

REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Pterinas

Con el fin de realizar estudios comparativos de las propiedades de las pterinas, se utilizaron los siguientes compuestos: pterina, 6-carboxipterina 6-formilpterina, neopterina, biopterina y ácido fólico. Las pterinas usadas fueron sintetizadas y provistas por el Laboratorios Shircks (Suiza). En ningún caso se realizó purificación posterior.

Preparación de soluciones de pterinas: las soluciones se prepararon pesando cantidades adecuadas de compuesto sólido, y luego disolviéndolos en soluciones acuosas de Na(OH) diluidas. Esto favorece la disolución, debido a que en medio alcalino, tal como se explicó en el *Capítulo 2*, todas las pterinas presentan al menos un grupo ionizado (fenolato) y, por ende, su solubilidad es mayor que en soluciones ácidas o ligeramente ácidas. Posteriormente, se ajustó el pH de la solución en aproximadamente 11, mediante el agregado de pequeños volúmenes de solución de Na(OH) 0,5 M y, por último, se llevó al volumen final mediante el empleo de matraces. Las soluciones se conservan en heladera a pH = 11 y se verificó la estabilidad tomando los espectros de absorción antes de cada medida.

Las soluciones fueron preparadas a distintas concentraciones, según la técnica en la cual serían empleadas. Por ejemplo, en algunos casos, como ciertas medidas de fluorescencia que requieren valores pequeños de absorbancia, se emplearon valores cercanos a 10^{-5} M. En otros casos se requieren concentraciones cercanas a la saturación (alrededor de 10^{-3} M en medio alcalino). La mayor parte de los experimentos realizados para este trabajo de tesis se llevó a cabo

empleando valores de concentraciones comprendidas entre los dos valores mencionados (10^{-5} - 10^{-3} M).

La concentración de las soluciones empleadas en los distintos experimentos de determinó, según el caso, por alguno de los siguientes métodos: a) calculándola a partir de la cantidad de sólido pesado, el volumen de solución y el peso molecular del compuesto; b) calculándola a partir del factor de dilución y la concentración (calculada según a) de una solución más concentrada; y c) calculándola a partir de medidas de absorbancia y los correspondientes valores de los coeficientes de extinción molar (ϵ) [Thomas, 2001].

El pH de las soluciones acuosas se ajustó agregando microlitros de soluciones concentradas de HCl o NaOH. Las medidas de pH se realizaron con medidores de pH provistos de un electrodo de vidrio combinado (pH-meter Metrom y pH-meter Schott CG 843P). La calibración de los equipos se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH 4,00; 7,00; 10,00 y 12,00.

No se utilizaron soluciones reguladoras para ajustar el pH de las soluciones a consecuencia de que las propiedades fluorescentes de las pterinas se ven afectadas por un gran número de ellos. Los estudios del *quenching* de fluorescencia de las pterinas por aniones presentes en soluciones reguladoras de uso frecuente están incluidos en este trabajo de tesis y los resultados se exponen en el *Capítulo 10*.

Para facilitar el análisis de los resultados experimentales obtenidos fue conveniente realizar los mismos en condiciones tales que existiera una sola forma ácido-base del compuesto en estudio. Teniendo en cuenta lo expuesto en el *Capítulo 2* puede deducirse que ajustando el pH en un valor mayor a 10, más del 99 % de las moléculas de los derivados pterínicos estarán en su forma alcalina. Por el contrario, fijándolo en un valor menor que 6 más del 99 % estarán en su forma ácida, a excepción de la 6-formilpterina que posee un pKa de 7.3, con la cual debe fijarse un valor de pH ligeramente menor, para obtener el mismo resultado. Por otro lado el pH no debe ser menor que 4, para evitar la presencia de otras formas ácido-base (ver *Capítulo 2*). En particular, para la 6-carboxipterina y

el ácido fólico el pH no debe ser menor a 5.0, para evitar la protonación de los grupos carboxilos.

Nucleótidos.

