

Dsup: um gene de tardígrado associado à tolerância à radiação



Vitor Nolasco de Moraes^{1,2}, Danyel Fernandes Contiliani^{1,2,3},
Tiago Campos Pereira^{1,2}

¹Depto de Biologia, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

²Programa de Pós-Graduação em Genética, FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

³Instituto Agronômico, Centro de Cana, Ribeirão Preto, SP

Autor para correspondência - vitor.moraes@usp.br

Palavras-chave: anidrobiose, radiação, radioproteção, proteína Dsup, quebra de DNA

Tardígrados são diminutos animais capazes de façanhas hercúleas, tais como tolerar temperaturas próximas ao zero absoluto, dessecação extrema, vácuo e radiação. Pesquisadores japoneses identificaram um gene exclusivo de tardígrados denominado *Dsup*. A proteína *Dsup* pode interagir com o DNA em algumas situações, além de protegê-lo contra os efeitos nocivos da luz ultravioleta e raios-X. Este artigo descreve o que já se sabe sobre o gene *Dsup* e os mecanismos por meio dos quais a proteína *Dsup* é capaz de promover **radioproteção** quando expressa em diferentes espécies.

Radioproteção - proteção contra radiações.

Tardígrados e poliextremotolerância

Tardígrados (do Latim, *tardi*: lento; *gradus*: passo - aquele que anda lentamente) são pequenos animais invertebrados, cujos tamanhos variam de 0,1 a 1,2 mm, e que habitam diversas partes do globo, incluindo ambientes **limnoterrestres**, marinhos e de água

doce. Seus corpos são segmentados, constituídos por cabeça, tronco e quatro pares de membros (pernas). Eles são comumente conhecidos como “ursos d’água” (Figura 1), e atualmente são descritas aproximadamente 1200 espécies.

Poliextremotolerância - tolerância a diversos tipos de condições extremas, tal como extremos de temperatura, de pressão, radiação e vácuo.

Limnoterrestre - ambientes terrestres úmidos, que estão sujeitos a períodos de seca e de imersão em água.

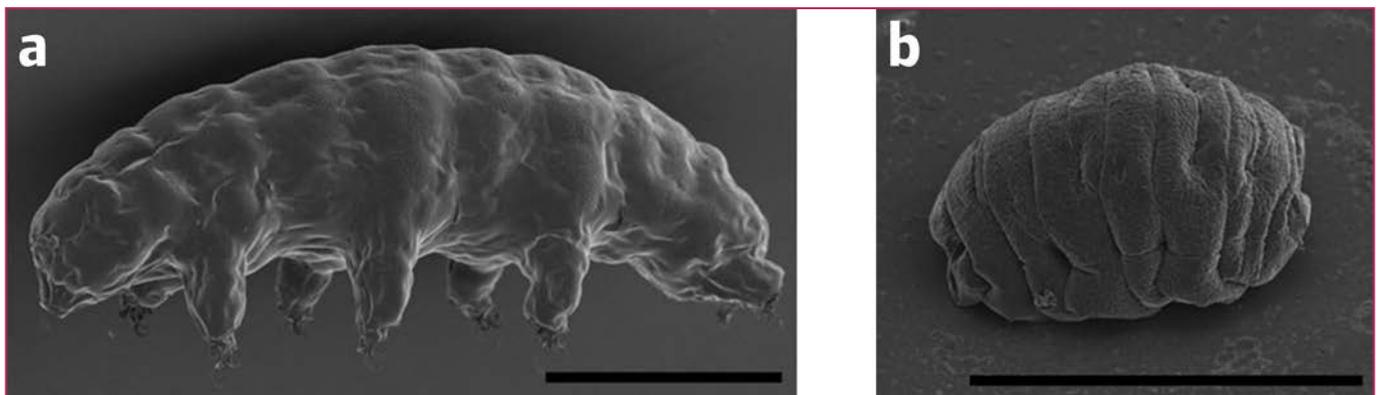


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura do tardígrado *Ramazzottius varieornatus* em seu estado hidratado (a) e em seu estado dessecado (em anidrobiose) (b). Barras de escala: 100 µm. A imagem corresponde à figura 1a e b do artigo Hashimoto, T., Horikawa, D., Saito, Y. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat Commun* 7, 12808, 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms12808>. Artigo do tipo Open Access; reprodução da imagem permitida devido a licença do tipo CC BY-NC-SA 4.0.

