA POR ÍONS CÁLCIO	08
C2-SELETIVIDADE IÔNICA E EFEITO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA NA LIGAÇÃO DE CÁLCIO AO DNA	10
C3-DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO DE POLIÁCIDOS	16
CAPÍTULO III	
EFEITO MODULADOR DE CARGA ELÉTRICA NA LIGAÇÃO DE DROGAS COM DNA	19
CAPÍTULO IV	
EFEITO MODULADOR DO SOLVENTE NA LIGAÇÃO DA ACTINOMICINA D AO DNA	25
EFEITO DE CO-SOLVENTES NA TORÇÃO DA DUPLA-HÉLICE	28



CAPÍTULO V

COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS	33
APÊNDICE	35
MODELO DE CONDENSAÇÃO DE CONTRAÍONS	35
MODELO DE CELA	37
EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN (EPB)	38
REFERÊNCIAS	45

O efeito de íons na estabilização conformacional de ácidos nucleicos foi estudado através da interação de íons cálcio e em comparação com íons monovalentes. O objetivo deste estudo foi de estabelecer uma base físico-química que melhor descreva estes efeitos para aplicá-la ao estudo da interação de ligantes com DNA. Dois modelos polieletrólitos foram utilizados nesta análise: o de condensação de contraíons e o de cela que envolve a resolução da equação de Poisson-Boltzmann (EPB). A seletividade de íons a diferentes conformações e sequências de base foram analisadas, tendo sido evidenciado uma sequência de seletividade (Li, Na e K) comum tanto para a reversão conformacional Z-B como para as conformações A e B.

Os efeitos destes fatores ambientais nas interações de fármacos: daunomicina, adriamicina e *N*-acetil-adriamicina e actinomicina com DNA foram modelados como um sistema de duas fases, onde a ligação foi considerada como um processo de troca, com uma forte componente entrópica entre a solução ("bulk") e as vizinhanças do DNA. O efeito de íons na ligação das três primeiras drogas acima, foi analisado pelo modelo de Friedmann Manning que leva em conta o efeito polieletrólito e portanto a troca entre o ligante e a fase de íons condensados ao redor do DNA. A inclusão deste efeito no modelo estatístico que descreve a exclusão de sítios vizinhos no DNA proporcionou uma descrição mais realista das isotermas de ligação, permitindo determinar, com maior precisão, uma ordem de especificidade a sequências: G-m³C>A-T>A-C-G-T>G-C>A-U, evidenciando alguns aspectos destas sequências que são importantes no reconhecimento molecular.

As alterações da hidratação na ligação da actinomicina D ao DNA foram analisadas por um modelo termodinâmico semelhante. A atividade de água foi alterada pela adição de co-solventes neutros, e o sistema foi considerado como tendo duas fases: uma que corresponde ao DNA e sua vizinhança e outra fase com a droga e o co-solvente, e a ligação é modelada como um processo de troca. Neste processo moléculas de água são transferidas da fase do DNA para a fase que contém o co-solvente quando a droga se liga. O efeito de alteração da atividade do solvente é acessar sítios de maior especificidade no DNA mas que são entálpicamente desfavoráveis. O efeito de co-solventes é induzir uma compensação entalpia-entropia tornando a ligação entálpicamente favorável. As alterações na atividade da água apresenta também um efeito no estado torcional da dupla hélice, que participa também



RESUMO

Os processos biológicos que caracterizam o papel biológico dos ácidos nucléicos tem como eventos básicos suas interações com proteínas e pequenos ligantes que em geral envolvem alterações de longo alcance tanto na estrutura secundária (conformacionais) nos ácidos nucléicos quanto na estrutura terciária, fletindo ou alterando o grau de super hélice da dupla hélice. Em geral estes eventos são fortemente dependentes de alterações de fatores ambientais tais como a presença de íons mono e bivalentes e de mudanças na hidratação. A descrição termodinâmica destes fatores ambientais é de grande importância para se entender as bases físico-químicas destes processos biológicos.

Neste trabalho é apresentado uma síntese dos resultados que obtivemos nos últimos anos que enfocaram o estudo de dois fatores ambientais: a presença de íons mono e bivalentes e da hidratação na estabilização termodinâmica de conformações não convencionais do ácido desoxirribonucléico (DNA) e na interação de pequenos ligantes: fármacos e oligopeptídios com esta molécula, bem como nos efeitos de alterações da hidratação nas características topológicas do DNA e seus efeitos no reconhecimento molecular.

O efeito de íons na estabilização conformacional de ácidos nucléicos foi estudado através de interação de íons cálcio e em competição com íons monovalentes. O objetivo deste estudo foi de estabelecer uma base físico-química que melhor descreva estes efeitos para aplicá-la ao estudo da interação de ligantes com DNA. Dois modelos polieletrólíticos foram utilizados nesta análise: o de condensação de contraíons e o de cela que envolve a resolução da equação de Poisson-Boltzmann (EPB). A seletividade de íons a diferentes conformações e sequências de base foram analisadas, tendo sido evidenciado uma sequência de seletividade (Li, Na e K) comum tanto para a reversão conformacional Z-B como para as conformações A e B.

Os efeitos destes fatores ambientais nas interações de fármacos: daunomicina, adriamicina e n-acetil-adriamicina e actinomicina com DNA foram modelados como um sistema de duas fases, onde a ligação foi considerada como um processo de troca, com uma forte componente entrópica entre a solução ("bulk") e as vizinhanças do DNA. O efeito de íons na ligação das três primeiras drogas acima, foi analisado pelo modelo de Friedmann Manning que leva em conta o efeito polieletrólítico e portanto a troca entre o ligante e a fase de íons condensados ao redor do DNA. A inclusão deste efeito no modelo estatístico que descreve a exclusão de sítios vizinhos no DNA proporcionou uma descrição mais realista das isotermas de ligação, permitindo determinar, com maior precisão, uma ordem de especificidade a sequências: G-me5C>A-T>A-C:G-T>G-C>A-U, evidenciando alguns aspectos destas sequências que são importantes no reconhecimento molecular.

As alterações da hidratação na ligação da actinomicina D ao DNA foram analisados por um modelo termodinâmico semelhante. A atividade de água foi alterada pela adição de co-solventes neutros, e o sistema foi considerado como tendo duas fases: uma que corresponde ao DNA e sua vizinhança e outra fase com a droga e o co-solvente, e a ligação é modelada como um processo de troca. Neste processo moléculas de água são transferidas da fase do DNA para a fase que contém o co-solvente quando a droga se liga. O efeito de alteração da atividade do solvente é acessar sítios de maior especificidade no DNA mas que são entalpicamente desfavoráveis. O efeito de co-solventes é induzir uma compensação entalpia entropia tornando a ligação entalpicamente favorável. As alterações na atividade da água apresenta também um efeito no estado torcional da dupla hélice, que participa também



deste processo de reconhecimento molecular contribuindo para o processo de compensação entalpia entropia.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Interações moleculares de alta especificidade entre proteínas e ligantes com ácidos nucleicos, especialmente o ácido desoxirribonucleico (DNA), são os eventos responsáveis pela expressão gênica, seu controle e regulação. Estas interações envolvem tanto os processos de reconhecimento molecular a seqüências de bases como também ajustes conformacionais tanto da proteína como do ácido nucleico (Pebo e Sauer, 1992).

Ao nível atômico e molecular este reconhecimento é baseado em interações de curto alcance, principalmente pontes de hidrogênio e forças de van der Waals, entre cadeias laterais da proteína e a parte exposta das bases, localizadas nos sulcos da dupla hélice, principalmente no sulco maior e em menor extensão no sulco menor (Steitz, 1990). Estes contatos claramente são dependentes da seqüência de bases e da existência de cadeias laterais na proteína para uma perfeita complementaridade entre as duas moléculas. Paralelamente, um ajuste conformacional de longo alcance, dependente também da seqüência de bases, é importante para que grupos aceptores e doadores das bases se exponham para contatos com a proteína.

Embora a região de contato entre a proteína e o ácido nucleico seja relativamente pequena, este ajuste conformacional, muitas vezes não se restringe somente à região de contato com a proteína, mas envolve centenas ou milhares de pares de bases, como é o caso da flexão observada na interação CAP-DNA (Steitz, 1990; Wu et al., 1984). Esta perturbação conformacional de longo alcance está relacionada à ação à distância entre a parte a ser transcrita e a região reguladora (Ptashne, 1986 e Wang et al., 1988).

Do ponto de vista da Biofísica Molecular a base para o entendimento destes processos de regulação e reconhecimento é a energética das interações de longo e curto alcance que, não só mantêm a estabilidade do complexo, como possibilita o ajuste conformacional para o reconhecimento molecular.

Em geral os efeitos de longo alcance nas interações de proteínas e pequenos ligantes com DNA são modulados por fatores ambientais, por exemplo, a concentração de sal, como ocorre no caso da ligação dos repressores λ cl (Koblan e Ackers 1991) e *lac* (Record et al., 1978, 1991). Esta modulação tem sua origem nas interações eletrostáticas entre grupos carregados no DNA e no ligante e em alterações elásticas, torção e compressão, induzidas na dupla hélice, pela blindagem eletrostática dos grupos fosfato. Ao lado desta contribuição eletrostática o efeito de sal ainda está associado a uma componente entrópica devido à liberação de íons na ligação (Record et al., 1991 e Misra et al., 1994). A correlação (linkage) entre a atividade do eletrólito e a energia de ligação está relacionada à energética das interações entre pequenos íons e as macromoléculas envolvidas, especialmente DNA.

Outro fator ambiental que modula estas interações é a atividade do solvente (Record et al. 1991; Garner e Rau 1995; Sidorova e Rau 1995). Spolar e Record (1994) mostraram evidências que o ajuste conformacional na proteína, necessário para o reconhecimento de seqüências de bases no DNA, é em geral um processo entrópico, envolvendo liberação de moléculas de água e, portanto, um processo que possivelmente deve ser dependente da atividade do solvente.

A descrição realista deste balanço energético é de grande importância para o entendimento da especificidade destes processos. Muitas vezes esta descrição, a nível



CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Interações moleculares de alta especificidade entre proteínas e ligantes com ácidos nucleicos, especialmente o ácido desoxirribonucleico (DNA), são os eventos responsáveis pela expressão gênica, seu controle e regulação. Estas interações envolvem tanto os processos de reconhecimento molecular a seqüências de bases como também ajustes conformacionais tanto da proteína como do ácido nucleico (Pabo e Sauer, 1992).

Ao nível atômico e molecular este reconhecimento é baseado em interações de curto alcance, principalmente pontes de hidrogênio e forças de van der Waals, entre cadeias laterais da proteína e a parte exposta das bases, localizadas nos sulcos da dupla hélice, principalmente no sulco maior e em menor extensão no sulco menor (Steitz, 1990). Estes contatos claramente são dependentes da seqüência de bases e da existência de cadeias laterais na proteína para uma perfeita complementaridade entre as duas moléculas. Paralelamente, um ajuste conformacional de longo alcance, dependente também da seqüência de bases, é importante para que grupos aceptores e doadores das bases se exponham para contatos com a proteína.

Embora a região de contato entre a proteína e o ácido nucleico seja relativamente pequena, este ajuste conformacional, muitas vezes não se restringe somente à região de contato com a proteína, mas envolve centenas ou milhares de pares de bases, como é o caso da flexão observada na interação CAP-DNA (Steitz, 1990, Wu et al, 1984). Esta perturbação conformacional de longo alcance está relacionada à ação à distância entre a parte a ser transcrita e a região reguladora (Ptashne, 1986 e Wang et al, 1988).

Do ponto de vista da Biofísica Molecular a base para o entendimento destes processos de regulação e reconhecimento é a energética das interações de longo e curto alcance que, não só mantêm a estabilidade do complexo, como possibilita o ajuste conformacional para o reconhecimento molecular.

Em geral os efeitos de longo alcance nas interações de proteínas e pequenos ligantes com DNA são modulados por fatores ambientais, por exemplo, a concentração de sal, como ocorre no caso da ligação dos repressores λCI (Koblan e Ackers 1991) e *lac* (Record et al, 1978, 1991). Esta modulação tem sua origem nas interações eletrostáticas entre grupos carregados no DNA e no ligante e em alterações elásticas, torção e compressão, induzidas na dupla hélice, pela blindagem eletrostática dos grupos fosfato. Ao lado desta contribuição eletrostática o efeito de sal ainda está associado a uma componente entrópica devido à liberação de íons na ligação (Record et al, 1991 e Misra et al, 1994). A correlação (linkage) entre a atividade do eletrólito e a energia de ligação está relacionada à energética das interações entre pequenos íons e as macromoléculas envolvidas, especialmente DNA.

Outro fator ambiental que modula estas interações é a atividade do solvente (Record et al 1991, Garner e Rau 1995, Sidorova e Rau 1995). Spolar e Record(1994) mostraram evidências que o ajuste conformacional na proteína, necessário para o reconhecimento de seqüências de bases no DNA, é em geral um processo entrópico, envolvendo liberação de moléculas de água e, portanto, um processo que possivelmente deve ser dependente da atividade do solvente.

A descrição realista deste balanço energético é de grande importância para o entendimento da especificidade destes processos. Muitas vezes esta descrição, a nível



teórico, é dificultada pela grande complexidade do sistema proteína-DNA, ou a nível experimental pela dificuldade na obtenção da proteína. Fatores protéicos que participam destes processos regulatórios são, em geral, encontrados em concentrações muito baixas no meio celular. Nestes casos os estudos *in vitro*, que em geral requerem concentrações relativamente altas de proteína, são prejudicados. Uma alternativa é a clonagem e expressão destes fatores por técnicas de Biologia Molecular, entretanto esta não é uma tarefa simples, pelo fato destas proteínas interagirem com o DNA, o que torna sua expressão com baixo rendimento e difícil sua purificação.

Diante das dificuldades de se trabalhar com estes sistemas, a utilização de pequenos ligantes como sistemas modelos mais simples, representam uma alternativa interessante para explorar as contribuições energéticas envolvidas nos processos de reconhecimento molecular. Estudos estruturais por difração de raios X e NMR, espectroscópicos e termodinâmicos têm mostrado que complexos de pequenos ligantes, fármacos e/ou oligopeptídios, com o DNA apresentam especificidade à sequência de bases, distorções na dupla hélice e energética de interação, muito semelhantes à interação de proteínas com DNA, o que os tornam bastante atrativos como modelos para estudar as bases do reconhecimento molecular.

Em geral estes pequenos ligantes, especialmente fármacos, utilizados como sistemas modelo, têm sua ação biológica centrada no núcleo celular e, como alvo a molécula de DNA. O entendimento das bases do reconhecimento destes fármacos contribuem em geral para projetar novas drogas que sejam mais efetivas ou que tenham maior especificidade (Neidle 1991), um forte atrativo, portanto, para sua utilização, como modelo simplificado, neste estudos de reconhecimento molecular.

Nossa proposta de pesquisa ao longo destes últimos anos tem sido de explorar e descrever as interações que estabilizam conformações na dupla hélice e modulam as interações de ligantes com DNA, utilizando, neste caso, pequenas moléculas como modelo para o reconhecimento molecular. Neste contexto a descrição dos efeitos de longo alcance mereceram atenção especial.

A seguir apresentamos uma síntese dos principais resultados que nos proporcionaram melhor compreensão e descrição de fatores que modulam as interações de pequenos ligantes com ácidos nucleicos. Os resultados experimentais são apresentados de maneira sintética para que não fique monótona a leitura, maiores detalhes experimentais e discussões podem ser encontradas nos artigos que acompanham cada capítulo. No capítulo II são apresentados resultados referentes ao estudo do efeito polieletrólítico, visando a descrição da seletividade na ligação de íons ao DNA, onde foi feita a comparação entre os dois principais modelos existentes. Foram exploradas as contribuições energéticas de origem eletrostática e conformacional na estabilização da conformação Z do DNA, bem como na transição hélice-hélice estendida em poliácidos fracos. Uma descrição mais precisa dos dois modelos polieletrólíticos utilizados é encontrada no apêndice.

No capítulo III são apresentados os estudos sobre a descrição termodinâmica da interação de drogas catiônicas com diferentes sequências de bases e a avaliação do efeito da presença da carga elétrica nestas drogas na afinidade de ligação ao DNA.

No capítulo IV são apresentados resultados do estudo dos efeitos moduladores de alterações da atividade do solvente na ligação entrópica de um pequeno ligante ao DNA e dos efeitos de alterações na atividade de água na torção da dupla hélice.



CAPÍTULO II

DESCRIÇÃO DA DUPLA HÉLICE COMO UM POLIELETRÓLITO

A presença dos grupos fosfato nos ácidos nucléicos criam uma instabilidade nestas macromoléculas devido à repulsão eletrostática. Como consequência, a molécula de DNA tende a se estender e a desestabilizar as pontes de hidrogênio entre as duas cadeias. A estabilização da estrutura de dupla hélice requer a blindagem destas cargas por contraíons e pela adição de sal, criando uma nuvem de íons ao redor do DNA. O efeito polieletrólítico tem sua origem, portanto, na interação entre os grupos fosfato, carregados negativamente, e os contraíons necessários na blindagem da repulsão entre eles.

Na descrição deste efeito dois modelos têm sido largamente utilizados: o de condensação de contraíons e o modelo de cela baseado na resolução da equação de Poisson-Boltzmann. A seguir apresentamos os principais aspectos destes modelos, uma descrição mais detalhada pode ser encontrada no apêndice.

A- MODELO DE CONDENSACÃO DE CONTRAÍONS

Este modelo foi desenvolvido por Manning (1969, 1974, 1978), para estudar o comportamento de polieletrólitos em solução e é baseado em algumas simplificações:

- o polieletrólito ou poliion é modelado como um arranjo linear e infinito de cargas puntuais, igualmente espaçadas por uma distância b e caracterizado por um parâmetro adimensional de carga: $\xi = q^2 / \epsilon k T b$ onde ϵ é a constante dielétrica do solvente, k a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

- a solução polieletrólítica é suficientemente diluída de tal forma que a interação entre dois poliions pode ser desprezada, e os íons na solução são considerados puntuais

- o polieletrólito e seus contraíons formam um sistema de duas fases:

- uma na qual os íons de valência N se condensam ao redor do poliion ocupando um volume V_p . Os íons são aprisionados neste volume numa extensão tal que o parâmetro de carga seja decrescido para $1/N$. Nesta região, conhecida como de condensação, os íons tem liberdade translacional e são ditos territorialmente ligados,

- outra fase é composta por íons que estão fora da fase de condensação. Estes íons são tratados pela teoria de Debye Huckel.

A idéia central do modelo é que os contraíons são atraídos na direção do poliion enquanto a energia eletrostática entre os fosfatos for maior do que a energia térmica, ou:

$$\xi = \frac{q^2}{\epsilon k T b} > 1/N$$

Nestas condições os contraíons, de valência N , se condensarão em torno do poliion blindando suas cargas, até que a carga de cada grupo fosfato (q) seja reduzida a uma fração q_{ef} dada por:

$$q_{ef} = \left(1 - \frac{1}{N\xi}\right)q$$

A energia livre do sistema é composta de duas contribuições: uma eletrostática (G_{el}) que tem origem nas cargas não compensadas do políon, e a outra entrópica (G_{mix}) e tem origem na diferença de concentrações iônicas entre a fase condensada e a solução, pois, em geral, na fase condensada a concentração de íons é muito maior do que na solução.

O termo de origem entrópica é dado pelas contribuições dos íons ligados, dos íons livres e das moléculas do solvente. A energia livre total é determinada então pela soma destas contribuições:

$$G = G_{el} + G_{mix}(\text{ligados}) + G_{mix}(\text{livres}) + G_{mix}(\text{solvente})$$

A interação de um íon de valência N com o polieletrólito na presença de sal mono- monovalente (1:1) é favorecida pelas tensões que resultam das duas componentes energéticas. À medida que os íons monovalentes da fase condensada são trocados por íons N -valentes, a blindagem das cargas aumenta, reduzindo as duas contribuições energéticas: eletrostática e de mistura. Para um sistema constituído de uma solução de polieletrólito de concentração N_p em grupos carregados, imerso em uma solução de eletrólito suporte N -monovalente ($N:1$) de concentração c_N , a energia livre de mistura, levando em conta os termos acima, é dada por;

$$G_{mix} = N_p RT \theta_N \ln(10^3 \theta_N V_p^{-1} / c_N)$$

onde θ_N é a fração de íons condensados ou “ligados” por grupo carregado no polieletrólito.

B- MODELO DE CELA

Neste modelo o polieletrólito é modelado também como uma distribuição linear e infinita de cargas puntiformes com espaçamento b . Em solução o polieletrólito, junto com sua nuvem de contraíons, ocupa uma região cilíndrica, cujo eixo é coincidente com o polímero. Desta forma em uma solução de polímeros de concentração N_p , em termos de grupos carregados, ao redor de cada um destes grupos forma-se uma nuvem iônica cujo raio é $R_c = 1/(N_p \pi b)^{1/2}$. Assume-se ainda que os íons são puntiformes e móveis dentro da região cilíndrica.

O campo elétrico do polieletrólito vincula os íons a permanecer no interior da cela, sendo que sua distribuição espacial nesta região é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$n_i(r) = n_i^0 \exp\left(\frac{-z_i q \Psi}{kT}\right)$$

onde n_i^0 é a concentração de íons de carga q e valência z_i na referência, ié, na borda da cela. Esta distribuição de íons na região cilíndrica pode ser calculada através da resolução da equação de Poisson

$$\nabla^2 \Psi = -4 \pi \rho(r) / \epsilon$$

onde $\rho(r)$ é a densidade de cargas no cilindro e é dada por :

$$\rho(r) = \sum n_i(r) z_i q$$



onde $n_i(r)$ é dada pela distribuição de Boltzmann acima, z_i é a valência dos íons da espécie i e q é a carga unitária.

As condições de contorno para a resolução desta equação são: o potencial e o campo elétricos na borda da cela são nulos e o campo na superfície do cilindro é função da densidade de cargas. A equação de Poisson com distribuição de Boltzmann é conhecida como equação de Poisson Boltzmann (EPB).

Estes dois modelos têm em comum o fato de modelarem o polieletrólito como uma distribuição linear e infinita de cargas separadas por uma distância b . Experimentos de espalhamento de luz (Hagerman 1988) têm mostrado que o DNA é um polímero relativamente rígido, pois em concentrações baixas de sal mono-monovalente (0.01 M NaCl) seu comprimento de persistência é $\lambda = 220 \text{ pb} = 75 \text{ nm}$, ou seja, cerca de 25 vezes maior que a distância de blindagem dos íons (comprimento de Debye). No intervalo de concentrações de 1 mM a 0.1 M NaCl o comprimento de persistência é de 10 a 57 vezes maior do que o comprimento de Debye. Portanto, mesmo em força iônica muito baixa, é razoável considerar o DNA como sendo linear.

Uma segunda semelhança entre os dois modelos é que a energia para trazer os íons para a vizinhança do polieletrólito depende fortemente da densidade de cargas do polieletrólito.

A principal diferença entre os dois modelos é que o modelo de condensação de contraíons, pela existência de duas fases, descreve o sistema levando em conta duas contribuições energéticas: uma de origem eletrostática e outra entrópica devido à troca de íons e solvente com a fase condensada. No modelo de cela este último termo não existe pois considera que a distribuição de íons dentro da cela é contínua, de tal maneira que a concentração de contraíons é alta na borda do polieletrólito e decai exponencialmente, de acordo com a função de Boltzmann, até que na borda da cela ela seja igual à da solução ("bulk"). Por descrever a distribuição de íons como duas fases o modelo de condensação de contraíons tem explicitamente a dependência da energia livre de ligação do íon com a concentração de sal.

C- LIGAÇÃO DE ÍONS COM DNA

A descrição adequada da ligação de íons bivalentes com DNA tem sido um tema importante de pesquisa pois, de um lado, alguns íons bivalentes são importantes na estabilização de algumas conformações da dupla hélice (Saenger 1984 e Sinden 1994) e por outro, algumas proteínas altamente específicas, como é o caso das enzimas de restrição, requerem Mg^{+2} na interação com a sequência de reconhecimento. Do ponto de vista físico-químico a descrição de sistemas misto de íons é um teste forte para um modelo polieletrólítico (Manning 1978 e Record et al 1978)

Temos utilizado titulações espectrofotométricas para monitorar a ligação de íons bivalentes, em particular o cálcio (Ca^{+2}), ao DNA. Nestes experimentos alíquotas de uma solução de CaCl_2 , de concentração conhecida, são adicionadas à solução contendo o polieletrólito, sal suporte e um corante, tetrametil murexida, que ao complexar cálcio apresenta um deslocamento em seu pico de absorção de 530 para 490 nm. Deste modo a concentração de íons cálcio livres em solução (Ca_f^{+2}) é monitorada em cada adição de CaCl_2 . Considerando que a concentração total de íons cálcio na solução (Ca_t^{+2}) é composta de uma parte livre (Ca_f^{+2}) e outra ligada (Ca_b^{+2}), pode-se determinar a concentração de íons



ligados pela diferença entre total e livre. Estes dados são analisados através de isotermas de Scatchard: r/Ca^{+2} vs r , onde r é a fração de íons cálcio ligados por grupo fosfato ou por par de base, que no modelo de Manning corresponde a θ_2 . Estes gráficos permitem determinar a energia de ligação destes íons.

C1- ENERGIA DA TRANSIÇÃO B Z INDUZIDA POR ÍONS CÁLCIO

No final dos anos 70 os métodos manuais de síntese de DNA e de cromatografia estavam bem desenvolvidos e permitiam que rapidamente se obtivesse uma quantidade relativamente grande de oligonucleotídeos, com grande pureza. Este avanço abriu a perspectiva para a obtenção de monocristais que deveriam proporcionar melhor resolução em experimentos de difração de raios X do que as fibras. Um dos primeiros monocristais a ter a estrutura resolvida, com grande resolução, foi de um hexa-desoxinucleotídeo de sequência guanina - citosina e a estrutura foi resolvida pelo grupo de Alexander Rich do MIT (Wang et al, 1979).

Surpreendentemente os resultados de difração mostraram uma estrutura bastante diferente daquelas normalmente observadas para o DNA ou RNA (B ou A). A estrutura encontrada era de uma hélice girada para a esquerda cujo esqueleto açúcar-fosfato, ao invés de descrever uma curva suave, apresentava uma forma de zig-zag, e por isto foi denominada estrutura Z por aquele grupo.

Esta conformação é observada para sequências particulares de base purina-pirimidina, especialmente 5' guanina-citosina3' e em menor grau para 5'guanina-timina3', não sendo observada para a sequência 5'adenina-timina3'.

Uma característica da conformação Z é que em relação ao carbono C_1' as guaninas deixam de estar na conformação usual *syn* e passam para *anti*. Para que esta rotação se torne possível, os açúcares ligados à guanina passam da conformação C_3' -endo para C_2' -endo, isto faz com que o esqueleto de açúcar-fosfato deixe de descrever uma curva suave e forme um zig-zag. Para acomodar estas transições e manter o empilhamento de bases fora do contato com o solvente, a dupla hélice gira em sentido contrário (Wang et al, 1979, Rich et al, 1984). Uma mudança conformacional de grande extensão como esta não é facilmente observada em outra macromolécula.

Quando estudavam alterações induzidas por altas concentrações de sal no espectro de dicroísmo circular (CD) de poli(dG-dC)₂, Fritz Pohl e Thomas Jovin (1972) observaram, embora não soubessem interpretar, que as bandas do espectro de CD se invertiam em alta concentração de sal: a banda positiva em 290 nm se tornava negativa e a inversão era observada também para a banda negativa em 240 nm. Após os resultados de Wang et al, (1979) ficou claro que estes espectros eram característicos da conformação Z. Os resultados de Pohl e Jovin (1972) evidenciavam, portanto, a existência desta conformação em solução.

Os pré-requisitos para que esta transição ocorra, além da sequência de bases, são: força iônica alta, baixa atividade de água, aductos com as bases, o estado torcional da dupla hélice e modificações químicas nas bases tal como metilação da citosina. Em geral estas condições estão interrelacionadas, como por exemplo para a sequência poli(dG-dC)₂ a quantidade de sal mono-monovalente necessária para promover a transição B-Z é maior que 5 M e aproximadamente 1 M de sal bi-monovalente (2:1), ao passo que para um polímero similar no qual a citosina foi metilada na posição 5, ié, poli(dG-me5dC)₂, a quantidade de sal 1:1 é menor que 700 mM, enquanto são necessárias concentrações sub-milimolar de sal 2:1.

Experimentos de titulação de cálcio ao poli(dG-me5dC)₂ na presença de 10 mM de NaCl permitiram observar a transição B-Z no gráfico de Scatchard e a partir dele calcular as contribuições energéticas de origem iônica e não iônica nesta transição (Ruggiero et al, 1987). Os experimentos de titulação de cálcio foram acompanhados paralelamente por dicroísmo circular para monitorar a conformação do polímero.

A isoterma de ligação de cálcio apresenta dois ramos descendentes separados por um patamar (fig. 1 artigo anexo). Os dois ramos correspondem à ligação de cálcio às conformações B para os valores mais baixos de $r < 0.2/\text{pb}$ e Z para os valores de $r > 0.35/\text{pb}$. A transição observada ocorre em $\sim 420 \mu\text{M CaCl}_2$, concentração suficientemente baixa para minimizar os efeitos de atividade do solvente, sugerindo a importância de contribuições de origem eletrostáticas nesta transição. Apesar disto observa-se que os íons Ca^{+2} ligam-se mais fortemente à conformação Z que possui menor densidade de cargas que a B ($\xi_Z = 3.85$ e $\xi_B = 4.2$), em aparente desacordo com os dois modelos polieletrólitos. Este fato nos fez pensar, à época, que o cálcio poderia ter ligação específica ao polímero induzindo a transição conformacional.

A segunda informação importante obtida neste trabalho foi o valor da energia livre para transferir íons cálcio da conformação B para a Z, $\Delta G_{\text{Ca, B-Z}}$, na condição de 0.29 íons Ca^{+2} por par de base:

$$\Delta G_{\text{Ca, B-Z}} = RT \ln \{ [\text{Ca}^{+2}]_{\text{fZ}} / [\text{Ca}^{+2}]_{\text{fB}} \} = -0.40 \pm 0.05 \text{ kcal/mol}$$

onde $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{fZ}}$ e $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{fB}}$ são as concentrações de $\text{Ca}^{+2}_{\text{f}}$ em equilíbrio com o polímero a $r=0.29$ nas conformações B e Z. No ponto médio da transição a variação total de energia livre é nula e, ela pode ser escrita como a soma de uma contribuição iônica e outra conformacional. A componente conformacional foi calculada como sendo:

$$\Delta G_{\text{conf, B-Z}} = -r \Delta G_{\text{Ca, B-Z}} = 0.12 \pm 0.02 \text{ kcal/mol pb}$$

Esta energia é da mesma ordem de grandeza que a obtida de experimentos de relaxamento de plasmídeos superhelicoidais que contém inserto de sequência (G-C)_n (Peck e Wang 1985, O'Connor et al 1986). Nestes experimentos a energia livre da transição medida foi de 0.45 kcal/mol pb. É importante lembrar que para esta sequência a quantidade de sal 2:1 necessária para promover a transição é maior do que na sequência que possui a citosina metilada, implicando, portanto, em energia conformacional maior.

Estes dados sugeriam a necessidade de considerar que parte dos íons cálcio teriam que se ligar especificamente ao DNA, pois a ligação mais forte à conformação Z caracterizada por densidade de cargas mais baixa é incompatível com os modelos polieletrólitos. A ligação sítio específica do íon deveria ser necessária para a ocorrência da transição. No sentido de verificar este fato foram realizados experimentos de competição que consistiam em adicionar sal 1:1 à uma solução de poli(dG me5dC)₂ previamente transformado na forma de sal de cálcio. A cada adição de sal 1:1 a conformação do DNA era monitorada através de espectros de CD, sendo que os espectros foram registrados após um tempo necessário para terminar os processos cinéticos envolvidos na transição conformacional.

Na forma de sal de cálcio (poli(dG-me5dC)₂-Ca) e na ausência de sal adicionado, este polímero apresenta espectro de CD característico da conformação Z. Esta foi uma observação importante pois mostrou a existência de conformação Z em água, ié, sem adição

de sal. À medida que sal 1:1 era adicionado a banda negativa em 295 nm do espectro de CD tornava-se menos negativa e passava à positiva, indicando claramente uma reversão conformacional de Z para B. Um gráfico dos valores de intensidade dicróica em 295 nm em função da concentração de sal é uma sigmoide, bastante estreita, sendo que a posição do ponto médio da transição variou de 20 a 40 mM dependendo do tipo de sal (1:1) adicionado. Para o polímero na forma de sal de cálcio ou magnésio, a ordem de efetividade em promover a reversão conformacional foi: $\text{LiCl} > \text{NaCl} \sim \text{KCl}$.

Estes experimentos de competição sugeriram alguns aspectos interessantes tanto do ponto de vista de interação de íons com DNA quanto da transição. O primeiro aspecto que vale destacar é que estes experimentos consistem em troca de contraíons bivalentes por monovalentes e que a partir de uma determinada concentração de sal 1:1, ou seja, depois que uma certa quantidade de íons cálcio foram trocados, houve a reversão conformacional, sugerindo que se a ligação de íons cálcio ao DNA fosse específica ou termodinâmica, ela não seria responsável pela estabilização da conformação Z, pois somente os íons ligados territorialmente seriam deslocados nestes experimentos de competição. Desta forma a ligação sítio específica pode ser necessária, mas não é suficiente para a estabilização da conformação Z.

O segundo aspecto é o da especificidade observada nestes experimentos, mostrando uma ordem de seletividade $\text{Li} > \text{Na} \geq \text{K}$, sugerindo que a ligação destes íons apresenta seletividade à estrutura secundária da dupla hélice.

O terceiro destaque é que esta reversão conformacional ocorre em concentrações de sal nas quais a blindagem eletrostática não é completa, sugerindo a importância destas interações na transição observada.

O caráter polieletrólítico que estes resultados evidenciaram para a transição B-Z poderia ser devido não só à ligação do íon bivalente, mas a alterações nas características elásticas da dupla hélice induzidas por estes íons, tais como, alteração no estado torcional do DNA na troca de íon bivalente pelo monovalente, relaxando a tensão torcional (Peck et al 1985) ou alterando o comprimento de persistência do polímero, o que teoricamente poderia facilitar a reversão conformacional (Wartell et al, 1982 e Manning, 1988).

Anderson e Bauer (1978) realizaram experimentos de relaxamento de plasmídeos super-helicoidais (PM-2) com topoisomerase I na presença de concentrações crescentes (0.05 M até 0.3 M) de LiCl, NaCl e KCl e mediram as alterações no ângulo de torção na dupla hélice induzidas por estes sais. Observaram que o Li induz torção positiva maior que o Na e, este maior que o K, portanto na mesma ordem de seletividade observada para a reversão conformacional. Estes dados parecem sugerir a importância da torção induzida, pelos contraíons monovalentes, no DNA como uma contribuição energética importante na reversão conformacional de Z para B.

C2- SELETIVIDADE IÔNICA E EFEITO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA NA LIGAÇÃO DE CÁLCIO AO DNA

A seletividade iônica às seqüências de bases e às duas estruturas secundárias diferentes (A e B), foi estudada através de experimentos de competição na ligação de cálcio a ácidos nucleicos, através de titulações espectrofotométricas, idêntica à relatada na transição B-Z, na presença de diferentes sais mono-monovalentes (Fossey 1992). As isotermas experimentais foram comparadas às teóricas geradas com a utilização dos dois modelos



polieletrólitos: modelo de condensação de contraíons e modelo de cela. Nestes experimentos os contraíons do polieletrólito (DNA ou RNA) foram trocados através de cromatografia de troca iônica sendo que a força iônica da solução de DNA na forma de sal X (DNA-X) foi ajustada com a adição de XCl, X= Li⁺, K⁺ e Na⁺.

As isotermas de Scatchard na forma de uma curva côncava indicaram um processo anticooperativo de ligação. Um fator que poderia contribuir para a origem da anticooperatividade observada é diminuição da contribuição eletrostática devido a maior eficiência de blindagem dos grupos fosfato pelos íons bivalentes, ié, à medida que os íons monovalentes são trocados por bivalentes, maior é a quantidade de cargas blindadas no polímero e menor é o potencial eletrostático para trazer íons bivalentes contra o fluxo de íons deixando a fase de condensação. Outro fator poderia ser a exclusão de sítios vizinhos devido ao tamanho do íon.

As isotermas de ligação do cálcio ao DNA natural (timo de bezerro) na presença de NaCl, indicaram que a constante de ligação do cálcio é fortemente dependente da força iônica, tabela I, em excelente acordo com a variação predita pelo modelo de Manning:

$$d \ln(K_{obs})/d \ln([NaCl]) = -2$$

ié, para cada íon cálcio ligado dois íons sódio são liberados.

TABELA I

Valores de K_{obs}(0) e d(ln(K_{obs}(0))/d(ln([NaCl])) para diferentes concentrações de NaCl e temperaturas.

[NaCl] (M)	K _{obs} (0) (M ⁻¹) 287 K	K _{obs} (0) (M ⁻¹) 290 K	K _{obs} (0) (M ⁻¹) 298 K	K _{obs} (0) (M ⁻¹) 303 K
0.01	9700±250	7870±200	7050±180	6300±150
0.02	2400±70	2070±50	1750±40	1530±50
0.03	1080±25	950±25	770±20	670±20
d(ln(K))/dln([NaCl])	-1.84	-1.98	-2.05	-1.87

É importante notar que o modelo de Manning descreve explicitamente esta dependência, ao passo que ela não é explícita na EPB. Entretanto, utilizando os valores de constante de ligação calculados de isotermas teóricas geradas pela EPB, em diferentes concentrações de sal 1:1, obtém-se um valor de -1.86 para esta variação, mostrando que os valores experimentais também estão em bom acordo com este modelo.

Os resultados resumidos na tabela I mostraram ainda que a ligação dos íons cálcio é um processo exotérmico, e a entalpia de van't Hoff calculada é: ΔH_{vH} = -0.25 kcal/mol, enquanto os valores obtidos de isotermas geradas com os dois modelos teóricos são -0.15 e +0.45 para os modelos de condensação de contraíons e de cela, respectivamente, indicando melhor acordo com o modelo de condensação de contraíons. O valor de entalpia obtido para o processo de ligação dos íons cálcio ao DNA, em competição com sódio, é característico de ligação territorial ou polieletrólítica (Hales et al, 1982 e Paoletti et al, 1989).

Os valores das constantes de ligação obtidas para o cálcio ao DNA-X na presença de 10mM de XCl para X = Li, Na ou K estão resumidas na tabela II e indicam que o lítio se



liga mais fortemente ao DNA do que os outros dois íons, mostrando que a seletividade de ligação dos íons monovalentes ao DNA é: $\text{Li} > \text{Na} \sim \text{K}$, que foi a mesma observada nos experimentos de reversão conformacional Z-B. A seletividade de íons observadas nestes experimentos foi praticamente a mesma que a observada por outros autores utilizando diferentes técnicas experimentais (Harlon et al 1975, Bleam et al 1980 e Anderson e Bauer 1978). Para a conformação A foi observada a mesma ordem de seletividade, entretanto, independente do íon monovalente usado, os níveis de ligação do cálcio foram quase duas vezes maiores do que para a conformação B, as densidades de cargas nas duas conformações são: $\xi_A = 5.6$ para o RNA e $\xi_B = 4.2$ para o DNA na conformação B, em acordo qualitativo com os dois modelos.

TABELA II

Constantes de ligação do cálcio ao DNA na presença de diferentes contraíons e em 10 mM de sal simples (1:1) destes contraíons.

DNA-X	XCl (=10 mM)	$K_{\text{obs}}(0) \text{ M}^{-1}$
DNA-K	KCl	8200 ± 200
DNA-Na	NaCl	7800 ± 200
DNA-Li	LiCl	3800 ± 100

As constantes de ligação de íons cálcio a polidesoxinucleotídeos sintéticos: $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ e $\text{poly}(\text{dG-dC})_2$, na presença de lítio e sódio, ($\text{poly}(\text{pur-pir})_2\text{-X} + 10 \text{ mM XCl}$), indicaram uma afinidade maior dos dois íons monovalentes à sequência A-T do que à G-C, sendo que para A-T a constante de ligação do cálcio na presença de lítio é o dobro do que na presença de sódio, ao passo que para a sequência G-C a constante de ligação na presença de sódio é 50% maior do que na presença de lítio. As estruturas do DNA para estas sequências são praticamente as mesmas (Saenger, 1984), com exceção do sulco menor que é ligeiramente mais estreito para A-T. A principal diferença entre as duas sequências refere-se ao grau de hidratação: o par A-T, por ter uma ponte de hidrogênio a menos do que o par G-C tem um grupo amina livre na adenina possibilitando pontes de hidrogênio com a água tornando-a mais hidratada do que G-C. Estes dois fatores devem contribuir para a diferença de seletividade observada para estas sequências.

Os dois modelos polieletrólíticos não descreveram a seletividade observada, pois eles são bastante simples e não há como individualizar os diferentes íons especialmente em relação às suas camadas de hidratação; no entanto, a EPB parece descrever melhor a ligação do cálcio na presença de sódio e potássio do que na de lítio, sugerindo que uma pequena parte destes íons (Li) pode ter ligação sítio específica com o DNA. Esta possibilidade foi reforçada nos experimentos de competição nos quais sal 1:1 foi adicionado ao DNA-Ca e RNA-Ca, sendo a fração de íons livres monitorada espectrofotometricamente, mostrado na fig. 1. Para as duas conformações (A e B) o lítio foi mais eficiente em remover íons cálcio do que potássio e sódio.

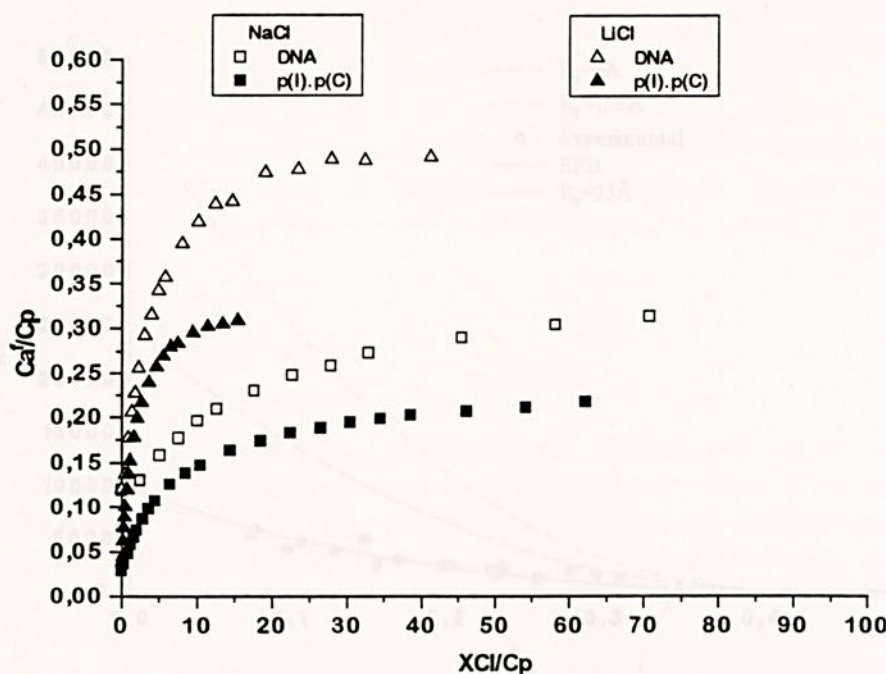


Fig. 1- Gráficos da razão de íons cálcio ligado por grupo fosfato em função da concentração de sal monovalente obtidos de experimentos de competição de DNA e RNA (poli(I).poli(C)) inicialmente como sais de cálcio aos quais foram adicionados sais monovalentes.

As isotermas teóricas geradas com os dois modelos polieletrólíticos, mostraram em todas as situações estudadas, que o modelo de condensação de contraíons estimou sempre níveis de ligação, dos íons bivalentes, mais altos do que os da EPB. Quando foi considerada uma região de condensação definida pela distância na qual as energias eletrostática e térmica do íon são iguais, ié, $e\psi = kT$, as isotermas geradas pelos dois modelos foram praticamente idênticas, fig.2 sugerindo que o modelo de Manning subestima o volume da fase condensada, e conseqüentemente superestima a componente entrópica.



onde δn_M é o número de contraíons monovalentes (M^+) liberados na ligação de cálcio. A constante termodinâmica para formação do complexo pode ser escrita como

$$K_T = \frac{a_{Ca-DNA} a_L^{\delta n_M}}{a_{Ca} a_{DNA}} = K_{obs} a_L^{\delta n_M}$$

onde K_T é a constante termodinâmica; a representam as atividades dos íons cálcio, do DNA e do íon monovalente M^+ . Esta equação pode ser reescrita em termos da constante aparente ou observada

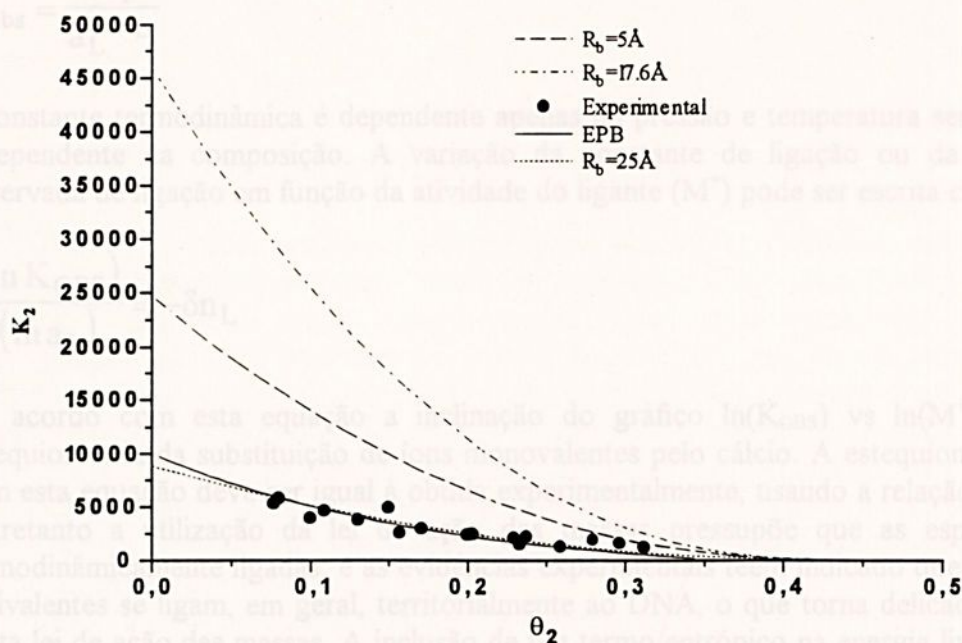
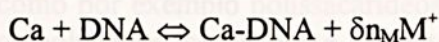


Fig. 2 Gráficos de Scatchard gerados com os dois modelos teóricos para diferentes valores de raio da cela ou de condensação e pontos experimentais relativos a ligação de cálcio ao DNA.

A comparação dos dois modelos de polieletrólitos mostrou que a teoria de condensação de contraíons traz explicitamente uma predição do comportamento da isoterma de ligação de um íon bivalente com a concentração de sal. No modelo de cela só é possível saber este comportamento resolvendo a equação diferencial, que na maior parte das vezes só pode ser resolvida através de métodos numéricos.

Record et al (1978) propuseram uma maneira alternativa para calcular a dependência da constante de ligação em função da concentração de sal no caso em que o modelo polieletrólítico utilizado é a equação de Poisson-Boltzmann. Consideraram o sal como um ligante genérico L na ligação entre o DNA e os íons bivalentes, cujo equilíbrio pode ser descrito em termos da lei de ação das massas:



onde δn_M é o número de contraíons monovalentes (M^+) liberados na ligação de cálcio. A constante termodinâmica para formação do complexo pode ser escrita como:

$$K_T = \frac{a_{\text{CaDNA}} a_L^{\delta n_L}}{a_{\text{Ca}} a_{\text{DNA}}} = K_{\text{obs}} a_L^{\delta n_L}$$

onde K_T é a constante termodinâmica; a_i representam as atividades dos íons cálcio, do DNA e do íon monovalente M^+ . Esta equação pode ser reescrita em termos da constante aparente ou observada:



$$K_{\text{obs}} = \frac{K_T}{a_L^{\delta n_L}}$$

a constante termodinâmica é dependente apenas da pressão e temperatura sendo, portanto, independente da composição. A variação da constante de ligação ou da energia livre observada de ligação em função da atividade do ligante (M^+) pode ser escrita como:

$$\frac{\partial(\ln K_{\text{OBS}})}{\partial(\ln a_L)} = -\delta n_L$$

De acordo com esta equação a inclinação do gráfico $\ln(K_{\text{OBS}})$ vs $\ln(M^+)$ fornece a estequiometria da substituição de íons monovalentes pelo cálcio. A estequiometria prevista com esta equação deve ser igual à obtida experimentalmente, usando a relação de Manning. Entretanto a utilização da lei de ação das massas pressupõe que as espécies estejam termodinamicamente ligadas, e as evidências experimentais têm indicado que os íons mono e bivalentes se ligam, em geral, territorialmente ao DNA, o que torna delicado a aplicação desta lei de ação das massas. A inclusão de um termo entrópico na energia livre do sistema torna o modelo similar ao de condensação de contraíons:

$$\Delta G_{\text{OBS}} = \Delta G_o + NRT \ln[M^+]$$

onde ΔG_o é a energia livre padrão que contém a dependência iônica e não iônica e o outro termo é uma contribuição entrópica. Esta equação conduz a uma relação idêntica a proposta por Record et al (1978), sem haver a necessidade de considerar a ligação termodinâmica de íons. É importante reforçar que a estequiometria de troca obtida por qualquer destes métodos é a inclinação da reta no gráfico $\ln K_{\text{obs}}$ vs $\ln[M^+]$, que no caso de ligação de cálcio foi próxima de 2. O valor predito pela teoria de condensação de contraíons é mais realista do que o previsto por Becquet e Rossky (1988) utilizando um modelo mais sofisticado de "hypernetted chain", no qual calcularam que, para cada íon bivalente ligado um único íon monovalente é liberado.

Os dois modelos se mostraram muito sensíveis ao parâmetro de cargas. Esta sensibilidade é tão marcante que o utilizamos para caracterizar polieletrólitos mais flexíveis, como por exemplo polissacarídeos e para descrever as curvas de titulação potenciométricas de poliácidos fracos, que é o ponto mais delicado dos modelos polieletrólíticos existentes.

Um destes trabalhos foi de caracterizar polissacarídeos naturais que presumia-se possuir cadeias laterais e polissacarídeos quimicamente modificados, quanto ao número de grupos carregados e à afinidade de ligação com íons cálcio. Embora aparentemente a caracterização de polissacarídeos nada tenha a ver com ácidos nucléicos, deve ser ressaltado que a descrição de polieletrólitos mais flexíveis pode ajudar na compreensão de fenômenos que ocorrem com ácidos nucléicos, pois muitos ligantes têm afinidade por fita simples que são bem mais flexíveis que a fita dupla. Por outro lado a titulação potenciométrica de poliácidos fracos envolve, em geral, a extensão da cadeia polieletrólítica, que é muito semelhante ao que ocorre com os ácidos nucléicos quando interagem com agentes intercalantes (Friedman et al, 1984). Estes estudos forneceram subsídios para melhor



correlacionar as alterações de longo alcance, elásticas e torcionais, com as contribuições eletrostáticas, que têm grande importância na atividade biológica dos ácidos nucleicos.

