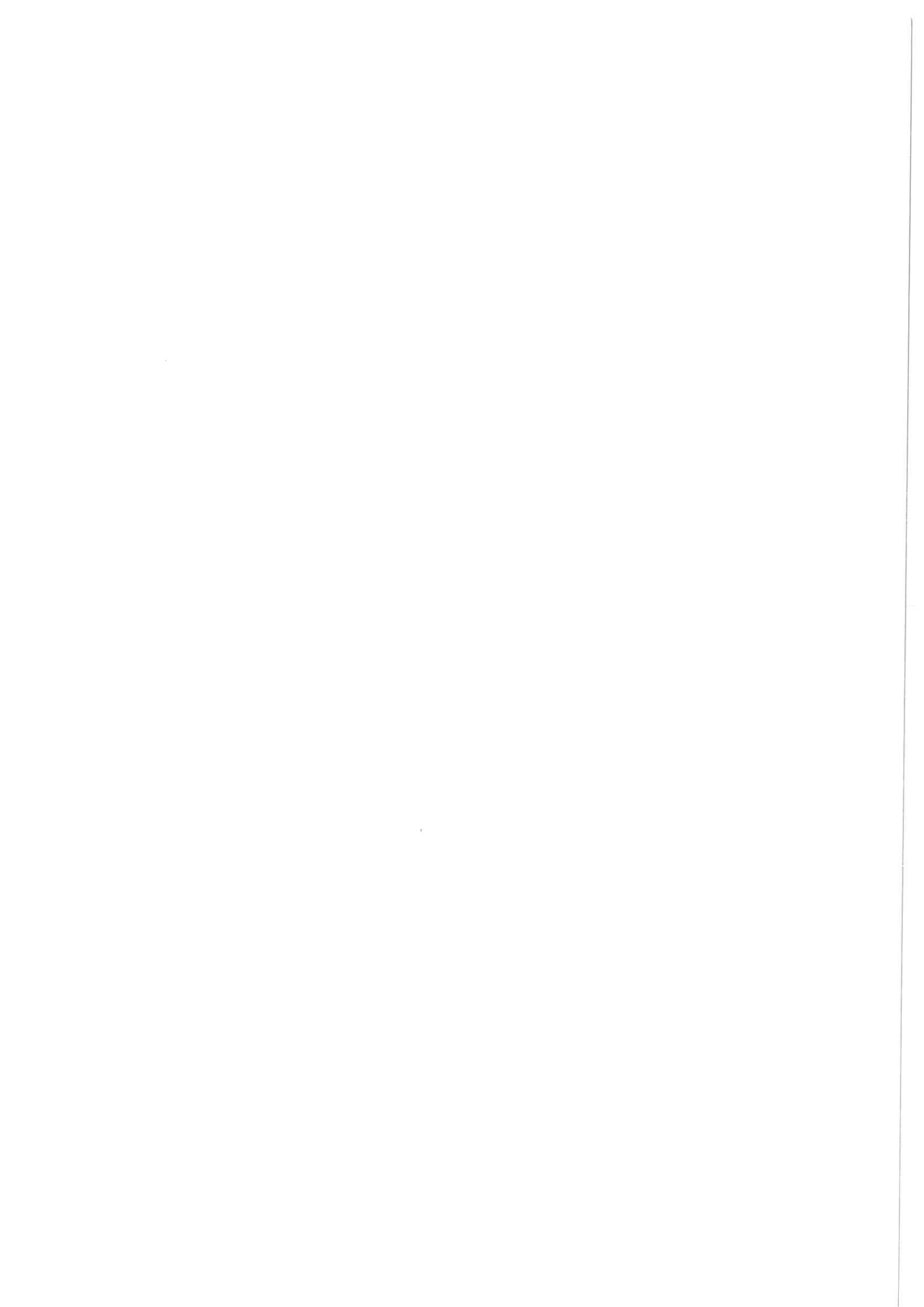

Boletim da Sociedade Portuguesa de Química

N.º 30 (Série II) • Dezembro 1987

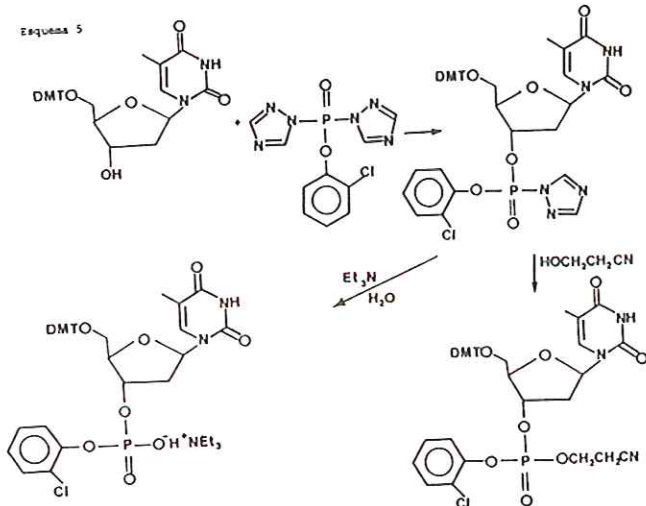
SUMÁRIO

• Informações, actualidade	3
• Passatempo	10
• A situação actual do SIDA ao nível mundial, <i>Alfredo Cravador</i>	11
• A síntese química do DNA, <i>Alfredo Cravador</i>	21
• Fermentação, emblema filosófico de Becher, <i>A.M. Amorim da Costa</i>	27
• O novo léxico científico de Florêncio Vesúvio.....	32
• O quê, quando e como no ensino do átomo, <i>Victor M.S. Gil</i>	33
• Planeamento de um curso laboratorial de Química Orgânica para uma Universidade Aberta, <i>M.R. Gomez-Anton</i>	41
• Humor químico, <i>Victor M.S. Gil</i>	44
• Congressos e conferências, <i>Maria Regina Tavares</i>	45
• Correspondência.....	47



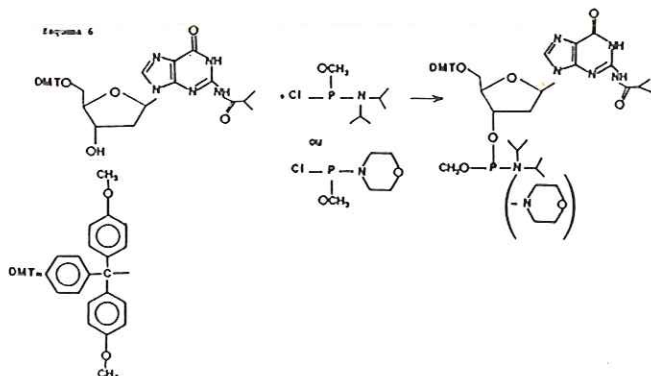
O grupo protector transitório deve ser suficientemente estável para permitir o isolamento, a purificação e a estocagem dos blocos desoxinucleotídicos completamente protegidos. A sua eliminação deve ser específica e rápida em condições que preservem os grupos protectores permanentes e o grupo protector temporário em posição 5'.

Os grupos ortoclorofenilo ($R = o\text{-ClC}_6\text{H}_4$ com $Y = 0$) permanente e o cianoetilo ($R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ com $Z = 0$) temporário (ver esquema 4) são exemplos de grupos muito utilizados na metodologia dos fosfatotriéster (7) (Exemplo: esquema 5).



O grupo protector permanente correntemente utilizado na metodologia do fosfitotriéster é o radical metilo. O terceiro substituinte do átomo do fósforo é um grupo azodialquilo introduzido em substituição de um átomo de cloro, o qual confere uma reactividade particularmente forte ao intermediário fosfocloridrito (utilizado durante o desenvolvimento inicial do método) (8) que o torna instável e de emprego pouco cómodo.

Os compostos diisopropilamino e morfolino-fosforoamidito possuem um bom compromisso de reactividade-estabilidade (Exemplo: esquema 6).



