

EXPERIMENTO 12

SEPARACION DE NUCLEOTIDOS DEL ARN DE LEVADURA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

REQUISITOS

Revisar los nucleótidos que forman parte de los ácidos nucleicos y sus propiedades iónicas.

OBJETIVOS

Efectuar la hidrólisis del ARN de levadura y separar los productos (ribonucleótidos) por cromatografía de intercambio iónico.

1. FUNDAMENTOS

El flujo de información biológica va claramente desde una clase de ácido nucleico a otra, desde el ADN al ARN, con sólo algunas excepciones, y de allí a la proteína. Para que esta transferencia de información se produzca fielmente, cada molécula antecesora actúa de metabolito estructural para la síntesis del producto siguiente de la secuencia. Además de regular la expresión celular, el ADN juega un papel exclusivo en la herencia. Este papel viene determinado por su capacidad de replicación, es decir, es una molécula que puede auto replicarse. El significado de la replicación es trascendental, permite que el ADN haga copias de sí mismo mientras se divide la célula. Estas copias van a las células hijas, las cuales pueden así, heredar todas y cada una de las propiedades y características de la célula original.

Por tanto, las propiedades biológicas del ADN son, en primer lugar, la determinación final de las propiedades de la célula viva al regular la expresión de la información biológica, principalmente mediante el control de la síntesis proteica. En segundo lugar, aunque no menos importante, debe quedar absolutamente claro que el ADN transfiere la información biológica desde una generación a la siguiente, es decir, es esencial para la transmisión de la información genética.

Diferencias estructurales entre el ADN y el ARN que son relevantes en la medicina molecular incluyen, la naturaleza de cadena simple del ARN y la utilización de uracilo (U) en vez de timidina (T). La forma más conocida de ARN es el ARN mensajero (ARNm), el cual sirve de intermediario entre el ADN y la proteína. Otra de las propiedades importantes que diferencian al ADN del ARN es la localización tejido-específica de este último. Mientras que el ADN es el mismo en todas las células de un organismo el ARN, y en especial el ARNm, sólo puede ser aislado del tejido donde se está produciendo activamente la proteína específica de interés. En términos de la tecnología de ADN recombinante, el ARNm de células eucariotas representa una gran ventaja con respecto al ADN, el ARN contiene sólo la información genética esencial que reside en los exones sin la información contenida en los intrones.

El dogma que describe el flujo de la información genética desde el ADN transcrito a ARN y traducido luego a proteína, no es absolutamente cierto. En 1970, Temin y Baltimore demostraron que la transcriptasa reversa, una enzima que se encuentra en los retrovirus, permitía que el ARN se copiara a ADN. Esta enzima le dio a la ingeniería genética la posibilidad de sintetizar ADN complementario a partir de ARNm y de esta manera clonar sólo las regiones codificantes de los genes.

Los primeros investigadores tenían buenas razones para pensar que la información no fluye directamente del ADN a las proteínas. El ADN se aloja en el núcleo (de una célula eucariótica), cuando es sabido que las proteínas se fabrican en el citoplasma. Se necesita el ácido ribonucleico (ARN), como intermediario. Los primeros experimentos sugerían la presencia de un intermediario del ADN; al administrar precursores radiactivos marcados del ARN a las células, aparece ARN radiactivo en el núcleo antes que en ningún otro sitio, indicando que es ahí donde se sintetiza el ARN. En un experimento de pulso y caza se da un breve «pulso» de precursores radiactivos, los cuales se incorporan a moléculas de ARN. Luego, se transfieren las células a un medio con precursores de ARN no radiactivos. Esta fase de «caza» sirve para cortar la incorporación de radiactividad al ARN, pues conforme éste se va degradando, la célula cuenta ahora sólo con precursores no marcados para sintetizar nuevas moléculas de ARN. El procedimiento del pulso y caza permite seguir la pista a una población de moléculas de ARN, sintetizadas todas a la vez, a lo largo del tiempo. En muestras tomadas después de la caza, el ARN radiactivo se encuentra en el citoplasma. Es decir lo que se sigue es la pista de los precursores marcados que ofrecen la imagen de la estructura por la radiactividad de la molécula, y en definitiva el punto nos indica el lugar de interés y la caza nos ofrece la ubicación final del producto sintetizado. El ARN se sintetiza en el núcleo y luego se traslada al citoplasma. Buen candidato, pues, para actuar como intermediario en el flujo de información del ADN a la proteína.