C-3 DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO DE POLIÁCIDOS

Em um destes trabalhos (Ruggiero et al 1994) o sistema estudado foi um polissacarídeo altamente sulfatado extraído do pepino do mar. Através de análise química foi possível estimar as razões molares dos diferentes constituintes deste polissacarídeo: ácido glucurônico 30%, galactosamina 39% e fucoses 31% que, em adição aos ensaios de digestão enzimática com condroitinase, permitiram propor a estrutura deste polissacarídeo como uma cadeia principal de condroitin-6-sulfato e cadeias laterais de duas fucoses sulfatadas. O objetivo do trabalho era a caracterização físico-química deste polissacarídeo em relação à sua densidade de cargas, pois através da distância entre os grupos carregados na cadeia seria possível constatar a estrutura proposta. Pretendia-se ainda estimar a afinidade do polissacarídeo por íons cálcio.

Este sistema apresenta um interesse especial, pois além de ser relativamente flexível, possui dois tipos diferentes de grupos ácidos: um forte, o grupo sulfato e, um fraco, a carboxila. Os modelos polieletrólitos em geral descrevem o comportamento de poliácidos fracos em relação aos experimentos de titulações ácido-base, desta forma este consistiria um bom teste do modelo de Manning, especialmente no que refere ao parâmetro de cargas e à descrição do fator de transporte. Outro ponto importante é determinar uma distribuição média de grupos carregados pois o grau de substituição destes polímeros é muito heterogêneo.

Experimentalmente foi utilizada a medida do fator de transporte do polieletrólito para determinar sua densidade de cargas e conseqüentemente a distância entre grupos carregados ao longo da cadeia. O fator de transporte é obtido em experimentos de titulação condutimétrica, do polímero na forma ácida, com pelo menos duas bases diferentes (LiOH e KOH). A densidade de carga foi calculada a partir do fator de transporte de acordo com o modelo proposto por Manning (1975).

Os valores de densidade de cargas, distância entre os grupos carregados e número médio de grupos carregados por unidade repetitiva, para os polissacarídeos: nativo, quimicamente modificado, condroitin-6-sulfato nativo e modificado e ácido hialurônico estão sumariados na tabela III



TABELA III

Valores de densidade de cargas, distância entre os grupos carregados e número médio de grupos carregados por unidade repetitiva, para condroitin fucosilado, condroitin-6-sulfato, e ácido hialurônico nativos e quimicamente modificados.

POLÍMERO	MODIF. QUÍMICA	f	ξ	b (Å)	Nº MÉDIO DE GRUPOS POR UNID. REPETITIVA
condroitin fucosilado	nativo	0.34 ± 0.01	2.56	2.79	3.65
condroitin fucosilado	carboxi reduzido	0.45 ± 0.01	1.93	3.70	2.75
condroitin fucosilado	dessulfatado	0.92 ± 0.02	0.75	9.52	1.07
condroitin sulfato	nativo	0.62 ± 0.02	1.40	5.10	2.00
condroitin sulfato	carboxi reduzido	0.93 ± 0.02	0.70	10.20	1.00
ácido hialurônico	nativo	0.94 ± 0.02	0.64	11.10	0.91

Estes resultados confirmaram o modelo proposto segundo o qual o polímero nativo, denominado condroitin-fucosilado, é composto por uma cadeia principal de condroitin-6-sulfato e cadeias laterais compostas de duas fucoses sulfatadas sendo que em média o número de grupos sulfato é 2.75.

As isotermas de ligação de cálcio indicaram uma alta afinidade destes íons para o condroitin fucosilado, certamente devido à presença das cadeias laterais carregadas. As isotermas obtidas para estes polissacarídeos foram bifásicas devido à presença dos dois grupos: sulfato e carboxila. A utilização de polímeros modificados permitiu fazer a deconvolução das constantes de ligação aos dois sítios. A constante de ligação do cálcio à carboxila foi $\sim 1200 \text{ M}^{-1}$ ao passo que para o grupo sulfato do condroitin-6-sulfato foi 3600 M^{-1} , e deste grupo para o condroitin fucosilado foi cinco vezes maior, indicando a alta afinidade possivelmente devido à presença das cadeias laterais.

Ao nível de informação do comportamento de polieletrólito em solução certamente a contribuição mais importante deste trabalho foi a descrição do perfil das curvas de titulação ácido-base destes polissacarídeos, sugerindo que esta descrição poderia contribuir para o entendimento de possíveis mudanças conformacionais relacionadas ao processo de ionização de um políácido fraco.

Este método foi então aplicado para ajustar a curva de titulação potenciométrica do ácido poligalacturônico e do ácido poli-L-glutâmico, dois políácidos fracos que apresentam uma mudança conformacional tipo hélice-hélice estendida (Ruggiero et al 1994). Devido à transição conformacional a curva de titulação potenciométrica, pK vs α , deixa de ser uma curva suave, como seria de se esperar para um polieletrólito, e passa a apresentar um ombro na região correspondente a graus de dissociação relativamente baixos ($\alpha \sim 0.4$). A presença deste ombro dificulta a obtenção da constante intrínseca de dissociação do políácido.

Esta mudança conformacional tem origem no processo de ionização do políácido fraco. Na forma ácida os prótons tem ligação relativamente forte e blindam as cargas das carboxilas, à medida que a base titulante é adicionada os prótons são trocados pelos cátions da base que se ligam mais fracamente à estes grupos, blindando menos as cargas do que os prótons. Estes grupos passam então a apresentar uma pequena carga residual. O número de grupos com cargas residuais aumenta à medida que a titulação evolui e, conseqüentemente, entre eles passa a existir uma forte interação repulsiva, resultando na extensão da cadeia polimérica. Apesar de ter sua origem no efeito polieletrólítico, a presença do ombro dificulta a descrição da curva pK vs α com base nos dois modelos existentes e, por isto, é um dos pontos mais delicados destes modelos, e que vale a pena ser melhor explorado.

A estratégia utilizada foi de determinar o fator de transporte para cada adição de base titulante e, com estes dados, obter um gráfico da distância entre as cargas em função do grau de dissociação (α). Este gráfico permitiu calcular os valores de densidades de cargas que caracterizam as duas conformações, antes e depois da transição. Com estes valores, e supondo um modelo de dois estados para descrever a transição, foi possível calcular os valores intermediários de densidade de cargas, que foram utilizados na equação de Poisson-Boltzmann para calcular os valores de pK correspondentes, permitindo descrever toda a curva pK vs α , como mostrado no artigo anexo.

...and through superimposing
...of ionic and nonionic
(conformational, solvation, etc.) effects.

By measuring the calcium binding to poly(dGdn²C) using the metallochromic indicator tetramethylammonium (TMM), we have been able to evaluate (a) the free energy of calcium ion transfer from B to Z conformations and (b) the other (monovalent ion and nonionic) contributions to the free-energy change for the methylated alternating polynucleotide in aqueous solution. With these results and with the assumption that calcium transfer free energy does not appreciably depend upon the base sequence, a possible rationalization of the behavior of different alternating polynucleotides toward calcium ion addition is suggested.

Poly(dGdn²C) is known to undergo a B-Z transition at very low ionic strength by addition of alkaline earth ions.² We have obtained the modified Scatchard plot (K_d , 1) for the system Ca^{2+} -poly(dGdn²C) in aqueous 10 mM NaCl at 17°C by using TMM as an indicator of the amount of free calcium ion in solution. In fact, it is well known that TMM changes its absorption spectrum when it reversibly binds Ca^{2+} ion,³ and consequently analytical methods for the spectrophotometric determination of Ca^{2+} activity or concentration have been devised.^{4,5} No spectral evidence of a direct interaction between TMM and DNA was found, in accord with the ionic nature of this dye. Very accurate spectrophotometric data have been obtained with a Cary 219 using the metallochromic indicator TMM, which binds reversibly Ca^{2+} with a 1:1 stoichiometry and with a stability constant that, in our experimental conditions, resulted $K_d = 650 \pm 30 M^{-1}$; its visible absorption band ($\epsilon_{420}^{Ca^{2+}} = 12,800 M^{-1} cm^{-1}$)⁶ undergoes an hyper- and hypochromic effect as a consequence of Ca^{2+} binding ($\epsilon_{420}^{Ca^{2+}} = 26,000 M^{-1} cm^{-1}$).⁶ To a 10 mM NaCl aqueous solution of poly(dGdn²C), previously eluted through a Na^+ form ion exchange column, $c = 2.0 \cdot 10^{-3} M$ (per phosphate, $\epsilon_{260}^{Ca^{2+}} = 7,100 M^{-1} cm^{-1}$), containing $10^{-4} M$ TMM, small aliquots of 10 mM $CaCl_2$ were added. The absorbances at 420 and 580 nm were accurately measured

*On leave of absence from Physics Department, Institute of Chemistry—UNESP, 13100-0, José do Rio Preto (SP), Brazil.

Biopolymers, Vol. 24, 1875-1879 (1987)
© 1987 John Wiley & Sons, Inc.

CCC 0006-3525/87/111875-05\$04.00



Ionic and Nonionic Contributions to the Free-Energy Change in the B-Z Transition of Alternating Polydeoxynucleotides in Aqueous Solution

JOÃO RUGGIERO,* GIORGIO MANZINI, *Department of Biochemistry, Biophysics, and Macromolecular Chemistry, University of Trieste, 34127 Trieste, Italy*; and FRANCO QUADRIFOGLIO, *Institute of Biology, University of Udine, 33100 Udine, Italy*

DNA can adopt a left-handed Z-conformation when alternating purine-pyrimidine sequences (with the apparent exception of AT) experience reduced water activity (obtained by addition of salts¹ or organic solvents²) or high topological stress.^{3,4} However, (dGdm⁵C)_n sequences can be converted to Z-structures even at low ionic strengths and without topological stresses by the presence of low amounts of calcium ions.⁵ In analogous conditions sequences such as (dGdC)_n⁵ or (dGdT)_n⁶ do not undergo the B-Z conversion. On the other hand, overall free-energy changes related to the B-Z conversion for (dGdC) and (dGdT) sequences have been evaluated through supercoiling relaxation measurements.^{7,8} This ΔG is, however, comprehensive of ionic and nonionic (conformational, solvation, etc.) effects.

By measuring the calcium binding to poly(dGdm⁵C) using the metallochromic indicator tetramethylmurexide (TMM), we have been able to evaluate (a) the free energy of calcium ion transfer from B to Z conformation and (b) the other (monovalent ion and nonionic) contributions to the free-energy change for the methylated alternating polynucleotide in aqueous solution. With these results and with the assumption that calcium transfer free energy does not appreciably depend upon the base sequence, a possible rationalization of the behavior of different alternating polynucleotides toward calcium ion addition is suggested.

Poly(dGdm⁵C) is known to undergo a B-Z transition at very low ionic strength by addition of alkaline earth ions.⁵ We have obtained the modified Scatchard plot (Fig. 1) for the system Ca²⁺-poly(dGdm⁵C) in aqueous 10 mM NaCl at 17°C by using TMM as an indicator of the amount of free calcium ion in solution. In fact, it is well known that TMM changes its absorption spectrum when it reversibly binds Ca²⁺ ion,⁹ and consequently analytical methods for the spectrophotometric determination of Ca²⁺ activity or concentration have been devised.^{10,11} No spectral evidence of a direct interaction between TMM and DNA was found, in accord with the anionic nature of this dye. Very accurate spectrophotometric data have been obtained with a Cary 219 using the metallochromic indicator TMM, which binds reversibly Ca²⁺ with a 1:1 stoichiometry and with a stability constant that, in our experimental conditions, resulted $K_{st} = 650 \pm 30 M^{-1}$; its visible absorption band ($\epsilon_{max}^{530} = 13,800 M^{-1} cm^{-1}$)¹⁰ undergoes an hyper- and hypsochromic effect as a consequence of Ca²⁺ binding ($\epsilon_{max}^{490} = 20,000 M^{-1} cm^{-1}$).¹⁰ To a 10 mM NaCl aqueous solution of poly(dGdm⁵C), previously eluted through a Na⁺ form ion exchange column, $c = 2.0 \cdot 10^{-3} M$ (per phosphate, $\epsilon_{max}^{255} = 7,100 M^{-1} cm^{-1}$), containing $10^{-4} M$ TMM, small aliquots of 10 mM CaCl₂ were added. The absorbances at 490 and 530 nm were accurately measured

*On leave of absence from Physics Department, Institute of Biosciences—UNESP, 15100 S. José do Rio Preto (SP), Brazil.

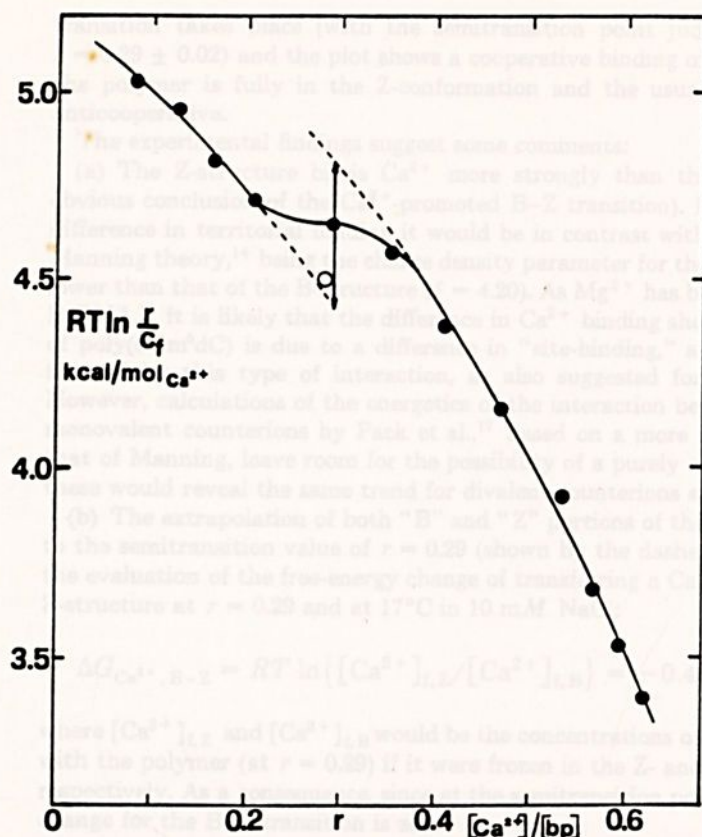


Fig. 1. Plot of $RT \ln(r/c_1)$ vs r for the system Ca^{2+} -poly(dGdm⁵C) in aqueous 10 mM NaCl solution at 17°C. The usual Scatchard plot has been modified in order to directly obtain the $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}}$ value. (●) Equilibrium values, and (○) value obtained soon after the addition of the amount of calcium ion that promoted the B-Z transition and before the equilibrium was reached, when the polymer was still largely in the B-conformation.

after equilibrium was reached (which was checked by means of the CD signal at 295 nm, recorded with a Jasco J-500 A). The ratio of the absorbances $R = A^{295}/A^{630}$ was used through a slight modification of the methods reported in the literature^{10,11} to obtain the free and TMM-bound Ca^{2+} concentrations and, as difference from the total added amount, the polymer-bound Ca^{2+} concentration. It is worth noting that only quartz and plastic containers were used and contact with glassware avoided since even short periods of the storage of aqueous solutions of the sodium salt of poly(dGdm⁵C) in glass promoted the B to Z transition in the absence of added calcium. Since Z-DNA is known to be rather prone to aggregation,^{12,13} sedimentation measurements were performed by means of an analytical ultracentrifuge Beckman Model E: the sedimentation coefficients (and the boundary patterns) in 0.01M NaCl resulted to be nearly equal for B-poly(dGdm⁵C) (no Ca^{2+} added: $s = 7.4 \pm 0.2$) and for Z-poly(dGdm⁵C) (in the presence of a nearly equivalent amount of Ca^{2+} : $s = 7.1 \pm 0.2$), ruling out the presence of aggregation in this case.

The modified Scatchard plot exhibits three distinct features: (a) in the range of r [moles of Ca^{2+} bound per mole of base pair (bp)] up to 0.2 the polymer is in the B-conformation (as evidenced by parallel CD spectra) and the usual Scatchard plot (not reported) is typically anticooperative; (2) within the range of $r = 0.2$ –0.4 the B-Z

transition takes place ($r = 0.29 \pm 0.02$) and the polymer is fully in the Z-conformation.

The experimental findings lead to the following conclusions:

(a) The Z-structure is in obvious conclusion of the difference in territoriality of the B-DNA,¹⁴ being lower than that of the B-DNA,¹⁵ it is likely that the Z-structure of poly(dGdm⁵C) is disfavored by this type of monovalent counterion. However, calculations of Manning, leave these results to be revealed.

(b) The extrapolation to the semitransition value of the evaluation of the free energy of the Z-structure at $r = 0.29$

$$\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}} = RT$$

where $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{f,z}}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{b,z}}$ with the polymer (at r respectively). As a consequence, the change for the B-Z tra

one can evaluate the effects, Na^+ ion intera

$$\Delta G_{\text{conf, B-Z}}$$

A word of caution is in transferring one mole of the process described by the process described by $(r_{\text{B}} = 0.25 \text{ ca. and } r_{\text{Z}} = 0.29 \text{ ca.})$ semitransition free energy assumption that $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}}$ parallelism of the B- and Z-DNA (1) into Eq. (2). In regard to the present to ones; anyway, it can be particularly if one considers the amount of Ca^{2+} bound interactions for this for

The overall free-energy of (dGdC)_n and (dGdT)_n plasmids containing sequences, values of 0.

transition takes place (with the semitransition point judged from CD spectra at $r = 0.29 \pm 0.02$) and the plot shows a cooperative binding of Ca^{2+} ; (3) beyond $r = 0.4$ the polymer is fully in the Z-conformation and the usual Scatchard plot is again antiooperative.

The experimental findings suggest some comments:

(a) The Z-structure binds Ca^{2+} more strongly than the B-structure (this is an obvious conclusion of the Ca^{2+} -promoted B-Z transition). If this were due only to a difference in territorial binding it would be in contrast with the simple condensation Manning theory,¹⁴ being the charge density parameter for the Z double helix ($\xi = 3.85$) lower than that of the B-structure ($\xi = 4.20$). As Mg^{2+} has been found "site bound" to B-DNA,¹⁵ it is likely that the difference in Ca^{2+} binding shown by the two structures of poly(dGm⁵dC) is due to a difference in "site-binding," as the Z-structure is more favored by this type of interaction, as also suggested for Mg^{2+} by Chen et al.¹⁶ However, calculations of the energetics of the interaction between poly(dGdm⁵C) and monovalent counterions by Pack et al.,¹⁷ based on a more sophisticated model than that of Manning, leave room for the possibility of a purely electrostatic interaction, if these would reveal the same trend for divalent counterions as well.

(b) The extrapolation of both "B" and "Z" portions of the modified Scatchard plot to the semitransition value of $r = 0.29$ (shown by the dashed curves of Fig. 1) allows the evaluation of the free-energy change of transferring a Ca^{2+} ion from the B- to the Z-structure at $r = 0.29$ and at 17°C in 10 mM NaCl:

$$\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}} = RT \ln \{ [\text{Ca}^{2+}]_{\text{f,Z}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{f,B}} \} = -0.40 \pm 0.05 \text{ kcal/mol} \quad (1)$$

where $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{f,Z}}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{f,B}}$ would be the concentrations of free Ca^{2+} in equilibrium with the polymer (at $r = 0.29$) if it were frozen in the Z- and in the B-conformations, respectively. As a consequence, since at the semitransition point the global free energy change for the B-Z transition is zero

$$\Delta G_{\text{B-Z}} = 0 = r \Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}} + \Delta G_{\text{conf, B-Z}} \quad (2)$$

one can evaluate the other (i.e., conformational and related solvent rearrangement effects, Na^+ ion interaction) free-energy change:

$$\Delta G_{\text{conf, B-Z}} = -r \Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}} = 0.12 \pm 0.02 \text{ kcal/mol bp}$$

A word of caution is due at this point: $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}}$ in Eq. (1) refers to the process of transferring one mole of Ca^{2+} from B- to Z-poly(dGdm⁵C), both at $r = 0.29$, whereas the process described by Eq. (2) is the transition from B to Z at their different r values ($r_{\text{B}} = 0.25$ ca. and $r_{\text{Z}} = 0.33$ ca., according to the results) of equilibrium at the semitransition free Ca^{2+} concentration ($0.9 \cdot 10^{-4} M$). However, the validity of the assumption that $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}}$ is independent of r , which is supported by the near parallelism of the B- and Z-curves in Fig. 1, implies the correctness of introducing Eq. (1) into Eq. (2). In regard to the other components of the free-energy change, it is not possible at present to separate the Na^+ interaction contribution from the nonionic ones; anyway, it can be expected that this contribution is not very relevant, particularly if one considers the opposing effects of Na^+ release in consequence of a higher amount of Ca^{2+} bound to the Z-form and of the higher level of the electrostatic interactions for this form suggested by the calculations of Pack et al.¹⁷

The overall free-energy change per base pair has been experimentally determined for (dGdC)_n and (dGdT)_n sequences through supercoiling relaxation measurements of plasmids containing segments of these Z-helicogenic sequences.^{7,8} For (dGdC)_n sequences, values of 0.45⁷ and 0.42⁸ kcal/mol bp have been reported. For (dGdT)_n

sequences, a value of 0.85 kcal/mol bp has been evaluated.⁸

A comparison with our results needs a preliminary notice: these values include an ionic contribution due to the interaction with the monovalent counterions, which in principle is different from that present in our experiment (absence vs. presence of divalent cations, respectively). Anyway, this difference should not constitute a significant part of the overall free-energy change. Once this is accounted for, the difference of about 0.3 kcal/mol bp between (dGdC)_n and (dGdm⁵C)_n in $\Delta G_{\text{conf, B-Z}}$ could be mainly ascribed to the presence of the 5-methyl group on the cytosine, in accord with the well-known evidence that the methylation of cytosine favors the left-handed conformation in the B-Z equilibrium.^{5,18} From a semiquantitative point of view, however, our result for $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}}$ could provide a rather straightforward justification of the experimental finding that unmethylated poly(dGdC) undergoes the B to Z transition only at a concentration of Ca²⁺ higher than 0.1M⁵; in fact, only in this condition can Ca²⁺ bind nearly quantitatively to the polymer, developing almost fully its Z-stabilizing potential (-0.4 kcal/mol of Ca²⁺) to counterbalance the "conformational" reluctance to assume the left-handed conformation (about +0.4 kcal/mol bp). In view of the ignorance of the Na⁺ ion contribution, this consideration cannot be brought beyond a speculative level; however, the coincidence of the two values might not be casual. Moreover, the experimental finding that both Ca²⁺ salt (data not shown) and Mg²⁺ salt¹³ of poly(dGdC) assume the B-conformation when dissolved in water in the absence of competing monovalent ions indicates that a level of binding not too far from 88% charge saturation (as calculated according to Manning¹⁴) is not yet sufficient to induce the transition at room temperature; however, an increase of temperature promotes the B to Z transition at about 75°C, for both Ca²⁺ salt (data not shown) and Mg²⁺ salt,¹³ suggesting that in this case the balance between $\Delta G_{\text{conf, B-Z}}$ and $r\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}}$ is not too far from zero. Analogously, that the free-energy change determined for (dGdT)_n sequences inserted in plasmids is markedly higher (+0.85 kcal/mol bp) is in accord with the observation that the presence of Ca²⁺, even at very high concentration, is not sufficient per se to promote the B-Z transition of linear poly(dGdT) · poly(dAdC),⁶ always in the assumption that $\Delta G_{\text{Ca}^{2+}, \text{B-Z}}$ is not too different from the case of poly(dGdm⁵C).

This work was carried out with the financial support of the Italian Ministry of Education, J. R. acknowledges ICTP (Trieste, Italy), CNPq (Brazil), and FAPESP (Brazil) for financing his stay in Trieste.

References

1. Pohl, F. M. & Jovin, T. M. (1972) *J. Mol. Biol.* **67**, 375-396.
2. Pohl, F. M. (1976) *Nature* **260**, 365-366.
3. Peck, L. J., Nordheim, A., Rich, A. & Wang, J. C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4560-4564.
4. Singleton, C. K., Klysik, J., Stirdivant, S. M. & Wells, R. D. (1982) *Nature* **299**, 312-316.
5. Behe, M. J. & Felsenfeld, G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1619-1623.
6. Zimmer, C., Tymen, S., Marck, C. & Guschlbauer, W. (1982) *Nucleic Acids Res.* **10**, 1081-1091.
7. Nordheim, A., Lafer, E. M., Peck, L. J., Wang, J. C., Stollar, B. D. & Rich, A. (1982) *Cell* **31**, 309-318.
8. O'Connor, T. R., Kang, D. S. & Wells, R. D. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13302-13308.
9. Raaflaub, J. (1951) *Z. Physiol. Chem.* **288**, 228-236.
10. Kohn, R. & Furda, I. (1967) *Coll. Czech. Chem. Commun.* **32**, 1925-1937.
11. Kwak, J. C. T. & Joshi, Y. M. (1981) *Biophys. Chem.* **13**, 55-64.
12. van de Sande, J. H., McIntosh, L. P. & Jovin, T. M. (1982) *EMBO J.* **1**, 115-120.

13. Behe, M. J., Felsenfeld, G.
14. Manning, G. S. (1978) *Qu.*
15. Murk Rose, D., Bleam, M. *Sci. USA* **77**, 6289-6292.
16. Chen, H. H., Behe, M. J. &
17. Pack, G. R., Prasad, C. V.
18. Fujii, S., Wang, A. H.-J., *Acids Res.* **10**, 7879-7892.

Received March 3, 1987

Accepted June 3, 1987

13. Behe, M. J., Felsenfeld, G., Szu, S. C. & Charney, E. (1985) *Biopolymers* **24**, 289-300.
14. Manning, G. S. (1978) *Quart. Rev. Biophys.* **11**, 179-246.
15. Murk Rose, D., Bleam, M. L., Record, M. T., Jr. & Bryant, R. G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6289-6292.
16. Chen, H. H., Behe, M. J. & Rau, D. C. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 2381-2389.
17. Pack, G. R., Prasad, C. V., Salafsky, J. S. & Wong, L. (1986) *Biopolymers* **25**, 1697-1715.
18. Fujii, S., Wang, A. H.-J., van der Marel, G., van Boom, J. H. & Rich, A. (1982) *Nucleic Acids Res.* **10**, 7879-7892.

Received March 3, 1987

Accepted June 3, 1987

João Ruggiero¹, Ricardo P. Vieira², Paulo A.S. Mourão^{1*}

¹ Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Caixa Postal 135, São José do Rio Preto, SP, 13084-900, Brazil

² Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 689, Rio de Janeiro, RJ, 21941-900, Brazil

(Received May 24th, 1987; accepted as revised form October 2nd, 1987)

Abstract

Calcium binding and charge distribution on a fucosylated chondroitin sulfate and a standard chondroitin 6-sulfate have been studied using a metallochromic indicator and conductometric titrations. The fucosylated chondroitin sulfate has a ~5-fold greater affinity for calcium ions than the standard chondroitin 6-sulfate. Possibly, this increased affinity for calcium ions is due to the branches on the fucosylated chondroitin sulfate, since the calcium affinity of an unbranched, sulfated furan is similar to that of the standard chondroitin 6-sulfate. More charged groups per disaccharide unit (and a shorter distance between these groups) also distinguish the fucosylated chondroitin sulfate from standard chondroitin 6-sulfate. Comparison between native and chemically modified (desulfated or carbonyl-reduced) polysaccharides suggests that the sulfate esters are responsible for the increased charge density of the fucosylated chondroitin sulfate and that the presence of the furanose branches does not alter the length of the repetitive units which compose the central core of chondroitin from sea cucumber. These results are consistent with the chemical studies of these two polysaccharides.

1. Introduction

Recently, we have isolated sulfated polysaccharides from different invertebrate connective tissues and compared them with the well known glycosaminoglycans that occur in vertebrate tissues. Novel sulfated polysaccharides were found in the tunic of ascidians [1-7] and the body wall of a sea cucumber [8-10].

* Corresponding author.

Increased calcium affinity of a fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber

João Ruggiero ^a, Ricardo P. Vieira ^b, Paulo A.S. Mourão ^{b,*}

^a Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Caixa Postal 136, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil

(Received May 24th, 1993; accepted in revised form October 2nd, 1993)

Abstract

Calcium binding and charge distribution on a fucosylated chondroitin sulfate and a standard chondroitin 6-sulfate have been studied using a metallochromic indicator and conductimetric titrations. The fucosylated chondroitin sulfate has a ~ 5-fold greater affinity for calcium ions than the standard chondroitin 6-sulfate. Possibly, this increased affinity for calcium ions is due to the branches on the fucosylated chondroitin sulfate, since the calcium affinity of an unbranched, sulfated fucan is similar to that of the standard chondroitin 6-sulfate. More charged groups per disaccharide unit (and a shorter distance between these groups) also distinguish the fucosylated chondroitin sulfate from standard chondroitin 6-sulfate. Comparison between native and chemically modified (desulfated or carboxyl-reduced) polysaccharides suggests that the sulfate esters are responsible for the increased charge density of the fucosylated chondroitin sulfate and that the presence of the fucose branches does not alter the length of the repetitive units which compose the central core of chondroitin from sea cucumber. These results are consistent with the chemical studies of these two polysaccharides.

1. Introduction

Recently, we have isolated sulfated polysaccharides from different invertebrate connective tissues and compared them with the well known glycosaminoglycans that occur in vertebrate tissues. Novel sulfated polysaccharides were found in the tunic of ascidians [1–7] and the body wall of a sea cucumber [8–10].

* Corresponding author.

The presence of fucose-rich sulfated polysaccharides have been reported in the body wall of sea cucumber [8–14]. We found that the main fraction of these sulfated polysaccharides has a chondroitin sulfate-like structure, containing unexpectedly large numbers of sulfated α -L-fucopyranose branches linked to position 3 of the β -D-glucuronic acid residues [9,10]. Methylation analysis and NMR spectroscopy revealed that the position of the glycosidic linkage and the site of sulfation in the fucose branches were extremely heterogeneous. We proposed a preponderance of disaccharide units formed by 3,4-di-*O*-sulfo- α -L-fucopyranosyl units glycosidically linked through position 1 $\rightarrow$ 2 to 4-*O*-sulfo- α -L-fucopyranose (1, Fig. 1).

The ability of glycosaminoglycans to complex divalent cations, especially calcium, is an important biological function of this class of polysaccharide. Comparison of the calcium affinities of different glycosaminoglycans has been useful in correlating biological function with physicochemical properties [15–18]. Different experimental approaches have been used to study calcium-glycosaminoglycan interactions, and the order of their affinity for calcium ions is heparin > chondroitin sulfate > keratan sulfate > hyaluronic acid [18–20]. Values of association constants determined by equilibrium dialysis vary from 31 900 M⁻¹ (heparin) to 710 M⁻¹ (hyaluronic acid) [18]. These results suggest that the affinity for calcium decreases with the decrease in number of charged groups per disaccharide unit.

The main purpose of the present work is to compare the charge distributions of the fucosylated chondroitin sulfate and of the standard chondroitin 6-sulfate, in order to determine the contribution of the sulfated fucose branches to the binding of calcium ions.

2. Experimental

Native and chemically modified polysaccharides.—Standard chondroitin 6-sulfate from shark cartilage and hyaluronic acid from umbilical cord were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Fucose-branched chondroitin sulfate and sulfated fucan were extracted from the body wall of the sea cucumber *Ludwigothurea grisea* by papain digestion, and purified by procedures previously described [10]. Purification procedures of the fucosylated chondroitin sulfate involve two subsequent columns of DEAE-cellulose, as described [10]. Desulfation of the glycosaminoglycans by solvolysis in Me₂SO [21] and reduction of the hexuronic acid carboxyl groups in the polysaccharide by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-NaBH₄ [22] were performed as described previously. Yield and integrity of the polysaccharides obtained after these two procedures were the same as in our previous study [9,10].

Chemical analysis of the polysaccharides.—Hexuronic acid was measured by the carbazole reaction [23], total methyl pentose by the method of Dische and Shettles [24], and total hexose by the method of Dubois et al. [25]. After acid hydrolysis of the polysaccharide (6.0 N HCl at 100°C for 6 h), total hexosamine was measured by a modified Elson–Morgan reaction [26], and sulfate by the BaCl₂–gelatin method



R = H or

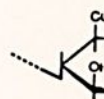


Fig. 1. Pro-cucumber disaccharide acid moiety. Me₂SO-m groups with acid residues the sea cucumber chondroitin

[27]. The hydrolyzed alditol ac-pyridine-

Conduc polysaccharide 50W-XB metric analysis from E. N

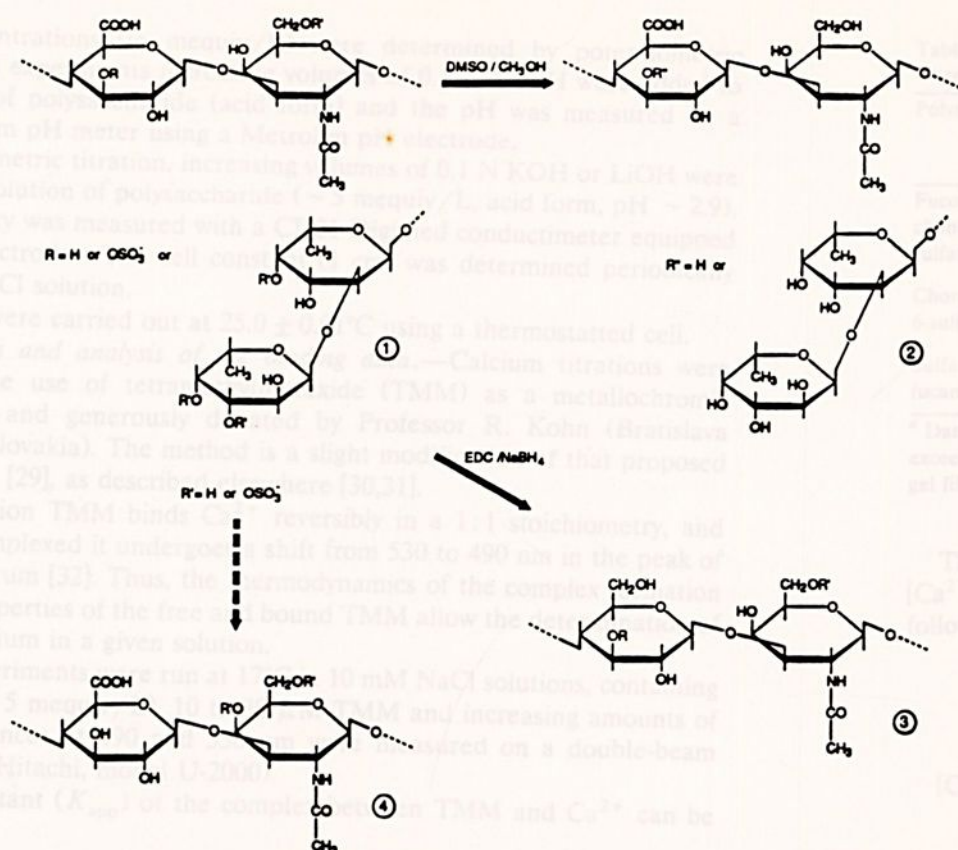


Fig. 1. Proposed structure of the major components of the fucosylated chondroitin sulfate of the sea cucumber before (1) and after chemical modifications (2-4). The polymer contains side chains of disaccharide units of sulfated α -L-fucopyranosyl linked to approximately one-half of the β -D-glucuronic acid moieties through the 0-3 position of the acid (1). Desulfation of this polysaccharide by solvolysis in Me_2SO -methanol yields the structures shown in 2, whereas reduction of hexuronic acid carboxyl groups with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)- NaBH_4 transforms the glucuronic acid residues of the polysaccharide in glucose (3). The sulfated fucose branches can be removed from the sea cucumber polysaccharide by mild hydrolysis with acid to give a polymer similar to standard chondroitin 4- or 6-sulfate (4). See text for other comments.

[27]. The percentages of hexoses, methyl pentoses and hexosamines in the acid hydrolyzates were estimated by gas-liquid chromatography of the corresponding alditol acetates [28] and by paper chromatography in (3:2:1) *n*-butanol-pyridine-water for 48 h.

Conductimetric and potentiometric titrations.—Native and chemically modified polysaccharides were converted to the acid form by passage through a Dowex 50W-XB cation exchange column (Sigma). The hydroxides used in both potentiometric and conductimetric titrations were purchased as standardized solutions from E. Merck A.G. (Darmstadt, Germany).

Polymer concentrations (in mequiv/L) were determined by potentiometric titrations. In these experiments increasing volumes of 0.1 N NaOH were added to a 5 mL solution of polysaccharide (acid form) and the pH was measured on a Micronal/Metrohm pH meter using a Metrohm pH electrode.

In the conductimetric titration, increasing volumes of 0.1 N KOH or LiOH were added to a 5 mL solution of polysaccharide (~5 mequiv/L, acid form, pH ~2.9), and the conductivity was measured with a CD21 Digimed conductimeter equipped with platinized electrodes. The cell constant (1 cm) was determined periodically using a standard KCl solution.

Both titrations were carried out at $25.0 \pm 0.01^\circ\text{C}$ using a thermostatted cell.

Calcium titration and analysis of the binding data.—Calcium titrations were performed with the use of tetramethylmurexide (TMM) as a metallochromic indicator, purified and generously donated by Professor R. Kohn (Bratislava University, Czechoslovakia). The method is a slight modification of that proposed by Kohn and Furda [29], as described elsewhere [30,31].

In aqueous solution TMM binds Ca^{2+} reversibly in a 1:1 stoichiometry, and when calcium is complexed it undergoes a shift from 530 to 490 nm in the peak of its absorption spectrum [32]. Thus, the thermodynamics of the complex formation and the spectral properties of the free and bound TMM allow the determination of free and bound calcium in a given solution.

The titration experiments were run at 17°C in 10 mM NaCl solutions, containing polysaccharide (1 to 5 mequiv/L), 10 to 30 μM TMM and increasing amounts of CaCl_2 . The absorbances at 490 and 530 nm were measured on a double-beam spectrophotometer (Hitachi, model U-2000).

The stability constant (K_{app}) of the complex between TMM and Ca^{2+} can be written as:

$$K_{\text{app}} = \frac{[\text{TMM}]f_{\text{TMMCa}}}{[\text{TMM}](1-f_{\text{TMMCa}})([\text{Ca}]_t - [\text{TMM}]f_{\text{TMMCa}})} \quad (1)$$

where $[\text{TMM}]$, $[\text{Ca}]_t$, and f_{TMMCa} are the total concentrations of TMM and calcium and the mole fraction of TMM complexed with calcium, respectively.

The quantity f_{TMMCa} can be determined from titrations in 10 mM NaCl, using the experimental values of the ratio (R) of absorbances at 490 and 530 nm:

$$R = \frac{A_{490}}{A_{530}} = \frac{f_{\text{TMMCa}}\epsilon_{\text{TMMCa}}^{490} + (1-f_{\text{TMMCa}})\epsilon_{\text{TMM}}^{490}}{f_{\text{TMMCa}}\epsilon_{\text{TMMCa}}^{530} + (1-f_{\text{TMMCa}})\epsilon_{\text{TMM}}^{530}} \quad (2)$$

K_{app} can then be calculated from Eq. 1. The values of the extinction coefficients (ϵ) for the metallochromic indicator were determined from measurements in the absence and in the presence of a large excess of CaCl_2 . The values obtained were: $\epsilon_{\text{TMM}}^{530} = 13800$, $\epsilon_{\text{TMM}}^{490} = 8400$, $\epsilon_{\text{TMMCa}}^{530} = 8420$, and $\epsilon_{\text{TMMCa}}^{490} = 20000$. K_{app} is an apparent stability constant, dependent on the ionic strength. Nevertheless, we found a nearly constant value of $650 \pm 30 \text{ M}^{-1}$ at 17°C , since the slight dilution of NaCl upon addition of CaCl_2 was nearly counterbalanced by the increase in ionic strength due to the CaCl_2 . These observations are in accord with Manzini et al. [31].

Table 1
Chemical composition

Polysaccharide	Chemical composition
Fucosylated chondroitin sulfate	Na, De, Ca
Chondroitin 6-sulfate	Na
Sulfated fucan	Na

^a Data in the Table exceed 5%. ^b Galactose gel filtration on Sepharose

The knowledge of $[\text{Ca}^{2+}]_f$, from the following:

$$[\text{Ca}^{2+}]_f = \dots$$

$[\text{Ca}]_b$ is then calculated

$$[\text{Ca}]_b = [\text{Ca}]_t - [\text{Ca}^{2+}]_f$$

The binding constant

$$[\text{Ca}]_b/[\text{Ca}^{2+}]_f$$

3. Results and discussion

Chemical modification.—A comparison of the chemical modification of sea cucumber by the structure of most of the sulfated polysaccharides (Table 1). The glucuronic acid 1-ethyl-3-(3-dimethylamino) carbodiimide reaction formation of glucuronic acid by the polymer by n

Table 1
Chemical composition and average molecular mass ^a of native and chemically modified polysaccharides

Polysaccharide	Chemical modification	Molar ratios					Average molecular mass (kDa) ^c
		GlcUA	GalNH ^b	Fuc	Glc	Sulfate	
Fucosylated chondroitin sulfate	Native	0.30	0.39	0.31	< 0.01	1.03	40
	Desulfated	0.35	0.46	0.19	< 0.01	0.05	12
	Carboxyl-reduced	0.06	0.30	0.31	0.33	0.99	32
Chondroitin 6-sulfate	Native	0.48	0.50	0.01	< 0.01	0.51	40
Sulfated fucan	Native	< 0.01	< 0.01	1.00	< 0.01	1.10	30

^a Data in the Table are mean values obtained from four replicates, and variations were found not to exceed 5%. ^b Galactosamine is *N*-acetylated [8–10]. ^c Average molecular masses were determined by gel filtration on Sephacryl S-400 columns and compared with glycosaminoglycans standards.

The knowledge of K_{app} allows calculation of the free calcium concentration, $[Ca^{2+}]_f$, from the absorbance ratio R in the presence of the polysaccharides, as follows:

$$[Ca^{2+}]_f = \frac{R\epsilon_{TMM}^{530} - \epsilon_{TMM}^{490}}{K_{app}(\epsilon_{TMMC}^{490} - R \cdot \epsilon_{TMMC}^{530})} \quad (3)$$

$[Ca]_b$ is then calculated from:

$$[Ca]_b = [Ca]_t - [Ca^{2+}]_f - f_{TMMC} \cdot [TMM] \quad (4)$$

The binding data are plotted according to the usual Scatchard diagram:

$$[Ca]_b/[Ca^{2+}]_f \text{ vs. } [Ca]_b \quad (5)$$

3. Results and discussion

Chemical modifications of the fucose-branched chondroitin sulfate.—Fig. 1 shows a comparison of the proposed structure of the fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber before (1) and after (2 and 3) various chemical modifications, and the structure of standard chondroitin sulfate (4). Solvolysis in Me_2SO removes most of the sulfate esters (2, Fig. 1) and slightly reduces the fucose content (Table 1). The glucuronic acid carboxyl groups in the polysaccharide were reduced with 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide- $NaBH_4$ (3, Fig. 1) and the extent of the reaction was estimated by the decrease in the glucuronic acid and the formation of glucose (Table 1). The sulfated fucose branches can be removed from the polymer by mild hydrolysis with acid (broken line, Fig. 1), since fucose forms a

glycosidic linkage that is more sensitive to acid than that formed by glucuronic acid or by hexosamine. The proposed structure of the defucosylated polymer is similar to that of standard chondroitin sulfate (4, Fig. 1). In the present study we compare the properties of the fucosylated chondroitin sulfate with those of standard chondroitin 6-sulfate, because of the similarity of the latter polymer with a defucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber [9,10].

Another sulfated polysaccharide isolated from the sea cucumber is a sulfated fucan (Table 1), mostly a linear polymer composed of disulfated and monosulfated α -L-fucopyranosyl units [33].

Conductimetric titrations of the sulfated polysaccharides.—Conductimetric titrations of anionic polymers have been used to determine their charge distribution [34]. In these experiments, a strong polyacid shows a sharp decrease in conductivity (σ) with an increase in degree of neutralization (α_n). This behavior is ascribed to the replacement of hydrogen ions by alkali metal ions during the course of the titration, since alkali metal ions associated with strong acid groups are less mobile than hydrogen ions [34,35]. With a weak polyacid, on the other hand, hydrogen ions are more tightly bound and their mobility is lower than for alkali metal ions associated with these groups [34,35]. Thus, the replacement of hydrogen ions during a titration with KOH or LiOH leads to a slow increase in the conductivity.

Conductimetric titrations of fucosylated chondroitin sulfate (Fig. 2A) and of standard chondroitin 6-sulfate (Fig. 2B) show curves with a mixed behavior that can be ascribed to the presence of both strong (sulfate) and weak (carboxyl) groups. A sharp decrease in conductivity with neutralization (to a, Figs. 2A and 2B) is followed by a slow increase in this parameter (from a to b), up to the point where complete neutralization of the polymer occurs (b). This interpretation for the titrations of the native chondroitin sulfates is confirmed by the titrations of their carboxyl-reduced and desulfated derivatives. Thus, in the titration of a carboxyl-reduced derivative from fucosylated chondroitin sulfate (Fig. 2C), the initial sharp decrease in conductivity ascribed to sulfate groups is accentuated, and in the titration of the desulfated derivative from the same polymer (Fig. 2D), the slow increase in conductivity ascribed to carboxyl groups is prominent*.

From the conductivity values (σ) obtained at the end point corresponding to the neutralization of the polymers by KOH or LiOH, transport factor (f) can be calculated [36] as follows:

$$f = \frac{\sigma_K - \sigma_{Li}}{10^3 \cdot C_p \cdot (\lambda_K - \lambda_{Li})} \quad (6)$$

where the σ_K and σ_{Li} are the experimental values of conductivities at a (Fig. 2)

* Some sulfate esters resist desulfation (Table 1) and may account for the initial decrease in conductivity observed in Fig. 2D.

Fig.
sul-
the
am
an
coi
str:
coi

ob
co

pc

wh
giv

e
co
th

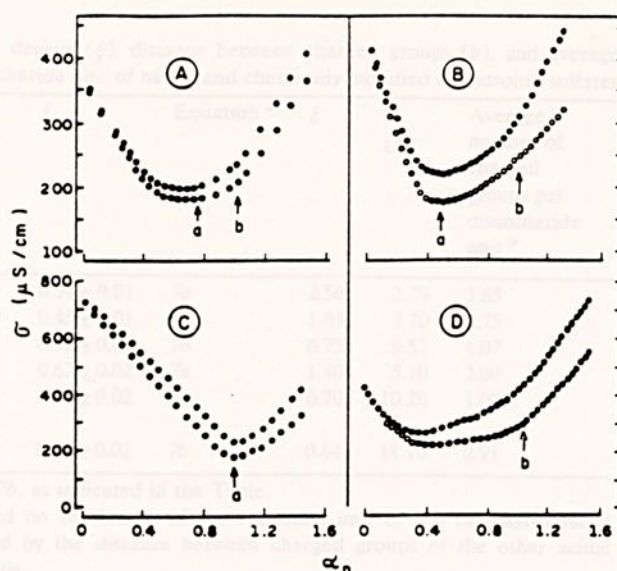


Fig. 2. Conductimetric titrations of native (A), carboxyl-reduced (C), and desulfated (D) chondroitin sulfate from sea cucumber and of standard chondroitin 6-sulfate (B). The conductimetric titrations of the polysaccharides, acid form, were performed as described under "Methods", with increasing amounts of KOH (●) or LiOH (○). The arrows a and b indicate the end points of titration of the sulfate and carboxyl groups, respectively. These points were extrapolations of the ascending and descending conductances, with a being the intersection, and b the point at which the conductance deviates from the straight line. The degree of neutralization (α_n) is the concentration of KOH or LiOH divided by the concentration of the polymer (C_p), both as equiv/L.

obtained from the titrations with KOH and LiOH, λ_K and λ_{Li} are the reduced ion conductances for K and Li and C_p is the polymer concentration in equiv/L.

In the counterion condensation model proposed by Manning [37,38] the transport factor is related to the linear charge density (ξ) as:

$$f = \frac{0.87}{|z|\xi} \quad |z|\xi > 1 \quad (7a)$$

$$f = 1 - \frac{0.55|z|^2\xi^2}{3.14 + |z|\xi} \quad |z|\xi < 1 \quad (7b)$$

where z is the valence of the counterion and ξ , for a rigid rod polyelectrolyte, is given by:

$$\xi = \frac{e^2}{\epsilon \cdot k \cdot T \cdot b} \quad (8)$$

e being the electrical charge of the titratable groups, ϵ the solution dielectric constant, k the Boltzmann constant, and b the distance between charged groups in the polymer.

Table 2

Transport factor (f), linear charge density (ξ), distance between charged groups (b), and average number of charged groups per disaccharide unit of native and chemically modified chondroitin sulfates

Polysaccharide	Chemical modification	f	Equation ^a	ξ	b (Å)	Average number of charged groups per disaccharide unit ^b
Fucosylated chondroitin sulfate	Native	0.34 ± 0.01	7a	2.56	2.79	3.65
	Carboxyl-reduced	0.45 ± 0.01	7a	1.93	3.70	2.75
	Desulfated	0.92 ± 0.02	7b	0.75	9.52	1.07
Standard chondroitin sulfate	Native	0.62 ± 0.02	7a	1.40	5.10	2.00
	Carboxyl-reduced	0.93 ± 0.02	7b	0.70	10.20	1.00
Hyaluronic acid	Native	0.94 ± 0.02	7b	0.64	11.10	0.91

^a ξ were calculated from Eqs. 7a or 7b, as indicated in the Table.

^b These values were calculated based on the length of the repeating unit of the carboxyl-reduced chondroitin sulfate (10.20 Å) divided by the distance between charged groups of the other acidic polysaccharides (b). See text for details.

The experimental data shown in Fig. 2 and the calculations described in Eqs. 6 and 8 were used to determine the transport factor, the linear charge density and the distance between charged groups of the various polysaccharides (Table 2). The linear charge density is higher (and the distance between charged groups is lower) in the fucosylated chondroitin sulfate than in standard chondroitin 6-sulfate. Therefore, the presence of highly sulfated fucose branches markedly increases its anionic charge density. After reduction of the glucuronic acid carboxyl groups, the charge density of standard chondroitin 6-sulfate decreases by half (the distance between charged groups doubles). However, the same chemical modification only slightly affects these same parameters of the fucosylated chondroitin sulfate since most of its anionic charges are due to sulfate esters. Accordingly, desulfation of the fucosylated chondroitin sulfate dramatically reduces its charge density, which now resembles that of a carboxyl-reduced chondroitin 6-sulfate. In fact, both the carboxyl-reduced chondroitin 6-sulfate and the desulfated chondroitin sulfate from sea cucumber have a single anionic charge per disaccharide unit (Table 1). This is attributed to sulfate esters at the O-6 position of galactosamine residues and to carboxyl groups of the glucuronic acid units, respectively (Fig. 1). The distances between the anionic groups of these two chemically modified chondroitins are similar, indicating that the repeat units of the two polymers have approximately the same length (Table 2). The values obtained are in agreement with the length of the repetitive unit of other glycosaminoglycans determined by different methodologies. For example, the length of a tetrasaccharide unit of heparin was reported as 20.4 Å [39] or 21.1 Å [40]. This result confirms that the fucose residues in the fucosylated chondroitin sulfate are branches and not intercalated among the

repetitive agreement:

In order to determine the average distance between charged groups within the repeating unit of the polysaccharide, the average number of charged groups per disaccharide unit of these values was calculated (Table 2). These values are in agreement with the standard

Binding. The binding of calcium to chondroitin 6-sulfate was determined by the method of Scatchard [30]. The results are shown in Fig. 3. The binding of calcium to chondroitin 6-sulfate is characterized by a high affinity and a low capacity.

The binding of calcium to chondroitin 6-sulfate was determined by the method of Scatchard [30]. The results are shown in Fig. 3. The binding of calcium to chondroitin 6-sulfate is characterized by a high affinity and a low capacity.

