

## Trabajo Práctico de Laboratorio 6

### Tema: Ácidos nucleicos

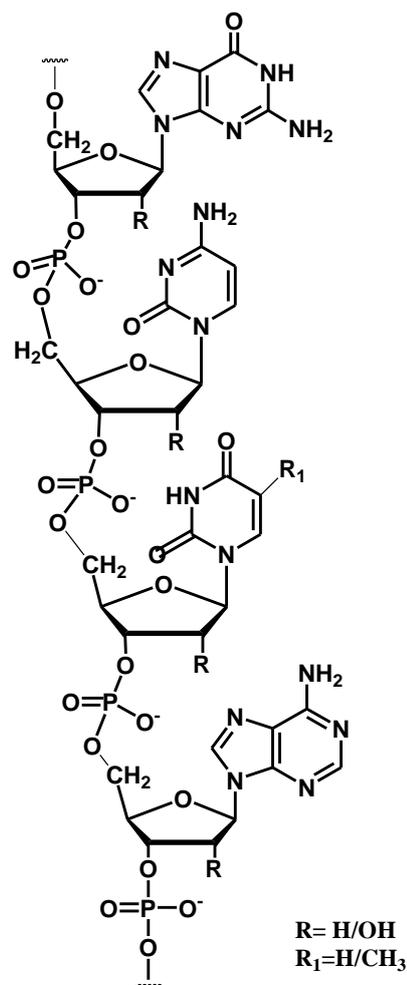
#### Introducción teórica

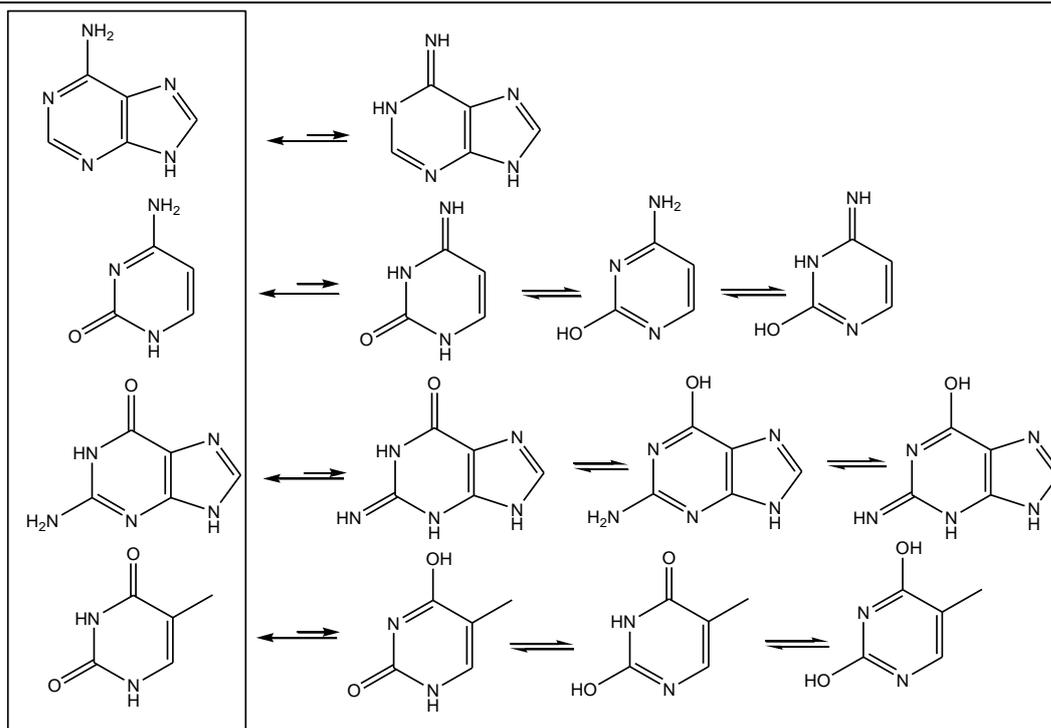
Los nucleótidos se unen entre sí en el ADN y el ARN por enlaces éster fosfato entre el componente de fosfato de un nucleótido y el componente de azúcar del nucleótido siguiente.

