

COMPETENCIA ENTRE DISTINTOS CONTRAIONES EN SOLUCIÓN CON ADN-B Y OTROS POLINUCLEÓTIDOS

M. E. Villegas*, S. B. Casal* y J. C. Benegas**

*Departamento de Física, Instituto de Matemática Aplicada San Luis (IMASL),
Facultad de Ciencias Físicas Matemática y Naturales, Universidad Nacional de San Luis,
Ejército de los Andes 950, (5700) San Luis.*

Resultados experimentales muestran que el ADN y otros polinucleótidos en solución tienen distintos grados de preferencia hacia los contraiones de las sales simples presentes. En este trabajo generalizamos el modelo desarrollado por Paoletti & al. basado en la teoría de condensación de contraiones, con el objeto de tener en cuenta las afinidades iónicas en dos sistemas: a) ADN-B en una solución con mezcla de sales 1:1 y b) distintas estructuras de polinucleótidos frente a la misma solución conteniendo sales 1:1 y 1:2. Los resultados son confrontados con los cálculos obtenidos mediante otros métodos teóricos y con los datos experimentales. Obtenemos un muy buen acuerdo con éstos últimos y algunas diferencias con resultados obtenidos por resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann y simulación de Monte Carlo, sobre todo a bajas concentraciones. El modelo propuesto se muestra adecuado para tener en cuenta las afinidades existentes entre las distintas estructuras y los diferentes iones de las sales estudiadas.

Various experimental results show that DNA and other polynucleotides in solution exhibit different degrees of affinity with counterions of the simple 1:1 and 1:2 salts. In this paper we extend the polyelectrolytic model of counterion condensation (Paoletti & al.) to take into account counterion-polyelectrolyte affinity. Two different solutions systems are considered: a) DNA-B with two 1:1 salts of different counterions and b) different polynucleotides with the same pair of 1:1 and 1:2 salts. The results of the model are in good agreement with experimental results and show some differences with previous theoretical calculations using Poisson-Boltzmann and Monte Carlo simulation.

I. INTRODUCCIÓN

Un polielectrolito es una cadena polimérica que tiene grupos ionizables regularmente distribuidos sobre ella. Las interacciones electrostáticas entre estos grupos cargados entre sí y con los distintos iones y moléculas polarizables de la solución juegan un rol importante en las propiedades termodinámicas de la solución y sobre la conformación, flexibilidad y estado de ligadura del polielectrolito, los cuales a veces determinan o condicionan su rol biológico.

El ADN, como otros polinucleótidos similares, se comporta en solución acuosa, como polielectrolito de alta densidad de carga, y en solución con sales de diferentes contraiones, exhibe distintos grados de preferencia por cada uno de ellos.

Dada la importancia biológica de estos polielectrolitos se han realizado en distintos laboratorios un amplio espectro de experimentos, y se han

desarrollado paralelamente diversos modelos teóricos para su análisis. Dentro de estos últimos los más utilizados son los cálculos según la ecuación de Poisson-Boltzmann, la simulación de Monte Carlo y el modelo de Condensación de Contraiones. Nosotros hemos generalizado la teoría de condensación de contraiones (CC) desarrollada originalmente por Manning¹, (con las posteriores modificaciones de Cesàro & al.,² y Paoletti & al.,³⁻⁴ con el fin de tener en cuenta esta afinidad.

En el presente trabajo estudiamos una solución del ADN-B con distintos contraiones monovalentes, también el comportamiento de distintas estructuras de polinucleótidos en una mezcla de sales con iones Ca^{2+} y Na^+ .

Los valores numéricos obtenidos por este modelo son confrontados con datos experimentales de diversos autores y también con los cálculos obtenidos mediante la resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann y de la simulación de Monte-Carlo.

(*) Becario de iniciación. FCFM y N-UNSL

(**) Carrera de investigador CONICET.

II. MODELO

Siguiendo la teoría original de Manning¹ para polielectrolitos lineales, éste es idealizado como una cadena infinita de cargas puntuales separadas una distancia b , que es la proyección sobre el eje del polímero de la distancia real entre dos cargas consecutivas. Con b se define el *parámetro densidad de carga*, ξ , característico de la teoría como:

$$\xi = \frac{q^2}{\epsilon \kappa_B T b} \quad (1)$$

donde q es la carga electrónica, ϵ la constante dieléctrica del medio (supuesta constante), κ_B la constante de Boltzmann y T la temperatura.