One of the main objectives of this study was to determine the effect of the fucose residues on the binding of calcium to chondroitin 6-sulfate. The results are shown in Fig. 4. The binding of calcium to fucosylated chondroitin 6-sulfate is characterized by a high affinity and a low capacity.

* K_{app} has been determined by the method of Scatchard [30]. The results are shown in Fig. 3. The binding of calcium to chondroitin 6-sulfate is characterized by a high affinity and a low capacity.

repetitive disaccharide units of the central chondroitin core. This inference is in agreement with our previous chemical studies (Fig. 1) [9,10].

In order to estimate the average number of charged groups per disaccharide unit we assume that the several sulfate esters and carboxyl groups are distributed within the 'space' of this disaccharide unit, thus reducing the distance between charged groups. According to this proposition the length of the repeating unit of the carboxyl-reduced chondroitin 6-sulfate (10.20 Å, Table 2) divided by the distance between charged groups of other acidic polysaccharides should indicate the average number of charged groups per disaccharide units (Table 2). In fact, these values are in good agreement with the chemical analyses of these polysaccharides (Table 1), which show 3.41 and 1.98 charged groups per disaccharide units (expressed as galactosamine residues) for the fucosylated chondroitin sulfate and standard chondroitin 6-sulfate, respectively.

Binding of calcium to fucosylated chondroitin sulfate.—Scatchard plots of calcium binding to the native fucosylated chondroitin sulfate and to standard chondroitin 6-sulfate are biphasic (Figs. 3A and B) indicating the presence of two class of sites. Desulfation and carboxyl reduction each eliminate one class of sites (Figs. 3C and D), so that the low-affinity sites can be assigned to the carboxyl groups and the high-affinity sites to the sulfate groups.

The apparent association constants (K) estimated by TMM complexation, to these sites as M^{-1} can be obtained from the Scatchard plots as $[Ca]_b/[Ca^{2+}]_f \times [Ca]_b$, and are shown in Table 3. Simply drawing tangents to the two ends of the Scatchard plots may give erroneous results [41]. However, we calculated K for the sulfate and carboxyl groups using a computer program that was developed to resolve such plots [41] (see continued lines in Figs. 3A and B).

One of the major observations of this study is that the calcium affinity of the sulfate groups is ~5-fold greater in the fucosylated chondroitin sulfate than in the standard chondroitin 6-sulfate (Table 3). This higher affinity for calcium is not a specific property of the sulfated fucoses, since a sulfated fucan from sea cucumber has a low calcium affinity compared with the other polysaccharides (Table 3). The higher affinity for calcium also cannot be attributed to the higher sulfate content of the fucosylated polymer, since the sulfated fucan has a low affinity but a higher sulfate–total sugar ratio than the fucosylated chondroitin sulfate (Table 1). Finally, the calcium affinity is not a simple function of linear charge density of the polymer since this latter value increases about 1.8-fold from the standard chondroitin 6-sulfate to the fucosylated chondroitin sulfate (Table 2) whereas the affinity for calcium increases ~5-fold. It may be that the higher calcium affinity of the fucosylated polysaccharide is related to the position occupied by the sulfated fucose branches on the chondroitin sulfate from sea cucumber *.

* K_{app} has a strong dependence on NaCl concentration. Low concentrations of NaCl were used to assure precise measurement of this association constant. This raises a question concerning the affinities of carboxyl and sulfate groups for Ca^{2+} under physiological conditions. Possibly, this point has to be clarified using a different methodology.

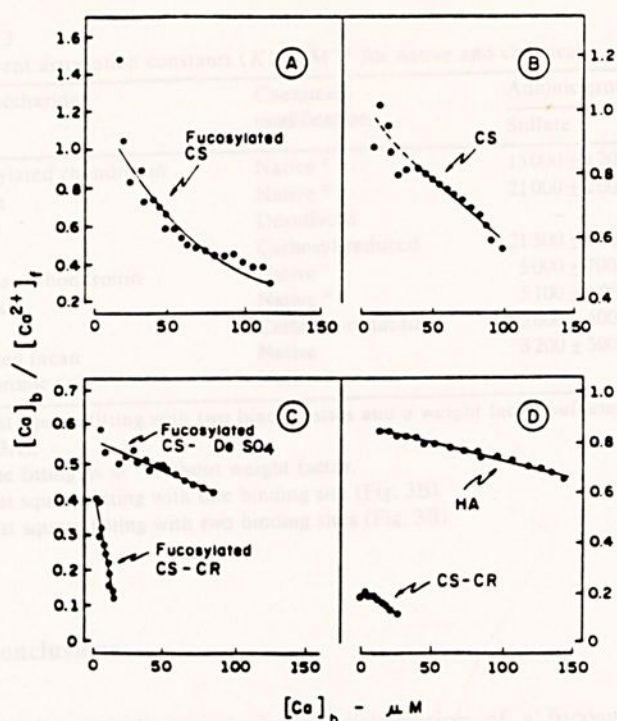


Fig. 3. Scatchard plots of calcium binding to the native or chemically modified chondroitin sulfates and to the hyaluronic acid. Calcium binding to fucosylated chondroitin sulfate (Fucosylated CS), to standard chondroitin 6-sulfate (CS) and to hyaluronic acid (HA), before and after desulfation (DeSO₄) or carboxyl reduction of the glucuronic acid units (CR) was performed as described in "Methods". The free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_f$) and the concentration of calcium complexed with the polysaccharide ($[Ca]_b$) were calculated as described in the text and binding data were plotted as usual Scatchard diagram. See additional comments on Table 3.

The association constant for the high-affinity sites of the fucosylated chondroitin sulfate (Table 3) is very similar to values obtained for heparin using either a similar experimental procedure ($20\,000\text{ M}^{-1}$) [42] or equilibrium dialysis ($31\,900\text{ M}^{-1}$) [18], although neither of these previous studies distinguished between sulfate and carboxyl groups. Since heparin and fucosylated chondroitin sulfate possess completely distinct chemical structures*, the calcium-binding sites in these polymers do not appear to have specific structural requirements.

* Another distinguishing characteristic of these two sulfated polysaccharides is the very low anticoagulant activity of fucosylated chondroitin sulfate compared with standard heparin. In the USP assay, standard heparin and fucosylated chondroitin sulfate have anticoagulant activities of 140-180 and 7 USP/mg, respectively.

Table 3
Apparent as
Polysacchari.

Fucosylated
sulfate

Standard ch.
6-sulfate

Sulfated fuc.
Hyaluronic :

^a Least squa
(Fig. 3A).

^b Same fitti

^c Least squa

^d Least squa

4. Conclu

Calcium
and of a :
indicator
polymers
and low :
chondroit
chondroit
the bran

Data f
theory pr
polymers.
along the
branched
boxylates
average 1
metric tit
(Table 1,
to estima
chondroi
2, see tex
from sea
disacchar
previous

Table 3
Apparent association constants (K) as M^{-1} for native and chemically modified chondroitin sulfates

Polysaccharide	Chemical modification	Anionic group	
		Sulfate	Carboxyl
Fucosylated chondroitin sulfate	Native ^a	15 000 $\pm$ 1 200	1 000 $\pm$ 130
	Native ^b	21 000 $\pm$ 2 000	1 600 $\pm$ 180
	Desulfated	—	1 600 $\pm$ 260
	Carboxyl-reduced	21 500 $\pm$ 2 200	—
Standard chondroitin 6-sulfate	Native ^c	5 000 $\pm$ 700	—
	Native ^d	5 100 $\pm$ 1 000	1 100 $\pm$ 300
	Carboxyl-reduced	3 600 $\pm$ 400	—
Sulfated fucan	Native	3 200 $\pm$ 300	—
Hyaluronic acid	Native	—	1 400 $\pm$ 100

^a Least square fitting with two binding sites and a weight factor sufficient to neglect the leftmost point (Fig. 3A).

^b Same fitting as in ^a without weight factor.

^c Least square fitting with one binding site (Fig. 3B).

^d Least square fitting with two binding sites (Fig. 3B).

4. Conclusions

Calcium binding and charge distribution of a fucosylated chondroitin sulfate and of a standard chondroitin 6-sulfate have been studied using a metallochromic indicator and conductimetric titrations. Measurements on chemically modified polymers show that a high-affinity class of sites can be assigned to sulfate groups, and low affinity sites to carboxyl radicals. The sulfate groups of the fucosylated chondroitin sulfate have a ~ 5 -fold higher affinity for calcium than the standard chondroitin 6-sulfate. Possibly, this increased affinity for calcium may be due to the branches on the fucosylated chondroitin sulfate.

Data from the conductimetric titrations were interpreted using a polyelectrolyte theory proposed by Manning [37,38]. This theory has been applied mostly to linear polymers, containing a single class of charged groups with a uniform distribution along the polymer. Our results demonstrate that the theory can be applied to branched polysaccharides, containing different charged groups (sulfates and carboxylates), since linear charge density, distance between charged groups and average number of charged groups per disaccharide unit determined by conductimetric titrations (Table 2) are in agreement with the data from chemical studies (Table 1, Fig. 1). In addition, data from conductimetric titrations make it possible to estimate the length of the disaccharide unit of the standard and fucosylated chondroitin sulfates. Similar values were obtained for both polysaccharides (Table 2, see text). This result indicates that the fucose residues in the chondroitin sulfate from sea cucumber are branched and not intercalated among the repetitive disaccharide units of the central core. This inference is in agreement with our previous chemical studies [9,10].

5. Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: FNDCT and PADCT), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We thank Dr. Martha M. Sorenson for help in the preparation of this manuscript.

6. References

- [1] R.M. Albano and P.A.S. Mourão, *Biochim. Biophys. Acta*, 760 (1983) 192-196.
- [2] R.M. Albano and P.A.S. Mourão, *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 758-765.
- [3] P.A.S. Mourão and A.S. Perlin, *Eur. J. Biochem.*, 166 (1987) 431-436.
- [4] M.S.G. Pavão, R.M. Albano, A.M. Lawson, and P.A.S. Mourão, *J. Biol. Chem.*, 264 (1989) 9972-9979.
- [5] M.S.G. Pavão, P.A.S. Mourão, and B. Mulloy, *Carbohydr. Res.*, 208 (1990) 153-161.
- [6] R.M. Albano, M.S.G. Pavão, P.A.S. Mourão, and B. Mulloy, *Carbohydr. Res.*, 208 (1990) 163-174.
- [7] J.A. Santos, B. Mulloy, and P.A.S. Mourão, *Eur. J. Biochem.*, 204 (1992) 669-677.
- [8] P.A.S. Mourão and I.G. Bastos, *Eur. J. Biochem.*, 166 (1987) 639-645.
- [9] R.P. Vieira and P.A.S. Mourão, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 18176-18183.
- [10] R.P. Vieira, B. Mulloy, and P.A.S. Mourão, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 13530-13536.
- [11] R.L. Katzman and R.W. Jeanloz, *Science*, 166 (1969) 758-759.
- [12] R.L. Katzman and R.W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 50-55.
- [13] Y. Kariya, S. Watabe, Y. Ochiai, K. Hashimoto, and K. Murata, *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B (1990) 387-392.
- [14] Y. Kariya, S. Watabe, K. Hashimoto, and K. Yoshida, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 5081-5085.
- [15] C. Woodward and E.A. Davidson, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 60 (1968) 201-205.
- [16] D.D. Dziewiatkowski, *Calcif. Tissue Int.*, 40 (1987) 265-269.
- [17] G.K. Hunter, *Connect. Tissue Res.*, 16 (1987) 111-120.
- [18] G.K. Hunter, K.S. Wong, and J.J. Kim, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260 (1988) 161-167.
- [19] J.R. Dunstone, *Biochem. J.*, 85 (1962) 336-351.
- [20] A. Maroudas, P.D. Weiberg, K.H. Parker, and C.P. Winlove, *Biophys. Chem.*, 32 (1988) 257-270.
- [21] K. Nagasawa, Y. Inoue, and T. Kamata, *Carbohydr. Res.*, 58 (1977) 47-55.
- [22] R.L. Taylor, J.E. Shively, and H.E. Conrad, *Methods Carbohydr. Chem.*, 7 (1976) 149-151.
- [23] Z. Dische, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 189-198.
- [24] Z. Dische and L.B. Shettles, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 595-603.
- [25] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 350-356.
- [26] C.J.M. Randle and W.T.J. Morgan, *Biochem. J.*, 51 (1955) 586-589.
- [27] H. Saito, T. Yamagata, and S. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1536-1542.
- [28] H.W. Kircher, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1103-1106.
- [29] R. Kohn and I. Furda, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 32 (1967) 1925-1937.
- [30] J. Ruggiero, G. Manzini, and F. Quadrifoglio, *Biopolymers*, 26 (1987) 1975-1979.
- [31] G. Manzini, L.E. Xodo, F. Fogolari, and F. Quadrifoglio, *Biopolymers*, 30 (1990) 325-333.
- [32] S.T. Ohnishi, *Anal. Biochem.*, 85 (1978) 165-179.
- [33] A.C. Ribeiro, R.P. Vieira, P.A.S. Mourão, and B. Mulloy, *Carbohydr. Res.*, 255 (1994) 225-240.
- [34] S.A. Rice and M. Nagasawa, *Polyelectrolyte Solutions*, Academic Press, New York, 1961, pp 427-489.
- [35] L. Kotin and M. Nagasawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 1026-1028.
- [36] M. Milas, X. Shi, and M. Rinaudo, *Biopolymers*, 30 (1990) 451-464.

- [37] G.S. Mann
- [38] G.S. Mann
- [39] G.P. Diakur (1978) 1110-
- [40] S.S. Stivala
- [41] T. Ohnishi
- [42] J. Mattai and



- [37] G.S. Manning, *J. Phys. Chem.*, 79 (1975) 282-285.
 [38] G.S. Manning, in E. Sélègni (Ed.), *Polyelectrolytes*, Reidel, Dordrecht, Holland, 1974, pp 9-37.
 [39] G.P. Diakun, H.E. Edwards, D.J. Wedlock, J.C. Allen, and G.O. Phillips, *Macromolecules*, 11 (1978) 1110-1114.
 [40] S.S. Stivala, M. Herbst, O. Kratky, and I. Pilz, *Arch. Biochem. Biophys.*, 127 (1968) 795-802.
 [41] T. Ohnishi, E.J. Masoro, H.A. Bertrand, and B.P. Yu, *Biophys. J.*, 12 (1972) 1251-1265.
 [42] J. Mattai and J.C.T. Kwak, *Biochim. Biophys. Acta*, 677 (1981) 303-312.

The cell model and the Poisson-Boltzmann equation applied to dilute aqueous solutions of polyelectrolytes without added salt are revisited. The results are applied to analyze potentiometric titration data of two weak polycarboxylic acids: the poly-L-glutamic and the poly-galacturonic acids. Both polycarboxylic acids show a complex dissociation process indicated by the presence of a shoulder on the pH vs α plot for degree of dissociation values near 0.3. This anomalous behavior has been correlated with an electrostatic conformational transition and its interpretation is difficult in the framework of current polyelectrolytic models. The Poisson-Boltzmann equation permits the estimation of both the structural parameters and the conformational free energies involved in this transition.

Keywords: Poisson-Boltzmann equation; potentiometric titration; conformational transition.

INTRODUÇÃO

O processo de dissociação de grupos ionizáveis de poliacídios de origem biológica é acompanhado, em geral, pelo aumento de interações de longo alcance, que resultam da repulsão eletrostática entre os grupos carregados. Em alguns casos, forças atrativas de curto alcance restringem a liberdade conformational dos segmentos que compõem o polímero. A interação destas forças resulta em fenômenos cooperativos não, ainda de difícil compreensão^{1,2}. O balanço destas interações energéticas muitas vezes induzindo alterações conformacionais que modulam a taxa de dissociação. Dentre as variáveis físico-químicas tais como temperatura, força iônica e pH alteram este balanço energético e, consequentemente, o processo de dissociação destes poliacídios.

Um balanço conformacional, cooperativo, que ocorre no sistema de ácido poli-L-glutâmico³ é um exemplo deste comportamento. Na forma ácida este polímero assume a conformação de um glóbulo. A elevação do pH dá origem a um aumento da repulsão eletrostática como resultado da neutralização parcial dos grupos carregados. Sob ação desta força o sistema passa para uma conformação estendida. As alterações induzidas nestes poliacídios pelo pH ou mesmo força iônica resultam em deformação sofrida por uma cadeia sob tensão, a qual rapidamente recupera seu comprimento intrínseco, quando a solução é retida. Vários outros polieletrólitos biológicos apresentam este tipo de resposta sob alterações de pH^{4,5}. As evidências têm mostrado que esta compensação elétrica às forças de longo alcance desempenham importante papel na estabilidade conformacional destas macromoléculas⁶ e na atividade biológica⁷. Desta maneira a análise de fenômenos representados em diagrama especial.

Do ponto de vista experimental, a titulação potenciométrica de grupos ácidos é uma maneira simples e efetiva de se obter este efeito. Na forma ácida o próton neutraliza completamente a carga da carboxila, e à medida que a base titulante é adicionada, o próton é trocado pelo cátion da base, deixando numa carga residual em cada grupo titulado. Este experimento, portanto, é uma forma de monitorar o processo de "carregar" o polímero.

A descrição quantitativa do equilíbrio iônico nestes poliacídios tem merecido atenção há longo tempo. Nesta análise é fundamental descrever a distribuição de conformações ao redor do polímero como função do grau de dissociação. Entre os modelos mais utilizados para descrever este equilíbrio estão o proposto por Oosawa⁸ e desenvolvido por Manning^{9,10}, que leva

em conta a condensação de contraíons, e o modelo de cela, baseado na resolução da equação de Poisson para o potencial eletrostático, levando em conta a distribuição de Boltzmann para íons da solução, conhecida como equação de Poisson-Boltzmann (EPB)^{11,12}.

Estes modelos assumem uma descrição simplificada para a cadeia polimérica. No modelo de condensação de contraíons (CC) o polímero é substituído por uma linha infinita de cargas, com os grupos carregados igualmente espaçados ao longo dela. Os contra- e co-íons são também considerados pontuais e o solvente é tratado como um meio contínuo caracterizado por uma constante dielétrica. O modelo baseia-se na possibilidade de sistema quando a energia eletrostática de formação de par iônico for maior do que a energia térmica. Para resolver esta instabilidade uma fração dos contraíons se liga ao campo eletrostático do polímero reduzindo a carga efetiva de cada grupo.

No modelo de cela por outro lado, a solução é representada por um conjunto de células cilíndricas, sendo o polímero uma cilindro de raio finito (a) coaxial à cela. Os grupos carregados são uniformemente distribuídos ao longo do eixo, contra- e co-íons são considerados pontuais e o solvente é tratado como contínuo.

Os dois modelos descrevem bem as propriedades coletivas das soluções contendo sal suporte. Neste caso, a simetria iônica formada blindada de modo eficiente as interações eletrostáticas e as condições de aplicabilidade dos modelos são claramente sustentadas.

Na ausência de eletrólito suporte o número de contraíons e de grupos carregados é o mesmo, supondo uma estequiometria 1:1. Dessa forma não é claro qual deve ser o mecanismo de blindagem e a aplicabilidade dos modelos deve ser avaliada criteriosamente.

O objetivo deste trabalho é discutir o modelo de cela na ausência de eletrólito suporte, apresentar a resolução da EPB e utilizá-la para interpretar as curvas experimentais de titulação potenciométrica de dois poliacídios fracos: o poli-L-glutâmico (PLGA) e poligalacturônico (PGA). A interpretação destes resultados, bem como a determinação das constantes intrínsecas de dissociação, não é uma tarefa simples e devido à presença de uma anomalia nestas curvas. Esta anomalia é, em geral, relacionada a uma mudança conformacional cooperativa no caso do PLGA, ou à desagregação, induzida no processo de dissociação do polímero. A aplicação da EPB para a análise destas curvas requer uma análise criteriosa das simplificações adotadas pelo modelo, e por este motivo consideramos



APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN À DISSOCIAÇÃO DE POLIÁCIDOS FRACOS

J. Ruggiero e J. R. Ruggiero

Departamento de Física, IBILCE - UNESP - Rua Cristóvão Colombo, 2265 - 15054-000 - São José do Rio Preto - SP

The cell model and the Poisson-Boltzmann equation applied to dilute aqueous solutions of polyelectrolytes without added salt are revisited. The results are applied to analyse potentiometric titration data of two weak polyacids: the poly-L-glutamic and the poly-galacturonic acids. Both polyacids show a complex dissociation process indicated by the presence of a shoulder on the pK vs α plot for degree of dissociation values near 0.3. This anomalous behavior has been correlated with an electrostatic conformational transition and its interpretation is difficult in the framework of current polyelectrolytic models. The Poisson-Boltzmann equation permits the estimation of both the structural parameters and the conformational free energies involved in this transition.

Keywords: Poisson-Boltzmann equation; potentiometric titration; conformational transition.

INTRODUÇÃO

O processo de dissociação de grupos ionizáveis de poliácidos fracos de origem biológica é acompanhado, em geral, pelo aparecimento de interações de longo alcance, que resultam da forte repulsão eletrostática entre os grupos carregados. Em oposição, forças atrativas de curto alcance restringem a liberdade rotacional dos monômeros que compõem o polímero. A compensação destes efeitos resulta em fenômenos, cooperativos ou não, ainda de difícil compreensão^{1,2}. O balanço destas contribuições energéticas muitas vezes induzem alterações conformacionais que modulam a taxa de dissociação. Desta forma variáveis físico-químicas tais como temperatura, força iônica e pH alteram este balanço energético e, consequentemente, o processo de dissociação destes poliácidos.

A mudança conformacional, cooperativa, que ocorre na dissociação de ácido poli-L-glutâmico³ é um exemplo deste comportamento. Na forma ácida este polímero assume a conformação de um glóbulo. A elevação do pH dá origem a um aumento da repulsão eletrostática como resultado da neutralização parcial dos grupos carregados. Sob ação desta força o polímero passa para uma conformação estendida. As alterações induzidas nestes poliácidos pelo pH ou mesmo força iônica é semelhante à deformação sofrida por uma mola sob compressão que rapidamente, recupera seu comprimento inicial quando aquela é retirada. Vários outros polieletrólitos biológicos apresentam este tipo de resposta sob alterações de força iônica, e as evidências têm mostrado que esta compensação elástica às forças de longo alcance desempenham importante papel na estabilidade conformacional destas macromoléculas⁴ e na atividade biológica⁵. Desta maneira a análise deste fenômeno representa um atrativo especial.

Do ponto de vista experimental, a titulação potenciométrica de grupos ácidos é uma maneira simples e efetiva de ter acesso a este efeito. Na forma ácida o próton neutraliza completamente a carga da carboxila, e à medida que a base titulante é adicionada, o próton é trocado pelo cation da base resultando numa carga residual em cada grupo titulado. Este experimento, portanto, é uma forma de monitorar o processo de "carregar" o políon.

A descrição quantitativa do equilíbrio iônico nestes poliácidos tem merecido atenção há longo tempo. Nesta análise é fundamental descrever a distribuição de contraíons ao redor do políon como função do grau de dissociação. Entre os modelos mais utilizados para descrever este equilíbrio estão o proposto por Oosawa⁶ e desenvolvido por Manning^{7,8}, que leva

em conta a condensação de contraíons, e o modelo de cela, baseado na resolução da equação de Poisson para o potencial eletrostático, levando em conta a distribuição de Boltzmann para íons da solução, conhecida como equação de Poisson-Boltzmann (EPB)^{6,9,10}.

Estes modelos assumem uma descrição simplificada para a cadeia polimérica. No modelo de condensação de contraíon (CC) o polímero é substituído por uma linha infinita de cargas, com os grupos carregados igualmente espaçados ao longo dela. Os contra- e co-íons são também considerados pontuais e o solvente é tratado como um meio contínuo caracterizado por uma constante dielétrica. O modelo baseia-se na instabilidade do sistema quando a energia eletrostática de formação de par iônico for maior do que a energia térmica. Para resolver esta instabilidade uma fração dos contraíons se liga ao campo eletrostático do polímero reduzindo a carga efetiva de cada grupo.

No modelo de cela por outro lado, a solução é representada por um conjunto de celas cilíndricas, sendo o políon uma cilindra de raio finito (a) coaxial à cela. Os grupos carregados são uniformemente distribuídos ao longo do eixo, contra- e co-íons são considerados pontuais e o solvente é tratado como contínuo.

Os dois modelos descrevem bem as propriedades coligativas das soluções contendo sal suporte. Neste caso, a atmosfera iônica formada blindando de modo eficiente as interações eletrostáticas e as condições de aplicabilidade dos modelos são claramente satisfeitas.

Na ausência de eletrólito suporte o número de contraíons e de grupos carregados é o mesmo, supondo uma estequiometria 1:1. Dessa forma não é claro qual deve ser o mecanismo de blindagem e a aplicabilidade dos modelos deve ser analisado criteriosamente.

O objetivo deste trabalho é discutir o modelo de cela na ausência de eletrólito suporte, apresentar a resolução da EPB e utilizá-la para interpretar as curvas experimentais de titulação potenciométrica de dois poliácidos fracos: o poli-L-glutâmico (PLGA) e poligalacturônico (PGA). A interpretação destes resultados, bem como a determinação das constantes intrínsecas de dissociação, não é uma tarefa simples é devido à presença de uma anomalia nestas curvas. Esta anomalia é, em geral, relacionada a uma mudança conformacional, cooperativa no caso do PLGA, ou à desagregação, induzida no processo de dissociação do poliácido. A aplicação da EPB para a análise destas curvas requer uma análise criteriosa das simplificações adotadas pelo modelo, e por este motivo constitui um



dos casos mais delicados de aplicação da EPB. Na tentativa de facilitar a determinação dos estados conformacionais envolvidos no processo de "carregamento" destes polímeros, utilizamos também curvas de titulação condutimétrica que permitem monitorar as variações da atividade de contraíons em função do grau de dissociação. Estes valores experimentais podem, também, ser analisados usando o modelo de cela e a resolução da EPB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Ácido poligalacturônico (Sigma), foi dissolvido em água, precipitado em etanol, ressuspendido em água e dialisado exaustivamente contra água. A forma ácida foi obtida através de diálise contra ácido e a seguir exaustivamente contra a água. Ácido poli-L-glutâmico (Sigma) foi dissolvido em água, e a forma ácida foi obtida através de troca iônica usando resina Dowex 50W, previamente condicionada na forma ácida.

Titulações potenciométricas

As titulações foram efetuadas através de adições de alíquotas da base titulante, NaOH (Merk) padronizadas a 0.1N, à solução de PGA. Em cada adição o pH resultante foi determinado através de eletrodo conjugado Metrom e pHmetro Metrom-Micronal mod B-375, ou de equipamento similar Corning. A temperatura da solução foi mantida em 25 ± 0.01 °C através de uma cela de titulação de paredes duplas por onde circula água de um termostato Neslab mod. RTE-111. A cela de titulação foi mantida sob fluxo de N_2 , purificado, no sentido de evitar a formação de ácido carbônico. A água utilizada em todos os procedimentos foi de qualidade condutimétrica com condutividade $0.6 \mu\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Os valores de pH medidos em cada adição de titulante são dispostos em gráfico de pK_{ap} vs α , onde:

$$pK_{ap} = \text{pH} - \log(\alpha/1-\alpha) \quad (1)$$

e

$$\alpha = \alpha_n + 10^{-\text{pH}/C_p} \quad (2)$$

sendo C_p a concentração (em eq/l) de grupos carregáveis no polímero, e corresponde a concentração de titulante no ponto de equivalência, α_n é o grau de neutralização do políácido e dado pela razão entre a concentração de titulante em cada adição e a concentração de grupos carregados.

Titulações Condutimétricas

O mesmo procedimento foi utilizado nas titulações condutimétricas de PGA com (LiOH e KOH Merk padronizadas), sendo que a condutividade da solução foi medida através de um condutivímetro Digimed Mod. CD21, que opera à 1 KHz, e cela de 1.01 cm a cada nova medida a constante da cela foi calibrada com solução padrão de KCl.

Os valores de condutividade (σ), obtidos em cada adição de titulante, são dispostos em gráficos em função de α_n . A condutividade elétrica da solução contendo o polímero é dada por:

$$\sigma = fC_p(\lambda_p + \lambda_i) \quad (3)$$

onde λ_p e λ_i são as condutâncias molares do polímero e do íon alcalino da base usada na titulação, C_p é a concentração de grupos carregados do polímero obtido da titulação potenciométrica e f é o fator de transporte obtido experimentalmente através de titulações com dois titulantes diferentes, como KOH

e LiOH. Sendo σ_K e σ_{Li} os valores da condutividade obtidos para estes dois titulantes, determina-se f através da relação:

$$f = (\sigma_K - \sigma_{Li})/(\lambda_K - \lambda_{Li}) \quad (4)$$

O MODELO DE CELA E A EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN (EPB)

O tratamento teórico de solução aquosa de polieletrólito, contendo ou não sal suporte, envolve a avaliação dos efeitos do forte campo eletrostático do polímero na distribuição espacial dos íons pequenos ao seu redor. Este campo é responsável pelo alto grau de não uniformidade dessa distribuição, pois íons de carga oposta ao poliíon (contraíons) são atraídos para sua vizinhança enquanto os de mesma carga (cofons) são repelidos. Estes gradientes iônicos são fundamentais para o comportamento da solução.

A abordagem mecânico-estatística envolve o cálculo das funções de correlação de pares entre todos os componentes do sistema: poliíon-íons, íons-íons, poliíon-poliíon, poliíon-água, íons-água e água-água. No cálculo destas funções as interações coulombianas são dominantes entre os três primeiros tipos de pares, e entre os restantes as interações carga-dipolo, dipolo-dipolo e interações fracas são as dominantes. A descrição do sistema através desta abordagem é extremamente complexa, sendo praticamente impossível mesmo com os atuais recursos computacionais. Considerar o solvente como um meio contínuo, caracterizado por uma constante dielétrica, apesar de reduzir parte da complexidade computacional, ainda o deixa de difícil tratamento.

Simplificações mais "drásticas" foram necessárias para tornar esta descrição teórica acessível do ponto de vista computacional, e conduziram, nos anos cinquenta, ao modelo de cela^{9,10} e na década seguinte ao modelo de condensação de contraíons^{7,8}. Estes modelos permitem a descrição de diversas propriedades físico-químicas de soluções polieletrólíticas, com relativo sucesso, utilizando recursos computacionais modestos. A proposição deste trabalho, como enfatizado na introdução, é discutir o modelo de cela aplicado à solução sem eletrólito suporte.

As suposições básicas do modelo de cela, para uma solução de polieletrólito na ausência de sal simples, são¹⁰: a) o poliíon é, ao menos localmente, considerado um cilindro rígido, de comprimento L , raio a e impenetrável aos contraíons; b) a solução é dividida num conjunto de celas, coaxiais à cadeia polimérica, cujo raio é determinado pelo volume médio por cadeia e c) os contraíons são "aprisionados" no campo elétrico do polieletrólito de forma a garantir a eletroneutralidade da cela, obedecendo a distribuição de Boltzmann. Esta distribuição de eletrólitos simples blinda a cadeia polimérica minimizando as interações intra e intercadeias. A imagem pictórica deste modelo é que cada cela, contendo o poliíon e a atmosfera iônica, é uma entidade eletricamente neutra "vagando" num mar de outras celas permeadas pelas moléculas do solvente.

Deve-se notar que esta descrição equivale a considerar somente as interações eletrostáticas, ou seja, os termos dominantes das correlações de pares poliíon-íon e íon-íon, sendo que as interações poliíon-poliíon estão sendo desprezadas pela imposição de neutralidade das celas. As interações de curto alcance estão limitadas à consideração de impenetrabilidade da cadeia polimérica e, conseqüentemente, à definição da distância de menor aproximação dos contraíons ao polímero. Uma revisão discutindo qualitativamente a abordagem mecânico-estatística do problema e contendo uma extensa lista bibliográfica sobre as implementações no modelo foi recentemente publicado por Anderson e Record¹¹.

Representar a solução polieletrólítica como um conjunto de celas paralelas, à primeira vista, parece muito difícil de ser



satisfeita experimentalmente. O modelo foi, recentemente, rediscutido por Mandel¹² e a condição necessária para a sua aplicabilidade é que o comprimento de persistência seja significativamente maior do que a distância, b , entre seus grupos carregados. A simetria cilíndrica exige, ainda, que o comprimento de persistência seja maior do que o raio da cela. Isto é satisfeito se ele for muito maior do que a distância de Debye, que é o comprimento de blindagem das interações coulombianas entre as cargas da cadeia.

Considerando, por simplicidade, que a solução seja composta por n_p cadeias por unidade de volume, sendo X o grau de polimerização da cadeia e $z_m q$ (q carga prótonica) a carga de cada grupo carregado, a concentração em número, n_c , de contraíons de carga $z_c q$ é dado pela condição de eletroneutralidade, ou seja,

$$n_c = - \frac{|Z_m|}{|Z_c|} X n_p, \quad (5)$$

ou seja, contraíons e poliíon têm cargas opostas. É conveniente representar as cargas do polieletrólito através de um parâmetro adimensional, a densidade de cargas:

$$\xi = \frac{\lambda_B}{b} = \frac{q^2}{\epsilon k T b}, \quad (6)$$

onde λ_B é o comprimento de Bjerrum, ϵ é a constante dielétrica, k a constante de Boltzmann, T a temperatura e b é a distância entre grupos carregados projetados ao longo do eixo do cilindro. Usando o sistema CGS, à temperatura ambiente, $\lambda_B = 7.13 \text{ \AA}$. Se $L \gg b$, o raio da cela pode ser escrito em função do parâmetro adimensional como:

$$R = (\pi b n_p)^{-1/2} = (\pi \lambda_B n_p / \xi)^{-1/2}. \quad (7)$$

Esta relação mostra que o raio da cela cresce com a diluição da solução e com o aumento da densidade de carga. Cálculos desenvolvidos por Odijk¹³, no contexto do modelo de "worm-like chain", mostram que na ausência de eletrólito simples, o comprimento de persistência varia inversamente com a concentração do polímero. Esse é um indicativo de que o modelo de cela possa ser aplicado mesmo para soluções muito diluídas, pois, nesse caso, tanto o raio R quanto o comprimento de persistência crescem. Em soluções muito concentradas há uma forte interação entre as cadeias, tornando-as entrelaçadas. Nestas condições o modelo não mais se aplica pois as correlações entre pares poliíon-poliíon não podem ser desprezadas e as cadeias não podem ser tratadas como independentes. Consequentemente é razoável usar o modelo de cela ao menos para soluções com concentração moderada de poliíon.

A função de distribuição para os contraíons pode ser obtida através da aplicação da condição de equilíbrio a cada cela. Sendo $n_c(r)$ a concentração, em número, de contraíons a uma distância r do poliíon, e considerando a solução diluída, o potencial eletroquímico é dado por:

$$\mu_c = \mu_c^0 + kT \ln n_c(r) + Z_c q \psi(r), \quad (8)$$

onde o último termo é o trabalho realizado contra o campo eletrostático, do polieletrólito, para colocar $n_c(r)$ contraíons no espaço entre r e $r+dr$. Ao escrever esta equação estamos supondo que o potencial de força média (que descreve o potencial efetivo entre as partículas existentes na solução) seja aproximado pelo potencial eletrostático médio $\psi(r)$, i.e. que nenhuma interação de curto alcance está sendo considerada, ou seja, as cargas são, com exceção da definição da distância a , pontuais. Fixman¹⁴ mostrou que o modelo pode incorporar modificações que levem em conta o raio finito das cargas.

A condição de equilíbrio impõe a constância do potencial eletroquímico em toda cela, particularmente na borda exterior onde ψ é por conveniência adotado como sendo nulo. Assim,

$$\mu_c^0 + kT \ln n_c(r) + Z_c q \psi(r) = \mu_c^0 + kT \ln n_c(R) \quad (9)$$

onde o potencial químico de referência foi considerado independente de r . A solução desta equação conduz à distribuição de Boltzmann para os contraíons ao redor do polieletrólito, ou seja,

$$n_c(r) = n_c^0 \exp(-|Z_c| q \psi(r)/kT), \quad (10)$$

onde n_c^0 é a concentração em $r = R$.

O potencial eletrostático é dado pelas soluções da equação de Poisson,

$$\nabla^2 \psi(r) = - \frac{4\pi}{\epsilon} q |Z_c| n_c(r), \quad (11)$$

com $n_c(r)$ dado pela distribuição de Boltzmann (10). Esta é a equação de Poisson-Boltzmann. Se mais de uma espécie de íons (contra-ou co-íons) está presente, a análise acima se aplica a cada espécie iônica e o lado direito da eq. (11) deve conter o somatório sobre todas elas. Fazendo uso da simetria cilíndrica e, definindo o potencial reduzido como:

$$\Phi(r) = - \frac{q |Z_c| \psi(r)}{kT}, \quad (12)$$

a EPB é reescrita como:

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} \left(x \frac{d\Phi}{dx} \right) = \exp(\Phi), \quad (13)$$

sendo $x = \kappa r$, onde κ é o parâmetro de blindagem de Debye, dado por:

$$\kappa^2 = 4 \pi Z_c^2 \lambda_B n_c^0. \quad (14)$$

O campo elétrico satisfaz condições de contorno na superfície do poliíon e na borda da cela dadas pela lei de Gauss:

$$\left(\frac{d\Phi}{dx} \right)_{x=\kappa a=\lambda_B} - \frac{2 |Z_c| \xi}{X_a} e \left(\frac{d\Phi}{dx} \right)_{x=\kappa R=\lambda_R} = 0. \quad (15)$$

A primeira reflete a carga do poliíon e a segunda a eletroneutralidade da cela.

A integração da equação 13 fornece a seguinte expressão para o potencial reduzido:

$$\Phi(x) = \ln \left(\frac{x^2}{2A^2} \sinh^2(A \ln(Bx)) \right), \quad (16)$$

onde A e B são constantes de integração, determinadas a partir das condições de contorno:

$$1 + A \coth(A \ln(BX_R)) = 0 \quad (17)$$

e

$$|Z_c| \xi = 1 + A \coth(A \ln(BX_a)). \quad (18)$$

Da (17) pode-se reescrever B como função de A

$$B = \frac{1}{X_R} \left(\frac{1-A}{1+A} \right)^{1/2A}, \quad (19)$$

que substituída na (18) fornece uma equação transcendente que correlaciona a constante de integração A aos parâmetros que descrevem a solução polieletrólítica, quais sejam: a densidade de cargas, ξ , a distância de menor aproximação, a , as concentrações de grupos carregados e de contra-íons e suas respectivas valências,

$$\xi|Z_c| = \frac{1-A^2}{1+A\coth(A\gamma)}, \quad (20)$$

sendo $\gamma = \ln(x_R/x_a)$. Embora a eq. (13) tenha solução exata em termos de funções elementares, a constante de integração, dada pela eq. (20), só pode ser obtida numericamente ou graficamente. Desta forma a análise das soluções da EPB estão vinculadas a este estudo numérico.

A equação transcendental para A apresenta solução real para valores de $0 \leq |Z_c| \xi \leq \gamma/(1+\gamma)$, sendo que o valor de A é restrito ao intervalo $1 \geq A \geq 0$. Para valores de $|Z_c| \xi \geq \gamma/(1+\gamma)$ a solução é um número imaginário puro, e a solução da EPB pode ser obtida substituindo-se A por $i|A|$ nas eq. (16-20).

De acordo com a eq. (8), o potencial elétrico é proporcional ao trabalho realizado contra o campo elétrico do polímero para levar um contra-íon da sua superfície até a posição onde o potencial é nulo. Quando o polieletrólito está na forma ácida e prótons são trocados por íons alcalinos, como num experimento de titulação potenciométrica, este trabalho representa a variação do potencial químico para dissociar todos grupos ácidos. Do ponto de vista termodinâmico a constante aparente de dissociação está correlacionada à constante intrínseca através da variação de energia livre eletrostática em função do grau de dissociação como segue:

$$pK_{ap} = pK_0 + \frac{1}{2.303RT} \left(\frac{\partial G^el}{\partial \alpha} \right) = 0.433q\Delta\Psi/kT = -0.433\Delta\Phi, \quad (21)$$

onde G^el é a energia livre eletrostática e pK_0 é o pK_{ap} intrínseco associado a remoção de um próton quando o polieletrólito está descarregado¹⁵ e $\Delta\Psi$ é a diferença de potencial eletrostático entre o polímero e o ponto de referência. Desta forma a solução da EPB fornece uma maneira simples de ajustar as curvas experimentais de titulação potenciométrica.

O cálculo da energia eletrostática em excesso (ΔpK) requer, assim, uma definição consistente do potencial de referência, e para isto pode-se lançar mão de uma imagem pictórica do processo de carregar o polieletrólito. Supondo que inicialmente o políon esteja "desligado", os contra-íons estarão uniformemente distribuídos em toda cela, com concentração média dada por n_c . "Ligar" o políon significa introduzir uma assimetria nesta distribuição, pois parte dos contra-íons são atraídos pelo campo elétrico do polieletrólito. Existirá assim uma distância, r , tomada a partir do eixo da cela, para a qual a concentração local será igual à média. Neste ponto o potencial elétrico é nulo, e ele deve ser usado como referência para o cálculo da energia. Honig e Sharp¹⁶ mostraram que para o modelo de cela o potencial deve ser corrigido adicionando-se o termo:

$$-\ln(n_c^0/n_c), \quad (22)$$

onde n_c^0 , a concentração de contra-íons na borda da cela, é dada por

$$n_c^0 = (1 - A^2)/(2\pi R^2 \lambda_B). \quad (23)$$

Essa correção não altera a distribuição de contra-íons ao redor do polieletrólito e, portanto as propriedades dela dependentes. Além disso, ela é necessária somente no caso de ausência de eletrólito simples.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

a - Análise Numérica da EPB

As equações acima mostram que a solução da equação de Poisson-Boltzmann para a cela coaxial na ausência de eletrólito simples depende dos parâmetros estruturais que modelam a cadeia polieletrólítica (o raio do políon, a , e a distância entre os grupos carregados, b), da concentração de grupos carregados em solução, X_{np} , e da valência dos contra-íons, z_c , que é unitária no estudo que se segue. Estes parâmetros influenciam a solução da EPB através da equação transcendental (20) que os correlaciona à constante de integração A.

Antes de apresentar alguns resultados do estudo numérico da eq. (20), convém rediscutir, particularmente, o parâmetro a . Como dito anteriormente, ele representa a distância de menor aproximação do contra-íon à cadeia polimérica, ou seja, é dado pela menor distância de aproximação entre o eixo do polímero e o centro de massa do contra-íon. Além disso, no contexto da aproximação de campo médio utilizada, este parâmetro contém a dependência de origem não eletrostática envolvida no modelo. Dessa forma é usual considerá-lo dependente dos raios hidratados tanto do polímero como do contra-íon, embora uma definição mais precisa não seja possível. Anderson e Record¹¹, no trabalho de revisão acima citado, comentam que o intervalo representativo de valores desse parâmetro, para políons rígidos, varia entre 3 e 30 Å. Baseado nas limitações para sua definição convém tratá-lo como um parâmetro ajustável da teoria.

A figura 1 mostra o gráfico da constante de integração A em função da densidade de cargas, ξ , para diferentes valores da distância de menor aproximação do contra-íon ao polímero. Conforme comentado na seção anterior, está claro que as soluções da eq. (20) são reais ou imaginários puros, conforme o valor da densidade de carga. Observa-se, ainda, que para a região $\xi > 2$, a variação de $|A|$ é praticamente independente da densidade de carga. Quando a distância de menor aproximação tende a zero, o que é equivalente a considerar o polieletrólito como uma linha de cargas, e os contra-íons pontuais, o potencial eletrostático é independente da densidade de cargas para $\xi \geq 1$. Neste contexto esta é a representação da condensação de contra-íons^{7,8}, pois uma fração de contra-íons liga-se ao políon, formando uma nuvem iônica que reduz a carga efetiva de cada grupo para um valor $\xi_{ef}=1$.

A variação da constante $|A|$ em relação a concentração equivalente do polieletrólito (C_p) no intervalo de concentrações de 1 a 20 meq/l, considerando diferentes valores de a está mostrada na fig. 2, onde todas as curvas referem-se a $\xi=3$. Observa-se que $|A|$ varia significativamente com a concentração

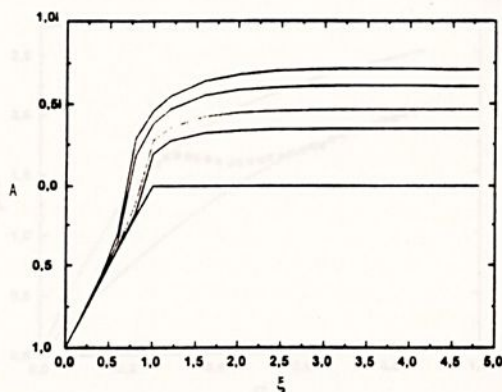


Figura 1. Variação da constante de integração A com a densidade de carga ξ , para valores de $a = 10,0, 5,0, 1,0, 0,1$ Å e $a = 0$, de cima para baixo, respectivamente.

do polímero se a distância de menor aproximação for grande. Quando esta distância decresce, $|A|$ se torna cada vez menos dependente da concentração do polímero no intervalo considerado.

A dependência de $|A|$ com a densidade de cargas, para $\xi > 1$, para diversos valores da concentração do polímero, mantendo $a = 10 \text{ \AA}$, está mostrada na fig. 3. Novamente fica evidente que a variação na constante de integração é decrescente quanto menor a concentração do polieletrólito. O limite $C_p \rightarrow 0$ (no caso de ausência de sal suporte), na teoria de Manning (CC), é a condição para a definição da fração de contraíons condensados. Da eq. (7) vê-se que isto corresponde ao limite $\gamma \rightarrow \infty$, ou seja, a condição para a qual o potencial independe da densidade de cargas para $\xi > 1$ e portanto a condição de condensação, como já discutido com relação ao limite $a \rightarrow 0$. No presente modelo, entretanto, é muito discutível o sentido físico deste limite pois o raio da cela cresce indefinidamente e as condições de aplicabilidade do modelo de cela e da EPB não são satisfeitas. Assim, o limite de $a \rightarrow 0$ é a única condição de condensação a partir da análise deste modelo.

Por fim, na Fig. 4 está mostrado a variação do potencial reduzido ϕ com a constante $|A|$ para valores diversos da distância ao eixo do polímero. Está claro que o potencial é rapidamente decrescente com essa distância e que na superfície do cilindro que representa a cadeia polimérica ele é fortemente dependente de $|A|$. Além disso, ela indica que, mesmo para

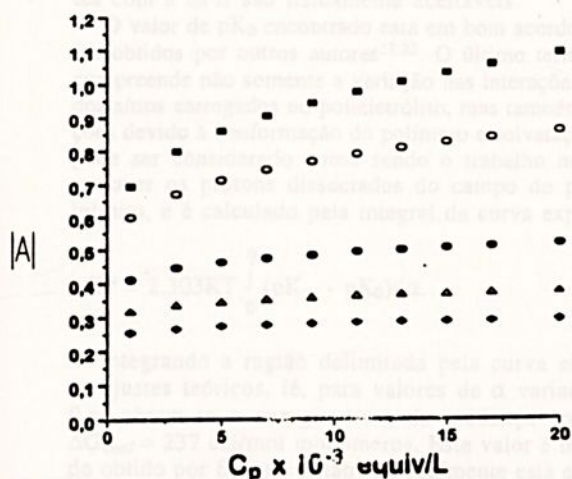


Figura 2. Variação da constante de integração $|A|$ em função da concentração de polímero para $x = 3$ e diversos valores de a : 20 (■); 10 (○); 1 (●); 0.1 (▲) e 0.01 (◆) todos os valores em Å.

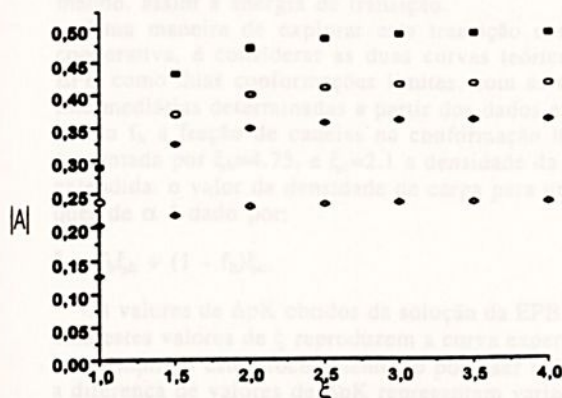


Figura 3. Variação de $|A|$ com a densidade de carga ξ (> 1) para diversos valores da concentração C_p (eq/L) de polímero e $a = 10 \text{ \AA}$. $C_p = 10^{-4}$ (■); 10^{-5} (○); 10^{-6} (●) e 10^{-10} (○).

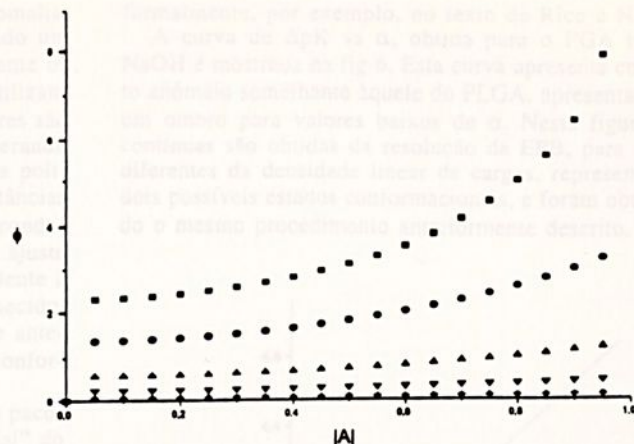


Figura 4. Dependência do potencial reduzido com a constante $|A|$ para diversos valores da distância ao eixo do polímero, considerando $\xi = 3$, $C_p = 5 \text{ meq/l}$ e $a = 10 \text{ \AA}$. De cima para baixo os símbolos representam $r = a$; $2a$; $2,5a$; $3,5a$ e $5a$.

uma densidade de carga alta, o potencial reduzido é aproximadamente zero para distâncias significativamente menores do que R , lembrando que, no caso, $R \sim 10a$. A análise conjunta dessas figuras evidencia a sensibilidade do potencial eletrostático com os diversos parâmetros que caracterizam o sistema. Por exemplo, se da Fig. 1 vimos que $|A|$ é praticamente constante com a densidade de carga para $\xi \geq 2$, esse valor varia com a distância a e da Fig. 2 vê-se que a sua variação com C_p é significativa para valores de $a > 1$. Somente no limite $a \rightarrow 0$ obtém-se a uniformidade.

b - Aplicação da EPB à dissociação do PLGA e PGA

Os resultados da análise acima serão utilizados na interpretação de dados experimentais obtidos de titulação potenciométrica dos poliácidos PLGA e PGA.

A curva de ΔpK vs α para o PLGA, obtidos da titulação potenciométrica com NaOH está mostrado na fig. 5. No eixo y estão dispostos os valores da diferença $pK_{ap} - pK_0$. As curvas representam, portanto, a variação da energia livre eletrostática em função do grau de dissociação. Como pode ser observado esta variação não é monótona como seria esperado para um poliácido fraco, mas apresenta uma anomalia à baixos valores de α .

As soluções da EPB são representadas na figura por linhas contínuas. É importante notar que são curvas suaves e espelham o comportamento esperado para poliácidos fracos.

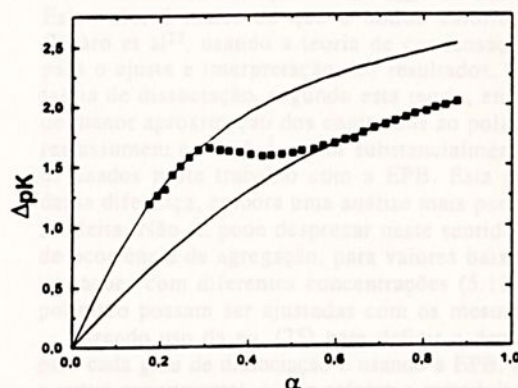


Figura 5. Variação do ΔpK_{ap} com o grau de dissociação, α , para o PLGA. Curvas teóricas (linhas contínuas) com $\xi = 4,75$, $a = 14 \text{ \AA}$ e $\xi = 2,1$, $a = 8 \text{ \AA}$. Concentração do polímero, $C_p = 7 \times 10^{-3} \text{ eq/L}$.

