



# O papel das nucleases no laboratório de biologia molecular: vilãs ou aliadas?

## The role of nucleases in the molecular biology laboratory: villains or allies?

[RIALA6/1747](#)

Silvana Beres CASTRIGNANO\*

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Doenças Respiratórias, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel. 11 3068 2906. E-mail: [silbc@uol.com.br](mailto:silbc@uol.com.br)

Recebido: 18.04.2018 - Aceito para publicação: 27.08.2018

### RESUMO

Em laboratório de biologia molecular existem normas para prevenir que nucleases destruam os ácidos nucleicos em análise. Rígida adesão a estas normas é primordial, principalmente em laboratórios de análises clínicas e ao se lidar com amostras com número restrito de cópias do genoma-alvo. Em contraposição, diversas nucleases têm tido importância fundamental, por exemplo, na identificação do ácido nucleico de vírus, investigação de RNA mensageiro, purificação de vírus em abordagem metagenômica, edição de genomas com o sistema CRISPR/Cas e descoberta de enzimas. O conhecimento de como nucleases podem ser tanto vilãs quanto aliadas é essencial na formação de todos que trabalham no campo de biologia molecular.

**Palavras-chave.** desoxirribonucleases, ribonucleases, vírus, biologia molecular, técnicas de laboratório clínico.

### ABSTRACT

In a molecular biology laboratory there are standards to prevent nucleases from destroying the nucleic acids under analysis. Strict adherence to these standards is paramount, mainly in clinical analysis laboratories and when dealing with samples with a limited number of copies of the target genome. In contrast, several nucleases have been of fundamental importance, for example, in the identification of the type of viral nucleic acid, investigation of messenger RNA, virus purification in metagenomic approach, genome editing with the CRISPR/Cas system, and enzyme discovery. Knowledge of how nucleases can be both villains and allies is essential in the training of all working in the field of molecular biology.

**Keywords.** deoxyribonucleases, ribonucleases, virus, molecular biology, clinical laboratory techniques.

É altamente recomendável que todos que ingressem em laboratório de biologia molecular recebam orientações exaustivas sobre prevenção da degradação dos ácidos nucleicos com que irão trabalhar. Esta preocupação é especialmente importante quando se tem pouco material-alvo na amostra a ser analisada e em laboratórios voltados ao diagnóstico, como os de análises clínicas, onde a inobservância dessa prevenção pode implicar em resultados falsamente negativos.

As enzimas que degradam ácidos nucleicos são chamadas de nucleases, e estão presentes em todos os seres vivos<sup>1</sup>. As nucleases têm a capacidade de hidrolisar a ligação fosfodiéster, que é a mais estável entre todas as ligações químicas encontradas nas moléculas biológicas, e podem ser divididas em ribonucleases (RNases) e desoxirribonucleases (DNases), dependendo da especificidade do seu ataque em relação às moléculas de ácido nucleico<sup>1</sup>.

As orientações para evitar a ação de nucleases durante a manipulação da amostra incluem regras para evitar a contaminação com nucleases do próprio manipulador e também de contaminantes externos como bactérias e outros microrganismos (enumeradas por Farrell<sup>2</sup>; Miller et al.<sup>3</sup>; Sambrook e Russell<sup>4</sup>). Além disso, os integrantes do laboratório também devem zelar para que a amostra não fique susceptível às nucleases da própria amostra, principalmente RNases, provenientes das células e tecidos (vide orientações de Farrell<sup>2</sup>).

No entanto há outro lado, oposto a essa mensagem de evitar nucleases, que merece ser igualmente ressaltado: do quanto as nucleases podem ser aliadas do pesquisador na investigação científica. Revisitaremos o papel positivo que as nucleases têm tido, em diferentes abordagens, através de alguns exemplos no campo da virologia.