É importante sublinhar que o sucesso da síntese química de DNA se baseia sobretudo na preparação destes blocos de base, isto é, na escolha dos diferentes grupos protectores, no rendimento das diferentes reacções e na pureza dos desoxinucleotídicos completamente protegidos.

2 — Desprotecção selectiva

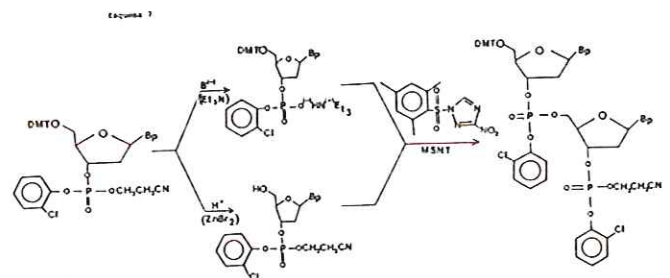
Para poder condensar dois desoxinucleotídicos pelo método do fosfato triéster, é necessário libertar separada-

mente por um lado a função fosfato e por outro o grupo hidroxílico 5' das suas protecções temporárias. Por exemplo, o grupo dimetoxitritilo é retirado em condições ácidas suaves e o grupo cianoetilo em condições básicas suaves.

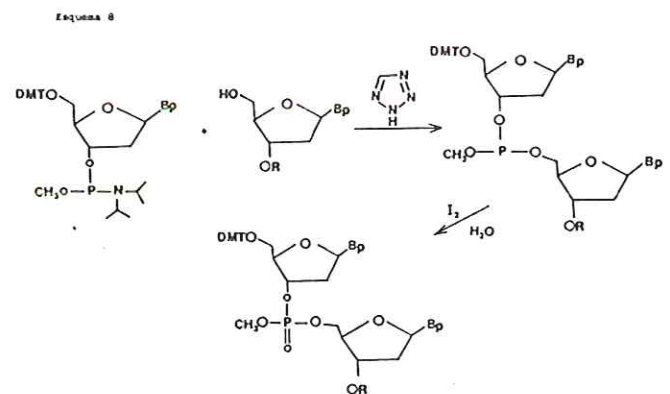
3 — Reacções de Condensação

A reacção de condensação necessita evidentemente da formação de espécies activas capazes de reagir com bons rendimentos sem formação de produtos secundários.

A activação do fosfatodiéster é frequentemente realizada pela acção conjugada de um cloreto de arilosulfonilo e de uma amina heterocíclica, ou de uma sulfonamida preparada antecipadamente a partir deste tipo de compostos (10) (Esquema 7).



A activação dos fosforoamiditos é realizada por um agente de protonação, ácido fraco (Ex.: o tetrazolo $pK_a = 4,9$) que acelera a quebra do grupo dialquilamina e favorece o ataque pela função hidroxilica que vai estabelecer a ligação internucleotídica (11). Não é portanto possível dentro desta metodologia eliminar o grupo dimetoxitritilo em presença do grupo fosforoamidito (Esquema 8).