Las bases nitrogenadas que constituyen parte del ADN son:

adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Una característica importante de las bases nitrogenadas es su carácter aromático. Esto les confiere la capacidad de absorber luz en la zona ultravioleta del espectro en torno a los 260 nm, lo cual puede aprovecharse para determinar el coeficiente de extinción del ADN y calcular la concentración de los ácidos nucleicos. Otra de sus características es que presentan tautomería o isomería de grupos funcionales. En las bases nitrogenadas se dan dos tipos de tautomerías: tautomería lactama-lactima, donde el hidrógeno migra del nitrógeno al oxígeno del grupo oxo (forma lactama) y viceversa (forma lactima), y tautomería imina-amina primaria, donde el hidrógeno puede estar formando el grupo amina (forma amina primaria) o migrar al nitrógeno adyacente (forma imina). La adenina sólo puede presentar tautomería amina-imina, la timina y el uracilo muestran tautomería doble lactama-lactima, y la guanina y citosina pueden presentar ambas. A

continuación se presentan las formas tautoméricas predominantes para cada base;



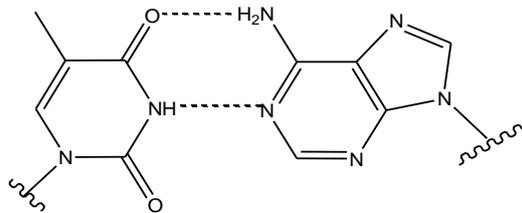


Por otro parte, las bases nitrogenadas presentan suficiente carácter polar como para establecer puentes de hidrógeno. Esto es debido a que tienen átomos electronegativos (nitrógeno y oxígeno) que presentan carga parcial negativa y átomos de hidrógeno con carga parcial positiva, de manera que se forman dipolos que permiten que se formen estos enlaces. Estos puentes se forman respetando una estricta complementariedad: adenina sólo se aparea con timina mediante dos puentes de hidrógeno, y guanina con citosina mediante 3 puentes de hidrógeno. Dado que timina no forma parte del ARN la complementariedad se establece entre adenina y uracilo mediante dos puentes de hidrógeno. La complementariedad de las bases es la clave de la estructura del ADN y tiene importantes implicancias debido a que permite procesos como la replicación del ADN, la transcripción de ADN a ARN y la traducción del ARN en proteínas.

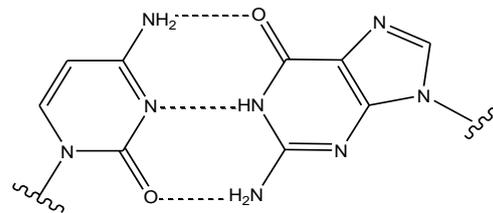
El modelo de estructura en doble hélice del ADN fue propuesto en 1953 por James Watson y Francis Crick en su artículo denominado "*Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid*" que fue publicado en la revista Nature. Este trabajo se vio reconocido con el premio Nobel en 1962, que compartieron con M. H. F. Wilkins y que se les concedió por sus descubrimientos en relación con la estructura molecular de los ácidos nucleicos y su significación para la transmisión de la información en la materia viva. Sin embargo, en rigor Chargaff fue quien descubrió (en 1940) que en el ADN las proporción de purinas era idéntica a la de pirimidinas, lo que se conoce como *equimolecularidad* de las bases ( $[A]=[T]$ ,  $[G]=[C]$ ). Con esta información y junto con los datos de difracción de rayos X proporcionados por Rosalind Franklin

fue que trabajaron Watson y Crick propusieron para proponer el modelo de la doble hélice de ADN.

