

aliada a uma exatidão muito boa comparada com as concentrações médias extraídas dos resultados de cinco laboratórios franceses especializados, julga-se estar diante de um método promissor para a análise de traços por polarografia.

Há um quarto de século, o Prof. Charlot, emérito reestruturador da química analítica na França, propôs vários ataques alcalinos seja com o NaOH concentrado, seja empregando sais fundidos como NaOH e KOH, Na_2CO_3 , Na_2O_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$ e Borax, dependendo do tipo de amostra e dos elementos a serem determinados⁽⁸⁾. No meio de tanta alternativa interessante para eliminar os inconvenientes do ataque ácido, acreditamos que a mineralização proposta com KCl-LiCl merece um lugar, principalmente pela sua simplicidade e inúmeras vantagens na determinação de metais pesados por polarografia, graças à feliz junção do efeito mineralizante do sal fundido e seu efeito solvante após a dissolução em água.

REFERÊNCIAS

- (¹) R. Combes et S. Kamaoun, Anal. Letters, 17 (A 6), 451 (1984).
(²) Janz, Molten Salts Handbook, Academic Press, 1967.

ARTIGO

EFEITO DE Mn^{2+} NAS ATIVIDADES DE TRANSCRIPTASE REVERSA COM DERIVADOS DE ÁCIDO POLIADENILICO COMO MATRIZES

Hiroshi Aoyama

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, 13100 - Campinas - (SP)*

Recebido em 12/02/85

As reações de síntese de DNA são catalisadas por enzimas genericamente denominadas DNA polimerases¹. Pelo menos três DNA polimerases distintas, α , γ e β , foram isoladas e caracterizadas de organismos eucarióticos^{2,3}. Outras DNA polimerases induzidas por vírus aparecem nas células após infecção viral; estas enzimas são mais conhecidas como transcriptases reversas^{4,5}. Todas estas enzimas necessitam de uma matriz ou molde, de um iniciador que forneça grupamentos 3'-OH livres, a partir dos quais serão adicionados desoxinucleosídeos trifosfatos e de cofatores. Além das matrizes naturais, DNA para DNA polimerases e DNA e RNA para transcriptases reversas, matrizes sintéticas podem também ser utilizadas¹⁻⁵. Assim, ácido poli desoxiadênlico, (poli dA), e ácido poli adenilico, (poli rA), podem substituir DNA e RNA, respectivamente.

Para derivados de poli A como matrizes os melhores iniciadores são oligodesoxitimilatos, (oligo dT), de 12 a 18 nucleotídeos, os quais (matrizes-iniciadores) estarão pareados através de ligações de hidrogênio. Para análogos do ácido policitidílico, (poli C), que também servem como

- (³) F. Seon, G. Picard, B. Trémillon, Electroch. Acta, 28-2, 209 (1983).
(⁴) QUARTEX, Appareils de Distillation sans Ebullition (série PB) 19, rue Poliveau, 75005 - Paris.
(⁵) T.M. Florence, G.E. Batley, Crit. Rev. Anal. Chem., 9, 238 (1980).
(⁶) F. Vydra, K. Stulik, E. Julakova, Electrochemical Stripping Analysis, Tabela 2.1 - 1976, Ellis Horwood Limited, England.
(⁷) A.C. Barbosa e R. Combes, a ser publicado.
(⁸) G. Charlot, Analyse Quantitative Minérale, Paris, Masson, 161, 4a. ed., pg. 564-574.

(PIROMINERALIZAÇÃO DE AMOSTRAS COM SAIS FUNDIDOS PARA DETERMINAÇÃO POLAROGRAFICA DE TRAÇOS)

ABSTRACT - The method for the digestion of biological samples in fused KCl-LiCl is improved by decreasing the time of the process.

It is also tested the applicability of the method to polarographic determination of soil samples.

matrizes sintéticas, os iniciadores complementares são oligo desoxiguanilatos, (oligo dG). Estes duplex matrizes-iniciadores são preparados por aquecimento (75°C para poli A-oligo dT; 90°C para poli C-oligo dG) durante 15 minutos e posterior resfriamento à temperatura ambiente⁶. Os quatro desoxinucleosídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) são necessários quando DNA ou RNA são utilizados como matriz; para os sistemas poli A-oligo dT e poli C-oligo dG, serão suficientes apenas dTTP e dGTP, respectivamente. Cátions bivalentes, geralmente Mg^{2+} , são utilizados como cofatores nas reações de síntese de DNA. O papel de íons metálicos nos mecanismos de DNA e RNA polimerases vem sendo estudado pelo grupo de Loeb⁷. Substituindo-se Mg^{2+} por Mn^{2+} como cátion bivalente observou-se um aumento nas afinidades aparentes de DNA polimerase β pela matriz DNA e por dTTP⁸. DNA polimerase $\pm$ pode reconhecer poli rA (matriz sintética do tipo RNA) com uma eficiência maior em presença de Mn^{2+} que de Mg^{2+} ⁹. Entretanto, transcriptase reversa, uma DNA polimerase dependente de RNA, reconhece tanto as matri-

