

HIROSHI AOYAMA

ESTUDOS DE MATRIZES E INIBIDORES NAS REAÇÕES
CATALISADAS POR DNA POLIMERASES DEPENDENTES
DE RNA.

Tese de Livre Docência
apresentada ao Instituto
de Biologia da Universi-
dade Estadual de Campi-
nas.

CAMPINAS

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meu pai, e

a minha esposa Célia,

pelo incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Aristodemo Pinotti, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Dr. Crodowaldo Pavan, Digníssimo Diretor do Instituto de Biologia.

A todos os colegas do Departamento de Bioquímica, em especial ao Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pelo apoio e sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Sra. Jedida Nascimento de Souza, pela manutenção das condições de trabalho e pela cordialidade.

Ao Dr. Simon Litvak, Dra. Laura T. Litvak e demais colegas do Institut de Biochimie Cellulaire et Neurochimie (CNRS), Bordeaux, França, pela amável hospitalidade e convivência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão dos auxílios que foram indispensáveis à realização deste trabalho.

INDICE

	pág.
ABREVIATURAS UTILIZADAS	1
RESUMO	3
SUMMARY	5
INTRODUÇÃO	7
DNA polimerases celulares	7
DNA polimerases virais	11
MATERIAL E MÉTODOS	23
Material	23
Métodos	24
Preparação de DNA ativado	24
Preparação de matrizes-iniciadores sintéticos	24
Preparação de RNA 70 S de AMV	24
Preparação de tRNA marcado com ^{32}P em 5' ou 3'	26
Interação transcriptase reversa - tRNA ^{Trp}	27
Atividades enzimáticas	27
Fidelidade de síntese de DNA	29
Purificação de DNA polimerase A de germen de trigo	29
Purificação de DNA polimerases de folhas infectadas por CaMV	31
RESULTADOS	32
Matrizes	32
Ions metálicos	32
Derivados de dNTP: dCf1TP	37
Derivados de matrizes sintéticas com substituição na posição 2'	46
Inibidores	59
Outras DNA polimerases dependentes de RNA	78
DISCUSSÃO	89
APÊNDICE	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AMV	virus de mieloblastose de aves
TYMV	virus do mosaico amarelo do nabo
CaMV	virus do mosaico da couve-flor
ASV	virus de sarcoma de aves
RSV	virus do sarcoma de Rous
RLV	virus de leucemia de Rauscher
LMV	virus de leucemia murina
HTLV	virus de leucemia T humana
LAV	virus associado à linfadenopatia
BSA	albumina de soro bovino
DTT	ditiotreitól
SDS	dodecil sulfato de sódio
cDNA	DNA complementar
dNTP	desoxinucleosídeo trifosfato
dNMP	desoxinucleosídeo monofosfato
dCfl	2'-fluor-2'-desoxicitidina
dCflTP	2'-fluor-2'-desoxicitidina trifosfato
dCzTP	2'-azido-2'-desoxicitidina trifosfato
ddTTP	2',3'-didesoxitimidina trifosfato
NEM	N-etilmaleimida
BE	brometo de etídeo
TMBE	tetrametil brometo de etídeo
dT ₁₂ ou oligo dT	oligo desoxitimidilato
dG ₁₂ ou oligo dG	oligo desoxiguanilato
(rA) _n	ácido poli riboadenílico
(dA) _n	ácido poli desoxirriboadenílico
(Am) _n	ácido poli (2'-O-metiladenílico)
(dAfl) _n	ácido poli (2'-fluor-2'-desoxiadenílico)
(Az) _n	ácido poli (2'-azido-2'-desoxiadenílico)
(rC) _n	ácido poli ribocitidílico
(dC) _n	ácido poli desoxirribocitidílico

(Cm)n	ácido poli (2'-O-metilcitidílico)
(Ce)n	ácido poli (2'-O-etilcitidílico)
(dCfl)n	ácido poli (2'-fluor-2'-desoxicitidílico)
(dUfl)n	ácido poli (2'-fluor-2'-uridílico)
(rU)n	ácido poli uridílico
(rI)n	ácido poli inosínico
NMR	ressonância nuclear magnética
EPR	ressonância eletrônica paramagnética
K _M	constante de Michaelis
K _i	constante de inibição
K _d	constante de dissociação

RESUMO

Este trabalho contém alguns estudos físico-químicos de DNA polimerases dependentes de RNA. Poliaminas, em presença de Mg^{2+} , exercem um efeito ativador nas reações catalisadas por transcriptase reversa de vírus de mieloblastose de aves, mas não por DNA polimerase α de *Xenopus laevis*. Derivados de nucleotídeos e polinucleotídeos foram descritos como substratos e inibidores de transcriptase reversa. dCflTP pode ser incorporado parcialmente no DNA sintetizado por transcriptase reversa e por DNA polimerases celulares α e γ . Análogos de poli A e poli C, com substituintes 2'-fluor e 2'-O-metil, podem ser utilizados como matrizes de síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa, em presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} . O papel do Mn^{2+} na síntese de DNA é discutido neste trabalho. Diferentes compostos foram utilizados como inibidores de síntese de DNA. O antibiótico novobiocina diminui a formação do complexo entre transcriptase reversa e o $tRNA^{Trp}$ iniciador, ligando-se irreversivelmente à enzima. (dCfl)n é um inibidor de transcriptase reversa utilizando-se DNA ativado ou RNA 70 S como matrizes naturais e (dA)n ou (rA)n como matrizes sintéticas. Nas mesmas condições nenhum efeito é verificado nas reações catalisadas por DNA polimerase α . As reações de transcriptase reversa em presença de (dAfl)n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador são resistentes à ação de (dCfl)n e de outros polinucleotídeos inibidores como (rU)n e (rI)n. Entretanto, tais reações são inibidas por outros compostos como brometo de etídeo, tetrametil brometo de etídeo, berenil e N-etilmaleimida.

DNA polimerase A de germen de trigo apresenta características de uma DNA polimerase dependente de RNA. Como a transcriptase reversa, a DNA polimerase A reconhece (rA)n com uma eficiência maior em presença de Mg^{2+} , e é inibida por glicerol e actinomicina D. O reconhecimento de matrizes naturais do tipo RNA somente se verifica utilizando-se desoxinucleosídeos trifosfato de alta atividade específica.

O processo do reverso da transcrição pode ser observado também em vírus de DNA. DNA polimerases purificadas de folhas infec

tadas pelo virus do mosaico da couve-flor reconhecem com eficiência (rA)n, (rC)n, (Cm)n como matrizes sintéticas; são resistentes à ação de afidicolina e são inibidas por brometo de etídeo.

SUMMARY

This work reports some physico-chemical studies on the RNA-dependent DNA polymerase. In the presence of Mg^{2+} , poliamines have an activating effect on the reactions catalyzed by avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, but not on those catalyzed by *Xenopus laevis* DNA polymerase α . Derivatives of nucleotides and polynucleotides have been described as substrates or inhibitors of reverse transcriptase. dCflTP could be partially incorporated in the DNA synthesized by reverse transcriptase and by cellular DNA polymerases α and γ . Poly A and poly C analogues, with 2'-fluoro and 2'-O-methyl as substituents, could be utilized as templates for the DNA synthesis catalyzed by reverse transcriptase, in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} . The role of Mn^{2+} on the DNA synthesis is discussed in this work. The antibiotic novobiocin reduces the complex formation between reverse transcriptase and the primer tRNA^{Trp} binding irreversibly to the enzyme. It has been observed that (dCfl)n was an inhibitor of reverse transcriptase by using activated DNA or 70 S RNA as natural templates and (dA)n or (rA)n as synthetic templates. At the same conditions no effect was verified on the reactions catalyzed by DNA polymerase α . Reverse transcriptase reactions directed by (dAfl)n.(dT)₁₂ as template-primer are resistant to (dCfl)n and to other inhibitor polynucleotides like (rU)n and (rI)n. However, these reactions were inhibited by other compounds like ethidium bromide, tetramethyl ethidium bromide, berenil and N-ethylmaleimide.

Wheat germ DNA polymerase A has shown some RNA-dependent DNA polymerase characteristics. Like reverse transcriptase, DNA polymerase A could recognize (rA)n better in the presence of Mg^{2+} and was inhibited by glycerol and actinomycin D. RNA natural templates could be copied only when high specific activity deoxynucleoside triphosphate was used.

The reverse of the transcription can also be observed in DNA virus. Synthetic templates like (rA)n, (rC)n, (Cm)n were efficiently recognized by DNA polymerases purified from cauliflower

mosaic virus infected leaves; it has been observed that these enzymes were resistant to aphidicolin and inhibited by ethidium bromide.

INTRODUÇÃO

DNA POLIMERASES CELULARES

A síntese de DNA é catalisada por enzimas denominadas DNA polimerases [E.C. 2.7.7.7] (KORNBERG, 1980). Os organismos eucarióticos superiores contêm pelo menos tres DNA polimerases distintas denominadas α , β , e γ , segundo a ordem de suas descobertas (WEISSBACH, 1981; FRY, 1983). Alguns autores sugerem que a DNA polimerase γ e a DNA polimerase mitocondrial são idênticas (ADAMS & KALF, 1980). Foram também descritas purificação e propriedades físicas de uma DNA polimerase δ (LEE et al., 1980).

DNA polimerases α , β e γ . A DNA polimerase α compreende cerca de 50% da atividade polimerásica total de células de mamíferos. Algumas dificuldades tem sido encontradas na purificação e caracterização desta enzima. O peso molecular de DNA polimerase α varia de 130.000 a 170.000 D. Para a matriz natural DNA, Mg^{2+} é o melhor cátion; para matriz-iniciador sintético a reação se processa melhor em presença de Mn^{2+} . A DNA polimerase α é sensível à alta concentração salina e é fortemente inibida por p-cloromercuribenzoato e N-etilmaleimida.

A DNA polimerase β é uma enzima de baixo peso molecular (cerca de 45.000 D) localizada no núcleo celular e de purificação relativamente fácil. Seu pH ótimo em meio alcalino e ponto isoelétrico são distintos das demais polimerases. A enzima é relativamente estável em alta concentração salina e não é inibida por p-hidroximercuribenzoato e N-etilmaleimida.

A DNA polimerase γ compreende apenas 10% da atividade polimerásica celular total. Apesar de purificada extensivamente de várias fontes, não existe uma concordância completa entre suas propriedades físicas e bioquímicas. Esta enzima parece possuir atividade de DNA polimerase dependente de RNA; ela é capaz de reconhecer poli A como matriz sintética. As DNA polimerases α e γ possuem comportamentos similares em colunas de troca iônica e possuem pesos moleculares aproximados. A DNA polimerase γ forma agregados com peso molecular variando de 120.000 a 330.000 D; para evitar este fenômeno

no são necessários alta força iônica e detergente.

Com relação à localização das DNA polimerases, a questão é um tanto complexa. Ao contrário do esperado, DNA polimerases de mamíferos são encontradas no citoplasma. Provavelmente, as DNA polimerases β e γ são de origem nuclear, estando mais ou menos firmemente ligadas ao núcleo; a polimerase γ pode também estar localizada na mitocôndria. Existem controvérsias quanto à localização da DNA polimerase α .

No que se refere às funções, dados indicam que a DNA polimerase α é a responsável pela replicação do DNA cromossomal; a DNA polimerase β parece estar envolvida no processo de reparo do DNA; e a DNA polimerase γ , cujo papel ainda não está bem definido, pode estar envolvida na iniciação de síntese de DNA *in vivo* e na replicação de DNA mitocondrial (SCOVASSI et al., 1980).

Algumas propriedades físico-químicas permitem distinguir as DNA polimerases α , β e γ . Com relação à inibidores, a DNA polimerase β é resistente à ação de N-etilmaleimida (KORNBERG, 1980). A DNA polimerase α é sensível à afidicolina* (HUBERMAN, 1981; SPADARI et al., 1982); e a DNA polimerase γ é a mais inibida por brometo de etídeo (TARRAGO-LITVAK et al., 1978).

Todas as DNA polimerases necessitam de uma matriz e de um iniciador para catalisar a síntese de DNA. *In vitro*, as DNA polimerases utilizam um DNA ativado como matriz, DNA este preparado pela ação de DNase I pancreática para expor grupamentos 3'-OH livres através de quebras na molécula (APOSCHIAN & KORNBERG, 1962). Elas são também capazes de utilizar polinucleotídeos como matrizes sintéticas pareadas com oligodesoxinucleotídeos (iniciadores) por complementaridade de bases. Neste sentido, a DNA polimerase γ reconhece (rA)n com eficiência maior do que o DNA ativado, o que permite distingui-la das DNA polimerases α e β (KNOPF et al., 1976).

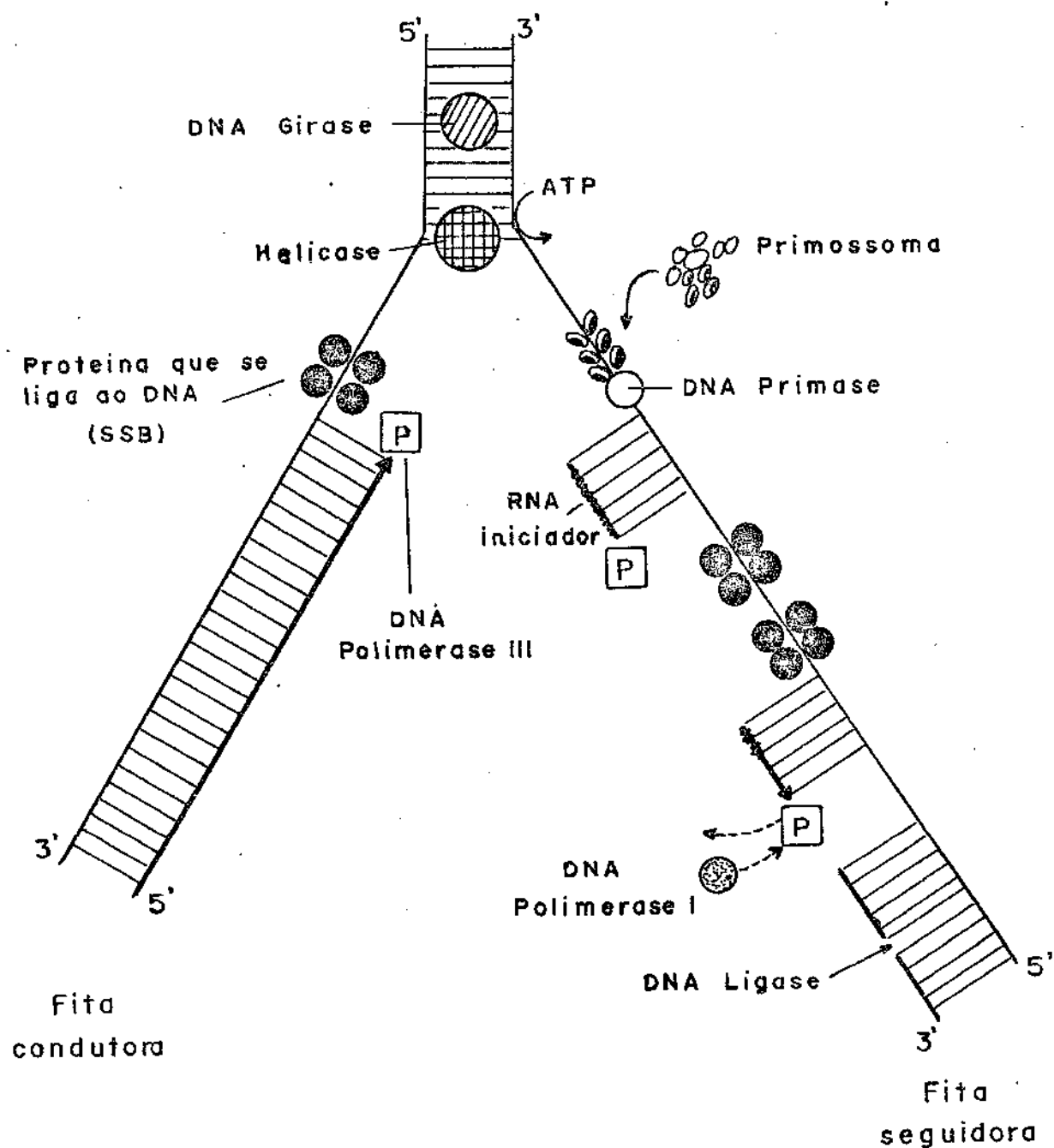
(*) As estruturas de alguns inibidores são apresentadas no Apêndice.

Além dos organismos eucarióticos acima mencionados, tem sido também descritas atividades de DNA polimerases em outros organismos, como, por exemplo, em bactérias (GEFTER, 1975; KORNBERG, 1980; NOSSAL, 1983), e em plantas (MORY et al., 1974; CASTROVIEJO et al., 1979; McKOWN & TEWARI, 1984).

Mecanismo. Em *Escherichia coli*, onde as DNA polimerases são denominadas I, II e III, KORNBERG (1983) propôs um mecanismo para replicação do DNA (V. Esquema 1).

Para replicação é necessário desenrolar o DNA, que possui estrutura fortemente enrolada, e manter as duplas fitas separadas. Um replisoma é um conjunto de enzimas responsáveis pelo avanço da forquilha de replicação. DNA girase (ou DNA topoisomerase, em eucariotos) é uma enzima que promove o desenrolamento do DNA (KAGUNI & KORNBERG, 1984; MIZUUCHI et al., 1984), e helicases são proteínas que mantêm desenrolados curtos fragmentos de DNA próximos à forquilha. O ATP fornece energia para separação das fitas de DNA, as quais uma vez separadas ligam-se à proteínas específicas para fita simples ("single-strand binding proteins") - SSB - que as impedem de se unirem novamente.

A fita condutora é replicada continuamente pela DNA polimerase III. Na fita seguidora (descontínua), em direção oposta ao movimento da forquilha de replicação, RNAs iniciadores são sintetizados por DNA primases ou primossomos (complexos) (STAYTON & KORNBERG, 1983; YAGURA et al., 1983, GROSSE & KRAUSS, 1985), formando-se a seguir fragmentos de Okazaki pela ação de DNA polimerase III.



ESQUEMA 1. Iniciação e alongamento da cadeia de DNA

DNA POLIMERASES VIRAIS

Além das DNA polimerases celulares mencionadas, outras DNA polimerases induzidas por vírus aparecem nas células após infecção viral, notadamente por vírus de tumor de RNA (retrovírus).

Retrovirus. Um interesse crescente com relação aos retrovírus é devido ao fato que eles são capazes de induzir espontaneamente tumores e diferentes formas de leucemias em animais (DULBECCO, 1982; BISHOP, 1983). De acordo com suas características morfológicas os retrovírus podem ser classificados em: tipo D (exemplo: vírus do macaco Mason-Pfizer *); tipo C (exemplos: vírus de sarcoma de Rous; vírus de leucoses de aves; vírus de mieloblastoses de aves); tipo B (exemplo: vírus do tumor mamário de camundongo).

O genoma do retrovírus de ASV é constituído de duas moléculas idênticas de RNA 35 S fita simples, com cerca de 10.000 nucleotídeos e peso molecular de $2-3 \times 10^6$ D. O RNA 35 S possui sequências idênticas nas extremidades 3' e 5', cujos comprimentos variam de acordo com o vírus; na extremidade 3' existe uma região de poli A, e na 5', uma estrutura cap.

Quatro genes foram identificados até o momento no genoma do vírus de sarcoma de aves:

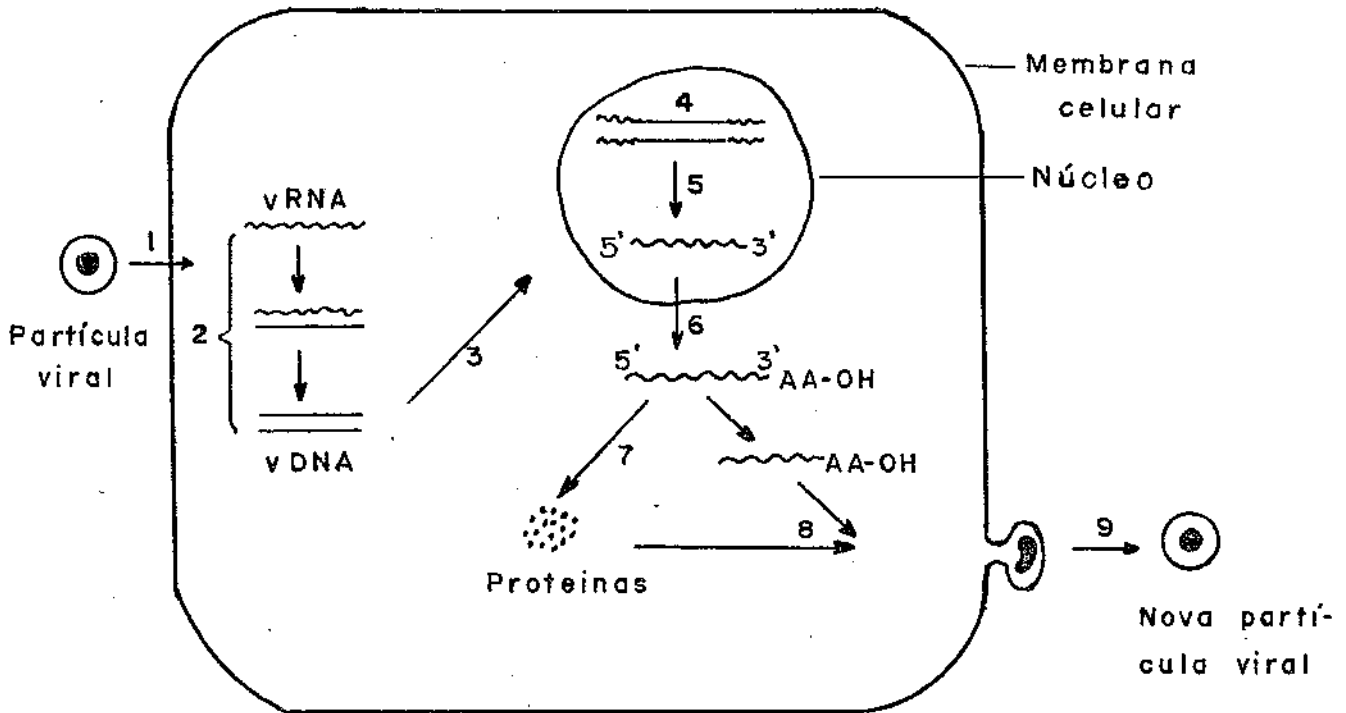
gag, codificando para as proteínas estruturais internas;
pol, codificando para transcriptase reversa (V. adiante);
env, codificando para a glicoproteína do envelope viral;
src, codificando para a proteína quinase, responsável pela transformação tumoral (WEISS & FARAS, 1983).

RNA 5' | gag | pol | env | src | 3'

(*) Os nomes em inglês dos vírus encontram-se no Apêndice.

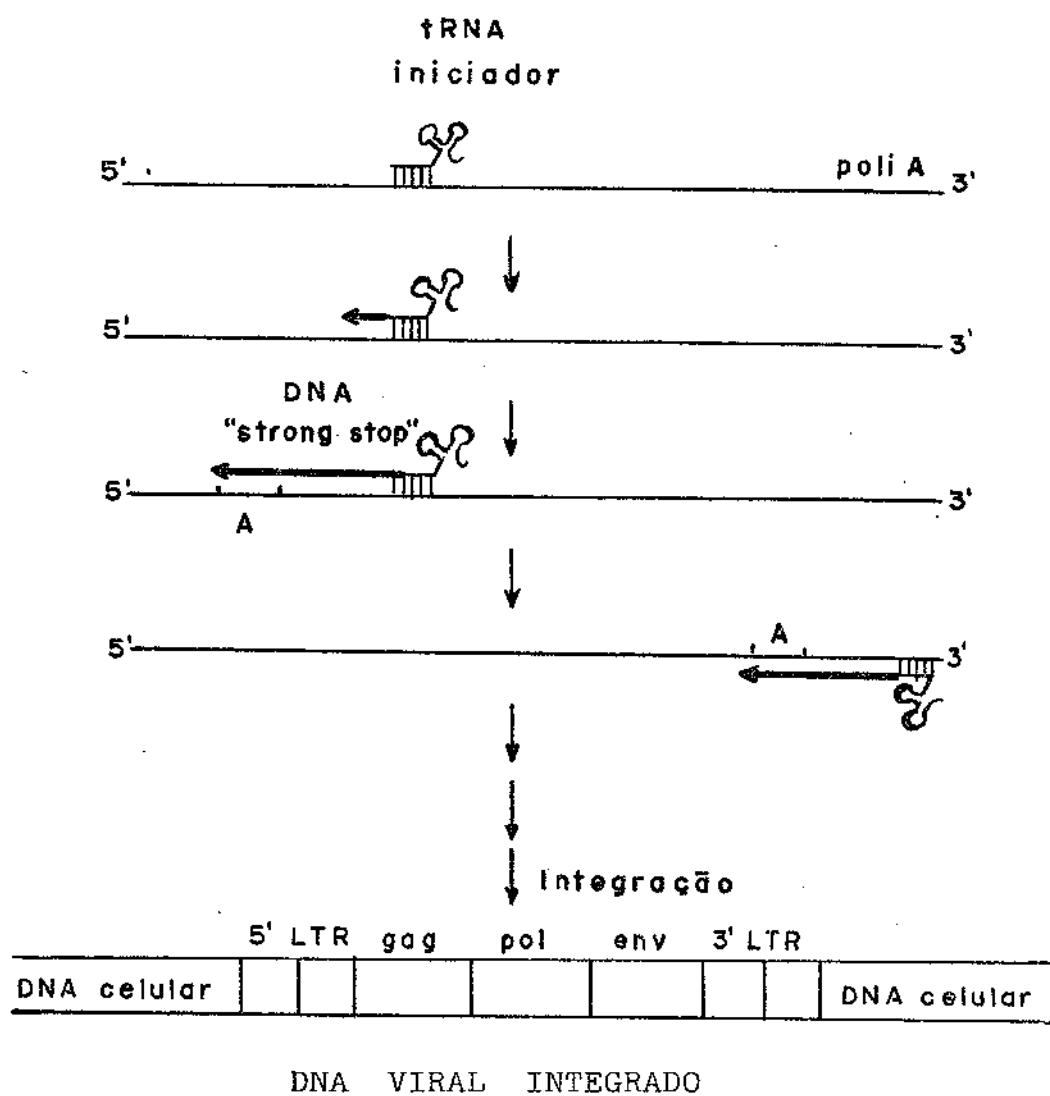
Durante o ciclo de vida do vírus de tumor de RNA (V. Esquema 2), logo após infecção, o RNA viral é transcrito em DNA dupla fita, provavelmente através de um híbrido RNA-DNA como um intermediário. O DNA é circularizado (DNA proviral) e transportado para o núcleo, onde é integrado ao genoma do hospedeiro por um mecanismo ainda desconhecido. Este DNA é então transcrito, provavelmente por uma RNA polimerase celular, dependente de DNA. Uma vez no citoplasma, o mRNA viral contendo poli A tem dois destinos: servir como mensageiro para síntese de proteínas virais, e encapsidação por proteínas específicas, sendo que os virions maduros se movem para a superfície celular.

Mecanismo. O mecanismo do reverso da transcrição ainda não está bem estabelecido (VERMA, 1981). A localização do tRNA iniciador (matrizes e iniciadores serão vistos mais adiante) é próxima à extremidade 5' da matriz RNA 35 S (V. Esquema 3). A síntese do DNA viral tem início na extremidade 3'-OH do tRNA e se processa em direção ao terminal 5' do genoma. Para RNA 35 S de RSV e usando-se o tRNA^{Trp} como iniciador, o DNA produzido possui 101 nucleotídeos e foi denominado DNA "strong stop" por HASELTINE et al. (1977). Este DNA (-) "strong stop", cujos últimos 21 resíduos são complementares a ambas as sequências dos terminais 5' e 3', pode pular da extremidade 5' para 3' da matriz e funcionar como um iniciador para transcrição do genoma viral inteiro. Os eventos que se seguem são a síntese do DNA (+), que parece iniciar em um único sítio (MITRA et al., 1982), e eliminação do tRNA iniciador. A molécula de DNA linear possui em ambas as extremidades duas sequências repetidas LTR ("long terminal repeats") que contém informações derivadas de ambos os terminais da matriz de RNA viral. Estes terminais repetidos parecem ajudar a integração ordenada do DNA viral no genoma do hospedeiro; e contém sequências reguladoras que modulam a eficiência da transcrição proviral (GRONER & HYNES, 1982).



- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Penetração | 6. Processamento e transporte |
| 2. Transcrição reversa | 7. Tradução |
| 3. Transporte do provirus ao núcleo | 8. Reunião do virion |
| 4. Integração | 9. Maturação do virion |
| 5. Transcrição | |

ESQUEMA 2. Ciclo de vida dos virus de tumor de RNA
(VERMA, 1977)



ESQUEMA 3. Mecanismo do reverso da transcrição de RNA 35 S viral

Transcriptase reversa. Os retrovirus possuem uma DNA polimerase capaz de transcrever fielmente RNA em DNA complementar. Estas DNA polimerases dependentes de RNA, inicialmente descritas por BALTIMORE (1970) e por TEMIN & MIZUTANI (1970), são mais comumente conhecidas como transcriptases reversas (TEMIN & MIZUTANI, 1974; SARNGADHARAN et al., 1978; VERMA, 1981).

A transcriptase reversa de AMV possui um peso molecular de 170.000 D e é constituída de duas subunidades: α (peso molecular 65.000 D) e β (peso molecular 95.000 D). As transcriptases reversa apresentam tanto atividades sintéticas quanto degradativas. A atividade sintética é caracterizada por atividade de DNA polimerase e a atividade degradativa é caracterizada por atividade de ribonuclease H. A enzima possui tanto atividade de DNA polimerase dirigida por RNA quanto a dirigida por DNA, sendo ambas inseparáveis e parecendo compartilhar um sítio ativo comum. A atividade de RNase H associada à transcriptase reversa degrada especificamente RNA de um híbrido DNA-RNA. O papel da atividade RNase H durante o processo de reverso da transcrição ainda não está bem esclarecido (OMER & FARAS, 1982; OLSEN & WATSON, 1985). Diferentemente da transcriptase reversa de virions purificados, a enzima induzida por virus dentro da célula é de difícil purificação devido à existência das outras DNA polimerases e de inibidores como proteases e nucleases. YANG et al. (1972) conseguiram isolar atividade de transcriptase reversa na fração do "pellet" microssomal de células do baço de camundongo infectado por virus da leucemia murina. Para extração da enzima desta fração subcelular foram necessários alta força iônica (0,5 M de KCl) e detergente não iônico (0,5% de Nonidet P-40).

A transcriptase reversa, como as outras DNA polimerases, necessita de uma matriz, e de um iniciador com uma extremidade 3'-OH livre para iniciar a síntese de DNA. A matriz natural é o RNA genômico viral (RNA 70 S), e o iniciador natural é um RNA 4 S ligado por pontes de H ao RNA 35 S (FARAS et al., 1974). Para AMV, o iniciador é um tRNA específico para triptofano (tRNA^{Trp}), o que foi confirmado por determinação da sequência de nucleotídeos e pela identificação do anticodon (HARADA et al., 1975; TAYLOR, 1977).

O DNA dupla fita é inativo como matriz-iniciador, a menos que grupos 3'-OH sejam introduzidos (HURWITZ & LEIS, 1972; FARAS et al., 1972). Para que a matriz RNA viral seja copiada eficientemente *in vitro* pela transcriptase reversa é necessário a presença de um iniciador que vai interagir com a matriz (DUESBERG et al., 1971).

As transcriptases reversas podem também utilizar polinucleotídeos como matrizes sintéticas, sendo necessário a presença de um iniciador (BALTIMORE & SMOLER, 1971; ROBERT et al., 1972). Desoxirribooligômeros são mais eficientes que ribooligômeros como iniciadores; derivados de poli A como matrizes necessitam de oligo(dT) como iniciador, e derivados de poli C necessitam de oligo(dG). Estes homopolímeros sintéticos tem-se mostrado mais eficientes que DNA ou RNA naturais como matrizes-iniciadores de transcriptase reversa (KACIAN et al., 1971; FARAS et al., 1972).

Várias tentativas tem sido feitas no sentido de se encontrar matrizes-iniciadores específicos que permitam distinguir as DNA polimerases virais das DNA polimerases celulares (GOODMAN & SPIEGELMAN, 1971; ROBERT et al., 1972; WELLS et al., 1972). (rC)_n. (dG)₁₂ é uma matriz ativa para DNA polimerases de vírus, mas é pouco eficiente como matriz de DNA polimerases celulares (WEISSBACH et al., 1972). GERARD et al. (1974) sugeriram que a matriz (Cm)_n com grupamento O-metil na posição 2', era específica para DNA polimerases dependentes de RNA. Não apenas o tamanho e a capacidade de formação de pontes de H, mas também as diferenças nas eletronegatividades dos 2'-substituintes são importantes para diferenciar vários análogos em seus comportamentos como DNA ou RNA. Assim, um considerável interesse tem sido despertado no estudo de nucleotídeos e seus polímeros 2'-substituídos. Alguns autores mostraram que o ácido poli 2'-O-etilcitidílico era uma matriz pobre (MIKKE et al., 1976), e o ácido poli-2'-fluor-2'-desoxiadenílico (DeCLERCQ et al., 1979) era uma matriz para transcriptase reversa.

Inibidores. Não existe descrito um inibidor que seja específico apenas para a transcriptase reversa viral. Um dos problemas neste estudo é que inibidores potentes e muito específicos, em geral, não são disponíveis (CHANDRA et al., 1977; COZZARELLI, 1977). Os compostos citotóxicos utilizados na quimioterapia do cancer podem agir interferindo com eventos específicos nos passos de biossíntese de DNA. O vasto número de compostos que inibem DNA polimerases de virus oncogênicos podem ser classificados em:

- compostos que se ligam à enzima. Ex.: derivados de rifamicina (GURGO et al., 1971).
- compostos que se ligam à matriz. Ex.: adriamicina, daunomicina, brometo de etídeo (CHANDRA et al., 1972; FRIDLENDER & WEISSBACH 1971; CHAIRES et al., 1985).
- análogos de substrato. Ex.: arabinosil CTP (TUOMINEN & KENNEY 1972).
- análogos de matrizes-iniciadores. Ex.: derivados de timidilato; polinucleotídeos modificados (CHANDRA et al., 1975; MIKKE et al., 1976).

O ácido fosfonofórmico parece inibir mais a DNA polimerase do virus da hepatite B que DNA polimerases celulares, por interação com a enzima no sítio de ligação do pirofosfato (SUNDQUIST & OBERG, 1979).

Uma vez que a transcriptase reversa é uma Zn^{2+} metalo-enzima, ela é inibida por agentes quelantes, como ortofenantrolina (POIESZ et al., 1974).

Alguns autores descreveram a existência de um inibidor de transcriptase reversa em placenta humana (NELSON et al., 1981), e no citoplasma de cultura de células (ROKUTANDA et al., 1982 e 1984).

Com algumas exceções, reagentes químicos utilizados como agentes antivirais são análogos de nucleosídeos (DeCLERCQ, 1981 e 1982). (dUfl)n inibe a replicação de virus da estomatite vesicular em células de camundongo (GROSCH & ERICKSON, 1975) e a atividade de DNA polimerase dependente de RNA de AMV (ERICKSON & GROSCH, 1974 ; ERICKSON, 1975). Análogos de poli U e poli C, com azida na posição

2' inibem a atividade de DNA polimerase dependente de RNA de vírus de sarcoma e leucemia murina (DeCLERCQ et al., 1975).