A valores de pH extremos las bases nitrogenadas se protonan o se ionizan perdiendo la posibilidad de aparearse mediante la misma cantidad de interacciones puente de hidrógeno que lo hacen normalmente a pH fisiológico.

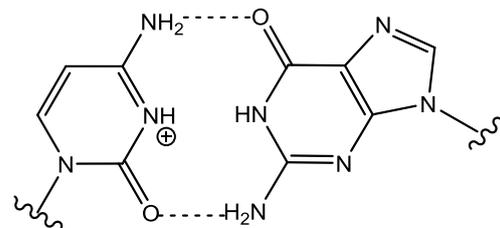
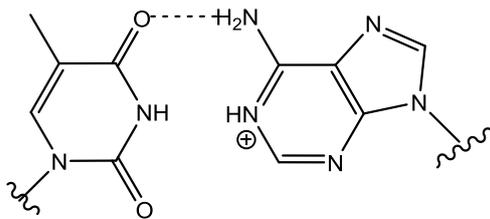


T=A

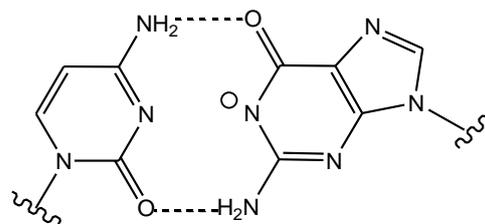
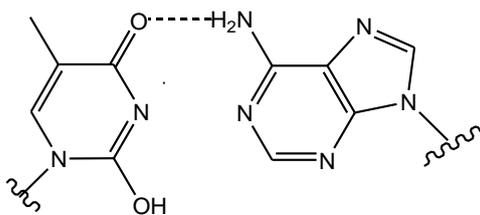