Los nucleótidos, como tales, participan de diversas funciones en el metabolismo celular, y los polímeros de los nucleótidos, los *ácidos nucleicos*, son los depositarios moleculares de la información genética. La estructura de todas las proteínas es producto de la información contenida en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos de las células [Lehninger, 1985]. Además, los nucleótidos son moléculas ricas en energía que dirigen los procesos metabólicos de las células. Actúan como señales químicas y son componentes estructurales de ciertas enzimas e intermediarios metabólicos.

Los nucleótidos están formados por una base nitrogenada, un azúcar y uno o más grupos fosfatos. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es polímero de *desoxirribonucleótidos*. El azúcar de lo desoxirribonucleótidos es la *2'-desoxirribosa* (Figura 4.1). El prefijo *desoxi* significa que este azúcar carece de un átomo de oxígeno, respecto de la ribosa.

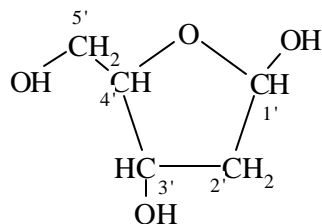


Figura 4.1: Estructura química de la desoxirribosa.

La base nitrogenada de los desoxirribonucleótidos puede ser una purina o una pirimidina. El ácido desoxirribonucleico tiene cuatro bases, bases púricas (derivadas de la purina) la *adenina* (A) y la *guanina* (G), y bases pirimídicas

(derivadas de la pirimidina): la *citocina* (C) y *timina* (T). Las estructuras químicas de estos compuestos pueden apreciarse en la Figura 4.2.

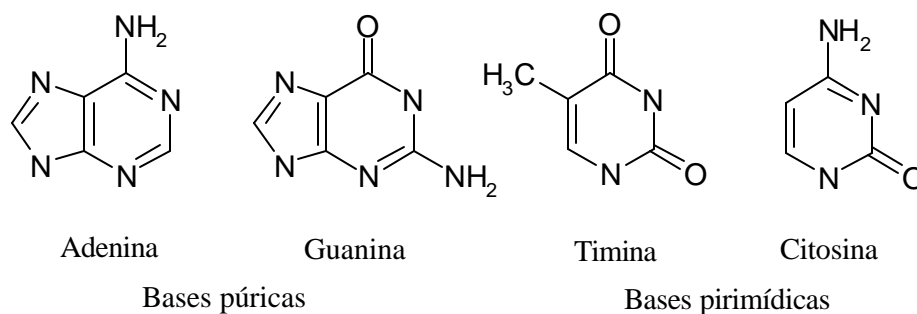
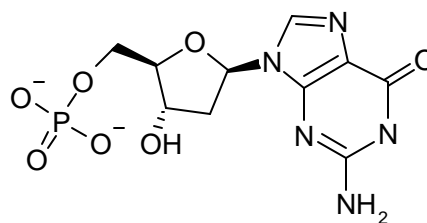
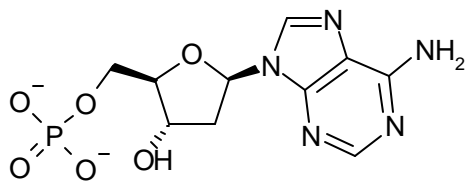


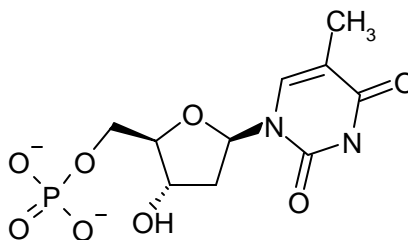
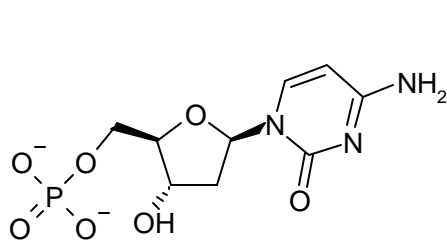
Figura 4.2: Estructura química de las bases púricas y pirimídicas que forman parte de los nucleótidos del ADN.