A utilização de interferon como uma substância antiviral específica não está bem definida (GRESSER & TOVEY, 1978; JOKLIK, 1980; PETSKA & BARON, 1981; CLEMENS, 1985). O interferon parece exercer seu efeito antiviral, pelo menos em parte, controlando a tradução de mRNAs virais, podendo também afetar células normais (SEN, 1982; LENGUEL, 1982; SAMUEL & KNUTSON, 1982). Por outro lado, enzimas induzidas por interferon podem participar do processo antiviral, por exemplo, a 2',5'-oligoadenilato sintetase, que é capaz de adicionar um dinucleotídeo adenosina no terminal CCA do tRNA (JUSTESEN et al., 1980). O antibiótico tunicamicina intensifica o efeito inibidor de interferon na multiplicação viral e crescimento celular (MAHESHWARI et al., 1983).

Outras DNA polimerases dependentes de RNA. A descoberta da enzima transcriptase reversa em vírus de tumor de RNA envolvidos na etiologia de leucemias e sarcomas de várias espécies animais levou vários autores a examinarem células humanas leucêmicas para uma atividade enzimática similar. Uma atividade semelhante à de transcriptase reversa viral foi rapidamente detetada em células de pacientes com leucemia (SARNGADHARAN et al., 1972; BAXT et al., 1972). Posteriormente, CHANDRA & STEEL (1977) observaram que o baço de uma criança com síndrome mielofibrótica, uma desordem pré-leucêmica, continha elevados níveis de transcriptase reversa.

Entre várias outras atividades polimerásicas é interessante citar a "enzima particulada" descrita por BAUER & HOFSCHNEIDER (1976) e BAUER et al. (1978). Esta atividade de DNA polimerase dependente de DNA está presente no fluido alantóico de ovos de galinha (precipitado de 27.000 rpm), e possui algumas propriedades semelhantes as da transcriptase reversa. Esta enzima particulada de fluido alantóico de galinha tem o seu paralelismo em mamíferos. Muitas espécies de mamíferos possuem partículas de vírus oncogênicos em suas placentas. MAYER et al. (1974) purificaram uma transcriptase reversa de placenta de macacos Rhesus, com propriedades características da enzima viral. MONDAL (1977) descreveu também uma enzima

particulada purificada do fluido amniótico humano, que, como a transcriptase reversa viral, reconhecia $(rC)n.(dG)_{12}$ e mRNA como matrizes.

Ainda é desconhecido o significado da presença de vírus oncogênicos em fluidos biológicos, não se conhecendo também até o momento qualquer doença específica que possa estar associada a estes vírus da placenta.

Outras DNA polimerases dependentes de RNA foram purificadas de cultura de células de tecidos humanos (FRIDLENDER et al. , 1972), e de células normais de ovários de *Xenopus laevis* (BROWN & TOCCHINI-VALENTINI, 1974). A matriz preferida por estas enzimas é o $(rA)n.(dT)_{12}$, em relação a $(dA)n.(dT)_{12}$ e ao DNA.

Propriedades imunológicas. Na maior parte das vezes, a caracterização de transcriptases reversas intracelulares baseada apenas em propriedades bioquímicas não é segura. Assim, técnicas imunológicas podem ser utilizadas na caracterização de transcriptase reversa viral e na sua distinção de enzimas da célula hospedeira. Este enfoque imunológico permite chegar a algumas observações, como, por exemplo: a transcriptase reversa de cada vírus tem propriedades imunológicas distintas, permitindo distingui-la das correspondentes atividades de outros vírus; nenhuma reatividade imunológica cruzada é observada entre transcriptase reversa de vírus pertencentes a diferentes classes; não se observa reação cruzada entre duas enzimas de uma mesma classe de vírus, porém de diferentes organismos (PARKS et al., 1972; BAUER & HOFSCHEIDER, 1976; CHANDRA & STEEL, 1977 ; KRAKOWER et al., 1977; WEIS et al., 1983).

Reverso da transcrição em vírus de DNA. O fenômeno do reverso da transcrição não está restrito apenas aos retrovírus (VARMUS 1982); alguns vírus de DNA, como por exemplo, o vírus da hepatite B e o vírus do mosaico da couve-flor parecem replicar através deste processo. SUMMERS & MASON (1982), trabalhando com vírus da hepatite B de pato, um vírus de DNA semelhante ao vírus da hepatite B humano, obtiveram a síntese de DNA (-) fita simples partindo de uma matriz RNA que era degradada após a cópia, e caracterizaram o complexo de replicação. Este fato levou alguns autores a observar que a replica

ção do CaMV, um vírus de DNA de plantas, que possui alguns aspectos comuns com o vírus da hepatite B, se processava também através de um reverso da transcrição (GUILLEY et al., 1982; HULL & COVEY, 1983; PFEIFFER & HOHN, 1983). Uma caracterização de uma atividade de DNA polimerase, específica para tecidos infectados por CaMV foi apresentada por VOLOVITCH et al. (1984); a enzima mostra uma capacidade de copiar poli C e regiões heteropoliméricas de mRNA.

Outros elementos genéticos eucarióticos como pseudogenes, sequências repetitivas e elementos de transposição parecem depender de transcriptases reversas para suas existências ou ampliações. Pseudogenes são sequências homólogas a genes funcionais contendo mudanças mutacionais que impedem a formação de um produto funcional, por exemplo, pseudogenes para β -globulina humana (WILDE et al., 1982), pseudogenes para pequenos RNAs nucleares (srna) humanos (BERNSTEIN et al., 1983). Elementos do tipo Alu, substratos de enzimas de restrição Alu, são sequências curtas de DNA repetitivo, encontradas dispersas no genoma de mamíferos (SHARP, 1983). A presença em cultura de células de *Drosophila melanogaster* de partículas do tipo retrovírus contendo moléculas de RNAs homólogas ao elemento de transposição *copia* fornece evidências que sugerem uma relação evolucionária entre retrovírus e elementos genéticos de transposição (SHIBA & SAIGO, 1983, FINNEGAN, 1983 e 1985).

Desde que BALTIMORE (1970) e TEMIN & MIZUTANI (1970) descreveram a atividade de transcriptase reversa em vírus de RNA, inúmeras contribuições tem sido apresentadas ao longo do tempo. Ainda hoje a transcriptase reversa é alvo de grandes atenções (VARMUS, 1985), embora vários aspectos, como, por exemplo, a função desta enzima viral, ainda não estejam definitivamente estabelecidos (SKALKA et al., 1984; BALTIMORE, 1985). Entretanto, é inegável que a transcriptase reversa é uma ferramenta essencial na tecnologia do DNA recombinante. Assim, neste aspecto, é bastante importante a clonagem e expressão de transcriptase reversa em bactérias. ROTH et al. (1985) e KOTEWICZ et al. (1985) descreveram a purificação e caracterização de transcriptase reversa de vírus de leucemia murina de Moloney expressa em *E. coli*. A proteína contida no extrato bruto da fração solúvel foi purificada através de várias cromatografias de

coluna; possuía peso molecular de 71.000 D e apresentava atividades de RNase H e de transcriptase reversa. Reconhecimento de mRNAs e outras características físico-químicas foram descritos para esta enzima.

Para finalizar, um tema bastante atual e polêmico, cabível nesta Introdução, é sem dúvida o que se refere à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causada por retrovirus, tendo sido inicialmente isolados e caracterizados dois subgrupos do vírus da leucemia T humana (HTLV I e HTLV II), como possíveis candidatos. Entretanto, dois outros vírus isolados recentemente podem ser os agentes primários causadores da AIDS: um isolado pelo grupo de Robert Gallo, no National Cancer Institute (EUA), denominado HTLV III, e outro isolado pelo grupo de Luc Montagnier, no Institut Pasteur (França), denominado LAV, um vírus associado a linfadenopatia. Estes dois vírus possuem propriedades muito similares e podem ser um único vírus. Diferentemente de HTLV I e HTLV II, porcentagens muito maiores de anticorpos para HTLV III e/ou LAV foram encontradas em pacientes com AIDS ou pré-AIDS (POPOVIC et al., 1984; GALLO et al., 1984; SCHUPBACK et al., 1984; SARNAGADHARAN et al., 1984; ROBERT-GUROFF et al., 1985; MONTAGNIER et al., 1985).

A estrutura genética do vírus em questão foi estabelecida no início de 1985 pela identificação de seus 9.193 nucleotídeos. Este trabalho foi efetuado por quatro equipes trabalhando independentemente: a do Institut Pasteur, em Paris; a do National Cancer Institute, em Bethesda; e a de duas firmas de biotecnologia Chiron e Genentech, ambas em San Francisco (WAIN-HOBSON et al., 1985).

Com a descoberta do vírus, inúmeras drogas antivirais tem sido descritas na terapêutica da AIDS, como, por exemplo, suramina, ribavirina, HPA-23. DORMONT et al. (1985) observaram uma inibição das DNA polimerases dependentes de RNA de retrovirus da AIDS humana e de macacos por HPA-23 (amônio-21-tungsto-9-antimoniato). A inibição é do tipo competitiva em relação à matriz sintética (rA)n.(dT)₁₂ sugerindo que a interação da droga com a enzima ocorre provavelmente no sítio de ligação da matriz-iniciador. Os primeiros resultados de ensaios clínicos de HPA-23 são encorajadores uma vez que se ob-

servou uma diminuição na produção de vírus pelos linfócitos do doente após tratamento (ROZENBAUM et al., 1985). Muito provavelmente o próximo passo para uma terapêutica mais eficaz da AIDS será o desenvolvimento de uma vacina.

A presente tese propõe estudos com DNA polimerases dependentes de RNA, não como ferramenta, como em clonagem molecular, mas do ponto de vista enzimático. Neste sentido, os seguintes pontos serão focalizados:

- novas características físico-químicas nas reações catalisadas por transcriptase reversa de AMV. Neste item estão incluídos aspectos como efeito de poliaminas, em substituição ao Mg^{2+} ; papel do análogo 2'-fluorado de dCTP; derivados de poli A e poli C, com fluor e O-metila na posição 2', como matrizes e inibidores; inibição por novobiocina e agentes intercalantes de DNA. Em alguns casos foram feitos estudos comparativos com a síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α , por estar esta implicada com a replicação, e por DNA polimerase γ , por reconhecer a matriz (rA)n como a enzima viral.

- algumas propriedades físico-químicas de DNA polimerase A de germen de trigo (do tipo de DNA polimerase γ animal) no sentido de caracterizá-la como uma DNA polimerase dependente de RNA.

- algumas propriedades cinéticas de DNA polimerases purificadas de folhas infectadas com o vírus do mosaico da couve-flor.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Virus de mieloblastose de aves e transcriptase reversa de AMV foram obtidos do Dr. J.W. Beard (Life Science Inc., St.Petersburg, Florida, USA), purificados a partir de plasma de aves apresentando uma mieloblastose no último estágio (HOUTS et al., 1979). Transcriptase reversa de AMV (Seikagaku America) foi também gentilmente cedida por Dr. R. Brentani (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Cancer, São Paulo).

DNA polimerase α foi purificada de ovócitos de *Xenopus laevis* como descrito por ZIMMERMAN & WLISSBACH (1981).

DNA polimerase γ foi purificada de células de camundongo como descrito por TARRAGO-LITVAK et al. (1978).

Os seguintes reagentes foram obtidos da Sigma: (dA)n, (rA)n, (rC)n, dATP, dCTP, dGTP, TTP, ddTTP, (rU)n, (rI)n, NEM, DNA (timo de bezerro), DNase I (*Escherichia coli*), DNA-celulose, nonidet P-40, espermina, espermidina, RNaseA (pâncreas bovino), RNase T₂ (*Aspergillus oryzae*), fosfatase alcalina, polinucleotídeo quinase, fosfodiesterase, nucleotidil transferase, mRNA (levedura de padeiro), mRNA (globina de coelho), novobiocina, actinomicina D, brometo de etídeo.

Da P.L. Biochemicals foram obtidos: (dC)n, (Cm)n, (Am)n, dT₁₂, dG₁₂, [³H] dNTP, [³²P] NTP, [³²P] dNTP foram obtidos da New England Nuclear.

Foram gentilmente cedidos os seguintes reagentes: dCflTP, (dAfl)n e (dCfl)n por Dr. W. Guschlbauer (Service de Biochimie, CEN Saclay, França); tRNA^{Trp} por Dr. B. Labouesse (IBCN, Bordeaux, França); RNA de TYMV por Dr. C. Mouchés (INRA, Bordeaux, França); afidicolina por Dr. A.H. Todd (Imperial Chemical Ind.Ltd, Inglaterra); tetrametil brometo de etídeo por Dr. J.B. LePecq (Villejuif, França).

Métodos

Preparação de DNA ativado

Na preparação de DNA ativado foi utilizado o método de APOSHIAN & KORNBERG (1962). A uma solução 1 mg/ml de DNA nativo de timo de bezerro, foram adicionadas diferentes quantidades de DNase I; as alíquotas foram incubadas a 30 °C por 15 min e depois outros 15 min a 75 °C, isto para inativar a DNase I. Em seguida, deixou-se a solução esfriar à temperatura ambiente e testou-se a capacidade de incorporação de [^3H] TMP dos diferentes DNAs ativados obtidos. As frações contendo atividade elevada foram reunidas.

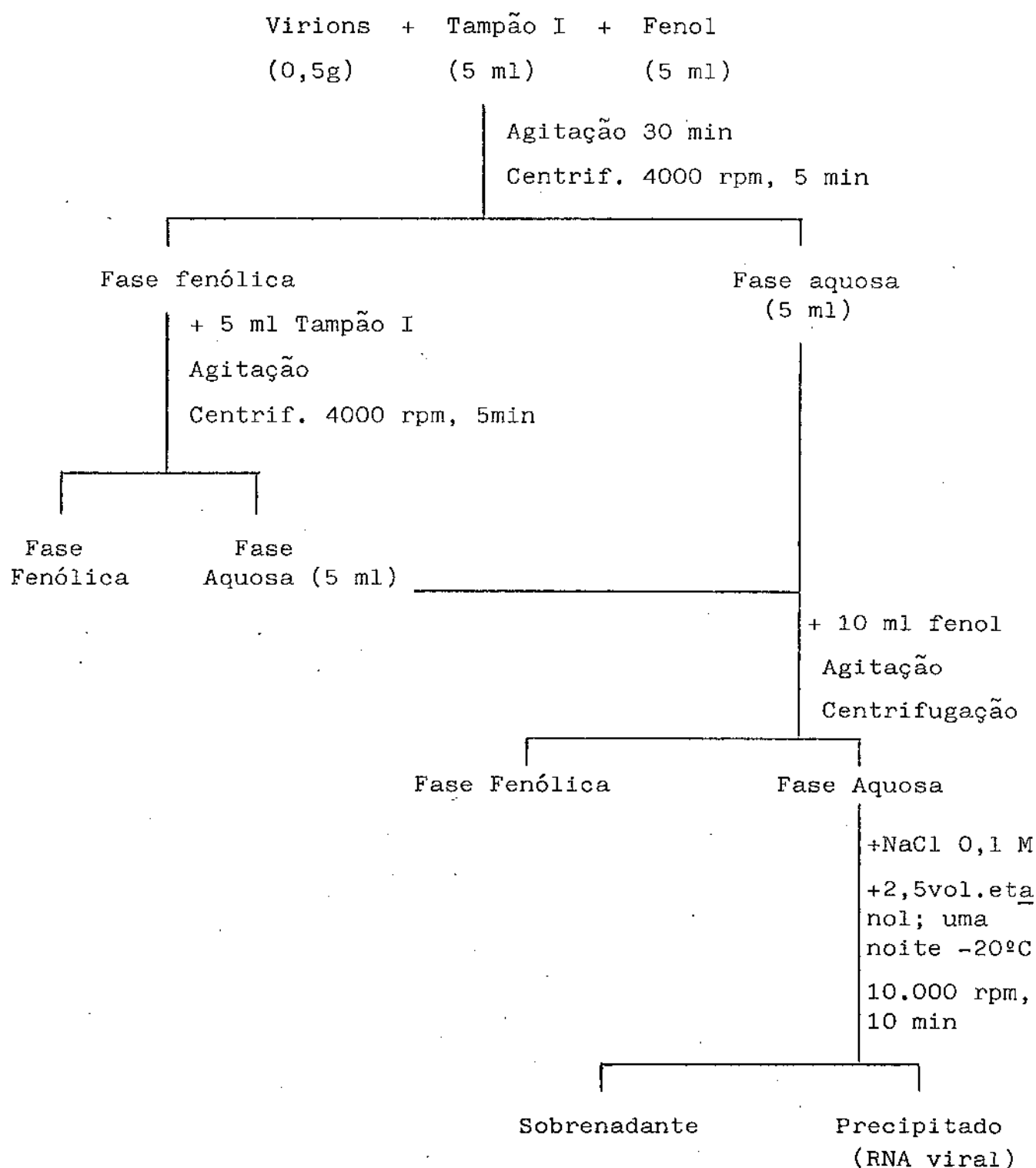
Preparação de matrizes-iniciadores sintéticos

O pareamento das duplas fitas de polinucleotídeos com oligodesoxinucleotídeos complementares (matrizes-iniciadores) foi realizado de acordo com o método descrito por FRIDLENDER & WEISSBACH (1971), com algumas modificações. Soluções contendo 2 A₂₆₀/ml de derivados de poli A e 0,4 A₂₆₀/ml de dT₁₂ em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) foram aquecidas a 75 °C por 15 min e depois, deixadas esfriar à temperatura ambiente por 30 min. Para análogos de poli C, a melhor relação foi 4 A₂₆₀/ml do polinucleotídeo e 0,4 A₂₆₀/ml de dG₁₂, sendo o pareamento mais eficiente a 90 °C, por 15 min.

Preparação de RNA 70 S de AMV

O RNA viral foi preparado a partir de virions congelados, realizando-se uma extração fenólica, seguida de várias centrifugações (COFFIN & BILLETER, 1976).

A 0,5 g de virions congelados adicionou-se uma mistura (vol/vol) de tampão I (Tris-HCl 20 mM, pH 8; 5 mM EDTA; 1% SDS) e fenol destilado saturado de tampão I. Agitou-se por 30 min (Vortex) e procedeu-se a seguir a uma série de centrifugações (V. Esquema 4).



ESQUEMA 4. Purificação de RNA de AMV

O RNA 70 S viral foi preparado utilizando-se o método descrito por MOELLING et al. (1979). O RNA foi colocado sobre um gradiente de glicerol 10-30% em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,4); 0,2% SDS; 0,1 M NaCl e 1 mM EDTA, e centrifugado durante 1 h a 22°C a 200.000xg. O material foi coletado com auxílio de uma bomba peristáltica (8 gotas por tubo; cerca de 0,25 ml) e cada fração foi diluída a 0,5 ml com tampão I para leitura de A_{260} . O pico de RNA 70 S obtido foi em seguida precipitado pela adição de acetato de potássio 0,2 M (pH 4,5) e dois volumes de etanol, deixando-se a - 20 °C.

Preparação de tRNA marcado com $[^{32}P]$ na posição 5' ou 3'

A marcação de tRNA com $[^{32}P]$ foi feita de acordo com o método descrito por ARAYA et al. (1979). Foi utilizado tRNA^{Trp} purificado de fígado bovino (FOURNIER et al., 1976).

Marcação na extremidade 5'

O tRNA foi inicialmente desfosforilado pela fosfatase alcalina. 50 µl de uma solução contendo tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8), 0,1% SDS, 2-10 µg tRNA e 0,1 unidade de fosfatase alcalina foram incubados a 60 °C por 1 h. A seguir foram feitas 2 extrações fenólicas de 20 µl cada; extração aquosa das 2 fases fenólicas; 4 extrações com éter etílico de 200 µl cada, evaporação do éter à temperatura ambiente. e precipitação da fase aquosa com 2,5 vol de etanol, após adição de acetato de sódio 0,3 M (pH 6).

O tRNA foi então fosforilado pela polinucleotídeo quinase em presença de $[^{32}P]$ ATP. 50 µl de uma solução contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM espermidina, 1 mM β-mercaptoetanol, 300 µCi de ATP γ $[^{32}P]$ e 2 unidades de polinucleotídeo quinase foram incubados a 37 °C por 30 min. Extração fenólica e precipitação com etanol foram realizadas como descrito.

Marcação na extremidade 3'

Inicialmente removeu-se o terminal CCA-3' do tRNA na presença de fosfodiesterase. 25 µl de uma solução contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8), 10 mM $MgCl_2$, 5-19 µg tRNA e 0,25 µg fosfodiesterase foram incubados a 20 °C por 10 min. Extração fenólica e precipitação com etanol foram efetuados como descrito na marcação da extremidade

5'.

A marcação do tRNA foi feita pela nucleotidil transferase (CCase), em presença de ATP α [^{32}P]. 5 μl de uma solução de tRNA sem CCA (1 mg/ml) e 100 μCi de ATP α [^{32}P] foram incubados com 5 μl de uma solução contendo Tris-glicina 100 mM (pH 8,5), 20 mM MgCl_2 , 15 mM DTT, 0,1 mM CTP, 0,5 mg/ml CCase, a 37 °C por 45 min. Extração fenólica e precipitação com etanol foram realizadas como descrito.

Interação transcriptase reversa - tRNA^{Trp}

A interação entre a transcriptase reversa e o tRNA^{Trp} foi realizada por filtração em gel, de acordo com o método de PANET et al. (1975). A mistura de incubação para um volume final de 0,2 ml consistia de Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), 60 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoetanol, 10 mM MgCl_2 , 5% (v/v) glicerol, 0,1% nonidet P-40, 0,17 μM de transcriptase reversa, 0,17 μM de tRNA^{Trp} marcado na extremidade 3' com [^{32}P], e 0,5 mM novobiocina, quando indicado. Após incubação por 10 min, em gelo, a amostra foi filtrada através de uma coluna de Sephadex G-100 (0,7 x 57 cm) equilibrada previamente com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 50 mM acetato de sódio, 10 mM β -mercaptoetanol, 0,1% EDTA, 10% glicerol e 0,1% nonidet P-40. Frações de 0,2 ml foram coletadas e atividade de transcriptase reversa foi determinada em alíquotas de 20 μl utilizando-se DNA ativado ou (rA)n.(dT)₁₂ como matriz. Radioatividade de tRNA^{Trp} foi determinada em alíquotas de 0,1 ml utilizando-se reagente de Bray como mistura de cintilação.

Atividades enzimáticas

As atividades de transcriptase reversa e DNA polimerases foram determinadas utilizando-se diferentes matrizes.

DNA ativado

Para um volume final de 0,05 ml, o meio de incubação continha: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM KCl, 6 mM acetato de magnésio, 2 mM DTT, 200 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 20 $\mu\text{g/ml}$ DNA ativado, 100 μM dCTP, 100 μM dGTP, 100 μM dATP, 5 μM [^3H] TTP (5.000-20.000 cpm/pmol). A reação.

foi iniciada pela adição de enzima (15 µg DNA polimerase α ou 0,65 µg transcriptase reversa), incubando-se 30 min ou 60 min a 37 °C. A reação foi paralizada pela adição de 1 ml de TCA frio 10% contendo 10 mM de pirofosfato de sódio. O precipitado foi filtrado, recolhido sobre filtro de nitrocelulose Schleicher & Schuell (0,45 µm) e lavado com TCA frio a 2%. Os filtros foram secos e a radioatividade contada em uma mistura de cintilação tolueno-PPO-POPOP.

Obs.: para DNA polimerase α o meio de incubação não continha KCl.

Polinucleotídeos sintéticos

Para um volume final de 0,05 ml o meio de incubação consistia de 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM KCl, 5 mM Mg²⁺ ou 0,5 mM Mn²⁺, 2 mM DTT, 200 µg/ml BSA, 0,2 A₂₆₀/ml (xA)n, 0,04 A₂₆₀/ml dT₁₂, 5 µM [³H] TTP (5.000-20.000 cpm/pmol). A reação foi iniciada pela adição de enzima (15 µg DNA polimerase α, 10 µg DNA polimerase γ, ou 0,65 µg transcriptase reversa), incubando-se 15 min ou 30 min, a 37 °C. A radioatividade foi determinada como descrito para DNA ativado.

Obs.: para polinucleotídeos análogos de poli C foram utilizados 0,4 A₂₆₀/ml (xC)n, 0,04 A₂₆₀/ml dG₁₂, [³H] dGTP.

RNA

O meio foi o mesmo que para DNA ativado, contendo ao invés de DNA, 25 µg/ml RNA 70 S de AMV, 10 µg/ml dT₁₂ (ou 25 µg/ml RNA de TYMV, 10 µg/ml dG₁₂).

As atividades são expressas em pmoles de dNMP radioativo incorporado, nas condições de ensaio.

Ensaio das atividades de transcriptase reversa e DNA polimerase α após pré-incubação na presença de novobiocina.

Transcriptase reversa: a pré-incubação foi feita em diferentes tempos a 37 °C na ausência ou presença de 0,5 mM de novobiocina, em 0,01 ml contendo tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,2), 2 mM DTT e 0,5% Triton X-100. Após pré-incubação os demais componentes para a síntese de DNA foram adicionados a um volume final de 0,1 ml (a concentração final de novobiocina era 0,05 mM) e a incubação realizada a 37 °C por 15 min.

DNA polimerase α : a pré-incubação foi feita a um volume de 0,01 ml contendo 10 μ g DNA polimerase α , tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 2 mM DTT, na ausência ou presença de 0,5 mM de novobiocina. Após pré-incubação a 37 °C nos tempos indicados os demais componentes para ensaio da polimerase foram adicionados a um volume de 0,1 ml e a síntese de DNA foi realizada a 37 °C por 15 min.

Fidelidade de síntese de DNA

A fidelidade de síntese de DNA por transcriptase reversa com matrizes-iniciadores A-T foi medida como descrito por SIROVER & LOEB (1977). Em um volume total de 0,05 ml a mistura de incubação continha os mesmos reagentes para ensaio da atividade enzimática; 0,24 A₂₆₀/ml de matriz-iniciador (xA)n.(dT)₁₂; 25 μ M [³²P] TTP (6 cpm/pmol); 25 μ M [³H] dCTP; 37 °C, 30 min. A reação foi paralizada e a radioatividade determinada como já descrito. A frequência de erros foi determinada pela relação [³H] / [³²P] no produto da reação.

Purificação de DNA polimerase A de germen de trigo

DNA polimerase A foi purificada de germen de trigo de acordo com o método descrito por CASTROVIEJO (1979).

O procedimento a seguir foi realizado a 4 °C.

360 g de germen de trigo foram homogeneizados em um almofariz com 4 vol de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,2), contendo 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂ e 250 mM sacarose. O homogeneizado foi filtrado através de 4 camadas de gaze, o qual foi pressionado manualmente pa-

ra recuperar o máximo de extrato.

O extrato bruto foi centrifugado a 15.000 xg, 10 min, e o sobrenadante foi centrifugado a 105.000 xg por 1 h. O sobrenadante foi submetido a um fracionamento com sulfato de amônio de 20 a 70% (1 h para cada precipitação). O precipitado obtido por centrifugação a 15.000 xg, 10 min, foi suspenso em tampão A Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), contendo 1 mM β -mercaptoetanol, 0,1 mM EDTA e 20% glicérol, e dialisado uma noite contra 50 vol do mesmo tampão.

Cromatografia em Fosfocelulose

A fração 20-70% de sulfato de amônio foi redialisada contra 5 vol de tampão A contendo 0,2 M de KCl, durante 3 h e adsorvida em 1 vol de fosfocelulose previamente equilibrada com o mesmo tampão; a suspensão foi agitada suavemente por 1 h. As proteínas não retidas foram eliminadas por centrifugação a 6.000xg, 10 min e por 5 lavagens sucessivas com 1 vol de tampão A contendo 0,2 M KCl. A resina foi então colocada sobre uma coluna de 5,4 cm de diâmetro após o qual as proteínas retidas foram eluídas através de 0,8 M KCl em tampão A. As frações contendo atividade de DNA polimerase foram reunidas e dialisadas 3h contra 30 vol de tampão A, e depois contra 60 vol durante uma noite.

Obs.: o tratamento com fosfocelulose foi feito de uma só vez por ser mais rápido que uma cromatografia em coluna. Por outro lado, para extração da enzima foi feita uma coluna uma vez que o volume de tampão de eluição utilizado é bem menor.

Cromatografia em DEAE-celulose

Colocou-se o dialisado sobre uma coluna de DEAE-celulose (2,5 x 12 cm) previamente equilibrada com tampão A. As proteínas não retidas foram eliminadas por lavagem com 5 vol do mesmo tampão. As proteínas retidas foram eluídas com tampão A contendo 0,3 M KCl.

Cromatografia em Fosfocelulose

A fração retida em DEAE-celulose foi passada sobre uma coluna de fosfocelulose (2,5 x 4 cm) equilibrada com tampão A contendo 0,2 M KCl. As enzimas foram eluídas através de um gradiente de tampão A contendo 0,2M e 0,8 M de KCl.

Cromatografia em Hidroxiapatita

As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e colocadas sobre uma coluna de hidroxiapatita (2 x 4 cm) previamente equilibrada com tampão B, fosfato de potássio 20 mM (pH 7,5), contendo 1 mM de β -mercaptoetanol, 0,4% de nonidet P-40 e 20% de glicerol. Após a adsorção a coluna foi lavada com 3 vol do mesmo tampão. As proteínas retidas foram eluidas através de fosfato de potássio 0,3 M. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e dialisadas contra 50 vol de tampão A contendo 0,01 M KCl, durante uma noite.

Cromatografia de afinidade

O dialisado foi colocado sobre uma coluna de DNA celulose (5 x 4 cm) previamente equilibrada com tampão A. As enzimas foram eluidas através de um gradiente linear de tampão A contendo 0,01 a 0,6 M de KCl. Foram eluidos 2 picos contendo atividade enzimática, um a 0,13 M KCl (DNA polimerase B), e outro que eluiu a 0,41 M KCl, que correspondia à DNA polimerase A. As enzimas foram dialisadas contra tampão A contendo 50% de glicerol e 50 mM de KCl, sendo após mantida a -20 °C.

Purificação de DNA polimerases de folhas de nabo infectadas com o vírus do mosaico da couve-flor

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito para as DNA polimerases de germen de trigo.

Na etapa final de purificação foram obtidos 2 picos contendo atividade enzimática.

RESULTADOS

Matrizes

Várias matrizes naturais foram utilizadas na síntese de DNA catalizada por transcriptase reversa (Tabela I). Assim, DNA ativado, RNAs mensageiros e RNAs virais permitem incorporação de dNMP na síntese de cDNA pela transcriptase reversa de AMV, que neste aspecto não parece apresentar uma especificidade muito elevada. Diferentemente do RNA 70 S de AMV, o RNA de TYMV é uma matriz mais eficiente em presença de dG_{12} que de dT_{12} como iniciador.

Alguns polinucleotídeos sintéticos podem servir, mais ou menos eficientemente, como matriz na síntese de DNA catalisada pela transcriptase reversa (Tabela II). $(dA)_n$ é uma matriz muito pouco eficiente, assim como $(Am)_n$, pelo menos em presença de Mg^{2+} como cátion bivalente. O reconhecimento de $(rA)_n$ e $(rC)_n$, matrizes do tipo RNA, pela transcriptase reversa é maior em presença de Mg^{2+} que de Mn^{2+} . Polinucleotídeos fluorados na posição 2' podem ser utilizados como matrizes pela enzima viral. Por outro lado, os derivados $(Am)_n$ e $(Cm)_n$, com grupo O-metila na posição 2', são excelentes matrizes porém em presença de Mn^{2+} .

Ions metálicos

Na Tabela III pode-se observar que a atividade da transcriptase reversa no reconhecimento de $(rA)_n$ como matriz é maior em presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} . Nas mesmas condições experimentais, Zn^{2+} e Ca^{2+} não mostram efeitos significativos. Diferentemente de Mg^{2+} , concentrações elevadas de Mn^{2+} e Co^{2+} parecem inibir a atividade de transcriptase reversa.

Efeitos de Mg^{2+} e poliaminas foram estudados na atividade de transcriptase reversa utilizando-se matrizes naturais como DNA ativado e RNA 70 S de AMV (Tabela IV). As poliaminas espermidina e espermina não possuem a capacidade de substituir Mg^{2+} na reação de síntese de DNA. Entretanto, é interessante notar que em alguns casos o efeito adicional de 1 mM de poliamina, em presença de Mg^{2+} , é bem maior que o do metal sozinho. Assim, por exemplo, a atividade

TABELA I. Atividade de transcriptase reversa com matrizes naturais.

10 µg/ml DNA ativado; 25 µg/ml RNA; 5 µg/ml dT₁₂; 5 µg/ml dG₁₂ foram incubados como indicado, em presença de 5 x 10⁻⁶ a 5 x 10⁻⁵ M de dNTP radioativo e 10⁻⁴ M dos demais dNTP frios, sendo as demais condições descritas em Material e Métodos.

Matriz	Condições	[³ H]NTP	[³² P]dNTP	Atividade específica (cpm/pmol)	dNMP incorporado (pmol/h)
mRNA de globina	0 min		TTP	4500	0,02
	completo		TTP	4500	8,6
mRNA de levedura	- RNA	dGTP		3000	0,04
	completo	dGTP		3000	5,2
	- RNA		dATP	4500	0,10
	completo		dATP	4500	28,9
RNA LMV	- dT ₁₂		dATP	15400	9,8
	completo		dATP	15400	12,1
	- dG ₁₂	dGTP		2000	1,7
	completo	dGTP		2000	102
RNA TYMV	- dG ₁₂		dATP	15000	10,4
	+ dT ₁₂		dATP	15000	12,2
	+ dG ₁₂		dATP	15000	217
RNA AMV	- dT ₁₂	TTP		33000	1,4
	completo	TTP		33000	6,2
	- dT ₁₂		dGTP	20000	3,3
	completo		dGTP	20000	16,5
DNA ativado	- Mg ²⁺	TTP		1000	0,28
	completo	TTP		1000	5,4

TABELA II. Atividade de transcriptase reversa com matrizes sintéticas.
 10 µg/ml (xA)n, 2 µg/ml dT₁₂, 10 µM [³H] TTP (900 cpm/pmol) ou
 20 µg/ml (xC)n, 2 µg/ml dG₁₂, 10 µM [³H] dGTP (1000 cpm/pmol) foram incubados em presença de 5 mM Mg²⁺, 0,5 mM Mn²⁺, como descrito em Material e Métodos.

Matriz-iniciador	[³ H] dNMP incorporado (pmol/30 min)		
	- metal	+ Mg ²⁺	+ Mn ²⁺
(dA)n.(dT) ₁₂	0,2	1,1	7,5
(rA)n.(dT) ₁₂	0,2	98,3	39,5
(dAfl)n.(dT) ₁₂	0,8	57,8	71,3
(Am)n.(dT) ₁₂	0,3	2,2	41
(dC)n.(dG) ₁₂	-	291	60
(rC)n.(dG) ₁₂	1,3	150	12
(dCfl)n.(dG) ₁₂	-	72	15
(Cm)n.(dG) ₁₂	0,3	18	102

TABELA III. Efeito de ions metálicos na atividade de transcripase reversa.

10 µg/ml (rA)n, 2µg/ml dT₁₂, 1 µM [³H] TTP (8.500 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos.