Cuando la densidad de carga supera el valor crítico ξ_c el modelo predice que parte de los iones de carga opuesta (contraiones) son retenidos cerca del macroion, llamándoseles *contraiones condensados o ligados territorialmente*, estos iones están deslocalizados dentro de un *volumen de condensación*, V_p , sin sufrir ligadura química con los grupos cargados del polímero. Por ello es también llamado modelo de dos estados: condensados y libres.

La fracción de contraiones condensados y el volumen de condensación son calculados minimizando simultáneamente la energía libre total reducida respecto de la fracción total de iones condensados (por unidad de carga polimérica) r y de la fracción de esta carga condensada que corresponde a una de las especies (supuesta independiente), x . Se impone además la condición de dilución infinita, como es usual en esta teoría.

II.1. CÁLCULO DE LA ENERGÍA LIBRE TOTAL REDUCIDA

La energía libre total reducida molar en exceso de un sistema compuesto por el polielectrolito, a una concentración C_p , cuyos grupos ionizables tienen valencia $z_p = 1$ y dos sales simples con contraiones de valencias z_i y z_j y coiones de valencia unitaria, se puede considerar compuesta por tres contribuciones principales:

(i) Un término puramente electrostático¹

$$g_{el} = -\xi \left(\frac{q_{ef}}{q} \right)^2 \ln [1 - \exp(-\kappa b)] \quad (2)$$

$$\kappa^2 = \frac{4\pi N_A q^2}{D \kappa_B T 10^3} \sum_{i=1}^s C_i z_i^2; \quad (3)$$

donde $[C_i] = \frac{\text{mol}}{\text{litro}}$ es la concentración de la especie i -ésima de iones, N_A es el número de Avogadro y q_{ef} es la carga efectiva de cada sitio ionizable dada por:

$$q_{ef} = q(1 - r_i z_i - r_j z_j) \quad (4)$$

κ es la constante de Debye-Hückel.

(ii) Una energía libre de mezcla de naturaleza entrópica^{3,4}, originada en la condensación de contraiones, y que tiene contribuciones de los contraiones i y j , condensados y libres, de los coiones y del solvente.

$$g_{mez} = g_i^{cond} + g_i^{lib} + g_j^{cond} + g_j^{lib} + g_{coiones} + g_{solv} \quad (5)$$

(iii) Un término que toma en cuenta las interacciones específicas entre el polion y los distintos contraiones.

$$g_{esp} = g_{0e} r_j \quad (6)$$

Este término específico considera, (mediante una constante de especificidad relativa g_{0e} , las interacciones no tenidas en cuenta en las contribuciones electrostáticas y entrópicas y que pueden existir entre el polion y los distintos contraiones presentes en la solución, (efectos estéricos entre el ion hidratado y el polielectrolito a analizar, y de la compatibilidad entre la estructura del polímero y el contraion, etc.). Suponemos que esta interacción específica es de corto alcance manifestandose solo para aquellos contraiones contenidos en V_p y no implica interacción del tipo de ligadura química.

El modelo será notado como *CCE* (condensación de contraiones con efectos específicos).

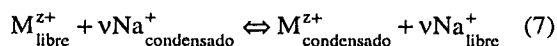
III. APLICACIONES

III.1 PARTE I: Análisis de competencia y especificidad en ADN-B frente a distintos contraiones monovalentes

III. 1.1. CÁLCULO DE COEFICIENTES

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con el modelo aquí presentado con datos experimentales y de otras teorías, consideramos que el

proceso de intercambio entre un catión de valencia z , M^{z+} y el catión monovalente Na^+ (elegido por ser uno de los iones más estudiados experimentalmente y de nuestro interés) puede ser expresado como sigue:



En esta ecuación v representa el número de cationes de sodio que han sido desplazados de V_P por la condensación de un catión M^{z+} durante la titulación del polielectrolito v es llamado coeficiente estequiométrico integral o coeficiente de intercambio, y viene dado por:

$$v = \frac{\Delta C_1^{\text{cond}}}{\Delta C_2^{\text{cond}}} = \frac{r_0 C_P - C_1^c}{C_z^c} = \frac{-(r_1 - r_0)}{r - r_1} \quad (8)$$

donde r_0 es la cantidad (fracción en general) de Na^+ condensado al ADN por grupo fosfato en ausencia de M^{z+} , es decir en el punto inicial de la titulación. En estas definiciones hemos representado por C_i^j ($i = 1, z$ y $j = 1, c$) a las concentraciones de los iones de valencia 1 y z , libres y condensados respectivamente y $R_i = C_i / C_P$. C_P es la concentración equivalente de grupos poliméricos cargados.

v puede así ser interpretado como un coeficiente acumulativo que caracteriza el intercambio iónico local.

Con el fin de estudiar las distintas características del proceso de intercambio iónico, también es conveniente definir un parámetro análogo a una constante de equilibrio, que Anderson y colaboradores⁵⁻⁶ han llamado coeficiente de competencia catiónica, y definido como:

$$D = \frac{C_z^l (C_1^c)^v}{C_z^c (C_1^l)^v} = \frac{(R_z - r + r_1)(r_1)^v}{(r - r_1)(R_1 - r_1)^v} \quad (9)$$

Observamos que un menor valor de D corresponde una mayor predisposición a condensar contraiones de valencia z (respecto del Na^+).

III. 1.2. RESULTADOS

Utilizamos los resultados experimentales de Paulsen *et al.*,⁵⁻⁶ que con datos de nmr han estudiado tanto v como D y su dependencia con las concentraciones relativas de iones en la solución. Todos

los cálculos se realizaron a 25°C y con una concentración de polímero $C_P = 0.02$ M, (correspondiente al límite superior del rango típico usado en experimentos de nmr) y para mezclas de sales de Na^+ con otras de contraiones de igual valencia es decir, $z_i = z_j = 1$. Además se ha tomado como es usual para el ADN-B un valor $\xi = 4.2$, asociado a una separación entre cargas $b = 1.7$ Å.

El primer resultado es que r es constante igual a $1/\xi$ (ver Fig. 3), independiente de la especificidad y de la concentración de sal presente, por lo que el coeficiente de intercambio catiónico, v es constante e igual a 1. Esta está de acuerdo con resultados experimentales (y con el concepto de que las interacciones son prioritariamente electrostáticas) pero no con los cálculos de P-B, donde r y v dependen de la concentración de sal.

En cuanto al comportamiento de D , según vemos en la Fig. 1, donde se lo grafica en función de la concentración de una de las sales presentes para distintos valores de g_{0e} , se observa una dependencia del mismo a bajas concentraciones de la sal simple agregada. Los resultados de P-B, y simulación de M-C no muestran esta dependencia.

Por último hicimos los ajustes tomando al coeficiente de especificidad como parámetro y usando los valores experimentales inferidos de nmr⁵⁻⁶, para competición del ion Na^+ con los iones monovalentes que son indicados en la Tabla 1. En esta tabla también se muestran los valores de g_{0e} obtenidos, y el cociente entre los radios de los iones en competencia (indicados con la letra δ). Los cálculos

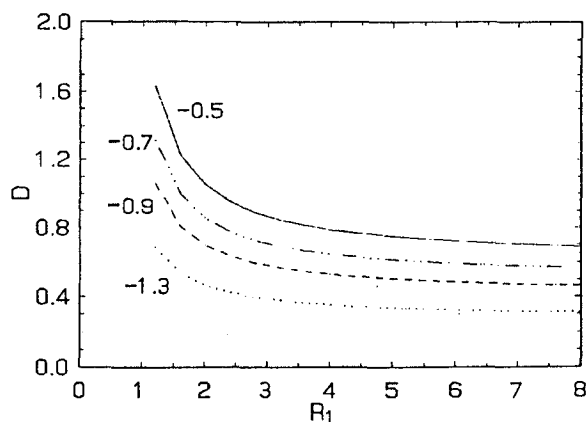


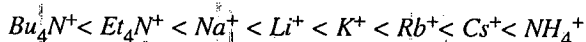
Fig. 1: Dependencia del coeficiente de competencia catiónica D con la concentración relativa de Na^+ agregado ($R_1 = C_{Na} / C_P$), para distintos valores de la constante de especificidad g_{0e} . $C_z = 0.03$ M, $C_P = 0.02$ M, $T = 25^\circ\text{C}$ y $\xi = 4.2$.