zes naturais (DNA e RNA) quanto sintéticas (poli rA e poli rC) melhor em presença de Mg^{2+} que de Mn^{2+} ^{4,5}. O ácido poli (2'-O-metilcitidílico), (poli Cm), um análogo de poli rC, tem sido utilizado como uma sonda que permite distinguir a transcriptase reversa das outras DNA polimerases celulares; neste aspecto, apenas a enzima viral pode reconhecer tal derivado, sendo a reação cerca de 40 vezes mais eficiente em presença de Mn^{2+} que de Mg^{2+} ¹⁰.

Neste trabalho mostramos os efeitos de dois análogos de poli rA, o ácido poli (2'-O-metiladenílico), (poli Am), e o ácido poli (2'-desoxi-2'-fluoradenílico), (poli dAfl), nas reações catalisadas por transcriptase reversa, de vírus de mieloblastose de aves (AMV).

Cada matriz-iniciador foi preparado previamente, mantendo-se uma proporção de poli xA:oligo dT de 5:1. A mistura de incubação para um volume final de 0,05 ml consiste de: tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,9); ditiotreitól 2mM; albumina de soro bovino 200 µg/ml; KCl 40 mM; $MgCl_2$ 5 mM ou $MnCl_2$ 0,5 mM; 0,2 A_{260} de poli xA; 0,04 A_{260} de oligo dT; (3H)dTTP 10 µM (1.000 cpm/pmol) e 0,65 µg de transcriptase reversa. A incubação era realizada a 37°C por 30 min. A reação era paralizada pela adição de 1 ml de uma solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) 10% contendo 0,1 M de pirofosfato de sódio. Os precipitados eram filtrados através de membranas de nitrocelulose, lavados com TCA 2%, secos, e a radioatividade determinada em um contador de cintilação líquida. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1

Análogos de poli A como matrizes de transcriptase reversa

Foram utilizados como abreviaturas de matrizes-iniciadores: poli (dA)-oligo dT, ((dA)_n-dT₁₂); poli (rA)-oligo dT, ((rA)_n-dT₁₂); poli (Am)-oligo dT, ((Am)_n-dT₁₂) e poli (dAfl)-oligo dT, ((dAfl)_n-dT₁₂).

METAL (mM)	(3H) TMP incorporado (pmol/30min)			
	(dA) _n -dT ₁₂	(rA) _n -dT ₁₂	(Am) _n -dT ₁₂	(dAfl) _n -dT ₁₂
Mg^{2+} 1	3,3	203	1,1	—
Mg^{2+} 2	4,8	261	1,4	50
Mg^{2+} 5	3,6	285	2,2	66
Mn^{2+} 0,1	3,6	280	15,8	—
Mn^{2+} 0,2	6,0	275	28,7	99
Mn^{2+} 0,5	7,0	210	41	82

Poli (dA) é uma matriz pouco eficiente na reação catalisada por transcriptase reversa. Mesmo trabalhando em temperaturas mais baixas (23°C) de maneira a evitar ao máximo a dissociação da matriz-iniciador, alguns autores não lograram um reconhecimento melhor de poli (dA)-oligo dT ¹¹. Provavelmente esta baixa eficiência seja devido à formação de estruturas tríplice-hélices desses desoxipolímeros em so-

lução ¹². O derivado 2'-O-metilado de poli A constituiu-se também uma matriz de baixa eficiência, em presença de Mg^{2+} como cátion bivalente; neste aspecto existe uma diferença do correspondente derivado de poli C ¹⁰. Entretanto, pode-se observar uma similaridade no comportamento desses compostos em presença de Mn^{2+} , onde a atividade de transcriptase reversa é bastante elevada. Já a substituição da hidroxila na posição 2' da ribose de poli A por um átomo de flúor resulta em um derivado eficientemente reconhecido como matriz pela transcriptase reversa ¹³. Poli A 2'-fluorado comporta-se assim, mais como poli (rA) do que como poli (dA). É interessante notar que poli (dUfl) não difere muito do poli U na formação de complexo com poli A ¹⁴. O polímero poli (C) 2'-fluorado assemelha-se mais a poli (rC) do que poli (dC) no que se refere aos espectros de dicroísmo circular, estabilidades térmicas, e interações com o ácido poliinosínico (poli I) ^{15,16}. Conceitualmente o flúor pode formar ligação de hidrogênio semelhante ao observado no tRNA ou polirribonucleotídeos ¹⁷. A impossibilidade de formação de tais ligações de hidrogênio por parte dos polinucleotídeos 2'-O-metilados poderia explicar a baixa eficiência desses compostos como matrizes.