Cátion	(mM)	[³ H] TMP incorporado (pmol/30 min)
nenhum		0,05
Mg ²⁺	0,1	2,4
Mg ²⁺	1	19,2
Mn ²⁺	0,1	30,5
Mn ²⁺	1	3,0
Co ²⁺	0,1	18,9
Co ²⁺	1	13,5
Zn ²⁺	0,1	0,16
Zn ²⁺	1	0,06
Ca ²⁺	0,1	0,03
Ca ²⁺	1	0,03

TABELA IV. Efeito de poliaminas nas atividades de transcriptase reversa e DNA polimerase α com matrizes naturais.
 20 $\mu\text{g/ml}$ DNA ativado ou 50 $\mu\text{g/ml}$ RNA 70 S e 5 $\mu\text{g/ml}$ dT₁₂, 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 10 μM [³H] TTP (1000 cpm/pmol) foram incubados em presença dos cátions como descrito em Material e Métodos.

Cátion	[³ H] TMP incorporado (pmol/h)			
	Transcriptase reversa		DNA polimerase α	
	DNA ativado	RNA 70 S	DNA ativado	DNA polimerase α
nenhum	0,28	0,23		0,34
Mg ²⁺ 1 mM	4,80	17,8		3,50
Mg ²⁺ 5 mM	5,40	27,8		3,80
Mg ²⁺ 10 mM	5,30	30,0		2,80
espermidina 1 mM	0,47	0,34		0,37
espermidina 5 mM	0,42	0,22		0,34
espermina 1 mM	0,46	0,25		0,22
espermina 5 mM	0,42	0,19		0,44
Mg ²⁺ 1 mM + espermidina 1 mM	9,70	48,9		2,20
Mg ²⁺ 5 mM + espermidina 1 mM	8,50	48,8		0,36
Mg ²⁺ 1 mM + espermina 1 mM	3,50	65,3		0,40
Mg ²⁺ 5 mM + espermina 1 mM	3,90	72,4		0,38

enzimática utilizando-se DNA ativado como matriz é maior em presença de Mg^{2+} 1 mM e espermina 1 mM, que de Mg^{2+} 10 mM. Um efeito análogo pode ser observado quando se utiliza RNA 70 S como matriz.

Na Figura 1 pode-se observar este efeito ativador de espermina (1 mM) na atividade de transcriptase reversa para diferentes concentrações de Mg^{2+} , utilizando-se RNA 70 S como matriz.

Por outro lado, as poliaminas não apresentam qualquer efeito na atividade de DNA polimerase α de *Xenopus laevis*, utilizando-se DNA ativado como matriz (Tabela IV). Espermidina e espermina não substituem o Mg^{2+} na reação de síntese de DNA, e mais ainda, em presença do cátion bivalente a reação é inibida.

Derivados de dNTP: dCflTP

Os efeitos de um derivado fluorado na posição 2' de dCTP foram testados na síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α de *X. laevis*, DNA polimerase γ de células de camundongo, e transcriptase reversa de AMV (Tabela V). Utilizando-se DNA ativado como matriz, dCflTP pode ser parcialmente incorporado no DNA sintetizado pelas enzimas mencionadas, sendo a eficiência maior em presença de Mg^{2+} que de Mn^{2+} como cátion bivalente. Nas mesmas condições verifica-se que CTP não apresenta qualquer efeito, não sendo incorporado pelas mesmas DNA polimerases.

Para verificar se dCflTP pode atuar como inibidor em concentrações mais elevadas, o seu efeito na síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α e transcriptase reversa foi estudado em presença de dCTP (Figura 2). Até a concentração de 0,1 mM dCflTP não apresenta qualquer efeito inibitório na incorporação de dCTP (50 μ M). Para dCflTP 1,8 mM a atividade de transcriptase reversa é inibida cerca de apenas 10%, enquanto a de DNA polimerase α é diminuída cerca de 30%.

A DNA polimerase α é sensível à ação de afidicolina como pode ser observado na Figura 3. 10 μ g/ml de afidicolina inibe cerca de 50% a atividade de DNA polimerase α em presença de 10 μ M de dCTP; aumentando-se a concentração de dCTP para 25 μ M a inibição é parcialmente revertida. Usando-se dCflTP como substrato, 5 μ g/ml de

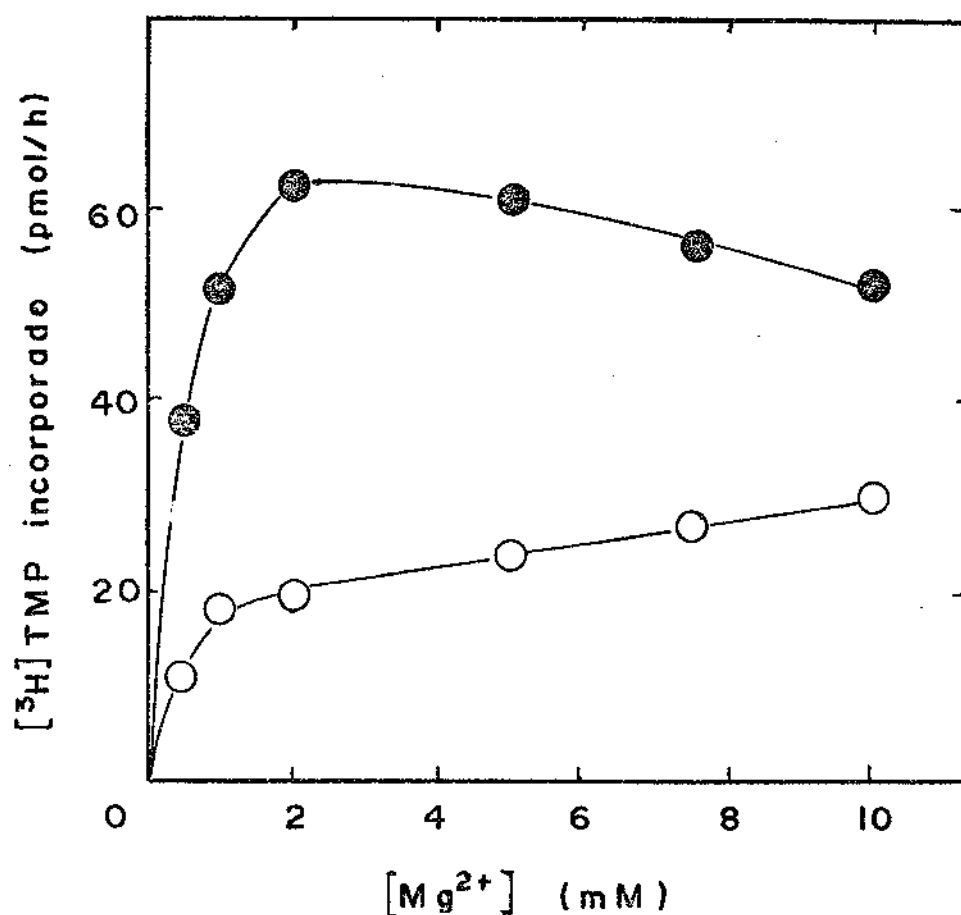


FIGURA 1. Efeito de espermina na atividade de transcriptase reversa variando-se a concentração de Mg^{2+} . 50 $\mu g/ml$ RNA 70 S de AMV, 5 $\mu g/ml$ dT₁₂, 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 10 μM [³H] TTP (900 cpm/pmol) foram incubados com 0,65 μg de transcriptase reversa na ausência (o—o) e em presença de 1 mM de espermina (●—●), como descrito em Material e Métodos.

TABELA V. Efeito de dCTP e dCflTP na síntese de DNA. 50 μM dATP, 50 μM dGTP, 5 mM Mg^{2+} ou 0,5 mM Mn^{2+} , 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA ativado, 10 μM dCTP, dCflTP ou CTP, e 1 μM [^3H] TTP (8.000 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em pmoles de TMP incorporado, por mg de proteína, em 15 min, após subtração dos valores obtidos na ausência de dCTP.

Enzima	[^3H] TMP incorporado (pmoles)					
	dCTP		dCflTP		CTP	
	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}
DNA polimerase α	15	3,5	7,8	3,5	0	0
DNA polimerase γ	41	37	10	3	0	0
Transcriptase reversa	3690	477	938	185	0	0

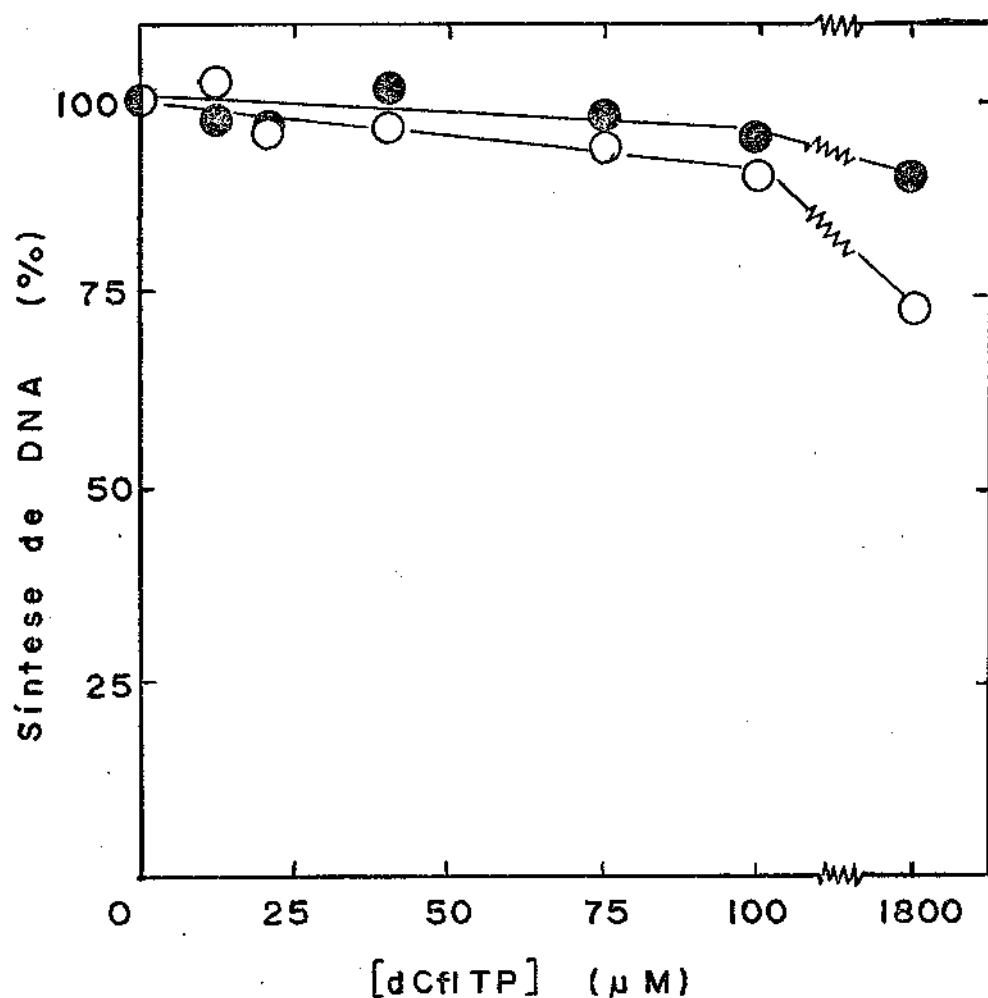


FIGURA 2. Efeito de dCfITP na síntese de DNA em presença de dCTP.

10 μg/ml DNA ativado, 10 mM Mg^{2+} , 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 1 μM $[^3H]$ TTP (8.000 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em % de DNA sintetizado pela DNA polimerase α (o—o) e pela transcriptase reversa (●—●). 100% de síntese corresponde a 0,25 pmoles de $[^3H]$ TMP incorporado para DNA polimerase α e 3,3 pmoles para a transcriptase reversa.

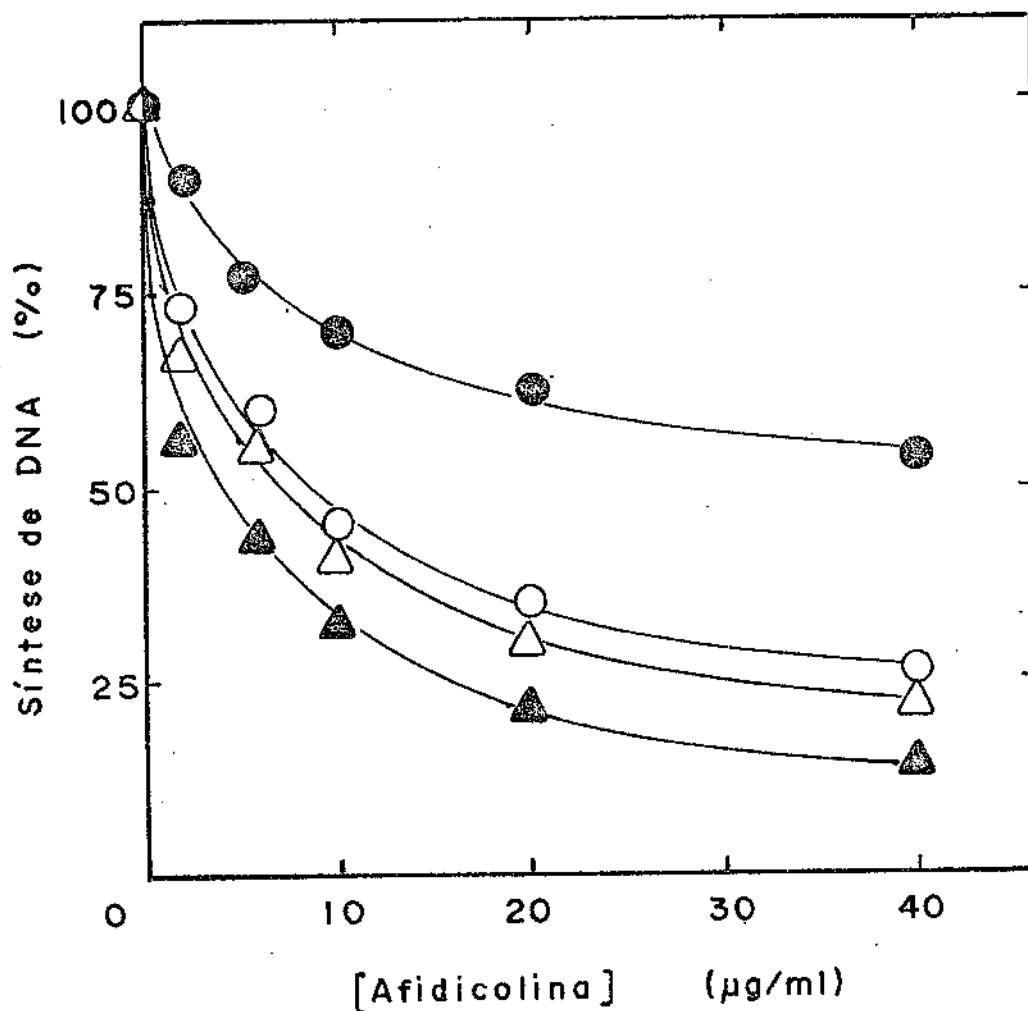


FIGURA 3. Efeito de afidicolina na síntese de DNA catali_sada por DNA polimerase α .
Concentrações variadas de afidicolina foram adicionadas à mistura de reação contendo 10 μ M (○) e 25 μ M (●) de dCTP, ou 25 μ M (Δ) e 50 μ M (▲) de dCf1TP, nas condições descritas em Material e Métodos.

afidicolina inibe a atividade enzimática de cerca de 50%, quer em presença de 25 ou 50 μ M de dCflTP.

O efeito de dCflTP na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa foi estudado usando-se DNA ativado, RNA 70 S de AMV e RNA de TYMV como matrizes (Tabela VI). A reação com matrizes RNA foi medida na ausência e na presença dos iniciadores dT₁₂ (para AMV) e dG₁₂ (para TYMV). Pode-se observar que dCflTP substitui parcialmente dCTP com as matrizes naturais estudadas. Na ausência dos iniciadores, a incorporação de dCflTP em DNA é pequena mas significativa, aumentando bastante em suas presenças. Na ausência de dCTP e dCflTP observa-se uma incorporação que é devido à presença dos demais desoxinucleotídeos.

Os efeitos das concentrações de dCTP e dCflTP foram estudados nas reações de transcriptase reversa de AMV, utilizando-se DNA ativado e RNA 70 S como matriz, sendo os resultados expressos através dos gráficos dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk (Figuras 4 e 5).

A partir das Figuras 4 e 5 foram determinados os valores de K_M para dCTP e dCflTP, que para uma melhor visualização estão indicados na Tabela A.

Tabela A. K_M aparente para dCTP e dCflTP na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa de AMV. Os valores de K_M foram calculados das Figuras 4 e 5.

Matriz	K_M ($\times 10^6$ M)	
	dCTP	dCflTP
DNA ativado	0,14	6,2
RNA 70 S - dT ₁₂	1,8	100
RNA 70 S + dT ₁₂	1,7	200

TABELA VI. Efeito de dCTP e dCflTP na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa em presença de matrizes naturais. 50 μM dATP e dGTP, 5 mM Mg^{2+} , 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA ativado, 25 $\mu\text{g/ml}$ RNA 70 S de AMV ou RNA de TYMV, 5 $\mu\text{g/ml}$ dT₁₂ ou dG₁₂ e 1 μM [³H] TTP (8.000 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em pmoles de TMP incorporado, por mg de proteína, em 15 min (para DNA ativado) e 30 min (para os RNAs).

Matriz	[³ H] TMP incorporado (pmol)		
	- dCTP	dCTP	dCflTP
DNA ativado	661	3692	938
RNA (AMV) - dT ₁₂	61	507	138
RNA (AMV) + dT ₁₂	5538	13385	7077
RNA (TYMV) - dG ₁₂	153	1046	230
RNA (TYMV) + dG ₁₂	2000	12000	2923

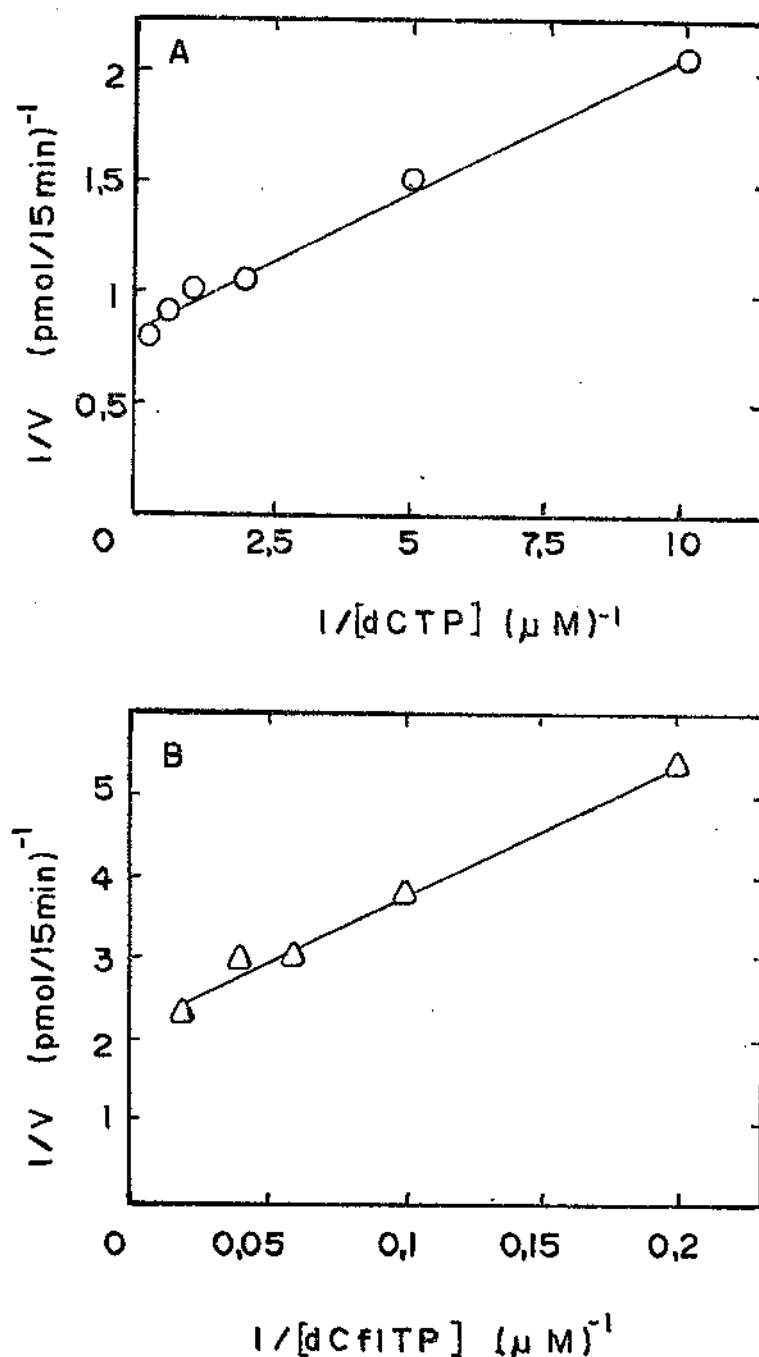


FIGURA 4. Determinação de K_M de dCTP e dCfITP para transcriptase reversa em presença de DNA como matriz (Lineweaver-Burk). As condições de ensaio foram descritas em Material e Métodos, variando-se as concentrações de dCTP (o—o) (A), e de dCfITP (Δ — Δ) (B).

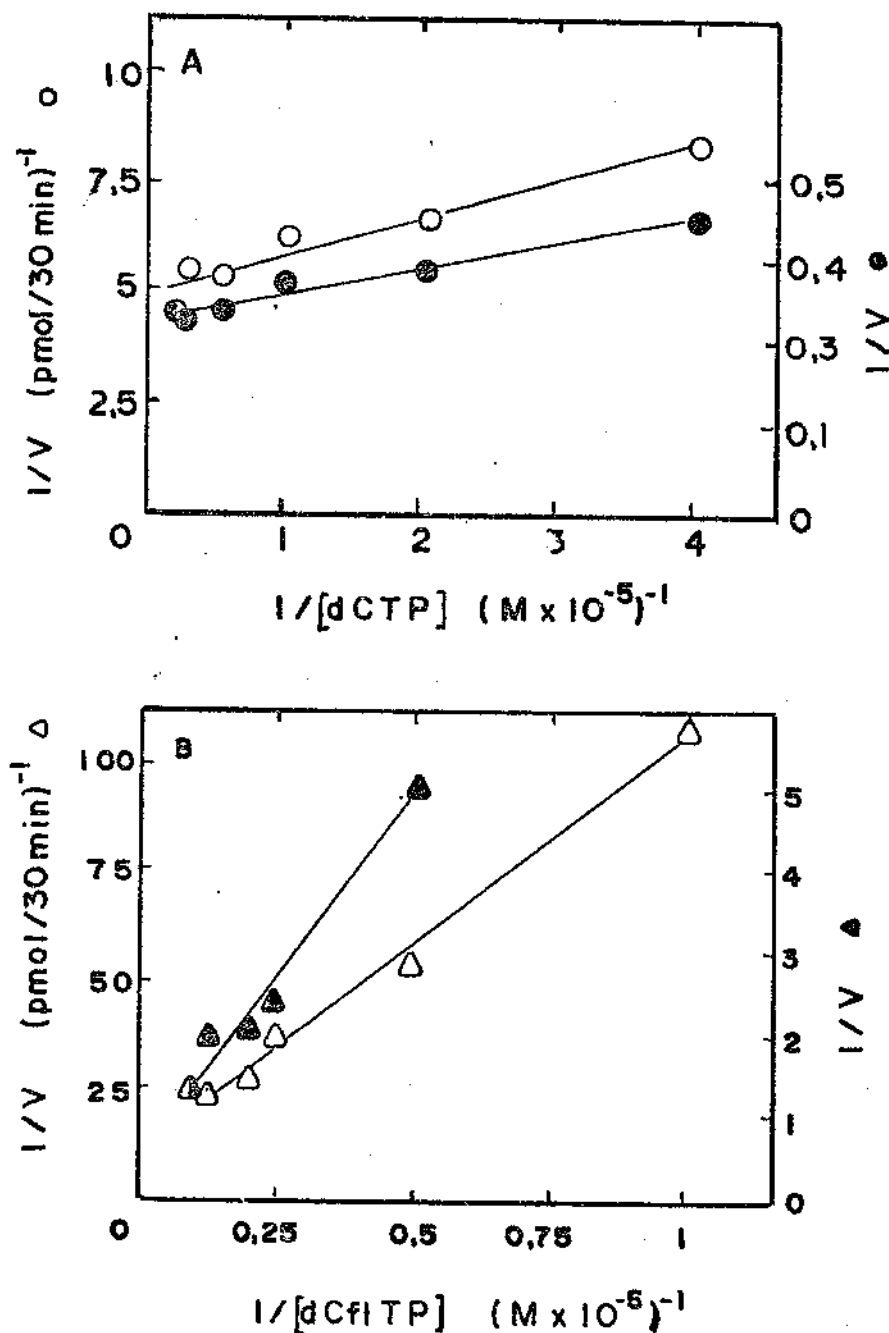


FIGURA 5. Determinação de K_M para dCTP e dCfITP para transcriptase reversa em presença de RNA 70 S como matriz (Lineweaver-Burk).

As condições foram descritas em Material e Métodos, variando-se as concentrações de dCTP (A) na ausência (o) e em presença (●) de 5 $\mu g/ml$ de dT₁₂, e variando-se as concentrações de dCfITP (B), na ausência (Δ) e em presença (▲) de dT₁₂.

Os valores de K_M para dCflTP são cerca de 50 vezes maiores que os obtidos para dCTP, utilizando-se DNA ativado ou RNA 70 S de AMV na ausência de dT_{12} . Em presença de dT_{12} a diferença é mais pronunciada, cerca de 100 vezes. A presença de dT_{12} que acarreta uma velocidade maior de incorporação, não tem efeito considerável nos valores de K_M para dCTP e dCflTP com RNA 70 S como matriz.

Derivados de matrizes sintéticas com substituição na posição 2'

Fluor

Derivados de poli A e poli C com fluor como substituinte na posição 2' funcionam como matrizes na reações catalisadas por transcriptase reversa (Tabela II). Foram feitos alguns estudos mostrando incorporação de $[^3H]$ TMP e $[^3H]$ dGMP em derivados de poli A e poli C como matrizes, em reações catalisadas por DNA polimerase α , DNA polimerase γ , e transcriptase reversa, em presença de Mg^{2+} e Mn^{2+} (Tabela VII). DNA polimerase α reconhece eficientemente apenas matrizes do tipo (dA)n e (dC)n, independentemente do cátion bivalente. Além dessas matrizes, DNA polimerase γ reconhece também (rA)n e (dAfl)n, com uma eficiência maior em presença de Mn^{2+} ; os correspondentes derivados de poli C não servem como matriz. Com a exceção de (dA)n que é uma matriz pobre para a transcriptase reversa, os demais pares matrizes-iniciadores são relativamente eficientes, principalmente em presença de Mg^{2+} .

Estudou-se o efeito de temperatura nas incorporações de TMP e dGMP por transcriptase reversa e DNA polimerase γ , utilizando-se (dAfl)n.(dT) $_{12}$ e (dCfl)n.(dG) $_{12}$ como matrizes-iniciadores (Tabela VIII). A síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa é cerca de 50% a 37 °C e 30% a 25 e 30 °C, tanto para (dAfl)n quanto para (dCfl)n. Para a DNA polimerase γ , em presença de Mg^{2+} , (dAfl)n pode substituir completamente (rA)n a 37 °C e cerca de 70% a 25 e 30 °C. Em presença de Mn^{2+} , a substituição é completa, obtendo-se mesmo valores superiores a 100% para ambas as enzimas.

TABELA VII. Síntese de DNA em presença de análogos de poli A e poli C como matrizes.
 10 µg/ml de polinucleotídeos, 2 µg/ml de dT₁₂ ou dG₁₂, 5 mM Mg²⁺ ou 0,5 mM Mn²⁺, 10 µM [3H] TTP (900 cpm/pmol) ou 10 µM [3H] dGTP (1000 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos.

Enzima	[3H] TTP incorporado (pmol/30 min)						[3H] dGMP incorporado (pmol/30 min)					
	(dA)n.(dT) ₁₂		(rA)n.(dT) ₁₂		(dAfl)n.(dT) ₁₂		(dC)n.(dG) ₁₂		(rC)n.(dG) ₁₂		(dCfl)n.(dG) ₁₂	
	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
DNA polimerase α	2,4	1,4	<0,2	<0,2	<0,2	0,6	2,3	3,1	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
DNA polimerase γ	6,7	3,3	0,8	2,9	0,9	5,2	1,7	1,4	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Transcriptase reversa	1,2	8,6	113	45	66	82	291	60	156	12	72	15

TABELA VIII. Comparação das atividades de transcriptase reversa e DNA polimerase γ com relação às matrizes-iniciadores, para diferentes temperaturas e cátions bivalentes.
10 $\mu\text{g/ml}$ de polinucleotídeos, 2 $\mu\text{g/ml}$ de iniciadores, 5 mM Mg^{2+} ou 0,5 mM Mn^{2+} , foram incubados com 10 μM $[^3\text{H}]$ TTP (900 cpm/pmol) ou 10 μM $[^3\text{H}]$ dGTP (1000 cpm/pmol) nas temperaturas indicadas. Os resultados estão expressos em pmoles de precursor radioativo incorporado; e em porcentagem (entre parênteses), considerando-se 100% as reações com (rA)n e (rC)n.

°C	Me^{2+}	Transcriptase reversa				DNA polimerase γ			
		$[^3\text{H}]$ TTP incorporado		$[^3\text{H}]$ dGMP incorporado		$[^3\text{H}]$ TTP incorporado			
		(rA)n.(dT) ₁₂	(dAfl).(dT) ₁₂	(rC)n.(dG) ₁₂	(dCfl)n.(dG) ₁₂	(rA)n.(dT) ₁₂	(dAfl)n.(dT) ₁₂		
25	Mg^{2+}	28,9 (100%)	6,0 (21%)	109 (100%)	22,3 (20%)	0,37 (100%)	0,22 (60%)		
25	Mn^{2+}	36,5 (100%)	33,4 (91%)	12,6 (100%)	15,4 (122%)	1,0 (100%)	1,1 (110%)		
30	Mg^{2+}	28,0 (100%)	6,8 (24%)	185 (100%)	52 (28%)	0,42 (100%)	0,28 (67%)		
30	Mn^{2+}	30,6 (100%)	27,2 (88%)	15,5 (100%)	16,8 (108%)	1,4 (100%)	1,46 (104%)		
37	Mg^{2+}	32,3 (100%)	15,8 (49%)	142 (100%)	66,2 (47%)	0,63 (100%)	0,73 (115%)		
37	Mn^{2+}	35,2 (100%)	40,0 (114%)	18,3 (100%)	21,3 (116%)	2,3 (100%)	4,2 (180%)		

A fidelidade de síntese de DNA pela transcriptase reversa foi estudada para as tres matrizes (dA)n, (rA)n e (dAfl)n (Tabela IX). (rA)n.(dT)₁₂ e (dAfl)n.(dT)₁₂ não se comportam diferentemente quanto a uma incorporação errada do desoxinucleotídeo dCMP não complementar. A fidelidade de síntese de DNA é menor quando se utiliza (dA)n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador.

Os efeitos de TTP e (dAfl)n foram estudados nas reações catalisadas por transcriptase reversa em presença de (dAfl)n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador, e Mg^{2+} ou Mn^{2+} como cátion bivalente (Figuras 6 e 7). Do gráfico interno da Figura 6 obtém-se os valores de K_M aparente para TTP de 10^{-4} e $1,6 \times 10^{-5}$ M, respectivamente, em presença de Mg^{2+} e de Mn^{2+} . Do gráfico interno da Figura 7 obtém-se os valores de K_M para (dAfl)n de 0,4 µg/ml e 4 µg/ml, respectivamente, em presença de Mg^{2+} e de Mn^{2+} .

O-metil

Derivados de poli A e poli C com substituinte O-metil na posição 2' podem ser utilizados como matrizes com uma eficiência mais elevada em presença de Mn^{2+} (Tabela II). Alguns parâmetros como as concentrações de cátion bivalente, desoxinucleosídeo trifosfato e matriz foram variados nas reações com os 2'-O-metil derivados de poli A e poli C (Figuras de 8 a 13). Quando o cátion bivalente é Mn^{2+} incorporações bem mais elevadas de TMP e d GMP são observadas em presença de (Am)n e (Cm)n, respectivamente (Figuras 8 e 11). Para concentrações de (Am)n superiores a 4 µg/ml observa-se uma inibição na velocidade de incorporação de TMP, em presença de Mn^{2+} (Figura 10). Do gráfico interno da Figura 12 obtém-se os valores de K_M para dGTP de $1,2 \times 10^{-5}$ M e 5×10^{-6} M, respectivamente, em presença de Mg^{2+} e de Mn^{2+} . Diferentemente da matriz (Am)n, não se observa inibição variando-se a concentração de (Cm)n, em presença de Mn^{2+} (Figura 13). Obtém-se do gráfico interno desta figura um valor de K_M para (Cm)n de 2 µg/ml.

TABELA IX. Fidelidade de síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa com análogos de poli A como matrizes. 10 $\mu\text{g/ml}$ (dA)n, (rA)n e (dAfl)n, 2 $\mu\text{g/ml}$ dT₁₂, 6 mM Mg²⁺, 25 μM [³²P] TTP (6 cpm/pmol), 25 μM [³H] dCTP (2300 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos.

Matriz-iniciador	Incorporação de desoxinucleotídeo complementar (pmol)	Incorporação de desoxinucleotídeo não complementar (pmol)	Frequência de erros
(dA)n.(dT) ₁₂	32	0,14	1/230
(rA)n.(dT) ₁₂	464	0,68	1/680
(dAfl)n.(dT) ₁₂	265	0,31	1/850

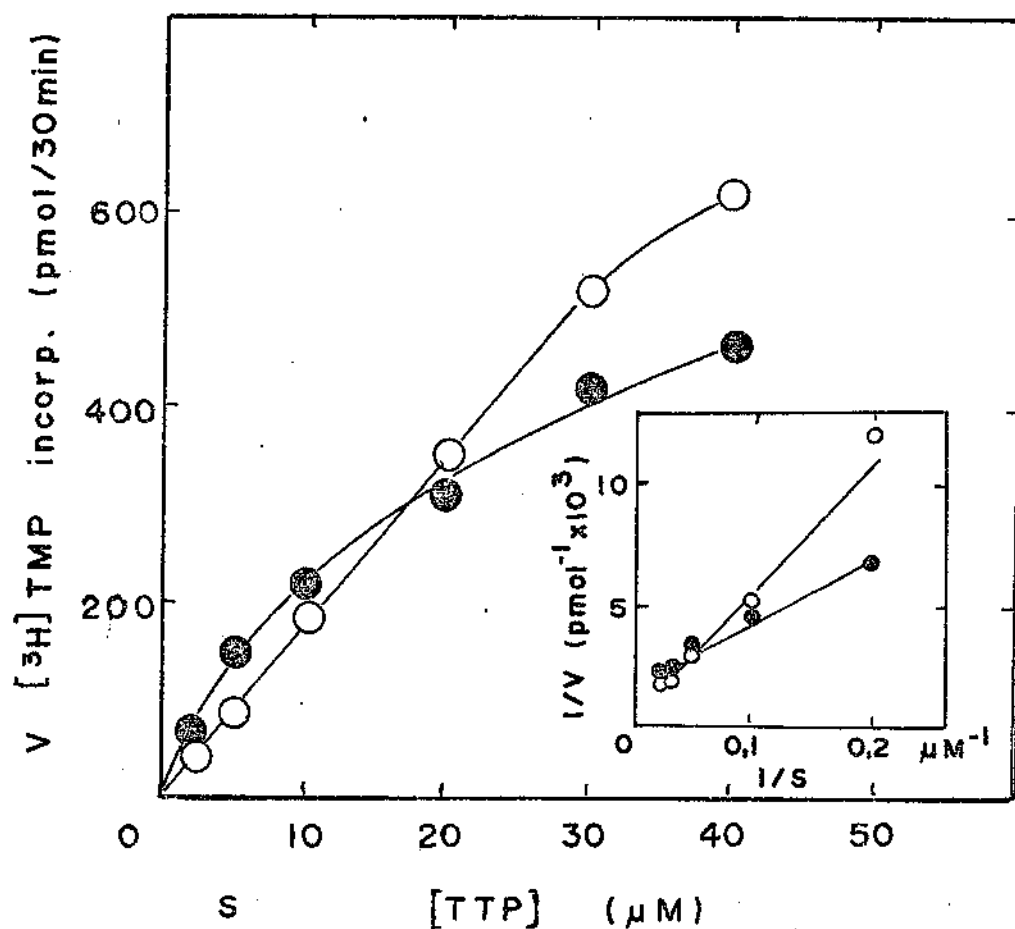


FIGURA 6. Variação de TTP na atividade de transcriptase reversa com (dAfl)n como matriz. 10 $\mu g/ml$ (dAfl)n, 2 $\mu g/ml$ dT₁₂, $[^3H]$ TTP (510.000 cpm/tubo) em concentrações variadas, foram incubados em presença de 5 mM de Mg^{2+} (o) ou de 0,5 mM de Mn^{2+} (•), como descrito em Material e Métodos. Internamente está representado o gráfico de Lineweaver-Burk.