En un desoxirribonucleótido el átomo de C-1' de la desoxirribosa se enlaza con el N-1 de las pirimidinas o con el N-9 de las purinas, formando un enlace N-glicosídico β . El signo prima (') se usa habitualmente para diferenciar posiciones sobre el azúcar de posiciones sobre las bases. Una base unida a la desoxirribosa es un *nucleósido*, mientras que el éster fosfórico de un nucleósido es un *nucleótido*. La posición más frecuente de la unión éster en los nucleótidos naturales es el grupo hidroxilo del C-5' del azúcar. Este compuesto se denomina *nucleósido-5'-fosfato* o *5'-nucleótido*. En la Figura 4.3 se muestran las estructuras químicas de los nucleótidos presentes en el ácido desoxirribonucleico, junto a su nomenclatura.

En los experimentos de fotosensibilización de nucleótidos por pterinas realizados para este trabajo de Tesis, se utilizaron los siguientes nucleótidos: 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato, 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato provistos por Sigma en pureza del 99 %, 99 % y 98 %, respectivamente. A partir de los nucleótidos sólidos se prepararon soluciones acuosas para realizar los experimentos.



2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP) 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP)



2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (dCMP) 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP)

Figura 4.3: Estructura química de los nucleótidos presentes en el ADN.

Ácido desoxirribonucleico.

La estructura del ácido desoxirribonucleico fue propuesta por Watson y Crick en 1953, sobre la base de datos de difracción de rayos X obtenidos por Wilkins y Franklin. El ácido desoxirribonucleico está compuesto por dos cadenas de polinucleótidos helicoidales con giro a la derecha que forman una doble hélice alrededor de un eje central. Las bases se disponen en el centro de la hélice en forma perpendicular al eje. Ambas cadenas se unen entre sí por puentes de hidrógeno que se establecen entre pares de bases. Las bases se unen entre sí de una sola forma: la guanina se une a la citosina y la adenina a la timina, a razón de tres y dos puentes de hidrógeno respectivamente.

Para realizar estudios de fotosensibilización de moléculas de ácido desoxirribonucleico por pterinas, se eligió una molécula de ácido

desoxirribonucleico que permitiera obtener un grado de reproducibilidad adecuado, con actividad biológica fácilmente evaluable en el laboratorio. Los estudios se centraron en moléculas de ácido desoxirribonucleico relativamente pequeñas y de bajo peso molecular, que se pueden obtener en el laboratorio en grado de pureza adecuado. Estas moléculas, denominadas *plásmidos*, son moléculas de ácido desoxirribonucleico circulares, presentes en ciertas bacterias. Los plásmidos son elementos genéticos transmisibles, más pequeños que los cromosomas, que tienen los genes necesarios para su propia replicación y otros que le confieren características especiales a las bacterias que los poseen [Stanier *et al*, 1984].

El ácido desoxirribonucleico utilizado en este trabajo fue *plásmido pUC18*, un plásmido de 2690 pares de bases (bp) obtenidas en el *Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM)* de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. La obtención de cantidades adecuadas de este plásmido con un grado de pureza aceptable requiere el empleo de una metodología relativamente compleja. Por ello se dedicará esta sección para desarrollar las técnicas utilizadas en dicha obtención.

Se eligió para trabajar una molécula de plásmido, y no ácido desoxirribonucleico cromosómico bacteriano, debido a que son, también, moléculas de ácido desoxirribonucleico de doble hebra, pequeñas, de más fácil obtención, purificación y manipulación. Por otra parte, el plásmido se puede elegir según las nuevas propiedades que le confiera a la bacteria, como, por ejemplo, la resistencia a un antibiótico, producción de toxinas, etc. Una bacteria puede no tener copia de un plásmido o tener varias copias del mismo. Además, el plásmido contiene sitios específicos sobre su secuencia de nucleótidos que pueden ser atacados por enzimas de restricción (enzimas que producen cortes sobre una secuencia específica del ácido desoxirribonucleico).