O favorecimento das reações de transcriptase reversa com poli (Am) e poli (Cm) em presença de Mn^{2+} ainda não está bem definido. Para as DNA polimerases em geral aceita-se que Mg^{2+} é o cátion preferido com DNA, enquanto Mn^{2+} é necessário para atividade com polinucleotídeos e polidesoxinucleotídeos ¹⁸. Na realidade Mg^{2+} ou Mn^{2+} seria um segundo cátion bivalente uma vez que DNA polimerases e transcriptase reversa contém quantidades estequiométricas de Zn^{2+} firmemente ligado ⁷. Este outro cátion além do Zn^{2+} , denominado de "cátion ativador" por Loeb ¹⁹, pode ser Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ⁷. Foi demonstrado através de estudos físicos que os cátions metálicos bivalentes interagem com os fosfatos e as bases nos polinucleotídeos ²⁰. Estudos de EPR de DNA polimerase em presença de Mn^{2+} revelaram a existência de 1 sítio ativo de forte ligação ($K_d = 1 \mu M$); 4 sítios de ligação intermediária ($K_d = 29 \mu M$) e cerca de 20 sítios inibitórios, de fraca ligação ($K_d = 0,8 mM$) ²¹. A atividade enzimática seria ativada com Mn^{2+} ocupando o sítio de ligação forte, e inibida, por ocupação do sítio de ligação fraca; observou-se que desoxinucleotídeos, como dTTP interagem com Mn^{2+} nos sítios de ligação forte e intermediária ²¹. Examinando com mais detalhes a estrutura e conformação do complexo ternário polimerase- Mn^{2+} -dTTP, por RNM, Sloan e col ²² concluíram que o papel do metal como ativador é o de coordenar a enzima com os grupos fosfatos α e γ do desoxinucleosídeo trifosfato, permitindo liberação do grupo pirofosfato.

A utilização de Mn^{2+} ou outros cátions bivalentes, em substituição ao Mg^{2+} pode também ser discutida do ponto de vista de fidelidade de síntese de DNA ²³, com relação à incorporação de desoxinucleotídeos não complementares ao produto formado. Estas frequências de erros são bem maiores para a transcriptase reversa que, diferentemente das DNA polimerases celulares, não possui nenhuma atividade exonuclease 3'-5', no sentido de reparar o DNA sintetizado, hidrolizando os desoxinucleotídeos terminais não complementares ²⁴. Assim, por exemplo, utilizando-se poli [d (A-T)] como matriz, em presença de Mg^{2+} , a frequência

de erros, por incorporação do desonucleotídeo dGTP não complementar, é de 1/10.000 para DNA polimerase α de placenta humana, e 1/3.000 para transcriptase reversa de AMV⁷. Observou-se que a frequência de erros aumentava por substituição de Mg^{2+} por outros cátions bivalentes. Para a transcriptase reversa e poli [d (A-T)], a frequência de erros, por incorporação de dCTP, era de 1/1.400, 1/1.100 e 1/600, respectivamente para Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} ²⁵. Esta fidelidade de síntese de DNA dependente do cátion ativador pode estar relacionada com a ligação do metal aos sítos de ligação fraca na enzima causando uma mudança conformacional no sítio ativo. Neste aspecto é interessante notar que a ligação de transcriptase reversa com Be^{2+} , um cátion bivalente não ativador, diminui a fidelidade de síntese de DNA²⁶. Estes íons metálicos que causam aumento na incorporação errada de desoxinucleotídeos são conhecidos como mutagênicos e/ou carcinogênicos. Mostrou-se que o Mn^{2+} é um agente mutagênico *in vivo*²⁷ e *in vitro*²⁸, podendo possuir também propriedades carcinogênicas²⁹.

CONCLUSÃO

Algumas matrizes são mais eficientes em presença de Mn^{2+} que de Mg^{2+} , como cátion bivalente, na síntese de DNA. Devido a sua presença nas células Mg^{2+} é considerado o ativador fisiológico. Do ponto de vista de mecanismo, a substituição de Mg^{2+} por outro cátion, por exemplo, Mn^{2+} , não parece envolver uma substituição simples no sítio ativo, uma vez que existem vários sítios para ligação do metal nas DNA polimerases⁷. Uma explicação possível seria que os íons metálicos se ligariam às bases nas matrizes, alterando suas propriedades de formação de ligações de hidrogênio^{20, 30}. Finalmente, a substituição de Mg^{2+} por Mn^{2+} ou outros cátions bivalentes provoca aumento na frequência de erros durante a síntese de DNA. Entretanto, esta redução na fidelidade de síntese de DNA não está bem definida como sendo a causa de mutagênese pelo metal. É interessante salientar que vários íons metálicos, entre os quais Mn^{2+} , são elementos essenciais na dieta humana, existindo uma faixa de concentração estreita quanto ao nível essencial e ao tóxico.