En 1957, Volkin y Astrachan hicieron una observación de interés. Comprobaron que uno de los cambios moleculares más dramáticos que ocurre al infectar *E. coli* con el fago T2 es una rápida explosión de síntesis de ARN. Además, este ARN inducido por el fago tiene una tasa de recambio muy rápida. Las bacterias infectadas se someten primero a un pulso de uracilo radioactivo. El ARN recuperado poco después del pulso está marcado, pero el que se recupera algo más tarde, después de la caza, no lo está, indicando que la vida media del ARN es muy corta. Finalmente, cuando se compara la composición de nucleótidos del ADN de *E. coli* y de T2 con la composición de nucleótidos del ARN inducido por el fago, esta última resulta ser muy parecida a la del ADN del fago. La conclusión provisional de los dos experimentos que acabamos de describir es que el ARN se fabrica a partir de ADN y se utiliza luego, de alguna manera, para sintetizar proteínas. Así pues, podemos establecer ahora un esquema de las tres etapas del flujo de información: replicación (síntesis de ADN), transcripción (copia de una porción del ADN en forma de ARN), y traducción (síntesis de un polipéptido dirigida por la secuencia de nucleótidos del ARN).

1.1 Tipos y características del ARN ribosómico, ARN de transferencia y ARN mensajero

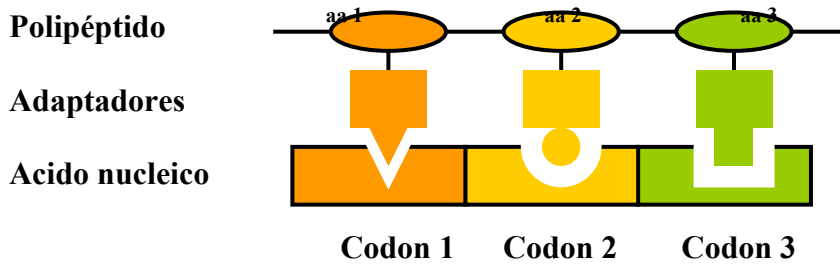
Según su función se distinguen los siguientes tipos de ARN:

- ARNt: Se encuentra disperso en el citoplasma. Tiene por función transportar aminoácidos específicos en los ribosomas.
- ARNm: Se sintetiza y se destruye en minutos. Se halla asociado a Histonas para evitar el ataque de las Nucleasas. Tiene por función, en la síntesis protéica, transportar la información copiada del ADN para la elaboración de una proteína.
- ARNr: Se encuentra en los ribosomas y se encarga de ordenar, según las instrucciones de los codones del ARNm, los aminoácidos que formarán parte de una proteína.

1.1.1 ARN de transferencia (tARN)

El conocimiento de la función genética del ADN, permitió entender cómo las células traducen el lenguaje de la secuencia de bases en el lenguaje de los polipéptidos. Los ácidos nucleicos no unen específicamente aminoácidos, por lo cual, en 1955, Crick propuso la hipótesis de la molécula **adaptadora**, para explicar este proceso. Esta hipótesis dice que la traducción ocurre a través de un adaptador, y postulaba que cada uno de estos adaptadores cargaba un aminoácido y reconocía al codón correspondiente (Figura 1)

Figura 1 Representación del mecanismo en el que participa el adaptador



aa_n: aminoácido

1.1.1.1 Estructura primaria y secundaria de tARN

En 1965, después de 7 años de esfuerzo, Robert Holley reportó la primera secuencia de bases significativa de un ácido nucleico biológico. Esta secuencia fue el tARN para la alanina (^{Ala}tARN)

Los obstáculos que Holley tuvo que enfrentar para esta determinación fueron los siguientes:

1.- Todos los organismos contienen muchas especies de tARN, al menos una para cada tipo de aminoácido (*i.e.* 20). Estas moléculas tienen propiedades casi idénticas y por tanto no son separados fácilmente. Algunas técnicas preparativas tuvieron que ser desarrolladas para que Holley determinara la secuencia del ^{Ala}tARN.