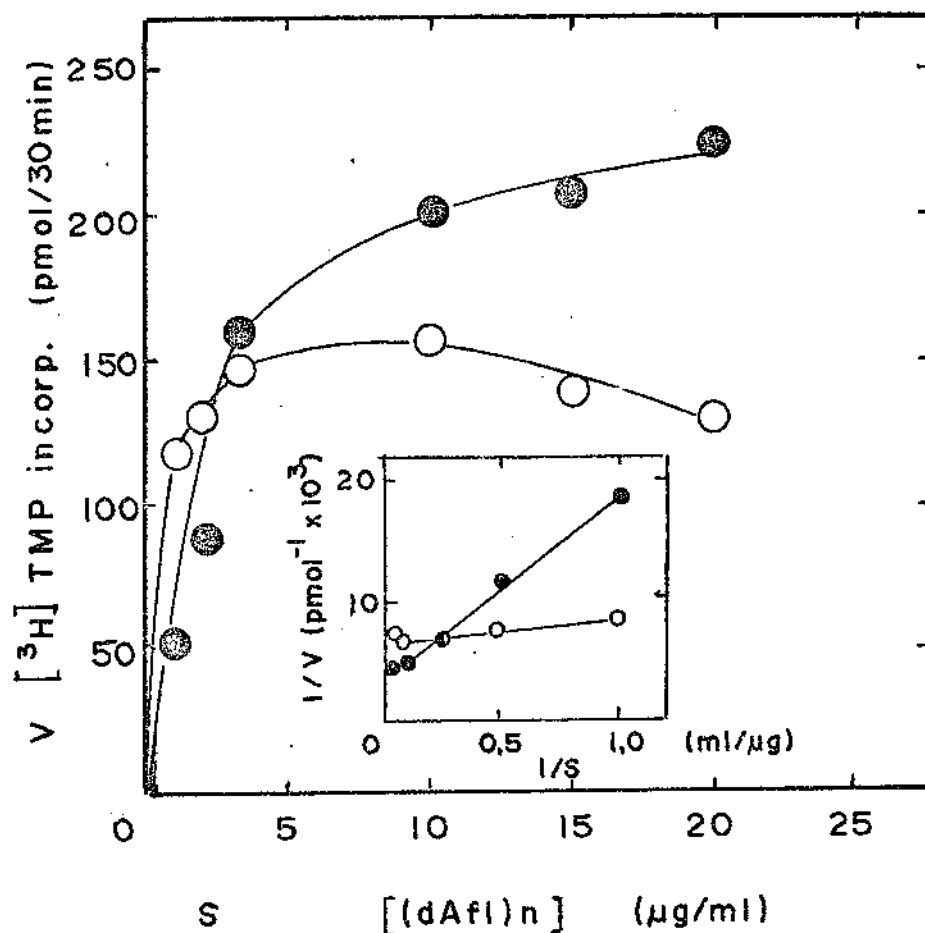


FIGURA 7. Variação da concentração da matriz (dAfl)n na atividade de transcriptase reversa. 10 μ M [3 H] TTP (900 cpm/pmol) e concentrações variadas de (dAfl)n foram adicionados às misturas de reação, em presença de 5 mM de Mg^{2+} (o) ou de 0,5 mM de Mn^{2+} (•). Internamente está representado o gráfico de Lineweaver-Burk.

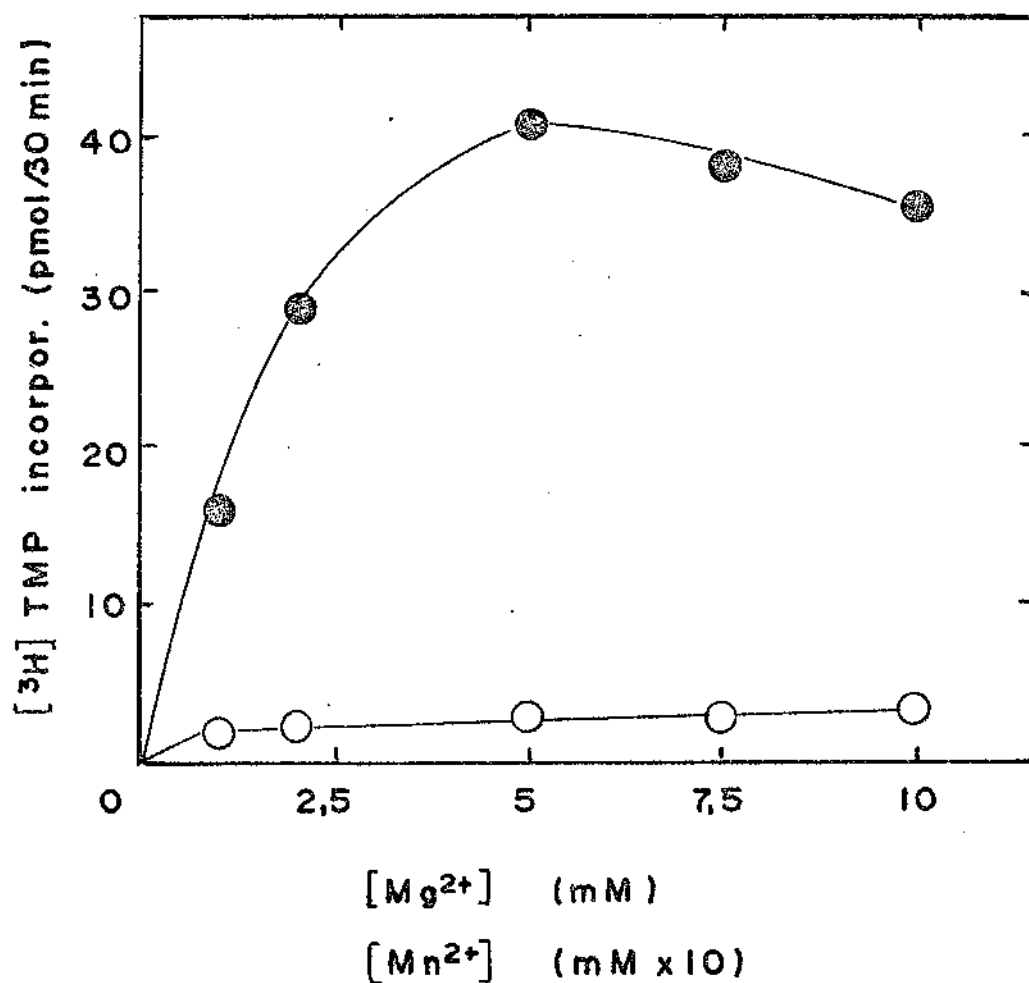


FIGURA 8. Variação da concentração de cátion bivalente na atividade de transcriptase reversa com (Am)n como matriz. 10 µg/ml (Am)n, 2 µg/ml dT₁₂, 10 µM [³H] TTP (800 cpm/pmol) foram adicionados às misturas de reação contendo concentrações variadas de Mg²⁺ (o) ou de Mn²⁺ (•).

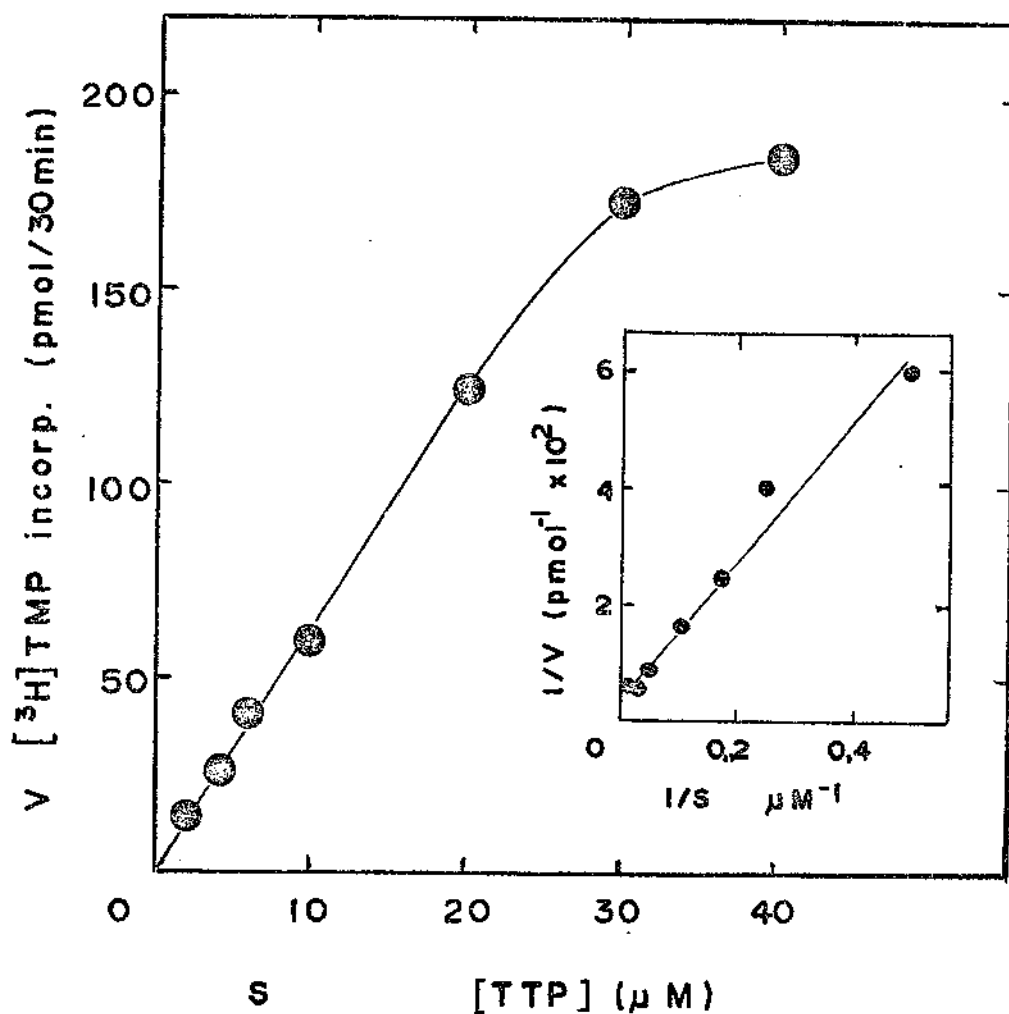


FIGURA 9. Variação de TTP na atividade de transcriptase reversa com (Am)n como matriz, em presença de Mn^{2+} . 10 $\mu\text{g/ml}$ (Am)n, 2 $\mu\text{g/ml}$ dT₁₂, 0,5 mM Mn^{2+} , $[^3\text{H}]$ TTP (290.000 cpm/tubo) em concentrações variadas foram adicionados às misturas de reação como descrito em Material e Métodos. Internamente está representado o gráfico de Lineweaver-Burk.

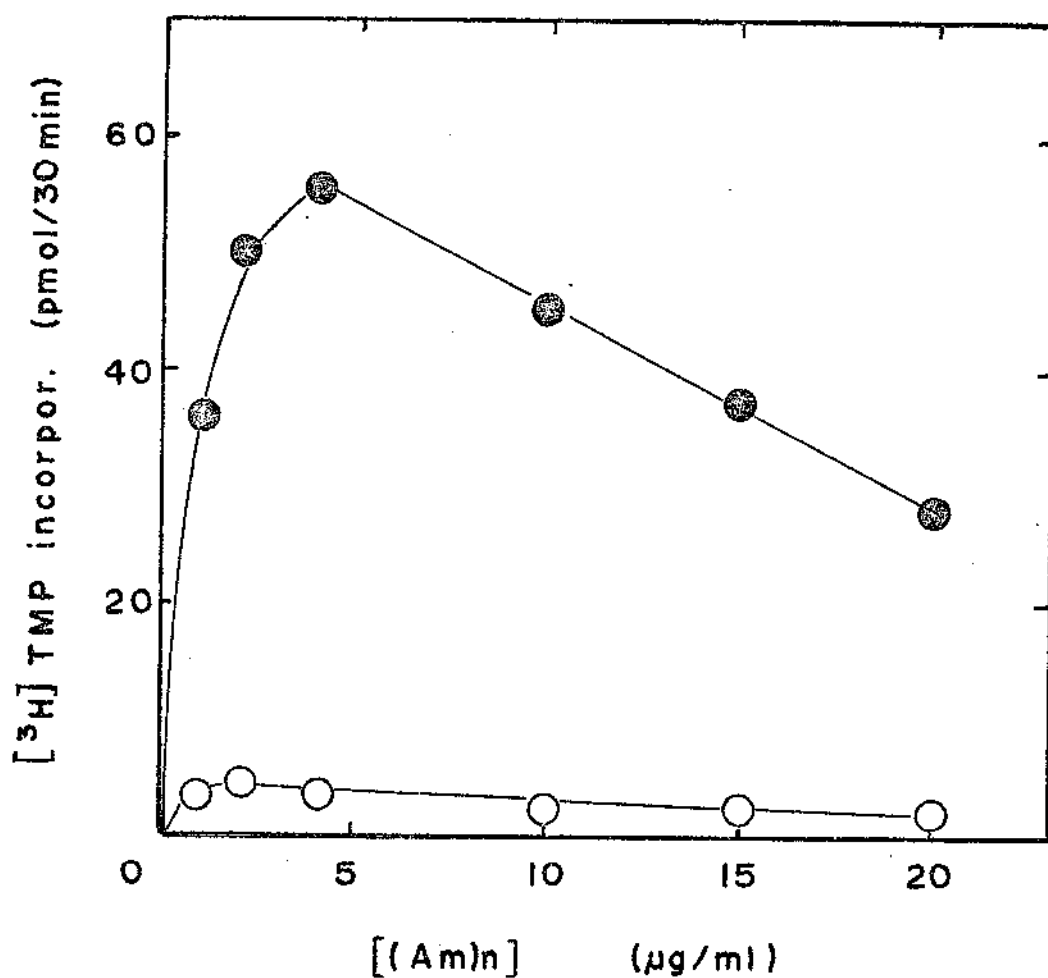


FIGURA 10. Variação da concentração da matriz $(\text{Am})_n$ na atividade de transcriptase reversa. $10 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ TTP (800 cpm/pmol) e concentrações variadas de $(\text{Am})_n$ foram adicionados às misturas de reação contendo 5 mM de Mg^{2+} (○) ou 0,5 mM de Mn^{2+} (●), como descrito em Material e Métodos.

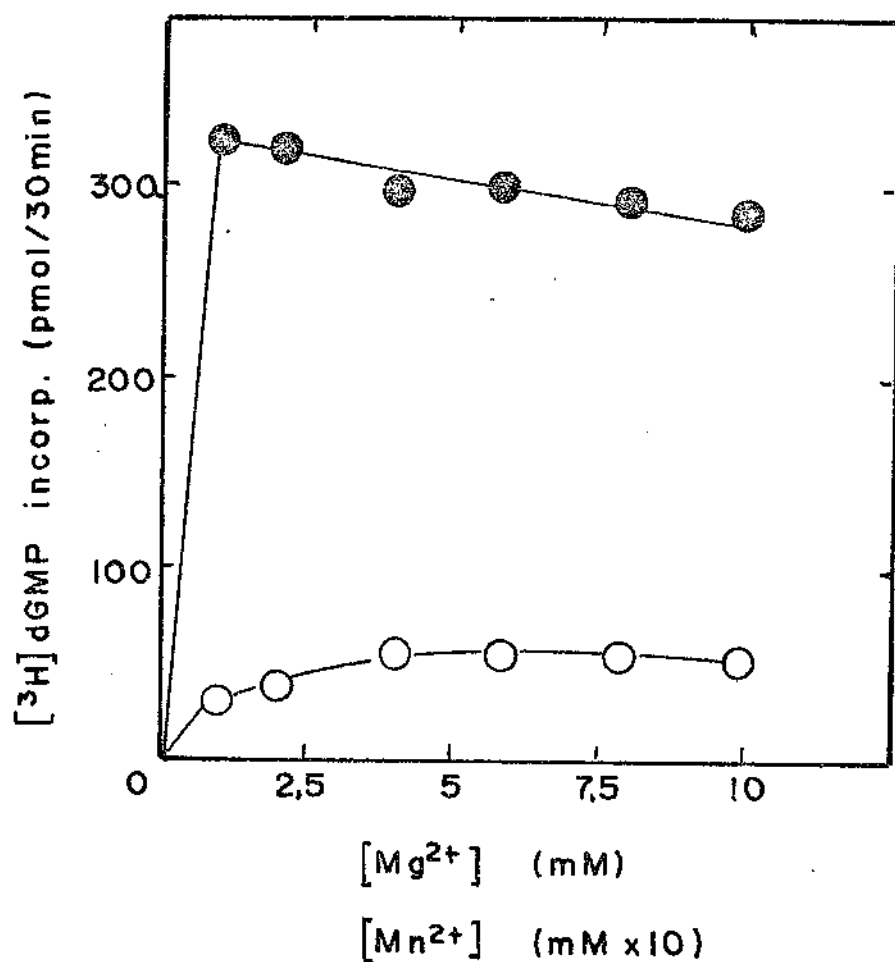


FIGURA 11. Variação da concentração de cátion bivalente na atividade de transcriptase reversa com (Cm)n como matriz. 20 $\mu\text{g/ml}$ (Cm)n, 2 $\mu\text{g/ml}$ dG₁₂, 10 μM $[^3\text{H}]$ dGTP (950 cpm/pmol) foram adicionados às misturas de reação contendo concentrações variadas de Mg^{2+} (o) ou de Mn^{2+} (●).

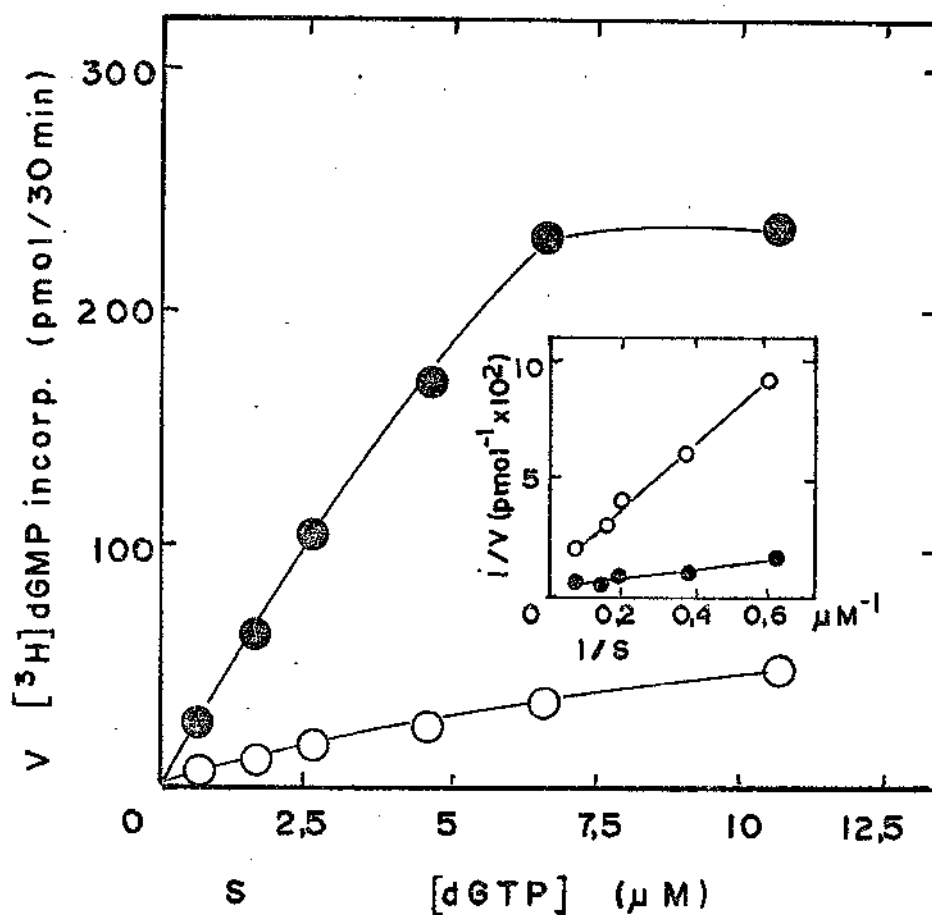


FIGURA 12. Variação de dGTP na atividade de transcriptase reversa com (Cm)n como matriz. 20 $\mu\text{g/ml}$ (Cm)n, 2 $\mu\text{g/ml}$ dG₁₂, e concentrações variadas de [^3H]dGTP (650.000 cpm/tubo) foram adicionados às misturas de reação contendo 5 mM de Mg^{2+} (○) ou 0,5 mM de Mn^{2+} (●). Internamente está representado o gráfico de Lineweaver-Burk.

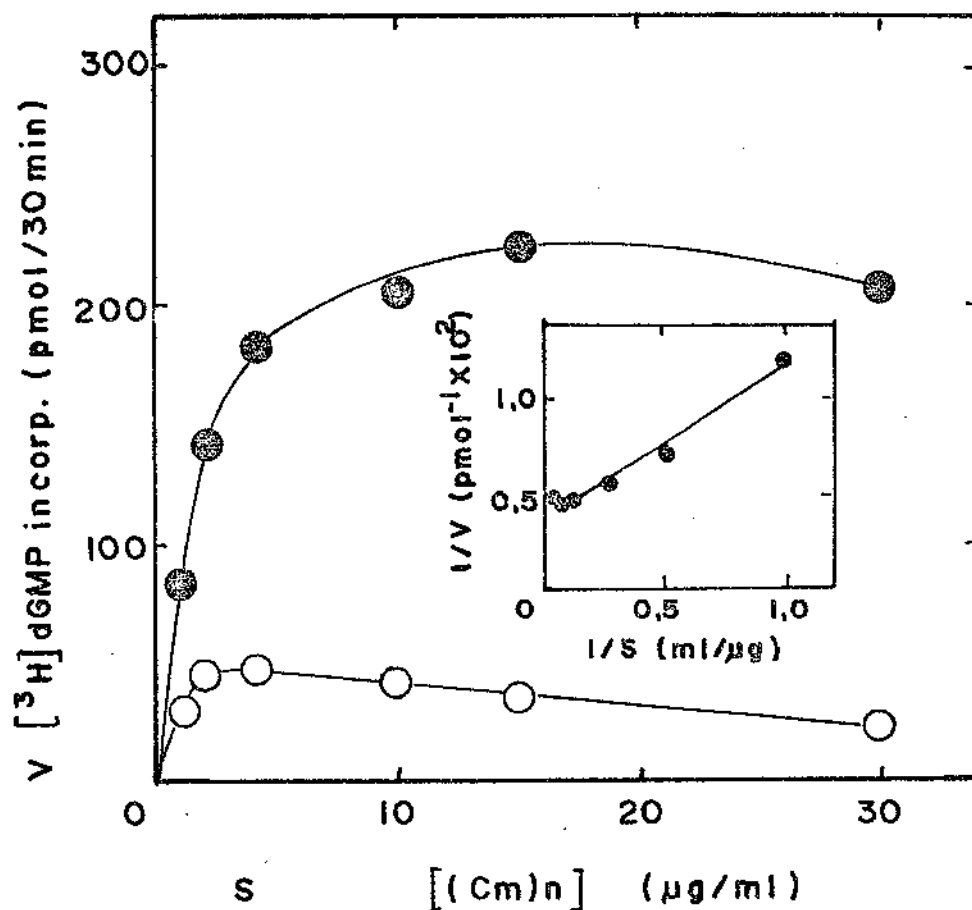


FIGURA 13. Variação da concentração da matriz $(\text{Cm})_n$ na atividade de transcriptase reversa. $10 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ dGTP (950 cpm/pmol) e concentrações variadas de $(\text{Cm})_n$ foram adicionados às misturas de reação contendo 5 mM de Mg^{2+} (o) ou 0,5 mM de Mn^{2+} (●). Internamente está representado o gráfico de Lineweaver-Burk, em presença de Mn^{2+} .

Inibidores

Diferentes tipos de compostos foram testados como inibidores nas reações catalisadas por transcriptase reversa, utilizando-se matrizes naturais e sintéticas.

Novobiocina

Observa-se pela Figura 14 que o antibiótico novobiocina inibe as reações catalisadas tanto por transcriptase reversa quanto por DNA polimerase α , utilizando-se DNA ativado como matriz; 0,5 mM da droga inibe cerca de 50% as atividades de ambas as enzimas.

O efeito de novobiocina na formação do complexo entre tRNA^{Trp} iniciador e transcriptase reversa foi estudado por filtração em gel (Figura 15). Pode-se observar que quando novobiocina é adicionada ao complexo enzima-tRNA já formado, a maior parte do tRNA^{Trp} iniciador encontra-se associada à enzima no volume de exclusão da coluna de Sephadex, de uma maneira similar aos resultados obtidos na ausência de novobiocina. Entretanto, quando novobiocina e transcriptase reversa são pré-incubadas antes da adição de tRNA, observa-se que apenas uma pequena fração do ácido nucleico se encontra associada à polimerase viral no volume de exclusão.

Um resultado distinto foi observado para transcriptase reversa e DNA polimerase α após pré-incubação em presença de 0,5 mM de novobiocina e posterior diluição do meio de incubação por adição dos demais componentes para síntese de DNA (Figura 16). Após pré-incubação com novobiocina e diluição à concentrações não inibitórias da droga, a atividade de transcriptase reversa continua inibida, ao passo que nas mesmas condições a atividade de DNA polimerase α é completamente revertida.

Efeitos de novobiocina utilizando-se matrizes sintéticas serão mostrados mais adiante.

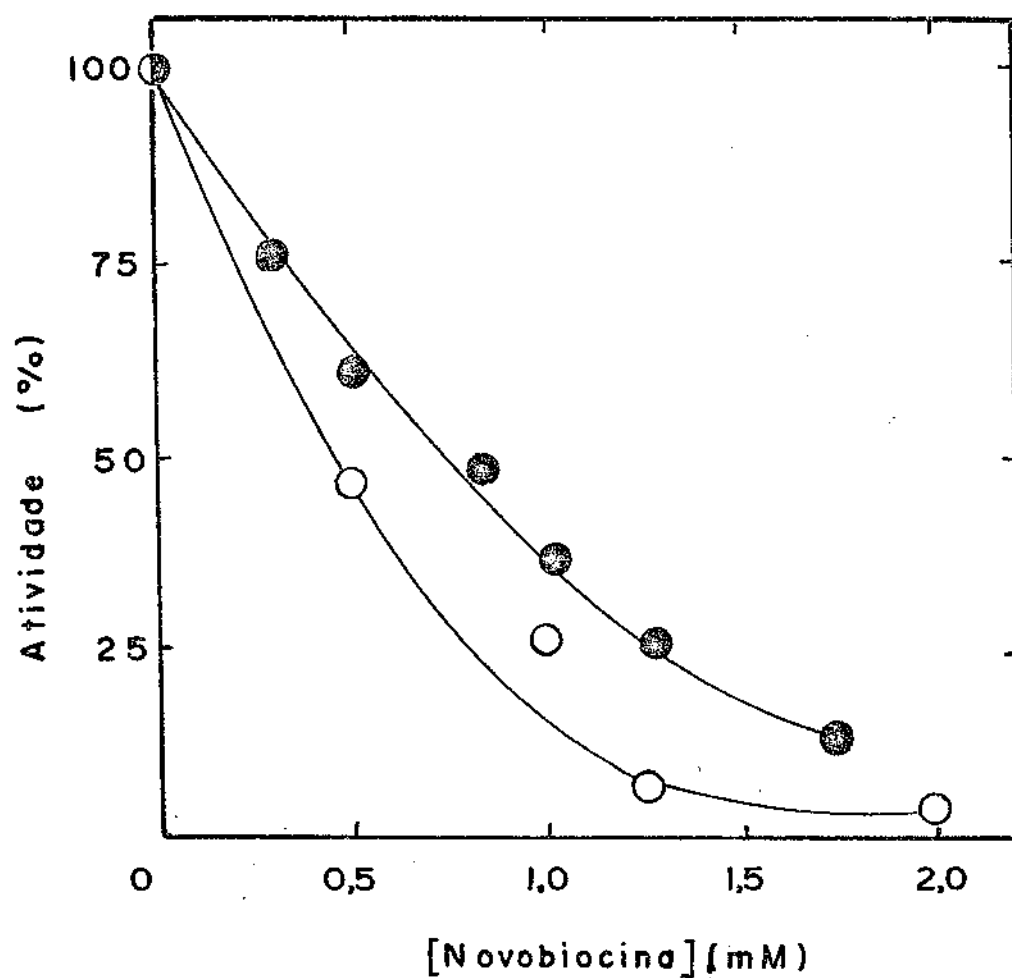


FIGURA 14. Efeito de novobiocina na síntese de DNA.

20 μ g/ml DNA ativado, 100 μ M dATP, 100 μ M dCTP, 100 μ M dGTP, 5 μ M $[^3\text{H}]$ TTP (7.500 cpm/pmol) foram incubados em presença das concentrações indicadas de novobiocina, e de 10 μ g de DNA polimerase α (o) ou de 0,65 μ g de transcriptase reversa (●).

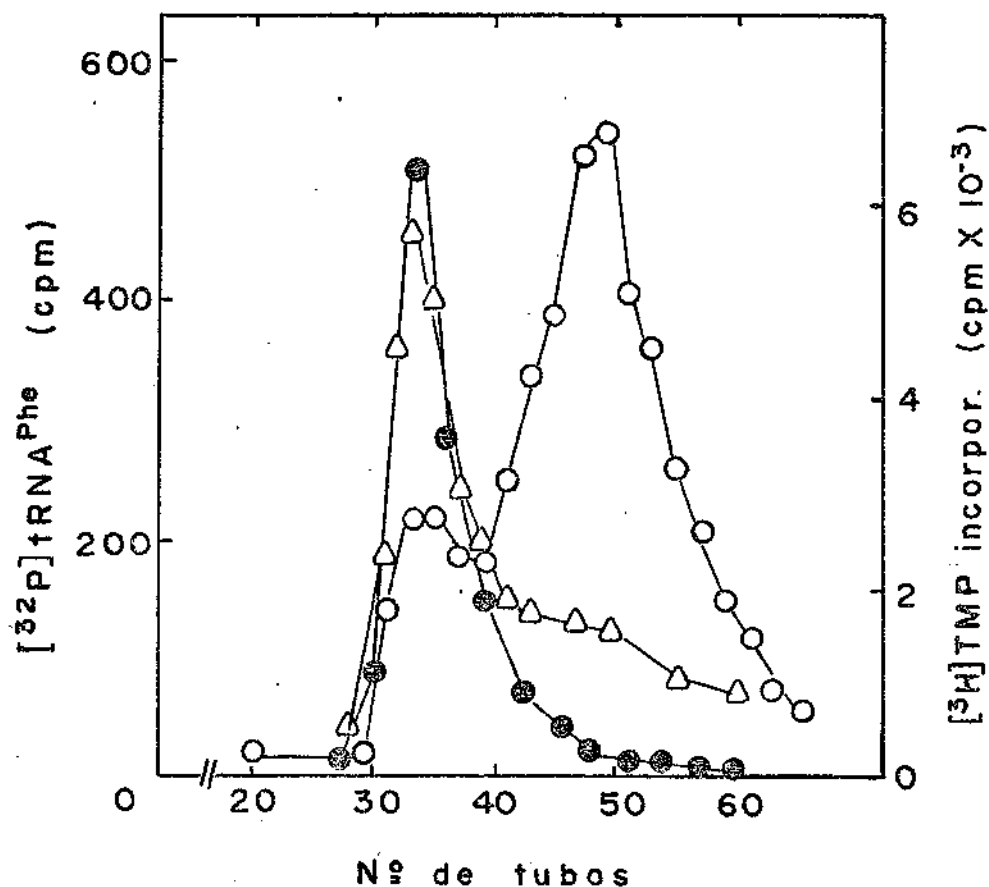


FIGURA 15. Filtração em Sephadex G-100 do complexo transcriptase reversa-tRNA^{Trp}.

Todas as condições de incubação, filtração e determinação da radioatividade foram descritas em Material e Métodos. Eluição de tRNA quando o iniciador foi adicionado após pré-incubação de novobiocina e transcriptase reversa (o). Eluição de tRNA sem pré-incubação da enzima e droga (Δ). Atividade de transcriptase reversa ($\bullet$).