Nos seres constituídos por células, o genoma consiste uniformemente de DNA de fita dupla (dsDNA, do inglês *double-stranded DNA*). Já os vírus podem ter genoma dsDNA, DNA de fita simples (ssDNA, do inglês *single-stranded DNA*), RNA de fita simples (ssRNA, do inglês *single-stranded RNA*) e RNA de fita dupla (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*)<sup>5</sup>. Ao ser descoberto um novo vírus, portanto, o tipo de genoma é uma das características necessárias para sua descrição e classificação.

Lançando mão de algumas nucleases, é possível caracterizar o genoma de vírus. Nas publicações a seguir, o genoma foi associado a partículas semelhantes a vírus visualizadas por microscopia eletrônica.

Enquanto investigavam a presença de genoma de rotavírus em fezes de animais e humanos através de eletroforese em gel de poliacrilamida, Pereira et al.<sup>6</sup> detectaram, em algumas amostras, duas bandas bem definidas diferentes dos segmentos genômicos característicos dos rotavírus. Os autores decifraram que eram segmentos genômicos do antes desconhecido picobirnavírus. Ao submeterem o genoma purificado do novo vírus separadamente a DNase I<sup>a</sup>, RNase pancreática (RNase A)<sup>b</sup> e RNase T1<sup>c</sup>, concluíram que era constituído por dsRNA<sup>6</sup>.

Após purificarem e concentrarem partículas semelhantes a vírus encontradas dentro da alga marinha unicelular denominada *Chaetoceros lorenzianus*, cientistas extraíram o ácido nucleico e submeteram-no separadamente às seguintes nucleases: RNase A, DNase I, nuclease S1<sup>d</sup>. Demonstraram ser o genoma suscetível a DNase I mas não a RNase A; e que parte do genoma não foi digerida com o uso de nuclease S1. Com o auxílio desses testes, foi possível concluir que o genoma do vírus DNA de *Chaetoceros lorenzianus* é composto por ssDNA em aproximadamente 5 kb e dsDNA em aproximadamente 0,9 kb<sup>10</sup>.

DNase I e RNase A também foram utilizadas, juntamente com tripsina (enzima proteolítica) e nuclease de micrococos<sup>e</sup>, para uma descoberta fundamental: a existência na natureza de transferência de informação do RNA para o DNA. Dois grupos independentes de investigadores comprovaram que a síntese de DNA usando RNA como molde era realizada por proteína, denominada transcriptase reversa, existente em vírions de genoma RNA que hoje sabemos ser retrovírus<sup>12,13</sup>.

a. DNase I — age em ssDNA ou dsDNA, estejam isoladas ou incorporadas na cromatina<sup>7</sup>

b. RNase A — cliva principalmente ssRNA na posição 3' e também RNA em híbridos DNA/RNA nos locais onde houver mal-pareamento (*mismatch*) simples<sup>7</sup>; também é responsável por clivar dsRNA em condições de baixa concentração de sal<sup>8</sup>

c. RNase T1 — cliva ssRNA onde houver nucleotídeos G<sup>7,9</sup>

d. nuclease S1 — endonuclease que degrada ssRNA e ssDNA<sup>7,9</sup>

e. nuclease de micrococos — hidroliza DNA e RNA<sup>11</sup>

Em relação à investigação de RNA mensageiro (mRNA), um tipo de abordagem é a pesquisa da ocorrência, naquele momento, de replicação de um vírus de genoma DNA. Esta abordagem tem especial aplicação no estudo de vírus que ficam latentes após a infecção primária, e que podem se reativar. Na investigação de um vírus de genoma DNA que não fica latente após a infecção, o encontro de DNA e/ou de mRNA virais em amostra de paciente indica infecção ativa. Já ao se investigar um vírus que fica latente, a interpretação de um resultado positivo não é tão óbvia. Os vírus da Família *Herspesviridae* são bons exemplos de vírus que, após a infecção primária, ficam latentes por toda a vida do hospedeiro e que podem se reativar periodicamente. Ao se reativarem, podem ou não causar doença e, alguns deles, mesmo em estado de latência, podem estar associados a algumas doenças. A diferenciação entre o encontro de mRNA ou DNA do vírus é importante, sendo que é também essencial o conhecimento dos mRNAs produzidos durante a fase de latência e aqueles produzidos durante a replicação viral<sup>14</sup>.