2.- Holley tuvo que inventar los métodos que fueron utilizados inicialmente para secuenciar el ARN.

3.- Diez de las 76 bases del ^{Ala}tARN de levadura están modificadas, sus fórmulas estructurales tuvieron que ser elucidadas a pesar de que se encuentran en cantidades menores a un miligramo.

La longitud de los tARN varía de especie a especie y en los eucariontes de organelo en organelo, y va desde 60 hasta 95 nucleótidos (18-28 kD), pero la mayoría tiene 76 nucleótidos.

Las partes circulares (verde), representan no complementariedad entre las bases. Los símbolos en color representan a los nucleótidos modificados.

Casi todos los tARNs, como reconoció Holley, presentan una estructura de trébol. Empezando por el extremo 5', los tARNs tienen las siguientes características comunes:

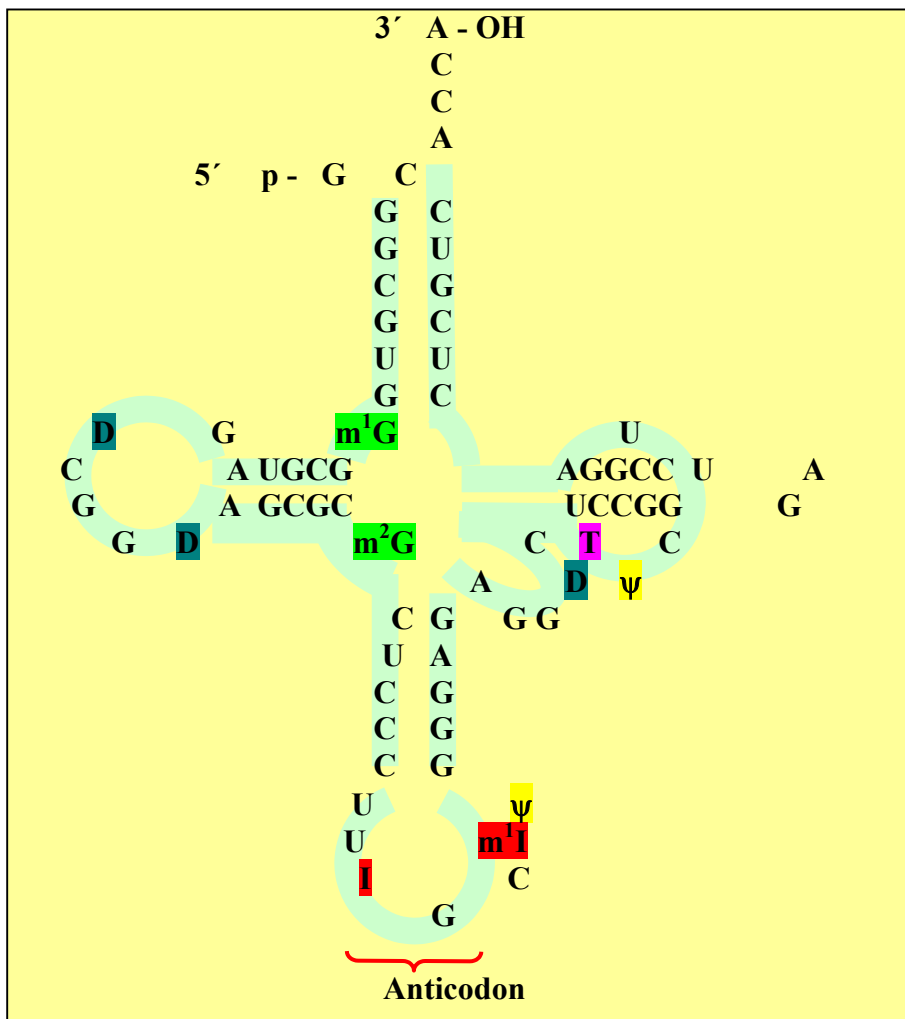
1.- grupo fosfato en extremo 5'.