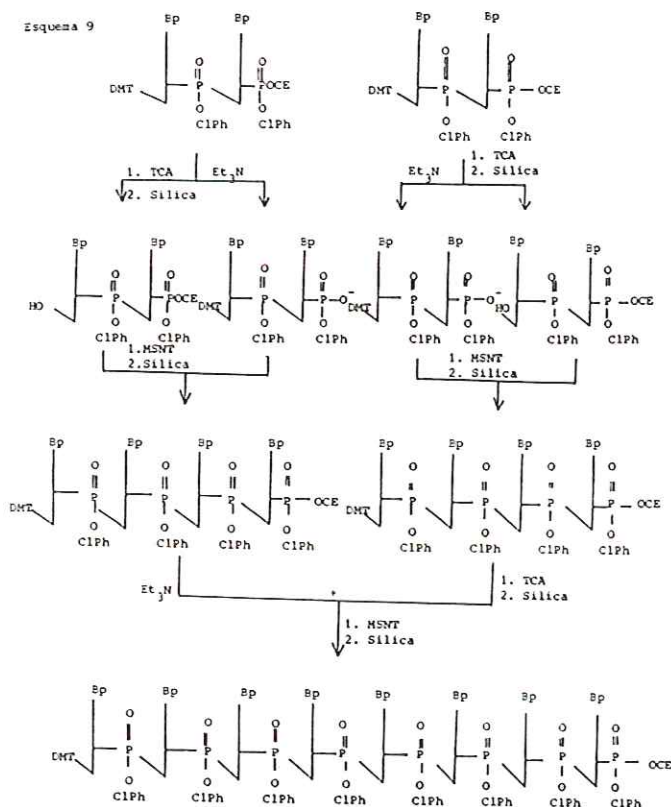


4 — Construção da cadeia oligodesoxinucleotídica

Na síntese em solução e pela metodologia do fosfatotriéster a extensão da cadeia polinucleotídica pode fazer-se de maneira alternada no sentido 3'→5' ou 5'→3' visto que se pode desproteger o grupo hidroxílico na extremidade 5' ou ~~trifosfato~~ na posição 3' do oligómero em construção. Dois oligómeros podem igualmente ser condensados um com o outro. Devido à sensibilidade dos fosforoamiditos às condições ligeiramente ácidas, esta flexibilidade própria aos triésterfosfatos não se aplica ao método do fosfitotriéster que não foi desenvolvido em solução. A síntese em solução permite a detecção de reacções secundárias de maneira mais directa que a síntese em fase sólida. Ela permite a identificação e a compreensão da origem dos produtos

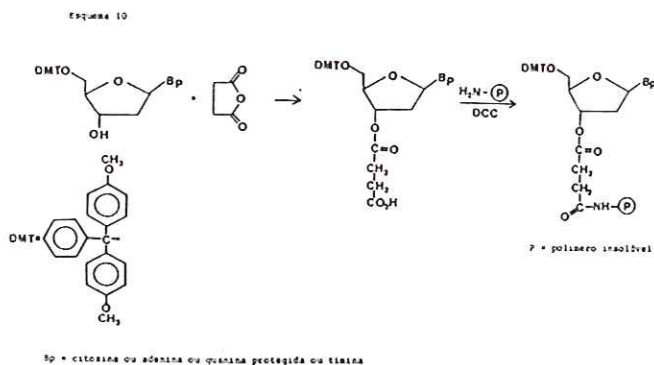
* fosfato triéster

parasitas e portanto possibilita a intervenção sobre os parâmetros correctores (Esquema 9).



Bp = citosina ou adenina ou guanina protegida, ou timina.
 ClPh = 2-clorofenol
 DMT = Dimetoxitritilo
 Cl = cloroetilo
 TCA = ácido tricloroacético
 MSNT = mesitileno-sulfonil-3-nitrotriazolo

A extensão da cadeia de DNA em fase sólida realiza-se numa só direcção (em geral 3' → 5') a partir de um desoxirribonucleosídeo fixo por uma das funções hidroxílicas a um suporte sólido. A fixação efectua-se em geral através da formação de uma ligação amídica entre um 2'-desoxi-3'-succinilribonucleosídeo e um polímero insolúvel aminado (β -NI₂) (12) (Esquema 10).



Bp = citosina ou adenina ou guanina protegida ou timina

O poliestirenodivinilbenzeno, a resina composta polidimetilacrilamida-kieselguhr, a sílica, as esferas de vidro de porosidade controlada, a celulose, o co-polímero teflo-poliestireno são exemplos de polímeros insolúveis correntemente utilizados.