Tipicamente, os tardígrados são conhecidos como os “organismos mais resistentes do mundo” pelo fato de serem capazes de tolerar frio e calor extremos, fortes secas, radiação, pressão hidrostática, vácuo e condições do espaço. Entretanto, essa poliextremotolerância ocorre apenas quando eles entram em um estado de animação suspensa, denominado anidrobiose (vide artigo O gene *Tps1* e seu papel na anidrobiose, publicado

nessa revista, (v. 16, n1, 2021). A anidrobiose é um estado especial em que o organismo não apresenta sinais observáveis de metabolismo, e se torna tolerante a diversos tipos de estresses físico-químicos. Entretanto, os tardígrados não são os únicos seres capazes de entrar em anidrobiose. Espécies anidrobiontes são encontradas entre as bactérias, leveduras, nematódeos, crustáceos, mosquitos e plantas.

O efeito da radiação nas células

Na natureza existem diferentes tipos de radiação. As radiações corpusculares são aquelas constituídas por partículas, tais como a radiação alfa (composta por núcleos de Hélio) e a radiação beta (composta por elétrons emitidos a partir do núcleo de átomos instáveis). Por sua vez, as radiações eletromagnéticas são aquelas formadas por ondas, tais como a radiação gama, a ultravioleta (UV) e os raios-X. Em especial, as radiações gama e os raios-X são considerados **ionizantes**, sendo assim capazes de promover quebras nas

cadeias de DNA (Figura 2). Essas quebras podem ser em apenas uma cadeia da dupla-hélice ou em ambas as cadeias. O primeiro tipo de quebra é mais facilmente reparado pela célula, ao passo que o segundo tende a ser mais letal.

Adicionalmente, a energia da radiação X pode converter moléculas de água em espécies reativas de oxigênio (por exemplo, peróxido de hidrogênio e superóxido), que são moléculas que danificam os demais constituintes da célula (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos) (Figura 2). Portanto, a exposição de organismos a elevados níveis de radiação ionizante tende a ser fatal.

Ionizante - capaz de ionizar moléculas. Diz-se de radiações altamente energéticas, capazes de excitar e ejetar elétrons de uma molécula, tornando-a carregada positivamente.