No caso do PLGA, por causa do aparecimento da anomalia, não se consegue ajustar a curva experimental utilizando um único valor da densidade linear de cargas, ξ , mas somente os trechos anterior e posterior a ela podem ser ajustados utilizando os valores $\xi=4.75$ e 2.1 , respectivamente. Estes valores são idênticos aos utilizados por outros autores^{17,18}, considerando modelos que levam em conta a flexibilidade da cadeia polimérica. Os ajustes teóricos foram obtidos usando distâncias de menor aproximação de 16 e $10\text{\AA}$, respectivamente e conduziram a um valor de $pK_0=3.87$. Este valor foi obtido do ajuste teórico para a porção da curva experimental correspondente à valores de α grandes, para os quais o valor de b é conhecido, $\xi=2.1$. A partir deste valor de pK_0 foi ajustada a parte anterior da curva considerando o valor de ξ próprio para a conformação helicoidal.

Simulação com modelos computacionais contidos no pacote WHAT IF¹⁹ mostraram que a conformação "helicoidal" do PLGA, considerando a primeira camada de hidratação, tem um raio de aproximadamente $8\text{\AA}$. Estudos de distribuição de íons monovalentes ao redor do DNA²⁰, através de RMN, mostraram não haver diferença muito grande entre os tempos de relaxação destes íons na presença ou ausência dos polímeros, indicando que possivelmente eles são livres para mover-se no campo elétrico do polieletrólito, alterando pouco, portanto, sua hidratação. Os dados de Kotin e Nagasawa²¹ de deslocamento químico de prótons nas curvas de titulação de poliestireno sulfonado conduzem a resultado semelhante. Considerando estes resultados, os valores de a utilizados nos ajustes com a EPB são fisicamente aceitáveis.

O valor de pK_0 encontrado está em bom acordo com os valores obtidos por outros autores^{18,22}. O último termo da eq. (21) compreende não somente a variação nas interações eletrostáticas dos sítios carregados no polieletrólito, mas também as contribuições devido à conformação do polímero e solvatação. Este termo pode ser considerado como sendo o trabalho necessário para remover os prótons dissociados do campo do poliion para o infinito, e é calculado pela integral da curva experimental:

$$\Delta G^{\text{el}} = 2.303RT \int_0^{\alpha} (pK_{\text{ap}} - pK_0) d\alpha. \quad (24)$$

Integrando a região delimitada pela curva experimental e os ajustes teóricos, i.e., para valores de α variando entre 0 e 0.6 , obtém-se a energia livre da mudança conformacional $\Delta G_{\text{conf}}^0 = 237 \text{ cal/mol monômeros}$. Este valor é muito próximo do obtido por Brant e colab²². Usualmente esta extrapolação é realizada através do ajuste de parte da curva experimental por uma reta ou função quadrática, com os quais se obtém um valor de pK_0 ligeiramente superior, mas um valor para ΔG_{conf}^0 de aproximadamente a metade do obtido com a EPB, substituindo, assim a energia de transição.

Uma maneira de explorar esta transição conformacional, cooperativa, é considerar as duas curvas teóricas obtidas da EPB como duas conformações limites, com as conformações intermediárias determinadas a partir dos dados experimentais. Sendo f_h a fração de cadeias na conformação helicoidal, representada por $\xi_h=4.75$, e $\xi_c=2.1$ a densidade da conformação estendida, o valor da densidade de carga para um valor qualquer de α é dado por:

$$\xi = f_h \xi_h + (1 - f_h) \xi_c. \quad (25)$$

Os valores de ΔpK obtidos da solução da EPB recalculados com estes valores de ξ reproduzem a curva experimental. Embora empírico este procedimento só pode ser aplicado porque a diferença de valores de ΔpK representam variações efetivas nos potenciais químicos. A determinação rigorosa da fração f_h , para polieletrólitos, necessita uma formulação estatística que considere efeitos de longo e curto alcance e está desenvolvido

formalmente, por exemplo, no texto de Rice e Nagasawa¹⁵.

A curva de ΔpK vs α , obtida para o PGA titulado com NaOH é mostrada na fig 6. Esta curva apresenta comportamento anômalo semelhante àquele do PLGA, apresentando também um ombro para valores baixos de α . Nesta figura as curvas contínuas são obtidas da resolução da EPB, para dois valores diferentes da densidade linear de cargas, representando assim dois possíveis estados conformacionais, e foram obtidas seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito.

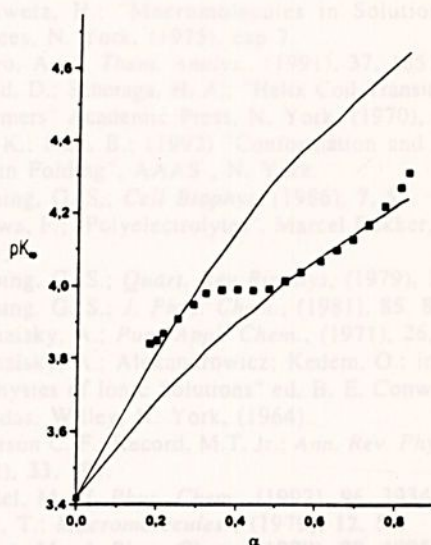


Figura 6. Dependência do pK_{ap} com o grau de dissociação, α , para o PGA. Curvas teóricas para $\xi = 1.67$, $a = 10\text{\AA}$ e $\xi = 1.57$, $a = 16\text{\AA}$. Concentração do polímero, $C_p = 19.2 \times 10^{-3} \text{ equiv/L}$.

Se para o PLGA os valores dos parâmetros estruturais para as duas conformações são bem conhecidos, o mesmo não ocorre com o PGA, embora não só a anomalia mostrada na fig. 6, como também resultados de calorimetria, dispersão óptica rotatória e osmometria²³, evidenciam a existência de uma transição conformacional. As evidências de estudos de difração de raios X neste polímero, nas formas salina e ácida²⁴, de espalhamento de luz em peptatos²⁵ e cálculos conformacionais evidenciam conformações helicoidais de simetrias dois e três porém com aproximadamente os mesmos passos de hélices. Desta forma procuramos ajustar as curvas de pK_{ap} com dois valores de densidade de cargas próximos $\xi=1.67$ e 1.57 , obtendo $pK_0=3.42$ que está em bom acordo com o valor obtido por outros autores^{23,26}. O valor da energia livre conformacional calculado da titulação foi $\Delta G_{\text{conf}}^0 = 63 \text{ cal/mol monômeros}$. Este valor é maior do que o obtido calorimetricamente por Cesàro et al²⁷, usando a teoria de condensação de contraíons para o ajuste e interpretação dos resultados. O cálculo da entalpia de dissociação, segundo esta teoria, envolve a distância de menor aproximação dos contraíons ao poliion, que os autores assumem como $5\text{\AA}$, valor substancialmente menor do que os usados neste trabalho com a EPB. Esta pode ser a fonte dessa diferença, embora uma análise mais aprofundada deva ser feita. Não se pode desprezar neste sentido a possibilidade de ocorrência de agregação, para valores baixos de α , embora titulações com diferentes concentrações (5.12 e 19.2 mM) de polímero possam ser ajustadas com os mesmos parâmetros.

Fazendo uso da eq. (25) para definir a densidade de cargas para cada grau de dissociação e usando a EPB, reproduz-se toda a curva experimental, o que reforça a metodologia adotada.

A EPB foi utilizada, ainda, para calcular os valores do fator de transporte em função do grau de dissociação usando a expressão²⁸

$$f = \frac{D_0}{D} = V^2 \left(\int_V \exp(\Phi) dv \int_V \exp(-\Phi) dv \right)^{-1}, \quad (26)$$

onde V é o volume ocupado pelos contraíons. Os resultados apresentam boa concordância com os dados experimentais, como mostrado na figura 7. Nessa figura os dados teóricos foram obtidos com os valores médios de ξ e α , usados nos ajustes do pK aparente.

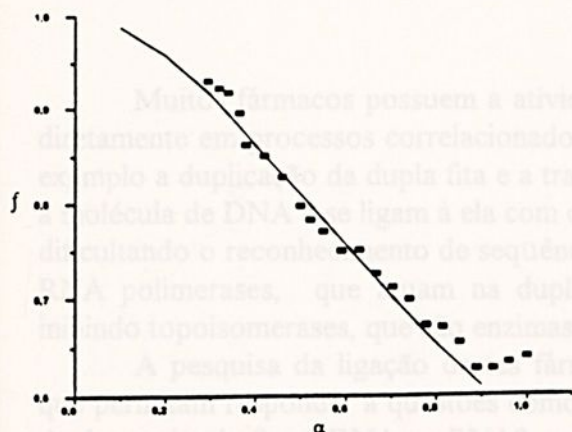


Figura 7. Dependência do fator de transporte, f , com o grau de dissociação. A curva teórica foi obtida usando a equação (26) e o valor médio da densidade de carga encontrado no ajuste do pK aparente.

CONCLUSÕES

O presente trabalho rediscutiu o modelo de cela e a equação de Poisson-Boltzmann aplicando-a à análise de dados experimentais de titulação potenciométrica e condutimétrica. Como enfatizado no texto a EPB tem sido largamente aplicada na análise de propriedades coligativas e de transporte de soluções polieletrólíticas, por ser um modelo de fácil trato computacional, embora isso se torne possível devido as drásticas simplificações introduzidas. Assim, a secção de resultados teóricos foi introduzida mais por completude no sentido de deixar o trabalho mais didático e autoconsistente.

Os resultados apresentados indicam que o modelo de cela e a EPB constituem um modelo útil para estudar a distribuição iônica em soluções aquosas de polieletrólitos, especialmente na interpretação de titulações potenciométrica e condutimétrica de poliacidos fracos. É importante lembrar que a dissociação destes poliacidos é uma das aplicações mais críticas deste e de outros modelos de solução polieletrólítica. Vale comentar que os valores de pK_0 são sempre ajustáveis através de extrapolação para $\alpha \rightarrow 0$. A EPB fornece uma base teórica para esse procedimento.

O parâmetro crítico da teoria é a distância de menor aproximação dos íons ao polímero. Este parâmetro, como discutido, representa mais que a mera soma dos raios dos diversos

componentes hidratados, refletindo, numa espécie de média, um conjunto complexo de interações. É de se esperar que com os avanços no entendimento de sistemas líquidos e soluções de macromoléculas, seja usando a formulação estatística ou simulação computacional, ele possa ser melhor entendido. Isto não impede que, através da escolha criteriosa deste parâmetro, o modelo auxilie na interpretação de uma ampla gama de resultados experimentais, alguns deles discutidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Morawetz, H.; "Macromolecules in Solution", Intersciences, N. York, (1975), cap 7.
2. Cesaro, A.; *J. Them. Analys.*, (1991), 37, 1851.
3. Poland, D.; Scheraga, H. A.; "Helix Coil Transition in Biopolymers" Academic Press, N. York, (1970), cap 6.
4. Dill, K.; Nall, B.; (1992) "Conformation and Forces in Protein Folding", AAAS, N. York.
5. Manning, G. S.; *Cell Biophys.*, (1986), 7, 57.
6. Oosawa, F.; "Polyelectrolytes", Marcel Dekker, N. York, (1971).
7. Manning, G. S.; *Quart. Rev Biophys.*, (1979), 11, 179.
8. Manning, G. S.; *J. Phys. Chem.*, (1981), 85, 870.
9. Katchalsky, A.; *Pure Appl. Chem.*, (1971), 26, 270.
10. Katchalsky, A.; Alexandrowicz; Kedem, O.; in "Chemical Physics of Ionic Solutions" ed. B. E. Conway e R.G. Barradas. Wiley, N. York, (1964).
11. Anderson C. F.; Record, M.T. Jr.; *Ann. Rev. Phys. Chem.*, (1982), 33, 191.
12. Mandel, M.; *J. Phys. Chem.*, (1992), 96, 3934.
13. Odijk, T.; *Macromolecules*, (1979), 12, 51.
14. Fixman, M.; *J. Phys. Chem.*, (1979), 70, 4995.
15. Rice, S. A.; Nagasawa, M.; "Polyelectrolyte Solutions", Academic Press, N. York, (1961), cap 7.
16. Sharp, K. A.; Honig, B. J.; *Phys. Chem.*, (1990), 94, 7684.
17. Cesaro, A.; Paoletti, S.; Benegas, J. C.; *Biophys. Chem.*, (1991), 39, 1.
18. Cesaro, A.; Paoletti, S.; Guidugli, S.; Benegas, J. C.; *Biophys. Chem.*, (1991), 39, 9.
19. Vriend, G.; *J. Mol. Graphics*, (1990), 8, 52.
20. Mills, P.; Anderson, C. F.; Record, M. T. Jr.; *J. Phys. Chem.*, (1986), 90, 6541.
21. Kotin, L.; Nagasawa, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1961), 83, 1026.
22. Dubin, P. L.; O'Connor, F.; Farris, L. A.; Brant, D. A.; "Thermodynamic Characterization of a Polymer Helix-Coil Transition using Ion Titration: A Physical Chemistry Laboratory Experiment, Preprint, U. California.
23. Cesaro, A.; Delben, F.; Paoletti, S.; *Int. J. Biol. Macromol.*, (1990), 12, 170.
24. Walkinshaw, M. D.; Arnott, S.; *J. Mol. Biol.*, (1981), 153, 1055.
25. Thibault, J. F.; Rinaudo, M.; *Biopolymers*, (1985), 24, 2131.
26. Ravanat, G.; Rinaudo, M.; *Biopolymers*, (1985), 24, 2131.
27. Cesaro, A.; Ciana, A.; Delben, F.; Manzini, G.; Paoletti, S.; *Biopolymers*, (1982), 21, 431.
28. Marcus, R. A.; *J. Chem. Phys.*, (1955) 23, 1057.

Publicação financiada pela FAPESP

CAPÍTULO III

EFEITO MODULADOR DE CARGA ELÉTRICA NA LIGAÇÃO DE DROGAS COM DNA

Muitos fármacos possuem a atividade biológica centrada no núcleo celular e agem diretamente em processos correlacionados com o aumento do número de células como por exemplo a duplicação da dupla fita e a transcrição. Em geral estes fármacos têm como alvo a molécula de DNA e se ligam à ela com o objetivo de estabilizar a estrutura de dupla hélice, dificultando o reconhecimento de seqüências de bases por parte de enzimas como DNA ou RNA polimerases, que atuam na duplicação e transcrição (Waring, 1981), ou ainda, inibindo topoisomerases, que são enzimas fundamentais nestes processos (Liu, 1994).

A pesquisa da ligação destes fármacos com ácidos nucleicos procura informações que permitam responder a questões como: qual o tipo de ligação feita?, preferência por fita dupla ou simples? por DNA ou RNA?, apresenta preferência por seqüência de bases?, qual a energética da ligação? etc. (Waring, 1981). Os progressos verificados na última década em métodos de síntese e purificação de oligonucleotídeos associados aos avanços em métodos de espectroscopia, difração de raios X, modelagem molecular e técnicas de Biologia Molecular, especialmente na preparação e clonagem de fragmentos de DNA e técnicas de "footprinting" (Ravezin 1993), têm permitido dar respostas a estas questões e proporcionado um avanço significativo no entendimento destas interações e tem, conseqüentemente, auxiliado para projetar novos fármacos.

As antraciclinas são uma família de antibióticos naturais que por interagirem com DNA têm utilização clínica intensa como antibióticos e drogas anti-tumorais (Waring 1981). A daunomicina, pertencente a esta família, tem atividade de inibir a duplicação e a transcrição, atuando como antibiótico, inibindo a multiplicação de vírus, mostrando ainda uma considerável atividade quimioterápica em leucemias agudas. Desta mesma família, a adriamicina apresenta uma atividade antitumoral significativamente maior, mostrando ter maior eficiência como droga anticâncer. Apesar de apresentarem atividades quimioterápicas e antibióticas relativamente distintas estas duas drogas possuem estruturas quase idênticas, sendo que a única diferença entre elas é a presença, na adriamicina, de uma hidroxila na posição 14 do cromóforo (fig. 3).



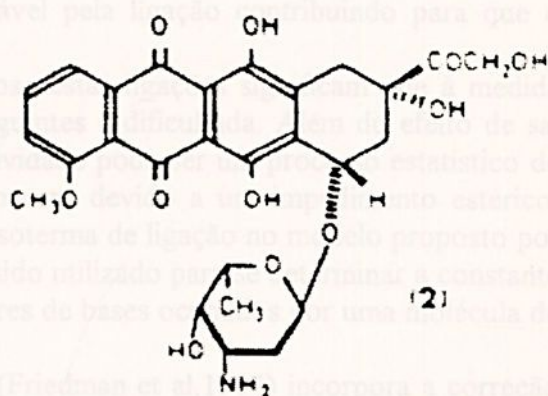
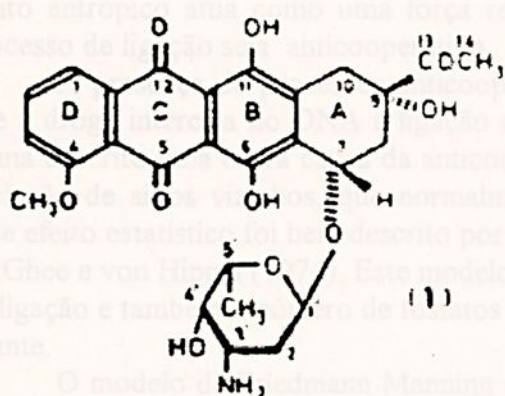


Fig. 3 - Estruturas químicas da daunomicina (1) e adriamicina (2).

As estruturas cristalográficas de complexos destas drogas com oligonucleotídeos (Quigley et al, 1981, Moore et al, 1989) e estudos de dinâmica e mecânica molecular (Neidle et al, 1987 e Cieplak et al, 1990) mostraram que elas interagem com o DNA intercalando seu cromóforo aglicone entre dois pares de bases, sendo que o anel D do cromóforo é projetado para o sulco maior da dupla hélice onde insere seu grupo metoxil, enquanto a cadeia lateral de açúcar aminado, daunosamina, se insere no sulco menor da dupla hélice.

Neste processo de ligação a presença da carga positiva no grupo amina do açúcar, em pH neutro, deve ser um fator importante na modulação da intensidade de ligação da droga ao DNA, e sua contribuição energética merece nossa atenção. Deste ponto de vista, o efeito de sal na blindagem eletrostática destes grupos e no processo entrópico de liberação de íons, deve ser levado em conta para a descrição do processo de ligação destas drogas à dupla hélice.

Friedmann e Manning (1984) propuseram um modelo que incorpora os efeitos de sal suporte na ligação de drogas carregadas e neutras ao DNA. Segundo este modelo o efeito de aumento de sal, especificamente na intercalação de drogas ao DNA, se deve à blindagem dos grupos fosfato, o que reduz a componente de origem eletrostática da interação e a componente entrópica da ligação. Este balanço energético, especialmente o termo entrópico, devido à diferença de concentração de sal entre a fase condensada e a solução, atua como uma força responsável pela interação ("driving force").

O efeito de concentrações crescentes de sal é aumentar a blindagem eletrostática reduzindo a repulsão entre os grupos fosfato, o que faz com que as bases se comprimam,

aumentando a torção na dupla hélice (Anderson e Bauer 1978 e Manning 1981). Este efeito compete com o que ocorre normalmente no processo de intercalação onde a dupla hélice recebe um torção no sentido anti-horário, contrário ao sentido normal de torção ("unwinding"), e a distância entre os grupos fosfato é aumentada (Jain et al 1977, Saenger 1984, Neidle et al 1987).

O efeito de sal, portanto, é importante tanto para drogas carregadas como neutras. O aumento da distância entre as bases na intercalação, reduz ainda mais a repulsão entre os grupos fosfato e uma quantidade menor de contraíons são, portanto, necessários para manter a estabilidade da estrutura, sendo o excesso liberado para a solução (bulk). Este efeito entrópico atua como uma força responsável pela ligação contribuindo para que o processo de ligação seja anticooperativo.

A presença de processos anticooperativos nestas ligações significam que à medida que a droga intercala no DNA a ligação das seguintes é dificultada. Além do efeito de sal acima descrito uma outra causa da anticooperatividade pode ser um processo estatístico de exclusão de sítios vizinhos, que normalmente ocorre devido a um impedimento estérico. Este efeito estatístico foi bem descrito por uma isoterma de ligação no modelo proposto por McGhee e von Hippel (1974). Este modelo tem sido utilizado para se determinar a constante de ligação e também o número de fosfatos ou pares de bases ocupados por uma molécula de ligante.

O modelo de Friedmann Manning (FM) (Friedman et al, 1984) incorpora a correção devido ao efeito polieletrólítico na isoterma de McGhee e von Hippel (MH) tornando-a mais realista. A utilização deste modelo pode resultar em valores mais precisos da ocupação no DNA. Em algumas situações o modelo MH não descreve satisfatoriamente a concavidade das isotermas anticooperativas, quando somente a exclusão de sítios vizinhos é levada em conta. Nestas situações é necessário a introdução de um parâmetro de anticooperatividade cujo significado físico é de difícil acesso.

Tendo em vista a importância da carga no açúcar aminado das antraciclinas na estabilização do complexo antraciclina-DNA, foram realizados experimentos com o objetivo de descrever a interação de daunomicina comparando os modelos de McGhee e von Hippel e o de Friedmann Manning. (Xodo et al 1988, Xodo et al 1987 anexos).

Os polinucleotídeos sintéticos permitiram testar a afinidade a várias seqüências purina - pirimidina, que potencialmente são o sítio de preferência para intercalação. Os valores de constantes de ligação e a ocupação são resumidos na tabela IV.

O possível impedimento estérico entre o grupo amina do N3 da base e do açúcar, no sulco menor, não parece ser um fator determinante da afinidade, pois as constantes de ligação as seqüências G-C e T-C são muito próximas. A comparação destas duas seqüências sugerem ainda que a possível interação do grupo hidroxila ligado a posição 2 do anel A com o grupo amina N2 da guanina parece ter uma importância secundária na estabilização do complexo.

Os ajustes através da FM resultaram em números de ocupação ligeiramente menores do que os obtidos com a MH. Chares et al (1982 e 1983) obtiveram $n = 4$ para DNA-ct e para poly(dG-dC), próximos aos valores obtidos com a MH: 3.7 e 3.3 respectivamente. Posteriormente Chares et al (1987) encontraram, através de experimentos de proteção à digestão por DNase I ("footprinting") em fragmentos de pBR322, que a ocupação é entre dois e três pares de bases, em bom acordo com os nossos resultados pois trata-se de ligação a seqüências aleatórias nos quais a ocupação é sempre maior do que em polinucleotídeos.

TABELA IV

Valores de constante de ligação de daunomicina a DNA com diferentes seqüências de bases e a estequiometria da ligação. Valores obtidos com o modelo de Friedmann-Manning e de McGhee-von Hippel.

ÁCIDO NUCLÉICO	FRIEDMAN-MANNING		McGHEE-vonHIPPEL	
	K(0) (μM^{-1})	n (pb)	K(0) (μM^{-1})	n (pb)
poli(dG-m5dC) ₂	7.0 ± 0.7	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1
poli(dA-dT) ₂	5.0 ± 0.2	1.68 ± 0.07	1.24 ± 0.04	2.3 ± 0.1
poli(dA-dC): poli(dG-dT)	3.62 ± 0.07	1.61 ± 0.04	1.7 ± 0.05	2.7 ± 0.1
poli(dI-dC) ₂	2.05 ± 0.08	1.62 ± 0.07	0.84 ± 0.05	2.7 ± 0.1
poli(dG-dC) ₂	1.22 ± 0.08	1.7 ± 0.1	0.80 ± 0.03	3.3 ± 0.2
poli(dA-dU) ₂	0.89 ± 0.05	1.8 ± 0.1	0.39 ± 0.02	2.9 ± 0.1
DNA-ct	0.83 ± 0.02	2.0 ± 0.1	0.59 ± 0.02	3.7 ± 0.1

Estes resultados indicam uma diferença razoável entre os valores das constantes de ligação e da ocupação calculados com os dois modelos. Os ajustes teóricos das isotermas de ligação sugeriram que a incorporação do efeito polieletrólítico descreve mais adequadamente a ligação.

A ordem de afinidade obtida foi: G-me5C > A-T > A-C:G-T > I-C > G-C > A-U, indicando grande preferência pela seqüência G-me5C com uma constante de ligação 5 a 6 vezes maior do que a seqüência G-C. Esta preferência pode estar indicando um possível contato hidrofóbico entre o grupo metil da citosina e o grupo metoxil do anel D do conjunto aglicone da droga, já que ambos devem se posicionar no sulco maior da dupla hélice. Este argumento é reforçado quando se considera as duas outras seqüências com grande afinidade: A-T e A-C:G-T, pois devido à timina estas seqüências também possuem o grupo metil voltado para o sulco maior, possibilitando contato semelhante. Apesar da presença do grupo metil em A-T a afinidade à esta seqüência foi quase 30% menor do que à G-me5C, que pode estar refletindo a diferença na largura do sulco menor, mais estreito na seqüência A-T (Neidle et al, 1987 e Yoon et al, 1988).

O possível impedimento estérico entre o grupo amina do N3 da base e do açúcar, no sulco menor, não parece ser um fator determinante da afinidade, pois as constantes de ligação às seqüências G-C e I-C são muito próximas. A comparação destas duas seqüências sugerem ainda que a possível interação do grupo hidroxila ligado à posição 9 do anel A com o grupo amina N2 da guanina parece ter uma importância secundária na estabilização do complexo.

Os ajustes através da FM resultaram em números de ocupação ligeiramente menores do que os obtidos com a MH. Chaires et al (1982 e 1983) obtiveram $n = 4$ para DNA-ct e para poli(dG-dC)₂ próximos aos valores obtidos com a MH: 3.7 e 3.3 respectivamente. Posteriormente Chaires et al (1987) encontraram, através de experimentos de proteção à digestão por DNase I ("footprinting") em fragmentos de pBR322, que a ocupação é entre dois e três pares de bases, em bom acordo com os nossos resultados pois trata-se de ligação a seqüências aleatórias nos quais a ocupação é sempre maior do que em polinucleotídeos.

Além de proporcionar ajustes melhores o modelo FM descreveu explicitamente o efeito de sal na dependência da energia de ligação com a concentração de sal. O modelo prevê que para cada molécula de droga que intercala no DNA ($1+1/\xi$) contraíons são liberados das vizinhanças do DNA. As isotermas em diferentes concentrações de NaCl, de 0.035 M a 0.280 M apresentam uma dependência linear de $\log(K_{obs})$ vs $\log([Na^+])$, e o número de íons sódio liberados por molécula de daunomicina ligada é 0.92, próximo do valor previsto pela teoria 1.24.

As entalpias de vant'Hoff obtidas indicaram um processo entálpico de ligação: $\Delta H_{vH} = -10.0$ kcal/mol para poli(dG-dC)₂, $\Delta H_{vH} = -11.0$ kcal/mol para poli(dA-dC):poli(dG-dT), enquanto a entalpia calorimétrica medida por Marki et al (1983) para poli(dA-dT)₂ foi $\Delta H = -8.9$ kcal/mol. Através de titulações microcalorimétricas utilizando um microcalorímetro de titulação "stopped flow", um equipamento bastante preciso, Remeta et al. (1991) três anos depois, obtiveram valores de entalpia muito próximos aos nossos, o que parece sugerir que a correção devido ao efeito polieletrólítico proporcionou uma descrição mais realista do processo de ligação.

O efeito da carga presente no açúcar, assim como da 14-OH foram testados através da comparação das afinidades de ligação da daunomicina (D), da adriamicina (AD) e da N-acetil-adriamicina (NAD). As duas primeiras (D e AD) têm estruturas idênticas com exceção da presença do grupo hidroxila na posição 14 do anel A do cromóforo aglicone (fig 3), enquanto que a terceira (NAD) é uma adriamicina com o grupo amina do açúcar acetilado, portanto sem carga elétrica. A avaliação do efeito de carga foi feita através do modelo FM (Ruggiero et al 1992).

Neste trabalho foi feito um estudo sistemático da agregação das drogas utilizando dois modelos: um que leva em conta somente a dimerização e outro que descreve um processo de associação indefinida. As isotermas de ligação das drogas foram calculadas levando-se em conta as constantes de dimerização obtidas com estes dois modelos. Para baixas concentrações de droga ($\sim 5 \mu M$) o modelo de dimerização foi suficiente para descrever a agregação da droga. Entretanto, para concentrações mais altas foi necessário utilizar o modelo de associação indefinida em bom acordo com os resultados de Remeta et al (1991).

Os valores de energia livre de ligação das drogas a diferentes seqüências 5' purina-pirimidina 3' obtidas das isotermas de ligação são mostrados na tabela V. Estes valores indicam que a presença da carga elétrica no amino-açúcar produz um efeito significativo na estabilização dos complexos. Os complexos formados pelas drogas que possuem este grupo têm em média a energia livre 2.33 kcal/mol menor do que os complexos formados pelo derivado N-acetil da adriamicina. Isto significa que as drogas portadoras dos grupos carregados se ligam ao DNA com constantes 20 a 50 vezes maiores do que a adriamicina modificada.

O modelo FM permitiu avaliar a contribuição do efeito de carga nesta ligação, o valor calculado foi de 1.48 kcal/mol. Assim da diferença de energia livre calculada entre as duas drogas carregadas e a não carregada (2.33 kcal/mol), 1.48 kcal/mol, ié, mais de 60% é devido ao efeito de carga.

Os dados da tabela V mostram ainda que a presença do 14-OH no cromóforo aglicone não altera significativamente a ordem de especificidade em relação à daunomicina, com exceção para as seqüências 5'A-T3' e 5'A-U3'. Como aspecto comum estas seqüências possuem o grupo 6-NH livre para pontes de hidrogênio no sulco maior com o grupo 14-OH, esta poderia ser uma possível explicação para a diferença de afinidade observada para estas

seqüências. Mesmo a possibilidade de ponte de hidrogênio entre o grupo 14-OH da adriamicina e o grupo fosfato do DNA observado por espectroscopia de Raman (Pohle e Fleming, 1986) não é suficiente para explicar a seletividade maior desta droga por A-T ou A-U.

TABELA V

Energias livres padrão, em kcal/mol, para a ligação de antraciclinas a seqüências 5'purina-pirimidina3' obtidas de extrapolação para r→0 com modelo FM. Para N-acetil-adriamicina (NAD), adriamicina (AD) e daunomicina (D), e as diferenças nas energias livres padrão entre elas.

polímero	-ΔG ⁰ NAD kcal/mol	-ΔG ⁰ AD	-ΔG ⁰ D	Δ(ΔG ⁰) AD-NAD	Δ(ΔG ⁰) D-NAD	Δ(ΔG ⁰) D-AD
d(G-me5C) ₂	7.48	9.63	9.68	2.15	2.2	0.05
d(A-T) ₂	7.29	9.63	9.49	2.34	2.2	-0.14
d(GT):d(AC)	6.83	-	9.29	-	2.46	-
d(I-C) ₂	6.69	-	8.99	-	2.3	-
d(G-C) ₂	6.28	8.7	8.7	2.42	2.42	0.0
d(A-U) ₂	6.14	8.58	8.48	2.44	2.34	-0.1
média experimental em Δ(ΔG ⁰)				2.34	2.32	-0.05

On the Interaction of Daunomycin with Synthetic Alternating DNAs: Sequence Specificity and Polyelectrolyte Effects on the Intercalation Equilibrium

LUIGI EMILIO XODO, GIORGIO MANZINI, JOÃO RUGGIERO,*

Department of Biochemistry, Biophysics and Macromolecular Chemistry, University of Trieste, I-34127 Trieste; and FRANCO QUADRIFOGLIO, Institute of Biology, Faculty of Medicine, University of Udine, I-33100 Udine, Italy

Synopsis

The interaction of daunomycin with ctDNA and six purine-pyrimidine alternating polydeoxynucleotides has been studied using fluorometric and uv-visible absorption methods. In the explored binding range of $r > 0.05$, the intercalation of the drug into the DNAs proved to be anticooperative, as indicated by the pronounced upward curvature of all the Scatchard plots obtained. The experimental data have been analyzed according to the recent theory of Friedman and Manning, which describes the polyelectrolyte effects on the site binding equilibria, drug intercalation included. We found that, accounting for the polyelectrolyte effects in the neighbor site exclusion model, the experimental data were nearly equally well described, in a wide range of binding ratios, by assuming the presence of sequence specificity effects (site size = 2 base pairs, exclusion parameter $n = 1$) or its absence (site size = 1 base pair, $n = 1.7$). The relevant results are as follows: (a) Daunomycin binds to all the DNAs considered with a stoichiometry of approximately 1 drug for every two base pairs. (b) The anticooperative nature of the interaction is essentially polyelectrolytic in origin. (c) The binding affinity shown by the drug for the different sites considered decreases in the order of $Gm^5C > AT > AC-GT > IC > GC > AU$, indicating a stabilizing effect of the $-CH_3$ group in position 5 of the pyrimidines. (d) The extent of quenching of the intrinsic fluorescence of daunomycin in the presence of DNA is bound to the presence, at the intercalation site, of a guanine residue, since GC, Gm^5C , and AC-GT sites induce a nearly total quenching, whereas AT, AU, and IC sites act only partially in this respect. The structural results obtained from the daunomycin-d[(CGTACG)]₂ crystal suggest that the 2-NH₂ group of guanine might be responsible for such a phenomenon. The influence of both the temperature and the ionic strength on the free energy of drug intercalation into ctDNA, poly[d(G-C)]:poly[d(G-C)], and poly[d(A-C)]:poly[d(G-T)] is examined and discussed.

INTRODUCTION

Daunomycin and its closely related 14-OH derivative adriamycin are anthracycline antibiotics widely used as chemotherapeutic agents for various human tumors.¹⁻³ The drug is believed to exert its biological activity by intercalating into the DNA double helix and by its ability to inhibit both DNA replication and RNA transcription.⁵⁻⁸ The chemistry as well as the pharmacological properties of daunomycin and related derivatives have been

*On leave of absence from the Physics Department, Institute of Biosciences—UNESP, 15100 S. José do Rio Preto, (SP) Brasil.



extensively investigated.^{1-3,9} Studies based on hydrodynamic,^{10,11} calorimetric,¹² and spectroscopic¹³⁻¹⁷ measurements are consistent with the intercalation of the drug into the DNA double helix. The insertion of the planar daunomycinone chromophore between adjacent DNA base pairs (bp) has been well established by x-ray diffraction analysis to atomic resolution of the complex between daunomycin and the duplex of d(CGTACG).^{18,19}

The interaction of daunomycin with DNA has been extensively investigated in aqueous solution. For example, it has been shown that (a) the drug binding to DNA probably involves three distinct steps, corresponding to a rapid "outside" binding, followed by intercalation and then by conformational changes of the drug and/or DNA binding site or drug redistribution²⁰; (b) daunomycin binds with higher affinity to free DNA than to nucleosomal DNA,²¹ suggesting the preference of the drug for a particular conformation; (c) the drug can effectively depress both the rate and the extent of the B-Z transition in poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] in 4M NaCl, thus showing a preference for B-DNA.²²

As for the DNA sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction, various studies have been carried out with synthetic polydeoxynucleotides of defined sequence by several research groups,^{13,23-26} with somewhat different results. However, there is a general consensus for the preference of daunomycin for alternating pyrimidine-purine polymers.^{25,27,28} In order to find out both the sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction and to obtain a thermodynamical picture of the intercalation process, we have carried out a systematic spectroscopic study on the binding of daunomycin to DNA and to six different pu-py alternating polydeoxynucleotides. In each case the binding data, represented in the usual Scatchard plot form,²⁹ show a concave upward curvature, as already found by other authors,^{13,14,16,30,31} reflecting the anticooperative nature of the interaction in the explored range of $r > 0.05$. In order to fully account for the anticooperativity shown by the interaction we have analyzed the data with the isotherm recently proposed by Friedman and Manning, which describes the influence of the polyelectrolyte effects on the equilibrium of site binding, extended also to neutral and charged intercalators.³² We found that our binding data were well described (vide infra), particularly at high binding ratios, by this binding isotherm (Eq. 77 of Friedman-Manning's theory³²) which in principle can include both neighbor site exclusion and polyelectrolyte contributions. We found that daunomycin binds to ctDNA and to the alternating copolymers with a stoichiometry of one daunomycin every two sites (site size = 1 base pair) and that the affinity of the drug for the various sequences follows the decreasing order of poly[d(G-m⁵C)] : poly[d(G-m⁵C)] > poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)] > poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)] > poly[d(I-C)] : poly[d(I-C)] > poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] > poly[d(A-U)] : poly[d(A-U)]. Moreover, the salt and temperature dependence of the free energy of binding of daunomycin to DNA has been explored for some of the above polymers.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Calf thymus DNA and poly[d(I-C)] : poly[d(I-C)] were purchased from Sigma Chemical; poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)], poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)],

poly[d(G-m⁵C)] : poly[d(G-m⁵C)], poly[d(A-U)] : poly[d(A-U)], and poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)] were from Pharmacia. Daunomycin was a gift from Farmitalia, Milan. The concentration of the polydeoxynucleotide solutions were determined by uv absorption at room temperature using as extinction coefficients the following values: poly[d(G-m⁵C)] : poly[d(G-m⁵C)], $\epsilon_{254} = 7100M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³³; poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)], $\epsilon_{262} = 6600M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)], $\epsilon_{254} = 7100M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³³; ctDNA, $\epsilon_{260} = 6400M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)], $\epsilon_{260} = 6500M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³⁴; poly[d(I-C)] : poly[d(I-C)], $\epsilon_{260} = 6900M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; poly[d(A-U)] : poly[d(A-U)], $\epsilon_{262} = 6600M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The right-handed B secondary structure of each polymer in the working buffer (see below) was confirmed by CD and uv melting experiments.

Buffer and Solutions

The standard solvent used in this work contained 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH 7.4. Titrations at different ionic strengths were carried out using the same buffer and EDTA concentration, but with the appropriate NaCl contents. Aqueous solutions of the drug were stored at -20°C and used within 2-3 weeks. Working solutions of the drug were prepared immediately before each experiment by diluting the stock solution and then determining the concentration by uv absorption ($\epsilon_{480} = 11500M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³⁵).

Spectrophotometric Titrations

Absorbance measurements were performed using a Cary 219 (Varian) spectrophotometer equipped with a thermostatted cell holder and stoppered quartz cuvettes. Titrations were made by adding successive aliquots of DNA to a drug solution (50-100 μM ca., 1 mL solution in a 0.5-cm cell) and recording the spectrum after each addition. Once the limit spectrum, i.e., that in the presence of a large excess of DNA, was obtained, the concentrations of bound and free drug needed for the Scatchard analysis were calculated according to³⁶

$$C_B = [(A^0 - A)/(A^0 - A_F)] C_T$$

$$C_F = C_T - C_B$$

where A^0 , A_F , and A are the drug absorbances in the absence of DNA, in the presence of a large excess of DNA, and of a mixture of free and bound drug, respectively; C_T is the total concentration of the drug in solution. The dimerization of daunomycin was taken into account in calculating C_F , using an association constant of $3300M^{-1}$.³⁵

Fluorometric Titrations

Fluorometric titrations were performed with a Perkin Elmer Model MPF-3L spectrofluorometer equipped with a thermostatted cell holder. The excitation wavelength was 470 nm; the emission spectra, from 500-750 nm, were recorded in the ratio mode. Titrations at 25°C were carried out by inducing the decrease of intrinsic fluorescence of a daunomycin solution (5 μM ca., 1.2 mL

solution in a 1-cm cuvette) by adding discrete aliquots (from 2 to 5 μL) of polymer solution. The fluorescence intensity of the drug in the absence (F_0) and in the presence of each amount (F) of DNA were used to calculate the quantities of free and bound drug from the relations³⁶

$$C_F = C_T[F/F_0 - P]/(1 - P)$$

$$C_B = C_T - C_F$$

where C_T is the total concentration of the drug in solution and P is the ratio between the fluorescence of the bound drug and that of the free drug. Inner filter effects were negligible.

Analysis of Binding Data

The Scatchard plots, obtained from absorption and fluorometric titrations, were fitted according to the neighbor exclusion model of McGhee and von Hippel,³⁶ and with a more complex binding isotherm developed by Friedman and Manning³² (see the results and discussion section). The best fits were done using a nonlinear least square program (algorithm of Marquardt) run in a VAX hardware system.

RESULTS AND DISCUSSION

Spectral Properties of Daunomycin-Polynucleotide Complexes

The visible absorption spectrum of daunomycin, in phosphate buffer, pH 7.4, is characterized by $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ and $\epsilon_{480} = 11500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.³⁵ When

TABLE I
Spectral Properties of the Complexes of Daunomycin with Polydeoxynucleotides in
150 mM NaCl, 10 mM Phosphate Buffer, 1 mM EDTA, pH 7.4

Sample	Absorption			Fluorescence ^a	
	λ_{max} (nm)	ϵ_{480} ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\Delta\epsilon_{480}$ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{max}	R.q.y.
ctDNA	506	7140 $\pm$ 250	4360	558	0.05 $\pm$ 0.02
Poly[d(G-m ⁵ C)]: poly[d(G-m ⁵ C)]	—	—	—	558	0.02 $\pm$ 0.02
Poly[d(G-C)]: poly[d(G-C)]	506	7040 $\pm$ 250	4460	558	0.05 $\pm$ 0.02
Poly[d(A-T)]: poly[d(A-T)]	505	7040 $\pm$ 250	4460	558	0.58 $\pm$ 0.04
Poly[d(A-U)]: poly[d(A-U)]	—	—	—	558	0.52 $\pm$ 0.04
Poly[d(I-C)]: poly[d(I-C)]	—	—	—	558	0.60 $\pm$ 0.04
Poly[d(A-C)]: poly[d(G-T)]	506	7050 $\pm$ 250	4450	558	0.05 $\pm$ 0.02
Free drug	480	11500 ^b			

^a $\lambda_{\text{em}} = 558 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$.

^bData from Chaires et al.³⁵

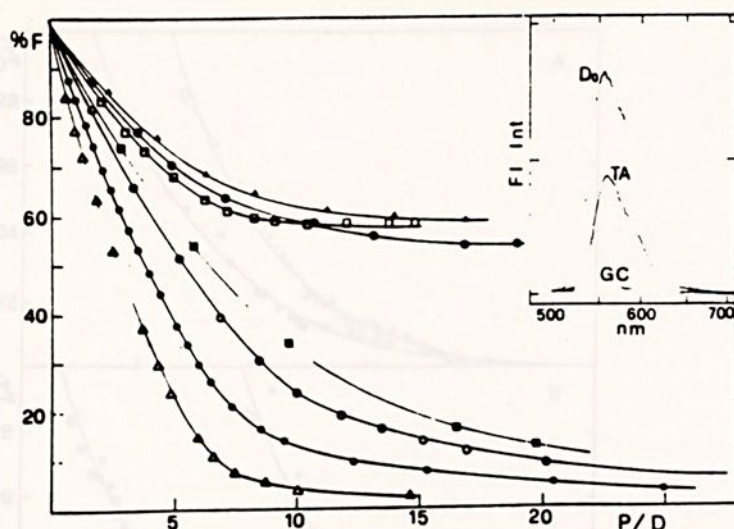


Fig. 1. Relative fluorescence intensity of daunomycin in the presence of increasing amounts of (Δ) poly[d(G-m⁵C)] : poly[d(G-m⁵C)]; ($\bullet$) poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)]; ($\circ$) poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)]; ($\blacksquare$) ctDNA; ($\blacktriangle$) poly[d(A-U)] : poly[d(A-U)]; ($\odot$) poly[d(I-C)] : poly[d(I-C)]; and ($\square$) poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)]. Measurements were carried out at 25°C, in 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH 7.4, $T = 25^\circ\text{C}$, and an initial drug concentration of $5 \mu\text{M}$ ca.; excitation wavelength, $\lambda = 470 \text{ nm}$. Insert shows the uncorrected emission spectra for free daunomycin (D_0) and for daunomycin in the presence of poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)] (AT) and poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] (GC) at $P/D = 100$.

the drug intercalates between adjacent bases of the DNA double helix, its absorption band undergoes a batho- and hypochromic effect. The limit spectrum of each titration, i.e., that which shows no further variation on adding more DNA, was used to calculate ϵ_{480} of the drug-DNA complex. The optical properties of the complexes of daunomycin with various DNAs are reported in Table I. The data show that the extinction coefficient of the bound daunomycin does not markedly depend on the polynucleotide base composition, as can be seen by the slight differences in $\Delta\epsilon_{480}$ that have been observed. However, when considering the decrease of the fluorescence quantum yield experienced by the drug in the presence of DNA, the level of quenching showed a marked dependence on the base composition of the intercalation site. Figure 1 shows the relative fluorescence quenching, at increasing P/D ratios, of daunomycin in the presence of different DNAs, while the insert illustrates the fluorescence emission spectra of daunomycin in the absence (D_0) and in the presence of poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] (GC) and poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)] (AT) at a stoichiometric P/D ratio of 100. Table I reports the limit relative quantum yields for the various polymers, determined with a $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$. It is interesting to note that the presence of a guanine residue at the intercalation site is connected to a nearly complete fluorescence quenching, while intercalation of the drug in AT, AU, or IC base pairs causes only a partial fluorescence quenching. As for ctDNA, it quenches the daunomycin fluorescence in a way intermediate between poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] and poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)] at low P/D ratios, but it tends to promote a nearly total quenching at very high P/D ratios.

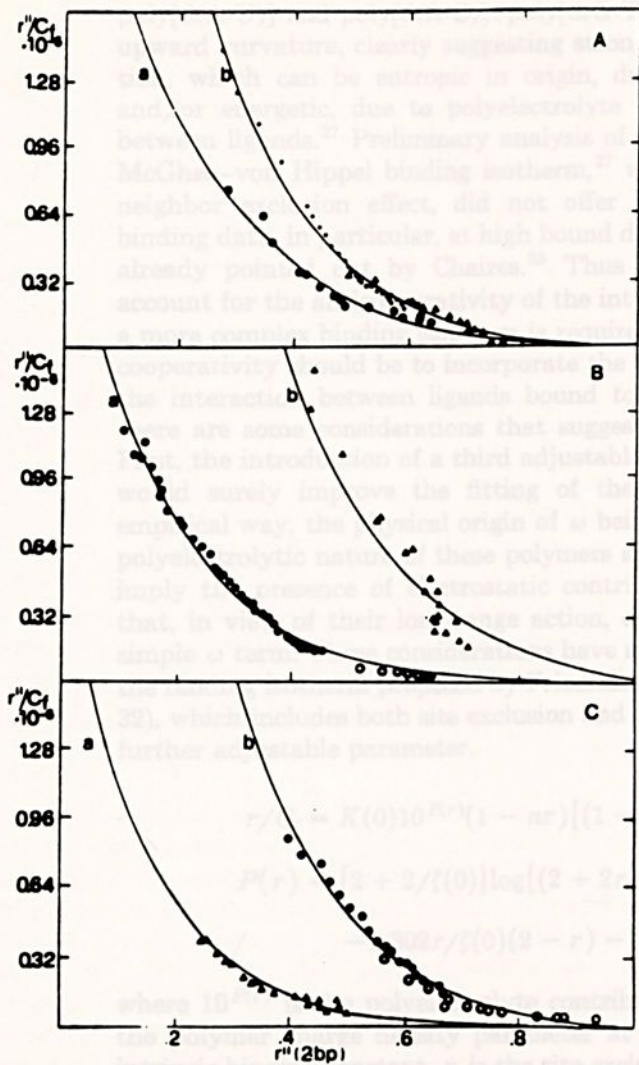


Fig. 2. Scatchard plots for the binding of daunomycin to pu-py alternating polydeoxynucleotides in 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH 7.4, $T = 25^{\circ}\text{C}$. Binding data for each polymer have been obtained by three separate fluorescence (FL) and uv titrations. Panel A: (a) poly[d(I-C)]:poly[d(I-C)], data from FL ($\bullet$); (b) poly[d(A-C)]:poly[d(G-T)], data from FL ($\circ$) and uv (Δ). Panel B: (a) poly[d(G-C)]:poly[d(G-C)], data from FL ($\bullet$) and uv ($\circ$); (b) poly[d(G-m⁵C)]:poly[d(G-m⁵C)], data from FL (Δ). Panel C: (a) poly[d(A-U)]:poly[d(A-U)], data from FL (Δ); (b) poly[d(A-T)]:poly[d(A-T)], data from FL ($\bullet$) and uv ($\circ$). The solid lines are the least squares fit of the data to Eq. (1) with the parameters reported in columns 3 and 4 of Table II, assuming model FM-II, i.e., 1 site size = 2 base pairs.