	Bu_4N^+	Et_4N^+	Li^+	NH_4^+	K^+	Cs^+	Rb^+
D	~ 20.0	~ 4.2	0.89	0.52	0.84	0.64	0.75
	----	----	± 0.02	± 0.04	± 0.03	± 0.03	± 0.03
g_{0e}	2.5	0.85	- 0.6	- 1.1	- 0.675	- 0.925	- 0.8
	± 0.2	± 0.15	± 0.15	± 0.1	± 0.125	± 0.125	± 0.1
δ_M/δ_{Na}	2.6	1.56	1.30	0.68	0.68	0.65	0.65

Tabla 1.

los fueron realizados con $R_i = R_j = 1.5$ y de forma tal que el rango de g_{0e} con su incerteza incluya al valor experimental desde $R_i = 1.5$ hasta $R_i = 9$. En base a estos cálculos en la Fig. 2 se han representado los valores de $\ln D$ experimentales, los calculados con CCE y también los calculados por P-B y simulación de M-C, éstos últimos obtenidos al variar el radio hidratado del catión competidor dentro del rango factible para los experimentos de nmr, todos en función del cociente de los radios de los iones en competición.

Se ve que CCE, reproduce correctamente el orden de afinidad con el ADN de los iones analizados:



con los valores de g_{0e} mostrados en la Tabla N° 1. P-B y M-C dan en cambio, un comportamiento lineal válido en general pero incorrecto para ciertos iones como NH_4^+ y K^+ . Tampoco reproducen el comportamiento de Cs^+ y Rb^+ que tienen radios hidratados iguales (ver Tabla N° 1) y presentan valores de D distintos. Un caso similar puede verse para los iones Li^+ y K^+ , los cuales tienen radios muy distintos y sin embargo presentan valores de D similares. Ésto permite inferir que los iones K^+ , Li^+ y NH_4^+ tienen comportamientos distintos, ya que además del tamaño debe existir otra razón que determina sus afinidades con el ADN.

En la Fig. 3 se ha representado la fracción de iones condensados de las dos especies en competición, para el caso particular de los iones Et_4N^+/Na^+ y NH_4^+/Na^+ , en iguales condiciones que en la Fig.

1, a fin de ilustrar las predicciones de nuestro modelo. Se observa que mientras la fracción condensada total permanece constante e igual a 0.762, por otro lado el ion Et_4N^+ es condensado mucho menos que el ion NH_4^+ . Observamos también que el ion NH_4^+ es más condensado que el Na^+ solo por debajo de $R_i \cong 1.5$.

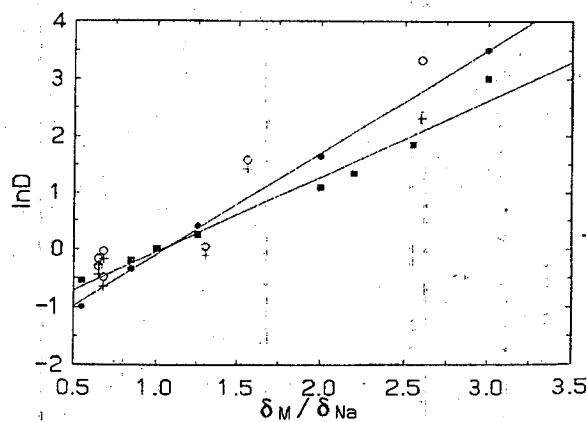


Fig. 2: Dependencia de $\ln D$ con el cociente de los radios de los distintos contraiones respecto al Na, δ_M/δ_{Na} indicados en la tabla N° 1. Datos experimentales (+), cálculos de P-B (\square), simulación de M-C (\bullet) y nuestro modelo (\circ). Para $C_i = C_j = 0.03$ M, $C_p = 0.02$ M, $T = 25^\circ$ C y $\xi = 4.2$.