AGRADECIMENTO

O autor agradece à FAPESP pelo auxílio financeiro recebido.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ A. Kornberg, "DNA Replication", Freeman Co, San Francisco, 1980.
- ² A. Weissbach em "Annual Reviews of Biochemistry", (Editado por E.E. Snell), Annual Reviews Inc. Califórnia, 1977, 46, p. 25.
- ³ M. Fry em "Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification", CRC Press, Florida, 1983, 1, p. 39.
- ⁴ H.M. Temin e S. Mizutani em "The Enzymes", (Editado por P.D. Boyer), Academic Press, New York, 1974, 10, p. 211.
- ⁵ I.M. Verma em "The Enzymes", parte A, (Editado por P.D. Boyer), Academic Press, New York, 1981, 14, p. 87.
- ⁶ B. Fridlender e A. Weissbach, Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 3116 (1971).
- ⁷ A.S. Mildvan e L.A. Loeb, Crit. Rev. Biochem., 6, 219 (1979).
- ⁸ T.S.F. Wang, D.C. Eichler e D. Korn, Biochemistry, 16, 4227 (1977).
- ⁹ K.W. Knopf, M. Yamada e A. Weissbach, Biochemistry, 15, 4540 (1976).
- ¹⁰ G.F. Gerard, F. Rottman e M. Green, Biochemistry, 13, 1632 (1974).
- ¹¹ V.K. Parnaik e M.R. Das, FEBS Lett, 161, 145 (1983).
- ¹² T.M. Tamblay e R.D. Wells, Biochemistry, 14, 1412 (1975).
- ¹³ H. Aoyama, L. Sarih-Cottin, L. Tarrago-Litvak, N. Kakiuchi, S. Litvak e W. Guschlbauer, Biochim. Biophys. Acta, aceito para publicação, (1985).
- ¹⁴ B. Janik, M.P. Kotick, J.H. Kreiser, L.F. Reverman, R.G. Sommer e D.P. Wilson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1153 (1972).
- ¹⁵ W. Guschlbauer, M. Blandin, J.L. Drocourt e M.N. Thang, Nucleic Acids Res. 4, 1933 (1977).
- ¹⁶ N. Kakiuchi, C. Marck, N. Rousseau, M. Leng, E. DeClercq e W. Guschlbauer, J. Biol. Chem., 257, 1924 (1982).
- ¹⁷ P. Bolton e D.R. Kearns, Biochim. Biophys. Acta, 517, 329 (1978).
- ¹⁸ F.J. Bollum, em "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", (Editado por J.N. Davidson e W. E. Cohn), Academic Press, New York, 1974, 15, p. 109.
- ¹⁹ L.A. Loeb, em "The Enzymes", (Editado por P.D. Boyer), Academic Press, New York, 1974, 10, p. 174.
- ²⁰ G.L. Eichhorn e Y.A. Shin, L. Am. Chem. Soc., 90, 7323 (1968).
- ²¹ J.P. Slater, I. Tamir, L.A. Loeb, e A.S. Mildvan, J. Biol. Chem., 247, 2784 (1972).
- ²² D.L. Sloan, L.A. Loeb, A.S. Mildvan e R.J. Feldmann, J. Biol. Chem., 250, 8913 (1975).
- ²³ L.A. Loeb and T.A.unkel, em "Annual Reviews of Biochemistry", (Editado por E.E. Snell), Annual Reviews Inc., California, 1982, 51, p. 429.
- ²⁴ N. Battula, e L.A. Loeb, J. Biol. Chem., 251, 982 (1976).
- ²⁵ M.A. Sirover e L.A. Loeb, J. Biol. Chem., 252, 3605 (1977).
- ²⁶ M.A. Sirover e L.A. Loeb, Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 73, 2331 (1976).
- ²⁷ A. Orgel e L.A. Orgel, J. Mol. Biol., 14, 453 (1965).
- ²⁸ D.K. Dube e L.A. Loeb, Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 1041 (1975).
- ²⁹ G.D. Stoner, M.B. Shimkin, M.C. Troxell, T.L. Thomson e L.S. Terry Cancer Res., 36, 1744 (1976).
- ³⁰ L.G. Marzilli, T.J. Kistenmacher, e G.L. Eichhorn, "Nucleic Acid-Metal Interaction" (Editado por T.G. Spiro), John Wiley & Sons, New York, 1980.