Los plásmidos pueden presentar varias formas espaciales diferentes debido a su forma circular, característica importante para el presente trabajo. Estas macromoléculas tienen un número de vueltas de hélice característicos de una hebra sobre la otra, pero al unir los extremos este número de vueltas puede ser igual, mayor o menor generando una estructura espacial diferente en cada caso. Si

el número de vueltas es igual en la molécula circular y en la lineal, el plásmido se considera que está relajado. Si el número de vueltas en la estructura circular es mayor que en la lineal se considera que está superenrollado. Una molécula de ácido desoxirribonucleico superenrollado es más compacta que una relajada de la misma longitud. A consecuencia de ello la molécula superenrollada se mueve más rápido en una electroforesis que una relajada. Así en una electroforesis de ácido desoxirribonucleico plasmídico pueden observarse varias bandas de distinta movilidad electroforética, mientras que con moléculas lineales de igual tamaño siempre se observa una sola banda [Stryer, 1995].

Técnica de obtención y purificación del plásmido.

El plásmido pUC 18 puede adquirirse comercialmente de laboratorios especializados. Sin embargo, se descartó trabajar con este tipo de material porque las muestras comerciales poseen un alto contenido de proteínas y soluciones reguladoras de pH cercano a 8. El tratamiento de purificación es posible en el laboratorio, pero siempre introduce daño mecánico sobre el ácido desoxirribonucleico conduciendo a la formación de formas relajadas en una cantidad comparable al que se obtiene directamente en el laboratorio. Por otro lado el costo del ácido desoxirribonucleico comercial es muy elevado, siendo injustificado para los experimentos a realizar.

Se procedió a la obtención de plásmido tipo pUC, transformando bacterias *Escherichia coli* (es decir, incorporándoles el plásmido). Estas bacterias son de uso muy habitual en los laboratorios de microbiología. El plásmido elegido para los experimentos de este trabajo, pUC18, hace a estas bacterias resistentes a un antibiótico, la ampicilina, que se utilizó para seleccionar aquellas bacterias que poseen el plásmido de las que no lo poseen.

El plásmido elegido se recuperó de una cepa de bacterias *Escherichia coli* no viables (sin capacidad para reproducirse) que se encontraban disponibles en el laboratorio que contenían el plásmido pUC18. Debido al carácter no viables de las bacterias de partida, se debió obtener de ellas una pequeña cantidad del plásmido

para transferirlo a bacterias viables. Esto es posible por el pequeño tamaño del plásmido, ya que el ácido desoxirribonucleico cromosómico, de mayor tamaño se encuentra degradado. De esta manera se pudo obtener de una mayor biomasa una importante cantidad del plásmido (del orden de los miligramos) para los experimentos fotoquímicos y fotofísicos de este trabajo en que se utilizó ácido desoxirribonucleico.

Para extraer el plásmido se recurrió a una técnica de precipitación selectiva de ácido desoxirribonucleico plasmídico, que se describe a continuación:

- 1) Se resuspenden las células en una solución reguladora Tris-EDTA.
- 2) Se agrega una solución de dodecilsulfato de sodio o SDS (detergente) e NaOH. Esta solución lisa las bacterias (rompe sus membranas celulares) y, entonces, se libera su contenido. Deben evitarse las agitaciones bruscas para que el ácido desoxirribonucleico cromosómico quede unido a las membranas y pueda ser separado por precipitación del ácido desoxirribonucleico plasmídico.
- 3) Se centrifuga. El sobrenadante contiene todas las sustancias intracelulares solubles, incluyendo el plásmido.
- 4) Para obtener el plásmido se agrega isopropanol que lo vuelve insoluble. Se centrifuga, y el precipitado se lava con etanol.
- 5) Se resuspende en agua esterilizada.

Este ácido desoxirribonucleico puede ser introducido en células adecuadas (proceso de transformación) y amplificarse muchas veces utilizando el mecanismo de replicación de estas células [Stanier *et al*, 1984]. La mayoría de las bacterias incorporan del medio moléculas de ácido desoxirribonucleico, pero con una eficiencia muy baja. En condiciones experimentales adecuadas pueden transformarse una cantidad importante de células. La transformación de bacterias requiere primero la obtención de células competentes. Estas células son bacterias a las cuales se les modifica la pared celular para posibilitar la incorporación del plásmido. Para obtener las células competentes se debe seguir una serie de pasos que se detallan a continuación:

- 1) Debemos obtener células bacterianas que se encuentren en su fase de crecimiento exponencial, debido a que en dicha fase las células son más sensibles a agentes físicos y químicos adversos. De esta forma, será más fácil modificar las

membranas bacterianas. Para ello a partir de un cultivo saturado de células, se realiza una dilución en un medio de cultivo fresco y se incuba a 37 °C. Se sigue el crecimiento por medidas de absorbancia a 550 nm.