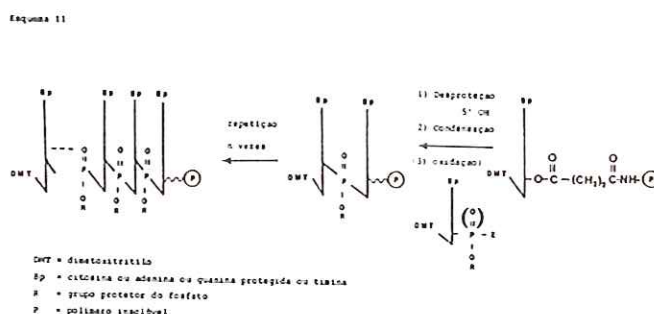
A extensão da cadeia polinucleotídica em fase sólida consiste na repetição de um ciclo que compreende essencialmente:

1) A reacção de desprotecção do grupo hidroxílico em 5' do primeiro nucleosídeo (ou da cadeia em crescimento) fixo no polímero insolúvel.

2) A reacção de condensação entre a função hidroxílica libertada e a espécie nucleotídica introduzida em solução e activada "in situ" no átomo de fósforo em posição 3'.

Com o método do fosfatotriéster uma terceira reacção de oxidação do fosfito em fosfato é necessária. Uma reacção suplementar é por vezes efectuada. Ela visa o bloqueamento da ligeira percentagem dos grupos hidroxílicos que não reagiram na reacção de condensação a fim de os desactivar para as reacções ulteriores.

Os reagentes em excesso, os sub-productos e os solventes das reacções e de lavagem são eliminados por simples filtração do suporte sólido (Esquema 11).



O isolamento do produto ligado ao polímero insolúvel é por consequência simples e rápido em relação aos métodos convencionais em solução. O conjunto das operações presta-se bem à automatização.

Uma desvantagem da fase sólida é a cinética desfavorável. Para conseguir reacções completas dentro de tempos razoáveis é indispensável utilizar excessos importantes de reagentes cuja pureza é portanto crítica. Traços de impurezas reactivas podem inibir completamente a reacção de condensação.

Em fase sólida a acumulação de produtos indesejáveis é inevitável visto não haver purificação em nenhuma etapa da extensão do fragmento de DNA. Uma maneira de minimizar este inconveniente consiste em utilizar dímeros ou trímeros preparados em solução, estratégia que nós adoptámos e que diminui de um factor 2 ou 3 o número de reacções efectuadas no polímero insolúvel.

O comprimento do fragmento de DNA que é possível obter por síntese química depende evidentemente do rendimento da etapa de condensação que tem que ser mantido o mais alto possível (90 a 95%) de maneira reprodutível. Nós preparamos correntemente fragmentos de 30 a 50 nucleótidos pelos métodos do fosfatotriéster e do fosfitotriéster. Do ponto de vista das vantagens e inconvenientes, os dois métodos são presentemente equivalentes.

5 — Desprotecção

A desprotecção do fragmento de DNA é uma operação delicada que deve preservar a integridade do edifício molecular. Reacções incompletas ou uma degradação parcial conduzem a uma mistura complexa de produtos.

A desprotecção compõe-se de 3 etapas distintas:

1) transformação dos grupos triésterfosfatos em diésterfosfatos;

- II) Desprotecção das bases;
 III) Desprotecção da função OH terminal em 5'.

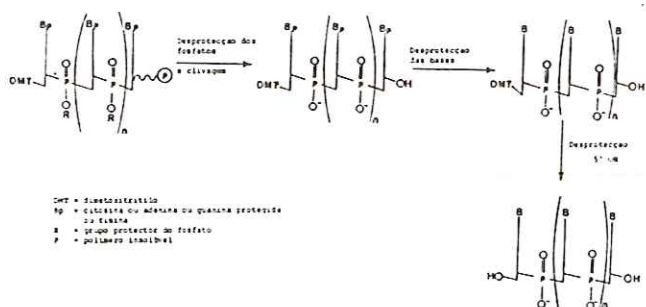
I) A desprotecção dos grupos fosfatos é uma fonte possível de ruptura internucleotídica. Esta pode ser minimizada utilizando reagentes selectivos antes de desproteger as bases.