Scatchard Plots and Binding Isotherms

Scatchard plots of r/C_T vs r were obtained by using the optical parameters of Table I and a titration procedure as described in the materials and methods section. Figure 2 A-C shows the plots for the interaction of daunomycin with poly[d(I-C)]:poly[d(I-C)], poly[d(A-T)]:poly[d(A-T)], poly[d(G-C)]:poly[d(G-C)], poly[d(G-m⁵C)]:poly[d(G-m⁵C)], poly[d(A-U)]:

p
u
t
i
a
b
N
n
b
a
a
a
c
t
i
t
l
F
w
e
p
i
r
t
l
s
i
t
l
3:
f
i

w
t
h
i
r
a:
t
l
p
b.
t
l
s
i
d.
p
i
r
a
c
(ϵ
i
r
d.
a

poly[d(A-U)] and poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)]. Each plot shows a pronounced upward curvature, clearly suggesting strong anticooperativity in the interaction, which can be entropic in origin, due to neighbor exclusion effects³⁷ and/or energetic, due to polyelectrolyte effects^{32,38-40} and to interactions between ligands.³⁷ Preliminary analysis of the binding data using the formal McGhee-von Hippel binding isotherm,³⁷ which takes into account only the neighbor exclusion effect, did not offer a satisfactory description of the binding data, in particular, at high bound drug/base pairs ratios (r), a finding already pointed out by Chaires.²⁵ Thus it appears evident that to fully account for the anticooperativity of the interaction of daunomycin with DNA a more complex binding isotherm is required. A way to describe this negative cooperativity should be to incorporate the parameter ω ,³⁷ which accounts for the interaction between ligands bound to nearest-neighbor sites. However, there are some considerations that suggest the choice of a different model. First, the introduction of a third adjustable parameter (ω), besides K and n , would surely improve the fitting of the data, but probably only in an empirical way, the physical origin of ω being not easily assessed. Second, the polyelectrolytic nature of these polymers and the ionic character of the drug imply the presence of electrostatic contributions to the interaction energy that, in view of their long-range action, cannot be well accounted for by a simple ω term. These considerations have suggested that we fit our data with the binding isotherm proposed by Friedman and Manning (equation 77 of Ref. 32), which includes both site exclusion and polyelectrolyte effects without any further adjustable parameter.

$$r/C_t = K(0)10^{F(r)}(1 - nr)[(1 - nr)/(1 - (n - 1)r)]^{n-1}$$

$$P(r) = [2 + 2/\zeta(0)]\log[(2 + 2r)/(2 - r)] \quad (1)$$

$$- 1.302r/\zeta(0)(2 - r) - 2.604r/(1 + r)$$

where $10^{F(r)}$ is the polyelectrolyte contribution to the binding, $\zeta(0) = 4.2$ is the polymer charge density parameter at $r = 0$ for B-DNA,³² $K(0)$ is the intrinsic binding constant, n is the site exclusion parameter expressed in sites, and r is the bound drug/sites ratio. Obviously the basic features of Manning's theory,³⁸⁻⁴⁰ i.e., the territorial binding of Na^+ ions and the absence of polyion-polyion interactions (diluted solutions), are assumed. As to the site binding of daunomycin, its well-established intercalative nature suggests, in the case of regularly alternating copolymers, the possibility of a range of situations between two limit cases: (a) no energetic difference in the binding of daunomycin to the two types of alternating intercalation sites (py:pu and pu:py), each site behaving equally well with respect to intercalation; and (b) intercalation only in one of the two types of sites. We have fitted the data applying the formalism of Friedman and Manning³² considering both limit cases: model FM-I (site size = 1 bp, r = bound drug/bp) and model FM-II (site size = 2 bp, r = bound drug/2 bp). An extension of this formalism to intermediate cases (different affinities for the two types of sites, but not so dramatic to ignore one class of sites) has not been considered since, as already pointed out, models with more than two adjustable parameters are

TABLE II

Binding Constant and Exclusion Parameter Values* for Daunomycin Binding to Nucleic Acids, in 150 mM NaCl, 10 mM Phosphate Buffer, 1 mM EDTA, pH 7.4, $T = 25^\circ\text{C}$

Samples	Friedman-Manning				McGhee-von Hippel	
	FM-I		FM-II			
	$K(0)$ (μM^{-1})	n (bp)	$K(0)$ (μM^{-1})	n (2 bp)	$K(0)$ (μM^{-1})	n (bp)
ctDNA ^b	0.83 ± 0.02	2.0 ± 0.1	—	—	0.59 ± 0.02	3.7 ± 0.1
Poly[d(G-C)]: poly[d(G-C)]	1.22 ± 0.08	1.7 ± 0.1	2.43 ± 0.05	1.05 ± 0.04	0.80 ± 0.03	3.3 ± 0.2
Poly[d(G-m ⁵ C)]: poly[d(G-m ⁵ C)]	7.0 ± 0.7	1.6 ± 0.2	13.6 ± 1.2	0.90 ± 0.07	2.30 ± 0.1	2.3 ± 0.1
Poly[d(A-T)]: poly[d(A-T)]	5.0 ± 0.2	1.68 ± 0.07	9.44 ± 0.26	1.01 ± 0.03	1.24 ± 0.04	2.3 ± 0.1
Poly[d(A-U)]: poly[d(A-U)]	0.89 ± 0.05	1.8 ± 0.1	1.75 ± 0.09	1.10 ± 0.05	0.395 ± 0.02	2.9 ± 0.1
Polyd[(I-C)]: polyd[(I-C)]	2.05 ± 0.08	1.62 ± 0.07	3.88 ± 0.14	1.02 ± 0.04	0.84 ± 0.05	2.7 ± 0.1
Poly[d(A-C)]: poly[d(G-T)]	3.62 ± 0.07	1.61 ± 0.04	7.12 ± 0.14	1.01 ± 0.02	1.70 ± 0.05	2.7 ± 0.1

*Values are the results from nonlinear least square fits of the experimental data of Fig. 2, using Eq. 1 and the neighbor site exclusion model of McGhee-von Hippel. Parameters are reported with their confidence limits computed by the Marquardt algorithm.⁴⁹

^bBinding parameters obtained at 30°C .

too flexible to be easily discriminated by the actual experimental data and would resolve only in a better numerical fitting without a more substantial insight into the physical reality of the system.

The solid lines in Fig. 2 represent the best fit according to FM-II [by using Eq. (1)], whereas Table II summarizes the binding parameters obtained by applying models FM-I, FM-II, and the standard McGhee-von Hippel binding isotherm.³⁷ Figure 3 shows, for the sake of comparison, the Scatchard plots for poly[d(A-T)]:poly[d(A-T)] and poly[d(G-C)]:poly[d(G-C)], which have been fitted according to the binding isotherm of McGhee-von Hippel³⁷ (dotted lines) and to that of model FM-I (solid lines).

A number of observations can be drawn from the data of Table II: (a) both FM-I and FM-II models fit the data well, even if the error on n in model FM-I is slightly higher than in FM-II; (b) the n values obtained with both models are essentially independent of the polymer considered within the experimental error; (c) the intrinsic affinity constants do depend on the particular sequence, although not dramatically; and (d) a straightforward physical meaning can be easily attributed to the values on n in FM-II, since they do not differ sensibly from 1 (corresponding to the stoichiometry of 1 drug/2 bp)—in FM-I the n values obtained are not very far from 2 but are systematically lower, beyond the standard deviations.

A first consideration is that the accuracy of the experimental data does not allow the rejection of one of the two limit models (similar errors in both cases). However, that n is an integer in FM-II but not in FM-I suggests that probably FM-II better reflects the physical nature of the system. Neverthe-

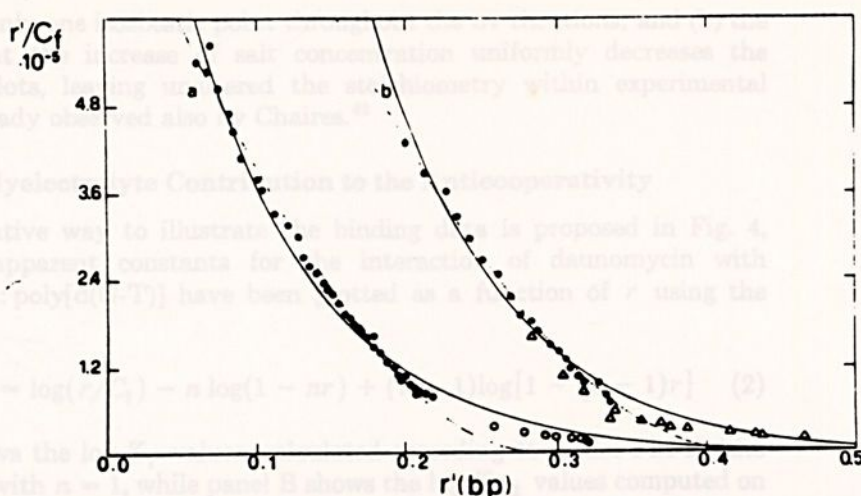


Fig. 3. Scatchard plots for the binding of daunomycin to poly[d(G-C)]:poly[d(G-C)] and poly[d(A-T)]:poly[d(A-T)]. Dotted lines represent the best fit according to the model of McGhee-von Hippel [Eq. (1) without the $10^{-R(r)}$ term] with parameters as reported in Table II (columns 5 and 6), whereas solid lines are the best fit according to Eq. (1), without assuming sequence specificity effects, i.e., 1 site size = 1 base pair (model FM-I).

less, a noninteger stoichiometry, even if certainly less plausible, cannot be ruled out; for instance, a stoichiometry of 1.5 could be conceptually explained by assuming that intercalation of two molecules into adjacent sites is possible but prevents intercalation at the nearest flanking sites. Moreover, recent molecular mechanical simulation studies⁴¹ have shown that intercalation of two 9-amino acridines into adjacent sites in DNA appears to involve energies very close to those of intercalation at two nonadjacent sites, thus allowing violation of the site exclusion principle. A further cause of a noninteger stoichiometry could obviously be an inadequacy of Manning's theory to describe quantitatively the electrostatic contribution to the energetics of such phenomena, but the rather straightforward results obtained by FM-II and evidence from previous studies³² suggest that this is not probably the case. Anyway, the discrepancy between the n values obtained with FM-I (around 1.7) and the stoichiometry of 2 cannot be attributed to experimental errors due to a poor evaluation of the extinction coefficients; on the one hand, an error on ϵ of daunomycin of 15% ca. is highly implausible, and so are, on the other hand, systematic errors of opposite sign in all the polymers' ϵ 's. This consideration is better sustained by the argument that fitting the data with Eq. (1), model FM-I, imposing $n = 2$ only in the exponent of the last term (and so attributing a precise stoichiometric meaning to the model), and allowing n , when a factor of r , to be an adjustable parameter in order to account for errors in ϵ , a reasonable fit of the data is achieved only with values of n well below 1.5 (different from 2 well beyond possible errors in ϵ 's) indicating the inability of FM-I to account for an exclusion parameter of 2.

As a last comment on the Scatchard plots, only one class of sites (intercalation) was assumed since a second mode of binding, mainly electrostatic, appeared to be unrealistic on the basis of the following observations: (a) the

presence of only one isosbestic point throughout the uv titrations; and (b) the evidence that the increase of salt concentration uniformly decreases the Scatchard plots, leaving unaltered the stoichiometry within experimental error, as already observed also by Chaires.⁴²

Polyelectrolyte Contribution to the Anticooperativity

An alternative way to illustrate the binding data is proposed in Fig. 4, where the apparent constants for the interaction of daunomycin with poly[d(A-C)]:poly[d(G-T)] have been plotted as a function of r using the equation

$$\log K_n = \log(r/C_t) - n \log(1 - nr) + (n - 1) \log[1 - (n - 1)r] \quad (2)$$

Panel A shows the $\log K_1$ values, calculated according to model FM-II (site size = 2 bp) with $n = 1$, while panel B shows the $\log K_{1,2}$ values computed on the basis of model FM-I (site size = 1 bp), with $n = 1$ and 2, respectively. The solid lines in both plots represent the theoretical variations of the $\log K$ due to polyelectrolyte effects only [calculated with Eq. 71 of Friedman and Manning's theory³²: $\Delta \log K_n(r) = -P(r)$]. According to model FM-II, which assumes sequence specificity but not "statistical" site exclusion ($n = 1$), the theoretical $\Delta \log K_1(r)$ curve offers a good accord with the experimental $\log K_1$ data. However, when FM-I (with $n = 1$) is adopted, i.e., in absence of multiple-site exclusion, the $\Delta \log K_1(r)$ curve falls well above the experimental $\log K_1$ values. Introducing site exclusion in the model, i.e., imposing $n = 2$ in Eq. (2), the anticooperativity shown by the system is now fully explained (a slight overestimation can be observed). To conclude, we can say that, on the basis of the theory of Friedman-Manning, the anticooperativity, which accompanies an intercalation process, is essentially polyelectrolytic in origin.

Comparison of Models: The Goodness-of-Fit Analysis

Figures 2 and 3 show that the binding isotherms of Friedman-Manning (FM-I and FM-II) better describe the experimental data at high r with respect to that of McGhee-von Hippel (M-H), while at a low binding range the three isotherms used fit the data equally well (a slight but not very significative preference for the M-H model seems to be evident at low r in some cases). In order to facilitate the comparison between the three models used, we report in Figs. 5 and 6 the residual plots, in the form of $(\text{exp} - \text{fit})/\text{exp}$ for all the DNA-drug systems investigated except poly[d(G-m⁵C)] : poly[d(G-m⁵C)], whose experimental points were not satisfactorily fitted by either models. The residual plots are not fully random, probably because of the inherent limits of the binding models to describe the experimental data. For a quantitative comparison of the goodness of fit, we provide for each fit (see captions to Figs. 5 and 6) the statistical parameter $\Sigma(\text{exp} - \text{fit})^2/\text{exp}$ (the square residuals have been normalized because the variance of experimental r/C_t values is inversely proportional to r). It can be seen that the best fits that produce the smaller sum of square residuals are obtained with model FM-II. An alternative way to uniform the variance of r/C_t values over the entire binding range is to fit their logarithm form. We have performed these

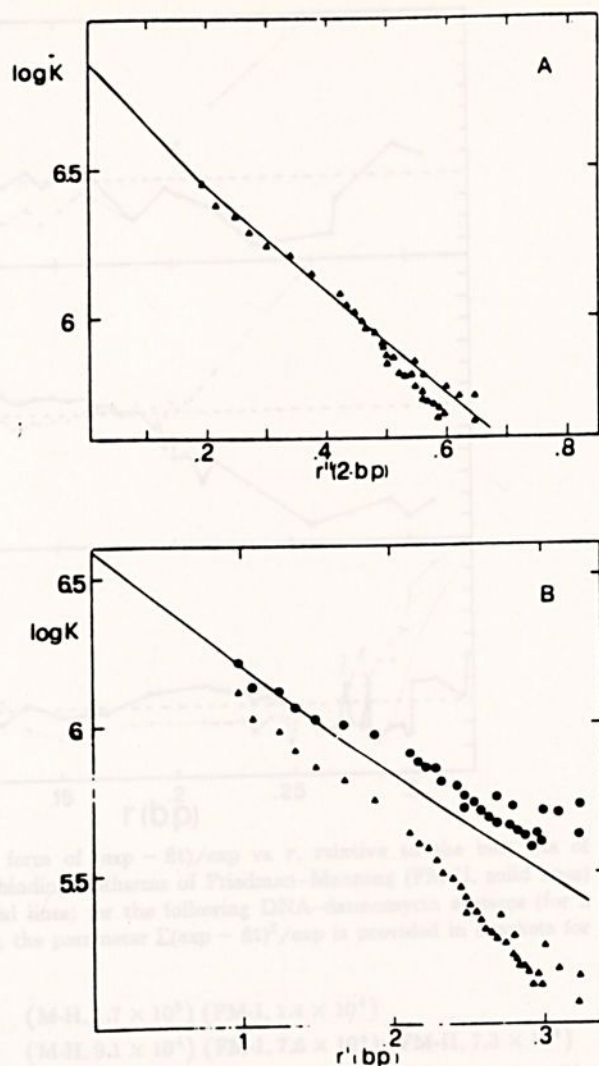


Fig. 4. Panel A: Data for the interaction of daunomycin with poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)] plotted according to Eq. (2) (model FM-II) with $n = 1$ and 1 site size = 2 base pairs. The solid line represents the dependence of the apparent binding constant, calculated with Eq. 71 of Friedman-Manning's theory (vide infra), as a function of r , due only to polyelectrolyte effects. Panel B: Plots of $\log K_1$ (Δ) and $\log K_2$ ($\bullet$) vs r plots for daunomycin binding to poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)]. Data have been plotted according to Eq. (2) (model FM-I) with $n = 1$ and 2, respectively. The solid line is as above.

fittings for some representative polymers—poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] and poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)]—and found, as expected, that the sum of square residuals $\sum(\text{exp} - \text{fit})^2$ is smaller when using model FM-II.

Affinity Constants and Sequence Specificity for Alternating Copolymers

Let us now consider the values of the intrinsic affinity constants of Table II. First, $K(0)$ values obtained with FM-I are nearly half the values obtained

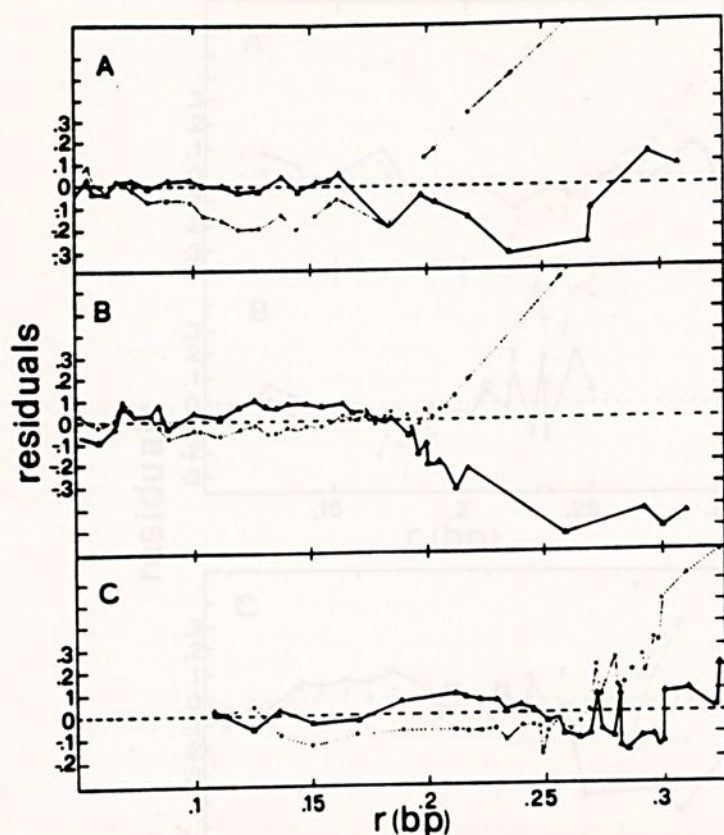


Fig. 5. Residual plots, in the form of $(\text{exp} - \text{fit})/\text{exp}$ vs r , relative to the best fits of experimental r/C_1 data with the binding isotherms of Friedman-Manning (FM-II, solid lines) and of McGhee-von Hippel (dotted lines) for the following DNA-daunomycin systems (for a quantitative comparison of models, the parameter $\Sigma(\text{exp} - \text{fit})^2/\text{exp}$ is provided in brackets for all the three models used):

- | | |
|---------------------------------|---|
| (A) ctDNA | (M-H, 1.7×10^5) (FM-I, 1.4×10^4) |
| (B) poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] | (M-H, 9.1×10^4) (FM-I, 7.6×10^4) (FM-II, 7.3×10^4) |
| (C) poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)] | (M-H, 1.3×10^5) (FM-I, 3.15×10^4) (FM-II, 3.0×10^4) |

For the residual plots of model FM-II the r values are intended multiplied by 2.

with FM-II since the former model implies twice as many potential sites as the latter. As for the sequence specificity, all the models adopted show that $Gm^5C > AT > AC-GT > IC > GC > AU$. The observation that $K(0)$ for poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)] is higher than for poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] has already been found.^{23,25,26} However, the overall picture of the affinity data reveals that a common feature shared by the three tightest binding polymers, and not by the others, is the presence of a 5-CH₃ group on the pyrimidine. The role of a substituent in position 5 of the pyrimidine has already been investigated even if in a somewhat different light: in 1978 Patel and Canuel,²⁸ with the aim of clarifying the influence of substituents in the grooves on the interaction of daunomycin, determined the thermal stabilization (i.e., ΔT between polymer alone and in the presence of the drug at different D/P ratios) of poly[d(A-U)] : poly[d(A-U)], poly[d(I-C)] : poly[d(I-C)], and 5-py substituted analogs, namely poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)], poly[d(A-

Fig.
experi
and of
quanti
all the

(A) p

(B) p

(C) p

For th

Br⁵U

Br⁵C

comp

and c

not u

are in

does

stron

struct

daun

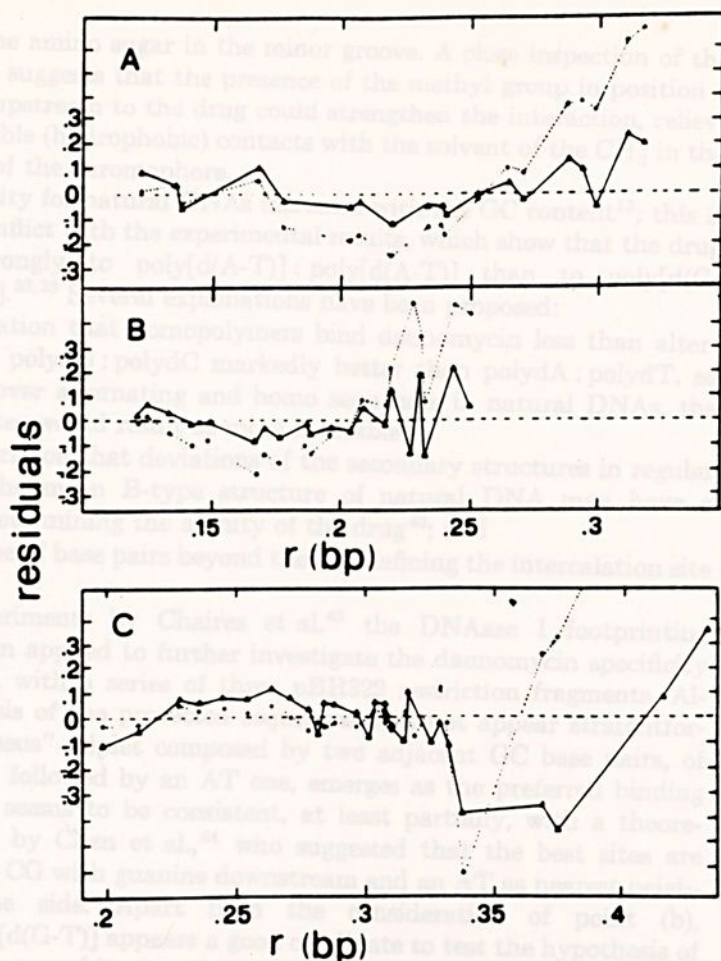


Fig. 6. Residual plots, in the form of $(\text{exp} - \text{fit})/\text{exp}$ vs r , relative to the best fits of experimental r/C_i data with the binding isotherms of Friedman-Manning (FM-II, solid lines) and of McGhee-von Hippel (dotted lines) for the following DNA-daunomycin systems (for a quantitative comparison of models, the parameter $\Sigma(\text{exp} - \text{fit})^2/\text{exp}$ is provided in brackets for all the three models used):

- (A) poly[d(I-C)] : poly[d(I-C)] (M-H, 1.1×10^6) (FM-I, 2.1×10^4) (FM-II, 1.9×10^4)
 (B) poly[d(A-U)] : poly[d(A-U)] (M-H, 3.9×10^4) (FM-I, 1.81×10^4) (FM-II, 1.8×10^4)
 (C) poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)] (M-H, 9.6×10^4) (FM-I, 7.0×10^4) (FM-II, 6.7×10^4)

For the residual plots of model FM-II, the r values are intended multiplied by 2.

Br⁵U]] : poly[d(A-Br⁵U)], poly[d(A-I⁵U)] : poly[d(A-I⁵U)], and poly[d(I-Br⁵C)] : poly[d(I-Br⁵C)]. They found that the thermal stabilization of these complexes was on the order of $\text{AT} = \text{AI}^5\text{U} > \text{IBr}^5\text{C} > \text{ABr}^5\text{U} > \text{IC} > \text{AU}$, and concluded that a bulky substituent in position 5 of the pyrimidine does not unfavor the interaction: actually in light of their evidence and ours, we are inclined to state that a substituent as $-\text{CH}_3$ or halogen in this position does favor, although not dramatically, the interaction of daunomycin. A strong piece of evidence in favor of this hypothesis comes from the crystal structure of the complex of daunomycin with the duplex of d(CGTAACG)^{18,19}: daunomycin is intercalated between two G:C base pairs, upstream of the

guanine, with the amino sugar in the minor groove. A close inspection of the solved structure suggests that the presence of the methyl group in position 5 of the cytosine upstream to the drug could strengthen the interaction, relieving the unfavorable (hydrophobic) contacts with the solvent of the CH_3 in the methoxy group of the chromophore.

The drug affinity for natural DNAs increases with the GC content¹³; this is apparently in conflict with the experimental results, which show that the drug binds more strongly to poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)] than to poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)].^{23,25} Several explanations have been proposed:

(a) the observation that homopolymers bind daunomycin less than alternating ones, but polydG : polydC markedly better than polydA : polydT, so that as a mean over alternating and homo sequences in natural DNAs, the GC-containing sites would result as more favorable²⁵;

(b) the consideration that deviations of the secondary structures in regular polymers from the mean B-type structure of natural DNA may have a relevant role in determining the affinity of the drug⁴³; and

(c) that the type of base pairs beyond the two defining the intercalation site may be relevant.

In recent experiments by Chaires et al.⁴³ the DNAase I footprinting technique has been applied to further investigate the daunomycin specificity in the interaction with a series of three pBR322 restriction fragments. Although the analysis of the protected sequences does not appear straightforward, the "consensus" triplet composed by two adjacent GC base pairs, of variable sequence, followed by an AT one, emerges as the preferred binding site. This finding seems to be consistent, at least partially, with a theoretical investigation by Chen et al.,⁴⁴ who suggested that the best sites are those flanked by a CG with guanine downstream and an AT as nearest neighbor on the same side. Apart from the consideration of point (b), poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)] appears a good candidate to test the hypothesis of Chen et al.,⁴⁴ since one of its two classes of sites is "ideal," according to this paper. We found that the affinity of daunomycin for this polymer is rather high indeed, but still lower than that for poly[d(G-m⁵C)] : poly[d(G-m⁵C)] and not higher than poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)]. This observation suggests that the proposed unfavorable presence of the 2-NH₂ group in the second base pair to the intercalated drug (repulsive interaction of the daunosamine moiety, extended in the minor groove, with 2-NH₂) has a minor role with respect to the favorable presence of 5 methyl group on the pyrimidine immediately upstream to the drug. However, the fluorescence quenching behavior observed on adding ctDNA (Fig. 1) (moderate quenching at low *P/D* ratios, but nearly total quenching reached at very high *P/D* ratios) further suggests a rather complicated sequence specificity of this drug, involving at least base triplets^{43,44}: at low *P/D* ratios the drug binds to both classes of sites (i.e., with and without the 2-NH₂ purine group), but at very high *P/D* ratios it binds mainly to totally quenching (i.e., G-containing) sites.

Ionic Strength Dependence of *K*(0)

The influence of the ionic strength on the affinity of daunomycin for ctDNA has been studied through spectrophotometric titrations at 30°C and different NaCl concentrations (Fig. 7). The data have been treated according to FM-I.

Fig. 7
with ct
and Na.
0.15M,
accordi
III. Ina

Obvior
affinity
is not
even a
alterna
experir
insert
depend
charge
several
ing of
salt, is

The th
-0.92 :

NaCl (M

0.035
0.075
0.150
0.280

*The b

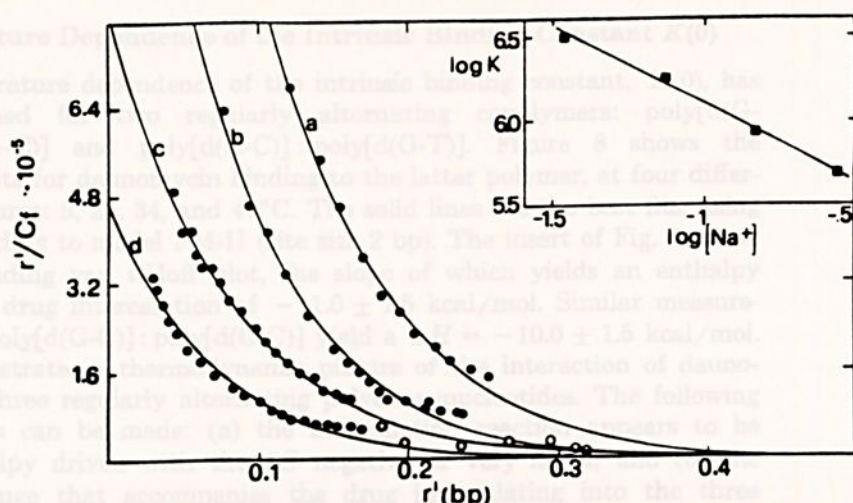


Fig. 7. Ionic strength dependence of the Scatchard plots for the interaction of daunomycin with ctDNA. Data have been obtained in 10 mM phosphate, 1 mM EDTA, pH 7.4, $T = 31^\circ\text{C}$, and NaCl contents of (a) 0.035M, fluorescence (FL) titration ($\bullet$); (b) 0.075M, FL titration ($\bullet$); (c) 0.15M, FL ($\bullet$) and uv ($\circ$) titrations; (d) 0.28M, FL ($\bullet$) titrations. The solid lines are the best fits according to Eq. (1), model FM-I, i.e., 1 site size = 1 base pair, with parameters reported in Table III. Insert shows the $\log k(0)$ vs $\log[\text{Na}^+]$ plot, whose slope is -9.2 .

Obviously in this case $K(0)$ is intended as a weighted mean of the intrinsic affinity constants for the different types of sites on the "random" polymer. It is not surprising that the experimental points are well described by FM-I since even a rather strong form of site heterogeneity as that implied by FM-II (an alternation of strong sites and "null" sites) cannot be discriminated within the experimental errors from the case of site homogeneity as in model FM-I. The insert shows a plot of $\log K(0)$ vs $\log[\text{Na}^+]$, whose slope is -0.92 ± 0.04 . The dependence of the free energy of binding of ions to ionic polymers of opposite charge as a function of the ionic strength has been theoretically derived by several authors.^{40,45,46} According to Friedman-Manning's theory,³² the binding of a univalent intercalating drug into DNA, in a univalent supporting salt, is described by the equation:

$$d \log K(0) / d \log [\text{Na}^+] = -[1 + 1/\zeta(0)] \quad (3)$$

The theoretical slope (-1.24) is not very far from the experimental finding of -0.92 ± 0.04 .

TABLE III
Binding Constants and Binding Site Size for the Interaction of Daunomycin with ctDNA at Different Ionic Strengths, $T = 30^\circ\text{C}$

NaCl (M)	$K(0)$ (μM^{-1})	n^a (bp)	ΔG (kcal/mol)
0.035	3.08	1.9	-9.0
0.075	1.70	2.2	-8.7
0.150	0.83	2.0	-8.2
0.280	0.47	2.6	-7.9

^aThe best-fit analysis gives a standard error for n of $\pm 5\%$.

Temperature Dependence of the Intrinsic Binding Constant $K(0)$

The temperature dependence of the intrinsic binding constant, $K(0)$, has been examined for two regularly alternating copolymers: poly[d(G-C)]:poly[d(G-C)] and poly[d(A-C)]:poly[d(G-T)]. Figure 8 shows the Scatchard plots for daunomycin binding to the latter polymer, at four different temperatures: 9, 25, 34, and 47°C. The solid lines are the best fits, using Eq. (1), according to model FM-II (site size 2 bp). The insert of Fig. 8 shows the corresponding van t'Hoff plot, the slope of which yields an enthalpy change upon drug intercalation of -11.0 ± 1.5 kcal/mol. Similar measurements with poly[d(G-C)]:poly[d(G-C)] yield a $\Delta H = -10.0 \pm 1.5$ kcal/mol. Table IV illustrates a thermodynamic picture of the interaction of daunomycin with three regularly alternating polydeoxynucleotides. The following considerations can be made: (a) the intercalation reaction appears to be mainly enthalpy driven with the ΔS negative or very small; and (b) the enthalpy change that accompanies the drug intercalating into the three alternating copolymers has the same magnitude, approximately -10 kcal/mol, markedly different from the value of nearly zero found for the homopolymers polydA:polydT and polydG:polydC⁴⁷ (a low ΔH value for drug binding to homopolynucleotides seems a general feature⁴⁸). This suggests that the intercalation of daunomycin into a pyrimidine-purine alternating site involves similar interactions nearly independent of the base composition of the binding

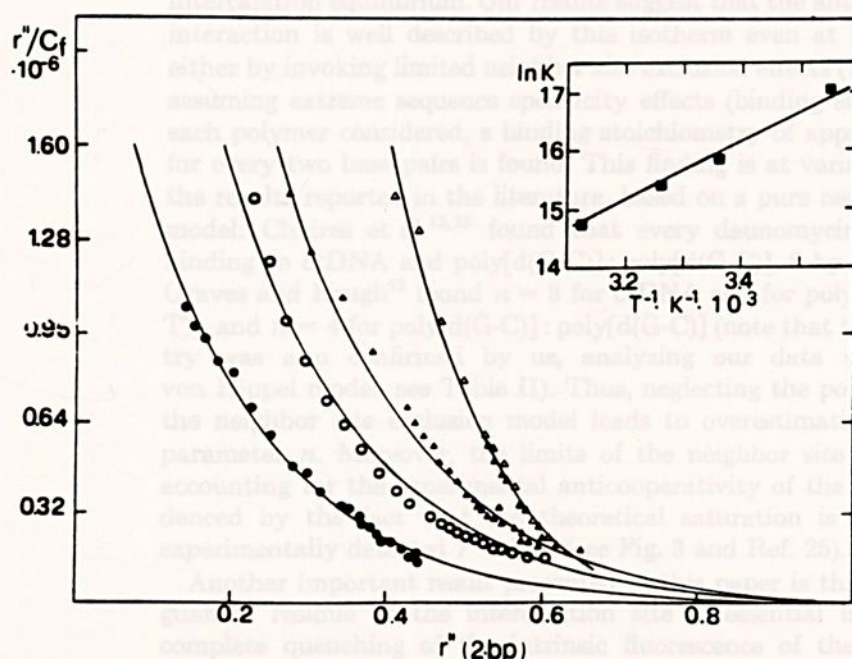


Fig. 8. Effect of the temperature on the Scatchard plots of the interaction of daunomycin with poly[d(A-C)]:poly[d(G-T)] in 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH 7.4. Solid lines represent the best fit according to Eq. (1), model FM-II (site size = 2 base pairs), with the following binding parameters: (●) 47°C, $K(0) = 2.44 \times 10^6$, $n = 1$; (○) 34°C, $K(0) = 4.8 \times 10^6$, $n = 1$; (▲) 25°C, $K(0) = 7.12 \times 10^6$, $n = 1$; (△) 10°C, $K(0) = 2.48 \times 10^7$, $n = 1.3$. The best fits gave uncertainties for n and K of about $\pm 5\%$.

TABLE IV
Thermodynamic Parameters for the Interaction of Daunomycin with Some Regularly Alternating Polydeoxynucleotides in 150 mM NaCl, 10 mM Phosphate Buffer, 1 mM EDTA, pH = 7.4, 25°C.

	ΔH (kcal/mol)	ΔS (e.u.)	ΔG^a (kcal/mol)
Poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)]	-10.0 ± 1.5	-4.2	-8.7
Poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)]	-8.9 ^b	+2.0	-9.5
Poly[d(A-C)] : poly[d(G-T)]	-11.0 ± 1.5	-5.4	-9.4

^aData calculated by the standard equation $\Delta G = -RT \ln K(0)$, the constant being calculated according to model FM-II (vide infra).

^bData measured by a differential scanning calorimetry analysis (Marky et al.⁶⁰).

site. Moreover, the lower ΔH value obtained with calorimetric measurements for the system daunomycin-ctDNA¹² appears, therefore, to be a mean between the two different situations.

CONCLUSIONS

We have analyzed the binding data on the interaction of daunomycin with ctDNA and with some pu-py alternating copolymers according to the neighbor site exclusion isotherm, which includes the polyelectrolyte effects on the intercalation equilibrium. Our results suggest that the anticooperativity of the interaction is well described by this isotherm even at high binding ratios, either by invoking limited neighbor site exclusion effects ($n = 2$ at most) or by assuming extreme sequence specificity effects (binding site size = 2 bp). For each polymer considered, a binding stoichiometry of approximately one drug for every two base pairs is found. This finding is at variance with respect to the results reported in the literature, based on a pure neighbor-site exclusion model: Chaires et al.^{13,25} found that every daunomycin excludes 4 bp on binding to ctDNA and poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)], 9 bp to polydG : polydC; Graves and Krugh²³ found $n = 3$ for ctDNA and for poly[d(A-T)] : poly[d(A-T)], and $n = 4$ for poly[d(G-C)] : poly[d(G-C)] (note that the same stoichiometry was also confirmed by us, analyzing our data with the McGhee-von Hippel model, see Table II). Thus, neglecting the polyelectrolyte effects, the neighbor site exclusion model leads to overestimation of the exclusion parameter n . Moreover, the limits of the neighbor site exclusion model in accounting for the experimental anticooperativity of the interaction are evidenced by the fact that the theoretical saturation is often overcome by experimentally detected r values (see Fig. 3 and Ref. 25).

Another important result presented in this paper is that the presence of a guanine residue at the intercalation site is essential in order to have a complete quenching of the intrinsic fluorescence of the drug. The strong hydrogen bond between the 9-OH group of the daunomycinone A ring and the $-\text{NH}_2$ group of the guanine residue in the minor groove, as shown by structural studies,^{18,19} could be the primary cause of such a physical property.

We found that the drug affinity for the various alternating copolymers considered decreases in the order $\text{G-m}^5\text{C} > \text{AT} > \text{AC(GT)} > \text{IC} > \text{GC} > \text{AU}$. This trend suggests that not only the type of the base pair immediately

downstream of the intercalation site is important for the complex stabilization, as indicated by a theoretical investigation,⁴⁴ but also the presence of a 5-group (CH_3 in the first three terms of the above DNA series) in the pyrimidine residue of the intercalation site plays an important role for the drug-DNA interaction. In this respect the very recent data of Chou et al.⁴⁵ confirm this finding: they observed that both ethidium and propidium bind more strongly to poly[d(A-T)]:poly[d(A-T)] than to poly[d(A-U)]:poly[d(A-U)].

References

1. Arcamone, F. (1978) *Top. Antibiot. Chem.* 2, 102-237.
2. Arcamone, F. (1981) *Doxorubicin: Anticancer Antibiotics*, Academic Press, New York.
3. Neidle, S. (1978) *Top. Antibiot. Chem.* 2, 242-278.
4. Hartmann, G., Goller, H., Koschel, K., Kersten, W. & Kersten, H. (1964) *Biochem. Z.* 341, 126-128.
5. Ward, D. C., Riech, E. & Goldberg, I. H. (1965) *Science* 149, 1259-1263.
6. DiMarco, A., Zunino, F., Silvestrini, R., Gambarucci, C. & Gambetta, R. A. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 1323-1328.
7. Goodman, F. M., Lee, G. M. & Bachur, N. R. (1977) *J. Biol. Chem.* 252 2670-2674.
8. Schellinx, J. A. A., Dijkwel, P. A. & Wanka, F. (1979) *Eur. J. Biochem.* 102, 409-416.
9. Crooka, S. T. & Reich, S. D. (1980) *Anthracyclines: Current Status and New Developments*, Academic Press, New York.
10. Reinert, K. E. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 3411-3430.
11. Gabbay, E. J., Grier, D., Fingerle, R. E., Reimer, R., Levy, R., Pearce, S. W. & Wilson, W. D. (1976) *Biochemistry* 15, 2062-2070.
12. Quadrioglio, F. & Crescenzi, V. (1974) *Biophys. Chem.* 2, 64-69.
13. Chaires, J. B., Dattagupta, N. & Crothers, D. M. (1982) *Biochemistry* 21, 3933-3940.
14. Moliner-Jumel, C., Malfroy, B., Reynaud, J. B., & Aubel-Sadron, G. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 441-449.
15. Plumbridge, T. W. & Brown, J. R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 479, 441-449.
16. Zunino, F., Di Marco, A., Zaccara, A. & Gambetta, R. A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 607, 206-214.
17. Schutz, H., Golimick, F. A. & Stutter, E. (1979) *Stud. Biophys.* 75, 147-159.
18. Quigley, G. J., Wang, A. H. J., Ughetto, G., van der Marel, G., van Boom, J. H. & Rich, A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7204-7208.
19. Wang, A. H.-J., Ughetto, G., Quigley, G. J. & Rich, A. (1987) *Biochemistry* 26, 1152-1163.
20. Chaires, J. B., Dattagupta, N. D. & Crothers, D. M. (1985) *Biochemistry* 24, 260-267.
21. Chaires, J. B., Dattagupta, N. D. & Crothers, D. M. (1983) *Biochemistry* 22, 284-292.
22. Chaires, J. B. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 8485-8494.
23. Graves, D. E. & Krugh, T. R. (1983) *Biochemistry* 22, 3941-3947.
24. Krugh, T. R. & Young, M. A. (1977) *Nature* 269, 627-628.
25. Chaires, J. B. (1983) *Biochemistry* 22, 4204-4211.
26. Phillips, D. R., Di Marco, A. & Zunino, F. (1978) *Eur. J. Biochem.* 85, 487-492.
27. Patel, D. J., Kozlowski, S. A. & Rice, J. A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3333-3337.
28. Patel, D. J. & Canuel, L. L. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90, 247-254.
29. Scatchard, G. (1949) *Ann. NY Acad. Sci.* 51, 660-672.
30. Barthalemy-Clavey, V., Maurizot, J. C. & Sicard, P. J. (1973) *Biochimie* 55, 859-868.
31. Zunino, F., Gambetta, R., DiMarco, A. & Zaccara, A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 277, 489-498.
32. Friedman, R. A. G. & Manning, G. S. (1984) *Biopolymers* 23, 2671-2714.
33. Pohl, F. M. & Jovin, T. M. (1972) *J. Mol. Biol.* 67, 375-396.
34. Wells, R. D., Larson, J. E., Grant, R. C., Shortle, B. E. & Cantor, C. E. (1970) *J. Mol. Biol.* 54, 465-497.
35. Chaires, J. B., Dattagupta, N. & Crothers, D. M. (1982) *Biochemistry* 21, 3927-3932.
36. Blake, A. & Peacocke, A. R. (1968) *Biopolymers* 6, 575-584.



37. McGhee, J. D. & von Hippel, P. H. (1974) *J. Mol. Biol.* **86**, 469-489.
38. Manning, G. S. (1981) *J. Phys. Chem.* **85**, 870-877.
39. Manning, G. S. (1979) *Acc. Chem. Res.* **12**, 443-449.
40. Manning, G. S. (1978) *Q. Rev. Biophys.* **11**, 179-246.
41. Rao, S. N. & Kollman, P. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5735-5739.
42. Chaires, J. B. (1984) *Biopolymers* **24**, 403-419.
43. Chaires, J. B., Fox, K. R., Herrera, J. E., Britt, M. & Waring, M. J. (1987) *Biochemistry*, in press.
44. Chen, K.-X., Gresh, N. & Pullman, B. (1985) *J. Biomol. Struct. Dynam.* **3**, 445-466.
45. Record, M. T., Lohman, T. M. & De Haseth, P. (1976) *J. Mol. Biol.* **107**, 145-158.
46. Wilson, W. D. & Lopp, I. G. (1979) *Biopolymers* **83**, 3025-3041.
47. Herrera, J. E., Britt, M. & Chaires, J. B. (1987) *Biophys. J.* **51**, 505a.
48. Chou, W. Y., Marky, L. A., Zaunczkowski, D. & Breslauer, K. J. (1987) *J. Biomol. Struct. Dynam.* **5**, 345-359.
49. Bevington, P. R. (1969) *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, McGraw-Hill, New York.
50. Marky, L. A., Snyder, J. G., Remeta, D. P. & Breslauer, K. J. (1983) *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1**, 487-507.

Received December 11, 1987

Accepted May 17, 1988

The equilibrium interaction of doxorubicin and its *N*-acetyl derivative with a series of purine-pyrimidine alternating dinucleotides has been studied through spectrofluorometry to assess the relevance of the electrostatic contribution to DNA intercalation. The results have shown that: (i) the suppression of the positive charge on the imino group has a profound negative effect on the free energy of intercalation, as expected, and (ii) a negligible effect on the base specificity, which supports the notion of an essentially electrostatic effect of *N*-acetylation on intercalation; (b) a reasonably good accord with the demands of a polyelectrolytic model, due to Friedman and

reduction
A great deal of studies has been devoted to clarify structural and energetic aspects of drug-nucleic acid interactions. Among the large number of drugs considered, widely differing in chemical structure and type of action, as well as in pharmacological effects, a few have received a deeper attention and have played a paradigmatic role in this field. One of these is doxorubicin [1], a widely used antitumor agent, together with its analog daunomycin [2]. A number of experimental investigations, from hydrodynamics [3,4] to calorimetry [5] to several spectroscopic techniques [6] and X-ray diffraction [10-13], have shown that these molecules interact with double-stranded nucleic acids through non-covalent intercalation of their chromophore between adjacent base pairs. Moreover, several studies have described the energetics as well as the sequence specificity of these interactions [8,9]. Another facet of these studies is connected to the interest in such systems can assume as experimental models

for recent developments in the field of theoretical treatments of polyelectrolytic effects [14,15].

Pursuing a research line carried out in our laboratory since several years, we present in this paper recent experimental results on the interaction of doxorubicin and its *N*-acetyl derivative with a series of purine-pyrimidine alternating polydeoxynucleotides. *N*-acetyl-doxorubicin is just one among hundreds of doxorubicin analogs and derivatives which have been synthesized and considered for a possible therapeutic effect. In this respect *N*-acetyl-doxorubicin failed its purpose, since the major effect of acetylating the amino group of the sugar moiety, is to decrease dramatically the affinity of the molecule for double-stranded DNAs [16], very likely because this derivatization abolishes the positive charge that doxorubicin bears at neutral pH. However, the structure of the intercalation complexes of doxorubicin [13] and daunomycin [10-13] with DNA, as revealed by X-ray studies, suggests that a compared study of the interaction of *N*-acetyl-doxorubicin and doxorubicin with double-stranded nucleic acids should constitute a particularly well suited experimental basis for assessing the relative importance of polyelectrolytic and non-polyelectrolytic contributions to these interactions and for testing recent developments in polyelectrolyte theories as well. The

Sponsorship: G. Manzini, Department of Biochemistry, Biophysics and Macromolecular Chemistry, University of Trieste, I-34127 Trieste, Italy.

BBAEXP 92335

Charge effect in the interaction of doxorubicin and derivatives with polydeoxynucleotides

João Ruggiero¹, Luigi E. Xodo², Antonio Ciana², Giorgio Manzini²
and Franco Quadrifoglio³

¹ Physics Department, Institute of Biosciences, UNESP, São José do Rio Preto (Brazil), ² Department of Biochemistry, Biophysics and Macromolecular Chemistry, University of Trieste, Trieste (Italy) and ³ Institute of Biology, Faculty of Medicine, University of Udine, Udine (Italy)

(Received 8 February 1991)

(Revised manuscript received 24 September 1991)

Key words: Doxorubicin; Drug-DNA intercalation; Polyelectrolyte effect

The equilibrium interaction of doxorubicin and its *N*-acetyl derivative with a series of purine-pyrimidine alternating polydeoxynucleotides has been studied through spectrofluorometry to assess the relevance of the electrostatic contribution to DNA intercalation. The results have shown that: (a) the suppression of the positive charge on the aminosugar has: (I) a profound negative effect on the free energy of intercalation, as expected, and (II) a negligible influence on the base specificity, which supports the notion of an essentially electrostatic effect of *N*-acetylation on intercalation; (b) a reasonably good accord with the demands of a polyelectrolytic model, due to Friedman and Manning, is found.

Introduction

A great deal of studies has been devoted to clarify structural and energetic aspects of drug-nucleic acid interactions. Among the large number of drugs considered, widely differing in chemical structure and type of interaction as well as in pharmacological effects, a few ones have received a deeper attention and have assumed a paradigmatic role in this field. One of these drugs is doxorubicin [1], a widely used antitumor agent, together with its analog daunomycin [2]. A number of experimental investigations, from hydrodynamics [3,4] and calorimetry [5] to several spectroscopic techniques [6-9] and X-ray diffraction [10-13], have shown that these molecules interact with double-stranded nucleic acids through non-covalent intercalation of their chromophore between adjacent base pairs. Moreover, solution studies have described the energetics as well as the sequence specificity of these interactions [8,9]. Another facet of these studies is connected to the interest that such systems can assume as experimental models

for recent developments in the field of theoretical treatments of polyelectrolytic effects [14,15].

Pursuing a research line carried out in our laboratory since several years, we present in this paper recent experimental results on the interaction of doxorubicin and its *N*-acetyl derivative with a series of purine-pyrimidine alternating polydeoxynucleotides. *N*-acetyldoxorubicin is just one among hundreds of doxorubicin analogs and derivatives which have been synthesized and considered for a possible therapeutic effect. In this respect *N*-acetyldoxorubicin failed its purpose, since the major effect of acetylating the aminogroup of the sugar moiety, is to decrease drastically the affinity of the molecule for double-stranded DNAs [16], very likely because this derivatization abolishes the positive charge that doxorubicin bears at neutral pH. However, the structure of the intercalation complexes of doxorubicin [13] and daunomycin [10-13] with DNA, as revealed by X-ray studies, suggests that a compared study of the interaction of *N*-acetyldoxorubicin and doxorubicin with double-stranded nucleic acids should constitute a particularly well suited experimental basis for assessing the relative importance of polyelectrolytic and non-polyelectrolytic contributions to these interactions and for testing recent developments in polyelectrolyte theories as well. The

Correspondence: G. Manzini, Department of Biochemistry, Biophysics and Macromolecular Chemistry, University of Trieste, I-34127 Trieste, Italy.

rationale' of this statement is founded on the observation that the acetylation of the aminosugar of doxorubicin should not sterically interfere with the intercalation geometry, its major expected effect consisting in the suppression of the electrostatic interaction of the positive charge of doxorubicin with the negative charges of the polyelectrolyte. Within this conceptual framework we have measured the affinity of *N*-acetyl-doxorubicin and doxorubicin for a number of purine-pyrimidine alternating polydeoxynucleotides and compared the results obtained in the light of the theoretical treatment established by Friedman and Manning some years ago [15].

Materials and Methods

Samples

Doxorubicin was a Sigma product and *N*-acetyl-doxorubicin was a kind gift from Farmitalia, Carlo Erba, Milan. Solid samples and their stock solutions in the desired buffers were stored at -20°C . Working solutions were prepared by dilution of stock solutions prior to use. The buffers used were 0.15 M NaCl, 5 mM Tris (pH 7.4), 0.5 mM EDTA for doxorubicin and 1 mM Tris (pH 7.4), 0.1 mM EDTA for *N*-acetyl-doxorubicin.

All the polydeoxynucleotides were Sigma samples, with the exception of poly(dGdT):poly(dAdT) which was purchased from PL Biochemicals. Concentrations were determined from the absorbances, using the following extinction coefficients, on a bp scale:

$$\text{poly(dAdT)}: \epsilon_{260} = 13200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$\text{poly(dAdU)}: \epsilon_{260} = 13800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

$$\text{poly(dGdC)}: \epsilon_{254} = 14200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$\text{poly(dGdm}^5\text{C)}: \epsilon_{254} = 14200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$\text{poly(dIdC)}: \epsilon_{260} = 13800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$\text{poly(dGdT)}:\text{poly(dAdC)}: \epsilon_{260} = 13200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

Methods

Spectrophotometric measurements have been made with a spectrophotometer Cary 2200 from Varian, equipped with thermostatable cell holder and cuvettes with 0.1 to 5 cm pathlengths.

Spectrofluorometric titrations have been obtained through the use of a fluorescence spectrophotometer MPF-3L from Perkin Elmer, equipped with thermostatable cell holder. The usual conditions adopted were: $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$, excitation slit 10 nm, $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$, emission slit 14 nm. Fluorescence-drug concentration data were obtained adding increasing aliquots of

drug stock solution to 1.5 ml of the desired buffer at the required temperature. The signal was corrected for the inner filter effect. Linearity in the response of the apparatus was checked using fluorescein as a standard.

The data have been fitted with the equations obtainable from simple dimerization and indefinite association models and reported in the results. C , total drug concentration, was determined through absorbance measurements in very dilute conditions (about 0.05 A in 5 cm pathlength cell) assuming $\epsilon_M = 13200$ [21]. I_M and I_D are the fluorescence coefficients (i.e., the fluorescence intensities at standard concentration) of monomeric and self-associated molecules. I_M , I_D and K_D were optimized through least squares fitting (algorithm of Marquardt).

An analogous procedure has been followed for absorbance-concentration measurements, simply substituting ϵ_M and ϵ_D for I_M and I_D .

DNA binding fluorescence data were obtained adding increasing aliquots of polymer stock solution (in the 0.3 to 10 mM bp range of concentration) to 1.5 ml of a 0.5–1.5 mM drug solution in the desired buffer and temperature range. The concentration of drug being micromolar ca., correction for inner filter was negligible. The signal was described as the sum of contributions from free monomers, free dimers and polymer bound molecules

$$F = C(I_M\alpha_M + I_D\alpha_D + I_B\alpha_B)$$

assuming zero the fluorescence of dimers. Since

$$\alpha_B = 1 - \alpha_M - \alpha_D = 1 - \alpha_M - 2K_D\alpha_M^2$$

and

$$\alpha_M = \left[\sqrt{1 + 8K_D C(1 - \alpha_B)} - 1 \right] / 4K_D C$$

it follows that α_B can be obtained from the solution of the quadratic form

$$\alpha_B^2 \cdot (I_B/I_M)^2 + \alpha_B \cdot (I_B/I_M) \{ (F/C) + (1/4K_D C) \} / 4K_D C + (F/C) + 2[(F/C) - 1] / 4K_D C = 0$$

where I_M , I_D and K_D are assumed to be the best fit values obtained from optimization of fluorescence-drug concentration data with the dimerization model. Finally,

$$r = C_B/C_P = C \cdot \alpha_B / C_P$$

and

$$C_M = C \cdot \alpha_M$$

are obtained and plotted in the form displayed in Figs. 3 and 4.