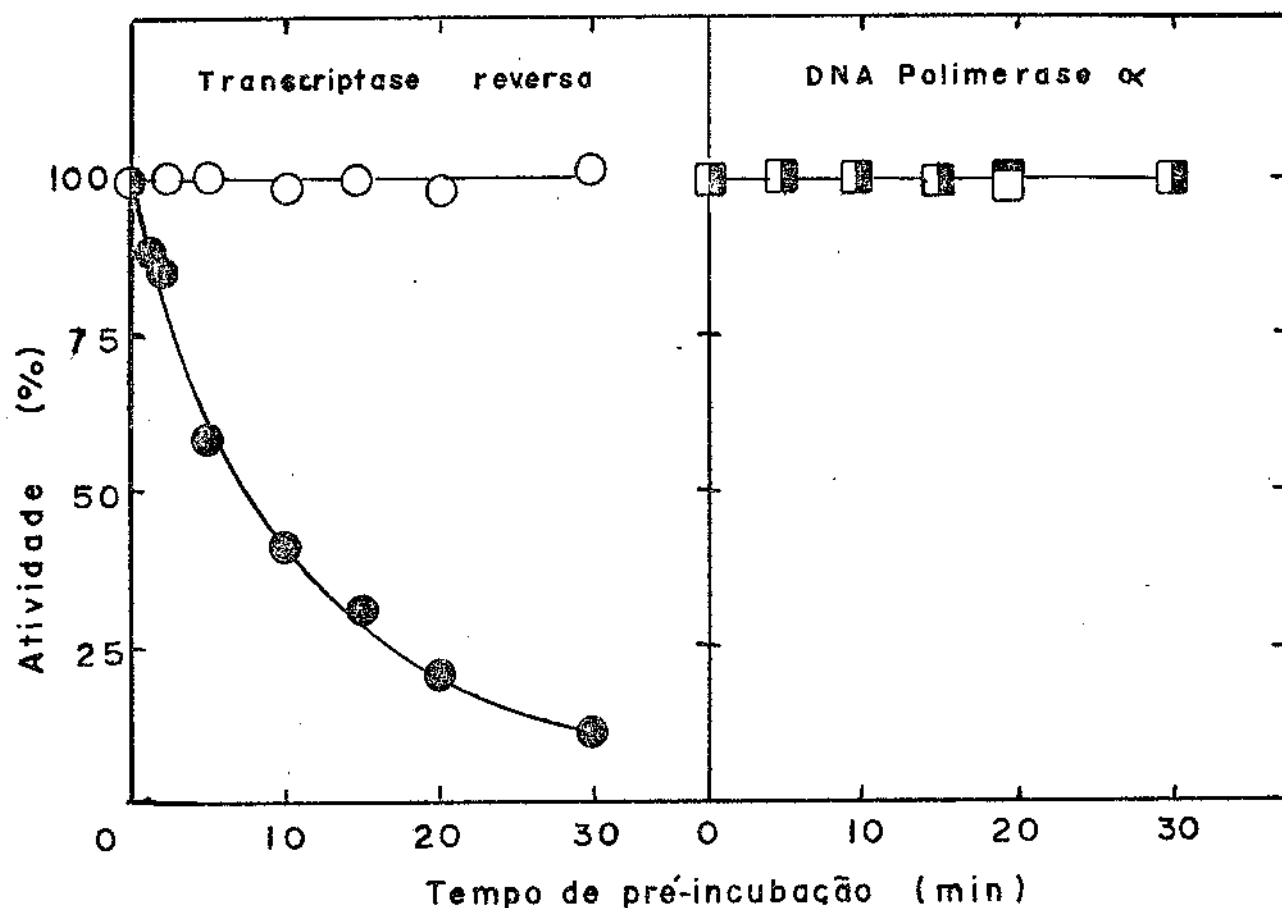


FIGURA 16. Reversibilidade da inibição de transcriptase reversa e DNA polimerase α após pré-incubação com novobiocina. Ambas as enzimas foram pré-incubadas com novobiocina nos tempos indicados como descrito em Material e Métodos. Após diluição (10 vezes) à concentrações não inibitórias da droga, a síntese de DNA foi medida. Pré-incubação de transcriptase reversa na ausência (○) e em presença (●) de novobiocina. Pré-incubação de DNA polimerase α na ausência (□) e em presença (■) de novobiocina.

Polinucleotídeos sintéticos

Análogos de poli C, como (rC)n, (Cm)n e (dCfl)n foram testados na reações catalisadas por transcriptase reversa, DNA polimerase α e DNA polimerase γ , utilizando-se matrizes naturais e sintéticas.

Pode-se observar pela Figura 17 que independentemente da matriz-iniciador (xA)n.(dT)₁₂, os análogos (rC)n e (Cm)n não apresentam efeitos significativos nas reações catalisadas por transcriptase reversa. Por outro lado, (dCfl)n é um potente inibidor; 5 μ g/ml deste polinucleotídeo fluorado inibe 90% a síntese de DNA com (dA)n e 60% com (rA)n como matriz. Nas mesmas condições de ensaio, (dCfl)n não tem qualquer efeito na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa quando (dAfl)n.(dT)₁₂ é utilizada como matriz iniciador.

Estudos similares foram realizados utilizando-se matrizes naturais nas reações de transcriptase reversa (Tabela X). (rC)n não mostra qualquer efeito na síntese de DNA quer com DNA ativado ou com RNA 70 S como matriz; o mesmo ocorre em presença de 1 μ g/ml de (Cm)n, ao passo que na concentração de 5 μ g/ml observa-se uma inibição de 30% quando RNA 70 S é a matriz. Já (dCfl)n inibe a síntese de DNA independentemente da matriz natural utilizada.

Na Figura 18 (A e B) pode-se observar uma análise cinética mostrando que (dCfl)n é um inibidor não competitivo com relação às matrizes-iniciadores (rA)n.(dT)₁₂ e (dA)n.(dT)₁₂ na reação catalisada por transcriptase reversa. Os valores de K_M aparente obtidos são de 7 e 0,25 μ g/ml para as duas matrizes, e os correspondentes valores de K_i são de 2,5 μ g/ml (Figura 18 A, (rA)n.(dT)₁₂) e 0,15 μ g/ml (Figura 18 B, (dA)n.(dT)₁₂).

A inibição por (dCfl)n com relação a TTP é também do tipo não competitiva (Figura 19 A e B). Os valores de K_M aparente para TTP são de 7×10^{-5} M e 8×10^{-5} M, em presença de (rA)n.(dT)₁₂ e (dA)n.(dT)₁₂, respectivamente; os valores de K_i correspondentes são de 1,5 e 0,25 μ g/ml.

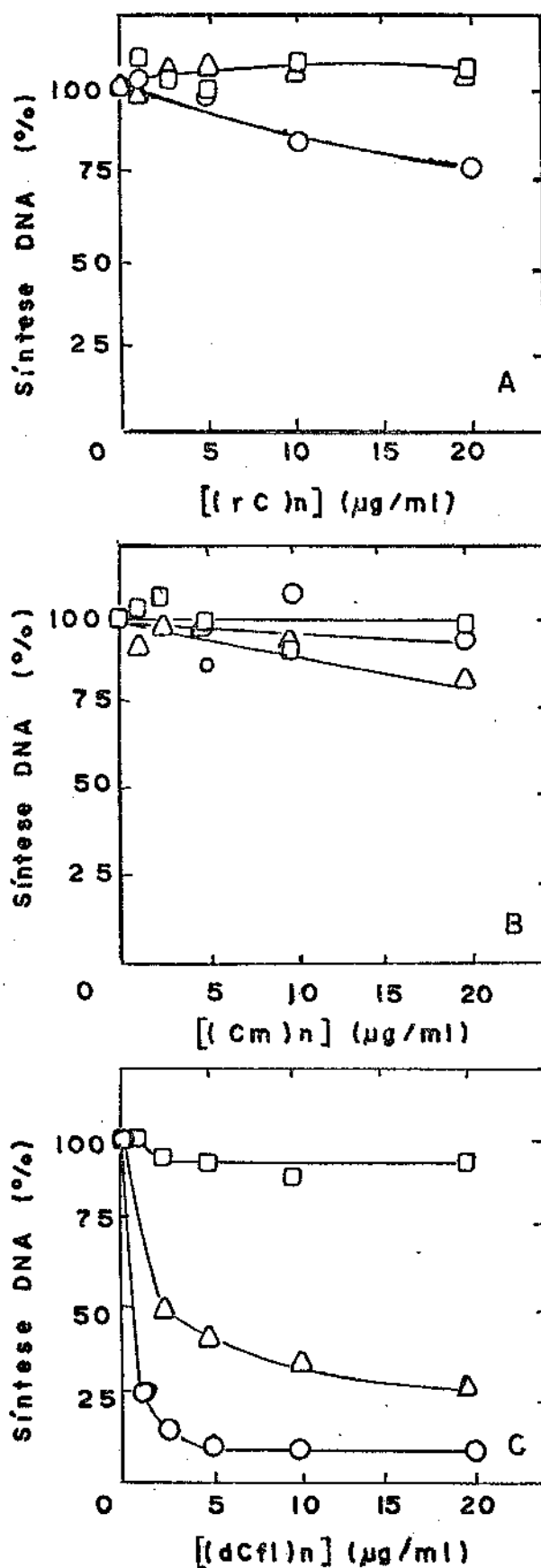


FIGURA 17. Efeitos de (rC)n, (Cm)n e (dCfl)n na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa. 10 µg/ml (dA)n, (rA)n ou (dAfl)n, 2 µg/ml dT₁₂, 6 mM Mg²⁺, 50 µM [³H] TTP (220 cpm/pmol); à 37 °C, 15 min. Os resultados estão expressos em % de DNA sintetizado com (dA)n.(dT)₁₂ (o), (rA)n.(dT)₁₂ (Δ), e (dAfl)n.(dT)₁₂ (□) como matriz-iniciador.

TABELA X. Efeito de análogos de poli C na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa em presença de matrizes naturais.

Para DNA ativado: 10 mM Mg^{2+} , 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 20 $\mu g/ml$ DNA ativado, 10 μM [3H]TTP (1000 cpm/pmol), 37 °C, 15 min. Para RNA 70 S: 6 mM Mg^{2+} , 100 μM dATP, 100 μM dCTP, 100 μM dGTP, 25 $\mu g/ml$ RNA 70 S de AMV, 5 $\mu g/ml$ dT₁₂, 10 μM [3H]TTP (1000 cpm/pmol), 37 °C, 30 min. Estão expressos entre parênteses os valores em pmoles correspondentes a 100% de incorporação de [3H] TMP.

Adição	(μg/ml)	[3H] TMP incorporado (%)	
		DNA ativado	RNA 70 S
nenhuma		100 (17)	100 (14)
(rC)n	1	99	103
(rC)n	5	99	110
(Cm)n	1	100	95
(Cm)n	5	99	68
(dCfl)n	1	70	61
(dCfl)n	5	43	38

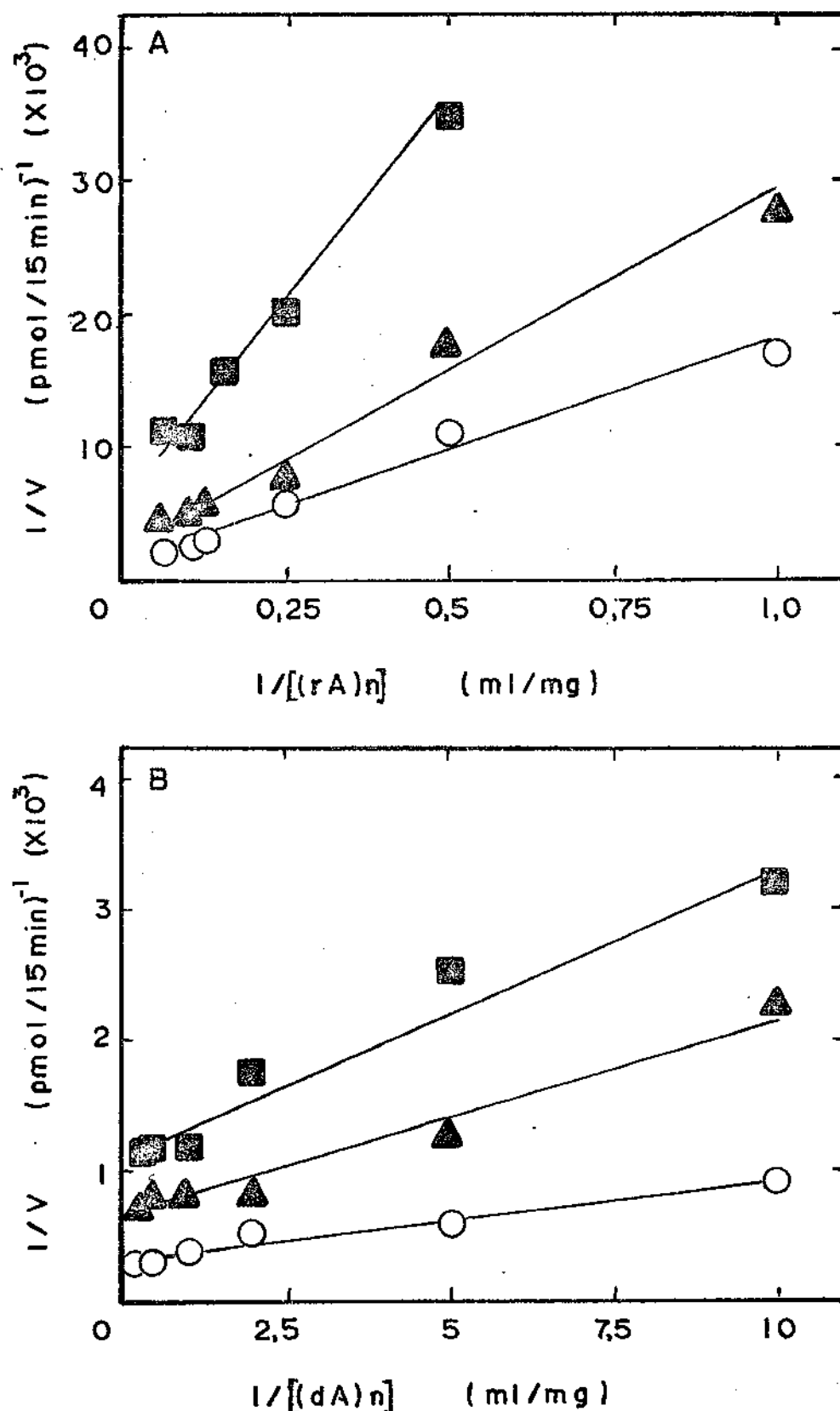


FIGURA 18. Gráficos de Lineweaver-Burk para cinética de inibição de transcriptase reversa por (dCfl)n.

A) concentrações variadas de (rA)n.(dT)₁₂ na ausência (o) e em presença de 2,5 µg/ml (▲) e 5 µg/ml (■) de (dCfl)n.

B) concentrações variadas de (dA)n.(dT)₁₂ na ausência (o) e em presença de 0,25 µg/ml (▲) e 0,5 µg/ml (■) de (dCfl)n.

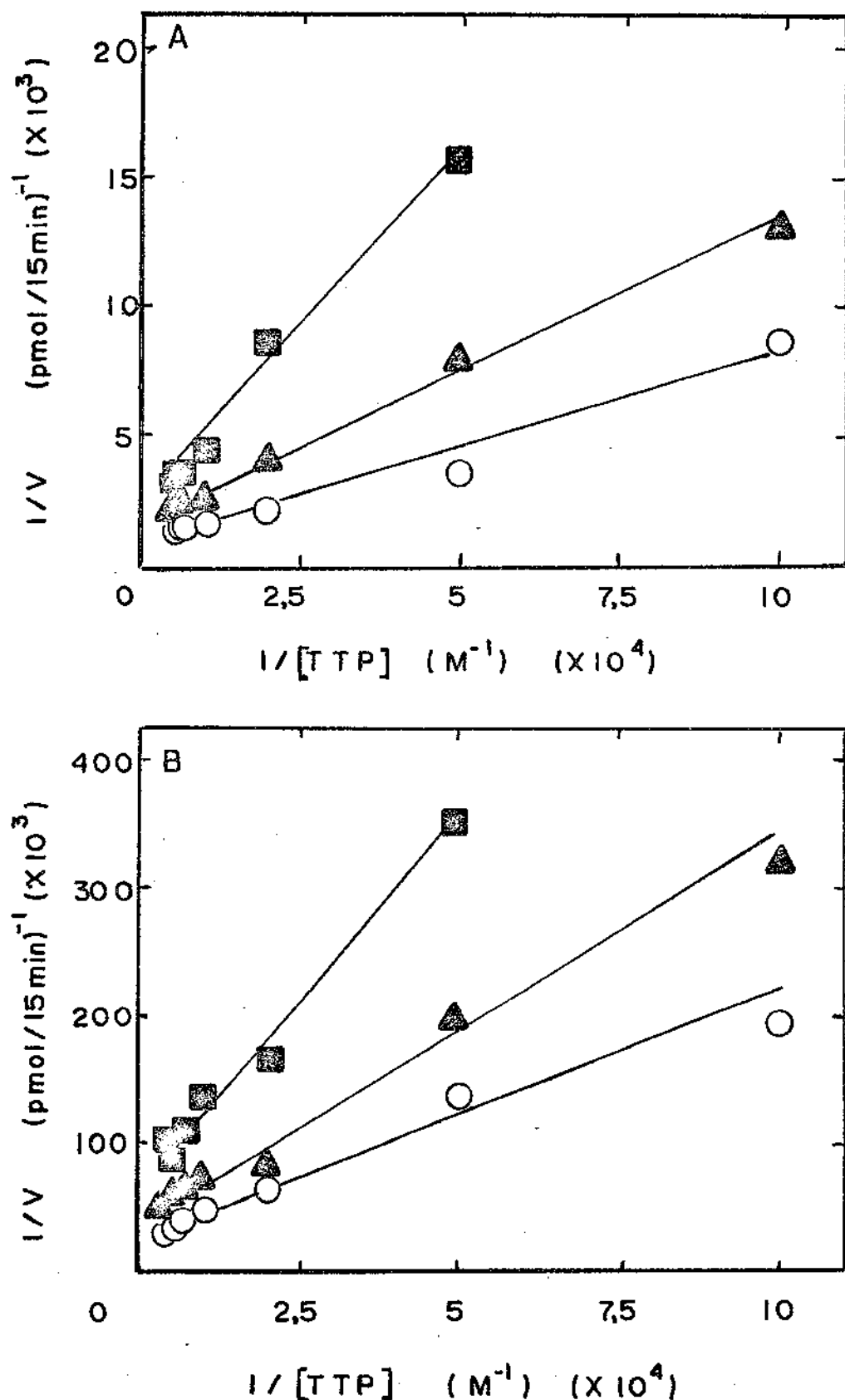


FIGURA 19. Gráficos de Lineweaver-Burk para cinética de inibição por (dCfl)n na incorporação de TMP.
 A) 10 µg/ml (rA)n, 2 µg/ml dT₁₂, na ausência (o) e em presença de 2,5 µg/ml (▲) e 5 µg/ml (■) de (dCfl)n.
 B) 2 µg/ml (dA)n, 0,4 µg/ml dT₁₂, na ausência (o) e em presença de 0,25 µg/ml (▲) e 0,5 µg/ml (■) de (dCfl)n.

A substituição de Mg^{2+} por Mn^{2+} como cátion bivalente não altera o padrão de inibição obtido em presença dos derivados de poli C (Tabela XI). Assim, como observado para Mg^{2+} , a síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa, em presença de Mn^{2+} , não é alterada por (rC)n ou (Cm)n, independentemente das matrizes sintéticas utilizadas. Por sua vez, (dCfl)n inibe a síntese de DNA, sendo novamente a reação com a matriz (dA)n a mais afetada. A síntese de DNA em presença de (dAfl)n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador não é inibida por (dCfl)n.

Na Figura 20 observa-se que o derivado fluorado (dCfl)n inibe a síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa, em presença de (rA)n como matriz, independentemente da concentração de Mg^{2+} .

Análogos de poli C foram testados na síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α e por DNA polimerase γ (Tabela XII). Nenhum dos análogos de poli C, mesmo (dCfl)n, mostra qualquer efeito nas reações catalisadas por DNA polimerase α , quer utilizando-se (dA)n.(dT)₁₂ ou DNA ativado como matriz. Para DNA polimerase γ , (rC)n ou (Cm)n não apresentam qualquer efeito inibitório significativo, independentemente da matriz-iniciador utilizada. (dCfl)n é um melhor inibidor com (rA)n.(dT)₁₂ do que com (dA)n.(dT)₁₂, observando-se uma inibição de cerca de 20% com (dAfl)n.(dT)₁₂.

Os efeitos de outros polinucleotídeos, como por exemplo, (rU)n e (rI)n, foram estudados na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa, utilizando-se derivados de poli A como matrizes (Tabela XIII). (rI)n inibe a síntese de DNA mais eficientemente com (dA)n.(dT)₁₂ do que com (rA)n.(dT)₁₂, sendo que a inibição é pequena (cerca de 10%) quando a matriz-iniciador é (dAfl)n.(dT)₁₂. (rU)n inibe preferencialmente a síntese de DNA em presença de (rA)n como matriz; a reação com (dA)n é resistente à ação de (rU)n, e com (dAfl)n não se observa uma inibição significativa.

TABELA XI. Efeito de análogos de poli C na síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa em presença de Mn^{2+} .
 10 $\mu g/ml$ (dA)n, (rA)n ou (dAfl)n, 2 $\mu g/ml$ dT₁₂, 0,5 mM Mn^{2+} , 50 μM [³H] TTP (220 cpm/pmol) e 5 $\mu g/ml$ de análogos de poli C foram incubados nas condições descritas em Material e Métodos. Estão expressos entre parênteses os valores correspondentes, em pmoles, a 100% de incorporação de [³H] TMP.

Adição	[³ H] TMP incorporado (%)		
	(dA)n.(dT) ₁₂	(rA)n.(dT) ₁₂	(dAfl)n.(dT) ₁₂
nenhuma	100 (82)	100 (328)	100 (322)
(rC)n	100	99	104
(Cm)n	99	94	114
(dCfl)n	10	65	103

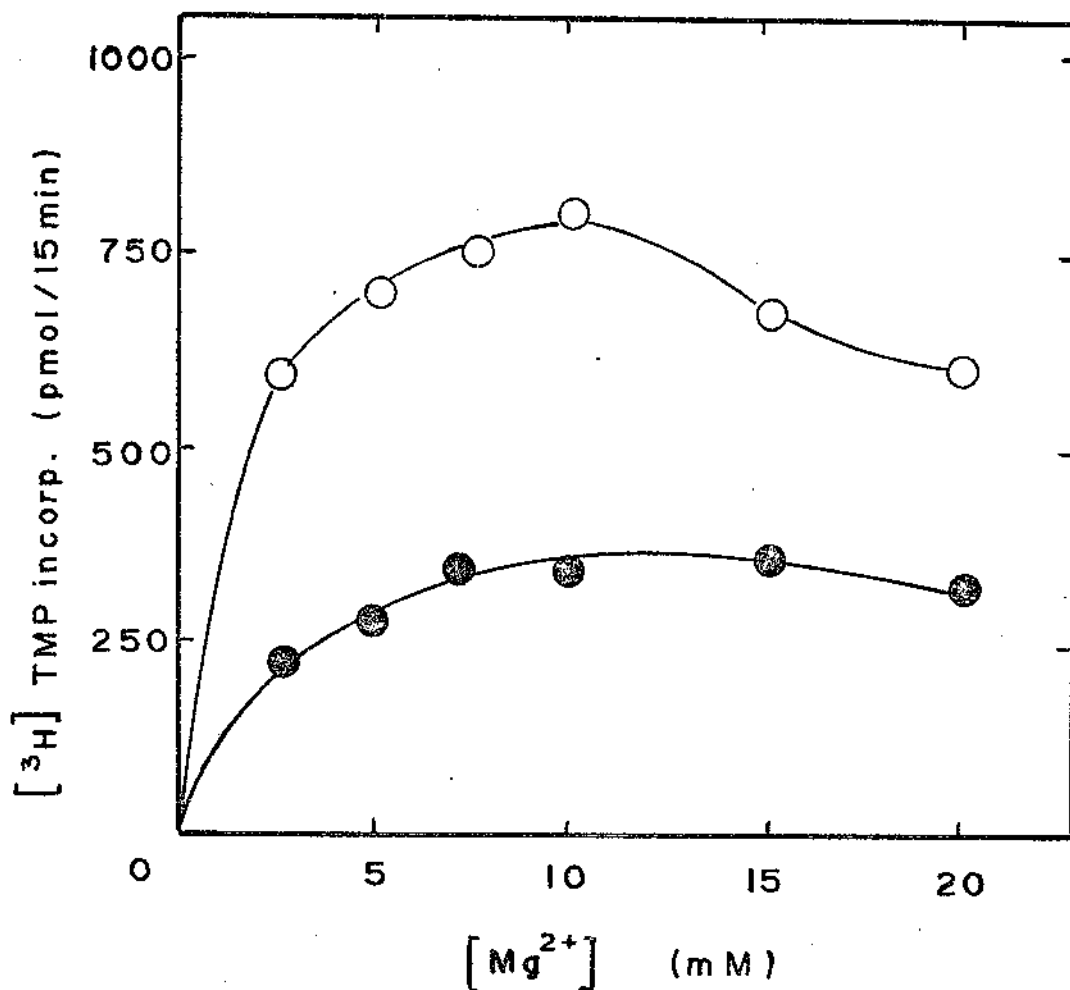


FIGURA 20. Variação da concentração de Mg^{2+} na inibição, por (dCfl)n, da síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa. 10 μ g/ml (rA)n, 2 μ g/ml dT₁₂, 50 μ M [³H] TTP (220 cpm/pmol) foram incubados a 37 °C por 15 min, nas condições descritas em Material e Métodos, na ausência (o) e em presença (•) de 5 μ g/ml de (dCfl)n.

FIGURA XII. Efeito de análogos de poli C nas sínteses de DNA catalisadas por DNA polimerase α e DNA polimerase γ .
Para DNA ativado: 10 mM Mg^{2+} , 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 20 $\mu g/ml$ DNA ativado, 10 μM $[^3H]$ TTP (1000 cpm/pmol).
Para matrizes sintéticas: 10 $\mu g/ml$ (dA)n, (rA)n ou (dAFL)n, 2 $\mu g/ml$ DT12, 5 mM Mg^{2+} , 10 μM $[^3H]$ TTP (1000 cpm/pmol). Estão expressos entre parênteses os valores em pmoles correspondentes a 100% de incorporação de $[^3H]$ TMP.

Adição	(μg/ml)	$[^3H]$ TMP incorporado (%)					
		DNA polimerase α			DNA polimerase γ		
		(dA)n.(dT)12	DNA ativado	(dA)n.(dT)12	(rA)n.(dT)12	(dAFL)n.(dT)12	
nenhuma		100 (2)	100 (12)	100 (7)	100 (2)	100 (1,5)	
(rC)n	1	100	100	100	102	89	
(rC)n	5	98	100	95	93	93	
(Cm)n	1	90	100	100	105	81	
(Cm)n	5	92	85	97	108	98	
(dCFL)n	1	95	100	99	73	87	
(dCFL)n	5	98	100	70	30	78	

TABELA XIII. Efeitos dos ácidos poliinosínico e poliuridílico nas atividades de transcriptase reversa em presença de derivados de poli A como matrizes.

10 µg/ml (dA)n, (rA)n ou (dAfl)n, 2 µg/ml dT₁₂, 10 mM Mg²⁺, 10 µM [³H] TTP (700 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos. Estão expressos entre parênteses os valores em pmoles correspondentes a 100% de incorporação de [³H] TMP.

Adição	(µg/ml)	[³ H] TMP incorporado (%)		
		(dA)n.(dT) ₁₂	(rA)n.(dT) ₁₂	(dAfl)n.(dT) ₁₂
nenhuma		100 (6)	100 (230)	100 (48)
(rI)n	5	41	68	88
(rI)n	10	33	61	89
(rU)n	5	92	84	98
(rU)n	10	100	65	90

Outros inibidores

Alguns inibidores usuais como brometo de etídeo, tetrametil brometo de etídeo, didesoxi TTP, N-etilmaleimida e berenil foram testados na reações catalisadas por transcriptase reversa, utilizando matrizes sintéticas. Efeitos de novobiocina e afidicolina foram também descritos.

Utilizando-se derivados de poli A como matrizes, pode-se observar que 10 μM de BE inibe a síntese de DNA, independentemente da matriz-iniciador e do cátion bivalente (Tabela XIV). TMBE nas mesmas condições mostra ser um inibidor menos eficiente; a reação com a matriz-iniciador $(\text{Am})\text{n} \cdot (\text{dT})_{12}$, em presença de Mg^{2+} não é inibida. A inibição por ddTTP é maior em presença de Mn^{2+} ; novamente a síntese de DNA em presença de $(\text{Am})\text{n}$ e Mg^{2+} não é afetada. Nos casos estudados 10 μM de berenil inibe cerca de 20% e 70% as reações catalisadas por transcriptase reversa utilizando-se $(\text{rA})\text{n}$ e $(\text{dAfl})\text{n}$ respectivamente. Não existem diferenças significativas na inibição de síntese de DNA por novobiocina, utilizando-se $(\text{rA})\text{n}$ ou $(\text{Am})\text{n}$ como matriz. Afidicolina não inibe a reação catalisada por transcriptase reversa em presença de $(\text{rA})\text{n}$.

Na reação catalisada por transcriptase reversa, pode-se observar na Figura 21 o comportamento de TMBE como inibidor, em várias concentrações de TTP, utilizando-se $(\text{Am})\text{n}$ como matriz, em presença de Mn^{2+} . A inibição por TMBE, em relação a TTP, é do tipo não competitiva para $(\text{Am})\text{n}$ como matriz; a K_i calculada da Figura 21 é de 10 μM .

Uma análise cinética similar foi realizada utilizando-se BE como inibidor e $(\text{dAfl})\text{n}$ como matriz na reação catalisada por transcriptase reversa, em presença de Mg^{2+} (Figura 22). A inibição por BE é do tipo não competitiva em relação a TTP, sendo o valor de K_i calculado da Figura 22 de 10 μM .

Os efeitos de NEM, BE, TMBE, novobiocina e afidicolina foram estudados na reação de síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa em presença de $(\text{rC})\text{n} \cdot (\text{dG})_{12}$ e $(\text{Cm})\text{n} \cdot (\text{dG})_{12}$ como matrizes-iniciadores (Tabela XV). Utilizando-se $(\text{Cm})\text{n}$ como matriz a reação é completamente inibida por 2 mM de NEM, em presença de Mg^{2+} ou

TABELA XIV. Efeitos de brometo de etídeo, tetrametil brometo de etídeo, didesoxi TTP, berenil, novobiocina e afidicolina nas atividades de transcriptase reversa em presença de derivados de poli A como matrizes. 10 µg/ml (rA)n, (Am)n ou (dAFL)n, 2 µg/ml dT₁₂, 5 mM Mg²⁺ ou 0,5 mM Mn²⁺, 10 µM [³H] TTP (700 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos. Estão expressos entre parênteses os valores em pmols correspondentes a 100 % de incorporação de [³H] TTP.

Adição	[³ H] TTP incorporado (%)					
	(rA)n. (dT) ₁₂		(Am)n. (dT) ₁₂		(dAFL)n. (dT) ₁₂	
	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
nenhuma	100 (212)	100 (82)	100 (1)	100 (30)	100 (162)	100 (228)
BE. 10 µM	18	13	26	2	42	43
TMBE 10 µM	85	80	100	53	83	81
ddTTP 5 µM	32	2	100	22	4	n.d.
Berenil 10 µM	83	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.
Novobiocina 1 mM	62	82	51	41	n.d.	n.d.
Afidicolina 10 µg/ml	100	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = não determinado

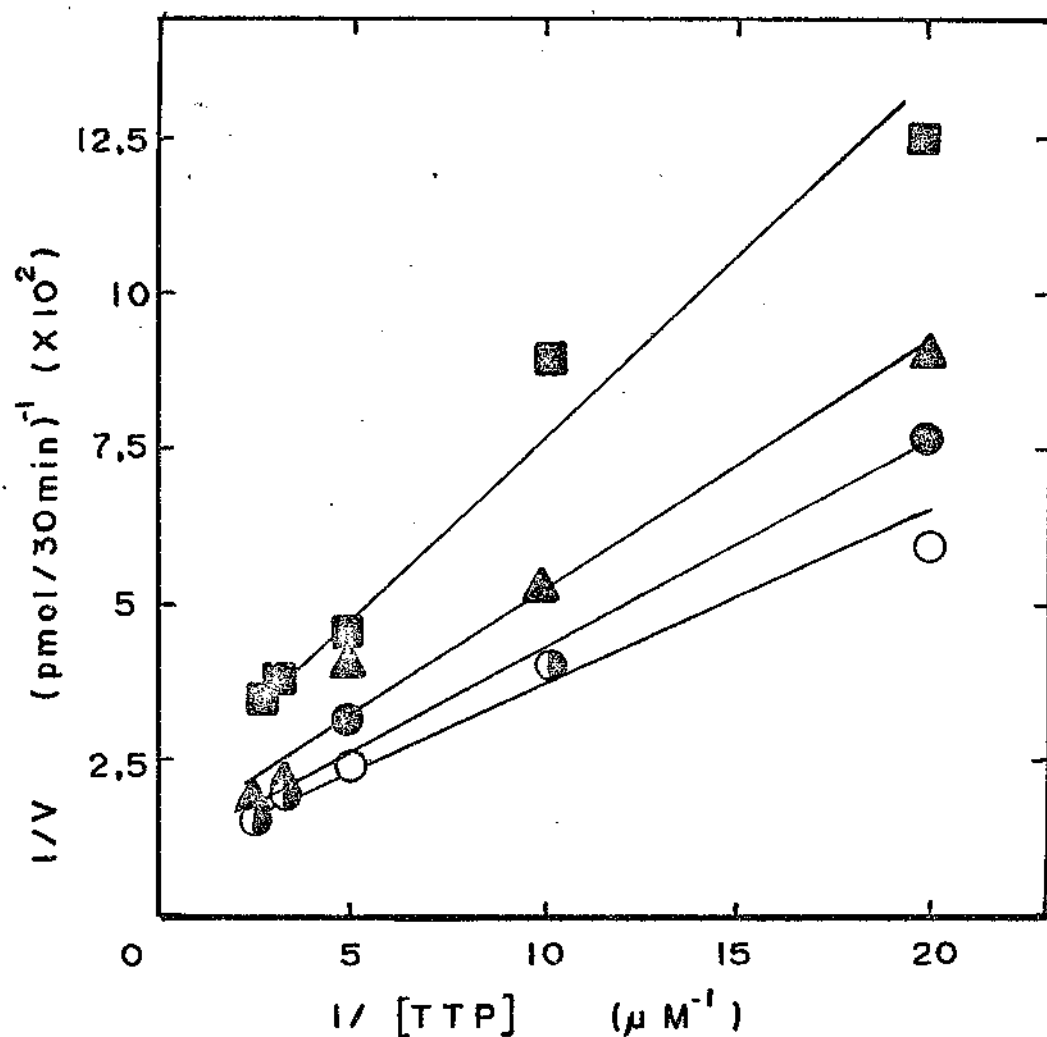


FIGURA 21. Gráfico de Lineweaver-Burk para cinética de inibição por tetrametil brometo de etídeo, utilizando-se (Am)n como matriz, em presença de Mn^{2+} .

10 $\mu g/ml$ (Am)n, 2 $\mu g/ml$ dT₁₂, 0,5 mM Mn^{2+} , e concentrações variadas de [³H] TTP (600.000 cpm/tubo) foram incubados como descrito em Material e Métodos, na ausência (o) e em presença de 2 μM (•) ; 5 μM (▲) e 10 μM (■) de TMBE.