Se a extensão da cadeia de DNA for realizada pelo método do fosfatotriéster em fase sólida, a clivagem do suporte insolúvel efectua-se com o mesmo reagente de desprotecção dos grupos fosfatos clorofenilados, por exemplo com o 2-nitrofenilcarbaldoximato de tetrametilguanidina. O grupo metilo utilizado com o método do fosfitotriéster é deslocado por ataque nucleofílico pelo anião tiofenalato antes da clivagem. Esta é efectuada em condições suaves.

II) As amins exocíclicas das bases são desaciladas por amonólise a 50°C. Este tratamento provoca uma ruptura, que não é desprezável, das ligações fosfatos internucleotídicas quando o fosfato está na forma de triéster; esta é a razão pela qual se converte antecipadamente e selectivamente o fosfatotriéster em fosfatodiester.

III) O grupo protector da função hidroxilica em posição 5' é o último a ser retirado (pelo ácido acético 80% no caso do grupo dimetoxitritilo). É conservado até ao fim para impedir a formação de triésteres fosfóricos cíclicos que conduzem a estruturas oligodesoxirribonucleotídicas com ligações 5'→5', durante as primeiras etapas de desprotecção. Devido ao seu carácter hidrófobo o grupo dimetoxitritilo protector da função 5'OH facilita o isolamento do produto por cromatografia de sílica em fase inversa (Esquema 12).

Esquema 12



6 — Isolamento, purificação e caracterização

Os métodos de isolamento e de purificação correntemente utilizados são a cromatografia de DEAE-celulose, de Sefadex, de camada fina de sílica, a cromatografia líquida a alta pressão (HPLC) com coluna de sílica de fase inversa ou de troca de catiões e a electroforese preparativa em poliácridamida.

A caracterização do produto isolado e marcado numa das extremidades com um radioisótopo pode ser efectuada pelo método de sequenciação de DNA de Maxam e Gilbert (13). É no entanto necessário um reajustamento das condições das reacções aos fragmentos de pequeno comprimento (14). Um outro método conhecido pelo nome de "Wandering spot" baseia-se na análise a duas dimensões (electroforese em acetato de celulose, seguida de cromatografia em camada fina de DEAE-celulose) dos fragmentos de oligonucleotido sin-

tético marcado numa extremidade, obtidos por digestão parcial com uma exonuclease (15). Este método restringe-se a fragmentos de comprimento inferior a 20 nucleotídeos.

II — O campo das aplicações

As aplicações dos oligodesoxirribonucleotídeos de sequência definida cobrem quase todos os aspectos da investigação que implicam a recombinação de DNA tanto no que diz respeito à construção, à identificação e à caracterização de clones bacterianos particulares, como à manipulação do DNA clonado com o fim de modificar a sua estrutura.

Nos campos da determinação de sequências de DNA, do estudo das interações proteína-DNA ou da análise estrutural do DNA, os oligodesoxirribonucleotídeos sintéticos têm-se revelado uma arma extremamente útil. A coordenação das competências e a conjugação dos esforços conduziram no nosso laboratório a alguns sucessos no domínio da Engenharia Genética aplicada à medicina.

A síntese química de DNA de sequência definida possibilitou a varredura (screening) de bancos de clones e o isolamento de estirpes bacterianas como a alfa-1-antitripsina, a antitrombina III e a uroquinase (16) (17) (18) e a síntese total da sequência de DNA que codifica para a somatocrinina humana cuja introdução num vector plasmídico (19) possibilitou a expressão deste factor hormonal na bactéria (20). Estes exemplos ilustram, de maneira não exaustiva a importância da química de síntese dos ácidos nucleicos em qualquer programa de engenharia genética: podemos prever, sem qualquer dúvida, que esta importância continuará a aumentar intensamente no futuro.