Results and Discussion

It is known that self-association in aqueous solution occurs to some extent for several anthracyclines [17–21] (Fig. 1). This phenomenon has been frequently studied for daunomycin, in different solvent conditions and with a number of experimental techniques, from visible light absorption [20,21] and circular dichroism [17,18] to nmr and sedimentation equilibrium [20]. Spectrophotometric studies have also been used for measuring self-association of doxorubicin and derivatives [21]. The results obtained appear not fully describable as a simple dimerization equilibrium, since the experimental data at concentrations over 0.1 mM fail to conform to the demands of a dimerization model [20], larger multimers being formed at high drug concentrations. In obtaining equilibrium binding data of these drugs to biopolymers through spectroscopic techniques, proper knowledge of the self-association phenomenon is required to avoid misinterpretations of the experimental results, since the spectral properties of self-associated molecules differ from those of the monomeric species.

N-acetyldoxorubicin is a neutral species at pH 7, differently from its parent compound, and can be expected to display a stronger tendency to self-association. Thus, we decided to assess the relevance of the phenomenon for this drug: its fluorescence intensity has been measured as a function of concentration, assuming that monomers and multimers differ in quantum yield and taking advantage of the higher sensitivity of this technique with respect to light absorption in exploring concentrations down to lower than 0.1 μM . After the usual correction for the inner filter effect, which is however negligible up to 1 μM and reasonably low below 10 μM , a plot as that reported in Fig. 2a has been obtained. The curve with a pronounced downward concavity clearly shows that: (a) self-association is not negligible even in the micromolar range (otherwise a straight line should be obtained); (b) the quantum yield of self-associated molecules is markedly lower than that of free monomers. The experimental data have been fitted with the equations deduced from a simple dimerization model (DM) and from an indefinite association model (IAM) [20], respectively. Inde-

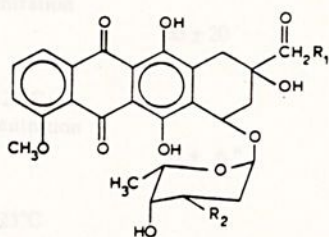


Fig. 1. Anthracycline structures. Doxorubicin: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{NH}_3^+$; Daunomycin: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_3^+$; *N*-acetyldoxorubicin: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{NHCOCH}_3$.

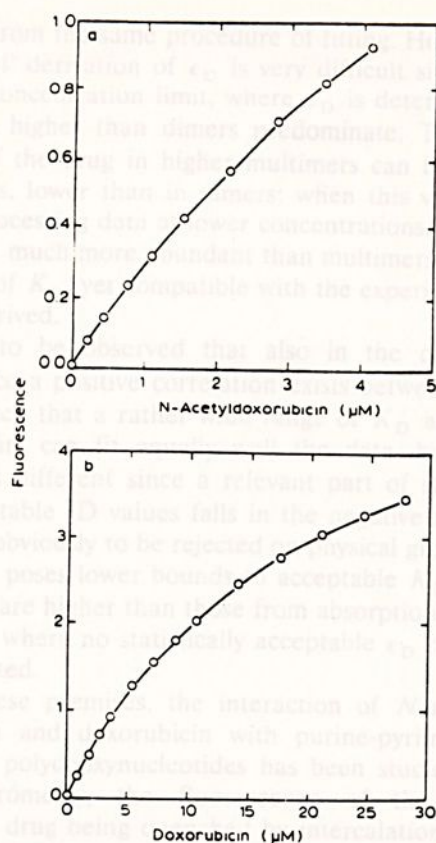


Fig. 2. (a) Fluorescence of *N*-acetyldoxorubicin as a function of concentration. Correction for inner filter effect has been made. (b) Fluorescence of doxorubicin as a function of concentration. Correction for inner filter effect has been made.

pendence of the fluorescence quantum yield from the multimer dimensions has been assumed in the second model for sake of simplicity. The equations are, respectively:

$$F = C(I_M\alpha_M + I_D\alpha_D)$$

$$= C\left\{\left[\left(\sqrt{1+8K_D C} - 1\right)/4K_D C\right](I_M - I_D) + I_D\right\} \quad (\text{DM})$$

$$F = C\left\{\left[\left(1 - \sqrt{1 - [1/(1 + 1/2K_D C)]^2}\right) \cdot (1 + 1/2K_D C)/K_D C\right] \cdot (I_M - I_D) + I_D\right\} \quad (\text{IAM})$$

where C is the total drug concentration, α_M and α_D are the monomer and the self-associated fractions, I_M and I_D are molar fluorescence coefficients (in arbitrary units) for the monomeric and the self-associated species, K_D is the dimerization constant for DM and the self-association constant, assumed equal for each step, for IAM. Details of the procedure are given in the experimental part. Table I shows the more relevant results of the optimization. Moreover, for *N*-acetyldoxorubicin it has been observed that: (a) at concentrations lower than 1 μM the data are described equally

well by both models, whereas at concentrations higher than 1 μM the the IAM is definitely better. This suggests that up to this concentration multimers higher than dimers can be neglected. (b) The ratio of the fluorescence efficiency of self-associated species to that of the monomer is practically zero, i.e., self-association induces an almost total quenching of the fluorescence; (c) the self-association appears to be much more pronounced than what could be expected on the basis of literature data for the charged analogs, so that dimers cannot be neglected even at micromolar concentrations.

We performed the same experiment with doxorubicin and, to our surprise, the results were very similar to the previous ones (see Fig. 2b): the extent of dimerization appears to be in this case only slightly lower than that of *N*-acetyldoxorubicin, as shown in Table I, and multimers have to be taken into account at higher concentrations. This result raised a problem of discrepancy with the literature data [21], obtained however through absorption measurements. In search of a possible explanation of this fact we decided to repeat some absorbance-concentration measurements. What we learned from the analysis of the data was that there is a rather strong correlation between K_D and the extinction coefficient of the associated form, ϵ_D , and that correlated pairs of these parameters fit the data in a rather wide range within the confidence limits, so that if an independent and univocal determination of ϵ_D is not feasible, a sufficiently accurate value of K_D cannot be obtained. The term 'independent' means not

obtained from the same procedure of fitting. However, a 'univocal' derivation of ϵ_D is very difficult since, in the high concentration limit, where ϵ_D is determined, multimers higher than dimers predominate. The extinction of the drug in higher multimers can be, and probably is, lower than in dimers: when this value is used in processing data at lower concentrations, where dimers are much more abundant than multimers, a too low value of K_D , yet compatible with the experimental data, is derived.

It has to be observed that also in the case of fluorescence a positive correlation exists between K_D and I_D , such that a rather wide range of K_D and I_D related pairs can fit equally well the data, but the situation is different since a relevant part of statistically acceptable ID values falls in the negative range, which has obviously to be rejected on physical grounds. This result poses lower bounds to acceptable K_D values, which are higher than those from absorption measurements, where no statistically acceptable ϵ_D can be easily rejected.

With these premises, the interaction of *N*-acetyldoxorubicin and doxorubicin with purine-pyrimidine alternating polydeoxynucleotides has been studied by spectrofluorometry, the fluorescence of the free monomeric drug being quenched by intercalation into DNA. The fluorescence behaviour of the bound drugs is analogous for *N*-acetyldoxorubicin, doxorubicin and daunomycin [8,9]: the presence of guanine containing base pairs strongly quenches the quantum yield of the drugs down to a few percent of that of the free species,

TABLE I
Self-association constants, I_D/I_M and $\chi^2 = (\sum \zeta^2)$
 ζ is the difference between experimental and calculated fluorescence values.

	Simple dimerization			Indefinite association		
	K_D ($\text{M}^{-1} 10^3$)	I_D/I_M	χ^2	K_D ($\text{M}^{-1} 10^3$)	I_D/I_M	χ^2
<i>N</i> -Acetyldoxorubicin in 1 mM Tris, $T = 15^\circ\text{C}$ (11 data points, concentration up to about 20 μM)	$147 \pm 15^*$	$-0.16 \pm 0.01^*$	5	102 ± 5	0.01 ± 0.01	3.5
<i>N</i> -Acetyldoxorubicin in 1 mM Tris, $T = 15^\circ\text{C}$ (9 data points, concentration up to about 5 μM)	65 ± 20	-0.01 ± 0.01	0.7	85 ± 25	0.00 ± 0.01	0.7
Doxorubicin in 0.15 M NaCl, $T = 25^\circ\text{C}$ (12 data points, concentration up to about 25 μM)	$41 \pm 6^*$	$-0.21 \pm 0.05^*$	15	44 ± 6	0.06 ± 0.03	15
Doxorubicin in 0.15 M NaCl, $T = 25^\circ\text{C}$ (8 data points, concentration up to about 10 μM)	80 ± 33	-0.06 ± 0.09	11	80 ± 26	0.17 ± 0.07	12

* Not acceptable on physical grounds, because it implies a significantly negative I_D value.

otherwise a residual quantum yield of around 50–60% is left. This finding, together with the strict analogy in the light absorption properties, indicates that all these drugs share the same basic features as to the structure of their complexes with DNA [10–13].

The finding that drug dimers are not negligible even at micromolar concentrations and that dimerization strongly quenches their fluorescence has been taken into account in deriving the DNA bound drug concentrations from the experiments, as described in the experimental part. Figs. 3 and 4 show the binding data obtained for *N*-acetyldoxorubicin and doxorubicin with the polynucleotides considered: poly(dGdm⁵C), poly(dGdC), poly(dGdT):poly(dAdC), poly(dAdT), poly(dAdU) and poly(dIdC). They are presented as $\Delta G(r) = -RT \ln(r/C_M)$ versus r , instead of the more tradi-

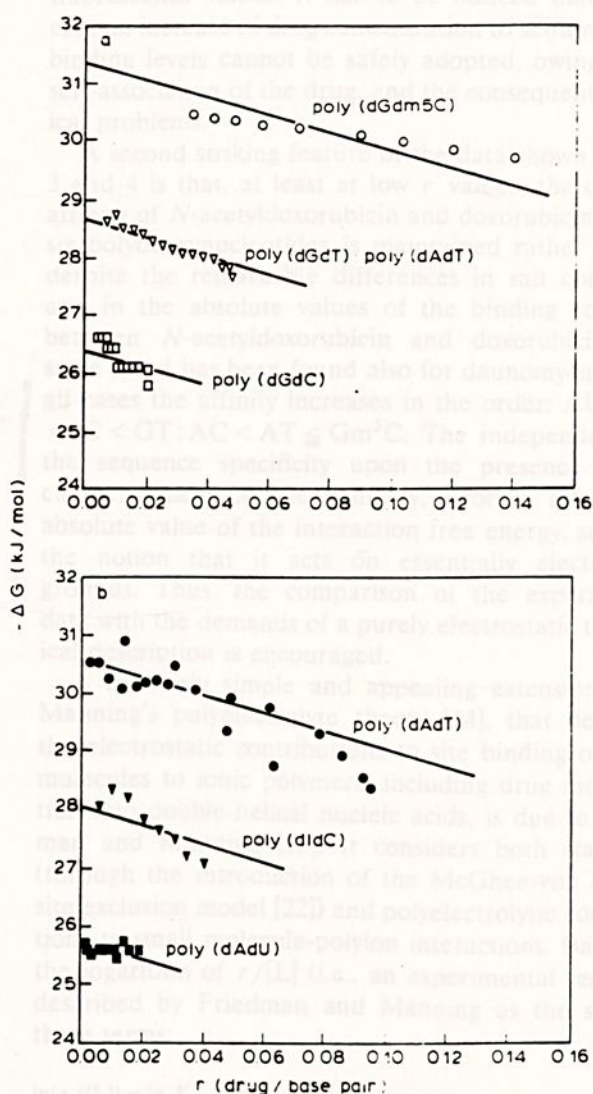


Fig. 3. Modified Scatchard plots for *N*-acetyldoxorubicin and the polydeoxynucleotides considered. See text for experimental conditions. Curves are calculated according to FM model (see text):

$$-\Delta G(r) = RT[\ln K_{np} + P(r) + S(r)]$$

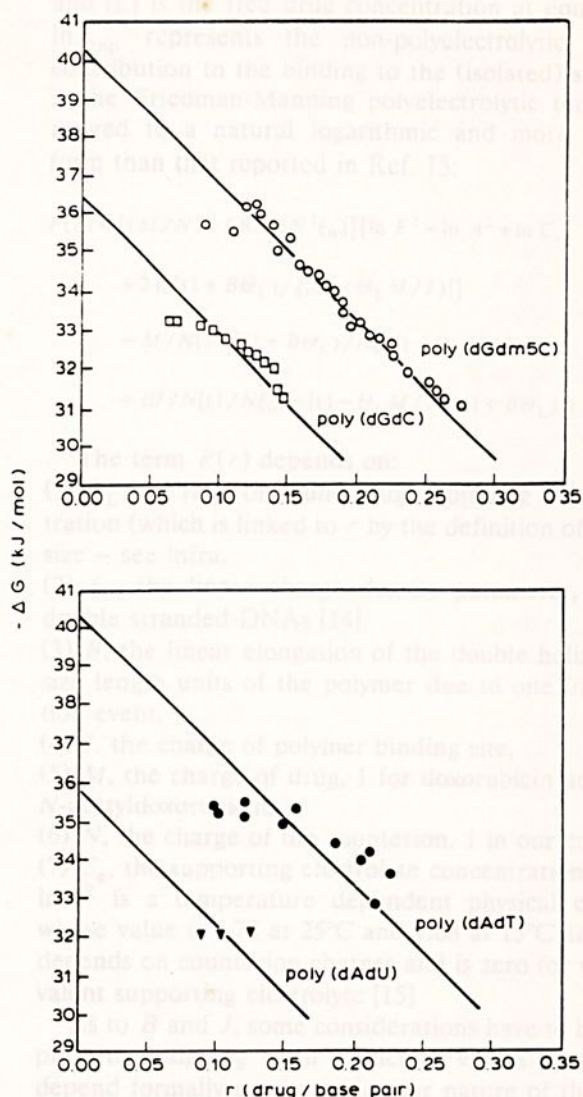


Fig. 4. Modified Scatchard plots for doxorubicin and the polydeoxynucleotides considered. See text for experimental conditions. Curves are calculated according to FM model (see text):

$$-\Delta G(r) = RT[\ln K_{np} + P(r) + S(r)]$$

tional Scatchard form; r is the ratio of the DNA bound drug to polymer base pair concentration, C_M is the free monomeric drug concentration. The main reason of presenting the data as the logarithm of the Scatchard variable is that it appears as the simplest way to reduce (unfortunately not to completely eliminate) the dependence of the ordinate standard deviation on the abscissa value. This results from the fact that an analysis of the experimental method employed shows that, in the low r range, the uncertainty of the ordinate value in the traditional Scatchard plot is more than proportional to its absolute value. At high r values (high c_f) the main error lies in the determination of c_b , hence of r itself, but we have not explored systematically this range. Secondly, the logarithm of the Scatchard variable is linearly related through the factor $-RT$ to a

free energy change: that of transferring one mole of ligand from a solution of free ligand concentration numerically equal to r into a solution of standard concentration polymer at the given value r of saturation. The solid lines have been calculated according to the Friedman-Manning model [15] (see below).

A first relevant result is the different affinity of the two drugs toward a given polymer, despite the different ionic strength conditions chosen should disfavour doxorubicin binding (0.15 M NaCl, 5 mM Tris) with respect to *N*-acetyldoxorubicin (1 mM Tris). This has been done to achieve a reasonable accuracy in the measurements, since at ionic strength lower than 0.1 M the derivation of free doxorubicin concentration becomes difficult and, on the contrary, *N*-acetyldoxorubicin binds so poorly that at ionic strengths higher than 1 mM it is difficult to sufficiently approach the fully bound state in order to get reliable limit fluorescence values. It has to be noticed that in this case an increase of drug concentration to achieve higher binding levels cannot be safely adopted, owing to the self-association of the drug, and the consequent analytical problems.

A second striking feature of the data shown in Figs. 3 and 4 is that, at least at low r values, the order in affinity of *N*-acetyldoxorubicin and doxorubicin for the six polydeoxynucleotides is maintained rather strictly, despite the remarkable differences in salt conditions and in the absolute values of the binding constants between *N*-acetyldoxorubicin and doxorubicin. The same trend has been found also for daunomycin [9]. In all cases the affinity increases in the order: AU $\leq$ GC < IC < GT:AC < AT $\leq$ Gm⁵C. The independence of the sequence specificity upon the presence of the charge, which, on the contrary, strongly affects the absolute value of the interaction free energy, supports the notion that it acts on essentially electrostatic grounds. Thus, the comparison of the experimental data with the demands of a purely electrostatic theoretical description is encouraged.

A relatively simple and appealing extension of of Manning's polyelectrolyte theory [14], that describes the electrostatic contributions to site binding of small molecules to ionic polymers, including drug intercalation into double-helical nucleic acids, is due to Friedman and Manning [15]. It considers both statistical (through the introduction of the McGhee-von Hippel site exclusion model [22]) and polyelectrolytic contributions to small molecule-polyion interactions. Basically, the logarithm of $r/[L]$ (i.e., an experimental result) is described by Friedman and Manning as the sum of three terms:

$$\ln(r/[L]) = \ln K_{np} + P(r) + S(r)$$

r is the ratio of bound drug to base pair concentration

and $[L]$ is the free drug concentration at equilibrium. $\ln K_{np}$ represents the non-polyelectrolytic constant contribution to the binding to the (isolated) site. $P(r)$ is the Friedman-Manning polyelectrolytic term, rearranged to a natural logarithmic and more compact form than that reported in Ref. 15:

$$\begin{aligned} P(r) = & [(M/N) + (BJ/2N^2\xi_0)] \{ \ln F^2 + \ln A^2 + \ln C_e \\ & + 2 \ln[(1 + B\theta_L)/\xi_0(1 - \theta_L M/J)] \} \\ & - M/N \{ 1 - [(1 + B\theta_L)/N\xi_0(1 - \theta_L M/J)] \} \\ & + BJ/N \{ (1/N\xi_0) - [(1 - \theta_L M/J)/(1 + B\theta_L)] \} \end{aligned}$$

The term $P(r)$ depends on:

- (1) θ_L , the ratio of bound drug to binding site concentration (which is linked to r by the definition of the site size - see infra,
- (2) ξ_0 , the linear charge density parameter, 4.2 for double stranded DNAs [14],
- (3) B , the linear elongation of the double helix in site size length units of the polymer due to one intercalation event,
- (4) J , the charge of polymer binding site,
- (5) M , the charge of drug, 1 for doxorubicin and 0 for *N*-acetyldoxorubicin,
- (6) N , the charge of the counterion, 1 in our case,
- (7) C_e , the supporting electrolyte concentration.

$\ln A^2$ is a temperature dependent physical constant whose value is 1.72 at 25°C and 1.68 at 15°C and $\ln F^2$ depends on counterion charges and is zero for uni:uni-valent supporting electrolyte [15].

As to B and J , some considerations have to be done prior to assigning them particular values, since they depend formally on the molecular nature of the binding site: to this, in turn, is linked the actual definition of the McGhee-von Hippel exclusion term [22] and the choice of the exclusion parameter n :

$$S(r) = \ln(1 - nr) + (n - 1) \ln[(1 - nr)/(1 - nr + r)]$$

In principle, for the intercalation into regularly pu-py alternating polynucleotides the site size dimension could be either 1 bp or 2 bp, depending on whether both pu-py and py-pu intercalation sites bind (nearly) equally well the drug or only one of the two is a good site. Consequently, J should be 2 or 4, respectively. Then B is 1 or 0.5, respectively, if an intercalation event induces an elongation of the double helix equivalent to a 1 bp rise. An inspection of the Friedman and Manning equation shows that the polyelectrolytic term $P(r)$ is by itself insensitive to the two possible choices because of parameter compensation effects. In fact the product BJ is always 2 and the quantities $B\theta_L$ and $\theta_L M/J$ assume indeed in each case the same value, once realized that they can be expressed as $BJr/2$ and

$Mr/2$, $r/2 = \Theta_L/J$ being the actual amount of bound drug per polymer charge, which is obviously independent of the model choice. A correct attribution of n value is less simple: no doubt that previous experimental evidences [6–9] limit its range from 2 to 4 or from 1 to 2, if the site size is 1 or 2 base pairs, respectively. Being usually difficult to approach saturation experimentally (or at least to be certain that it has been effectively approached), n is extrapolated from the data on the basis of some model, usually that of McGhee-von Hippel [22], which however ignores long range interactions. On the basis of our previous results with daunomycin [9] we believe that the saturation is reached at one drug molecule per two base pairs, thus n should be 2 if the site size is 1 bp, but more likely is 1, with a site size of 2 bp: this is equivalent to assuming that only 5'-py-pu3' (and not 5'-pu-py3') sequences are efficient intercalation sites, as suggested by the X-ray diffraction results [10–13]. In any case, as shown by inspection of the term $S(r)$, the difference in the binding behaviour is small except that at very high r values and vanishes in the low r limit.

In Figs. 3 and 4 the experimental data points, plotted as $-\Delta G(r) = RT \ln(r/C_M)$, have been fitted with the Friedman and Manning equation, which dictates the slope through the terms $S(r)$ and $P(r)$ as described above, and allows the better choice of the

intercept through the term $\ln K_{np}$. It has to be observed that, at low r values, the calculated curve is practically indistinguishable from a straight line. A consideration can be made about the accord between calculated and experimental slopes. In the case of *N*-acetyldoxorubicin, its low binding level has prevented a sufficiently wide exploration of r values, so that the knowledge of the experimental slopes is not sufficient to support or reject the quantitative validity of the model; moreover, the fact that the experimental r values are very close to zero implies a very low uncertainty in the extrapolated ΔG° values, with the possible exception of poly(dGdm⁵C), where a small discrepancy between calculated and experimental slopes is found. In the case of doxorubicin the experimental slopes are more reliable since the explored range of r is somewhat larger, but a longer extrapolation is required to obtain the ΔG° values: in this case, too, we feel that the experiment is not sufficient to test the theoretical slope, and that, despite a higher uncertainty on the ΔG° values, their implications are not impaired. Table II-A resumes the extrapolated ΔG° values for *N*-acetyldoxorubicin at low ionic strength and for doxorubicin at 0.15 M NaCl, as well as the corresponding values for daunomycin, previously obtained in this laboratory [9]. Table II-A reports also the differences in standard free energy $\Delta(\Delta G^\circ)$ between

TABLE II

(A) Standard free energies of anthracycline binding to pu-py alternating polydeoxynucleotides, as deduced by extrapolation through FM model

Data are given in kJ/mol. a, *N*-acetyldoxorubicin; b, doxorubicin; c, daunomycin, data from Ref. 9; d, difference between b and a; e, difference between c and a; f, difference between c and b.

Polymer	a - ΔG°	b - ΔG°	c - ΔG°	d $\Delta(\Delta G^\circ)$	e $\Delta(\Delta G^\circ)$	f $\Delta(\Delta G^\circ)$
(dGdm ⁵ C)	31.3	40.3	40.5	9.0	9.2	0.2
(dAdT)	30.5	40.3	39.7	9.8	9.2	-0.6
(dGdT):(dAdC)	28.6	-	38.9	-	10.3	-
(dIdC)	28.0	-	37.6	-	9.6	-
(dGdC)	26.3	36.4	36.4	10.1	10.1	0.0
(dAdU)	25.7	35.9	35.5	10.2	9.8	-0.4
Experimental average				9.8	9.7	-0.2
Calculated				6.2	6.2	0.0

(B) Standard free energies of anthracycline binding to pu-py alternating polydeoxynucleotides, calculated through linear best fitting to $r = 0$

Data are given in kJ/mol. a, *N*-acetyldoxorubicin; b, doxorubicin; c, difference between b and a.

Polymer	a - ΔG°	b - ΔG°	c $\Delta(\Delta G^\circ)$
(dGdm ⁵ C)	30.6	39.7	9.1
(dAdT)	30.7	37.0	6.3
(dGdT):(dAdC)	28.8	-	-
(dIdC)	28.2	-	-
(dGdC)	26.7	35.0	8.3
(dAdU)	25.6	32.0	6.4
Experimental average			7.5

N-acetyldoxorubicin and doxorubicin, between *N*-acetyldoxorubicin and daunomycin and between doxorubicin and daunomycin for each polydeoxynucleotide considered. It appears that the differences between *N*-acetyldoxorubicin and the charged compounds are reasonably constant at about 9.7 kJ/mol, whereas the differences between the two charged species are nearly zero. In the assumption that $\ln K_{np}$ and $S(r)$ are the same for all the drugs with a given polydeoxynucleotide, the $\Delta(\Delta G^\circ)$ values can be attributed only to the differences in the polyelectrolytic term and compared with the calculated value of $\Delta[RTP(r)_{r=0}]$. This value results to be 6.2 kJ/mol, in reasonably good agreement with the experimental finding. Obviously, the expected theoretical difference $\Delta[RTP(r)_{r=0}]$ between doxorubicin and daunomycin is zero, in good accord with the experiment. We have, moreover, obtained the ΔG° values also by empirical linear fitting of the experimental values, to avoid any possible bias due to inadequacies of the model. The results are reported in Table II-B. Their inspection shows that the difference in affinity for the polymers between doxorubicin and *N*-acetyldoxorubicin is substantially confirmed, although somewhat lower (7.5 kJ/mol against 9.7).

A further consideration is that a deeper insight into this phenomenon would require the experimental determination of the ionic strength dependence of the affinity to DNA for both the charged and uncharged drugs; we have not undertaken an extensive study of this dependence, in consideration of the above mentioned analytical difficulties. However, the dependence of binding of daunomycin to c.t. DNA from ionic strength has been evaluated by Chaires [23] at $0.05 \leq C_e \leq 1$ M, a range extending to high salt conditions, where the validity of current polyelectrolyte theories is expected to weaken. This notwithstanding, the data presented appear in good accord with the expectations of the FM theory. As to *N*-acetyldoxorubicin, we have measured its affinity for poly(dGdm⁵C) (the most favourable case, since it exhibits the highest binding for this drug) at three different concentrations of the supporting electrolyte. The results are presented in Fig. 5. In the insert the dependence of ΔG° from $\log C_e$ is shown. The full line is drawn with its slope calculated according to the FM model [15]:

$$(d\Delta G^\circ/d \log C_e) = RT(\ln 10)[(M/N) + (BJ/2N^2\epsilon_0)]$$

$$= 1.3 \text{ kJ/mol}$$

The experimental slope appears somewhat higher, but the theoretical one remains within the confidence limits. The ΔG° value for the binding of *N*-acetyldoxorubicin to poly(dGdm⁵C) that can be obtained by extrapolation at $C_e = 0.15$ M is about -27 kJ/mol and -26 kJ/mol using model-based and empirical extrapola-

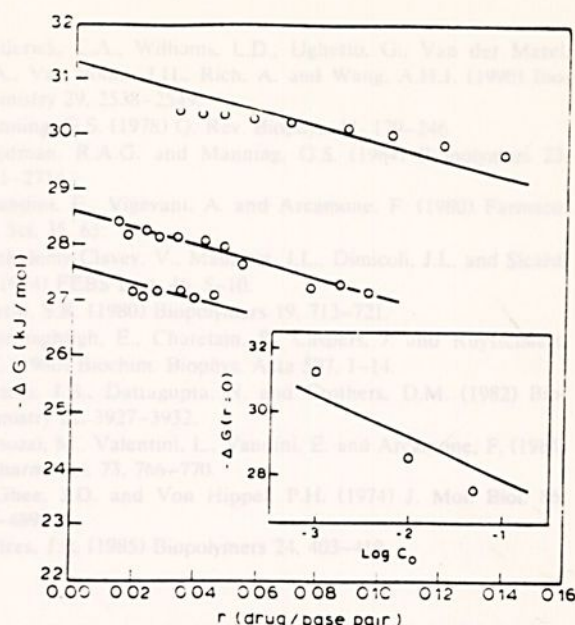


Fig. 5. Modified Scatchard plots for the binding of *N*-acetyldoxorubicin to poly(dGdm⁵C) at three different ionic strengths: 1 mM, 10 mM and 50 mM. Curves are calculated according to FM model (see text). In the inset: ionic strength dependence of binding for this system: the slope of full line is drawn according to FM model.

tions, respectively. Therefore, at this ionic strength, the difference in the free energy of binding to this polymer between *N*-acetyldoxorubicin and doxorubicin amounts to about 13–14 kJ/mol, which means that: (i) a difference of more than two orders of magnitude on the affinity constants is observed; (ii) about one third of the free energy of binding of charged anthracyclines to DNA is due to the charge itself. At lower ionic strengths this contribution must be even higher. Moreover, the overall polyelectrolytic contribution to the free energy of intercalation at $C_e = 0.15$ M, which is not zero even in the case of the neutral intercalator, is calculated by the FM model to be $-RTP(r) = -18.5$ kJ/mol for doxorubicin, corresponding to about one half of the total driving force for this process. These results point out the relevance of electrostatic interactions in drug-DNA binding phenomena and may be of value in the development of drug design.

Acknowledgements

This work has been carried out with the financial contribution of Italian MURST and CNR, and Brazilian FAPESP and CNPq.

References

- 1 Arcamone, F. (1981) Doxorubicin Anticancer Antibiotics: Medicinal Chemistry, Vol. 17, Academic Press, New York.
- 2 Arcamone, F. (1978) Top. Antibiot. Chem. 2, 102–237.

- 3 Reinert, K.E. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 3411-3430.
- 4 Gabbay, E.J., Grier, D., Fingerle, R.E., Reimer, R., Levy, R., Pearce, S.W. and Wilson, W.D. (1976) *Biochemistry* 15, 2062-2070.
- 5 Quadrifoglio, F. and Crescenzi, V. (1974) *Biophys. Chem.* 2, 64-69.
- 6 Chaires, J.B., Dattagupta, N. and Crothers, D.M. (1982) *Biochemistry* 21, 3933-3940.
- 7 Zunino, F., Di Marco, A., Zaccara, A. and Gambetta, R.A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 607, 206-214.
- 8 Chaires, J.B. (1983) *Biochemistry* 22, 4204-4211.
- 9 Xodo, L.E., Manzini, G., Ruggiero, J. and Quadrifoglio, F. (1988) *Biopolymers* 27, 1839-1857.
- 10 Quigley, G.J., Wang, A.H.J., Ughetto, G., Van der Marel, G.A., Van Boom, J.H. and Rich, A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7204-7208.
- 11 Wang, A.H.J., Ughetto, G., Quigley, G.J. and Rich, A. (1987) *Biochemistry* 26, 1152-1163.
- 12 Moore, M.H., Hunter, W.N., Langlois d'Estaintot, B. and Kennard, O. (1989) *J. Mol. Biol.* 206, 693-705.
- 13 Frederick, C.A., Williams, L.D., Ughetto, G., Van der Marel, G.A., Van Boom, J.H., Rich, A. and Wang, A.H.J. (1990) *Biochemistry* 29, 2538-2549.
- 14 Manning, G.S. (1978) *Q. Rev. Biophys.* 11, 179-246.
- 15 Friedman, R.A.G. and Manning, G.S. (1984) *Biopolymers* 23, 2671-2714.
- 16 Arlandini, E., Vigevari, A. and Arcamone, F. (1980) *Farmaco. Ed. Sci.* 35, 65.
- 17 Barthelemy-Clavey, V., Maurizot, J.L., Dimicoli, J.L. and Sicard, P. (1974) *FEBS Lett.* 46, 5-10.
- 18 Martin, S.R. (1980) *Biopolymers* 19, 713-721.
- 19 Goormaghtigh, E., Chatelain, P., Caspers, J. and Ruyschaert, J.M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 597, 1-14.
- 20 Chaires, J.B., Dattagupta, N. and Crothers, D.M. (1982) *Biochemistry* 21, 3927-3932.
- 21 Menozzi, M., Valentini, L., Vannini, E. and Arcamone, F. (1984) *J. Pharm. Sci.* 73, 766-770.
- 22 McGhee, J.D. and Von Hippel, P.H. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 469-489.
- 23 Chaires, J.B. (1985) *Biopolymers* 24, 403-419.

Estes estudos baseados em titulações espectrofotométricas da ligação de actD a DNA tipo de bacteriófago (D₁A-ct) realizados por Cavalieri et al (1964) e Gellert et al (1965) revelaram a existência de duas classes de sítios de ligação da droga: uma forte correspondendo a frações baixas de droga ligada por par de base e outra fraca. Para acessar os sítios fortes estes autores necessitaram uma razão par de base/droga >200. Cavalieri et al (1964) mediram ainda a entalpia de van't Hoff para a ligação aos dois sítios e encontraram que a ligação ao sítio forte é endotérmica ($\Delta H_{\text{lig}} = 1 \text{ kcal/mol}$), ao contrário do que ocorre normalmente em um processo de intercalação. Para o sítio fraco observaram $\Delta H_{\text{lig}} = -3.2 \text{ kcal/mol}$, mesmo assim bastante alto comparado com a entalpia de outras drogas intercalantes $\Delta H_{\text{lig}} = -5 \text{ kcal/mol}$.

Os resultados microcalorimétricos de Quadrifoglio et al (1974 e 1976) e Mark et al (1983) confirmaram o caráter endotérmico desta ligação e apontaram que uma possível causa deste valor anômalo de entalpia poderia ser a liberação de um grande número de moléculas de água, de uma ou outra mudança conformacional na droga ou DNA no processo de complexação. Entretanto, nenhum destes estudos, e tão pouco os posteriores a eles, mostraram, de maneira tão unívoca, a origem destes valores anômalos de entalpia.

Esta ligação apresenta portanto, a mesma riqueza de detalhes estruturais, termodinâmicos e especificidade que são normalmente observados para ligações de proteínas-DNA (Sietz 1989 e Pabo et al 1992). A ligação de actD foi utilizada como modelo de ligação específica ao DNA, com o propósito de explorar contribuições energéticas, tais como hidratação, torção e flexão da dupla hélice, que modulam esta interação, com o objetivo de melhorar a compreensão da energética deste processo.

A água foi considerada uma variável termodinâmica para explorar os efeitos de hidratação na ligação da droga e a estratégia experimental foi de utilizar co-solventes

A água foi considerada uma variável termodinâmica para explorar os efeitos de hidratação na ligação da droga e a estratégia experimental foi de utilizar co-solventes

CAPÍTULO IV

EFEITO MODULADOR DO SOLVENTE NA LIGAÇÃO DA ACTINOMICINA D AO DNA

Os estudos da ligação da actinomicina D (actD) ao DNA através de diversas técnicas tem evidenciado que ela se liga ao DNA intercalando seu cromóforo de anéis aromáticos, fenoxazone, entre pares de bases adjacentes e inserindo suas cadeias laterais pentapeptídicas cíclicas no sulco menor da dupla hélice. Estes estudos tem evidenciado também uma acentuada preferência pelo par 5'-GC-3', flanqueado por 5'-A e 3'-T.

A estrutura cristalográfica (Kamitori e Takusagawa, 1992) da actD ligada à sequência $[d(GAAGCTTC)]_2$ e dados de RMN (Zhou et al, 1989) da actD ligada à $[d(ATCGAT)]_2$ mostraram que o reconhecimento molecular é complexo, envolvendo pontes de hidrogênio entre grupos aceitadores e doadores da droga e das bases localizados no sulco menor. Esta ligação é estabilizada por pontes de hidrogênio entre os grupo amina N2 da guanina 5' com a carbonila e a amida da treonina, e entre o grupo amina da droga e o oxigênio O'4 da desoxirribose ligada à citosina na posição 3'. Há ainda recobrimento hidrofóbico e ligações envolvendo moléculas de água entre as valinas da droga e a adenina e timina que flanqueiam o par GC central. Estes estudos mostraram ainda que há uma distribuição assimétrica de torções nas regiões adjacentes ao sítio preferencial, que além de gerar flexão na dupla hélice, deforma o sulco menor permitindo a inserção da prolina da cadeia lateral da droga entre os açúcares do esqueleto açúcar-fosfato.

Estudos baseados em titulações espectrofotométricas da ligação da actD a DNA timo de bezerro (DNA-ct) realizados por Cavalieri et al (1964) e Gellert et al (1965) revelaram a existência de duas classes de sítios de ligação da droga: uma forte correspondendo a frações baixas de droga ligada por par de base e outra fraca. Para acessar os sítios fortes estes autores necessitaram uma razão par de base/droga >200 . Cavalieri et al (1964) mediram ainda a entalpia de van't Hoff para a ligação aos dois sítios e encontraram que a ligação ao sítio forte é endotérmica ($\Delta H_{vH} \sim 1$ kcal/mol), ao contrário do que ocorre normalmente em um processo de intercalação. Para o sítio fraco obtiveram $\Delta H_{vH} = -3.8$ kcal/mol, mesmo assim bastante alto comparado com a entalpia de outras drogas intercalantes $\Delta H < -8$ kcal/mol.

Os resultados microcalorimétricos de Quadrifoglio et al (1974 e 1976) e Marki et al (1983) confirmaram o caráter endotérmico desta ligação e apontaram que uma possível causa deste valor anômalo de entalpia poderia ser a liberação de um grande número de moléculas de água, de íons ou uma mudança conformacional na droga ou DNA no processo de complexação. Entretanto nenhum destes estudos, e tão pouco os posteriores a eles, mostraram, de maneira não ambígua, a origem destes valores anômalos de entalpia.

Esta ligação apresenta portanto, a mesma riqueza de detalhes estruturais, termodinâmicos e especificidade que são normalmente observados para ligações de proteínas-DNA (Steitz 1989 e Pabo et al 1992). A ligação de actD foi utilizada como modelo de ligação específica ao DNA, com o propósito de explorar contribuições energéticas, tais como hidratação, torção e flexão da dupla hélice, que modulam esta interação, com o objetivo de melhorar a compreensão da energética deste processo.

A água foi considerada uma variável termodinâmica para explorar os efeitos de hidratação na ligação da droga e a estratégia experimental foi de utilizar co-solventes



neutros, que não se ligam às moléculas interagentes, para tamponar a atividade da água (Colombo et al 1992). A ligação da droga foi monitorada através de titulações espectrofotométricas, nas quais pequenas alíquotas de droga foram adicionadas a uma solução contendo DNA na presença ou não de co-solventes. Para ter uma resolução razoável foram utilizadas cubetas de 5 cm de caminho óptico. As concentrações de droga livre e ligada foram obtidas de maneira similar à já descrita e os dados da ligação foram analisados através de isothermas de Scatchard, maiores detalhes são encontrados no texto anexo.

As concentrações de DNA utilizadas nestas titulações para possibilitar o acesso aos sítios fortes de ligação foram ~ 150 pb/droga. Em concentrações mais baixas ~ 80 pb/droga e na ausência de co-solventes não foi possível observar ligação à esta família de sítios. Nesta situação os gráficos de Scatchard foram lineares indicando apenas uma classe de sítios de ligação, caracterizada por uma constante de ligação de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e uma ocupação de 11 pares de base para cada molécula de droga. Entretanto a presença de co-solventes (sacarose, sorbitol, glicose, etileno glicol e glicerol) nestas titulações induziu um aumento nas constantes de ligação e, a partir de uma concentração crítica, foi possível acessar os sítios fortes mesmo à 80 pb/droga. As isothermas de ligação obtidas foram bifásicas (fig 1 no texto anexo) indicando a presença das duas classes de sítios, sendo que a ocupação dos sítios fracos foi de ~ 11 pb/droga enquanto que a dos sítios fortes foi > 50 pb/droga, o que à primeira vista pode ser difícil de entender.

Os valores de constante de ligação medidos para as duas classes de sítios estão em bom acordo com os valores obtidos através de "footprinting" em um fragmento de restrição de 139 pb de pBR322 (Goodisman et al 1992). Neste fragmento foram observados 14 sítios de ligação sendo que 3 deles são caracterizados por constantes de ligação maiores que 10^6 M^{-1} e 11 com constantes entre 10^4 e $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. A autorradiografia apresentada no trabalho de Goodisman et al (1992) mostra que a proteção à digestão de DNaseI aos sítios fortes ocorre a concentração baixa de actinomicina, ou seja a uma razão > 100 pb/droga. Nossos resultados mostraram boa concordância, portanto, com os de "footprinting" que é uma técnica mais sofisticada e uma das poucas que permite determinar a constante de ligação para cada sítio, enquanto a titulação espectrofotométrica utilizada informa apenas o valor médio a cada classe de sítios.

Experimentos de ligação de actinomicina a polinucleotídeos sintéticos que contém o sítio forte: poli(dG-dC)₂ e um intermediário: poli(dA-dC):poli(dG-dT) apresentaram isothermas lineares confirmando a existência de um único sítio de ligação como era de esperar. Para estas seqüências a adição de co-solventes não alterou os níveis de afinidade. Para poli(dA-dT)₂, ao qual a droga não liga, a presença de sacarose não foi suficiente para induzir a ligação, indicando a importância da interação entre a treonina da droga e o grupo amina da guanina 5' na estabilização do complexo.

A constante de ligação sítios fortes aumenta com a concentração de co-solventes, sendo que a variação na constante é linearmente dependente da atividade do solvente (água), como pode ser visto na fig. 4.



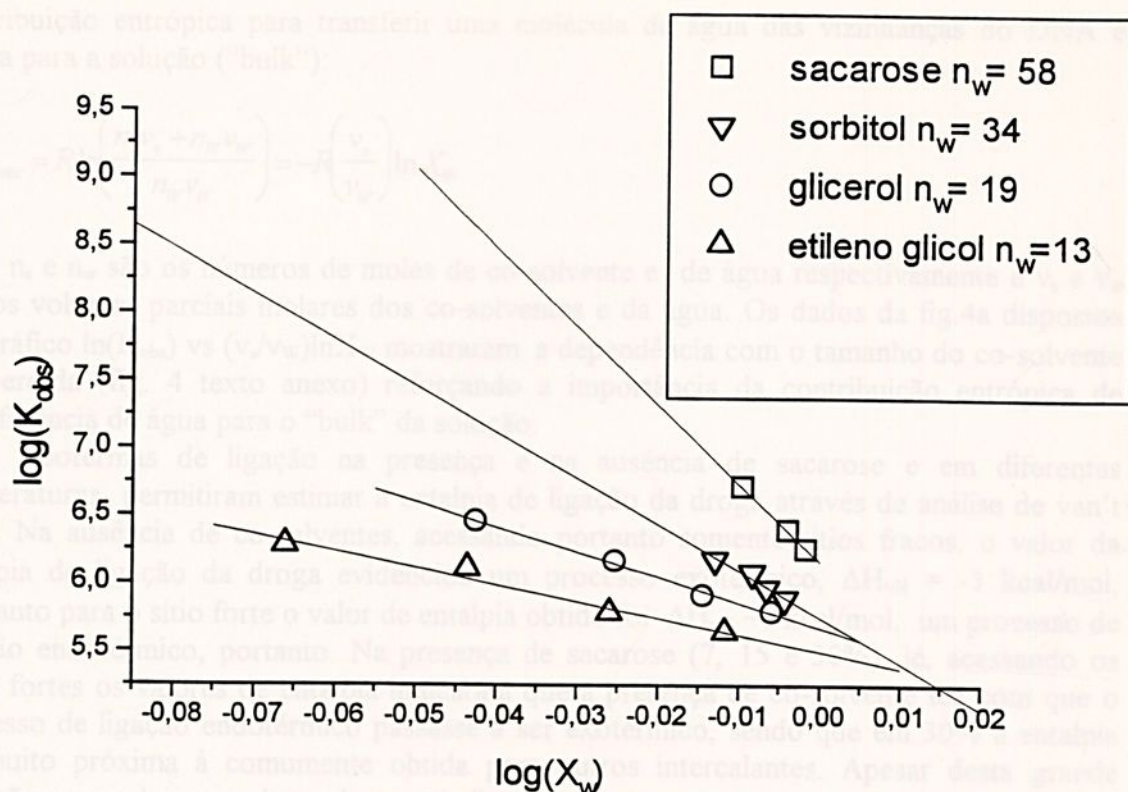


fig. 2 - Gráfico da variação das constantes de ligação observada da actinomicina D ao DNA, obtidas das titulações na presença de co-solventes neutros, em função da fração molar de água.

Para os sítios fracos tanto a constante de ligação quanto a ocupação variam muito pouco com a adição de co-solventes. Esta dependência linear entre a energia de ligação da droga e a atividade da água parece reforçar a hipótese que os co-solventes não se ligam ao DNA ou à droga, evidenciando ainda a importância da atividade da água na ligação.

A interpretação da dependência linear entre a energia de ligação e a atividade da água, mostrada na fig.4a foi feita com base na suposição que considera a água é uma variável termodinâmica na ligação, ou seja deve ser tratada como um ligante, como mostrado no capítulo II. Considerando a atividade da água como sendo dada pela sua fração molar X_w , a variação da energia de ligação observada em função do potencial químico da água pode ser dada por:

$$\frac{\partial(\ln K_{OBS})}{\partial(\ln X_w)} = -\delta n_w$$

Esta equação indica que a inclinação no gráfico da constante de ligação em função da atividade do solvente fornece o número de moléculas de água liberadas na ligação. Os números obtidos variaram linearmente com o volume parcial molar dos co-solventes utilizados (fig. 3b no texto anexo). Nossa interpretação para esta dependência linear no tamanho do co-solvente levou em conta a perturbação criada na solução pela presença do co-solvente. na solução ("bulk"). Esta perturbação é refletida no equilíbrio como uma

contribuição entrópica para transferir uma molécula de água das vizinhanças do DNA e droga para a solução ("bulk"):

$$\Delta S_{\text{mix}} = R \ln \left(\frac{n_s v_s + n_w v_w}{n_w v_w} \right) = -R \left(\frac{v_s}{v_w} \right) \ln X_w$$

onde n_s e n_w são os números de moles de co-solvente e de água respectivamente e v_s e v_w são os volumes parciais molares dos co-solventes e da água. Os dados da fig.4a dispostos em gráfico $\ln(K_{\text{obs}})$ vs $(v_s/v_w)\ln X_w$ mostraram a dependência com o tamanho do co-solvente foi perdida (fig. 4 texto anexo) reforçando a importância da contribuição entrópica de transferência de água para o "bulk" da solução.

Isotermas de ligação na presença e na ausência de sacarose e em diferentes temperaturas permitiram estimar a entalpia de ligação da droga através de análise de van't Hoff. Na ausência de co-solventes, acessando portanto somente sítios fracos, o valor da entalpia de ligação da droga evidenciou um processo exotérmico, $\Delta H_{\text{vH}} = -3$ kcal/mol, enquanto para o sítio forte o valor de entalpia obtido foi $\Delta H_{\text{vH}} \sim 1$ kcal/mol, um processo de ligação endotérmico, portanto. Na presença de sacarose (7, 15 e 30%), ié, acessando os sítios fortes os valores de entalpia indicaram que a presença de co-solvente fez com que o processo de ligação endotérmico passasse a ser exotérmico, sendo que em 30% a entalpia foi muito próxima à comumente obtida para outros intercalantes. Apesar desta grande variação na entalpia os valores de energia livre tiveram apenas uma pequena variação (fig. 5 texto anexo).

Os valores de entropia ($T\Delta S$) calculados a partir da energia livre, mostraram uma variação oposta à da entalpia, sugerindo que a liberação de moléculas de água na complexação da droga, induzida por alterações na atividade da água, é responsável por um processo de compensação entalpia - entropia. Entretanto este equilíbrio não é completo, pois a variação da entalpia em função da entropia obtida da inclinação do gráfico ΔH vs $T\Delta S$ foi 1.2. De acordo com Grunwald et al (1995) para uma compensação completa a inclinação deveria ser igual à unidade. Eles propõem ainda, que a variação não nula da energia livre com a entropia, responsável pela desigualdade entre entalpia e entropia, poderia ter origem poderia em uma mudança conformacional ou uma ligação muito forte. O valor encontrado para esta variação a partir da inclinação do gráfico ΔG vs $T\Delta S$ foi 0.2.

Os resultados de ligação de actinomicina ao DNA timo de bezerro, de polinucleotídeos sintéticos e de "footprinting" de Goodisman et al (1992) sugeriram que o acesso aos sítios fortes está relacionado à disponibilidade destes sítios, provavelmente devido à entalpia desfavorável de ligação ou à quantidade de água que deve ser liberada na ligação, pois estes trabalhos evidenciaram que estes sítios foram favorecidos em alta concentração de sítios ou reduzindo a atividade de água.

Este trabalho permitiu acessar o número de moléculas de água liberados na ligação e mostrar, pela primeira vez, que esta é a origem do processo endotérmico nesta ligação.

EFEITO DE CO-SOLVENTES NA TORÇÃO DA DUPLA HÉLICE

O estado torcional da dupla hélice é de extrema importância na atividade biológica da molécula de DNA. Em organismos procariotos ou eucariotos o DNA genômico



encontra-se altamente organizado, formando, com o auxílio de proteínas, uma estrutura complexa que é capaz de reduzir em muitas ordens de grandeza a relação entre o comprimento do DNA e o espaço que esta molécula deve ocupar na célula. Se o DNA de cada um dos 46 cromossomos de uma de nossas células somáticas fosse esticado e emendado, resultaria em um filamento único com aproximadamente 2.0 m de comprimento, que deve estar contido no núcleo celular, que tem apenas 0.5 μm de diâmetro. Para que isto seja possível é necessário que a dupla hélice esteja formando uma estrutura terciária conhecida como superhélice (Maxwell, 1993 e Vologodiskii, 1995) em torno de proteínas. Mesmo o DNA de vírus encontra-se altamente compactado na forma de super-hélices, sugerindo que o aspecto torcional ou topológico da molécula de DNA deva ser levado em conta quando se avalia a energética da interação de ligantes com a dupla hélice.

Muitas estruturas não convencionais de DNA, entre elas a conformação Z, estruturas cruciformes e tripla hélice que têm mostrado desempenhar importante papel biológico, são estabilizadas pela energia torcional e aspectos topológicos da dupla hélice (Maxwell 1993, Frank-Kamenetiskii 1993 e Sinden 1994). Na dissertação de mestrado de Uderlei Covissi (1993) foi iniciado um trabalho sobre a topologia do DNA e seus efeitos na ligação de ligantes. Naquele trabalho foi explorado o efeito de actinomicina na atividade de extrato de topoisomerase I em relaxar plasmídeos, bem como o efeito de co-solventes na ligação desta droga a plasmídeos super-helicoidais. Os resultados foram bastante animadores e em seu trabalho de doutorado tem realizado experimentos para estimar, entre outras coisas, o efeito de co-solventes na torção da super-hélice *in vivo* e *in vitro*. Alguns resultados do trabalho *in vitro* são apresentados a seguir.

Experimentos para avaliar o efeito de co-solventes na torção da dupla hélice envolveram reações enzimáticas de fechamento de plasmídeos previamente linearizados com enzimas de restrição. Nestes experimentos plasmídeos pUC18 (2686 pb) foram linearizados com *Hind* III (Gibco BRL) em tampão recomendado pelo fabricante (tris HCl 50mM pH 8.0, MgCl_2 10 mM, NaCl 100 mM). Após o tempo de reação a enzima foi inativada à alta temperatura e em seguida o plasmídeo foi circularizado na presença de diferentes concentrações de co-solventes através de reação com T4 DNA ligase (Gibco - BRL) em tampão tris 10 mM, MgCl_2 6.6 mM, KCl 1 mM e ditiotretitol 1 mM. O produto da reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1%, de dimensões: 20x25x0.3 cm, tampão tris acetato 10 mM, aplicando campo de 2 V/cm por 24 h.. O gel foi corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g/ml}$) e visualizado através de transiluminação na região de UV. Com o objetivo de melhorar a resolução dos topoisômeros, em alguns casos, cloroquina foi adicionada ao gel de agarose.