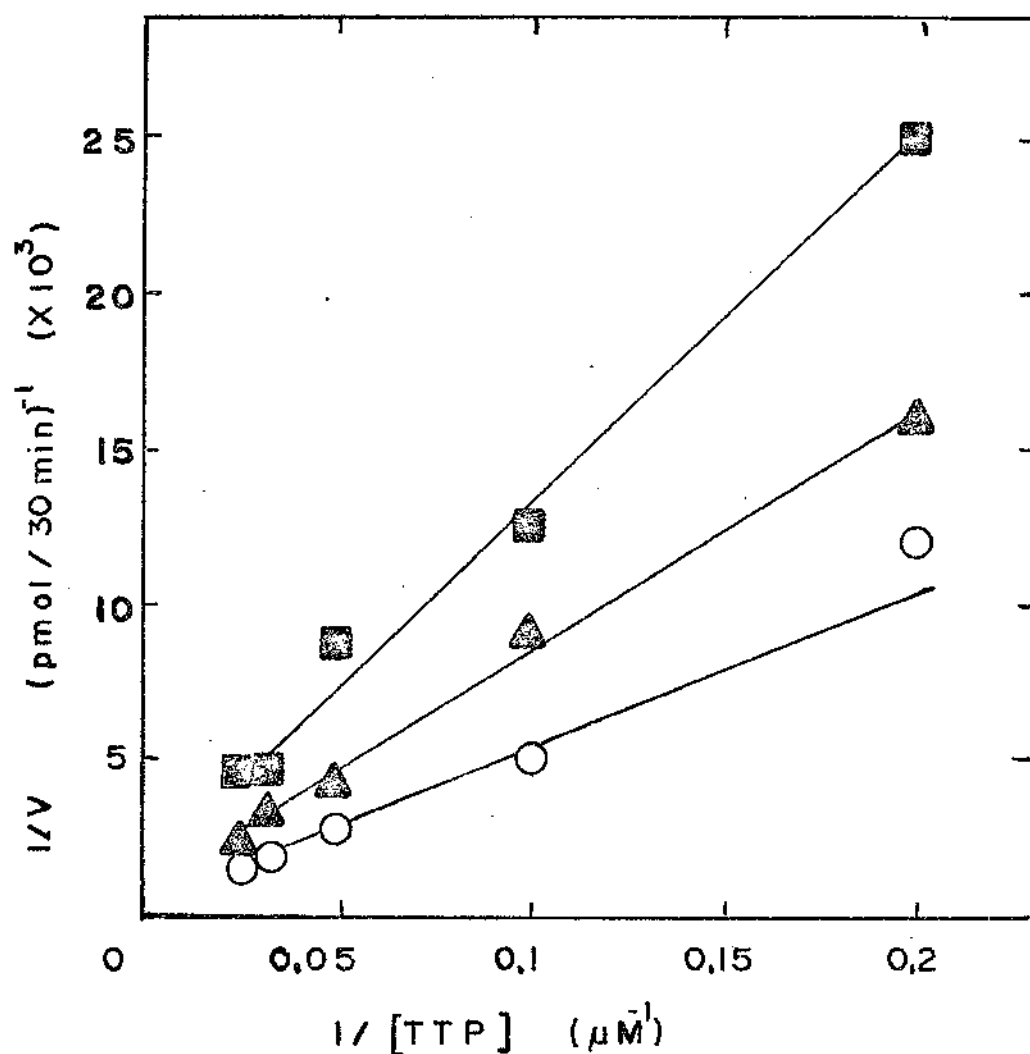


FIGURA 22. Gráfico de Lineweaver-Burk para cinética de inibição por bromato de etídeo utilizando-se (dAfl)n como matriz, em presença de Mg^{2+} .

10 $\mu\text{g/ml}$ (dAfl)n, 2 $\mu\text{g/ml}$ dT₁₂, 5 mM Mg^{2+} e concentrações variadas de $[^3\text{H}]$ TTP (510.000 cpm/tubo) foram incubados na ausência (o) e em presença de 5 μM ($\blacktriangle$) e 10 μM ($\blacksquare$) de BE.

TABELA XV. Efeitos de N-etilmaleiimida, brometo de etídeo, tetrametil brometo de etídeo, novobiocina e afidicolina nas atividades de transcriptase reversa em presença de derivados de poli C como matrizes.

20 $\mu\text{g/ml}$ (rC)n ou (Cm)n, 2 $\mu\text{g/ml}$ dG₁₂, 5 mM Mg²⁺ ou 0,5 mM Mn²⁺, 10 μM [³H] dGTP (900 cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos. Estão expressos entre parênteses os valores em pmoles correspondentes a 100% de incorporação de [³H] dGMP.

Adição		[³ H] dGMP incorporado (%)			
		(rC)n.(dG) ₁₂		(Cm)n.(dG) ₁₂	
		Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
nenhuma		100 (76)	100 (1)	100 (17)	100 (139)
NEM	2 mM	n.d.	n.d.	5	7
BE	10 μM	83	89	80	80
TMBE	10 μM	87	96	100	75
Novobiocina	1 mM	16	19	36	35
Afidicolina	10 $\mu\text{g/ml}$	100	85	100	91

n.d. = não determinado

de Mn^{2+} . BE e TMBE na concentração de 10 μM são inibidores pouco eficientes (cerca de 10-20%) nas reações catalisadas por transcriptase reversa em presença de (rC)n ou (Cm)n. A exemplo de (Am)n, a reação com (Cm)n e Mg^{2+} é estável à ação de TMBE 10 μM . As reações de síntese de DNA utilizando-se análogos de poli C são mais sensíveis à ação de novobiocina (1 mM) do que com análogos de poli A. Afidicolina não apresenta efeitos significativos nas reações catalisadas por transcriptase reversa com derivados de poli C como matrizes sintéticas.

Outras DNA polimerases dependentes de RNA

DNA polimerase A de germen de trigo

Vários polímeros sintéticos foram testados como matrizes nas reações catalisadas por DNA polimerase A de germen de trigo (Tabela XVI). Das matrizes utilizadas, a DNA polimerase A reconhece melhor (rA)n, sendo a eficiência maior em presença de Mg^{2+} que de Mn^{2+} . Já a transcriptase reversa reconhece bem (rA)n e (rC)n em presença de Mg^{2+} , e (Cm)n, em presença de Mn^{2+} .

RNA 70 S de AMV foi testada como matriz natural nas atividades de DNA polimerase A de germen de trigo e de DNA polimerase γ de células de camundongo (Figura 23). Aumentando-se a concentração de enzima nota-se um aumento na síntese de DNA catalisada por DNA polimerase A; nas mesmas condições experimentais, aumentando-se a concentração de DNA polimerase γ , a síntese de DNA é praticamente desprezível.

Trabalhando-se com RNA 70 S de AMV como matriz foram estudadas algumas condições de ensaio da atividade de DNA polimerase A de germen de trigo (Tabela XVII). A reação é dependente de Mg^{2+} ; a velocidade aumenta com o tempo de incubação e diminui em presença de Mg^{2+} 10 mM. Omitindo-se RNA do meio de reação observa-se uma síntese de DNA apreciável, diferentemente do que ocorre para a transcriptase reversa. Uma incorporação de $[^{32}P]$ dGMP não específica pode ser descartada uma vez que a reação não ocorre por pré-incubação da DNA polimerase A a 100 °C. Qualquer eventual contaminação de DNA

TABELA XVI. Atividade de DNA polimerase A de germen de trigo com matrizes sintéticas. 10µg/ml (rA)n, (Am)n, 2 µg/ml dT₁₂ e 5 µM [³H] TTP (1600 cpm/pmol) ou 20 µg/ml (rC)n, (Cm)n, 2 µg/ml dG₁₂ e 5 µM [³H] dGTP (1400 cpm/pmol) foram incubados com as misturas de reação como descrito em Material e Métodos. Os controles para ambas as enzimas, usando-se (rA)n como matriz são 0,1 pmol, na ausência de ions metálicos, e 0,05 pmol, na ausência do iniciador dT₁₂.

Matriz-iniciador	[³ H] dNMP incorporado (pmol/30 min)			
	DNA polimerase A		Transcriptase reversa	
	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
(rA)n.(dT) ₁₂	6	1	100	51
(Am)n.(dT) ₁₂	0,1	0,4	0,4	12
(rC)n.(dG) ₁₂	0,2	0,7	178	17
(Cm)n.(dG) ₁₂	0,1	0,2	18	102

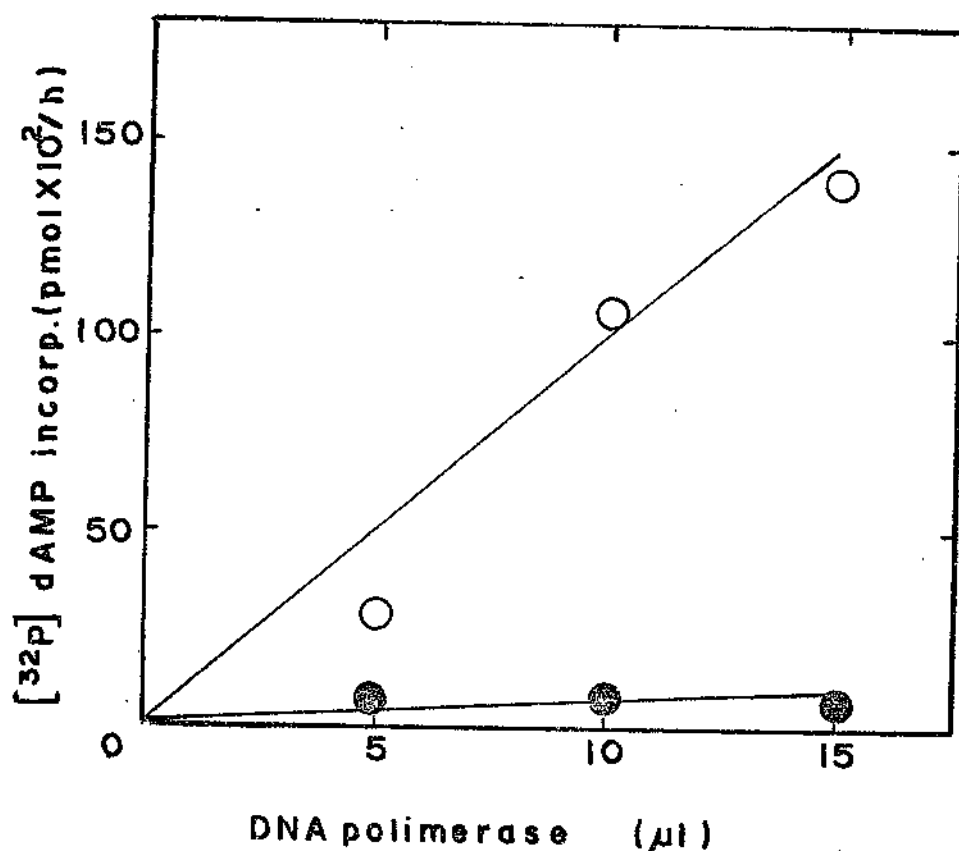


FIGURA 23. Atividades de DNA polimerase A e DNA polimerase γ em presença de RNA 70 S como matriz. 25 $\mu\text{g/ml}$ RNA 70 S, 10 $\mu\text{g/ml}$ dT_{12} , 100 μM dCTP, 100 μM dGTP, 100 μM TTP, 0,03 μM $[^{32}\text{P}]$ dATP ($8,7 \times 10^6$ cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos, em presença de DNA polimerase A (o) e de DNA polimerase γ (●). 5 μl corresponde a 5 μg de DNA polimerase A e 10 μg de DNA polimerase γ , respectivamente.

TABELA XVII. Requerimentos para atividade de DNA polimerase A de germen de trigo com RNA como matriz. 20 µg/ml RNA 70 S de AMV, 10 µg/ml dT₁₂ foram adicionados às misturas contendo 0,03 µM [³²P] dGTP (6 x 10⁶ cpm/pmol) como descrito em Material e Métodos. O sistema completo contém 6 mM de Mg²⁺ e é incubado a 37 °C por 60 min.

Sistema	[³² P] dGMP incorporado (pmolx10 ³ /h)	
	DNA polimerase A	Transcriptase reversa
completo	6,9	157
Mg ²⁺ 10 mM	4,1	164
- Mg ²⁺	0,4	0,7
- RNA	3,0	0,5
- RNA + DNA polimerase A	-	0,5
+ DNA polimerase A (fervido a 100 °C)	0,5	n.d.
15 min de incubação	5,9	n.d.
30 min de incubação	6,5	n.d.

n.d. = não determinado

polimerase A não serve como matriz na reação catalisada por transcriptase reversa.

Estudou-se o efeito de actinomicina D na síntese de DNA catalisada por DNA polimerase A, em presença de RNA 70 S como matriz (Figura 24). 10 µg/ml de actinomicina D inibe a reação catalisada pela DNA polimerase A cerca de 60%; nas mesmas condições a atividade de transcriptase reversa é inibida cerca de 50%.

Os efeitos de glicerol e oligo dT foram também estudados nas reações catalisadas por DNA polimerase A de germen de trigo, utilizando-se RNA 70 S como matriz (Tabela XVIII). Como para a transcriptase reversa a presença de dT_{12} estimula a velocidade da reação catalisada por DNA polimerase A para os dois desoxinucleosídeos trifosfato testados. 20% de glicerol na mistura de reação inibe as atividades de ambas as enzimas.

Observou-se que as RNases T_2 e A inibiam as atividades de DNA polimerase A com RNA 70 S como matriz (Tabela XIX). Em presença de dT_{12} , a síntese de DNA catalisada por DNA polimerase A é inibida de 40 e 50%, respectivamente, em presença de RNase T_2 e RNase A. As atividades de transcriptase reversa são mais eficientemente inibidas por ambas RNases. Na ausência de dT_{12} não se observa efeito de RNases na atividade de DNA polimerase A; para a transcriptase reversa, os efeitos de RNases na ausência de dT_{12} são menos acentuados que os observados em presença de dT_{12} .

DNA polimerases de virus do mosaico da couve-flor

Na purificação de DNA polimerases a partir de folhas infectadas por CaMV foram eluídos dois picos por cromatografia em DNA-celulose, sendo as suas atividades determinadas em presença de diferentes matrizes (Tabela XX). As DNA polimerases de ambas as frações reconhecem DNA ativado e $(\text{rA})\text{n} \cdot (\text{dT})_{12}$ com grande eficiência; a fração 2 possui uma atividade maior em presença de Mn^{2+} que de Mg^{2+} com $(\text{rA})\text{n}$ como matriz. Utilizando-se $(\text{rC})\text{n} \cdot (\text{dG})_{12}$ observa-se uma incorporação maior de dGMP em presença de Mn^{2+} que de Mg^{2+} ; para a fração 2 a atividade é maior em presença de Mn^{2+} com $(\text{Cm})\text{n}$ como matriz.

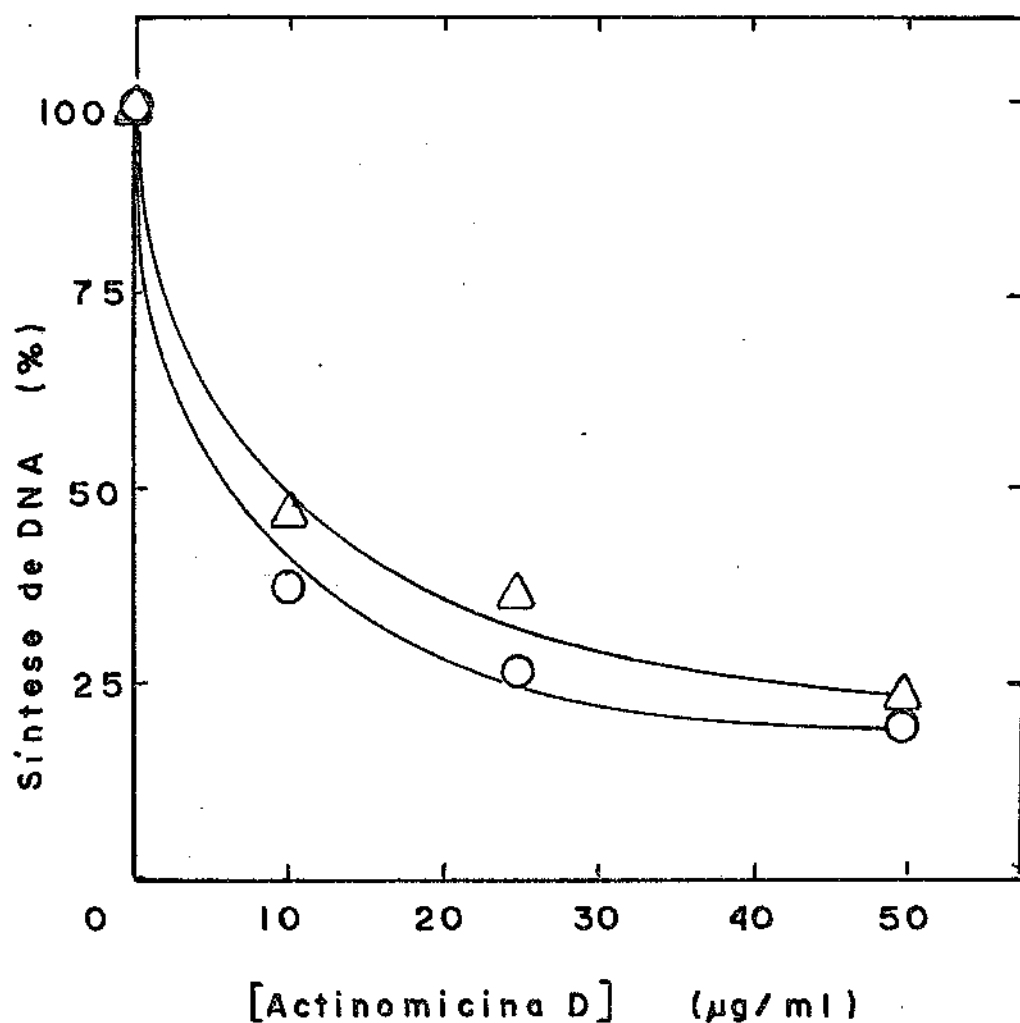


FIGURA 24. Efeito de actinomicina D na atividade de DNA polimerase A em presença de RNA como matriz. 25 µg/ml RNA 70 S, 10 µg/ml dT₁₂, 100 µM dCTP, 100 µM dGTP, 100 µM TTP, 0,03 µM [³²P] dATP (8,7 x 10⁶ cpm/pmol) foram incubados como descrito em Material e Métodos, em presença das concentrações indicadas de actinomicina D e DNA polimerase A (o) ou transcriptase reversa (Δ). 100% de síntese correspondem a 10,5 e 340 pmol x 10³/h, para DNA polimerase A e transcriptase reversa, respectivamente.

TABELA XVIII. Efeitos de oligo dT e glicerol na atividade de DNA polimerase A de germen de trigo. 25 µg/ml RNA 70 S de AMV, 10 µg/ml dT₁₂ foram adicionados à misturas contendo 0,03-0,06 µM [³²P] TTP (7,5 x 10⁶ cpm/pmol) ou [³²P] dATP (8,7 x 10⁶ cpm/pmol) como descrito em Material e Métodos.

Sistema	[³² P] dNMP incorporado (pmolx10 ³ /h)			
	DNA polimerase A		Transcriptase reversa	
	TMP	dAMP	TMP	dAMP
Completo	23	10,5	146	340
- dT ₁₂	6	5	18	39
- Mg ²⁺	0,2	n.d.	1	n.d.
+ glicerol	8	n.d.	105	n.d.

n.d. = não determinado

TABELA XIX. Efeitos de RNases na atividade de DNA polimerase A de germen de trigo com RNA como matriz.

25 µg/ml RNA 70 S de AMV, 10 µg/ml dT₁₂ foram adicionados à misturas contendo 0,05 µM [³²P] TTP (7,5 x 10⁶ cpm/pmol) como descrito em Material e Métodos. O RNA é previamente incubado a 37 °C por 30 min em presença de RNase T₂, a pH 4,5, e em presença de RNase A, a pH 8,3.

Sistema	[³² P] TMP incorporado (pmolx10 ³ /h)			
	DNA polimerase A		Transcriptase reversa	
	- dT ₁₂	+ dT ₁₂	- dT ₁₂	+ dT ₁₂
Completo	10	23	29	146
+ RNase T ₂ 2 U/ml	10	15	29	62
+ RNase T ₂ 20 U/ml	12	14	19	19
+ RNase A 50µg/ml	11	12	12	14
+ RNase A 100µg/ml	10	11	11	12

TABELA XX. Atividades de DNA polimerases (picos 1 e 2) de folhas infectadas por CaMV, em presença de matrizes naturais e sintéticas.

a) DNA ativado: 10 µg/ml DNA ativado, 5 mM Mg²⁺, 50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP; e (b) (rA)n.(dT)₁₂: 10 µg/ml (rA)n, 2 µg/ml dT₁₂, 5 mM Mg²⁺ ou 0,5 mM Mn²⁺; foram incubados em presença de 5 µM [³H] TTP (1500 cpm/pmol), como descrito em Material e Métodos; c) (xC)n.(dG)₁₂: 10 µg/ml (rC)n, (Cm)n, 2 µg/ml dG₁₂, 5 mM Mg²⁺ ou 0,5 mM Mn²⁺ foram incubados em presença de 0,6 µM [³H] dGTP (1500 cpm/pmol) como descrito em Material e Métodos.

Matriz	[³ H] dNMP incorporado (pmol/30 min)					
	DNA polimerase (pico 1)			DNA polimerase (pico2)		
	- Me ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	- Me ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
DNA ativado	n.d.	2,5	n.d.	n.d.	6,2	n.d.
(rA)n.(dT) ₁₂	0,1	3,2	4	0,1	4,8	37
(rC)n.(dG) ₁₂	0,01	0,05	0,4	0,01	0,58	5,1
(Cm)n.(dG) ₁₂	0,01	0,01	0,1	0,01	0,02	1,6

n.d. = não determinado

Dois inibidores, afidicolina e brometo de etídeo, foram testados nas atividades das duas frações de DNA polimerases de folhas infectadas por CaMV (Figura 25). Utilizando-se DNA ativado como matriz não se observa efeito inibitório significativo nas atividades das frações 1 e 2 de DNA polimerases por afidicolina. Já BE inibe ambas as atividades enzimáticas em presença de (rA)n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador. A inibição é mais pronunciada para a fração 2; 10 μ M de BE inibe cerca de 30% a atividade da fração 1 e cerca de 85% a atividade da fração 2.

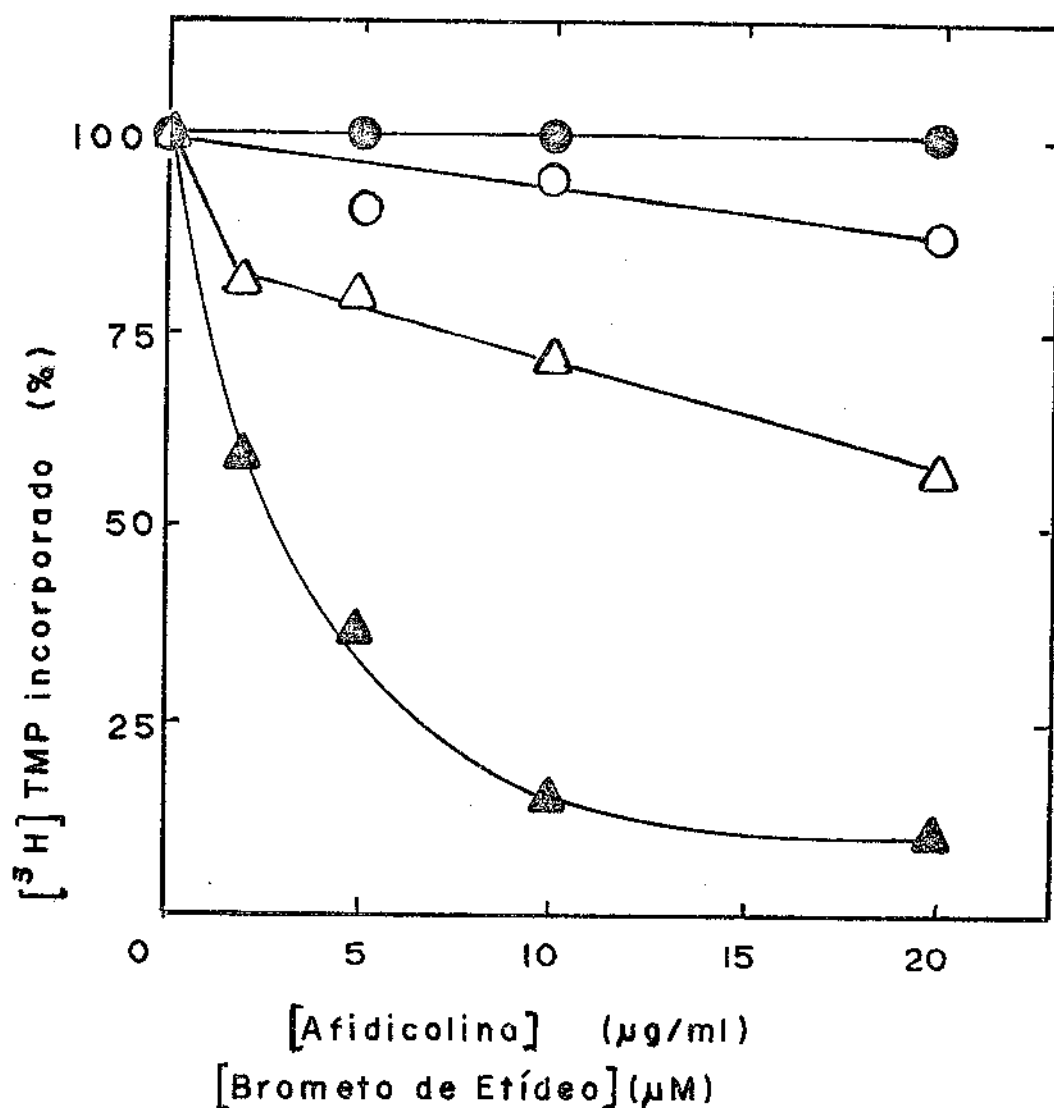


FIGURA 25. Efeitos de afidicolina e brometo de etídeo nas atividades de DNA polimerases purificadas de folhas infectadas por CaMV.

Para DNA ativado: 10 µg/ml DNA ativado, 5 mM Mg^{2+} , 50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 5 µM $[^3H]$ TTP (1.500 cpm/pmol) e fração 1 (o) ou fração 2 (●) de DNA polimerase foram incubados em presença de afidicolina nas concentrações indicadas.

Para (rA)n.(dT)₁₂: 10 µg/ml (rA)n, 2 µg/ml dT₁₂, 5 mM Mg^{2+} , 5 µM $[^3H]$ TTP (1.500 cpm/pmol) e fração 1 (Δ) ou fração 2 (▲) de DNA polimerase foram incubados em presença de BE nas concentrações indicadas.

DISCUSSÃO

A transcriptase reversa de AMV reconhece DNA ativado e vários RNAs diferentes como matrizes naturais na reação de síntese de DNA sendo necessário para tanto um iniciador que forneça grupamento 3'-OH livre (Tab.I). Alguns autores mostraram que o iniciador permanece covalentemente ligado ao cDNA, por estudos de estabilidade do complexo à denaturação e por transferência de $[^{32}\text{P}]_{\alpha}$ do DNA produto aos ribonucleotídeos após hidrólise alcalina (HURWITZ & LEIS, 1972; LEIS & HURWITZ, 1972; TAYLOR et al., 1972). BALTIMORE & SMOLER (1971) observaram que somente os iniciadores que formam pares de bases com as matrizes são eficientes. RNA 70 S de AMV assim como os mRNAs possuem sequências de poli A, e portanto requerem oligo(dT) como iniciador. Por outro lado, RNA de TYMV, que contém poli C, necessita de oligo(dG) como iniciador, sendo oligo(dT) pouco ativo (Tab.I) (AOYAMA, 1985 a). DUESBERG et al. (1971) observaram que a atividade de DNA polimerase de RSV, utilizando-se RNA de vírus do mosaico de tabaco como matriz, era pouco estimulada por oligo(dT) e cerca de 10 vezes por oligo(dC).

Nas reações catalisadas pelas transcriptases reversas os polinucleotídeos sintéticos que servem como matrizes são mais eficientes do que as matrizes naturais (Tab.I e II). As matrizes sintéticas características para DNA polimerases dependentes de RNA são (rA)_n e (rC)_n, em presença de Mg^{2+} como cátion bivalente. Derivados de poli A e poli C, com fluor na posição 2', são melhores matrizes do que os correspondentes derivados com O-metil. O íon metálico deve desempenhar um papel importante e diferenciado na síntese de DNA; a substituição de Mg^{2+} por Mn^{2+} torna os análogos 2'-O-metilados dos polinucleotídeos ótimas matrizes nas reações catalisadas pela transcriptase reversa. Uma discussão mais detalhada em relação às matrizes sintéticas e ao Mn^{2+} será abordada posteriormente.

Com relação ao cátion bivalente, Mg^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} podem ser utilizados na reação catalisada pela transcriptase reversa com (rA)_n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador. Diferentemente de Mg^{2+} , 1 mM

de Mn^{2+} e Co^{2+} inibem a velocidade de reação (Tab.III). A atividade máxima é atingida para concentrações de Mg^{2+} superiores a 5 mM, tanto com DNA ativado ou com RNA 70 S como matriz (Tab.IV). LEIS & HURWITZ (1972), trabalhando com RNA de AMV obtiveram uma concentração ótima de Mg^{2+} de 10 mM e observaram que Mg^{2+} e Mn^{2+} juntos apresentavam um efeito estimulatório.

Cátions polivalentes, como as poliaminas, tem sido utilizados em reações dependentes de Mg^{2+} , sendo bastante estudados em reações de síntese de RNA e de síntese de proteínas (COHEN, 1971). Nas reações catalisadas por transcriptase reversa, utilizando-se DNA ativado ou RNA 70 S como matriz, as poliaminas espermidina e espermina não possuem a capacidade de substituir o Mg^{2+} , entretanto, em presença do cátion bivalente, observa-se um estímulo na velocidade de reação (Tab.IV). O efeito ativador de espermina 1 mM é observado independentemente da concentração de Mg^{2+} utilizada (Fig.1). Este efeito de poliaminas não pode ser explicado simplesmente pela complexação com ácidos nucleicos, uma vez que a síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α de *Xenopus laevis*, em presença de DNA ativado como matriz, não é afetada por poliaminas, ocorrendo mesmo uma inibição quando em presença de Mg^{2+} ; observar que concentrações elevadas de Mg^{2+} (10 mM) também inibem a reação (Tab.IV). A interação de DNA com poliaminas foi inicialmente mostrada pela habilidade de espermina e espermidina precipitarem DNA, pela habilidade dessas amins protegerem DNA da denaturação térmica, e por estudos de difração de raios-X em complexos poliamina-DNA. Alguns estudos sugerem que, *in vivo*, na presença de poliaminas, o DNA não pode estar livre em solução, mas em algum tipo de complexo precipitado. Uma análise dos efeitos de poliaminas não é muito fácil uma vez que espermidina ou espermina pode reagir com substrato, com produto, ou mesmo com a enzima (TABOR & TABOR, 1983; TABOR & TABOR, 1984).

Todos os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfato são necessários na reação de síntese de DNA quando se utiliza RNA ou DNA ativado como matriz. dCflTP, um análogo 2'-fluorado de dCTP pode ser utilizado como substrato nas reações catalisadas por DNA polimerases α e γ celulares e pela transcriptase reversa viral (Tab. V).

HELFMAN et al. (1978) observaram que dCflTP substituía dCTP, cerca de 25-30%, na reação de DNA polimerase II de *Escherichia coli*, e muito pouco na reação de DNA polimerase III. Estes autores não observaram diferenças na substituição de Mg^{2+} por Mn^{2+} como cátion bivalente. Para a transcriptase reversa de AMV, a substituição de dCTP por dCflTP é de apenas 10% com Mg^{2+} , e cerca de 40% em presença de Mn^{2+} (Tab.V).

Uma inibição pouco significativa é observada na síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α e transcriptase reversa (30 e 10%, respectivamente) por dCflTP até uma concentração de 1,8 mM, em presença de 50 μ M de dCTP (Fig.2). BROX et al. (1974) observaram que 10 μ M de dCfl inibia o crescimento de várias linhas de células linfoblásticas em cultura. WOHLRAB et al. (1985), estudando o efeito de dCfl no crescimento de certos virus do tipo herpes, observaram por centrifugação em gradiente de densidade que este composto era incorporado em DNA e RNA celular e viral, e que a atividade citotóxica de dCfl era cerca de 10 vezes menor que a de arabinosil citosina (araC). Alguns autores estudaram os efeitos de outros análogos de nucleotídeos 2'-substituídos. Assim, 2'-azido-2'-desoxicitidina (dCz), mas não 2'-amino-2'-desoxicitidina, bloqueava o crescimento celular (SKOOG et al., 1977), e a síntese de DNA em células infectadas por virus (BJURSELL, 1978). Com relação a dCzTP existem descritos diferentes efeitos: as sínteses de DNA e de RNA iniciador não eram afetadas para concentração de 0,1 mM (ELIASSON et al., 1981), mas a síntese de RNA catalisada por DNA primase de *E. coli* (REICHARD et al., 1978), e o crescimento de células de ovário de hamster chinês (SKOOG et al., 1977) eram inibidos cerca de 50%, em concentrações de 0,5 mM e 0,1 mM de dCzTP, respectivamente. O análogo dAzTP inibe a atividade de RNA polimerase associada com a DNA polimerase de células tumorosas (YAGURA et al. 1982).

Afidicolina, um diterpeno tetracíclico, é descrito na literatura como um inibidor específico de DNA polimerase α (IKEGAMI et al., 1978; HUBERMAN, 1981; SPADARI et al., 1982). A síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α de *X. laevis* é inibida cerca

de 50% em presença de 7-8 mg/ml de afidicolina, quer utilizando-se dCTP ou dCflTP. Concentrações mais elevadas de dCTP (25 μ M) revertem parcialmente a inibição por afidicolina (Fig.3). As reações catalisadas por transcriptase reversa de AMV utilizando-se matrizes sintéticas não são afetadas por afidicolina (Tab.XIV e XV). PEDRALINOY & SPADARI (1979) observaram que a síntese de DNA *in vitro* catalisada por transcriptase reversa era insensível à afidicolina. *In vivo*, afidicolina parece não interferir na síntese de DNA viral linear, mas inibe o aparecimento de DNA viral circular (YAMAGISHI et al., 1981; HSU & TAYLOR, 1982).

Com relação aos parâmetros cinéticos, o valor de K_M aparente para dCflTP é cerca de 50 vezes o de dCTP na reação catalisada por transcriptase reversa de AMV utilizando-se DNA ativado como matriz (Tab.A, das Fig.4 e 5) (AOYAMA et al., 1985 a); Esta substituição menos eficiente pode também ser observada na Tab. V, em presença de Mg^{2+} . A síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa é ativada por dT₁₂ ou dG₁₂, dependendo do RNA utilizado como matriz (Tab.VI). Omitindo-se dCTP da mistura de reação contendo RNA, a síntese de DNA é desprezível, diferentemente do observado por HELFMAN et al.(1978) para DNA polimerases de *E. coli*. A presença do iniciador dT₁₂ não altera significativamente os valores de K_M de dCTP e dCflTP com RNA 70 S (Tab.A). Mudanças conformacionais no açúcar devido à presença de um átomo eletronegativo como fluor na posição 2' de desoxinucleosídeos (BLANDIN et al., 1974; GUSCHLBAUER & JANKOWSKI, 1980) podem explicar as diferenças nos valores de K_M para dCTP e dCflTP. HAKOSHIMA et al. (1981) observaram que 2'-fluor nucleosídeos mostravam conformações não usuais em suas estruturas cristalinas.

ALLAUDEEN et al. (1982) estudaram o efeito de 1-(2'-desoxi-2'-fluor- β -D-arabinofuranosil)5-iodo citidina trifosfato (FlACTP) na síntese *in vitro* e *in vivo* de DNA. Este composto, um análogo de dCflTP com arabinose em lugar de ribose e um átomo de iodo na posição 5 da base, parece ser um substrato alternativo para DNA polimerase viral de Herpes simples mas não para DNA polimerase α . Baixas concentrações do nucleosídeo correspondente (FlAC) ini

bem preferencialmente a síntese de DNA viral (60%) que a de DNA celular (5%).