2.- Un brazo de 7 pares de bases que incluye al nucleótido 5' y pueden contener pares de bases diferentes a los de Watson-Crick como G-U. A esta región se le denomina como brazo aceptor o brazo del aminoácido, porque el aminoácido es llevado (cargado) en el OH libre del extremo 3'.

- 3.- Un brazo de 3 a 4 pares de bases que termina en un giro que frecuentemente contiene la base modificada dihidrouracilo (D en la Figura), por lo cual se denomina **brazo D**.
- 4.- Un brazo de 5 pares de bases que termina en un giro que contiene el anticodon, el triplete de bases que es complementario con el codon en el mRNA. A esta región se le denomina **brazo del anticodon**.
- 5.- Un brazo de 5 pares de bases que termina en un giro que casi siempre contiene la secuencia T ψ C (en donde ψ representa pseudouridina), esta región es denominada brazo T ψ C o simplemente T.
- 6.- Todos los tARNs terminan en una secuencia CCA con el OH del extremo 3' libre
- 7.- Hay 15 posiciones invariables (siempre tienen la misma base) y 8 posiciones **semi-invariantes** (contienen sólo una purina o pirimidina) que se presentan en los giros.

El sitio de mayor variabilidad en los tARNs se encuentra en el denominado **brazo variable**, que tiene de 3 a 21 nucleótidos y puede tener una región lineal de 7 o más pares de bases.

Figura 2 Secuencia de bases del ^{Ala}tARN de levadura dibujado en su forma de trébol.



1.1.1.2 Estructura terciaria del tARN

La estructura tridimensional del tARN fue resuelta de manera independiente por Alexander Rich y Sung Hou Kim y en un cristal diferente por Aaron Klug en 1974, a través de estudios de cristalografía de rayos X del ^{Phe}tARN de levadura. La molécula asume una conformación con forma de L, en la cual la longitud de la L está dada por los brazos T y aceptor formando una doble hélice. La parte restante de la L está formada por los brazos D y del codón.

1.1.2 Transcripción y síntesis del ARN

El proceso de síntesis de ARN o TRANSCRIPCIÓN, consiste en hacer una copia complementaria de un trozo de ADN. El ARN se diferencia estructuralmente del ADN en el azúcar, que es la ribosa y en una base, el uracilo, que reemplaza a la timina. Además el ARN es una cadena sencilla

En una primera etapa, una enzima, la ARN-polimerasa se asocia a una región del ADN, denominada promotor, la enzima pasa de una configuración cerrada a abierta, y desenrolla una vuelta de hélice, permitiendo la polimerización del ARN a partir de una de las hebras de ADN que se utiliza como patrón. La ARN-polimerasa, se desplaza por la hebra patrón, insertando nucleótidos de ARN, siguiendo la complementariedad de bases, así p.e.