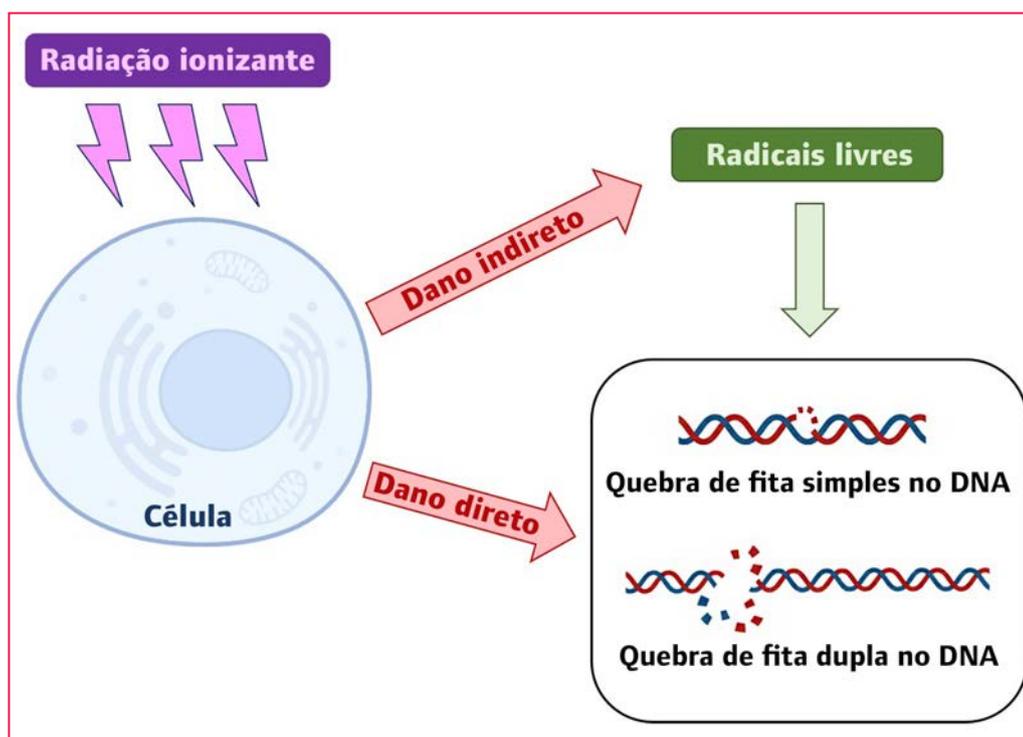


Figura 2. Lesões no DNA por radiação ionizante. Os danos causados no DNA decorrentes da exposição celular a radiações ionizantes podem ocorrer de forma direta (i.e., a radiação promovendo quebras no DNA) e/ou indireta, envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, geram quebras no DNA. Imagem: Moraes, V. N. utilizando elementos disponibilizados em BioRender (célula e moléculas de DNA).

O gene *Dsup*

Durante o processo de sequenciamento do genoma do tardígrado anidrobionte *Ramazzottius varieornatus*, pesquisadores japoneses identificaram um gene codificador de uma proteína exclusiva de tardígrados, denominada de *Dsup* (do inglês, **D**amage **s**uppressor). Até o momento, esse gene ainda não

foi detalhadamente caracterizado, porém sabe-se que a proteína codificada (*Dsup*) possui 445 resíduos de aminoácidos. Portanto, o gene deve possuir no mínimo 1335 pares de bases; naturalmente, o tamanho de fato deve ser maior ao se considerar a provável existência de íntrons (Figura 3). *Dsup* é muito expresso durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário de *R. varieor-*

natus, período marcado por intensa síntese de DNA e múltiplas divisões celulares.

Curiosamente, até o momento não há outras proteínas semelhantes à Dsup nos bancos de dados, de tal forma que ela se apresenta com uma identidade única. Apesar disso, foi observada similaridade de uma pequena região de 8 a 12 aminoácidos entre Dsup e HMGN (proteínas que se ligam a nucleossomos, protegem contra radicais hidroxila e

que são encontradas apenas em vertebrados). Em termos físico-químicos, trata-se de um polipeptídeo muito básico (alcalino), especialmente em sua porção **carboxi-terminal**. Considerando a carga positiva dessa região, os pesquisadores levantaram a hipótese de Dsup se associar ao DNA por meio de **interações eletrostáticas**. De fato, ao testarem experimentalmente essa ideia, eles verificaram que Dsup se liga a ácidos nucleicos *in vitro*, isto é, em um ambiente fora da célula.

Carboxi-terminal - a extremidade da proteína em que se situa o grupo carboxila (-COOH), oposta à extremidade na qual se encontra o grupo amino (-NH₂).

Interação eletrostática - atração ou repulsão entre moléculas eletricamente carregadas.