G=C

**Apareamientos a pH 7.0**

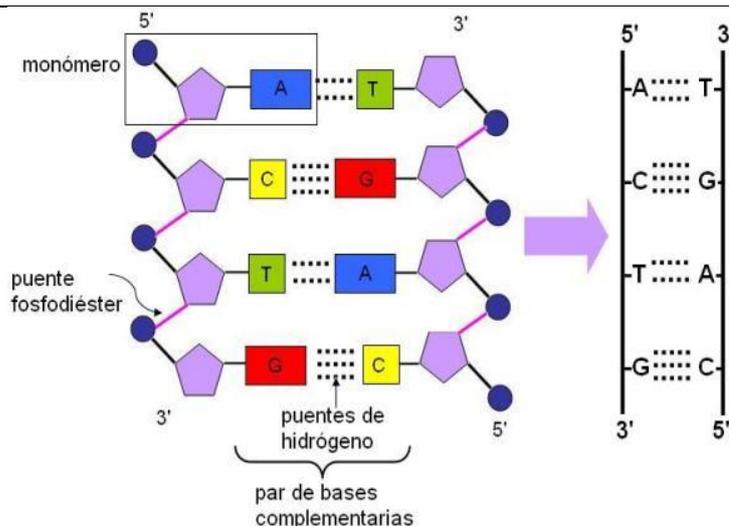


**Apareamientos a pH 3.0**

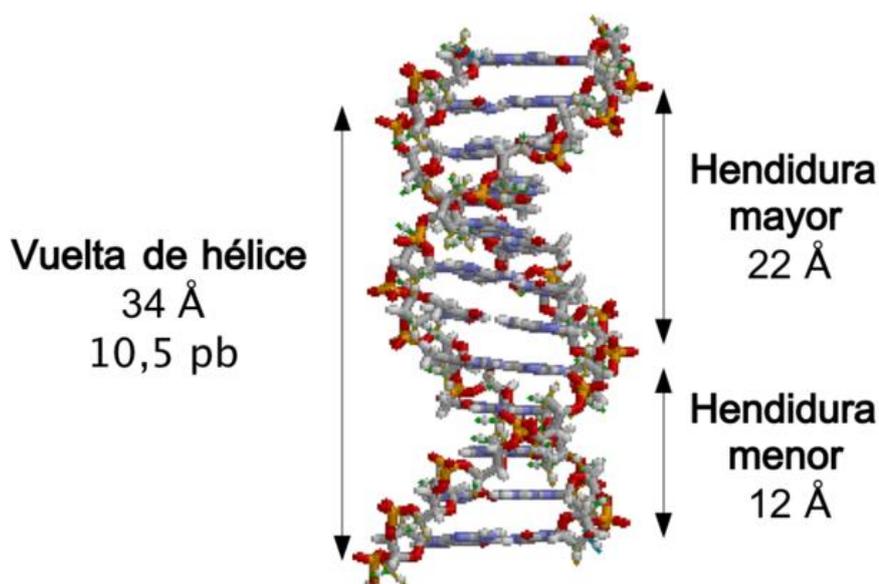


**Apareamientos a pH 11.0**

Los extremos de cada una de las hebras del ADN son denominados 5'-P (fosfato) y 3'-OH (hidroxilo). Las dos cadenas se disponen en direcciones inversas antiparalelas.

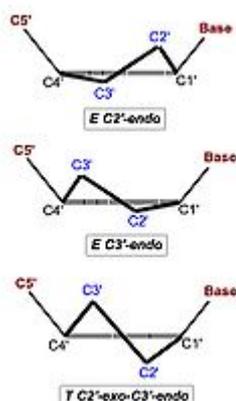


El ADN existe en muchas conformaciones. Sin embargo, en organismos vivos sólo se han observado las conformaciones ADN-A, ADN-B y ADN-Z. La conformación que adopta el ADN depende de su secuencia, la cantidad y dirección de super-enrollamiento que presenta, la presencia de modificaciones químicas en las bases y las condiciones de la solución, tales como la concentración de iones de metales y poliaminas. Estructuralmente las diferencias están basadas en las conformaciones del anillo del azúcar y del enlace *N*-glicosídico. De las tres conformaciones, la forma "B" es la más común en las condiciones existentes en las células. La misma se presenta a continuación;

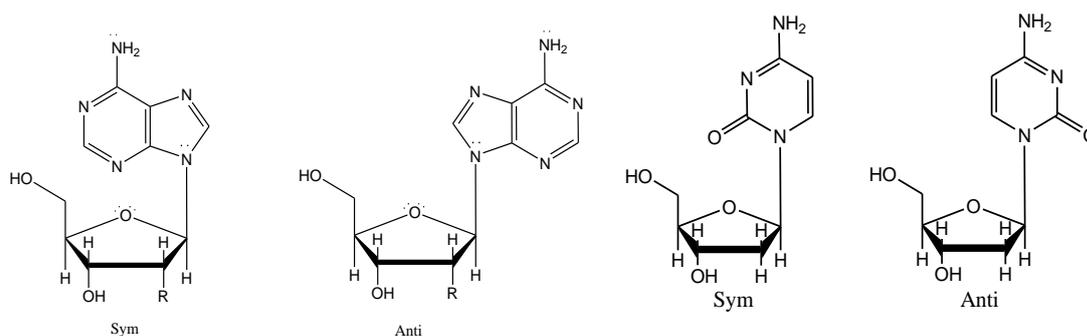


*Posibles conformaciones de la ribosa y/o desoxirribosa:* el azúcar puede presentar forma de "sobre" (forma E: *envelope*) cuando uno de los carbonos queda por fuera del plano, o forma de "media silla" (forma T: *twist*) cuando dos de los carbonos quedan por fuera del plano y en lados opuestos. Además, para cada uno de estos carbonos la conformación puede ser "endo", si el

carbono está dirigido hacia donde lo está el carbono 5', o "exo", si está dirigido hacia el lado opuesto. Los únicos carbonos que pueden dar lugar a estos plegamientos son los carbonos 2' y 3'.