Estes experimentos indicaram que a mobilidade dos topoisômeros, obtidos das reações de fechamento (circularização), foram dependentes do tipo e concentração de co-solvente neutro. A reação de circularização com ligase T4, como de topoisomerase I, gera uma família de topoisômeros, que obedecem a uma distribuição de Boltzmann. Cada membro desta família é caracterizado por uma quantidade conhecida como "linking number" ou o número de voltas do plasmídeo (Lk). Este número é a relação entre o número de pares de base do plasmídeo e o passo da hélice do DNA, que na conformação B é de 10.4 pb por volta. Assim para o pUC18 no estado relaxado este número corresponde à $Lk_0 = 2686/10.4 = 258$.

Em uma reação de circularização ou de topoisomerase I, o plasmídeo está sujeito a tensões devido à alterações nas condições ambientais, tais como força iônica, flutuação térmica, presença de intercalantes etc, cujo efeito no plasmídeo é de aumentar ou diminuir o

número de voltas. O aumento da força iônica, por exemplo, reduz a repulsão eletrostática entre os grupos fosfato e a distância entre eles, aumentando, conseqüentemente, o ângulo de torção da dupla hélice $\psi > 34.61/\text{pb}$. ($\psi = 34.61/\text{pb}$ corresponde ao ângulo entre as bases no estado relaxado, ié, $360/10.4$). Como conseqüência do aumento do ângulo de torção, o passo da hélice diminui e o número de voltas do DNA aumenta: $Lk > Lk_0$ ($Lk_0 = 258$ no caso do pUC18) gerando, assim, superhélice positiva. Na família de topoisômeros gerada por reação de topoisomerase I ou de circularização com T4 ligase, os topoisômeros obtidos diferem entre si por uma volta ($\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 1$)

A mobilidade eletroforética da família de topoisômeros é em geral dependente das condições ambientais nas quais a reação de circularização ou topoisomerase I foi feita. Desta forma cada topoisômero gerado é observado no gel de eletroforese como sendo uma banda, e uma coleção de plasmídeos com ΔLk próximos é observada como um conjunto de bandas cujas intensidades obedecem a uma distribuição de Gauss., ié, o perfil densitométrico das bandas no gel apresenta um máximo central. A quantificação dos dados de eletroforese é feita através do método de contagem de bandas segundo o qual conta-se o número de bandas em que a posição do máximo central é deslocada (Keller 1975 e Shure et al 1976).

Os resultados dos experimentos de circularização de pUC18 indicaram que na ausência de co-solvente o plasmídeo apresenta uma diferença de 1.8 voltas ($\Delta Lk = 1.8$), no sentido positivo, devido à presença de íons Mg^{+2} no tampão de reação. À medida que o plasmídeo foi circularizado em concentrações crescentes de co-solventes a mobilidade dos topoisômeros diminuiu aproximando-se da forma relaxada e em seguida aumentou novamente indicando que o efeito do co-solvente é de aplicar uma torção no sentido contrário ao do Mg^{+2} , ié, relaxando a torção na dupla hélice (fig. 5). As reações de fechamento na presença de etileno glicol e glicerol e sacarose indicam que o relaxamento das 1.8 voltas positivas iniciais e posterior formação de super-hélice negativa é dependente da concentração destes co-solventes.

Com os valores do número de voltas (ΔLk) para as reações de fechamento na presença de co-solventes neutros foi possível avaliar a energia livre torsional para a indução de super hélice no plasmídeo:

$$\Delta G_t \sim 10RTN\sigma^2$$

onde R e T são a constante dos gases e a temperatura. N é o número de pares de base do plasmídeo e σ é a densidade de super hélice $= (Lk - Lk_0)/Lk_0$. Na fig. 1b são mostrados gráficos de energia livre torsional induzidos pela adição de etileno glicol e glicerol em reações de circularização de pUC18. Novamente pode ser visto que a energia torsional varia linearmente com a atividade de água mas não parece depender do co-solvente.

O valor de energia livre torsional estimado para o DNA na presença de sacarose foi $\Delta G_t = 0.2 \text{ kcal/mol}$. É importante enfatizar aqui que este valor é idêntico à parte não compensada da energia livre de ligação da actinina ao DNA (veja tabela 1a) sob condições fisiológicas. Entretanto, a variação de energia livre torsional, induzida pelo co-solvente, e estimada para o DNA, foi retirada da energia livre de ligação da actinina ao DNA, e

Fig. 1- Eletroforese em gel de agarose 1% de plasmídeos (pUC18) circularizados com ligase T4 a 25°C, na presença de 5, 10, 15, 20, 30% de etileno glicol.



Os gráficos de Lk em função da atividade de água na reação de circularização na presença de etileno glicol e glicerol são mostrados na fig. 6a. Estes gráficos mostram que Lk varia linearmente com a atividade de água. Entretanto, não parece haver uma dependência com o tamanho do co-solvente utilizado.

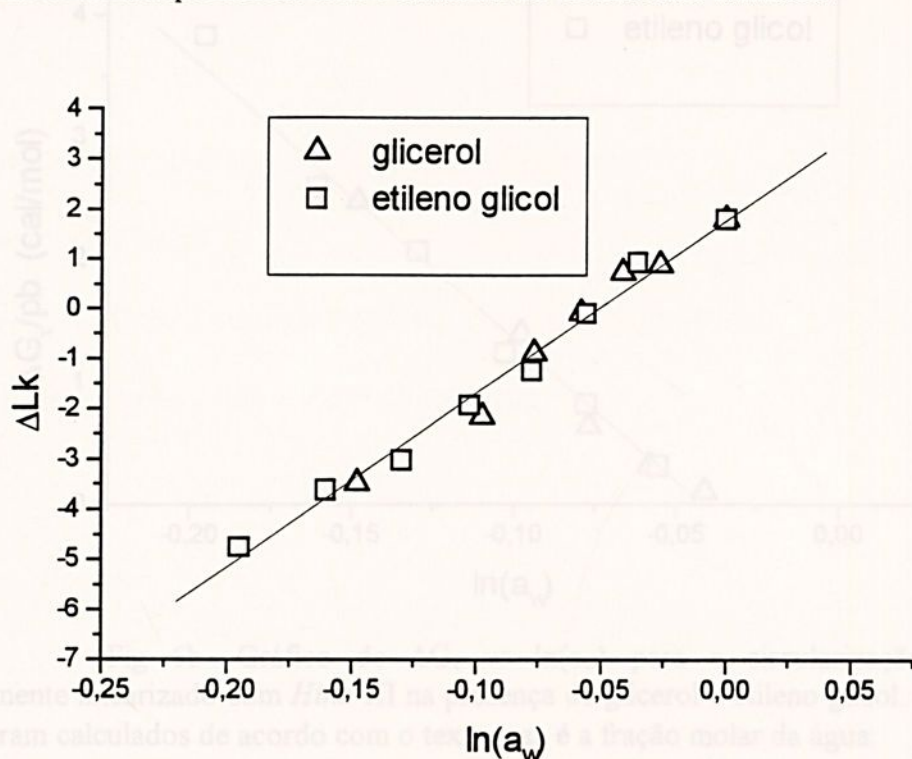


Fig 6a- Gráfico de Lk vs $\ln(a_w)$ para a circularização de pUC18 previamente linearizado com *Hind* III na presença de glicerol e etileno glicol. Os valores de Lk foram obtidos pelo método de contagem de bandas e, a_w é a fração molar da água.

Com os valores do número de voltas (ΔLk) para as reações de fechamento na presença de co-solventes neutros foi possível avaliar a energia livre torcional para a indução de super hélice no plasmídeo:

$$\Delta G_r = 10RTN\sigma^2$$

onde R e T são a constante dos gases e a temperatura, N é o número de pares de base do plasmídeo e σ é a densidade de super hélice = $(Lk - Lk_0)/Lk_0$. Na fig. 6b são mostrados gráficos de energia livre torcional induzidas pela adição de etileno glicol e glicerol em reações de circularização de pUC18. Novamente pode ser visto que a energia torcional varia linearmente com a atividade de água mas não parece depender do co-solvente.

O valor de energia livre torcional estimado para o DNA na presença de sacarose foi $\Delta G_r = 0.2$ kcal/mol. É importante enfatizar aqui que este valor é idêntico à parte não compensada da energia livre de ligação da actinomicina D ao DNA (artigo anexo). Isto pode ser coincidência. Entretanto, a variação de energia livre torcional, induzida pelo co-solvente, e estimada para o DNA, foi retirada da energia livre de ligação da actD ao DNA, e observou-se que a entalpia é totalmente compensada, ié, a inclinação do gráfico ΔH vs $T\Delta S$ é aproximadamente um indicando compensação completa.

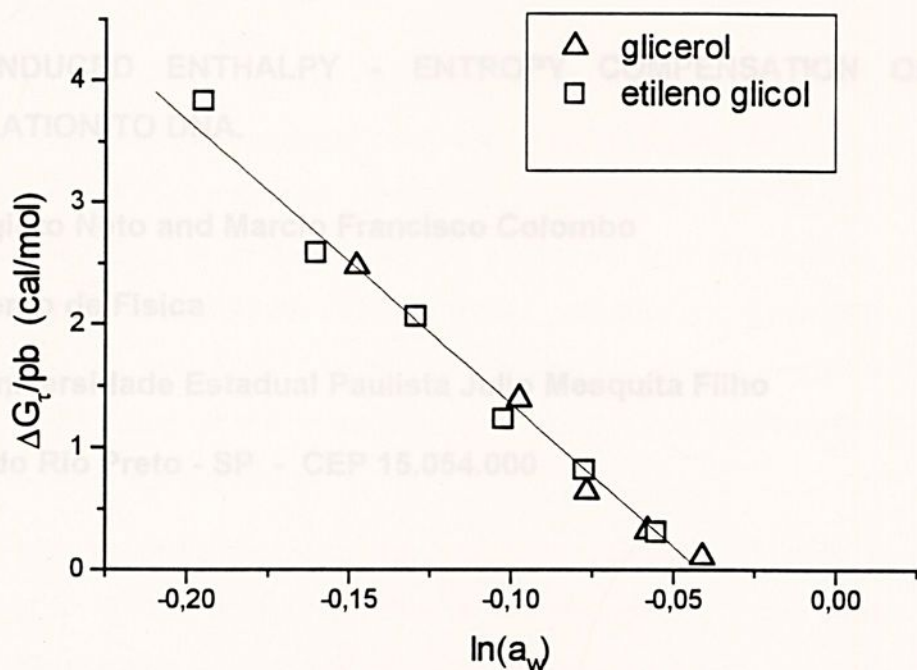


Fig 6b- Gráfico de ΔG_r vs $\ln(a_w)$ para a circularização de pUC18 previamente linearizado com *Hind* III na presença de glicerol e etileno glicol. Os valores de ΔG_r foram calculados de acordo com o texto e a_w é a fração molar da água.

Estes resultados evidenciaram que a contribuição da alteração da atividade de água tem duas componentes importantes no processo de reconhecimento molecular da actinomicina ao DNA: a transferência de moléculas de água para o “bulk”, que induz ligação a uma família de sítios mais fortes, e a torção induzida da dupla hélice. Quando estas duas contribuições são levadas em conta no cálculo de energia livre, observa-se uma compensação entalpia - entropia completa.

WATER INDUCED ENTHALPY - ENTROPY COMPENSATION ON DRUG INTERCALATION TO DNA.

João Ruggiero Neto and Marcio Francisco Colombo

Departamento de Física

IBILCE - Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho

São José do Rio Preto - SP - CEP 15.054.000

Microcalorimetric and spectroscopic titrations (Marky et al 1983, Quadrifoglio et al 1974, Snyder et al 1989, Bailey et al 1993), have shown that act-D binding to DNA presents an anomalous enthalpic value ($\Delta H \sim +1$ kcal/mol) compared with other intercalating dyes ($\Delta H \sim -8$ kcal/mol). The free energy values, however, are very similar, suggesting the importance of entropic contributions to the recognition mechanisms of DNA binding sequences by the actinomycin. The positive enthalpy value in the intercalation of the actinomycin has been attributed to the release of water molecules on DNA binding or to a possible conformational change either in the DNA or in the lateral pentapeptide side chains.

Searching a possible mechanism to explain the entropy driven process of Act-D to DNA binding, Quadrifoglio et al (1976) carried out microcalorimetric measurements comparing the binding energies of Act-D and its analog actinomine, that lacks the pentapeptide lateral chains, to DNA and nucleotides. From these studies they proposed that the interaction of the peptide arms to the minor groove is responsible for the entropic character of Act-D/DNA interaction. They proposed, also, that the source for the entropy gain on association of Act-D and DNA would be the release of water molecules from the complex related to the free DNA and drug in solution. This same interpretation had been formulated earlier by Gellert, et al (1965), from their spectrophotometric studies of the Act-D / DNA interaction.

INTRODUCTION

Actinomycin D (actD), interacts with DNA through intercalation of its phenoxazone ring between adjacent base pairs and inserting its pentapeptide side chains into the DNA minor groove. Recent crystallographic (Kamitori & Takusagawa 1992) and NMR (Zhou et al 1989) studies show that the aminoacids of the side chains are in very close contact with the bases, establishing hydrogen bonds and hydrophobic contact with DNA. Under this mechanism several water molecules of hydration layers, located on the minor groove of free DNA and solvating the free drug should be lost under complexation

Microcalorimetric and spectroscopic titrations (Marky et al 1983, Quadrifoglio et al 1974, Snyder et al 1989, Bailey et al 1993), have shown that actD binding to DNA presents an anomalous enthalpic value ($\Delta H \sim +1$ kcal/mol) compared with other intercalating dyes ($\Delta H \sim -8$ kcal/mol). The free energy values, however, are very similar, suggesting the importance of entropic contributions to the recognition mechanisms of DNA binding sequences by the actinomycin.. The positive enthalpy value in the intercalation of the actinomycin has been attributed to the release of water molecules on DNA binding or to a possible conformational change either in the DNA or in the lateral pentapeptide side chains.

Searching a possible mechanism to explain the entropy driven process of Act-D to DNA binding, Quadrifoglio et.al.(1976) carried out microcalorimetric measurements comparing the binding energies of Act-D and its analog actinomine, that lacks the pentapeptide lateral chains, to DNA and nucleotides. From these studies they proposed that the interaction of the peptide arms to the minor groove is responsible for the entropic character of Act-D/DNA interaction. They proposed, also, that the source for the entropy gain on association of Act-D and DNA would be the release of water molecules from the complex related to the free DNA and drug in solution. This same interpretation had been formulated earlier by Gellert, et.al.(1965), from their spectrophotometric studies of the Act-D / DNA interaction.



However, and in spite of the appealing of this proposition, there are still no definitive experiments in the literature revealing the origin of this entropic contribution.

With the aim of exploring the possible role of solvation changes on the actinomycin to DNA binding, we measured the binding affinities as a function of the water chemical potential. The main idea, behind such experiments, is to account, explicitly, the water activity as a fundamental thermodynamic variable operating on the reaction chemical equilibrium. In order to accomplish that we make use of linkage equations (Wyman et al 1992) that relate changes in equilibrium constants with changes in ligand chemical potentials. Experimentally, we can use 'inert' or neutral solutes, added to the probing solution, to buffer the water activity. These approaches have been successfully applied recently to study the role of water on several systems. Of particular interest are the modulation of the equilibrium between B and Z conformations of synthetic polynucleotides by water molecules (Preisler et al 1995)) and the participation of water molecules on the recognition of highly specific binding sites of repressors: lac (Ha et al 1992) and gal (Garner et al 1994) to DNA.

Following molar extinction coefficients: $\epsilon = 12600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for dT-DNA, $\epsilon = 14200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for poly(dG-dC), $\epsilon = 13200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for poly(dA-dC) poly(dG-dT).

Actinomycin D binding to DNA, in the presence and absence of cosolvents, was estimated by spectrophotometric titration, in a Cary E spectrophotometer, using 5 cm path length cuvettes, thermostated with a Nalab water circulating bath. Small volumes of actD were added to a DNA solution and the optical density at 440 nm measured after each addition. High DNA concentrations were used in order to optimize the binding conditions to access lower binding ratios. The extinction coefficient of the bound drug were obtained by the extrapolation of the drug absorbance in the presence of a large excess of binding sites and the value obtained was $\epsilon_b = 11900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ both in the presence and absence of cosolvents.

The drug concentrations used during titration were maintained at very low levels, 0.2 to 5 μM , in order to avoid drug dimerization. The binding data (free and bound drug concentrations) were calculated neglecting any type of drug self

MATERIALS AND METHODS

Actinomycin D (actD) from U.S. Biochem was used without any further purification. Calf thymus DNA from Pharmacia was dissolved in phosphate buffer overnight at 4°C, sonicated in ice, phenol extracted and precipitated with ethanol. Synthetic polydeoxynucleotides (poly(dG-dC)₂, poly(dA-dT)₂ and poly(dA-dC):poly(dG-dT)) were purchased from Pharmacia and used without further purifications. The DNA and the polydeoxynucleotides solutions, in the presence and absence of cosolvents, were filtered with Millipore filter (0.25 µm) by two or three times before determining their concentrations. Neutral cosolvents were analytical grade. Both DNA and drug were prepared in 10 mM phosphate buffer pH 7.5, containing 150 mM NaCl and 1 mM EDTA. The drug concentrations in buffer were determined spectrophotometrically through the absorption in 440 nm using a molar extinction coefficient $\epsilon_F = 24800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. After this procedure no aggregation was observed by turbidity. Calf thymus DNA and synthetic polydeoxynucleotides concentrations were determined, after the filtration in Millipore filters, using the following molar extinction coefficients: $\epsilon = 12800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for ct-DNA, $\epsilon = 14200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for poly(dG-dC)₂, $\epsilon = 13200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for poly(dA-dC):poly(dG-dT).

Actinomycin D binding to DNA, in the presence and absence of cosolvents, was estimated by spectrophotometric titration, in a Cary E spectrophotometer, using 5 cm path length cuvettes, thermostated with a Neslab water circulating bath. Small volumes of actD were added to a DNA solution and the optical density at 440 nm measured after each addition. High DNA concentrations were used in order to optimize the binding conditions to access lower binding ratios. The extinction coefficient of the bound drug were obtained by the extrapolation of the drug absorption in the presence of a large excess of binding sites and the value obtained was $\epsilon_B = 11900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ both in the presence and absence of cosolvents.

The drug concentrations used during titration were maintained at very low levels, 0.2 to 5 µM, in order to avoid drug dimerization. The binding data (free and bound drug concentrations) were calculated neglecting any type of drug self

association. The bound drug concentrations, $[actD]_B$, were determined as in Crothers and Miller (1968):

$$[actD]_B = \frac{\left([actD]_T \times \epsilon_F - \frac{A_i}{5}\right)}{\epsilon_F - \epsilon_B}$$

where A_i is the optical density in 440 nm at the i^{th} actinomycin addition. $[actD]_T$ is the total drug concentration and is given by:

$$[actD]_T = [actD]_B + [actD]_F$$

where $[actD]_F$ is the free drug concentration.

The binding data were analysed through Scatchard plots: $r/[actD]_F$ vs $r(= [actD]_B/[DNA])$. In the range of drug concentrations used, in the absence of cosolvents, these plots were typically linear, and the binding constants were obtained by the linear regression.

Titration at different temperatures (10, 15, 18 and 25°C) and in different concentrations of sucrose were carried out in order to determine the binding constants in these temperatures and the enthalpy values were obtained through van'tHoff analysis:

$$d \ln K_{obs}/d(1/T) = - \Delta H/ R$$

where R is the gas constant. The entropy values were obtained from the difference between Gibbs free energy change at 25°C. and the van'tHoff enthalpy:

$$\Delta S = - (\Delta G - \Delta H)/ T$$

RESULTS AND DISCUSSION

EFFECT OF SOLUTES ON THE ActD-ctDNA INTERACTION

Fig. 1 shows the Scatchard plots obtained from the titration of actD to DNA in buffer alone and in the presence of 15% sucrose at two different temperatures. It can be seen the Scatchard plots collected in phosphate buffer are linear, which indicates the existence of only one class of binding sites. However, the titrations in the presence of co-solvents, (e.g. sucrose) show this plot is biphasic.

These binding isotherms could not be fitted by only one straight line, or even by a model describing an anticooperative binding such as the MacGhee and von Hippel, as shown in the fig 1. These Scatchard plots were fitted using two straight lines. The same behavior was observed in the presence of the other co-solvents studied: glucose, sorbitol, glycerol and ethylene glycol.

These biphasic plots could be an evidence of the existence of two distinct classes of binding sites whose binding constants are given by the slopes of the two line segments. The binding constants so obtained indicate one class of sites with relatively lower affinity. The binding strength of these weak binding sites is, moreover, similar to that determined in the absence of cosolvents. The second class of binding sites, with relatively higher affinity, has its strength dependent on the specie and concentration of the cosolvent.

The plots in the fig. 1 show also that the binding constants of the strong binding sites increase with the co-solvent concentration and with the decrease in the temperature, while the binding constants to the weak binding sites seems to be approximately independently of the temperature and equal to that obtained in the absence of co-solvent.

Earlier spectrophotometric studies on the interaction of Act-D to DNA, reported in the literature (Cavalieri, et.al.(1964), Gellert, et.al.(1965)), have also described the existence of two classes of binding sites: weak and strong. However, the detection of the strong class of binding sites is rather dependent on the solution conditions. The ratios of base pair to drug concentrations utilized by Cavalieri et al

(1964) to detect the stronger binding were ten times higher than that used in the present work, at similar ionic strength. Its noteworthy the stronger binding sites were detected at an ionic strength 15 times greater than that used in earlier studies by Gelert et al (1965) a condition that unfavour drug binding to the strong binding sites. Furthermore, our data presented in Fig.1 clearly demonstrate that adding sucrose to the DNA / drug solution favors drug binding to the strong binding sites on DNA even at high ionic strength.

The binding constants determined in the presence and in the absence of co-solvents are of the same order of magnitude to that determined by Goodismann et al (1992) from the footprinting studies of the actinomycin binding to a 139 bp restriction fragment of pBR322. In those experiments the binding constants to 14 sites were accessed. The constants measured show the existence of 3 different binding sites with affinity higher than 10^6 M^{-1} and 11 sites with binding constants ranging from $8 \cdot 10^5$ to 10^4 M^{-1} . The averaged binding constants we found are 10^5 M^{-1} for the weak sites and up to $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ for the strong binding sites.

Footprinting is one of the few techniques which allows to determine the binding constants to each individual binding site while the spectrophotometric titrations, carried out in the present study, allows to determine only an averaged binding constant. In this way the results obtained suggest that the presence of sucrose, sorbitol, glycerol and ethylene glycol favor the drug binding to sites which could not be accessed in an titration carried out only in the presence of the buffer, at these conditions of DNA to drug concentrations and ionic strength. The values of the binding constants obtained for the two classes of binding sites are in good agreement with the values used by Goodismann et al (1992) as the binding constants to the calf thymus DNA as the carrier in the footprinting titrations.

It is quite interesting that the observed dependence of the drug binding levels, to the stronger sites, with the water activity is similar to the observations of Garner and Rau (1995) for the independence of the binding constants of *gal*



repressor to a non specific DNA sequence (poly d(I-C). d(I-C)) used as competitor on their experiments. Their results and the independence observed on the binding levels to the weak sites with the water activity suggests the importance of the water release on specific ligands to DNA interactions.

It is also important to remark, that titrations carried out in the presence of alcohols (data not shown) presented opposite behaviors on the binding of actinomycin to DNA in very good agreement with the data of Varani et al (1987).

The behavior on the drug binding observed for alcohols, in opposition to that observed for sugars and polyols, allows us to rule out the hypothesis that the changes on the drug binding levels could be due to variations induced by co-solvents in the dielectric constant of the solutions. Sugar, alcohol and polyols induce the same effect of decreasing the solution dielectric constant (Weissberger 1970).

According to Varani et al (1986) the effects induced by alcohols on the actD intercalation levels are due to the inclusion of the cosolvent on the solvation layers of the drug, leading the intercalation energetically unfavorable. The opposite effects observed by polyols (sucrose, sorbitol, glycerol and ethylene glycol) seems to be due to the exclusion of these cosolvents from the solvation layers of the drug and the DNA, either by steric exclusion Parsegian et al (1995) or by preferential hydration Timashev (1994).

It is quite interesting that Act-D is only seen to bind to the strong sites when in presence of excluded co-solvents, as suggested by the Scatchard plots. A possibility would be that these cosolvents are somehow altering the structure of DNA. This hypothesis was checked by Circular Dichroism and no observable conformational change was detected in sucrose solution. Unwinding the double helix could be another possible effect induced by co-solvents on the DNA, increasing the distance between adjacent base pairs and creating conditions to increase intercalation. We have tried to estimate the effect induced by co-solvents on the torsion of superhelical DNA through T7 closure reaction of linearized plasmids. The

effect observed for glycerol and ethylene glycol and sugars was to induce positive supercoil, an effect similar to that described by Lee et al (1978) for these polyols.

EFFECT OF SOLUTES ON THE INTERACTION OF ACT-D TO SYNTHETIC POLYDEOXYNUCLEOTIDES

In order to further investigate the mechanism of action of polyols on enhancing drug intercalation to ct-DNA, we carried out experiments with synthetic polydeoxynucleotides. In these studies we have used poly(dG-dC):poly(dG-dC), which bears the central core of the most favorable binding sequence (5'AGCpyr3'), that is taken as representative of the strong site. We made also studies with poly d(A-C):poly d(G-T) whose sequence is less favorable than G-C and considered as a site with medium affinity and with poly d(A-T).d(A-T) to which there is no Act-D binding at all (Wells, et.al.).

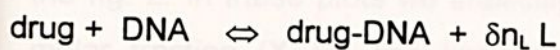
The Scatchard plots for the binding of actD to poly d(G-C) and poly d(A-C):poly d(G-T) in buffer and in the presence of 15% of sucrose show the existence of only one type of binding site (data not shown). Sucrose that, among the co-solvents utilized, was the most efficient to potentialize the actD binding to the ct-DNA, were unable to uncover a second class of site in these polymers, as we should expect since those sequences bears only one binding site (Table I). The results summarized in this table I also show that the presence of sucrose does not alter the specificity to these sequences.

The affinities of drug to the sequence G-C, both in buffer and in the presence of sucrose, are characterized by binding constants with the same order of magnitude to that observed for the strong binding site on ct-DNA. It is noteworthy that this sequence is not the most favorable to the drug, and results of spectrophotometric titrations on oligonucleotides carried out by Bailey et al (1993) showed that binding to GC flanked by T and A in the 5' and 3' ends presents binding constant three times higher than that we measured for the sequence GC. Addition of sucrose does not

alter significantly the binding affinity to this polymer in respect to the buffer. Circular dichroism spectra of the complex of Act-D/DNA in the presence of 20% glycerol and 20% sucrose, shown in fig 2, indicates also a very small effect of these solutes on the drug binding to G-C sequence. We come to this conclusion inspecting the small effect on the negative dichroic absorptions of the drug in 450 and 385 nm which characterizes the binding. The same behavior was observed for the sequence poly d(A-C). d(G-T) whose binding constant in the buffer alone or with sucrose (15%) was approximately one fifth of that observed for the G-C sequence, in agreement with Wells and Larson (1971). For the sequence A-T it was not observed binding as followed by optical or circular dichroism spectra, even in the presence of large amount of sucrose.

DETERMINATION OF THE NUMBER OF WATER MOLECULES RELEASED ON THE BINDING

The non covalent binding of a drug or protein to DNA involves in general an entropic contribution due to the release of water molecules from the surfaces that come into contact on the binding. The origin of this entropic contribution is, however, still uncertain, although it has been shown to play an important role on the binding specificity. The equilibrium state in these interactions has been shown to be displaced by the presence of low concentrations of ligands such as salt (Record et al 1978) and protons (Ackers 1991), and in general it can be described by a simple mass law equation (Record (1978):



where L refers to a generic ligand which can be salt or protons. The binding constant can be given by:

$$K = \frac{a_{drugDNA}}{a_{drug}a_{DNA}a_L^{\delta n_L}} = \frac{K_{obs}}{a_L^{\delta n_L}}$$

where a_i means activities, K the thermodynamic constant and K_{obs} the measured constant in the titrations. If the release of water plays a detectable contribution to the free energy of drug binding this equation should also be adequate to describe changes in equilibrium due to the changes in the water activity. Thermodynamically, the activity of water of a solution depends on the number of any other solute molecules dissolved in solution. Thus, it is always possible to study reactions in the presence of some solutes which are excluded from the reactants and products, i.e., which does not interact directly with the compounds of the reaction, and whose contribution is only buffering the water activity. In such cases, the number of water molecules released on the complexation is found by changing $L \leftrightarrow w$ in the linkage relation:

$$\frac{d(\log(K_{obs}))}{d(\log(a_w))} = -\delta n_w$$

This equation provides the change in the number of hydrating water molecules released upon binding, δn_w . This number is found experimentally from the slope on a plot of $\log(K_{obs})$ vs $\log(a_w)$, where K_{obs} is the measured values of binding constants obtained from the Scatchard plots and a_w is the water activity varied with different concentrations of sucrose, sorbitol, glycerol and ethylene glycol as shown in the fig. 2. In these plots we implicitly assumed that the water activity is equal to its molar fraction (X_w). The linear dependence observed in these plots allows to determine δn_w , which represents the difference between the number of solute-excluding water for the drug-DNA complex and the drug and DNA separately. The linear dependence observed in these plots provides, also, evidence to rule out any binding of the co-solvents to DNA or drug. The magnitude of δn_w can be, moreover,

interpreted as a measurement related to the contribution of water molecules to the entropic part of the free energy change.

The experimental results shown in the fig. 3, also shows that the number of solute-excluding water depends on the type of the co-solvent used to induce the osmotic stress. This dependence is linear with partial molar volumes of the co-solvents. Thus the larger is the solute higher is the sensitivity of the free energy change on the chemical potential of water. This kind of effect has been observed in other systems and interpreted as the capability of larger solutes have to exclude larger amounts of water molecules from the surfaces (Parsegian et al 1995, Rau et al 1995).

Our approach to explain the dependence on the solute sizes observed on the free energy changes with the chemical potential of the water takes into account the perturbations on the bulk induced by the presence of the co-solvent. Under this approach the reaction solution could be thought as a two phase system: one phase we will call the DNA phase containing DNA plus drug plus water; the other phase, called the bulk which contains water plus co-solvent. We assume these two phases separated by a semipermeable membrane. Under these conditions the water vapor pressure above the solutions in both phases are in equilibrium. In this way the work necessary to transfer n_w water molecules from the DNA phase to the bulk phase is given by the mixing entropy:

$$\Delta S_{\text{mix}} = R \ln((n_s v_s + n_w v_w) / n_w v_w)$$

where n_i are the mole number and v_i the partial molar volumes and the subscript i refers to water and co-solvent. After some algebraic manipulations this relation can be written as:

$$\Delta S_{\text{mix}} = -R (v_s / v_w) \ln X_w$$

where X_w is the water molar fraction. A plot of the binding free energy versus the mixing entropy for the different co-solvents, fig. 4, shows that the binding free energy increases linearly, and at the same rate, with the mixing or translational entropy to transfer water molecules from DNA phase to the bulk solution containing the co-solvent. Under this assumption the size dependence observed in the fig 3a, was lost.

It is interesting to note that the osmotic sensitivity of the drug binding to polynucleotides is reduced even with the co-solvent that is the most efficient for increase drug complexation to natural DNA. These results seems to suggest, in views of the results of calorimetric titrations on oligonucleotides of Snyder et al (1989) and Bailey et al (1993), that for the sites present in the synthetic polynucleotides, the whole number of water molecules involved in the complexation was already released in the absence of co-solvents, and they are not capable to remove a significant extra amount of water, inducing higher binding levels.

THE COMBINED EFFECT OF WATER AND TEMPERATURE ON THE EQUILIBRIUM BINDING CONSTANT OF ACT-D TO DNA INTERCALATION.

Titration carried out at different temperatures (10, 15, 18 and 25°C) allowed us to calculate the van'tHoff binding enthalpy for the binding of Act-D to DNA in the presence and absence of solute. Our measurements carried out in buffer showed that the complexation is an enthalpically unfavorable process and the enthalpy obtained was $< +1$ kcal/mol, in very good agreement with the calorimetric titrations of actinomycin D to natural DNA obtained by Quadrifoglio et al (1976) and Marky et al (1982). It is important to note that this enthalpy change is that associated to the weak binding site, since in these solution conditions only these kind of sites are probed. The results of Bailey et al (1993) and Snyder et al (1989) on the



thermodynamic of the binding of the actD to oligonucleotides, bearing sequences with different affinities, showed that the enthalpic contribution becomes less favorable for the sequences of higher affinity. These unfavorable enthalpies are compensated, however, by the entropic contribution which becomes more positive with the affinity. It was proposed by these authors that the origin of this large entropic driven force, is the displacement of solvent molecules and ions from the ionic atmosphere around DNA upon complexation. Yet, their results suggest that the binding to each type of site involves the release of a characteristic amount of water to overwhelming the unfavorable enthalpy.

The co-solvent effect on the actD-DNA van t'Hoff were measured at different concentrations of sucrose, the most effective co-solvent, among those we investigated, to induce binding to the stronger sites. The Scatchard plots obtained showed an increase in the binding levels for the stronger sites as temperature decreased and, therefore, an endothermic process. Thus, the presence of this co-solvent, that favors binding at fixed temperature, has another remarkable role: it changes the intercalation exothermic process into endothermic.

The dependence of the van'tHoff enthalpy at different sucrose concentrations, plotted as a function of the logarithm of water molar fraction, is shown in the fig. 5. The binding becomes energetically more favorable as the sucrose concentration increases. This plot shows also that both the binding enthalpy decrease, and the entropy increases, linearly with the logarithm of water activity.

These results shows that the great change in the enthalpy values, induced by the presence of the co-solvent, could be being compensated by the entropy change due to the water release on the complexation to the bulk solution. In this way the stronger site observed only in special conditions for the natural DNA can be related to a site characterized by a highly unfavorable enthalpy, even more exothermic, which would not be accessed in experiments carried in these conditions and in the buffer. Thus, the presence of co-solvents would provide the compensatory entropic contribution needed to yielding the interaction of the drug to the strong

This hypothesis was confirmed by the CD, Electrophoresis experiments reported

binding sites more probable. A plots of ΔH and ΔG vs $T\Delta S$ are shown in the fig. 6, the linear dependence observed in the ΔH vs $T\Delta S$ is an evidence for this compensatory process. The slope calculated in this plot is 1.22, suggesting that the compensation is not complete (Grunwald et al 1994). According to these authors a possible source for the incomplete enthalpy-entropy compensation could be a great variation on the free energy with the entropy due to an increase on the binding affinity. In fact the plot of ΔG vs $T\Delta S$ shown in the fig. 6 shows an appreciable linear change of these two parameters, with a calculated slope of 0.22.

Several authors have suggested at least three sources for the entropic driven force for Act-D intercalation: a) the release of water from the complex, b) the release of ions from the ionic atmosphere of DNA and, c) conformational rearrangements of the drug or of the DNA. The results reported here bring for the first time strong experimental evidences in favor of the role of water on DNA recognition and points to a way to quantitate such entropic contribution on macromolecular reactions.

CONCLUSIONS

Analysis of the effect of sugars, polyols and alcohols on the actinomycin to DNA binding constants shows that the sugars and polyols increase and alcohols decrease the actD affinity to DNA in relation to buffer alone. These effects have been earlier interpreted by us as caused by solvation changes on drug and drug-DNA complex. Following that line of reasoning, there would be a preferential interaction of glycerol with the drug in solution thus unfavoring binding to the nucleic acids. The increase on drug intercalation in the presence of sugar would be promoted by an exclusion of the solute from the drug, favoring intercalation. Thus, we have assumed that there is no effect of these solutes on DNA conformation. This hypothesis was confirmed by the CD. Electrophoresis experiments reported

showed that in general the co-solvent effect on the DNA topology was to relieving the DNA torsional stress, This effect could not explain the difference in the behavior observed for different co-solvents.

Our results with the synthetic polydeoxynucleotides reinforce the interpretation that solutes do not interact with DNA. With the specific sequences for strong and for weak binding, sucrose was not able to induce the appearance of a new binding site. Furthermore, no binding was detected with an A-T sequence even with solutes. Therefore, these solutes are only modulating the energetic of binding through solvation effects.

It is striking that increasing sucrose reveals the strong site for act-D on DNA and have, apparently, a minor effect on the weak site. The possible molecular origin of the effect of sucrose is that its presence in solution impose changes in the energy to transfer water molecules from DNA phase to bulk water and act-D from there to DNA phase relative to pure water. Thus, a significant increase in the binding constant to the strong sites could compensate the fact that they are fewer in the random sequence of calf thymus compared to the large number of weak binding sites in this sequence. Furthermore, the difference in the magnitude of the effect of sucrose between the strong and weak binding sites, could indicate that more water molecules are released when act-D binds to the stronger site. Hence, the drug would have a closer contact with DNA when bound to the strong site than to the weak.

The use of the strategy of probing the water chemical potential as a thermodynamic variable allow us to demonstrate clear and unambiguously that the entropic contribution in the actD to DNA complexation has its origin on the release of the water molecule from the interacting molecules. The method used allows us to quantitate the enthalpy-entropy compensation involved in the complexation studied.



Walls, R. D. & Larson, J. E. (1970) *J. Mol. Biol.* 49, 319-342.

Weissberger, A. (1970) *Techniques of Chemistry*, vol. II, Organic Solvents, Wiley - Interscience, New York.

REFERENCES

Bailey, S. A., Graves, D. E., Rill, R. & Marsch, G. (1993) *Biochemistry* 32, 5881- 5887.

Cavalieri, L. & Nemchin, R. (1964) *Biochem. Biophys. Acta* 87, 641.

Garner, M. & Rau, D.C. (1995) *Embo. J.* 14, 1257-1263.

Gellert, M., Smitt, C, Neville, D. & Fesenfeld, G. (1965) *J.Mol.Biol.* 11, 445-457.

Goodisman, J., Rehfuss, R. Ward, B. & Dabrowiak, J. C. (1992) *Biochemistry* 31, 1046-1058.

Grunwald, E. & Steel, C. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5687-5692.

Ha, J- H., Capp, M.W., Hehenwalter, M.D., Baskerville, M. & Record, M.T. Jr. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 252-264.

Kamitori, S. & Takusagawa, F. (1992) *J. Mol. Biol.* 225, 444 - 456.

Marky, L.A., Snyder, J.G., Remeta, D.P. e Breslauer, K.J. (1983) *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1, 487.

Muller, W. & Crothers, D.M. (1968) *J. Mol. Biol.* 35, 251- 290.

Preiler, R.S., Chen, H.H., Colombo, M.F.,Choe. Y. Short Jr., B.J., & Rau, D.C. (1995) *Biochem.* 34, 14400.

Quadrifoglio, F. Crescenzi, V, (1974) *Biophys. Chem.* 2, 64.

Quadrifoglio, F., Ciana, A. & Crescenzi, V. (1976) *Biopolymers* 15, 595-597.

Record, T. Jr., Anderson, C.F. & Lohman, T. M. (1978) *Quart. Rev. Biophys.*

Record, T.Jr., Ha, J-H & Fisher, M.A. (1991) *Methods in Enzymol.* 208, 291- 343.

Sidorova, N.Y. & Rau, D.C. (1995) *Biopolymers* 35, 377-384.

Snyder, J.G., Hartman, N.G., Déstantoit, B.L., Kennard, O., Remeta, D.P. e Breslauer, K.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3968.

Zhou, N., James, T. L. & Shafer, R. H. (1989) *Biochemistry* 28, 5231-5239.



Wells, R. D. & Larson, J. E. (1970) J. Mol. Biol. 49, 319-342.

Weissberger, A. (1970) "Techniques of Chemistry " vol.II. Organic Solvents, Willey - Interscience, New York.

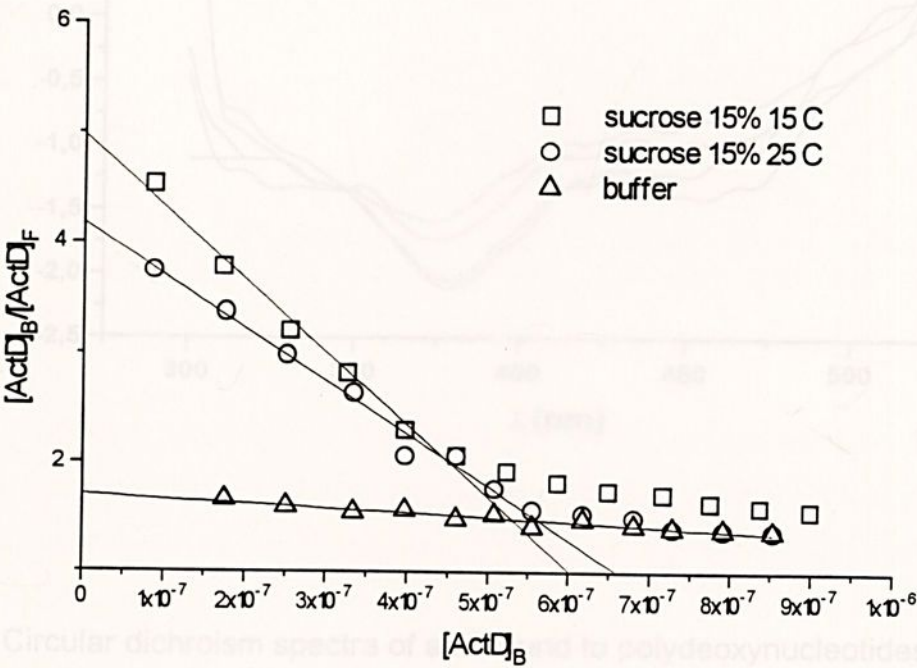


Fig. 2 - Circular dichroism spectra of actinomycin D bound to polydeoxynucleotides: poly(dA-dT) in buffer (—) and 20% sucrose (---); poly(dG-dC) in buffer (---) and 20% sucrose (—).

Fig. 1 Scatchard plots for the actinomycin D binding to DNA in buffer and in 15% sucrose at 15 and 25 °C

polymer	buffer	15% sucrose	15% ethanol
poly d(G-C) ₂	1.8 × 10 ⁻⁵ M ⁻¹	1.5 × 10 ⁻⁵ M ⁻¹	9 × 10 ⁻⁵ M ⁻¹
poly d(A-C).poly d(G-T)	3.6 × 10 ⁻⁵ M ⁻¹	3.7 × 10 ⁻⁵ M ⁻¹	1.6 × 10 ⁻⁵ M ⁻¹
poly d(A-T) ₂	no binding	no binding	no binding

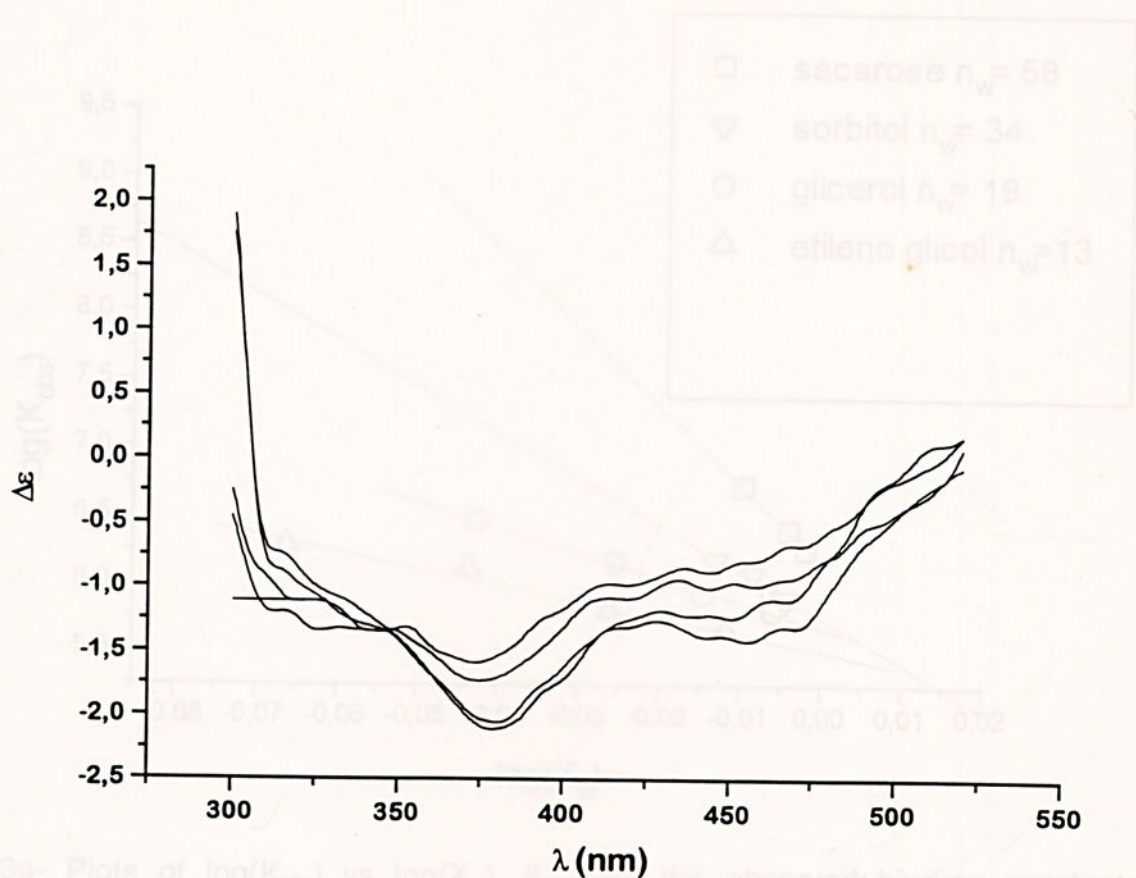


Fig. 3a- Plots of $\log(K_{obs})$ vs $\log(X_w)$ K_{obs} are the observed binding constants, obtained from the slopes of the segments. X_w is the water molar fraction in each titration

Fig. 2 - Circular dichroism spectra of actD bound to polydeoxynucleotides: poly(dA-dT) in buffer (—) and 20% sucrose (-.-.); poly(dG-dC) in buffer (- - -) and 20% sucrose

TABLE I

polymer	buffer	15% sucrose	15% ethanol
poly d(G-C) ₂	$1,6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$	$1,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$	$9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$
poli d(A-C):poli d(G-T)	$3,6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	$3,7 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	$1,6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$
poli d(A-T) ₂	no binding	no binding	no binding

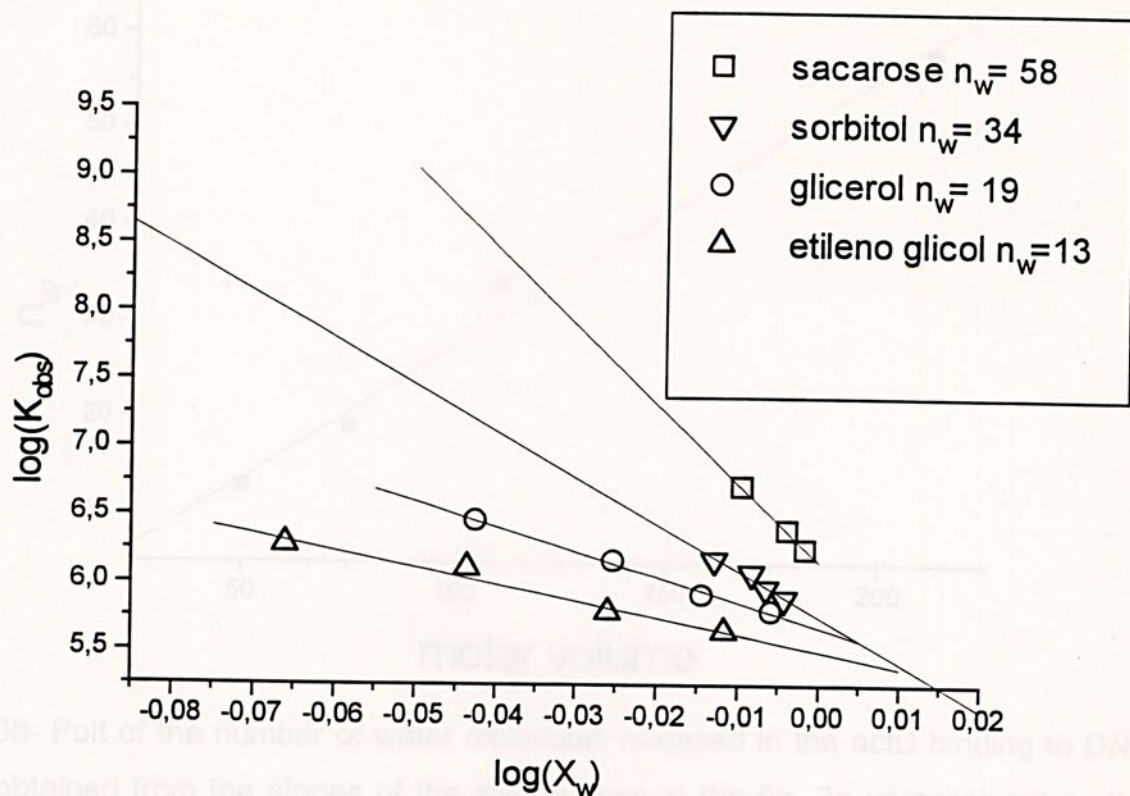


Fig. 3a- Plots of $\log(K_{obs})$ vs $\log(X_w)$. K_{obs} are the observed binding constants, obtained from the slopes of the segments Scatchard plots corresponding to the strong sites for titrations run in different cosolvents. X_w is the water molar fraction in each titration.

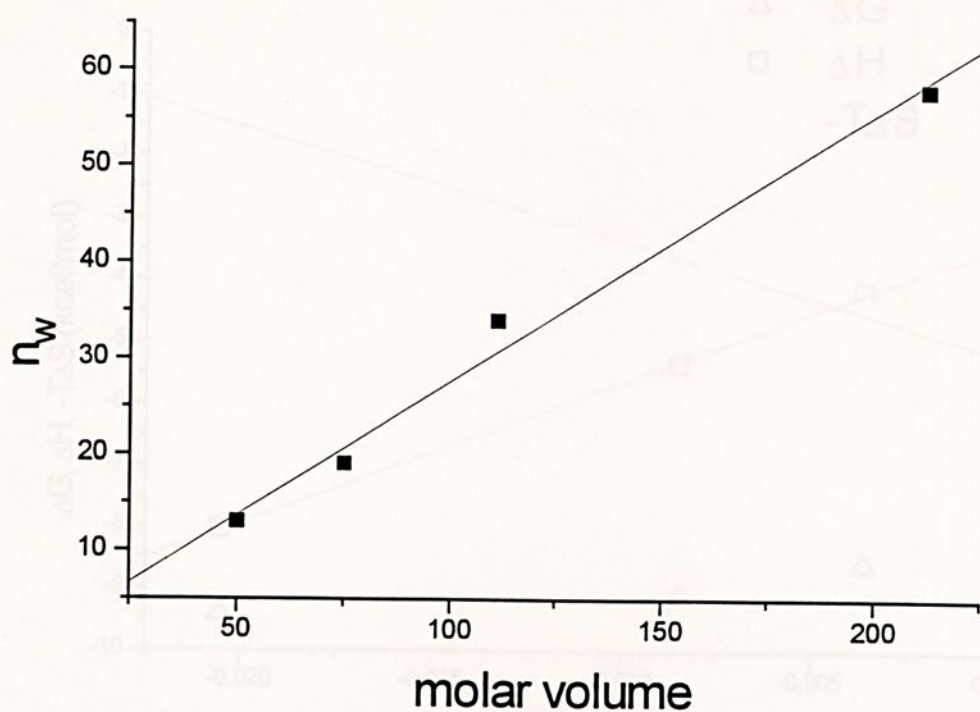


Fig. 3b- Plot of the number of water molecules released in the actD binding to DNA (n_w) obtained from the slopes of the straight lines in the fig. 3a vs cosolvent partial molar volumes.