2) Cuando la A_{550} se encuentra entre 0.2 y 0.4 se detiene el crecimiento introduciendo el recipiente en hielo durante un tiempo. Luego se centrifuga, manteniendo la temperatura a 0°C, para separar las bacterias del medio de cultivo.

3) En esta etapa se inicia el proceso para alterar las membranas celulares agregando, en dos pasos, primero Cl_2Ca y luego Cl_2Mg . Estas etapas se realizan manteniendo permanentemente las células a 0°C. Los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} aumentan la permeabilidad de las membranas celulares.

4) Las células así tratadas ya pueden transformarse. Estas bacterias pueden almacenarse si se evita su posterior crecimiento, debido a que las membranas celulares se recuperan si esto sucede. Para ello se conservan en glicerol a temperaturas de -70°C o inferiores.

Tanto la obtención de células competentes como su posterior transformación presentan dificultades de origen experimental. Esto se debe a que las células cuya pared celular está debilitada, son muy lábiles y pueden perder fácilmente su capacidad de reproducirse. También es frecuente que se recuperen de esta modificación, regenerando su pared celular, y en consecuencia no pueden ser transformadas.

Con las células competentes obtenidas se procedió a su transformación, con el siguiente protocolo:

1) Se coloca 100 a 200 μ l de bacterias competentes con 5 μ l de la solución del plásmido, manteniendo todo siempre en hielo. Se incuba durante 30 minutos.

2) Se realiza un *shock* térmico durante 2 minutos a una temperatura entre 42 - 45 °C. Se coloca nuevamente en hielo durante 5 minutos.

3) Se agrega a la mezcla 1 ml de medio de cultivo. Se incuba a 37 °C durante 1 hora.

4) Para seleccionar las bacterias que incorporaron el plásmido se realiza un cultivo en placa con un medio que contiene antibiótico. Se siembra un volumen conocido de la mezcla para poder calcular la eficiencia de la transformación.

En los primeros intentos de transformar esas células competentes la eficiencia de transformación fue cercana a $10^3 - 10^4$ (Eficiencia de transformación: bacterias transformadas por microgramo de plásmido). Estos valores de eficiencia de transformación no dan la seguridad de que las bacterias que crecen en el medio con ampicilina sean bacterias que hayan incorporado el plásmido, sino que puede deberse a mutaciones espontáneas del genoma bacteriano. En consecuencia, la preparación de células competentes debió reiterarse varias veces hasta obtener aquellas con las cuales la eficiencia de transformación sea la adecuada (10^6-10^7 , o mayores).

Una vez obtenidas y seleccionadas las bacterias transformadas, la siguiente etapa es la obtención de las moléculas de plásmido. Como las bacterias transformadas en estas condiciones son resistentes a la ampicilina, solamente aquellas bacterias que incorporaron el plásmido crecerán en un medio con este antibiótico y por ello se eligen medios de cultivos que lo contengan.

Se prepara un medio de cultivo líquido (para obtener una mayor biomasa) con ampicilina, y se inocula con las bacterias transformadas. Se incuba a 37°C hasta saturación del cultivo.

Se obtuvo una gran biomasa de bacterias y de ellas el plásmido. Éste se extrajo con la técnica de extracción de ácido desoxirribonucleico plasmídico que se detalló anteriormente. Posteriormente se purificó en dos etapas:

1) tratamiento con una enzima que degrada ácido ribonucleico (ARN), ARNasa, para eliminar restos de ácido ribonucleico, que habitualmente se extrae con el ácido desoxirribonucleico;

2) purificación con fenol para eliminar aquellas proteínas que coprecipitan.