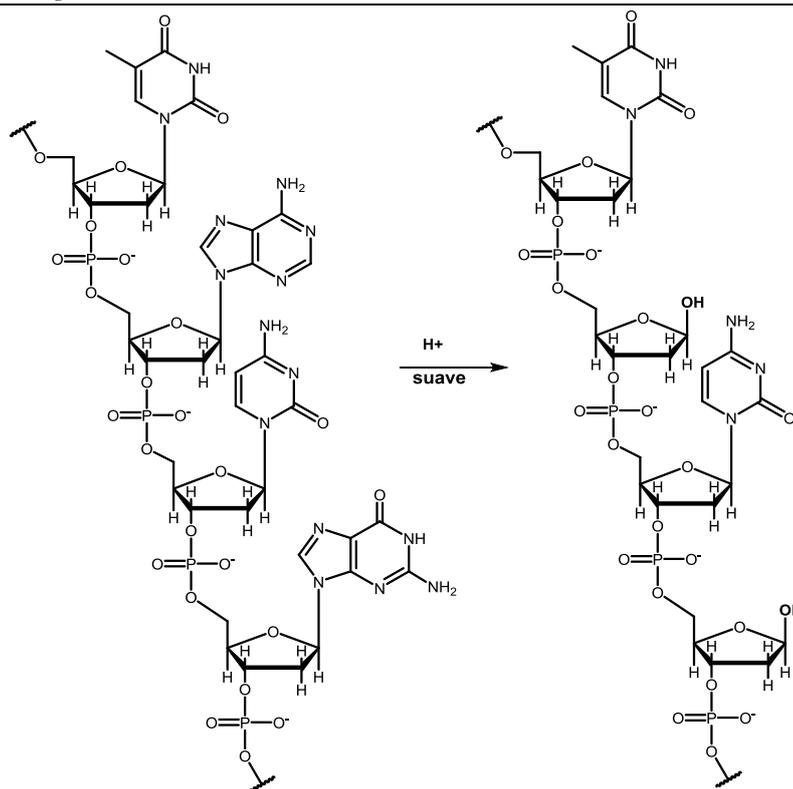
El enlace *N*-glicosídico puede aparecer en la conformación "*anti*", si la parte más voluminosa de la base queda alejada del azúcar, o en la conformación "*syn*" si el plano de la base nitrogenada está dirigido hacia el azúcar. La conformación "*anti*" es más estable que la conformación "*syn*".



En el ADN-B, la conformación que adopta el azúcar es E C2'-endo y *anti* para el enlace *N*-glicosídico de todas las bases.

### Propiedades químicas de los ácidos nucleicos

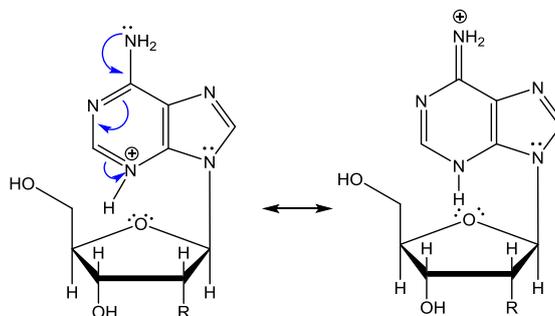
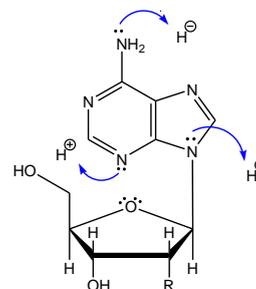
En medio ácido suave es posible obtener los ácidos apurínicos a partir de ADN de acuerdo a la siguiente reacción general:



A través del análisis del mecanismo de reacción es posible racionalizar porqué la unión *N*-glicosídica que se hidroliza corresponde a las bases púricas y porqué sólo se hidrolizan las mismas en ADN y no en ARN en estas condiciones.