Muitos dos artigos da literatura que examinam a importância da quantificação do mRNA viral para associação a doença têm como foco os vírus da Família *Herspesviridae* que causam doença em seres humanos, devido à gama de órgãos acometidos, diferentes doenças a eles atribuídas e possibilidade de gravidade dos quadros clínicos, principalmente entre os pacientes com comprometimento do sistema imune. A nuclease DNase I tem sido utilizada para eliminar ao máximo o DNA residual após extração de ácidos nucleicos e, assim, o mRNA viral poder ser avaliado<sup>15-18</sup>.

Outro tipo de estudo do mRNA é a investigação de suas estruturas secundárias e terciárias, de suma importância para as suas funções. Como exemplo, citaremos estudos que analisaram a existência de estruturas em haste-alça (do inglês, *stem-loop*) e pseudonós (do inglês, *pseudoknot*) no sítio interno de entrada no ribossomo (IRES, do inglês *internal ribosome entry site*) de giardiavírus, que infecta o protozoário *Giardia lamblia*. Através de pesquisas com esse vírus de genoma dsRNA, já eram conhecidas a sequência nucleotídica completa do genoma, a extensão do segmento que alberga a função de IRES no transcrito viral de senso positivo

e também já se acumulavam indícios da existência de vários elementos estruturais necessários para o início da tradução das proteínas virais<sup>19,20</sup>. O mesmo grupo de pesquisa, em publicações posteriores, sintetizou *in vitro* moléculas de RNA representando a região do IRES a ser analisada e, entre outros ensaios realizados, utilizou RNase T1, RNase A, RNase V1<sup>f</sup> e RNase T2<sup>g</sup> para verificar onde a molécula de mRNA era clivada. Estes testes enzimáticos ajudaram a confirmar a existência de várias estruturas secundárias no IRES do giardiavírus e contribuíram para a compreensão de quais estruturas são importantes na tradução das proteínas do giardiavírus<sup>19,20</sup>.

Metagenômica viral é uma abordagem que permite a análise do conjunto de sequências genômicas associadas a vírus de uma amostra, através da amplificação sequência-independente de segmentos de ácidos nucleicos<sup>21,22</sup>. Seja a amostra a ser analisada biológica ou ambiental, primeiramente excluem-se células do hospedeiro ou de outros organismos que possam estar na amostra, como, por exemplo, bactérias. Como, após essa purificação, além dos vírus ainda restam ácidos nucleicos livres, nucleases têm sido usadas para diminuir a quantidade desses ácidos nucleicos. A ideia que embasa a estratégia de usar nucleases nesta fase é estar o genoma viral, desde que dentro da cápside viral, protegido das nucleases<sup>22-24</sup>.

O uso de DNase I no preparo de amostra a ser submetida a metagenômica viral foi descrito primeiramente por Allander et al<sup>23</sup> em amostras de soro. Durante a avaliação do método com vírus conhecidos, conseguiram detectar, no soro bovino utilizado como diluente, dois parvovírus previamente desconhecidos.

Já Djikeng et al<sup>24</sup>, para análise de sequências virais de uma amostra ambiental, utilizaram DNase I e RNase A após a concentração de partículas virais (e antes da extração de ácidos nucleicos) para eliminar os ácidos nucleicos livres das células degradadas. Após a amplificação randômica do material obtido, descreveram sequências virais com similaridade significativa com aproximadamente 30 famílias de vírus, incluindo sequências de dois potenciais novos vírus.

f. RNase V1 — cliva preferencialmente dsRNA ou regiões estruturadas, sem especificidade de base<sup>9</sup>

g. RNase T2 — cliva ssRNA com preferência para resíduos de adenosina<sup>7,9</sup>