Polinucleotídeos 2'-fluorados como matrizes em síntese de DNA

Polinucleotídeos com diferentes substituintes na posição 2' podem se comportar como substratos ou inibidores de síntese de DNA (AOYAMA et al., 1985 b). Derivados de poli A e poli C com fluor na posição 2' funcionam como matrizes de reações catalisadas por transcriptase reversa de AMV (Tab.II e VII). Diferentemente de DNA polimerase α , DNA polimerase γ reconhece além de (rA)n, também (dAfl)n como matriz (AOYAMA, 1985 b). Em presença de Mn^{2+} , (dAfl)n é uma matriz consideravelmente melhor tanto para DNA polimerase γ quanto para transcriptase reversa. DECLERCQ et al. (1979) e CHANDRA et al. (1981) observaram que (dAfl)n era uma eficiente matriz para transcriptase reversa de vírus de leucemia murina e vírus de leucemia de Rauscher, respectivamente. Para transcriptase reversa os análogos de poli C mostram um atividade maior em presença de Mg^{2+} que de Mn^{2+} . Trabalhando com outro análogo de poli C, com O-metil na posição 2' como matriz, GERARD et al. (1974) observaram para transcriptase reversa de AMV uma velocidade de síntese 40 vezes maior em presença de Mn^{2+} que de Mg^{2+} .

Comparando-se as atividades de transcriptase reversa e DNA polimerase γ com relação à utilização de (dAfl)n e (dCfl)n à várias temperaturas, observa-se que para a enzima viral a substituição é cerca de 50% a 37 °C (as utilizações de (rA)n e (rC)n são consideradas como 100%), enquanto que para DNA polimerase γ , a substituição é total. Diminuindo-se a temperatura de incubação, a eficiência de substituição também também diminui (Tab.VIII). Utilizando-se Mn^{2+} ao invés de Mg^{2+} os polinucleotídeos fluorados substituem completamente os correspondentes polirribonucleotídeos, às vezes com atividades superiores, para ambas as enzimas e independentemente da temperatura utilizada. CHANDRA et al. (1981) observaram que (dAfl)n estimulava as atividades de DNA polimerase γ de tecido de ovário humano e transcriptase reversa de RLV com (rA)n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador.

De modo a diminuir a dissociação da matriz-iniciador, PARNAIK & DAS (1983) trabalharam a 23 °C e observaram uma afinidade mais alta de transcriptase reversa de AMV por matrizes-iniciadores relacionadas com uma menor velocidade de síntese de DNA. Nestas condições eles não conseguiram estudar os desoxipolímeros. A baixa eficiência de $(dA)n.(dT)_{12}$ para transcriptase reversa de AMV pode ser explicada por uma possível formação de estruturas tríplice hélices (TAMBLY & WELLS, 1975). É mais provável, entretanto, que a baixa atividade de $(dA)n.(dT)_{12}$ como matriz seja devido a uma afinidade de ligação muito baixa do desoxipolímero pela transcriptase reversa de AMV (TAMBLY & WELLS, 1975; WARWICK-KOOCHAKI & BOBST, 1984).

HURWITZ & LEIS (1972) não conseguiram detetar nenhuma atividade exonuclease 5'-3' ou 3'-5' em DNA polimerase de vírus de leucemia murina de Rauscher. FLUGEL et al. (1973) também não observaram atividade exonuclease 5'-3' para DNA polimerase de AMV. Esta falta de atividades exonucleásicas pode ser responsável pela alta frequência de incorporação incorreta de bases pela transcriptase reversa. A fidelidade é o aspecto mais crucial na replicação de DNA *in vivo*. Erros maiores que 1 em 10^9 - 10^{10} bases copiadas são intoleráveis. Não existe até o presente nenhum sistema de ensaio *in vitro* capaz de aproximar esta sensibilidade (LOEB & KUNKEL, 1982). As incorporações incorretas de dCMP em $(rA)n.(dT)_{12}$ e $(dAfl)n.(dT)_{12}$ não são significativamente diferentes para transcriptase reversa de AMV (Tab.IX). A fidelidade de síntese de DNA mais baixa com $(dA)n.(dT)_{12}$ como matriz-iniciador está de acordo com a baixa afinidade de transcriptase reversa de AMV por matrizes polidesoxinucleotídeos. HILLEBRAND & BEATTIE (1985) estudaram a influência das estruturas primária e secundária de matrizes na velocidade e na fidelidade de síntese de DNA.

O valor de K_M para TTP utilizando-se $(dAfl)n.(dT)_{12}$ em presença de Mn^{2+} ($K_M = 1,6 \times 10^{-5}$ M; Fig.6) é da mesma ordem de grandeza que o obtido para $(rA)n.(dT)_{12}$ em presença de Mg^{2+} ($K_M = 2,5 \times 10^{-5}$ M; Fig.19A) na reação catalisada por transcriptase reversa de AMV. HURWITZ & LEIS (1972) obtiveram para DNA polimerase de RLV, utilizando-se poli(dA-dT) como matriz, um valor de K_M para TTP

de $2,6 \times 10^{-5}$ M. Para a matriz fluorada e Mg^{2+} como cátion bivalente a afinidade de transcriptase reversa por TTP diminui ($K_M = 10^{-4}$ M - Fig.6). A afinidade de transcriptase reversa por (dAfl)n.(dT)₁₂ é maior em presença de Mg^{2+} que de Mn^{2+} (Fig.7), analogamente ao observado para (rA)n.(dT)₁₂ (Fig.18A).

Derivados 2'-O-metilados de poli A e poli C como matrizes em síntese de DNA

Análogos de polinucleotídeos com substituintes 2'-O-alquil foram utilizados como matrizes ou inibidores em reações catalisadas por DNA polimerases virais. O ácido poli (2'-O-metilcitidílico) serve como matriz para DNA polimerase dependente de RNA de AMV (GERARD et al., 1974); à atividade de transcriptase reversa associada à partículas similares a virus (SHIBA & SAIGO, 1983), mas não para DNA polimerase γ de células HeLa (GERARD, 1975). Por outro lado, derivados 2'-O-alquilados de poli A são inibidores de DNA polimerases dependentes de RNA de virus de leucemia murina (ARYA et al., 1974); e o ácido poli (2'-O-etilcitidílico) é um inibidor de transcriptase reversa de AMV (MIKKE et al., 1976).

Os derivados 2'-O-metilados de poli A e poli C são pouco eficientes como matrizes para transcriptase reversa de AMV, em presença de Mg^{2+} , sendo a eficiência extremamente aumentada utilizando-se Mn^{2+} como cátion bivalente (Fig.8 e 11).

A afinidade de transcriptase reversa por TTP é a mesma quer utilizando-se (Am)n como matriz, em presença de Mn^{2+} ($K_M = 2,5 \times 10^{-5}$ M; Fig.9), ou (rA)n, em presença de Mg^{2+} , coincidindo também com o observado para (dAfl)n (Fig.6). O mesmo comportamento foi verificado para dGTP, para (Cm)n/ Mn^{2+} ($K_M = 5 \times 10^{-6}$ M; Fig.12) e para (rC)n/ Mg^{2+} ($K_M = 5 \times 10^{-6}$ M; resultado não apresentado). Os comportamentos cinéticos de (Am)n e (Cm)n como matrizes para transcriptase reversa de AMV, em presença de Mn^{2+} , são distintos, uma vez que diferentemente do observado para (Cm)n, a reação é inibida para concentrações de (Am)n acima de 4 μ g/ml (Fig.10 e 13). Novamente se constata uma similaridade nas afinidades de transcriptase reversa por diferentes matrizes: K_M para (Cm)n/ Mn^{2+} é de 2 μ g/ml (Fig.13) e

K_M para $(rC)n/Mg^{2+}$ é de 1,7 $\mu g/ml$ (resultado não apresentado). Estes resultados sugerem que, uma vez selecionadas as melhores condições de ensaio, as afinidades de transcriptase reversa pelos substratos independem do cátion bivalente utilizado.

Papel de ions metálicos na síntese de DNA

Os polinucleotídeos 2'-fluorados são melhores matrizes que seus análogos 2'-O-metilados em presença de Mg^{2+} , sendo que a situação se inverte utilizando-se Mn^{2+} . Conceitualmente o fluor pode formar pontes de H semelhante ao observado no tRNA ou polinucleotídeos (BOLTON & KEARNS, 1978), o que não ocorre com os polinucleotídeos 2'-O-metilados. Porém, o favorecimento dessas reações em presença de Mn^{2+} ainda não está bem esclarecido (AOYAMA, 1985 c). Para as DNA polimerases em geral aceita-se que o Mg^{2+} é o cátion preferido com DNA como matriz, enquanto Mn^{2+} é necessário para atividades com polinucleotídeos e poli desoxinucleotídeos (BOLLUM, 1974). 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 (MILDVAN & LOEB, 1979). Este outro cátion além do Zn^{2+} , denominado de "cation ativador" por LOEB (1974), pode ser Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} . Foi demonstrado através de estudos físicos que os cátions metálicos bivalentes interagem com os fosfatos e as bases nos polinucleotídeos (EICHHORN & SHIN 1968). Estudos de EPR de DNA polimerase em presença de Mn^{2+} revelaram a existência de 1 sítio de ligação forte ($K_d = 1 \mu M$); 4 sítios de ligação intermediária ($K_d = 29 \mu M$) e cerca de 20 sítios inibitórios, de ligação fraca ($K_d = 0,8 mM$) (SLATER et al., 1972). A atividade enzimática seria aumentada com Mn^{2+} ocupando o sítio de ligação forte, e inibida, por ocupação do sítio de ligação fraca; observou-se que desoxinucleotídeos, como TTP, interagem com Mn^{2+} nos sítios de ligação forte e intermediária (SLATER et al., 1972). Examinando com mais detalhes a estrutura e conformação do complexo ternário polimerase- Mn^{2+} -TTP, por RNM, SLOAN et al. (1975) 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, com relação à incorporação de desoxinucleotídeos não complementares ao produto formado (LOEB & KUNKEL, 1982). Utilizando-se poli (dA-dT) como matriz, em presença de Mg^{2+} , a frequência de erros, por incorporação de dGTP não complementar é de 1/10.000 para DNA polimerase α de placenta humana e 1/3.000 para transcriptase reversa de AMV (MILDEVAN & LOEB, 1979). Observou-se que a frequência de erros aumentava por substituição de Mg^{2+} por outros cátions bivalentes; para a transcriptase reversa e poli (dA-dT), 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+} (SIROVER & LOEB, 1977). Esta fidelidade de síntese de DNA dependente do cátion ativador pode estar relacionada com a ligação do metal aos sítios 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 DNA (SIROVER & LOEB, 1976). 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* (ORGEL & ORGEL, 1965) e *in vitro* (DUBE & LOEB, 1975), podendo também possuir propriedades carcinogênicas (STONER et al., 1976). Nas reações com homopolímeros sintéticos, como (Am)_n e (Cm)_n, o Mn^{2+} deve estar atuando mais provavelmente como um cátion ativador.

Inibidores

Estudos com inibidores de síntese de DNA tem várias aplicações. Pode servir, por exemplo, para diferenciar DNA polimerases: DNA polimerase α é sensível à ação de afidicolina; DNA polimerase β é resistente à N-etilmaleimida. A utilização de alguns inibidores permite esclarecer etapas da replicação. Em procariotos, a novobiocina inibe o sistema de síntese de DNA dependente de ATP; para *E. coli*, o alvo é a DNA girase, enzima que intervém nos mecanismos de super enrolamento negativo e de relaxamento do DNA (COZZARELLI,

1980).

0,5 mM de novobiocina inibe cerca de 50% as atividades de DNA polimerase α de *X. laevis* e de transcriptase reversa de AMV, utilizando-se DNA ativado como matriz (Fig.14). Nas mesmas condições DNA polimerases β e γ de células de camundongo são pouco afetadas (SARIH et al., 1983). Para matrizes sintéticas, nas reações catalisadas por transcriptase reversa, a inibição por novobiocina é mais acentuada com (rC)_n do que com (rA)_n (Tab.XIV e XV). Quando a transcriptase reversa é pré-incubada com novobiocina, observa-se uma diminuição na interação entre a enzima e o tRNA^{Trp}, por filtração em gel (Fig.15). A transcriptase reversa de AMV parece estar envolvida na seleção e no pareamento de bases do tRNA^{Trp} ao genoma viral (LITVAK & ARAYA, 1982).

Um aspecto interessante na utilização de novobiocina foi a diferenciação obtida na inibição de transcriptase reversa e DNA polimerase γ pois ambas as enzimas possuem alguns comportamentos comuns como, por exemplo, reconhecimento da matriz (rA)_n e inibição por brometo de etídeo.

Em células procarióticas novobiocina inibe a atividade de DNA girase, porém em células eucarióticas e virais o nível de ação ainda não está estabelecido. Uma pré-incubação de transcriptase reversa com novobiocina causa uma perda na habilidade da enzima formar um complexo estável com o tRNA^{Trp} iniciador. Uma importante diferença no mecanismo de ação de novobiocina em DNA polimerase α e transcriptase reversa é que no caso da polimerase celular a inibição é totalmente reversível enquanto que a inativação da polimerase viral não pode ser contornada por diluição da droga a uma concentração não inibidora (Fig.16). Para DNA polimerase α a inibição por novobiocina é do tipo não competitiva com relação a TTP e ao DNA sugerindo que a droga deve estar afetando um outro sítio diferente na enzima (SARIH et al., 1983).

Vários polinucleotídeos sintéticos tem sido utilizados como inibidores de reações catalisadas por DNA polimerases virais. TUOMINEN & KENNEY (1971), trabalhando com DNA polimerase de vírus de leucemia murina de Rauscher, e RNA viral, DNA ativado ou poli

(dA-dT) como matrizes, observaram a seguinte escala de inibição por polinucleotídeos;

$$(rU)_n > (rG)_n \gg (rA)_n > (rC)_n$$

Alguns polinucleotídeos 2'-substituídos como (dUfl)_n, (Am)_n, (Ce)_n foram também descritos como inibidores de DNA polimerases virais (ERICKSON & GROSCH, 1974; ARYA et al., 1974; MIKKE et al. 1976).

Diferentemente de (dCfl)_n, os polinucleotídeos (rC)_n e (Cm)_n não possuem efeitos inibitórios nas reações catalisadas por transcriptase reversa de AMV, utilizando-se matrizes sintéticas como (rA)_n ou (dA)_n, ou matrizes naturais como RNA 70 S de AMV ou DNA ativado (Fig.17 e Tab.X). Com relação às matrizes sintéticas a reação com (dA)_n é mais afetada (90% de inibição) que com (rA)_n (60% de inibição) utilizando-se (dCfl)_n como inibidor. É interessante notar que nas mesmas condições de ensaio não se observa inibição quando (dAfl)_n é usada como matriz. Assim como o cátion bivalente parece não interferir no padrão de inibição por (dCfl)_n, uma vez que o mesmo perfil mostrado acima é também obtido com Mn²⁺ (Tab.XI), a inibição parece independe da concentração de Mg²⁺ utilizada (Fig. 20).

Uma análise cinética mostra que (dCfl)_n é um inibidor não competitivo com relação à (rA)_n.(dT)₁₂, à (dA)_n.(dT)₁₂ e ao TTP na reação de transcriptase reversa, sendo a inibição mais acentuada quando (dA)_n é utilizada como matriz (Fig.18 e 19).

Um outro aspecto que pode ser destacado neste estudo de inibição por (dCfl)_n é que este composto não afeta a atividade de DNA polimerase α de *X. laevis*, quer utilizando (dA)_n ou DNA ativado como matriz. Já para DNA polimerase γ de células de camundongo, a inibição por (dCfl)_n é maior em presença de (rA)_n do que de (dA)_n e ocorrendo uma pequena inibição com (dAfl)_n (Tab.XII). Enquanto (dCfl)_n é um inibidor mais potente com (dA)_n para transcriptase reversa, a reação de DNA polimerase γ com (rA)_n é mais inibida. Neste contexto pode-se notar que (rA)_n.(dT)₁₂, a melhor matriz-iniciador para transcriptase reversa, é substituída com uma eficiência de

50% por $(dAfl)n.(dT)_{12}$, enquanto que no caso de DNA polimerase γ , $(dA)n.(dT)_{12}$, que é a melhor matriz (GOODMAN & SPIEGELMAN, 1971; ROBERT et al., 1972), é totalmente substituída pelo análogo 2'-fluorado (Tab.VII). As melhores matrizes para ambas as enzimas são menos afetadas por $(dCfl)n$ como inibidor.

ERICKSON & GROSCH (1974) observaram que $(dUfl)n$ era um inibidor não competitivo ou parcialmente não competitivo, enquanto $(rU)n$ era um inibidor competitivo nas reações catalisadas por transcriptase reversa de AMV com $(rC)n.(dG)_{12}$ como matriz-iniciador.

Os dados das Fig.17-19 e Tab.X sugerem que $(dCfl)n$ diminui a eficiência de polinucleotídeos dupla fitas como matrizes-iniciadores no sistema de transcriptase reversa de AMV. Como a inibição por $(dCfl)n$ é do tipo não competitiva (Fig.18) é possível que a ligação de $(dCfl)n$ a um outro sítio possa modificar as afinidades pelos sítios das matrizes-iniciadores (Fig.17 e 18) e de TTP (Fig. 19) sem interagir diretamente com os sítios dos substratos normais.

A inibição de transcriptase reversa de AMV por $(dCfl)n$, maior em presença de $(dA)n.(dT)_{12}$ e a não inibição da síntese de DNA dirigida por $(dAfl)n.(dT)_{12}$ está de acordo com a alta afinidade mostrada por 2'-fluoropolímeros por aquela enzima (ERICKSON & GROSCH 1974; ERICKSON, 1975, WARWICK-KOOCHAKI & BOBST, 1984).

Análogos de poli A com halogênio na posição 2 da base foram descritos como potentes inibidores competitivos ($K_i = 0,02 \mu g/ml$) com relação à matriz-iniciador nas reações catalisadas por transcriptase reversa de vírus de leucemia murina (FUKUI & DeCLERCQ, 1982).

A síntese de DNA catalisada por transcriptase reversa de AMV em presença de $(dAfl)n.(dT)_{12}$ como matriz-iniciador mostra-se também ser pouco afetada utilizando-se outros polinucleotídeos, $(rU)n$ e $(rI)n$, como inibidores (Tab.XIII). Assim, alguns análogos de polinucleotídeos inibem a síntese de DNA com $(rA)n.(dT)_{12}$ e $(dA)n.(dT)_{12}$ mas não com $(dAfl)n.(dT)_{12}$ como matrizes-iniciadores, sugerindo que fluor na posição 2' confere uma certa estabilidade ao polinucleotídeo que provavelmente está relacionado com a possibilidade de formar pontes de H, como observado para tRNA e polirribonucleo

tídeos (BOLTON & KEARNS, 1978).

Em geral, os inibidores de síntese de DNA são compostos que se ligam à enzima, ou à matriz, ou são análogos de substratos. A fim de caracterizar os derivados de poli A e poli C, com substituintes 2'-fluorados e 2'-O-metilados, como matrizes, foram testados alguns dos inibidores usuais na reação catalisada por transcriptase reversa de AMV. Comparando-se os efeitos de BE e seu derivado TMBE observa-se que o primeiro inibe a síntese de DNA, independentemente da matriz (rA)n, (Am)n e (dAfl)n e do cátion bivalente utilizados; já a inibição por TMBE é menor observando-se mesmo uma estabilidade em presença de (Am)n.(dT)₁₂/Mg²⁺ (Tab.XIV). ddTTP e berenil inibem preferencialmente a reação catalisada por transcriptase reversa em presença de (dAfl)n.(dT)₁₂, que em presença de (rA)n.(dT)₁₂ como matriz-iniciador. Neste aspecto existe uma diferença fundamental entre a ação destes inibidores e dos derivados de polinucleotídeos, uma vez que para estes últimos a estabilidade maior é verificada em presença de (dAfl)n como matriz.

Dados cinéticos mostram uma inibição similar por TMBE e o sistema (Am)n.(dT)₁₂/Mn²⁺, e por BE e o sistema (dAfl)n.(dT)₁₂/Mg²⁺, nas reações catalisadas por transcriptase reversa de AMV (Fig.21 e 22). Em ambos os casos a inibição é do tipo não competitiva com relação à TTP (K_i= 10 µM) não diferindo também do observado para (rA)n.(dT)₁₂/Mg²⁺ em presença de BE como inibidor (K_i = 5 µM) (resultado não apresentado).

A inibição por BE e TMBE para derivados de poli C como matrizes é bem menor quando comparada com a observada para derivados de poli A (Tab.XV). A síntese de DNA utilizando-se (Cm)n.(dG)₁₂ / Mg²⁺ é estável em presença de TMBE, como observado para (Am)n, sendo porém inibida por NEM. Se por um lado as reações catalisadas por transcriptase reversa em presença de derivados de poli C são mais estáveis à ação de BE e TMBE, o inverso é observado em relação à novobiocina.

Os diferentes comportamentos inibitórios de BE e TMBE podem ser explicados através de suas ações uma vez que BE é uma droga que se intercala na matriz, diferentemente de TMBE. FRIDLENDER &

WEISSBACH (1971) observaram que as enzimas de tumor de mamíferos eram mais sensíveis à inibição por BE do que as enzimas de tumor de aves e que a interação da droga com pares de bases A-T era mais forte que com pares de bases G-C. SARIH et al. (1980) forneceram algumas evidências mostrando que tanto BE quanto TMBE inibiam a atividade de transcriptase e a sua habilidade em desdobrar a alça aceptora do tRNA iniciador, mas a formação de um complexo estável entre a enzima e o tRNA iniciador era abolida somente pela droga intercalante.

Recentemente foram descritos alguns outros tipos de inibidores. Assim, por exemplo, um derivado dialdeído de ATP (SRIVASTAVA et al., 1983), rosa de Bengala (SRIVASTAVA & MODAK, 1983), 5-benzil 6-aminouracil (WRIGHT & BROWN, 1985) aparecem como inibidores de transcriptase reversa de AMV; e aciclovir trifosfato (FURMAN et al. 1984), como inibidor de DNA polimerase do vírus da herpes simples.

DNA polimerase A de germen de trigo

A DNA polimerase A de germen de trigo é uma enzima do tipo DNA polimerase γ animal. Entretanto, diferentemente desta última, e como a transcriptase reversa viral, a enzima de planta reconhece (rA)n melhor em presença de Mg^{2+} que de Mn^{2+} (Tab.XVI). O reconhecimento de (rC)n.(dG)₁₂ não ficou bem caracterizado, sendo que uma eficiência maior podia ser obtida para uma relação matriz:iniciador de 1:1 ao invés de 5:1 (resultado não apresentado; AOYAMA & LITVAK, 1985). MONDAL & HOFSCHEIDER (1983) demonstraram uma atividade de transcriptase reversa em núcleos de células normais, que reconhecia (rC)n.(dG)₁₂ melhor em presença de Mg^{2+} . Aqueles autores, entretanto, não ensaiaram (Cm)n como matriz, e a atividade com (rA)n não era comparável com a obtida com DNA ativado.

Além da atividade dependente de RNA, a DNA polimerase A de germen de trigo mostra também uma atividade endógena significativa na ausência da matriz (Tab.XVIII), cuja explicação não foi possível ser estabelecida até o momento. No entanto, uma copurificação de DNA polimerase com outra enzima poderia ser levado em consideração. Neste caso, a desoxinucleotidil terminal transferase, uma enzima que se comporta como DNA polimerase, mas não necessita de uma ma

triz e requer pelo menos um trinucleotídeo como iniciador (BOLLUM, 1978; KORNBERG, 1980), seria uma possibilidade. Vários autores observaram atividades de uma outra enzima, DNA primase, em preparações de DNA polimerase. SINGH & DUMAS (1984) descreveram uma copurificação de DNA primase com a DNA polimerase de levedura e sugeriram esta associação na síntese de fragmentos de Okazaki nas forquilha de replicação. Outros sistemas enzimáticos, como as aminoacil-tRNA sintetases, tendem a copurificar nas etapas iniciais da purificação e não podem ser completamente resolvidas nas etapas finais; é o caso, por exemplo, de treonil-tRNA sintetase purificada de fígado de rato até quase a homogeneidade (DIGNAM et al., 1980).

As reações dependentes de RNA catalisadas por DNA polimerase A e transcriptase reversa são inibidas em presença de glicerol 20% e actinomicina D 10 µg/ml (Tab. XVIII e Fig.24). As DNA polimerases B e C de germen de trigo, ao contrário, são estimuladas por glicerol (resultado não apresentado). Actinomicina D inibe a atividade de RNA polimerase dependente de DNA por ligação ao DNA dupla fita; em concentrações mais elevadas este antibiótico inibe também a atividade de DNA polimerase dependente de DNA. GURGO et al.(1971) observaram uma inibição parcial de DNA polimerases dependentes de RNA por actinomicina D que se ligava fracamente a híbridos DNA-RNA e a RNA fita simples.

As reações catalisadas por DNA polimerases dependentes de RNA são inibidas na presença de RNases. As RNases A (específica para oligonucleotídeos pirimidínicos) e T₂ (não específica) são ambas inibidoras de DNA polimerase A e transcriptase reversa com RNA como matriz (Tab.XIX). Uma inibição mais completa por RNase foi descrita por SARNGADHARAN et al. (1972) com DNA polimerase de células leucêmicas, por pré-tratamento de RNA 70 S com RNase. KOTLER et al.(1984) descreveram uma DNA polimerase dependente de DNA, sensível à RNase, purificada de células de rato transformadas por vírus de sarcoma aviário.

A síntese de DNA em vírus do mosaico da couve-flor pode ser parcialmente inibida por RNase, actinomicina D e glicerol, e estimulada por ions K⁺ (PFEIFFER & HOHN, 1983). Por similaridade de

propriedades aqueles autores sugeriram que uma enzima do tipo DNA polimerase A celular poderia estar envolvida na replicação de CaMV que ocorre por reverso da transcrição. Os resultados apresentados nesta tese estão de acordo com tais observações e mostram a DNA polimerase A de germen de trigo com características de uma DNA polimerase dependente de RNA, possuindo inclusive algumas propriedades similares as de transcriptase reversa de AMV.

A função da DNA polimerase A de plantas ainda não está bem caracterizada. Esta enzima pode estar envolvida na iniciação da síntese de DNA em germen de trigo, reconhecendo RNAs iniciadores sintetizados por DNA primase (LITVAK et al., 1984).

DNA polimerases de folhas infectadas por CaMV

Seguindo-se o mesmo procedimento de purificação de DNA polimerase A, duas atividades DNA polimerásicas foram eluídas por cromatografia em DNA-celulose, a partir de folhas de nabo infectadas por CaMV. Como a DNA polimerase γ animal, as polimerases descritas reconhecem (rA)n.(dT)₁₂ melhor em presença de Mn^{2+} que de Mg^{2+} ; são mais eficientes que a DNA polimerase A de trigo no reconhecimento de (rC)n.(dG)₁₂, e como a transcriptase reversa de AMV é capaz de utilizar (Cm)n.(dG)₁₂ como matriz-iniciador com uma eficiência maior em presença de Mn^{2+} (Tab.XX).

Ambas as frações de DNA polimerases de folhas infectadas por CaMV são resistentes à ação de afidicolina e são inibidas por brometo de etídeo (Fig.25) sendo a inibição maior para a fração mais ativa (Tab.XX). Estas propriedades são características de DNA polimerase γ animal e de transcriptase reversa viral.

Paralelamente ao desenvolvimento deste trabalho, VOLOVITCH et al.(1984) descreveram a caracterização de uma DNA polimerase dependente de RNA em células infectadas por CaMV. Aquelos autores observaram que diferentemente do material não infectado, na purificação de DNA polimerase das folhas infectadas por CaMV eram eluídos de fosfocelulose dois picos que reconheciam (rA)n, sendo que apenas um deles era capaz de reconhecer (rC)n e regiões heteropoliméricas de mRNAs naturais. Independentemente, MENISSIER et al. (1984)

descreveram também uma atividade de DNA polimerase associada ao vírus do mosaico da couve-flor, e obtiveram um peso molecular para a enzima de 76.000 D.

Um grande problema com que se defronta é saber se a DNA polimerase representa uma DNA polimerase celular ou viral. Talvez o mais seguro seja concluir que existem DNA polimerases de vírus de tumor de RNA que são biologicamente eficientes na síntese de DNA dirigida por RNA e que existem algumas DNA polimerases que podem estar envolvidas na síntese de DNA dirigida por RNA.

Foram descritas recentemente algumas características adicionais sobre a analogia do complexo de replicação de CaMV e do vírus da hepatite B (MARSH et al., 1985), e da implicação deste último na transcrição reversa (BUSCHER et al., 1985).

Este trabalho procurou contribuir com características físico-químicas de transcriptase reversa de AMV, principalmente no que se refere aos derivados de polinucleotídeos sintéticos como matrizes e inibidores na reação de síntese de DNA. Um outro aspecto focalizado foi a proposição de uma atividade dependente de RNA para a DNA polimerase A de germen de trigo. Finalmente mostrou-se que DNA polimerases purificadas de folhas infectadas por CaMV eram capazes de reconhecer matrizes sintéticas do tipo RNA, como (rA)_n, (rC)_n e mesmo (Cm)_n, esta última descrita como uma sonda específica para DNA polimerases dependentes de RNA.

Do trabalho apresentado, vários aspectos são sugeridos como perspectivas futuras:

- Qual o tipo de ligação entre novobiocina e transcriptase reversa?

- Teste com diferentes análogos de novobiocina na procura de um inativador de transcriptase reversa sem afetar as outras enzimas envolvidas na síntese de DNA de eucariotos.

- Procura de inibidores específicos de transcriptase reversa viral, por exemplo, entre os alcalóides.

- procura de atividade de transcriptase reversa em outros vírus de DNA.

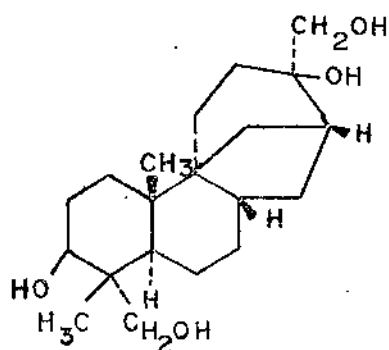
- 2',5'-adenosina oligonucleotídeo sintetase, uma enzima induzida por interferon, é capaz de introduzir um dinucleotídeo de adenosina no terminal CCA de tRNA. O estudo deste efeito na transcriptase reversa pode dar informações valiosas no efeito antiviral do interferon.

- Caracterização do cDNA produzido na reação de DNA polimerase A de germen de trigo, utilizando-se RNA como matriz.

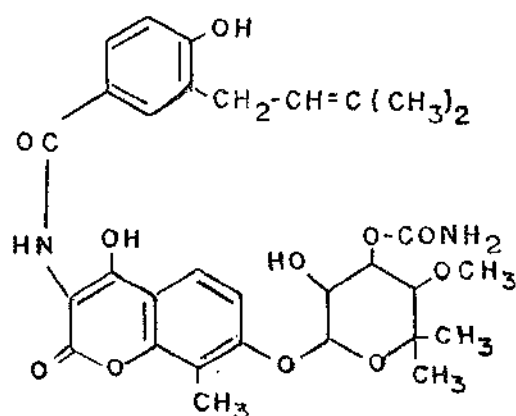
- Diadenosina tetrafosfato (Ap_4A) é produzido nas reações catalisadas por aminoacil-tRNA sintetases (RAPAPORT & ZAMECNIK, 1976) e induz a replicação de DNA (GRUMMT, 1983). Existe alguma relação envolvendo aminoacil-tRNA sintetases, tRNA e DNA polimerases?