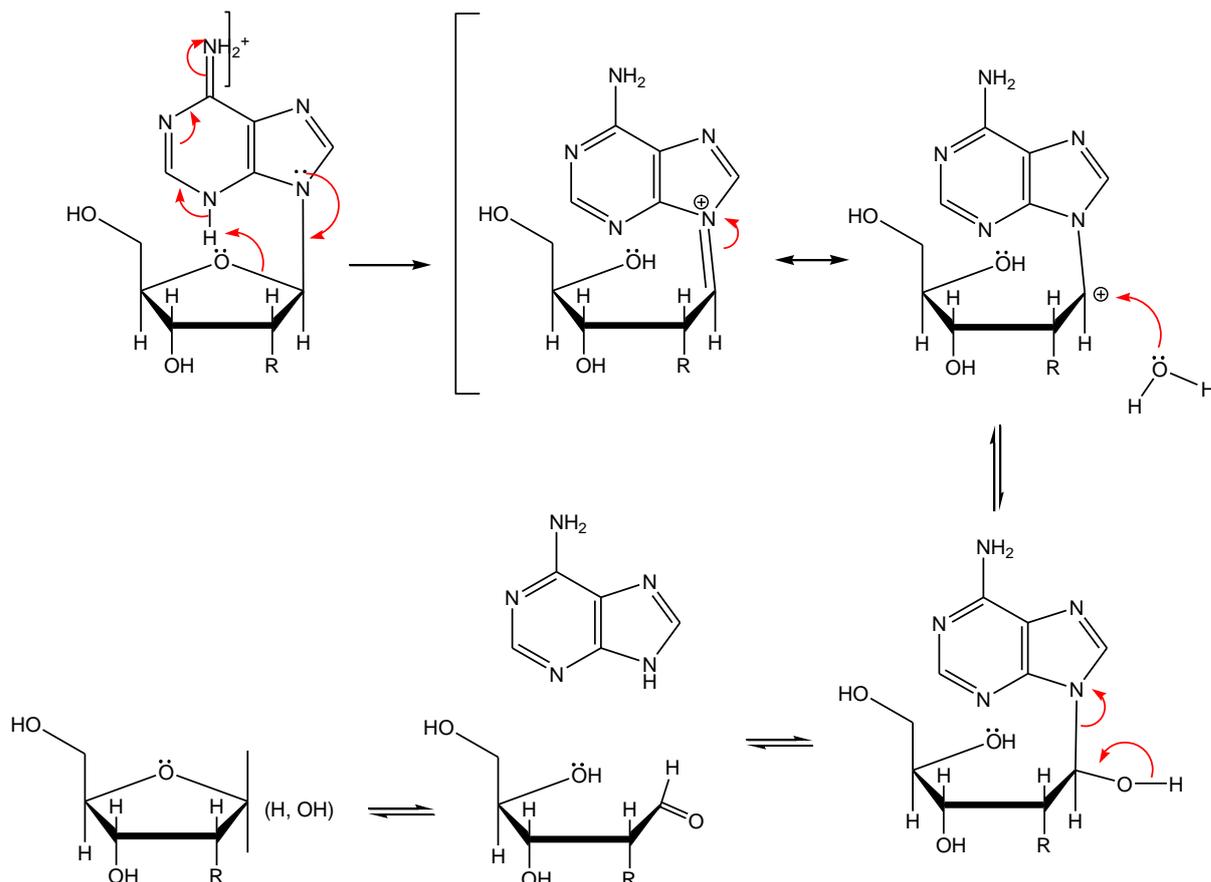
*Análisis del mecanismo de hidrólisis en medio ácido sobre 2' desoxinucleósidos*

¿Cuál es el nitrógeno más básico de una base púrica?. La posición de protonación se justifica por la posibilidad de plantear estructuras contribuyentes al híbrido de resonancia del ácido conjugado, que indican que aun tratándose de un átomo de nitrógeno  $sp^2$  éste resulta más básico que la amina primaria que se encuentra como sustituyente en la posición 6 y que aparentemente presenta hibridación  $sp^3$ .