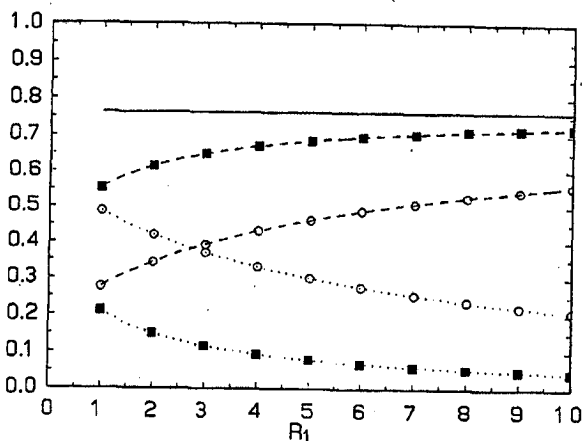


Fig. 3: Fracción de iones condensados de las dos especies en competición, para el caso del par de iones $\text{Et}_4\text{N}^+/\text{Na}^+$ (\square) y $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ (\circ), a iguales condiciones que la Fig. 1. (---) es la fracción condensada de Na^+ , (....) la fracción condensada del ion competidor y (—) la fracción condensada total.

III. 2. PARTE II: Selectividad de distintas estructuras de polinucleótidos, incluyendo ADN-B, frente a una misma mezcla de sal: Ca^{2+} y Na^+ .

En esta parte del trabajo aplicamos el modelo a datos experimentales obtenidos por medio de absorción espectroscópica para dos polinucleótidos⁷ en solución acuosa conteniendo 10 mM de NaCl a 17° C, y variando la concentración de CaCl_2 . Los resultados son presentados como curvas de Scatchard.

Estas curvas, introducidas hace 40 años por G. Scatchard, consisten en graficar $K^2 = C_j^{\text{cond}} / (C_j^{\text{libre}} C_p)$ en función de C_j^{cond} y tienen la ventaja de mostrar en forma inmediata aspectos termodinámicos importantes.

Si el diagrama es cóncavo hacia abajo indica cooperatividad entre los sitios involucrados en la interacción. Si en cambio es cóncavo hacia arriba el comportamiento es opuesto (anticooperatividad).

III. 2.2. RESULTADOS

En la Figs. 4 y 5 se han graficado la curva de Scatchard para dos estructuras secundarias una de tipo B, el Poli (dGdC), y otra de tipo A, correspondiente al Poli (rG): Poli(rC), obtenidas de los datos experimentales de Mancini & al.,⁷ y de cálculos de la ecuación de Poisson-Boltzmann⁷ y del modelo aquí presentado.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de las características de los polinucleótidos utilizados, y los valores de la constante de especificidad que le corresponden según los ajustes realizados. Los datos experimentales muestran diferencias en la interacción del Ca^{2+}

Estructura primaria del polímero	Estructura Secundaria del polímero	ξ	ϵ_{0e}
Poli (rG) : Poli (rC)	A	5.1	0.75
Poli (dGdC)	B	4.2	1.1

Tabla 2.

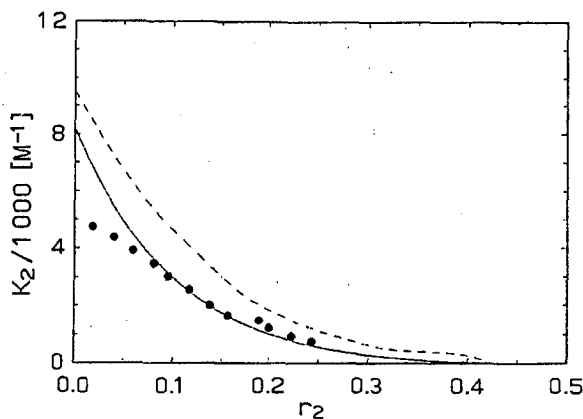


Fig. 4: Curva de Scatchard para una estructura secundaria de tipo B, según datos experimentales (\bullet), cálculos mediante la ecuación de Poisson-Boltzmann (---) y según el modelo aquí presentado (—). Datos de Tabla N° 2.

