
Enzimas em biologia molecular. II. Sequenciamento genômico pelo método de Sanger: T7 DNA polimerase, Sequenase e Termo Sequenase

Silvana Beres CASTRIGNANO

Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz

As enzimas utilizadas para sequenciamento de DNA pelo método de Sanger são as mesmas utilizadas para amplificação de DNA, por exemplo, na reação em cadeia pela polimerase (PCR)?

Para responder a esta pergunta, neste segundo artigo da série sobre enzimas utilizadas no laboratório de biologia molecular vão ser apresentadas as pesquisas sobre a enzima T7 DNA polimerase e outras delas derivadas, que tiveram papel essencial em impulsionar a técnica de sequenciamento de Sanger.

Quando Sanger et al¹ descreveram o método de terminação da cadeia para sequenciamento genômico, utilizaram como enzima o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli* para incorporar os desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) e os didesoxirribonucleotídeos trifosfato (ddNTPs). A diferença entre dNTP e ddNTP reside no grupo 3'-hidroxil que falta a estes últimos. Nesta técnica, a incorporação dos nucleotídeos acontece no sentido 5'→3', na sequência de um *primer* (oligonucleotídeo) que foi anelado à sequência-molde, aquela que se quer sequenciar. Enquanto a incorporação de um dNTP permite a continuação da cadeia, a incorporação de um ddNTP, pela falta de um grupo 3'-hidroxil, leva à interrupção do crescimento da mesma. A seguir, para identificação da sequência, utiliza-se eletroforese em gel, para separação dos fragmentos sequenciados por tamanho¹. O fragmento Klenow tem as mesmas propriedades da DNA polimerase I de *E. coli*, como

a atividade polimerase 5'→3' e a atividade de exonuclease 3'→5', mas não a atividade de exonuclease 5'→3', pois falta a ele o domínio N-terminal em relação à enzima completa^{2,3}.

Para que a reação de sequenciamento pelo método de Sanger ocorra de forma eficiente, é interessante que a enzima utilizada tenha alta processabilidade — termo que descreve o número de nucleotídeos continuamente incorporados por uma DNA polimerase usando o mesmo par *primer*-molde, sem dissociação — e faça pouca distinção entre dNTPs e ddNTPs⁴. A enzima T7 DNA polimerase mostrou-se melhor nesses quesitos do que o fragmento Klenow utilizado por Sanger⁴.

A enzima DNA polimerase do bacteriófago T7 foi descoberta em 1971 e extensivamente estudada pelo grupo de Charles C. Richardson, no Departamento de Química Biológica e Farmacologia Molecular da Faculdade de Medicina de Harvard⁴. O gene da T7 DNA polimerase foi detectado no gene 5 do bacteriófago, mas a atividade polimerase da proteína por ele codificada depende de um fator do hospedeiro do bacteriófago, a proteína tiorredoxina de *E. coli*. O papel desta última é estrutural, estabilizando a ligação da T7 DNA polimerase com o conjunto *primer*-molde. O grupo também demonstrou que a tiorredoxina era responsável por aumentar a processabilidade da polimerase em mais de 100 vezes⁴.

Outro ponto que foi analisado pelo grupo era a atividade de exonuclease. Esta atividade é

positiva e desejável na amplificação de segmentos genômicos pois excisa bases que foram incorporadas erroneamente à cadeia de DNA em formação em relação à fita molde de DNA. A atividade de exonuclease aumenta portanto a fidelidade da enzima⁴. Já no caso de reação de sequenciamento pelo método de Sanger, a atividade de exonuclease é prejudicial, pois: (1) a atividade exonuclease 5'→3' pode degradar *primers* e o DNA produzido³; (2) a atividade exonuclease 3'→5' pode interferir na análise da polimerização pois pode degradar *primers* e o produto de DNA, mas principalmente porque pode hidrolizar tanto o dNTP quanto o ddNTP terminais, prevenindo a acumulação de produtos cuja cadeia foi finalizada pela adição de ddNTP³; (3) quando a concentração de dNTPs diminui, a atividade de exonuclease aumenta, ficando próxima da atividade polimerase, resultando em parada da síntese da nova cadeia⁴; (4) a atividade de exonuclease faz com que a DNA polimerase não seja eficiente em regiões onde a fita-molde tenha estruturas secundárias⁴. No caso da T7 DNA polimerase, apesar de não ter atividade de exonuclease 5'→3', ela apresenta atividade de DNA exonuclease 3'→5' para DNA de fita simples e dupla⁴. Para sua melhor adequação à função de sequenciamento, o grupo de Richardson demonstrou a possibilidade de inativação parcial desta última atividade através de uma reação de oxidação. Esta enzima quimicamente modificada, batizada de Sequenase, foi patenteada e usada em *kits* comerciais de sequenciamento⁴. Posteriormente o grupo gerou mutantes da T7 DNA polimerase e selecionou um que não tinha atividade de exonuclease: a esse mutante, patenteado como Sequenase Versão 2, faltavam 28 aminoácidos da região N-terminal⁴.