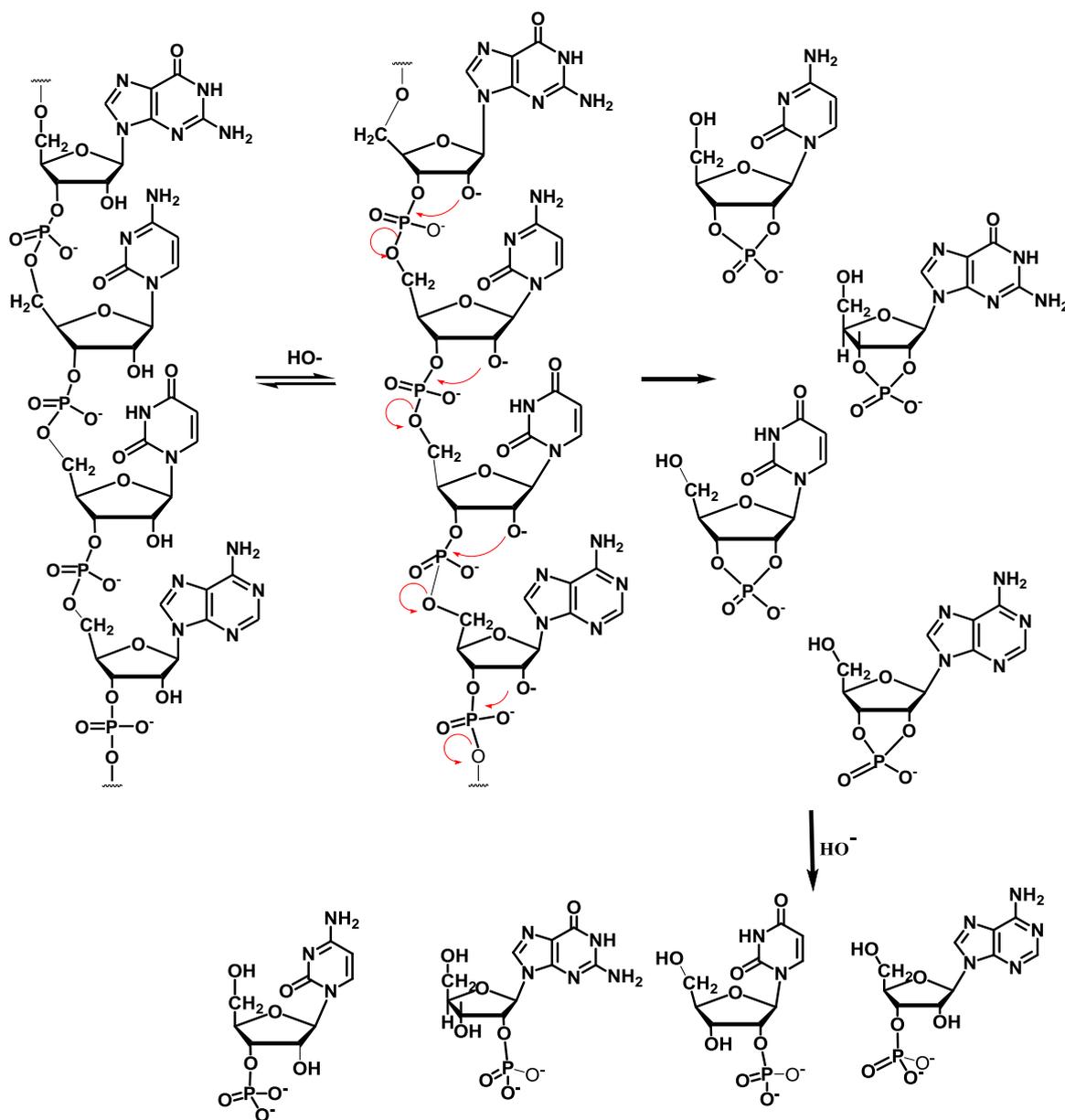
**Acido conjugado de adenosina**

Habiendo definido cuál es la posición más básica, es posible entonces plantear el mecanismo de hidrólisis ácida de nucleósidos púricos sobre estructuras en conformación *syn*. La proximidad espacial del oxígeno anular de la desoxirribosa con el nitrógeno protonado de la posición 3 de la base púrica (que se encuentra en conformación *syn*) justifica el planteo de un mecanismo de hidrólisis con protonación del oxígeno anular. Esto implica la ruptura del enlace entre el carbono anomérico y el oxígeno anular en la etapa lenta de la reacción.



Asimismo, es posible justificar la mayor labilidad del enlace *N*-glicosídico en nucleósidos de 2'-desoxirribosa respecto de los de ribosa. Esto es debido a que en los 2'-desoxirribonucleosidos no se manifiesta el efecto inductivo atractor de electrones del grupo 2'OH, el cual competiría con el desplazamiento de los electrones del enlace entre el carbono anomérico hacia el oxígeno anular.

Complementariamente a lo discutido en párrafos anteriores, el ARN es más lábil en medio básico que el ADN, obteniéndose como producto de su hidrólisis una mezcla de nucleósidos monofosforilados en las posiciones 2' y 3'. Este comportamiento puede racionalizarse a través del siguiente mecanismo de reacción:



### Trabajo Práctico

**Objetivo:** Aislar y purificar e hidrolizar ADN. Caracterizar químicamente sus componentes.

#### PROTOCOLO DE LABORATORIO

**Preparación de buffer de lisis:** Colocar 40 ml de agua destilada, 5 ml de detergente y una punta de espátula de NaCl. Agitar con varilla de vidrio.