Três sistemas de edição de genoma baseados em nucleases têm sido foco de bastante estudo: sistema CRISPR/Cas (CRISPR, acrônimo da língua inglesa para *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, traduzível por conjunto de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas; e Cas, proveniente de *CRISPR-associated protein*, ou seja, proteína associada ao CRISPR), nucleases dedos de zinco (ZFN, do inglês *zinc-finger nucleases*) e nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALEN, do inglês *transcription activator-like effector nucleases*)<sup>25,26</sup>. Estes sistemas têm sido vistos como extremamente promissores em vários campos, incluindo tratamento de doenças genéticas e câncer, erradicação de doenças endêmicas e tratamento antiviral, pois têm a capacidade de modificar sítios específicos do genoma, dentro das células<sup>26-28</sup>. A mais utilizada dessas ferramentas é o sistema CRISPR/Cas, que, simplificada, é formado por um dsRNA que guia o sistema (já que sua sequência deve ser específica para que se ligue ao DNA a ser clivado), um motivo adjacente (PAM, do inglês *protospacer adjacent motif*) e por enzima nuclease Cas9<sup>h,26,27,29</sup>. Em relação a vírus e doenças virais, o sistema CRISPR/Cas9 tem sido pesquisado para fins de (I) eliminar, de dentro das células do hospedeiro, vírus com genoma DNA (ou que têm um intermediário dsDNA em qualquer estágio de ciclo de vida viral) e que se mantêm persistentes após a infecção primária como o vírus da hepatite B, papilomavírus, herpesvírus, vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e poliomavírus JC; (II) eliminar vírus de genoma RNA que se mantêm persistentes após a infecção primária, como o vírus da hepatite C, desde que foi conseguida a adaptação para que o sistema clivasse RNA; (III) identificar fatores das células do hospedeiro essenciais para a infecção de vírus, seja para vírus que ficam persistentes, como HIV-1, seja para aqueles passíveis de causar epidemia como vírus da dengue, zika, Ebola, influenza e (IV) induzir mutação em insetos para impedi-los de continuar a ser vetores virais<sup>27-29</sup>.

Vale a pena ainda mencionar que várias polimerases que são usadas para sintetizar ácidos nucleicos no laboratório podem ter função nuclease associada.

h. Cas 9 — cliva dsDNA<sup>27,29</sup>

São exemplos de DNA polimerases que têm atividade de exonuclease 3'→5', conhecida como de revisão (do inglês, *proofreading*): DNA Polimerase I, Klenow (fragmento maior da DNA Polimerase I), DNA polimerases termoestáveis de alta fidelidade<sup>1,7</sup>. Já as transcriptases reversas, além da atividade DNA polimerase RNA-/DNA-dependente têm também ação de nuclease RNase H<sup>i,7</sup>.

Os exemplos acima citados são só alguns dos inúmeros existentes na literatura de como diferentes nucleases têm sido úteis no laboratório de biologia molecular, seja na análise de amostras humanas, animais, vegetais ou ambientais.

Dois pontos de vista distintos sobre as nucleases, como vilãs e como aliadas, precisam ser incutidos e discutidos com todos os iniciantes na área de biologia molecular. Tanto a orientação sobre respeitar as técnicas corretas para evitar um falso negativo devido à ação das nucleases indesejáveis, assegurando assim a qualidade dos resultados, quanto o incentivo ao conhecimento mais profundo das nucleases e discussão de possíveis utilizações das mesmas em investigação científica fazem parte da formação dos profissionais de laboratório de biologia molecular.