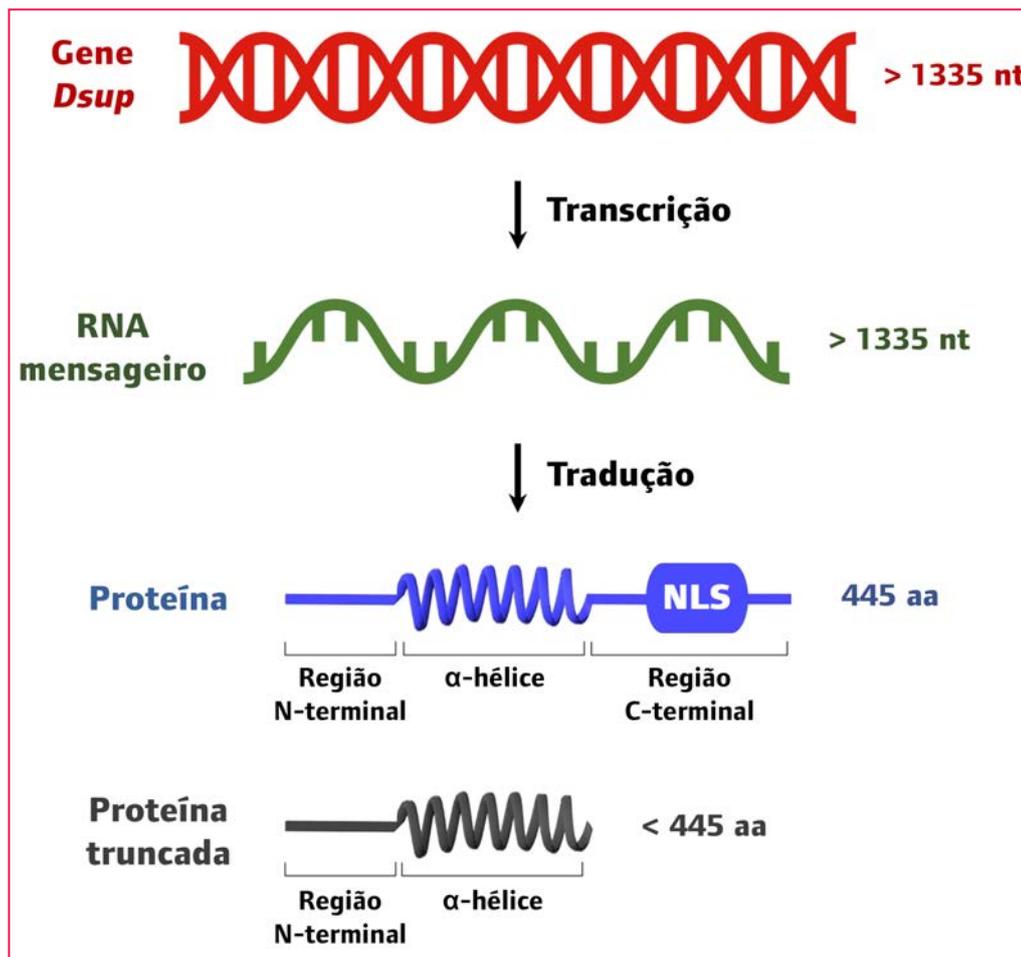


Figura 3. Aspectos moleculares de Dsup. O gene *Dsup* e seu RNA mensageiro são representados com um número mínimo de 1335 nucleotídeos. A proteína Dsup apresenta uma região de α-hélice e um sinal de localização nuclear (NLS, que permite que a proteína sintetizada no citoplasma migre para o núcleo) na região C-terminal. Em contraste, a versão truncada de Dsup é desprovida da porção carboxi-terminal, assim não apresentando o NLS. Imagem baseada em: Hashimoto T, Kunieda T. DNA Protection Protein, a Novel Mechanism of Radiation Tolerance: Lessons from Tardigrades. *Life*. v.7, n.2, p. 26, 2017.

Para verificar se essa interação ocorre dentro da célula, os pesquisadores realizaram a fusão da proteína Dsup a uma proteína fluorescente, permitindo a visualização de ambas dentro da célula com o auxílio de **microscópio de fluorescência**. Assim, eles confirmaram que Dsup se localiza no núcleo celular.

Para verificar se essa interação com o DNA e localização no núcleo de fato eram me-

diadas pela extremidade básica carboxi-terminal de Dsup, os cientistas criaram uma versão artificial da proteína, desprovida da porção carboxi-terminal (Figura 3). Os ensaios demonstraram que esta versão menor é incapaz de se ligar ao DNA e de se localizar no núcleo, evidenciando assim o papel da extremidade carboxi-terminal na atuação da proteína.