**Extracción de ADN:** Colocar media banana cortada en trozos en un tubo falcon de 50 ml, agregar el buffer de lisis y homogenizar con varilla de vidrio. Centrifugar durante 10 min a 5000 rpm. Filtrar el sobrenadante con un algodón y embudo, colectarlo en un nuevo tubo falcon. Agregar

etanol 96 % frío (agente precipitante) en una proporción 2:1 (etanol: filtrado). Esperar unos segundos y observar como comienza la precipitación del ADN (el ADN tiene una apariencia de mucus blanco y fibroso). Dejar reposar unos minutos y centrifugar 10 min a 5000 rpm. Descartar el sobrenadante con la ayuda de una varilla de vidrio. Resuspender el pellet de ADN obtenido en 10 ml de agua.

**Caracterización química de los componentes estructurales del ADN**

**Hidrólisis ácida de ADN:** Colocar la solución de ADN obtenida en un erlenmeyer, agregarle 30 ml de  $H_2SO_4$  al 10% y calentar a baño maría durante 30 min. En caso de excesiva evaporación agregar agua destilada hasta alcanzar el volumen inicial.

**Reconocimiento de azúcares, reacción de Molisch:** Trasvasar 5 ml del hidrolizado a un tubo de ensayo, agregar 4 gotas de solución de  $\alpha$ -naftol, agitar y añadir por las paredes del tubo 3 ml de  $H_2SO_4$  (c). Observar y anotar los resultados.

**Caracterización de fosfatos:** Colocar 3 ml del hidrolizado en un tubo de ensayo y alcalinizar con  $NH_4OH$ . Posteriormente, acidificar con  $HNO_3$  (c) y agregar 3 ml de molibdato de amonio al 30%. Calentar y observar los resultados.

**Caracterización de bases púricas:** Colocar 3 ml del hidrolizado en un tubo de ensayo y agregarle  $NH_4OH$  hasta reacción alcalina. Luego agregar gota a gota solución de  $AgNO_3$  al 10 %. Observar y anotar los resultados.