En esta etapa de purificación se presenta el inconveniente asociado a que las técnicas usadas en biología molecular están pensadas para cantidades muy pequeñas de ácido desoxirribonucleico (del orden del μg). Esto requirió de modificaciones en el protocolo de preparación y purificación estándar para plásmidos con el fin de obtener una cantidad de muestra de un orden 1000 (mil) veces mayor. Este protocolo fue desarrollado como parte de este trabajo de tesis.

La pureza del plásmido se determinó por corridas electroforéticas en geles de agarosa y por medidas de Absorbancia a 260-280 nm. La relación de absorbancias A^{260} / A^{280} debe estar entre 1.8 y 2.0 para aceptar que el ácido desoxirribonucleico obtenido tiene una pureza adecuada. Previo a la purificación esta relación no se cumple por la presencia de impurezas como proteínas. Las proteínas absorben fuertemente a 280 nm, por ello su presencia, aunque sea en muy pequeña cantidad, disminuye apreciablemente la relación de absorbancias.

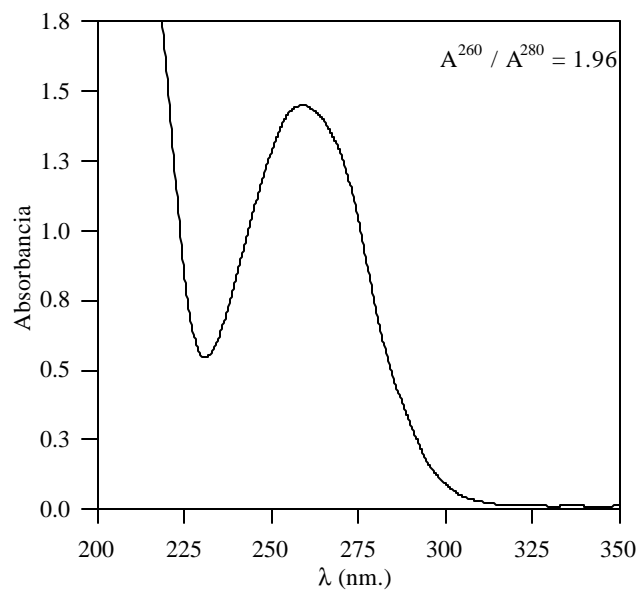


Figura 4.4: Espectro de absorción de una solución de plásmido pUC18 obtenido en el laboratorio a pH= 6.5. Camino óptico 1 cm.

Las corridas electroforéticas en geles de agarosa se revelan con bromuro de etidio, compuesto radioactivo que se une selectivamente a los ácidos nucleicos, ya sean ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. Si el ácido desoxirribonucleico está impurificado con ácido ribonucleico veremos en el gel una banda muy extendida, característica, de estas moléculas. De esta forma podemos evaluar la presencia de ácido ribonucleico en nuestra solución. Es usual

que coprecipite ácido ribonucleico con el ácido desoxirribonucleico, por ello se trata la muestra con ARNasa, previamente a la purificación para eliminar proteínas.

En la siguiente etapa de la purificación, se eliminan las proteínas (que siempre co-precipitan con el ácido desoxirribonucleico) agregando fenol en soluciones acuosas. En estas condiciones se forma un sistema de dos fases, donde el ácido desoxirribonucleico permanece en la fase acuosa que sobrenada. En la interfase se forma un coagulo o gel que contiene las proteínas, permitiendo su separación. La ARN-asa utilizada en la primera etapa de purificación también es una proteína, y en consecuencia se elimina en esta etapa.

Una vez purificado el plásmido se puede evaluar la pureza del mismo por medidas de absorbancia. El espectro del ácido desoxirribonucleico, como puede verse en la Figura 4.4, presenta una banda característica a longitudes de onda menores de 300 nm. Si el ácido desoxirribonucleico está bien purificado debe cumplir con la relación de absorbancias ya mencionada. Si se cumple esta relación la absorbancia a 260 nm nos permite conocer la concentración del ácido desoxirribonucleico ya que se acepta que una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 miligramos por litro.

Como puede observarse en la Figura 4.4 se obtuvo soluciones de plásmido pUC 18 muy puras que cumplen muy bien con la relación de absorbancias. En los geles no se observa la presencia de ácido ribonucleico.