Microscópio de fluorescência - instrumento que permite a visualização de estruturas que, quando excitadas por algum tipo de radiação eletromagnética, emitem um tipo de luz específico.

Adicionalmente, por meio de estudos computacionais, um grupo de pesquisa espanhol encontrou evidências de que a proteína Dsup não possui uma estrutura terciária definida, potencialmente podendo se “moldar” para se ligar ao DNA.

Dsup confere radiotolerância em diversos organismos

Considerando a interação de Dsup com o DNA, e que os tardígrados possuem elevada tolerância à radiação, os pesquisadores levantaram a hipótese de que essa proteína seria capaz de proteger o DNA contra os danos promovidos pela radiação ionizante também em outros organismos.

Nesse sentido, eles realizaram a **expressão heteróloga** do gene *Dsup* em células humanas (a partir daqui denominadas “Células-Dsup”), e as expuseram à radiação X. Por meio do **ensaio Cometa**, eles perceberam que células-Dsup apresentaram menores danos no DNA, isto é, menor fragmentação do material genético.

Notoriamente, sabe-se que, por volta de uma hora após a exposição à radiação, histonas posicionadas próximas a sítios de quebra de dupla cadeia de DNA apresentam **fosforilação**. Portanto, histonas fosforiladas representam sinais de dano causado por raios X.

Os pesquisadores observaram que células-Dsup apresentavam menores focos de histonas fosforiladas do que células do grupo controle (i.e., não expressando Dsup).

Em especial, após exposição aos raios X, os cientistas perceberam que as células do grupo controle apresentavam aspecto anormal e não adesão à placa de cultivo (que são características de células mortas), ao passo que algumas das células-Dsup apresentavam morfologia normal e aderência. Por fim, as células-Dsup que se apresentavam normais também tiveram proliferação muito superior (por volta de 100 vezes mais abundantes) do que as células controle após 12 dias de cultivo. Tomados em conjunto, todos esses experimentos evidenciam que Dsup é uma proteína que se liga ao DNA (e aos nucleossomos, possivelmente tal qual as proteínas HGMN), protegendo-o de quebras promovidas por radiação X, resultando em uma maior viabilidade celular quando expostas aos raios X.

Mais recentemente, um grupo de pesquisa italiano verificou que Dsup é capaz de modular genes de reparo em células humanas submetidas à radiação ultravioleta e estresse oxidativo. Ou seja, quando as células-Dsup são expostas a peróxido de hidrogênio, Dsup se liga diretamente ao DNA, protegendo-o, e ativa diversas vias de detoxificação para remover radicais livres (Figura 4). Entretanto, quando exposta à radiação UV, Dsup parece ativar de maneira mais eficaz os mecanismos de reparo do DNA, favorecendo uma recuperação celular mais rápida e a sobrevivência.

Expressão heteróloga - transcrição e tradução de um gene em uma célula (ou organismo) que naturalmente não possui aquele gene.

Ensaio Cometa - teste realizado com células, as quais são submetidas a uma diferença de potencial elétrico. Se o DNA estiver fragmentado devido à radiação, os pedaços de DNA vão se deslocar mais rapidamente para o polo positivo, gerando uma imagem que se assemelha a um cometa. Para mais detalhes, vide o artigo: O uso do ensaio Cometa para o ensino de genética toxicológica, *Genética na Escola*, Volume 2 - n°2, 2007).

Fosforilação - adição de um grupo fosfato $[(PO_4)^{-3}]$ em uma determinada molécula.