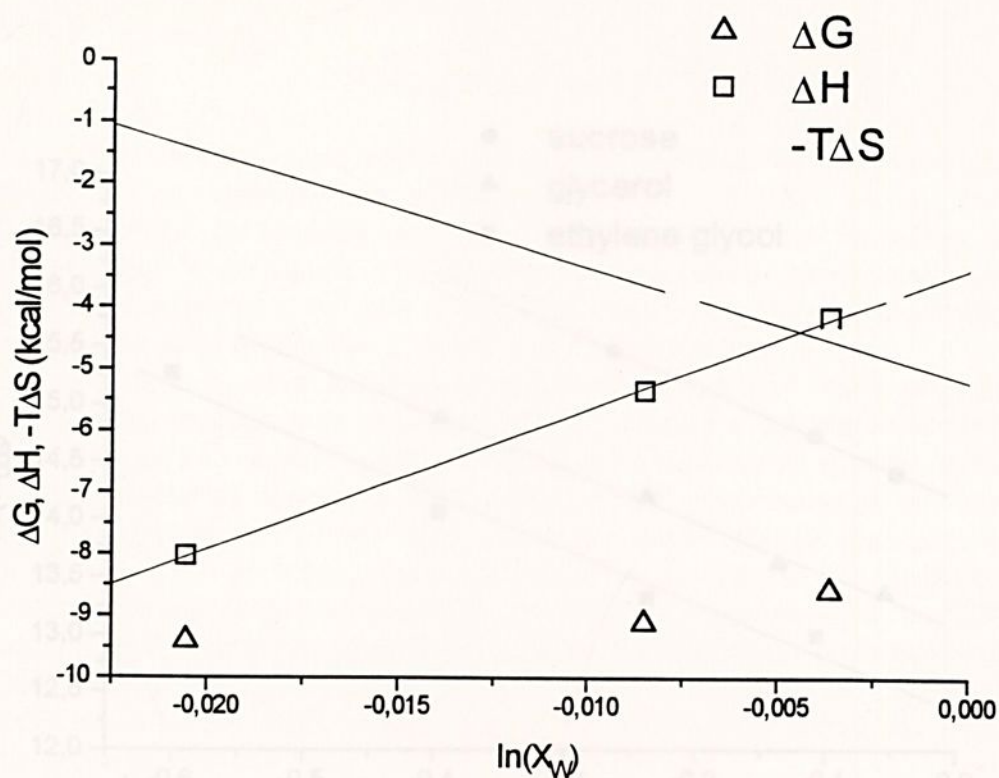


fig. 5- Enthalpy and entropy vs $\ln X_w$ obtained from the vant'Hoff plots of the binding isotherms of the actD - DNA at different temperatures and in different sucrose concentrations.

COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS

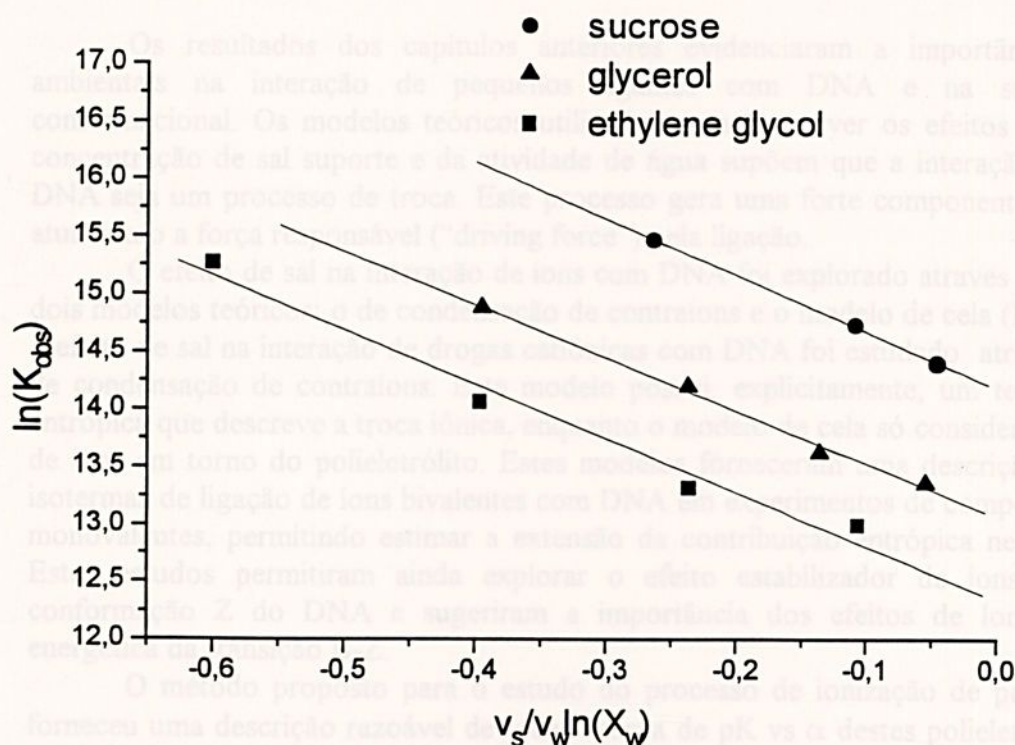


fig. 4 - Plot of the binding free energy ($\ln(K_{obs})$) vs entropy of mixing.

A associação deste método e simulações de Monte Carlo na rede cúbica tem fornecido uma descrição mais adequada deste efeito de longo alcance, apontando perspectivas em duas direções: uma para explorar e compreender as alterações nas características elásticas em biopolímeros, outra na utilização de polipeptídeos, que são polímeros fracos, no estudo do dobramento proteico, pela inclusão de aminoácidos hidrofóbicos intercalados em seqüências de aminoácidos ácidos, como por exemplo pol(glu-ala-glu). A descrição da curva de ionização destes polímeros permitirá avaliar a contribuição energética dos grupos hidrofóbicos na conformação destes polímeros.

A comparação dos modelos de McGhee-von Hippel e Friedman-Manning no estudo da intercalação de drogas catiônicas (daunomicina e adriamicina) com DNA mostraram que a inclusão das contribuições eletrostática e entrópica, devido ao efeito polieletrólítico, nas isotermas de ligação que levam em conta apenas o efeito de exclusão de sítios, fornece uma descrição mais adequada dos processos de ligação. Estes estudos sugeriram a importância do processo de troca de íons na afinidade da droga e na descrição dos processos cooperativos da ligação destas drogas ao DNA. A aplicação deste modelo permitiu a obtenção de valores mais precisos de constantes de ligação e de ocupação destas drogas a várias seqüências de bases, sugerindo a importância de alguns grupos, posicionados nos sulcos da dupla hélice, no reconhecimento molecular.

CAPÍTULO V

COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados dos capítulos anteriores evidenciaram a importância de fatores ambientais na interação de pequenos ligantes com DNA e na sua estabilidade conformacional. Os modelos teóricos utilizados para descrever os efeitos da variação na concentração de sal suporte e da atividade de água supõem que a interação do ligante ao DNA seja um processo de troca. Este processo gera uma forte componente entrópica que atua como a força responsável ("driving force") pela ligação.

O efeito de sal na interação de íons com DNA foi explorado através da aplicação de dois modelos teóricos: o de condensação de contraíons e o modelo de cela (EPB), enquanto o efeito de sal na interação de drogas catiônicas com DNA foi estudado através do modelo de condensação de contraíons. Este modelo possui, explicitamente, um termo de origem entrópica que descreve a troca iônica, enquanto o modelo de cela só considera a distribuição de íons em torno do polieletrólito. Estes modelos forneceram uma descrição razoável das isotermas de ligação de íons bivalentes com DNA em experimentos de competição com íons monovalentes, permitindo estimar a extensão da contribuição entrópica nestas interações. Estes estudos permitiram ainda explorar o efeito estabilizador de íons bivalentes na conformação Z do DNA e sugeriram a importância dos efeitos de longo alcance na energética da transição B-Z.

O método proposto para o estudo do processo de ionização de políácidos fracos forneceu uma descrição razoável de toda a curva de pK vs α destes polieletrólitos, para as quais em geral os modelos polieletrólíticos falham. Este estudo evidenciou a importância das interações eletrostáticas entre grupos carregados na cadeia como origem da mudança conformacional hélice-hélice estendida, sugerindo que estas interações repulsivas atuam no sentido de aliviar tensões elásticas distendendo o polieletrólito. Este efeito elástico de origem eletrostática é comum em ácidos nucleicos.

A associação deste método e simulações de Monte Carlo na rede cúbica tem fornecido uma descrição mais adequada deste efeito de longo alcance, apontando perspectivas em duas direções: uma para explorar e compreender as alterações nas características elásticas em biopolímeros, outra na utilização de polipeptídios, que são políácidos fracos, no estudo do dobramento proteico, pela inclusão de aminoácidos hidrofóbicos intercalados em seqüências de aminoácidos ácidos, como por exemplo poli(glu-ala-glu). A descrição da curva de ionização destes políácidos permitiria avaliar a contribuição energética dos grupos hidrofóbicos na conformação destes polímeros.

A comparação dos modelos de McGhee-von Hippel e Friedman-Manning no estudo da intercalação de drogas catiônicas (daunomicina e adriamicina) com DNA mostraram que a inclusão das contribuições eletrostática e entrópica, devido ao efeito polieletrólítico, nas isotermas de ligação que levam em conta apenas o efeito de exclusão de sítios, fornece uma descrição mais adequada dos processos de ligação. Estes estudos sugeriram a importância do processo de troca droga/íons na afinidade da droga e na descrição dos processos antiooperativos da ligação destas drogas ao DNA. A aplicação deste modelo permitiu a obtenção de valores mais precisos de constantes de ligação e de ocupação destas drogas a várias seqüências de bases, sugerindo a importância de alguns grupos, posicionados nos sulcos da dupla hélice, no reconhecimento molecular.



Os estudos do efeito de alterações na atividade do solvente na ligação de uma droga neutra ao DNA evidenciaram também a importância da contribuição entrópica, no processo de reconhecimento molecular. Estes estudos evidenciaram que esta contribuição tem origem na transferência de moléculas de água das vizinhanças do DNA para a solução, possibilitando o acesso a sítios de ligação mais específicos, que são caracterizados por uma entalpia desfavorável de ligação, sugerindo um papel da água na especificidade e no reconhecimento molecular. Os resultados sugeriram ainda que o efeito deste processo de troca (droga/água) é de compensar esta entalpia desfavorável tornando a ligação exotérmica.

Há evidências que a redução da atividade do solvente altera o estado torcional da dupla hélice, devendo também contribuir no reconhecimento molecular. As variações na energia torcional da dupla hélice, induzidas pela redução na atividade do solvente, sugeriram um papel importante no processo de ligação e de reconhecimento molecular. A utilização de co-solventes, para reduzir a atividade da água, permitiu ainda simular de maneira mais realista o processo de ligação *in vivo*, pois o meio celular é rico em osmólitos, que atuam no sentido de modular as interações que envolvem reconhecimento molecular. Estas contribuições devem, portanto, ser levadas em conta ao se projetar novos fármacos.

2) A interação entre dois ou mais polímeros não desconsiderada.

3) Assume-se a presença de íons (q) como sendo a do solvente puro.

4) Os íons na solução são considerados pontos e parte dos íons se condensam num volume V_c nas vizinhanças do polímero, formando o parâmetro de carga para um valor $1/Z$ (onde Z é a valência dos íons condensados). Estes íons são ditos territorialmente ligados, tendo liberdade de deslocamento no volume V_c .

5) Os íons fora do volume condensado são tratados pela teoria de Debye-Hückel.

A ideia fundamental deste modelo é que os contraíons serão atraídos na direção do polímero sempre que sua energia eletrostática for maior do que a energia cinética. Nesse sentido foi introduzido um parâmetro adimensional ξ , denominado parâmetro de carga, dado por:

$$\xi = \frac{q^2}{ekTb} \quad (1)$$

onde q é a carga do grupo ionizável do polímero, ϵ é a constante dielétrica do solvente, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. Se, numa solução contendo contraíons monovalentes ($Z = 1$), não haverá condensação, pois a energia cinética é superior à eletrostática. Ao aumentar-se ξ , os contraíons se condensarão em torno do polímero, blindando suas cargas. A condensação de íons de alta valência será que a densidade efetiva de cargas:

$$\xi_c = \frac{q^2(1 - \xi_c)}{ekTb} \quad (2)$$

torne-se igual à unidade. Nesta expressão, ξ_c representa a fração de contraíons "ligados" por grupo carregado no polímero ($\theta_c = C_c/C_p$), sendo C_c a concentração de contraíons ligados ao polímero e C_p a concentração molar dos grupos carregados do polímero.

Para uma solução contendo contraíons de valências diferentes a teoria prevê que os contraíons se condensarão segundo $\xi_c = 1/Z_c$, sendo Z_c a valência do íon

APÊNDICE

Neste apêndice são apresentados os dois modelos utilizados na descrição da dupla fita como um polieletrólito, utilizados para estudar a seletividade de ligação de íons ao DNA: o modelo de condensação de contraíons ou modelo de Manning de duas variáveis (Manning, 1978), e o modelo de cela (Poisson-Boltzmann) (Katchalsky, 1971) com as modificações por nós introduzidas na solução da Equação de Poisson-Boltzmann.

MODELO DE CONDENSAÇÃO DE CONTRAÍONS

A teoria de condensação de contraíons desenvolvida por Manning (Manning, 1978) para estudar o efeito do poliíon numa solução iônica, está baseada nas seguintes simplificações:

1) O poliíon é considerado uma linha infinita com densidade linear de carga $\lambda=q/b$, sendo q a carga de cada grupo ionizado do poliíon e b a distância média entre as cargas).

2) A interação entre dois ou mais poliíons são desprezadas.

3) Assume-se a constante dielétrica (ϵ) como sendo a do solvente puro.

4) Os íons na solução são considerados pontuais e parte dos íons se condensam num volume V_p nas vizinhanças do poliíon, reduzindo o parâmetro de cargas para um valor $1/Z$ (onde Z é a valência dos íons condensados). Estes íons são ditos territorialmente ligados, tendo liberdade de deslocamento no volume V_p .

5) Os íons fora da fase condensada são tratados pela teoria de Debye-Hückel.

A idéia fundamental deste modelo é que os contraíons serão atraídos na direção do poliíon sempre que sua energia eletrostática for maior do que a energia cinética. Nesse sentido foi introduzido um parâmetro adimensional ξ , denominado parâmetro de carga, dado por:

$$\xi = \frac{q^2}{\epsilon k T b} \quad (1)$$

onde q é a carga do grupo ionizado do poliíon, ϵ é a constante dielétrica do solvente, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. Se, numa solução contendo contraíons monovalentes, $\xi < 1$ não haverá condensação, pois a energia cinética é superior à eletrostática. Ao contrário, se $\xi > 1$ os contraíons se condensarão em torno do poliíon, blindando suas cargas. A condensação de contraíons prossegue até que a densidade efetiva de cargas:

$$\xi_{ef} = \frac{q^2(1-\theta_1)^2}{\epsilon k T b} = \frac{q_{ef}^2}{\epsilon k T b} \quad (2)$$

torne-se igual à unidade. Nessa expressão θ_1 representa a fração de contraíons "ligados" por grupo carregado no poliíon ($\theta_1 = C^b_1 / C_p$), sendo C^b_1 a concentração de contraíons ligados ao polímero e C_p a concentração molar de grupos carregados do poliíon.

Para uma solução contendo contraíons de valências diferentes a teoria prevê que os contraíons se condensarão enquanto $\xi_{ef} > 1/Z_i$, sendo Z_i a valência do íon



considerado. A teoria de duas variáveis é a extensão deste modelo para uma solução contendo mistura de íons mono e bivalentes. A energia livre total é dada pela soma de duas contribuições: uma eletrostática, de longo alcance, e outra entrópica, relacionada à troca de contraíons entre a fase condensada e a solução. Definindo a energia livre de Gibbs reduzida por grupo carregado do políon como:

$$g = \frac{G}{n_p RT} \quad (3)$$

onde n_p é o número de moles de grupos carregados do políon (grupos fosfato no caso de ácidos nucleicos) e R é a constante universal dos gases, pode-se escrever a energia livre total do sistema como:

$$g = g_{el} + g_{mix} \quad (4)$$

onde g_{el} é a energia livre associada à repulsão eletrostática entre as cargas residuais dos grupos carregados do políon e não compensadas pelos íons condensados. g_{mix} é a energia livre associada à troca de íons livres, "ligados" e moléculas do solvente entre a fase condensada e a solução "bulk". Para um solução polieletrólítica contendo dois tipos de cátions mono e bivalentes, pode-se escrever estas contribuições como:

$$g_{el} = -(1 - \theta_1 - 2\theta_2)^2 \xi \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (5)$$

$$g_{mix} = \theta_1 \ln(\theta_1 / V_p) + \theta_2 \ln(\theta_2 / V_b) + \theta_1 \ln(10^{-3} C_1^f) + (C_2^f / C_p) \ln(10^{-3} C_2^f) + \theta_2 \quad (6)$$

onde $\theta_2 = C_b^2 / C_p$ representa a fração de íons bivalentes "ligados" por grupo fosfato, C_b^2 é a concentração molar de íons bivalentes "ligados" e C_2^f a concentração molar de íons livres.

O parâmetro κ (em cm^{-1}) é o inverso do comprimento de Debye, e é dado por:

$$\kappa^2 = \frac{4\pi q^2 N^a}{10^3 \epsilon kT} \sum_i Z_i^2 C_i \quad (7)$$

onde a soma se estende sobre todas as espécies iônicas, e N^a é o número de Avogadro.

O volume de condensação (V_p), medido em cm^3 por mol de grupo fosfato, na condição de excesso de sal suporte ($C_1 \gg C_p$ e $C_1 \gg C_2$) é dado por:

$$V_p = 10^3 e(1 - \xi^{-1})(\kappa b)^2 / C_1 \quad (8)$$

Minimizando a energia livre total em relação a θ_1 e θ_2 e impondo a condição que a quantidade total de íons bivalentes na solução é fixa, ou seja $dC_2/d\theta_2 = -C_p$, obtêm-se:

$$\ln(10^3 e \theta_1 / C_1 V_p) = -2\xi(1 - \theta_1 - 2\theta_2) \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (9)$$

e

$$\ln(\theta_2 / C_2) = 2\ln(\theta_1 / C_1) - \ln(V_p / 10^3 e) \quad (10)$$

A solução das equações (9) e (10) é obtida iterativamente (por exemplo utilizando o método de Newton-Raphson): para um par de valores de C_1 e C_2 , atribuindo um valor para θ_2 na equação (9) determina-se θ_1 que substituído na equação (10) permite determinar um novo θ_2 e assim sucessivamente, até que se observe convergência.

A constante intrínseca de ligação é dada por:



$$\lim_{\theta_2 \rightarrow 0} (\theta_2 / C_2^f) = K_2(0) \quad (11)$$

onde $K_2(0)$ representa a constante aparente de ligação entre o íon bivalente e o poliíon, e é proporcional ao trabalho por grupo fosfato realizado para deslocar um íon bivalente da solução (livre) para o volume de condensação V_p (ligado).

Na condição de excesso de sal suporte $C_1 \gg C_2$ e C_p a força iônica é dada por $I \approx C_1$ e a dependência de $\ln[K_2(0)]$ com a força iônica I , é dada por:

$$\frac{d[\ln(K_2(0))]}{d[\ln(C_1)]} = -2 \quad (12)$$

Esta relação mostra que o trabalho para trazer um íon bivalente da solução (livre) aumenta com o crescimento da força iônica, pois $K_2(0)$ diminui com o crescimento de C_1 e, mostra também que a "ligação" de um íon bivalente é acompanhada da liberação de dois íons monovalentes.

MODELO DE CELA

O modelo de cela pressupõe que:

- em soluções polieletrólíticas diluídas, o polímero carregado (poliíon), juntamente com seus contraíons ocupam uma região cilíndrica, sendo que o polímero é o centro de sua atmosfera iônica, formada por pequenos íons móveis na solução;
- não haver interação entre as atmosferas de poliíons vizinhos;
- devido à repulsão eletrostática entre os poliíons as macromoléculas estão distribuídas uniformemente na solução, como se fosse um favo de mel, sendo por isto chamado modelo de cela

Cada cela pode ser assumida como sendo um cilindro de altura b e diâmetro $2R_c$, onde b é igual à distância entre as projeções dos grupos carregados sobre o eixo do polímero e, $2R_c$ é igual à distância média entre os eixos dos polímeros (figura 1).

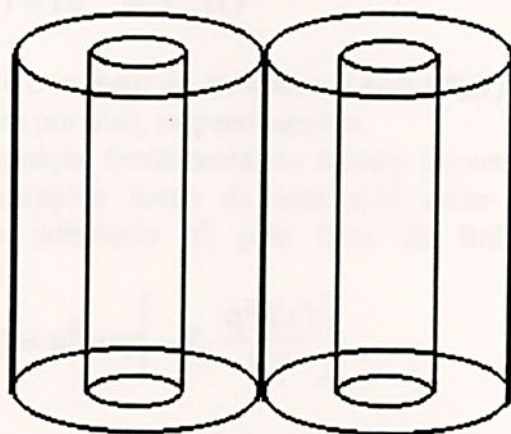


Figura 1: Desenho esquemático para ilustrar o modelo de cela para polieletrólitos lineares (Katchalsky, 1971).

O parâmetro b é obtido a partir da estrutura cristalográfica do polímero; o raio da cela, R_c , é determinado a partir da concentração de monômeros na solução, pois, numa solução contendo N_p grupos carregados por unidade de volume, temos:

$$N_p(\pi R^2 b) = 1 \quad (13)$$

e o raio da cela é:

$$R_c = 1 / (N_p \pi b)^{1/2} \quad (14)$$

A análise convencional do modelo de cela para soluções polieletrólíticas pressupõe também que os íons móveis são puntiformes e que a constante dielétrica é constante em toda a cela e igual a do solvente.

EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN (EPB)

A equação de Poisson que relaciona o potencial eletrostático $\Psi(r)$ do políon em qualquer ponto da cela com a densidade volumétrica de carga produzida pelos íons móveis da solução, escrita em coordenadas cilíndricas (Katchalsky, 1971; Anderson, 1982 e Granot 1983), é:

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left[r \frac{d}{dr} \Psi(r) \right] = -\frac{4\pi}{\epsilon} \rho(r) \quad (15)$$

sendo que a densidade volumétrica de cargas $\rho(r)$ é dada por:

$$\rho(r) = \sum_i n_i(r) Z_i q \quad (16)$$

onde $n_i(r)$ é igual ao número de íons por cm^3 da espécie i em r , Z_i a valência da espécie iônica i e q a carga unitária (do proton). A relação entre $\rho(r)$ e a concentração molar local da espécie i ($C_i(r)$) é dada por:

$$n_i(r) = 10^{-3} N^a C_i(r) \quad (17)$$

nesta equação N^a é o numero de Avogadro e $n_i(r)$ e $C_i(r)$ são expressos em números de íons por cm^3 e em moles por litro, respectivamente.

A suposição fundamental do modelo convencional de PB (Poisson-Boltzmann) é que as concentrações locais de íons $n_i(r)$ estão relacionadas com as respectivas concentrações de referência n_i^0 pelo fator de Boltzmann, envolvendo o potencial eletrostático $\Psi(r)$:

$$n_i(r) = n_i^0 \exp \left[-Z_i \frac{q \Psi(r)}{kT} \right] \quad (18)$$

A concentração de referência n_i^0 representa a concentração de íons na borda da cela ($r = R_c$). Neste ponto adota-se, por questões de simetria, o valor do potencial eletrostático como sendo nulo: $\Psi(R_c) = 0$.

Substituindo as concentrações locais de íons $n_i(r)$ pelas respectivas relações de Boltzmann temos:

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left[r \frac{d}{dr} \Psi \right] = - \frac{4\pi}{\epsilon} \sum_{i=1}^m Z_i n_i^0 e^{-\frac{Z_i q \Psi}{kT}} \quad (19)$$

Definindo o potencial reduzido $y = q\Psi/kT$ e o parâmetro de Debye para força iônica unitária $\kappa_1^2 = \frac{4\pi q^2}{\epsilon kT}$ e procedendo a uma mudança de variável: $x = \kappa_1 r$, pode-se reescrever a EPB como:

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} \left[r \frac{d}{dx} y \right] = - \sum_{i=1}^m Z_i n_i^0 e^{-Z_i y} \quad (20)$$

As duas condições de contornos necessárias para a solução desta equação são:

a) A lei de Gauss aplicada na interface políon-solução ($x_p = \kappa_1 R_p$, onde R_p é o raio do polímero):

$$\left. \frac{d}{dx} y \right|_{x=x_p} = - \frac{2\xi}{x_p} \quad (21)$$

onde $\xi = q^2 / \epsilon kT b$ é conhecido como parâmetro de carga.

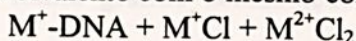
b) A condição de eletroneutralidade da cela implica que:

$$\left. \frac{d}{dx} y \right|_{x=x_c} = 0 \quad (22)$$

onde $x_c = \kappa_1 R_c$.

Este sistema só apresenta solução analítica para o caso de simples diluição do polieletrólito, onde se tem uma única espécie de íon móvel: o contraíon. Entretanto, no caso de um sistema onde há excesso de sal suporte e/ou uma mistura de íons de diferentes valências, a EPB não apresenta solução analítica, e a integração deve ser feita através de métodos numéricos.

É conveniente utilizar um método de integração que reduz o problema de valores de contorno para um problema equivalente de valores iniciais (Bailey, 1968). O método aplicado foi o de Runge-Kutta de 4ª- ordem (Bronson 1980). Primeiramente a equação (20) foi colocada em sua forma mais explícita e específica para tratar o tipo de sistema estudado, que contém uma mistura de sal-de-polímero com o contraíon monovalente, mais excesso de sal suporte sendo que seu cátion é igual ao contraíon, e um sal de cátion bivalente com o mesmo coíon do sal suporte, podendo ser representado por:



para este sistema a equação (20) fica:

$$\frac{d^2}{dx^2} y = - \frac{1}{x} \frac{d}{dx} y - (n_1^0 e^{-y} + 2n_2^0 e^{-2y} - n_3^0 e^y) \quad (23)$$

onde n_1^0 , n_2^0 e representam as concentrações de referência (em número de íons por cm^3) de cátions monovalentes e bivalentes e n_3^0 ânions monovalentes (coíons), que são parâmetros a serem determinados.

A equação (23) é uma equação diferencial de 2ª ordem, e pode ser transformada num sistema de equações diferenciais de 1ª ordem. Fazendo:

$$\begin{aligned} y_1 &= y \\ y_2 &= \frac{d}{dx} y_1 \\ y_3 &= n_1^0 e^{-y_1} \\ y_4 &= n_2^0 e^{-2y_1} \\ y_5 &= n_3^0 e^{y_1} \end{aligned} \quad (24)$$

pode-se transformar a equação (23), que é uma equação diferencial de 2ª ordem, em um sistema de equações diferenciais de 1ª ordem:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} y_1 &= y_2 \\ \frac{d}{dx} y_2 &= -\frac{1}{x} y_2 - (y_3 + 2y_4 - y_5) \end{aligned} \quad (25)$$

que deve satisfazer as seguintes condições de contorno:

$$y_2 = \frac{2\xi}{x_p} \quad \text{em } x=x_p \quad (26a)$$

$$y_1 = y_2 = 0 \quad \text{em } x=x_c \quad (26b)$$

O método de Runge-Kutta implica no conhecimento do valor da função e de sua derivada em um dado ponto. No entanto, apesar da equação (26b) fornecer o valor da função (potencial) e de sua derivada (o campo elétrico) num mesmo ponto (a borda da cela), não é apropriado iniciar a solução a partir deste ponto em direção à borda do polímero.

Nas condições típicas de excesso de sal suporte monovalente utilizados em experimentos de ligação de íons bivalentes, o potencial e o campo elétrico se anulam em distâncias que correspondem a alguns comprimentos de Debye ($r \approx 5/\kappa$).

Estando a borda de célula R_c geralmente a uma distância duas a três vezes maior que esta ($r \approx 5/\kappa$), implica então que a integração da equação (23) deve ser realizada num espaço relativamente grande, onde a função e sua derivada sejam praticamente nulas, resultando numa grande acumulação de erros originários do próprio método numérico utilizado.

Por isso foi utilizada a equação (26a) e através do valor inicial do potencial $y_1(x)$ e o valor do campo $y_2(x)$ no mesmo ponto $x = x_p$, foi possível aplicar o método de Runge-Kutta de 4ª ordem, como descrito adiante.

Este método numérico aplicado para resolver o sistema de equações (24) e (25), com valores iniciais dados por $y_1(x_p)$ e $y_2(x_p)$, consiste em obter os valores de y_1 e y_2 para um ponto $x_p + h$, uma vez conhecidos os valores em x_p , onde h é o passo de integração.

De posse dos valores de $y_1(x_p+h)$ e $y_2(x_p+h)$, pode-se calcular, reaplicando o método, os valores de $y_1(x)$ e $y_2(x)$ para $x = x_p+2h$, e assim sucessivamente.

Desta forma, foi escolhido um valor para o potencial $y_1(x = x_p)$ e integrou-se a equação (23) pelo método de Runge-Kutta. Se o valor $y_1(x_p)$ escolhido não fosse o correto, o campo elétrico e o potencial na borda da cela ($x = x_c$) não seriam nulos.

A solução numérica deste sistema de equações necessitou a especificação de todos os n_i^0 , e do ponto R_b onde o campo elétrico e o potencial foram praticamente nulos. Classicamente, R_b foi calculado como sendo 5 vezes o inverso do parâmetro de Debye, pois R_b não coincide com R_c no caso em que há sal suporte na solução. O parâmetro de Debye foi calculado em função da força iônica I da solução, onde I é definido como:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i |Z_i|^2 C_i \quad (27)$$

Na resolução numérica da EPB para um dado conjunto de valores de ξ , R_p , R_b e n_i^0 , utiliza-se o método de Runge-Kutta de 4ª ordem, iniciando-se a solução da EPB atribuindo um valor inicial ao potencial reduzido na borda do polímero ($y_1(x_p)$). Se após a evolução da solução, conforme descrito anteriormente, o potencial e o campo elétrico não se anularem simultaneamente no ponto $x = x_b$, inicia-se novamente a solução, variando sistematicamente $y_1(x_p)$. O procedimento foi repetido até que o campo e o potencial elétrico se anulassem em $x = x_b$, ou estivessem dentro do intervalo de tolerância desejado (da ordem de 10^{-4}).

Com os valores de $y_1(x)$ obtidos, foi possível calcular o número total de íons (N_i) de cada espécie iônica na cela, pois:

$$N_i = \int_{V_C} n_i(r) dv = \int_{V_C} n_i^0 e^{-Z_i y_1(x)} dv \quad (28)$$

onde $V_c = \pi b R_c^2$ e $dv = 2\pi b r dr$.

N_i pode ser escrito em função das concentrações molares de referência C_i^0 , pois sendo a relação entre C_i^0 e n_i^0 em $r = R_c$ dada pela equação (17), temos que:

$$N_i = \int_{V_C} \frac{N^a}{10^3} C_i^0 e^{-Z_i y_1(x)} dv \quad (29)$$

e, analogamente, podemos obter o valor da concentração de íons na cela, pois:

$$C_i = \frac{1}{V} \int_{V_C} C_i(x) dv \quad (30)$$

onde C_i é a concentração molar na cela e $C_i(x)$ é a concentração molar local de cada espécie i , dada por:

$$C_i(x) = C_i^0 e^{-Z_i y_1(x)} \quad (31)$$

Os valores de N_i obtidos devem satisfazer a condição de eletroneutralidade da cela:

$$\sum_i Z_i N_i = N_p \quad (32)$$



O único parâmetro que pode ser variado na EPB e que em princípio é desconhecido, é n_i^0 . Caso a relação dada pela equação (32) não se verifique, inicia-se a solução da EPB (equação 23) para um novo conjunto de valores de n_i^0 . Depois de encontrar o valor do potencial na superfície, $y_1(x_p)$ e obter a solução da EPB, determina-se o número de íons (equação 28). Se a igualdade da equação (32) não for satisfeita por uma quantidade maior que um certo valor pré-determinado, criteriosamente muda-se os n_i^0 , e retorna-se ao estágio inicial da resolução.

Desta forma, para uma determinada conformação do polímero caracterizada por valores de R_p e b , e para um conjunto de concentrações de polímero (C_p) e de íons suporte na solução, é possível, por meio de métodos iterativos, obter as concentrações de íons livres na solução.

Analizando o método de resolução da EPB utilizado por diversos autores, verifica-se que, conhecidas as concentrações de polímero (e seus parâmetros estruturais b e R_p) e as concentrações médias de sais suportes na solução, é necessário estimar os valores das concentrações livres (ou de referência) dos íons na solução, pois são estas concentrações livres, n_i^0 (ou C_i^0), que determinam o valor de $y_1(x)$. Uma vez determinado o valor de $y_1(x)$, é necessário, ainda, verificar se as concentrações médias obtidas para o conjunto de C_i^0 correspondem aos valores conhecidos. Caso isso não ocorra deve-se iniciar uma nova solução para valores de C_i^0 modificados criteriosamente. Este procedimento é muito difícil de ser implementado para o caso de soluções nas quais tem-se misturas de sais com diferentes valências.

No caso de soluções formadas por sal de polímero e excesso de sal suporte com cátion igual ao contraíon, ié, para o caso de $C_s \geq 10 C_p$, o que implica em supor fonte infinita de íons na borda da cela. Nestas condições a concentração média de sal suporte desejada pode ser obtida variando apropriadamente o valor de C_1^0 , implicando numa solução iterativa entre a equação (23) e a equação (28).

Esta aproximação pode ser utilizada para analisar um sistema contendo polímero e uma mistura de sais suporte mono e bivalentes com o mesmo coíon, com a condição de que $C_s + C_2 \geq 10 C_p$ (onde C_s é a concentração de cátions monovalentes provenientes do sal suporte e C_2 é a concentração de cátions bivalentes). Nesta situação pode-se supor que $C_3^0 = C_1^0 + 2 C_2^0$, onde C_3^0 , C_1^0 e C_2^0 são concentrações de ânions monovalentes e cátions mono e bivalentes de referência, respectivamente. De acordo com esta aproximação, para um determinado conjunto de valores de C_1^0 e C_2^0 (e consequentemente C_3^0) obtém-se o valor de $y_1(x)$. Variando convenientemente os valores de C_1^0 e C_2^0 é possível obter as concentrações médias desejadas. Deve-se notar que, para este sistema, torna-se necessário resolver a EPB iterativamente usando as equações que expressam as concentrações médias dos íons monovalentes e bivalentes. Satisfazer a relação: $C_s + 2C_2 = C_3$ é um bom teste para verificar a validade da solução obtida.

Entretanto, este método é pouco prático quando se deseja aplicá-lo para se obter a isoterma de Scatchard para uma experiência de competição entre os íons bivalentes e monovalentes na ocupação de sítios de um polímero. Neste tipo de experimento é realizada uma titulação da solução de polímero, excesso de sal suporte 1:1 e adição de sal 2:1. No início da titulação as concentrações de sal 2:1 são muito inferiores à concentração de polímero (cerca de duas ordens de grandeza menor) sendo incorreto supor que $C_2 = C_2^0$. Esta igualdade implica em assumir fonte infinita de íons bivalentes, válida somente para o caso em que $C_2 \geq 10 C_p$.

Nesta situação, pode-se iniciar a solução supondo a existência de fonte infinita para os íons monovalentes, ou seja $C_1^0 = C_3^0 = C_3^0$, e atribuir a C_2^0 um valor inferior a C_2 , e após resolver a EPB, verificar se a concentração de íons bivalentes obtida após a integração da equação (28) é igual (dentro de uma margem de tolerância previamente escolhida) à concentração desejada. Caso não seja, modifica-se o valor de referência C_2^0 e reinicia-se a solução da EPB.

Ao obter-se o valor de C_2 desejado, deve-se ainda verificar se a cela é eletricamente neutra, e em caso negativo variar os valores de referência dos cátions positivos e/ou negativos. E assim sucessivamente, para cada nova concentração de íons a ser analisada.

Uma forma alternativa de resolver este sistema consiste em "inverter" a solução do modelo, ou seja, para uma concentração de íons bivalentes de referência calcula-se a concentração de íons bivalentes na solução. Nos experimentos típicos de titulação de íons bivalentes, a concentração de sal suporte (1:1) é de 50 a 100 vezes maior que a concentração de polímero, e o sal bivalente (2:1) é variado desde valores de 100 vezes menores até valores 3 ou 4 vezes maiores que a concentração de polímero. Portanto, durante um experimento destes, a força iônica é praticamente igual à concentração de sal suporte. Nesta situação é possível supor que $C_s = C_1^0$ e $C_3^0 = C_1^0 + 2 C_2^0$, sendo que o número de íons bivalentes ligados é calculado pela seguinte relação:

$$N_2^b = \int_{V_1}^0 n_2^0 e^{-2y_1} dv \quad (33)$$

onde $V_L = \pi b (R_b^2 - R_p^2)$ e R_b é o ponto onde o potencial reduzido é igual à unidade. O número de íons bivalentes livres, será igual a:

$$N_2^f = \int_{V_L}^0 n_2^0 e^{-2y_1} dv \quad (34)$$

onde $V_f = \pi b (R_c^2 - R_b^2)$.

Com estes resultados é possível calcular:

a) a fração de íons bivalentes "ligados" ao polímero θ_2 :

$$\theta_2 = \frac{N_2^b}{N_p} \quad (35)$$

b) a constante de associação aparente no limite de $\theta_2 \rightarrow 0$, $K_2(0)$:

$$\lim_{\theta_2 \rightarrow 0} \left(\frac{N_2^b / N_2^f}{C_p} \right) = K_2(0) \quad (36)$$

c) o coeficiente de atividade aparente γ_2 :

$$\gamma_2 = N_2^f / N_2 \quad (37)$$

onde N_2 é igual ao número total de íons bivalentes em cada cela:

$$N_2 = N_2^b + N_2^f \quad (38)$$

Outra modificação introduzida nas rotinas computacionais utilizadas na solução da EPB, consiste em não impor o ponto onde o potencial e o campo reduzidos sejam praticamente nulos (da ordem de 10^{-4}), sendo que este ponto (R_b) é determinado pelos critérios de convergência adotados, que consistem em descartar a solução da EPB, quando tanto o potencial e o campo sejam menor que um certo valor previamente escolhido, em geral foi utilizado 10^{-4} .

Estas modificações introduzidas na solução da EPB: "inversão" do problema e não imposição do ponto R_b , possibilitaram a simulação rápida e eficiente dos experimentos de competição realizados.

7. BRONSON, R. *Moderns Introduction to Equations Diferenciais*. McGraw-Hill do Brasil.
8. CAVALIERI, L. e NENON, A. *Arquivos Brasileiros de Quimica* 27, 641-652, (1964).
9. CHAIRES, J. B., DATTAGUPTA, N. e CHATHERS, D. M. *Biochemistry* 21, 3913-3940, (1982).
10. CHAIRES, J. B., DATTAGUPTA, N. e CHATHERS, D. M. *Biochemistry* 22, 284-292, (1983).
11. CHAIRES, J. B., FOX, K. A., HENDERA, J. A., BRITT, M. e WARING, M. J. *Biochemistry* 26, 8227-8236, (1987).
12. CIEPLAK, P., KAO, J. W., UNKLESWORTH, P. D. J. e KODERMAN, P. A. *Biopolymers* 29, 717-727, (1990).
13. COLOMBO, M. F., RAI, D. C. e PARSEGGIAN, V. A. *Science*, 255, 651-659, (1992).
14. COVIEL, U. D. S. "Estudo de Interação de Actinomicina D com Ácido Desoxirribonucleico e em Efeito na Atividade da Topoisomerase I", dissertação de mestrado - UNICAMP - UNESP, (1993).
15. FRANK-KAMENETSKII, M. D. "Unzipping DNA" VCH Publishers Inc. New York, (1975).
16. FRIEDMAN, R. A. e MANNING, G. S. *Biopolymers* 23, 2671-2714, (1984).
17. GARNER, M. F. RAI, D. C., KAO, J. W. *Biopolymers* 14, 1237-1261, (1991).
18. GELLERT, M., SMITH, C., NEVILLE, D. e HESSENFELD, G. *J. Mol. Biol.* 11, 443-457, (1965).
19. GOODMAN, J., RUFFUS, R., WARD, B. e DABROWSKI, J. C. *Biochemistry* 31, 1046-1058, (1992).
20. GRANOT, I. - *Biopolymers*, 22, 1831, (1983).
21. GRUNWALD, E. e STEEL, C. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 3687-3692, (1990).
22. HAGERMAN, P. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 285-286, (1988).
23. HALE, P. W. e PASS, G. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 78(1), 283-287, (1982).
24. HANLON, S., BRIDING, S., WU, T. T. e WALSH, B. *Biochemistry* 14, 1648-1660, (1975).
25. JAIN, S. C., TSAI, C.-C., WU, H. W. *J. Mol. Biol.* 114, 319-331, (1977).
26. KAMITORI, S. e TAKESAWA, F. *J. Am. Biol.* 223, 444-456, (1992).
27. KATCHASLKY, A. - *Proc. Appl. Chem.* 26, 327, (1971).
28. KELLER, W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4876-4880, (1975).
29. KOHLAN, K. S. e ACKERS, G. *Biochemistry* 30, 7812-7827, (1991).
30. LIU, L. F. "DNA Topoisomerases Biochemistry and Molecular Biology" (1994).
31. MANNING, G. S. "Linking laws for the equilibrium and transport properties and polyelectrolyte solutions" em *Polyelectrolytes of Biology*, Dordrecht, Holland Reidel (1974).
32. MANNING, G. S. - *Quart. Rev. Biophys.* 11, 179 (1978).
33. MANNING, G. S. *Biopolymers* 20, 2337-2356, (1981).
34. MANNING, G. S. *Biopolymers* 23, 1529-1542, (1988).
35. MANNING, G. S. *J. Chem. Phys.* 31, 824-833, (1969).
36. MANNING, G. S. *J. Phys. Chem.* 75, 282-285, (1971).
37. MANNING, G. S. *Quart. Rev. Biophys.* 11, 179-246, (1978).
38. MARK, L. A., SNYDER, J. G., REMITA, D. F. e BRESLAUER, K. J. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1, 487-507, (1983).
39. MARK, L. A., SNYDER, J. G., REMITA, D. F. e BRESLAUER, K. J. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1, 487-507, (1983).
40. McIlroy, J. D. e von HIPPEL, P. H. *J. Mol. Biol.* 25, 469-490, (1974).



REFERÊNCIAS

1. ANDERSON, P. e BAUER, W. *Biochemistry* **17**, 594-601, (1978).
2. ANDERSON, G.F. & RECORD Jr, T. - *Ann Rev. Phys. Chem.* **33**, 191, (1982).
3. BAILEY, P.B. SHAMPINE, I.F. & WOLTMAN, P.E. Nonlinear Two Point Boundary Value Problem. Academic Press, New York, 1968.
4. BATES e MAXWELL "DNA Topology" IRL Press
5. BECQUET, R. J. e ROSSKY, P. J. *J. Phys. Chem.* **92**, 3504-3612, (1988).
6. BLEAM, M. L., ANDERSON, C. F. e Record, M. T. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3085-3089, (1980).
7. BRONSON, R. Moderna Introdução às Equações Diferenciais. McGraw-Hill do Brasil.
8. CAVALIERI, L. e NENCHIN, R. *Biochem. Biophys. Acta* **87**, 641-652, (1964).
9. CHAIRES, J. B., DATTA GUPTA, N. E CROTHERS, D. M. *Biochemistry* **21**, 3933-3940, (1982).
10. CHAIRES, J. B., DATTA GUPTA, N. E CROTHERS, D. M. *Biochemistry* **22**, 284-292, (1983).
11. CHAIRES, J. B., FOX, K. R., HERRERA, J. E., BRITT, M. e WARING, M. J. *Biochemistry* **26**, 8227-8236, (1987).
12. CIEPLAK, P., RAO, S. N., GROOTENHITS, P. D. J. E KOHLMAN, P. A. *Biopolymers* **29**, 717-727, (1990).
13. COLOMBO, M. F., RAU, D. C. E PARSEGAN, V. A. *Science*, **256**, 655-659, (1992).
14. COVISSi, U. D. S. "Estudo da Interação da Actinomicina D com Ácido Desoxirribonucleico e seu Efeito na Atividades da Topoisomerase I", dissertação de mestrado - IBILCE -UNESP, (1993).
15. FRANK-KAMENETSKII, M. D. "Unraveling DNA" VCH Publishers Inc. New York, (1993).
16. FRIEDMAN, R. A. E MANNING. G. S. *Biopolymers* **23**, 2671-2714, (1984).
17. GARNER, M E RAU, D.C. *EMBO J.* **14**, 1257-1263, (1995).
18. GELLERT, M., SMITT, C., NEVILLE, D. E FESENFELD, G. *J. Mol. Biol.* **11**, 445-457, (1965).
19. GOODISMAN, J., REHFUSS, R., WARD, B. E DABROWIAK, J. C. *Biochemistry* **31**, 1046-1058, (1992).
20. GRANOT, J. - *Biopolymers*, **22**, 1831, (1983).
21. GRUNWALD, E. E STEEL, C. J. *Am. Chem. Soc.* **117**, 5687-5692, (1995).
22. HAGERMAN, P. J. *Ann. Rev. Biophys. Biophysical Chem.* **17**, 265-286, (1988).
23. HALES, P.W. E PASS, G. J. *Chem. Soc., Faraday Trans.*, **78**(1), 283-287 (1982).
24. HANLON, S., BRODNO, S., WU, T. T. E WOLF, B. *Biochemistry* **14**, 1648-1660, (1975).
25. JAIN, S. C., TSAI, C.-C., SOBEL, H. M. *J. Mol. Biol.* **114**, 319-331, (1977).
26. KAMITORI, S. E TAKUSAGAWA, F. *J. Mol. Biol.* **225**, 444-456, (1992).
27. KATCHASLKY, A. - *Pure Appl. Chem.* **26**, 327, (1971).
28. KELLER, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4876-4880, (1975).
29. KOBLAN, K. S. E ACKERS, G. *Biochemistry* **30**, 7822-7827, (1991).
30. LIU, L. F. "DNA Topoisomerases Biochemistry and Molecular Biology" (1994)
31. MANNING, G. S. "Limiting laws for the equilibrium and transport properties and polyelectrolyte solutions" em *Polyelectrolytes* ed. E. Sélègny. Dordrecht, Holland Reidel (1974)
32. MANNING, G. S. - *Quart. Rev. Biophys.* **11**, 179 (1978).
33. MANNING, G. S. *Biopolymers* **20**, 2337-2350, (1981).
34. MANNING, G. S. *Biopolymers* **27**, 1529-1542, (1988).
35. MANNING, G. S. *J. Chem. Phys.* **51**, 924-933, (1969).
36. MANNING, G. S. *J. Phys. Chem.* **79**, 282-285, (1975).
37. MANNING, G. S. *Quart. Rev. Biophys.* **11**, 179-246, (1978).
38. MARKI, L.A., SNYDER, J.G., REMETA, D.P. E BRESLAUER, K.J. *J. Biomol. Structure Dyn.* **1**, 487-507, (1983).
39. MARKY, L. A., SNYDER, J. G., REMETA, D. F. E BRESLAUER, K. J. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1**, 487-507, (1983).
40. McGhee, J. D. e von HIPPEL, P. H. *J. Mol. Biol.* **86**, 469-489, (1974).



41. MISRA, V. K., HECHT, J. L., SHARP, K. A., FRIEDMAN, R. A., E HONIG, B. *J. Mol. Biol.* 238, 264-280, (1994).
42. MOORE, M. H., HUNTER, W. N., D'ESTOINTOT, B. L. E KENNARD, O. *J. Mol. Biol.* 206, 693-705, (1989).
43. NEDLE, S. "Drug-DNA Interactions: The Design of New Anti-Cancer Agents by Computer Modelling Methods" in *Theoretical Biochemistry and Molecular Biophysics* eds. D. L. Beveridge e R. Lavery Adenine Press N. York, (1990).
44. NEIDLE, S., PEARL, L. H. E SKELLY, J. V. *Biochem. J.* 243, 1-13, (1987).
45. O'CONNORS, T. R., KANG, D. S. E WELLS, R. D. *J. Biol. Chem.* 261, 13302-13308, (1986).
46. OOSAWA, F. "Polyelectrolytes" Marcel Dekker Publishing. (1971)
47. PABO, C. O. E SAUER, R. T. *Ann. Rev. Biochem.* 61, 1053-, (1992).
48. PAOLETTI, S., CESÀRO, A., CIANA, A., DELBEN, F., MANZINI, G. and CRESCENZI, V. "In Solution Properties of Polysaccharides", D.A. Brandt (Editor), ACS Symposium Series, No. 150, American Chemical Society, Washington, p. 379 (1981).
49. PECK, L. J. E WANG, J. C. *Cell*, 40, 129-137, (1985).
50. POHL, F. M. E JOVIN, T. M. *J. Mol. Biol.* 67, 375-396, (1972).
51. POHLE, W. E FLEMMING, J. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 4, 243-250, (1986).
52. PTASHNE, M. "A Genetic Switch Gene Control and Phage λ " Blackwell Scientific Publications & Cell Press - Australia, (1986).
53. QUADRIFOGLIO, F., CIANA, A. E CRESCENZI, V. *Biopolymers* 15, 595-597, (1976).
54. QUADRIFOGLIO, F. E CRESCENZI, V. *Biophys. Chem.* 2, 64-71, (1974).
55. QUIGLEY, G. J., WANG, A. H.J., UGHETTO, G., VAN DER MAREL, G., VAN BOOM, J. H. E RICH, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7204-7208, (1980).
56. RAVEZIN, A. "Footprinting of Nucleic Acid-Protein Complex" Academic Press Inc. San Diego, (1993).
57. RECORD, M. T. JR., ANDERSON, C. F. E LOHMAN, T. M. *Quart. Rev. Biophys.* 11, 103-178, (1978).
58. RECORD, M. T. JR., HA, J.-H. E FISHER, M. A. *Methods in Enzymol.* 208, 291-343, (1991).
59. RECORD, T. JR., ANDERSON, C. F. E LOHMAN, T. M. *Quart. Rev. Biophys.* 11, 103-178, (1978).
60. REMETA, D. F. MUDD, C. P., BERGER, R. L. E BRESLAUER, K. J. *Biochemistry* 30, 9799-9809, (1991).
61. RICH, A., NORDHEIM, A. E WANG, A. H.-J. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 791-846, (1984).
62. SAENGER, W "Principles of Nucleic Acids Structure" Springer-Verlag, N. York, (1984).
63. SHURE, M. E VINOGRAD, J. *Cell* 8, 215-226, (1976).
64. SIDOROVA, N. Y. E RAU, D. C. *Biopolymers* 35, 377-384, (1995).
65. SINDEN, R. R. "DNA Structure and Function" Academic Press San Diego, (1994).
66. SPOLAR, R. S. E RECORD, T. Jr. *Science* 263, 777-781, (1994).
67. STEITZ, T. *Quart. Rev. Biophys.* 23, 205-280, (1990).
68. VOLOGODISKII, A. "Topology and Physics of Circular DNA" CRC Press-Boca Raton, (1992).
69. WANG, A. H.-J., QUIGLEY, G. J., KOLPAK, F. J., CRAWFORD, J. L., VAN BOOM, J. H., VAN DER MAREL, G. E RICH, A. *Nature* 282, 680-686, (1979).
70. WANG, J. C. E GIAEVER, G. N. *Science* 240, 300-304, (1988).
71. WARING, M. J. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 159-192, (1981).
72. WARTELL, R. M., KLYNIK, J., HILLEN, W. E WELLS, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 29, 2549-2553, (1982).
73. WU, H. E CROTHERS, D. M. *Nature*, 308, 509-513, (1984).
74. YOON, C., PRIVE, G. G., GOODSSELL, D. S. E DICKERSON, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6332-6336, (1988).
75. ZHOU, N. JAMES, T. L. E SHAFER, R. H. *Biochemistry* 28, 5231-5239, (1989).