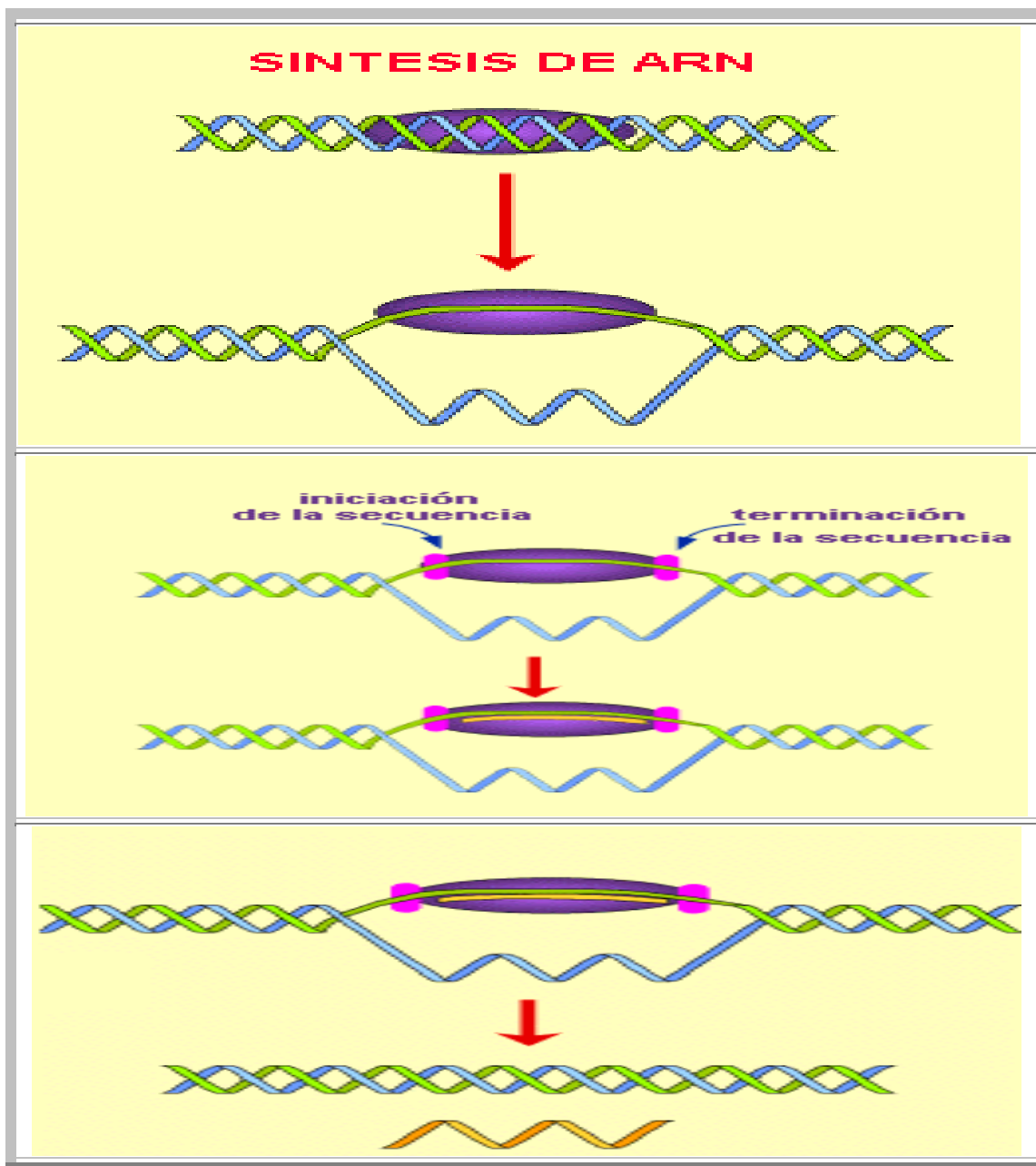
Secuencia de ADN: 3'... TACGCT...5'

Secuencia de ARNm: 5'...UAGCGA...3'

Cuando se ha copiado toda la hebra, al final del proceso, la cadena de ARN queda libre y el ADN se cierra de nuevo, por apareamiento de sus cadenas complementarias.

De esta forma, las instrucciones genéticas copiadas o transcritas al ARN están listas para salir al citoplasma. El ADN, por tanto, es la "copia maestra" de la información genética, que permanece en "reserva" dentro del núcleo. El ARN, en cambio, es la "copia de trabajo" de la información genética. Este ARN que lleva las instrucciones para la síntesis de proteínas se denomina ARN mensajero. Esos pasos se muestran en la siguiente figura

Figura 3 Transcripción y síntesis del ARN









	molécula de DNA, en la región próxima al punto de inicio de la transcripción (de -50 a +40 nt, aproximadamente)
	RNAPol-II (RNA polimerasa II)
	TBP (<i>TATA Binding Protein</i> , proteína ligante de TATA); masa molecular: 30-38 kDa. Es uno de los componentes de TFIID (700-800 kDa en total).
	TFIIB (factor de transcripción 'B' de tipo II)
	TFIIE (factor de transcripción 'E' de tipo II)
E34-1, E34-2	otra molécula de TFIIE
	TFIIIF (factor de transcripción 'F' de tipo II)
F30-1, F30-2	otra molécula de TFIIIF
	TFIIH (factor de transcripción 'H' de tipo II). Posee actividad helicasa (desenrolla la doble hélice) y proteína quinasa (fosforila la RNAPol).