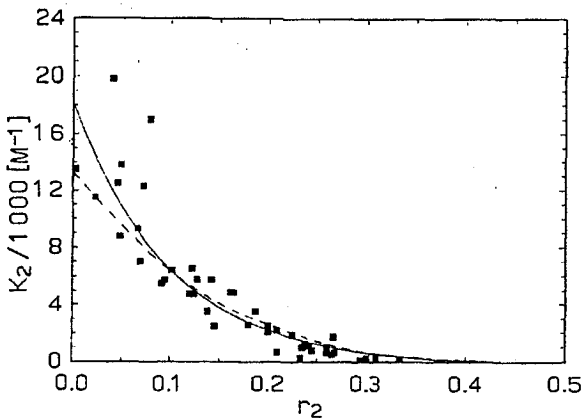


Fig. 5: Curva de Scatchard para una estructura secundaria de tipo A, según datos experimentales (\square), cálculos mediante la ecuación de Poisson-Boltzmann (---) y según el modelo aquí presentado (—). Datos de Tabla N° 2.

con las distintas estructuras de los polinucleótidos, con lo que el modelo se presenta adecuado para hacer un análisis de la preferencia de distintas estructuras ante igual mezcla de sales simples.

IV. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha presentado una extensión del modelo de condensación de contraiones para polielectrolitos lineales en solución (CC) que introduce el efecto de las interacciones específicas poliión-contraión a través de un término de especificidad en la energía libre total del sistema.

El modelo predice correctamente la cantidad r de carga condensada por unidad polimérica. En el caso de competencia entre dos contraiones monovalentes esta cantidad total es la predicha por el modelo original de Manning¹, plenamente confirmada en forma experimental para el caso de un solo tipo de contraiones monovalentes. El modelo también predice que el coeficiente de intercambio es igual a uno. Esto es una consecuencia de la naturaleza electrostática de las interacciones y de la constancia de la fracción total de iones condensados.

En los cálculos de P-B estas dos cantidades varían ligeramente con la concentración de sal^{5,6}. Los resultados también dependen de la definición de "contraion condensado" que se realice en los cálculos de P-B. En este tipo de cálculos este concepto no es natural ni ha sido tomado con un criterio uniforme en la literatura^{5,7} dependiendo los resultados, entre otras cosas de la distancia máxima que puede estar un contraion para ser considerado como "condensado" sobre el polímero (o sea el radio de integración de la densidad radial de contraiones).

La dependencia de D con R_l observada por nuestro modelo a bajas concentraciones de sal parece razonable desde el punto de vista del equilibrio químico y proponemos que sea analizado experi-

mentalmente en detalle. Los resultados de P-B, presentados por Paulsen & al., no muestran dicha dependencia, pero consideramos de importancia hacer un análisis sobre el límite de integración tomado por dichos autores.

Podemos decir finalmente que el modelo ofrece una buena descripción cualitativa dado que predice correctamente el orden de especificidad, pudiendo determinar preferencias relativas entre los contraiones de las distintas sales presentes.

También es importante notar que las diferencias de tamaño parecen dar cuenta de la mayor parte de los efectos específicos encontrados, pero evidentemente se deben incluir otras causas de afinidad para ciertos contraiones, especialmente Li^+ , NH_4^+ y K^+ .

Del análisis de distintos polinucleótidos, vemos que el acuerdo con los valores experimentales es muy bueno y que la estructura secundaria es un factor influyente en la preferencia del polielectrolito por los distintos iones, y es incluido en el parámetro de especificidad g_{oe} . Es nuestro interés hacer un estudio más sistemático sobre este parámetro para profundizar el conocimiento de sus características.

REFERENCIAS

1. Manning, G., J. of Chemical Physics, 51, 924-933 (1969)
2. Cesàro A., Delben F., Flaibani A. y Paoletti S., Carbohydrate Reserch, 161, (1986).
3. Paoletti S., Benegas J., Cesàro A., Manzini G., Fogolari F. y Crescenzi V., Biophys. Chem., 41, 73-80 (1991)
4. S. Paoletti, A. Cesàro, M. A. G. T. van den Hoop, J. Benegas, Anales Asoc. de Física Arg., 4, 408, (1991).
5. Paulsen Mark, Anderson Charles & Record Thomas, Biopolymers, 27, 1249-1265 (1988)
6. Anderson Ch. & Record T., Biophys. Chem., 19: 423-465 (1990).
7. Manzini G., Xodo L., Fogolari F. y Quadrifoglio F., Biopolymers, 30, 325-333 (1990).