BIBLIOGRAFIA

- (1) G.J. Powers, R.L. Jones, G.A. Randall, M.H. Garuthers, J.H. van de Sande e H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 975 (1975).
- (2) E.L. Brown, R. Belagaje, M.J. Ryan e H.G. Khorana, *Methods in Enzymology* **68**, 109 (1979).
- (3) G.S. Ti, B.L. Gaffney e R.A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1316 (1982).
- (4) a) S.S. Jones, C.B. Reese, S. Sibanda e A. Ubasawa, *Tet. Lett.*, **22** (47) 4755 (1981). b) H.P. Daskolov, M. Sekine e T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **54**, 3076 (1981). c) B.L. Gaffney e R.A. Jones, *Tet. Lett.*, **23** (22) 2257 (1982). d) T. Trichtinger, R. Charubala e W. Pfeleiderer, *Tet. Lett.*, **24** (7) 711 (1983). e) M. Sekine, J. Matsuzaki e T. Hata, *Tet. Lett.*, **23** (50) 5287 (1982). f) T. Kamimura, M. Tsuchiya, K. Moura, M. Sekine e T. Hata, *Tet. Lett.*, **24** (27) 2775 (1983).
- (5) K.L. Agarwal, A. Yamasaki, P.J. Cashion e H.G. Khorana, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **11**, 451 (1972).
- (6) H.G. Khorana, *Science* **203**, 614 (1979).
- (7) N. Katagiri, K. Itakura e S.A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7332 (1975).
- (8) R.L. Letsinger e W.B. Lursford, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3655 (1976).
- (9) L.J. McBride e M.H. Garuthers, *Tet. Lett.*, **24** (3) 245 (1983).
- (10) a) S.S. Jones, B. Rayner, C.B. Reese, A. Ubasawa e M. Ubasawa, *Tetrahedron* **3075** (1980). b) V.A. Efimov, S.V. Reverdatto e O.G. Chakhmakhcheva, *Tet. Lett.*, **23** (9), 961 (1982).

- (11) S.L. Beaucage e M.H. Caruthers, *Tet. Lett.*, 22 (20) 1859 (1981).
- (12) a) H. Iti, Y. Ike, S. Ikuta e K. Itakura, *Nucl. Acids Res.*, 10, 1755 (1982). b) M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh e R.C. Titmas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 37 (1982).
- (13) A.M. Maxam e W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 74, 560 (1977).
- (14) a) E. Jay, A.K. Seth, Y. Rommens, A. Sood, G. Jay, *Nucl. Acids Res.*, 10 (20), 6319 (1982). b) A.M. Banaszuk, K.V. Deugou, J. Sherwood, M. Michalak, B.R. Glick, *Anal. Biochem.*, 128, 281 (1983).
- (15) C.P.D. Tu, E. Jay, C.P. Bahl e R. Wu, *Anal. Biochem.*, 74, 73 (1976).
- (16) Bollen, A., *Chimie Nouvelle* (Fevr. 1984).
- (17) A. Bollen, A. Herzog, A. Cravador, P. Héron, P. Chuchana, A. Van der Straten, R. Loriau, P. Jacobs and A. Van Elsen, *DNA*, 2, 255 (1983).
- (18) P. Jacobs, A. Cravador, R. Loriau, F. Brockly, B. Colau, P. Chuchana, A. Van Elsen, A. Herzog and A. Bollen, *DNA*, 4, 139 (1985).
- (19) A. Cravador, P. Jacobs, A. Van Elsen, C. Lacroix, B. Colau, P. Van Alphen, A. Herzog and A. Bollen, *Biochimie*, 67, 829 (1985).
- (20) Resultados não publicados.



SOPOEQUIP

PRODUTOS E EQUIPAMENTOS PARA A INDÚSTRIA E LABORATÓRIOS LDA

DINAMISMO - QUALIDADE - SERVIÇO

ESCOLHA - EFICIÊNCIA

PEÇA-NOS A LISTA DAS NOSSAS REPRESENTADAS
ALGUMA LHE INTERESSARÁ!

Estamos à distância do seu telefone...

QUINTA DA PIEDADE, LOTE 12-1.º
TEL. 259 44 62

2625 PÓVOA ST.ª IRIA
TELEX 43926 DISO-P