Figura 4. Modelo del complejo de preiniciación de la transcripción de los genes eucarióticos de tipo II y sus componentes

Nomenclatura

TF: Transcription Factor, factor de transcripción (factor de iniciación de la transcripción); una proteína que participa en el comienzo de la transcripción como mediador en la unión de la RNA pol al DNA o en la activación de la RNA pol.

II: de tipo II, hace referencia a los TF que participan en la transcripción realizada por la RNA polimerasa II (genes de tipo II: todos los que codifican proteínas y la mayoría de los que codifican los snRNAs).

H: la letra permite nombrar cada uno de los factores en concreto.

(2) Modelo tridimensional del complejo, visto desde distintos ángulos (como si fueran las 6 caras de un cubo que envolviera al modelo):

1.1.3 Reconocimiento

El proceso de síntesis del ARN, incluye primero la unión de la molécula de ARN holopolimerasa con el molde en el sitio promotor (40 pares de bases de ADN que contienen 2 elementos). A la unión sigue un cambio conformacional de la ARN polimerasa; luego el primer nucleótido (casi siempre una purina) se une al sitio de iniciación en la sub-unidad beta de la enzima. En presencia de los 4 nucleótidos, la ARN polimerasa se mueve a la segunda base del molde, se forma el enlace fosfodiéster y ahora, la cadena nascente se adhiere al sitio de polimerización en la sub-unidad beta de ARN polimerasa.

1.1.4 Iniciación

El inicio de la formación de la molécula de ARN en su extremo 5' va seguido por la liberación del factor alfa, en tanto que el alargamiento de 5' a 3' continúa antiparalelo a su molde. La enzima polimerasa, los ribonucleótidos en una secuencia específica dictada por la tira molde e interpretada según las reglas de apareamiento de bases de WATSON-CRICK. En la reacción de polimerización se libera pirofosfato tanto el procarionota como el eucariota es común que en la molécula de ARN se polimeriza primero un ribonucleótido de purina.

1.1.5 Elongación

El inicio de la formación de la molécula de ARN en su extremo 5' va seguido por la liberación del factor alfa, en tanto que el alargamiento del ARN de 5' a 3' continúa antiparalelo a su molde. La enzima polimeriza los ribonucleótidos en una secuencia específica dictada por la tira molde e interpretada según las reglas de apareamiento de Watson-Crick. En la reacción de polimerización se

libera pirofosfato. Tanto en procariotas como en eucariota es común que en la molécula de ARN se polimericé primero un ribonucleótido de purina.

Conforme el complejo de **alargamiento** tiene la ARN polimerasa central progresa a lo largo de la molécula de made, debe ocurrir un desenrollamiento del ADN para proporcionar el acceso a la base apropiada que se aparea a los nucleótidos de la tira codificadora. La extensión del desenrollamiento del ADN es constante a lo largo de la transcripción y se ha calculado que es de 17 pares de bases por molécula de polimerasa. Por lo tanto, parece que el tamaño de la región desenrollada del ADN es dictado por la polimerasa y es independiente de la secuencia del ADN en el complejo. Esto sugiere que la ARN polimerasa se ha relacionada con una actividad “desenrollasa” que abre la hélice del ADN. El hecho de que la doble hélice se desenrolle por lo menos transitoriamente para la transcripción implica cierto rompimiento de las estructuras nucleosómicas de las células eucariotas.