Uma forma de aumentar a sensibilidade da reação de sequenciamento seria utilizar enzimas termoestáveis, o que permitiria que fossem feitos diversos ciclos de sequenciamento com a mesma mistura, sem reposição da enzima a cada ciclo, e permitindo assim utilizar amostras com concentração bem menor do DNA a ser sequenciado. A *Thermus aquaticus* DNA polimerase (*Taq* DNA polimerase), que é enzima termoestável, faz bastante distinção entre ddNTPs e dNTPs, durante a incorporação dos

mesmos. Tabor e Richardson², com vistas à utilização de enzimas termoestáveis no sequenciamento e para compreender a base molecular da habilidade de distinguir entre dNTP e ddNTPs, empreenderam a construção de genes híbridos de T7 DNA polimerase, DNA polimerase I de *E. coli* e da *Taq* DNA polimerase. Descobriram que um único grupo hidroxil é crítico para indicar essa seletividade. A troca da tirosina 526 da T7 DNA polimerase por uma fenilalanina aumenta a discriminação contra os ddNTPs em mais de 2.000 vezes, enquanto a troca da fenilalanina na posição homóloga da DNA polimerase I de *E. coli* (posição 762) ou da *Taq* DNA polimerase (posição 667) por tirosina diminui a discriminação contra os diferentes ddNTPs entre 250 e 8.000 vezes².

O conhecimento gerado pelo grupo de Richardson possibilitou a criação da Termo Sequenase a partir da *Taq* DNA polimerase. Esta foi geneticamente manipulada para inibição da atividade exonuclease 5'→3' e também para remoção da discriminação contra ddNTPs com a mutação fenilalanina→tirosina no resíduo 667^{4,5}.

Os descobrimentos acima incentivaram a continuação das pesquisas com DNA polimerases para melhorar a performance no sequenciamento genômico. Isso ocorreu não só com DNA polimerases da família A, como as citadas acima, mas também com membros da família B de DNA polimerases, como phi29, T4, Vent, Deep Vent, 9°N-7, Pfu^{3,6}. Muitas dessas pesquisas têm resultado em enzimas que vêm sendo patenteadas, algumas já disponíveis em *kits* comerciais^{3,6}.

Como pode ser depreendido do que foi citado, as enzimas que usamos para sequenciamento de DNA pela técnica de Sanger não são exatamente as mesmas que usamos para amplificação de DNA, pois algumas características desejáveis para amplificação como a atividade de exonuclease, que aumenta a fidelidade da enzima na amplificação, pode comprometer o sequenciamento. E uma característica muito desejável para sequenciamento pela técnica de Sanger, como a pouca discriminação entre dNTP e ddNTP, não são necessárias para amplificação.

Que tal o leitor descobrir qual é a enzima DNA polimerase existente no *kit* de sequenciamento que utiliza?

REFERÊNCIAS

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-67.
2. Tabor S, Richardson CC. A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(14):6339-43.
3. Reha-Krantz LJ. Recent patents of gene sequences relative to DNA polymerases. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2008; 2(3):145-163.
4. Zhu B. Bacteriophage T7 DNA polymerase - sequenase. *Front Microbiol*. 2014;5:181. doi: 10.3389/fmicb.2014.00181.
5. Reeve MA, Fuller CW. A novel thermostable polymerase for DNA sequencing. *Nature*. 1995;376(6543): 796-7.
6. Chen CY. DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present. *Front Microbiol*. 2014;5:305.doi: 10.3389/fmicb.2014.00305.