## REFERÊNCIAS

1. Mishra NC. Nucleases: Molecular biology and applications. Hoboken (NJ): Wiley-Interscience;2002.
2. Farrell Jr. RE. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 4.ed. Boston (MA): Academic Press;2010.
3. Miller JM, Astles R, Baszler T, Chapin K, Carey R, Garcia L et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel. *MMWR Suppl.* 2012;61(1):1-102. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/other/su6101.pdf>
4. Sambrook J, Russell DW, editors. Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press;2001.
5. Whelan S. Viral replication strategies. In: Knipe DM, Howley, PM, editors. *Fields virology*. 6.ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2013. pp. 105-26.

i. RNase H — degrada a molécula de RNA que está em dímero RNA/DNA<sup>7</sup>



6. Pereira HG, Flewett TH, Candeias JAN, Barth OM. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *J Gen Virol*. 1988; 69(Pt 11):2749-54. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-69-11-2749>
7. Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal*. 2008;2(1-2):25-45. <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-008-0026-2>
8. Ludert JE, Hidalgo M, Gil F, Liprandi F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. *Arch Virol*. 1991;117(1-2):97-107.
9. Ehresmann C, Baudin F, Mougél M, Romby P, Ebel J-P, Ehresmann B. Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(22):9109-28. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC306456/>
10. Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Koike K, Nagasaki K. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* Grunow. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(15):5285-93. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00202-11>
11. Alexander M, Heppel LA, Hurwitz J. The purification and properties of micrococcal nuclease. *J Biol Chem*. 1961;236(11):3014-9. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/236/11/3014.long>
12. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970;226(5252):1209-11.
13. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 1970;226(5252):1211-3.
14. Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 6.ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins;2013.
15. Weinberger B, Plentz A, Weinberger KM, Hahn J, Holler E, Jilg W. Quantitation of Epstein-Barr virus mRNA using reverse transcription and real-time PCR. *J Med Virol*. 2004;74(4):612-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.20220>
16. Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-related gene expression in patients with chronic active EBV infection. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 1): 42-50. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.013482-0>
17. Bressollette-Bodin C, Nguyen TV, Illiaquer M, Besse B, Peltier C, Chevallier P et al. Quantification of two viral transcripts by real time PCR to investigate human herpesvirus type 6 active infection. *J Clin Virol*. 2014; 59(2):94-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.11.014>
18. Greijer AE, Ramayanti O, Verkuijlen SA, Novalić Z, Juwana H, Middeldorp JM. Quantitative multi-target RNA profiling in Epstein-Barr virus infected tumor cells. *J Virol Methods*. 2017;241:24-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.007>
19. Garlapati S, Wang CC. Identification of an essential pseudoknot in the putative downstream internal ribosome entry site in giardavirus transcript. *RNA*. 2002;8(5):601-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1370281/>
20. Garlapati S, Wang CC. Structural elements in the 5'-untranslated region of giardavirus transcript essential for internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *Eukaryot Cell*. 2005;4(4):742-54. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.4.4.742-754.2005>
21. Ambrose HE, Clewley JP. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev Med Virol*. 2006;16(6):365-83. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.515>
22. Delwart EL. Viral Metagenomics. *Rev Med Virol*. 2007;17(2):115-31. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.532>
23. Allander T, Emerson SU, Engle RE, Purcell RH, Bukh J. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(20):11609-14. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.211424698>
24. Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, Spiro DJ. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS One*. 2009;4(9):e7264. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007264>
25. Conklin BR. Sculpting genomes with a hammer and chisel. *Nat Methods*. 2013;10(9):839-40. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2608>
26. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397-405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
27. Sophe JA, Lebbink RJ. Antiviral goes viral: harnessing CRISPR/Cas9 to combat viruses in humans. *Trends Microbiol*. 2017;25(10):833-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.005>
28. Saey TH. Gene drivers spread their wings. *Science News*. 2015;188(12):16. Disponível em: <https://www.sciencenews.org/article/gene-drives-spread-their-wings>
29. Chen S, Yu X, Guo D. CRISPR-Cas targeting of host genes as an antiviral strategy. *Viruses*. 2018;10(1):e40. <http://dx.doi.org/10.3390/v10010040>