1.1.6 Término

La terminación de la síntesis de la molécula de ARN es señalada por una secuencia en la tira codificadora de la molécula de ADN, señal que es registrada por una proteína de terminación, el factor rho (ρ). Posteriormente a la terminación de la síntesis de la molécula de ARN, la enzima central se separa de la molécula de ADN. De manera simultanea, mas de una molécula de polimerasa de ARN puede transcribir la misma tira codificadora, pero el proceso es ejecutado en fases y espaciado de tal manera que en todo momento cada un a esta transcribiendo una parte distinta de la secuencia de ADN.

1.1.7 ARN polimerasa

Es la enzima responsable de la polimerización de ribonucleótidos en una secuencia complementaria a la tira codificada del gen (tira que se transcribe en una molécula de ARN). Las múltiples subunidades de las enzimas polimerasas se adhieren a la región promotora de un gen y transcribe la secuencia de la tira molde de ADN (unidad de transcripción) a una tira complementaria de ARN (transcripción primaria). A esto sigue el comienzo de la síntesis de una molécula de ARN a partir de ADN en el punto de iniciación (corresponde al nucleótido 5' del ARNm), y el proceso continua hasta alcanzar una secuencia de determinación. Hay 3 tipos de ARN polimerasa:

- El tipo I transcribe ARN ribosómico.
- El tipo II ARN mensajero.
- El tipo III ARN de transferencia.

La ARN polimerasa dependiente del ADN de la bacteria *ESCHERICHIA COLI* existe como una molécula central compuesta de 4 subunidades; 2 de estas son idénticas entre si (las subunidades alfa) y

las otras 2 son semejantes en tamaño una a la otra, pero no idénticas (subunidad B y subunidad B'). La ARN polimerasa central utiliza un factor proteínico específico (el factor sigma) que ayuda a la enzima central para unirse mas fuertemente a la secuencia específica de desoxinucleotidos de la región promotora. La ARN polimerasa también tiene 2 moléculas de cinc.

1.1.8 Detalles del experimento

La hidrólisis alcalina del ARN produce inicialmente 2', 3' nucleósidos monofosfatos cíclicos y finalmente una mezcla de 2' y 3' nucleósidos monofosfatos, los cuales son separados utilizando una columna de intercambio iónico (DOWEX-50), en forma H⁺. Esta es una resina de poliestireno con residuos sulfónicos (RSO⁻³ H⁺). Sustancias con una carga neta positiva se enlazan ionicamente a los grupos fijos sulfonatos, quedando unidas a la resina intercambiadora catiónica. Si el pH (o la concentración del catión desplazante) del eluente se incrementa, las sustancias enlazadas se disocian de la resina, siendo eludidas de la columna. El pH se incrementa cambiando de un lavado con ácido 0,05N (eluente) a uno con agua. Los componentes separados son identificados por su espectro característico de absorción ultravioleta:

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

ARN de levadura	Columna Dowex 50W (4 cm x 0.5 cm)
KOH 0.3N	Lámpara UV
Ácido Perclórico	Tubos de ensayo
HCl 3N; 1N; 0.05N	

2.2 Métodos

1. En un tubo con tapa de rosca coloque 100 mg de ARN de levadura (comercial) y añada 1 ml de KOH 0.3N. Mezcle. Tape. Incube a 37°C durante 20-24 horas. Coloque la solución en un baño de hielo y agregue ácido perclórico 1N para neutralizar. Guarde a 0°C hasta su uso.
2. Centrifugue en frío a 3000 rpm, 10 min. Descarte el precipitado formado y ajuste el pH del sobrenadante, añadiendo HCl 1N para obtener una concentración final de ácido de 0.05N (efectúe los cálculos): ESTA ES LA MUESTRA
3. Prepare una columna (4 cm x 0,5 cm) con la resina Dowex-50W lavada en HCl 3N. Añada 5 ml de HCl 0,05N para equilibrar la columna. Ajuste el flujo a 0.5 ml/min. ¡NO DEJE SECAR LA COLUMNA!