APÊNDICE

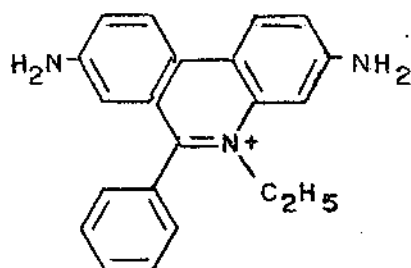
1. Estruturas de alguns inibidores de síntese de DNA



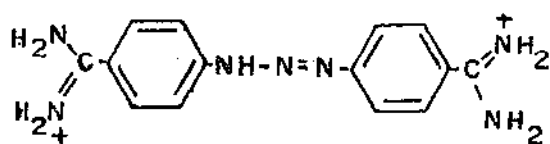
AFIDICOLINA



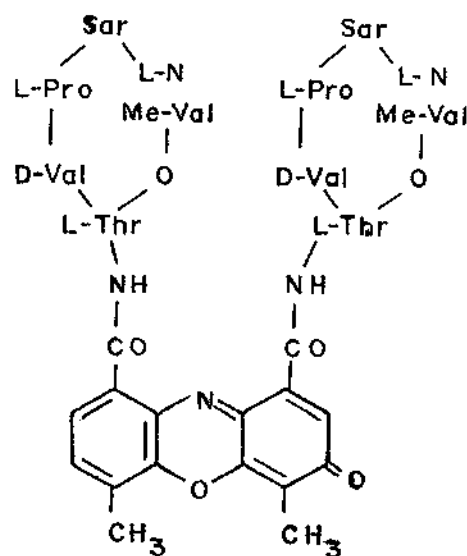
NOVOBIOCINA



BROMETO DE ETIDEO



BERENIL



ACTINOMICINA D

2. Nomes originais (em inglês) de virus utilizados na tese:

Virus de mieloblastose de aves (Avian myeloblastosis virus)
Virus do mosaico amarelo do nabo (Turnip yellow mosaic virus)
Virus do sarcoma de Rous (Rous sarcoma virus)
Virus de leucemia murina de Rauscher (Rauscher murine leukemia virus)
Virus de sarcoma de aves (Avian sarcoma virus)
Virus de leucose de aves (Avian leucosis virus)
Virus do macaco Mason-Pfizer (Mason-Pfizer monkey virus)
Virus do tumor mamário de camundongo (mouse mammary tumor virus)
Virus da hepatite B (Hepatitis B virus)
Virus do mosaico da couve-flor (Cauliflower mosaic virus)
Virus de herpes simples (Herpes simplex virus)
Virus da leucemia T humana (Human T leukemia virus)
Virus associado a linfadenopatia (Lymphadenopathy-associated virus)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.J. & KALF, G.F. (1980). DNA polymerase isolated from the mitochondrial chromosome appears to be identical to DNA polymerase γ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1875-1884
- ALLAUDEEN, H.S., DESCAMPS, J., SEHGAL, R.K. & FOX, J.J. (1982). Selective inhibition of DNA replication in herpes simplex virus infected by 1-(2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-iodocytosine. *J. Biol. Chem.* 257, 11879-11882.
- AOYAMA, H. (1985 a). Template requirements for AMV reverse transcriptase. *Arq. Biol. Tecnol.* 28, 413-420
- AOYAMA, H. (1985 b). Análogo 2'-fluorado de ácido poliadenílico como matriz de DNA polimerase γ . *Arq. Biol. Tecnol.* Aceito para publicação
- AOYAMA, H. (1985 c). Efeito de Mn^{2+} nas atividades de transcriptase reversa com derivados de ácido poliadenílico como matrizes. *Química Nova*. Aceito para publicação.
- AOYAMA, H. & LITVAK, S. (1985). RNA-dependent activity for wheat germ DNA polymerase A. *Arq. Biol. Tecnol.* Submetido à publicação
- AOYAMA, H., SARIH-COTTIN, L., TARRAGO-LITVAK, L., LITVAK, S. & GUSCHLBAUER, W. (1985 a). 2'-fluoro-2'-deoxycytidine triphosphate as a substrate for RNA- and DNA-dependent DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta* 824, 218-224
- AOYAMA, H., SARIH-COTTIN, L., TARRAGO-LITVAK, L., KAKIUCHI, N., LITVAK, S. & GUSCHLBAUER, W. (1985 b). 2'-fluoro-2'-deoxy-polynucleotides as templates and inhibitors for RNA- and DNA-dependent DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta* 824, 225-232
- APOSHIAN, H.V. & KORNBERG, A. (1962). Enzymatic synthesis of DNA. IX. The polymerase formed after T_2 bacteriophage infection of *E. coli*: a new enzyme. *J. Biol. Chem.* 237, 519-524
- ARAYA, A., SARIH, L. & LITVAK, S. (1979). Reverse transcriptase mediated binding of primer tRNA to the viral genome. *Nucleic Acids Res.* 6, 3831-3843

- ARYA, S.K., CARTER, W.A., ALDERFER, J.L. & TS'IO, P.O.P. (1974). Inhibition of RNA directed DNA polymerase of murine leukemia virus by 2'-O-alkylated polyadenylic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 608-615
- BALTIMORE, D. (1970). Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature* 226, 1209-1211
- BALTIMORE, D. (1985). Retrovirus and retrotransposons: the role of reverse transcriptase in shaping the eukaryotic genome. *Cell* 40, 481-482
- BALTIMORE, D. & SMOLER, D. (1971). Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1507-1511
- BAUER, G. & HOFSCHNEIDER, P.H. (1976). An RNA-dependent DNA polymerase different from the known viral reverse transcriptases, in the chicken system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 3025-3029
- BAUER, G., FRIIS, R.R., JILEK, G. & HOFSCHNEIDER, P.H. (1978). Purification and characterization of particles containing RNA-dependent DNA polymerase, in the allantoic fluid of uninfected leukosis virus-free chicken eggs. *Biochim. Biophys. Acta* 518, 125-137
- BAXT, W., HEHLMAN, R. & SPIEGELMAN, S. (1972). Human leukaemic cells contain reverse transcriptase associated with a high molecular weight virus-related RNA. *Nature* 240, 72-75
- BERNSTEIN, L.B., MOUNT, S.M. & WEINER, A.M. (1983). Pseudogenes for human small nuclear RNA U3 appear to arise by integration of self primed reverse transcripts of the RNA into new chromosomal sites. *Cell* 32, 461-472
- BISHOP, J.M. (1983). Cellular oncogenes and retrovirus. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 301-354
- BJURSELL, G. (1978). Effects of 2'-deoxy-2'-azidocytidine on polyoma virus DNA replication: evidence for rolling circle-type mechanism. *J. Virol.* 26, 136-142
- BLANDIN, M., TRAN-DINH, S., CATLIN, J.C. & GUSCHLBAUER, W. (1974). Nucleoside conformations. NMR and circular dichroism studies on pyrimidine-2'-fluoro-2'-deoxyribonucleosides. *Biochim. Biophys. Acta* 361, 249-256

- BOLLUM,F.J. (1974). Mammalian DNA polymerases. Progr.Nucleic Acid Res.Mol.Biol. 15, 109-144
- BOLLUM,F.J. (1978). Terminal deoxynucleotidyl transferase: biological studies. In Advances in Enzymology (Meister,A.,ed.) vol. 47.John Wiley & Sons, New York, 347-374
- BOLTON,P.H. & KEARNS,D.R. (1978). Hydrogen bonding of the 2' OH in RNA. Biochim.Biophys.Acta 517, 329-337
- BROWN,R.D. & TOCCHINI-VALENTINI,G.P. (1974). The preparation of RNA-directed DNA polymerase from ovaries of *Xenopus laevis*. Methods Enzymol. XXIX E, 173-177
- BROX,L.W., LePAGE,G.A., HENDLER,S.S. & SHANNAHOFF,D.H. (1974).Studies on the growth inhibition and metabolism of 2'-deoxy-2'-fluorocytidine in cultured human lymphoblasts. Cancer Res.34, 1838-1842
- BUSCHER,M., REISER,W., WILL,H. & SCHALLER,H. (1985). Transcripts and the putative RNA pregenome of duck hepatitis B virus: implications for reverse transcription. Cell 40, 717-724
- CASTROVIEJO,M. (1979). Synthèse du DNA dans les embryons de blé. Thèse Docteur D'état. Université de Bordeaux II, France.
- CASTROVIEJO,M., THARAUD,D., TARRAGO-LITVAK,L. & LITVAK,S. (1979). Multiple DNA polymerases from quiescent wheat embryos.Purification and characterization of three enzymes from the soluble cytoplasm and one from purified mitochondria. Biochem.J. 181, 183-191
- CHAIRES,J.B., DATTAGUPTA,N. & CROTHERS,D.M. (1985). Kinetics of daunomycin-DNA interaction. Biochemistry 24, 260-267
- CHANDRA,P., DEMIRHAM,I. & DeCLERCQ,E. (1981). A study of antitemplate inhibition of mammalian, bacterial and viral DNA polymerases by 2- and 2'-substituted derivatives of polyadenylic acid. Cancer Lett. 12, 181-193
- CHANDRA,P., EBENER,U. & GOTZ,A. (1975). Inhibition of oncornaviral DNA polymerases by 5-mercapto polycytidylic acid: mode of action. FEBS Lett. 53, 10-14
- CHANDRA,P., EBENER,U., STEEL,L.K., LAUBE,H., GERICKE,D., MILDNER,B., BARDOS,T.J., HO, Y.K. & GOTZ,A. (1977). Molecular approaches to inhibit oncogenesis by RNA tumor viruses. Ann.N.Y.Acad.Sci. 284, 444-462

- CHANDRA,P. & STELL,L.K. (1977). Purification, biochemical characterization and serological analysis of cellular DNA polymerases and a reverse transcriptase from spleen of a patient with myelo - fibrotic syndrome. *Biochem. J.* 167, 513-524
- CHANDRA,P., ZUNINO,F., GOTZ,A., GERICKE,D., THORNBECK,R. & DiMARCO, A. (1972). Specific inhibition of DNA polymerases from RNA tumor viruses by some new daunomycin derivatives. *FEBS Lett.* 21, 264-268
- CLEMENS,M. (1985). Interferons and oncogens. *Nature* 313, 531-532
- COFFIN,J.M. & BILLETIER,M.A. (1976). A physical map of the Rous sarcoma virus genome. *J.Mol.Biol.* 100, 293-318
- COHEN,S.S. (1971). Introduction to the polyamines. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- COZZARELLI,N.R. (1977). The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 641-668
- COZZARELLI,N.R. (1980). DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207, 953-960
- DeCLERCQ,E. (1981). Nucleoside analogues as antiviral agents. *Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung.* 28, 289-306
- DeCLERCQ,E. (1982). Specific targets for antiviral drugs. *Biochem. J.* 205, 1-13
- DeCLERCQ,E., BILLIAU,A., HOBBS,J., TORRENCE,P.F. & WITTKOP,B.(1975). Inhibition of oncornavirus functions by 2'-azido-polynucleotides. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 72, 284-288
- DeCLERCQ,E., FUKUI,T., KAKIUCHI,N. & IKEHARA,M. (1979). Influence of various 2- and 2'-substituted polyadenylic acids on murine leukemia virus reverse transcriptase. *Cancer Lett.* 7, 23-37
- DIGNAM,J.D., RHODES,D.G. & DEUTSCHER,M.P. (1980). Purification and structural characterization of rat liver threonyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 19, 4978-4984
- DORMONT,D., SPIRE,B., BARRÉ-SINOUSSE,F., MONTAGNIER,L. & CHERMANN, J.C. (1985). Inhibition of RNA-dependent DNA polymerases of AIDS and SAIDS retroviruses by HPA-23 (ammonium-21-tungsto-9-antimoniate). *Ann.Inst.Pasteur/virol.* 136 E, 75-83

- DUBE, D.K. & LOEB, L.A. (1975). Manganese as a mutagenic agent during *in vitro* DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1041-1046
- DUESBERG, P., HELM, K.V.D. & CANAANI, E. (1971). Comparative properties of RNA and DNA templates for the DNA polymerase of Rous sarcoma virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2505-2509
- DULBECCO, R. (1982). La nature du cancer. *La Recherche* 13, 1426-1436
- EICHHORN, G.L. & SHIN, Y.A. (1968). Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 7323-7328
- ELIASSON, R., PONTIS, E., REICHARD, P. & ECKSTEIN, F. (1981). Replication of polyoma DNA in nuclei isolated from azidocytidine-inhibited fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 256, 9044-9050
- ERICKSON, R.J. (1975). The binding of polynucleotides to the DNA polymerase of AMV. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 238-246
- ERICKSON, R.J. & GROSCH, J.C. (1974). The inhibition of AMV DNA polymerase by synthetic polynucleotides. *Biochemistry* 13, 1987-1993
- FARAS, A.J., DAHLBERG, J.E., SAWYER, R.C., HARADA, F., TAYLOR, J.M., LEVISON, W.E., BISHOP, J.M. & GOODMAN, H.M. (1974). Transcription of DNA from 70 S RNA of Rous sarcoma virus. II. Structure of a 4 S RNA primer. *J. Virol.* 13, 1134-1142
- FARAS, A.J., TAYLOR, J.M., McDONNELL, J., LEVINSON, W.E. & BISHOP, J.M. (1972). Purification and characterization of the DNA polymerase associated with Rous sarcoma virus. *Biochemistry* 11, 2334-2342
- FINNEGAN, D.J. (1983). Retroviruses and transposable elements -which came first? *Nature* 302, 105-106
- FLUGEL, R.M., LARSON, J.E., SCHENDEL, P.F., SWEET, R.W., TAMBLYN, T.R. & WELLS, R.D. (1973). DNA synthesis in Vitro. (Inman, R. and Wells, R.D., eds.). p.309-329. Second Annual Steenbock Symposium. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
- FOURNIER, M., DORIZZI, M., SARGER, C. & LABOUESSE, J. (1976). Purification of tRNA^{Trp}, tRNA^{Val}, and partial purification of tRNA^{Ile} and tRNA^{Met}_f from beef liver. *Biochimie* 58, 1159-1165

- FRIDLENDER, B., FRY, M., BOLDEN, A. & WEISSBACH, A. (1972). A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 452-455
- FRIDLENDER, B. & WEISSBACH, A. (1971). DNA polymerases of tumor virus: specific effect of ethidium bromide on the use of different synthetic templates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 68, 3116-3119
- FRY, M. (1983). Eukaryotic DNA polymerases. In *Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification*. (Jacob, S.T., ed.), vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 39-92
- FUKUI, T. & DECLERCQ, E. (1982). Inhibition of murine leukaemia virus reverse transcriptase by 2-halogenated polyadenylic acids. *Biochem. J.* 203, 755-760
- FURMAN, P.A., ST. CLAIR, M.A. & SPECTOR, T. (1984). Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 259, 9575-9579
- GALLO, R.C., SALAHUDDIN, S., POPOVIC, M., SHEARER, G.M., KAPLAN, M., HAYNES, B.F., PALKER, T.J., REDFIELD, R., OLESKE, J., SAFAI, B., WHITE, G., FOSTER, P. & MARKHAM, P.D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-503
- GEFTER, M.L. (1975). DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 45-78
- GERARD, G.F. (1975). Poly (2'-O-methylcytidylate).oligodeoxyguanylate, a template-primer specific for reverse transcriptase, is not utilized by HeLa cell DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 706-711
- GERARD, G.F., ROTTMAN, F. & GREEN, M. (1974). Poly (2'-O-methyl-cytidylate).oligo deoxyguanylate as a template for the RNA-directed DNA polymerase in RNA tumor virus particles and a specific probe for the RNA-directed enzyme in transformed murine cells. *Biochemistry* 13, 1632-1641
- GOODMAN, N.C. & SPIEGELMAN, S. (1971). Distinguishing reverse transcriptase of an RNA tumor virus from other known DNA polymerases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2203-2206
- GRESSER, I. & TOVEY, M.G. (1978). Antitumor effects of interferon. *Biochim. Biophys. Acta* 516, 231-247

- GRONER, B. & HYNES, N.E. (1982). Long terminal repeats provide regulatory signals at the ends of retroviral genes. *Trends Biochem.Sci.* 7, 400-403
- GROSCH, J.C. & ERICKSON, R.J. (1975). Inhibition of vesicular stomatitis virus replication by poly(2'-fluoro-2'-deoxyuridylic acid). *Antimicrob.Agents Chemother.* 8, 544-550
- GROSSE, F. & KRAUSS, G. (1985). The primase activity of DNA polymerase α from calf thymus. *J.Biol.Chem.* 260, 1881-1888
- GRUMMT, F. (1983). Diadenosine tetraphosphate (Ap_4A): a putative chemical messenger of cell proliferation. Control and inducer of DNA replication. *Plant Mol. Biol.* 2, 41-44
- GUILLEY, H., DUDLEY, R.K., JONARD, G., BALÁZS, E. & RICHARDS, K.E. (1982). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell* 30, 763-773
- GURGO, C., RAY, R.K., THIRY, L. & GREEN, M. (1971). Inhibitors of the RNA and DNA-dependent polymerase activities of RNA tumor viruses. *Nature* 229, 111-114
- GUSCHLBAUER, W. & JANKOWSKI, K. (1980). Nucleoside conformations is determined by the electronegativity of the sugar substituent. *Nucleic Acids Res.* 8, 1421-1433
- HAKOSHIMA, T., OMORI, H., TOMITA, K., MIKI, H. & IKEHARA, M. (1981). The crystal and molecular structure of 2'-deoxy-2'-fluoroinosine monohydrate. *Nucleic Acids Res.* 9, 711-729
- HARADA, F., SAWYER, R.C. & DAHLBERG, J.E. (1975). A primer RNA for initiation of *in vitro* Rous sarcoma virus DNA synthesis. Nucleotide sequence and amino acid acceptor activity. *J.Biol.Chem.* 250, 3487-3497
- HASELTINE, W.A., MAXAM, A.M. & GILBERT, W. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 74, 989-993
- HELFMAN, W.B., HENDLER, S.S., SHANNAHOFF, D.H. & SMITH, D.W. (1978). *Escherichia coli* DNA polymerases II and III: substrate specificity. *Biochemistry* 17, 1607-1611

- HILLEBRAND, G.G. & BEATTIE, K.L. (1985). Influence of template primary and secondary structure on the rate and fidelity of DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 260, 3116-3125
- HOUTS, G.E., MIYAGI, M., ELLIS, C., BEARD, D. & BEARD, J.W. (1979). Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J. Virol.* 29, 517-522
- HSU, T.W. & TAYLOR, J.M. (1982). Effect of aphidicolin on avian sarcoma virus replication. *J. Virol.* 44, 493-498
- HUBERMAN, J.A. (1981). New views of the biochemistry of eukaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase α . *Cell* 23, 647-648
- HULL, R. & COVEY, S.N. (1983). Does cauliflower mosaic virus replicate by reverse transcription? *Trends Biochem. Sci.* 8, 119-121
- HURWITZ, J. & LEIS, J.P. (1972). RNA-dependent DNA polymerase activity of RNA tumor viruses. I. Directing influence of DNA in the reaction. *J. Virol.* 9, 116-129
- IKEGAMI, S., TAGUCHI, T., OHASHI, M., OGURO, M., NAGANO, H. & MANO, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . *Nature* 275, 458-460
- JOKLIK, W.K. (1980). The molecular basis of the antiviral activity of interferons. Introductory remarks. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 350, 432-440
- JUSTESEN, J., FERBUS, D. & THANG, M.N. (1980). 2',5'-oligoadenylate synthetase, an interferon induced enzyme: direct assay method for the products, 2',5'-oligoadenylates and 2',5' co-oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 8, 3073-3085
- KACIAN, D.L., WATSON, K.F., BURNY, A. & SPIEGELMAN, S. (1971). Purification of the DNA polymerase of AMV. *Biochim. Biophys. Acta* 246, 365-383
- KAGUNI, J.M. & KORNBERG, A. (1984). Topoisomerase I confers specificity in enzymatic replication of the *Escherichia coli* chromosomal origin. *J. Biol. Chem.* 259, 8578-8583
- KNOPE, K.W., YAMADA, M. & WEISSBACH, A. (1976). HeLa cell DNA polymerase γ : purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* 15, 4540-4548

- KORNBERG,A. (1980). DNA Replication. Freeman Co., San Francisco, California
- KORNBERG,A. (1983). Mechanism of replication of the *Escherichia coli* chromosome. Eur.J.Biochem. 137, 377-382
- KOTEWICZ,M.L., D'ALESSIO,J.M., DRIFTMIER,K.M., BLODGETT,K.P. & GERARD,G.F. (1985). Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. Gene 35, 249-258
- KOTLER,M., ROSENBERG,J. & FRIDLENDER,B. (1984). RNase-sensitive DNA dependent DNA polymerase from rat cells transformed by avian sarcoma virus. Biochim.Biophys.Acta 781, 92-99
- KRAKOWER,J.M., BARBACID,M. & AARONSON,S.A. (1977). Radioimmunoassay for mammalian type C viral reverse transcriptase. J.Virol. 22, 331-339
- LEE,M.Y.W.T., TAN,C.K. & DOWNEY,K.M. (1980). Purification of DNA polymerase δ from calf thymus: partial characterization of physical properties. Biochemistry 19, 2096-2101
- LEIS,J.P. & HURWITZ,J. (1972). RNA-dependent DNA polymerase activity of RNA tumor viruses. II. Directing influence of RNA in the reaction. J.Virol. 9, 130-142
- LENGYEL,P. (1982). Biochemistry of interferon and their actions. Ann.Rev.Biochem. 51, 251-282
- LITVAK,S. & ARAYA,A. (1982). Primer tRNA in retrovirus. Trends Biochem.Sci. 7, 361-364
- LITVAK,S., GRAVELINE,J., ZOURGUI,L., CARVALLO,P., SOLARI,A.,AOYAMA,H., CASTROVIEJO,M. & TARRAGO-LITVAK,L. (1984). Studies on the initiation of DNA synthesis in plant and animal cells. In Proteins involved in DNA replication. (Hubscher,U. and Spadari,S. eds). vol 179, Plenum Press, New York, p. 249-262
- LOEB,L.A. (1974). Eukaryotic DNA polymerase. In The Enzymes,(Boyer, P.D.,ed) vol 10, Academic Press, New York, p. 174-209
- LOEB,L.A. & KUNKEL,T.A. (1982). Fidelity of DNA synthesis. Ann.Rev. Biochem. 52, 429-457

- MAHESHWARI,R.K., SREEVALSAN,T., SILVERMAN,R.H., HAY,J. & FRIEDMAN, R.M. (1983). Tunicamycin enhances the antiviral and anticellular activity of interferon. *Science* 219, 1339-1341
- MARSH,L., KUZJ,A. & GUILFOYLE,T. (1985). Identification and characterization of cauliflower mosaic virus replication complex-analogy to hepatitis B virus. *Virology* 143, 212-223
- MAYER,R.J., SMITH,R.G. & GALLO,R.C. (1974). Reverse transcriptase in normal Rhesus monkey placenta. *Science* 185, 864-867
- McKOWN,R.L. & TEWARI,K.K. (1984). Purification and properties of a pea chloroplast DNA polymerase. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 81, 2354-2358
- MENISSIER,J., LAQUEL,P., LEBEUSIER,G. & HIRTH,L. (1984). A DNA polymerase activity is associated with cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 12, 8769-8778
- MIKKE,R., KIELANOWSKA,M., SHUGAR,D. & ZMUDZKA,B. (1976). Poly 2'-O-ethylcytidylate, an inhibitor and poor template for AMV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 3, 1603-1611
- MILDVAN,A.S. & LOEB,L.A. (1979). The role of metal ions in the mechanism of DNA and RNA polymerases. *Crit.Rev.Biochem.* 6, 219-244
- MITRA,S.W., CHOW,M., CHAMPOUX,J. & BALTIMORE,D. (1982). Synthesis of murine leukemia virus plus strong stop DNA initiates at a unique site. *J. Biol.Chem.* 257, 5983-5986
- MIZUUCHI,K., MIZUUKI,M., O'DEA,M.H. & GELLERT,M. (1984). Cloning and simplified purification of *Escherichia coli* DNA gyrase A and B proteins. *J.Biol.Chem.* 259, 9199-9201
- MOELLING,K., SYKORA,K.W., DITTMAR,K.E.J., SCOTT,A. & WATSON,K.F. (1979). The isolation of avian viral RNA and polypeptides. *J.Biol.Chem.* 254, 3738-3742
- MONDAL,H. (1977). Occurence of particle-bound reverse transcriptase in human amniotic fluid. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 79, 67-75
- MONDAL,H. & HOFSCHNEIDER,P.H. (1983). Demonstration of free reverse transcriptase in the nuclei of embryonic tissues of the japanese quail. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 116, 303-311

- MONTAGNIER, L., BRUNET, J.B. & KLATZMANN, D. (1985). Le SIDA et son virus. *La Recherche* 167, 750-760
- MORY, Y.Y., CHEN, D. & SARID, S. (1974). DNA polymerase from wheat embryos. *Plant Physiol.* 53, 377-381
- NELSON, J.A., LEVY, J.A. & LEONG, J.C. (1981). Human placentas contain a specific inhibitor of RNA-directed DNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78, 1670-1674
- NOSSAL, N.G. (1983). Prokaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 581-615
- OLSEN, J.C. & WATSON, K.F. (1985). RNase H mediated release of the retrovirus RNA polyadenylate tail during reverse transcription. *J. Virol.* 13, 324-329
- OMER, C.A. & FARAS, A.J. (1982). Mechanism of release of the avian retrovirus tRNA^{Trp} primer molecule from viral DNA by ribonuclease H during reverse transcription. *Cell* 30, 797-805
- ORGEL, A. & ORGEL, L.A. (1965). Induction of mutations in bacteriophage T₄ with divalent manganese. *J. Mol. Biol.* 14, 453-457
- PANET, A., HASELTINE, W.A., BALTIMORE, D., PETERS, G., HARADA, F. & DAHLBERG, J.E. (1975). Specific binding of tryptophan tRNA to AMV RNA dependent DNA polymerase (reverse transcriptase). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 2535-2539
- PARKS, W.P., SCOLNICK, E.M., ROSS, J., TODARO, G.J. & AARONSON, S.A. (1972). Immunological relationships of reverse transcriptase from RNA tumor viruses. *J. Virol.* 9, 110-115
- PARNAIK, V.K. & DAS, M.R. (1983). A higher affinity of AMV reverse transcriptase for template-primers correlates with a lower rate of DNA synthesis. *FEBS Lett.* 161, 145-148
- PEDRALI-NOY, G. & SPADARI, S. (1979). Effect of aphidicolin on human and viral DNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 1194-1202
- PETSKA, S. & BARON, S. (1981). Definition and classification of the interferons. *Methods Enzymol.* 78, 3-14
- PFEIFFER, P. & HOHN, T. (1983). Involvement of reverse transcription of CaMV: a detailed model and test of some aspects. *Cell* 33, 781-789

- POIESZ, B.J., BATTULA, N. & LOEB, L.A. (1974). Zinc in reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 959-964
- POPOVIC, M., SARNGADHARAN, M.G., READ, E. & GALLO, R.C. (1984). Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224, 497-500
- RAPAPORT, E. & ZAMECNIK, P.C. (1976). Presence of Ap₄A in mammalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible positive "pleiotypic activator". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 3984-3988
- REICHARD, P., ROWEN, L., ELIASSON, R., HOBBS, J. & ECKSTEIN, F. (1978). Inhibition of primase, the dnaG protein of *Escherichia coli* by 2'-deoxy-2'-azidocytidine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 253, 7011-7016
- ROBERT, M.S., SMITH, R.G., GALLO, R.C., SARIN, P.S. & ABRELL, J.W. (1972). Viral and cellular DNA polymerase: comparison of activities with synthetic and natural RNA templates. *Science* 176, 798-800
- ROBERT-GUROFF, M., BROWN, M. & GALLO, R.C. (1985). HTLV-III neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Nature* 316, 72-74
- ROKUTANDA, M., MAEDA, Y.Y. & WATANABE, S.T. (1982). An inhibitor of reverse transcriptase in the cytoplasm of the cultured cells and the spleen of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 510-516
- ROKUTANDA, M., WATANABE, S.T. & MAEDA, Y.Y. (1984). Mechanism of the action of the inhibitor of reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 299-305
- ROTH, M.J., TANESE, N. & GOFF, S.P. (1985). Purification and characterization of murine reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260, 9326-9335
- ROZENBAUM, W., DORMONT, D., SPIRE, B., VILMER, E., GENTILINI, M., GRISCELLI, C., MONTAGNIER, L., BARRÉ-SINOUSSE, F. & CHERMANN, J.C. (1985). Antimonio tungstate (HPA-23) treatment of three patients with AIDS and one with prodrome. *Lancet* I, 450-451

- SAMUEL.C.E. & KNUTSON,G.S. (1982). Mechanism of interferon action. Kinetics of induction of the antiviral state and protein phosphorylation in mouse fibroblasts treated with natural and cloned interferons. J.Biol.Chem. 257, 11791-11795
- SARIH,L., GARRET,M., AOYAMA,H., GRAVES,P.V., TARRAGO-LITVAK,L. & LITVAK,S. (1983). The *in vitro* inhibition of DNA polymerase α and avian reverse transcriptase by novobiocin. Biochemistry Internat. 7 79-88
- SARIH.L., HEVIA-CAMPOS,E., THARAUD,D. & LITVAK,S. (1980). Inhibition of AMV reverse transcriptase by ethidium bromide. Effect on enzyme activity and primer tRNA recognition. FEBS Lett. 122, 100-104
- SARNGADHARAN,M.G., POPOVIC,M. BRUCH,L., SCHUPBACH,J. & GALLO,R.C. (1984). antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 224, 506-508
- SARNGADHARAN,M.G., ROBERT-GUROFF,M. & GALLO,R.C. (1978). DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells. Biochim. Biophys.Acta 516, 419-487
- SARNGADHARAN,M.G., SARIN,P.S., REITZ,M.S. & GALLO,R.C. (1972). Reverse transcriptase activity of human acute leukaemic cells: purification of the enzyme, response to AMV 70 S RNA, and characterization of the DNA product. Nature 240, 67-72
- SCHUPBACH,J., POPOVIC,M., GILDEN,R.V., GONDA,M.A., SARNGADHARAN,M.G. & GALLO,R.C. (1984). Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. Science 224, 503-505
- SCOVASSI,A.I., PLEVANI,P. & BERTAZZONI,U. (1980). Eukaryotic DNA polymerases. Trends Biochem.Sci. 5, 335-337
- SEN,G.C. (1982). Mechanism of interferon action: progress toward its understanding. Progress Nucl.Ac.Res.Mol.Biol. 27, 106-156
- SHARP,P.A. (1983). Conversion of RNA to DNA in mammals: Alu-like elements and pseudogenes. Nature 301, 471-472

- SHIBA,T. & SAIGO,K. (1983). Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element *copia* in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 302, 119-124
- SINGH,H. & DUMAS,L.B. (1984). A DNA primase that copurifies with the major DNA polymerase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 259, 7936-7940
- SIROVER,M.A. & LOEB,L.A. (1976). Metal-induced infidelity during DNA synthesis. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 73, 2331-2335
- SIROVER,M.A. & LOEB,L.A. (1977). On the fidelity of DNA replication. VI.Effect of metals on synthesis with AMV DNA polymerase. *J.Biol. Chem.* 252, 3605-3610
- SKALKA,A.M., DUYK,G., LONGIARU,M., DeHASETH,P.,TERRY,R. & LEIS,J. (1984). Integrative recombination. A role for the retroviral reverse transcriptase. Cold Spring Harbor In *Quant.Biol.*49, 651-659
- SKOOG,L., BJURSELL,G., THELANDER,L., HAGERSTROM,T., HOBBS,J. & ECKSTEIN,F. (1977). 2'-deoxy-2'-azidocytidine, a new inhibitor of DNA replication in mammalian cells. *Eur.J.Biochem.*72,371-378
- SLATER,J.P., TAMIR,I., LOEB,L.A. & MILDVAN,A.S. (1972). The mechanism of *E. coli* DNA polymerase. I. Magnetic resonance and kinetic studies of the role of metals. *J. Biol.Chem.* 247, 6784-6794
- SLOAN,D.L., LOEB,L.A., MILDVAN,A.S. & FELDMAN,R.J. (1975).Conformation of deoxynucleoside triphosphate substrates on DNA polymerase I from *E. coli* as determined by nuclear magnetic relaxation. *J.Biol.Chem.* 250, 8913-8920
- SPADARI,S.,SALA,F. & PEDRALI-NOY,G. (1982). Aphidicolin:a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. *Trends Biochem.Sci.* 6, 29-32
- SRIVASTAVA,S.K., ABRAHAM,K.I. & MODAK,M.J. (1983). The mechanism of inhibition of AMV reverse transcriptase by a dialdehyde derivative of ATP. Inactivation of essential sulfhydryl group function. *Biochim.Biophys.Acta* 745, 194-201

- SRIVASTAVA, S.K. & MODAK, M.J. (1983). Rose Bengal mediated inhibition of DNA polymerases: mechanism of inhibition of AMV reverse transcriptase under photooxidative conditions. *Biochemistry* 22, 2283-2288
- STAYTON, N.M. & KORNBERG, A. (1983). Complex of *Escherichia coli* primase with the replication origin of G-4 phage DNA. *J. Biol. Chem.* 258, 13205-13212
- STONER, G.D., SHINKIN, M.B., TROXELL, M.C., THOMSON, T.L. & TERRY, L.S. (1976). Test for carcinogenicity of metallic compounds by the pulmonary tumor response in strain A mice. *Cancer Res.* 36, 1744-1747
- SUMMERS, J. & MASON, W.S. (1982). Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29, 403-415
- SUNDQUIST, B. & OBERG, B. (1979). Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase. *J. Gen. Virol.* 45, 273-281
- TABOR, H. & TABOR, C.W., eds. (1983). *Methods in Enzymology - Polyamines* vol 94, Academic Press, New York, 497pp
- TABOR, C.W. & TABOR, H. (1984). Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 749-790
- TAMBLY, T.M. & WELLS, R.D. (1975). Comparative ability of RNA and DNA to prime DNA synthesis *in vitro*: role of sequence, sugar, and structure of template-primer. *Biochemistry* 14, 1412-1425
- TARRAGO-LITVAK, L., VIRATELLE, O., DARRIET, D., DALIBART, R., GRAVE, P.V. & LITVAK, S. (1978). The inhibition of mitochondrial DNA polymerase γ from animal cells by intercalating drugs. *Nucleic Acids Res.* 5, 2197-2210
- TAYLOR, J.M. (1977). An analysis of the role of tRNA species as primers for the transcription into DNA of RNA tumor virus genomes. *Biochim. Biophys. Acta* 473, 57-71
- TAYLOR, J.M., FARAS, A.J., VARMUS, H.E., LEVINSON, W.E. & BISHOP, J.M. (1972). RNA directed DNA synthesis by the purified DNA polymerase of Rous sarcoma virus. Characterization of the enzymatic product. *Biochemistry* 11, 2343-2351

- TEMIN,H.M. & MIZUTANI,S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213
- TEMIN,H.M. & MIZUTANI,S. (1974). RNA tumor virus DNA polymerases. In *The Enzymes* (Boyer,P.D.,ed). vol 10. Academic Press, New York. p. 211-235
- TUOMINEN,F.W. & KENNEY,F.T. (1972). Inhibition of RNA-directed DNA polymerase from Rauscher leukemia virus by the 5'-triphosphate of cytosine arabinoside.*Biochem.Biophys.Res.Comm.*48,1469-1475
- VARMUS,H.E. (1982). A growing role for reverse transcription.*Nature* 299, 204-205
- VARMUS,H.E. (1985). Reverse transcriptase rides again. *Nature* 314, 583-584
- VERMA,I.M. (1977). The Reverse Transcriptase. *Biochim.Biophys.Acta* 473, 1-38
- VERMA,I. (1981). Reverse Transcriptase. In *The Enzymes* (Boyer,P.D., ed.). vol 14-A. Academic Press, New York, p. 87-103
- VOLOVITCH,M., MODJTAHEDI,N., YOT,P. & BRUN,G. (1984). RNA-dependent DNA polymerase activity in cauliflower mosaic virus-infected plant leaves. *EMBO J.* 3, 309-314
- WAIN-HOBSON,S., SONIGO,P., DANOS,O., COLE,S. & ALIZON,M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS-virus, LAV. *Cell* 40, 9-17
- WARWICK-KOOCHAKI,P.E. & BOBST,A.M. (1984). Affinity of reverse transcriptase for some polynucleotide inhibitors. *Arch.Biochem. Biophys.* 228, 425-430
- WEIS,J., SMITH,D., BURNS,N., FURCHT,L. & FARAS,A. (1983). Production and characterization of monoclonal antibodies against retrovirus reverse transcriptase. *J.Virol.* 45, 859-863
- WEISS,J.H. & FARAS,A.J. (1983). Purification and characterization of two protein kinases associated with Rous sarcoma virus. *Biochemistry* 22, 165-170
- WEISSBACH,A. (1981). Cellular and viral-induced eukaryotic polymerases. In *The Enzymes*, (Boyer,P.D.,ed), vol 14-A, Academic Press, New York, p. 67-86

- WEISSBACH,A.,BOLDEN,A., MOLLER,R., HANAFUSA,H. & HANAFUSA,T.(1972).
DNA polymerase activities in normal and leukovirus-infected
chicken embryos cells. J.Virol. 10, 321-327
- WELLS,R.D., FLUGEL,R.M., LARSON,J.E., SCHENDEL,P.F. & SWEET,R.W.
(1972). Comparison of some reactions catalyzed by DNA polymerase
from AMV, *E. coli*, and *M. luteus*. Biochemistry 11, 621-629
- WILDE,C.D., CROWTHER,C.E., CRIPE,T.P., LEE,M.G.S. & CROWAN,N.J.
(1982). Evidence that a human β -tubulin pseudogene is derived
from its corresponding mRNA. Nature 297, 83-84
- WOHLRAB,F., JAMIESON,A.T., HAY,J., MENGEL,R. & GUSCHLBAUER,W.(1985).
The effect of 2'-fluoro-2'-deoxycytidine on herpes virus growth.
Biochim.Biophys.Acta 824, 233-242
- WRIGHT,G.E. & BROWN,N.C. (1985). Inhibition of RNA-directed DNA
polymerase from AMV by a 5-benzyl-6-aminouracyl. Biochem.
Biophys.Res.Comm. 126, 109-116
- YAGURA,T., KOZU,T. & SENO,T.,T. (1982). Inhibition of a novel sub-
species of DNA polymerase α by 2'-deoxy-2'-azidoadenosine 5'-
triphosphate. Biochem.Biophys.Res.Comm. 104, 1189-1195
- YAGURA,T., KOZU,T., SENO,T., SANEYOSHI,M., HIRAGA,S. & NAGANO,H.
(1983). Novel form of DNA polymerase α associated with DNA
primase activity of vertebrates. Detection with mouse stimulating
factor. J.Biol.Chem. 258, 13070-13075
- YAMAGISHI,K.H., KANO,K. & MANO,Y. (1981). Effects of aphidicolin on
retrovirus DNA synthesis *in vivo*. Biochem.Biophys.Res.Comm.
102, 1372-1378
- YANG,W.K., KOH,C.K. & WATERS,L.C. (1972). Preparation of RNA-
directed DNA polymerase from spleens of Balb/c mice infected by
Rauscher leukemia virus. Biochem.Biophys.Res.Comm.47, 505-511
- ZIMMERMANN,W. & WEISSBACH,A. (1981). Participation of DNA polymerase
 α in amplification of ribosomal DNA in *Xenopus laevis*. Mol.
Cel. Biol. 1, 680-686.