4. Coloque 0.1 ml de la muestra, déjela entrar a la columna y comience la elusión con HCl 0.05N.
5. Recoja 4 fracciones de 1 ml cada una. Alguna de ellas contiene el 2' (3') fosfato de uridina.
6. Eluya ahora con agua destilada (0.5 ml/min) y recoja 5 fracciones de 1 ml cada una. En estas fracciones aparece el GMP.
7. Siga añadiendo agua destilada e incremente el flujo de la columna a 1 ml/min. Recoja 2 fracciones de 3 ml y 4 fracciones de 2 ml cada una. Aquí aparece una mezcla de monofosfato de adenosina y citidina.
8. Añada HCl 1N a cada una de las fracciones eludías con agua, para hacerlas 0,05N HCl.
9. Mida la absorción de UV de cada muestra, aplicando gotas en un papel de filtro, séquelas y obsérvelas bajo la lámpara de UV (λ corta). ¡CUIDADO: NO OBSERVE DIRECTAMENTE LA LUZ DE LA LAMPARA. ¡NO EXPONGA LA PIEL A LA LUZ DE LA LAMPARA! CUIDADO!
10. Anote el número de fracciones (ml de eluente) donde aparecen manchas oscuras o marcadas en el fondo fluorescente-verdoso del papel de filtro. Haga un perfil que refleje la elusión de los nucleótidos.
11. Hágale a cada uno de los eluatos que contienen nucleótidos, la prueba de presencia de purinas en caliente (1 ml eluato a ebullición; 0.5 ml sulfato cúprico al 10% y 5 gotas de solución saturada de bisulfato de sodio). Las purinas y sus derivados dan un precipitado amarillento.
12. En base a estos resultados identifique los nucleótidos (GMP, AMP) en el perfil de elusión. Complete la identificación tomando en cuenta los valores de pK para los diferentes grupos presentes en los ribonucleótidos y las condiciones (pH) de la muestra aplicada.

Tabla 1 Pka de los nucleótidos

NUCLEOTIDO	PKA1	PKA2	PKA3
AMP		3,3	6,1
CMP		4,5	6,3
GMP	0,7	2,3	5,92
UMP		6,4	9,5
TMP	1,6	6,5	10,0

3. AUTO-EVALUACIÓN.

1. Para qué se usa el baño de hielo cuando se añade ácido perclórico?
2. Qué precipita cuando se añade el ácido perclórico?
3. Para qué se ajusta la concentración de HCl a 0.05N en la muestra?

4. Por qué los ribonucleótidos monofosfatos se enlazan a los grupos sulfonato de la columna? Todos los nucleótidos del ARN se enlazan? Explique utilizando datos tomados de la bibliografía.
5. Otros factores diferentes al estado de ionización de los grupos de los nucleótidos pueden contribuir a su separación por cromatografía de intercambio iónico. Explique brevemente.
6. Averigüe las reacciones que permitirían detectar la presencia de los nucleótidos de pirimidina en las fracciones obtenidas.
7. Indique otros tests para nucleótidos de purina.
8. La separación de los ribonucleótidos podría hacerse usando una resina de intercambio aniónico? Explique las características de esa resina. ¿Cuáles condiciones experimentales se aplicarían (diseño experimental) y cuál sería el orden de elusión de los nucleótidos?.
9. Una vez hidrolizado el ARN (punto 1 del método, los nucleótidos liberados se pueden separar por electroforesis en acetato de celulosa usando buffer citrato. pH 3.5. ¿Cómo realizaría ese experimento? Hacia cuál de los polos migrarán los nucleótidos? Explique, consiguiendo los datos necesarios en la bibliografía.

4. INFORME 12 (ARN)

Apellidos

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

Nombres

N° del mesón

N° del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		Definitiva	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Dibuje en el siguiente cuadro los cinco mononucleótidos mas importantes de los ácidos nucleicos y coloque su nombre.

2. Complete el cuadro del perfil de elusión

Fraccion	Eluente	Mancha	pH	Prueba	Nucleotido
F1					
F2					
F3					
F4					
F5					
F6					
F7					
F8					
F9					
F10					
F11					
F12					
F13					
F14					
F15					

3. discuta sus resultados

Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.