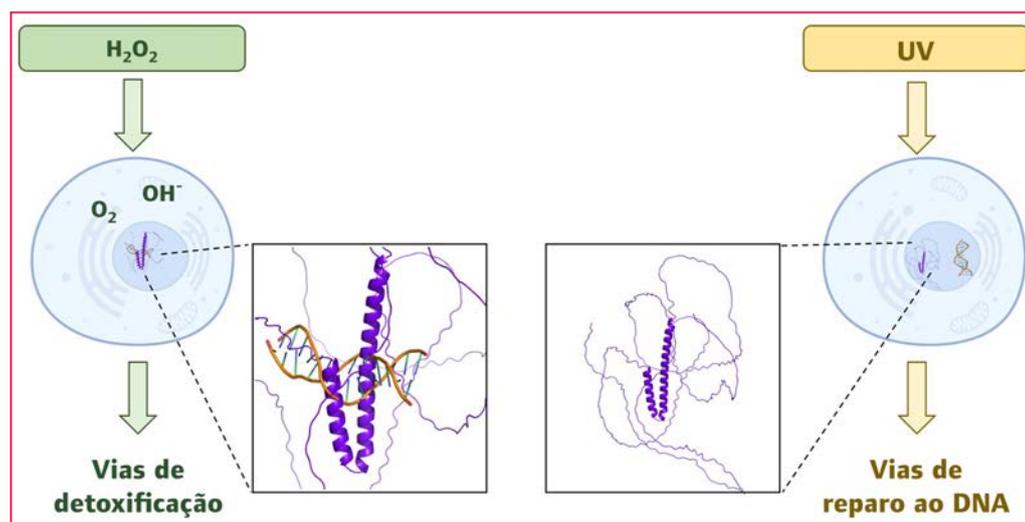


Figura 4. Dsup confere proteção contra estresse oxidativo e radiação UV. À esquerda, vemos que a proteína Dsup pode interagir com DNA para proteção contra radicais livres. À direita, nota-se que Dsup não se liga ao DNA, porém ativa vias de reparo ao dano no DNA. Imagem: Moraes, V. N. utilizando elementos disponibilizados em BioRender (célula), Protein Data Bank (estrutura de DNA – 103D) e AlphaFold Protein Structure Database (protein – PODOW4).

Em 2021, outro grupo de pesquisadores espanhóis expressaram Dsup na bactéria *Escherichia coli*, e demonstraram o seu importante papel na tolerância a radiações ionizante e ultravioleta. Resultados semelhantes foram observados em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) expressando o gene *Dsup*, geradas por um grupo de cientistas nos Estados Unidos. Neste estudo norte-americano, plantas do grupo controle e plantas transgênicas foram semeadas em placas contendo 1 mM de etilmetano sulfonato (EMS, um agente **mutagênico**) e cultivadas por duas semanas. As plantas-controle apresentaram redução no crescimento das raízes e de massa total (massa fresca), ao passo que plantas transgênicas *Dsup* apresentaram fenótipos semelhantes a plantas que não foram expostas a EMS, evidenciando assim o papel protetor de *Dsup* quanto a esse **agente estressor**. Semelhantemente ao observado em células humanas expressando *Dsup*, o ensaio Cometa realizado em células de tabaco expostas a radiação X ou UV mostraram que *Dsup* também protege o DNA em vegetais.

Conclusão

Estudos sobre os genomas de seres que habitam locais extremos (*i.e.*, organismos extre-

mófilos) ou que toleram situações extremas (*i.e.*, organismos extremotolerantes) têm o potencial de identificar genes singulares, associados a essas propriedades fascinantes. A caracterização pormenorizada das proteínas codificadas por esses genes, como *Dsup*, e de seus mecanismos moleculares de ação, nos permitem compreender como é possível haver vida em ambientes considerados “inóspitos”, assim como apresentam um imenso potencial biotecnológico para a agricultura, medicina e indústria.

Para saber mais

HASHIMOTO, T. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature communications*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016.

MÍNGUEZ-TORAL, M. et al. A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-unique *Dsup* protein. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

PUIG, J. et al. DNA Damage Protection for Enhanced Bacterial Survival Under Simulated Low Earth Orbit Environmental Conditions in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, p. 3898, 2021.

KIRKE, J.; JIN, XIAO-LU; ZHANG, XING-HAI. Expression of a tardigrade *Dsup* gene enhances genome protection in plants. *Molecular Biotechnology*, v. 62, n. 11, p. 563-571, 2020.

mM - milimolar, equivalente a 10^{-3} molar.

Mutagênico - capaz de causar mutação nos ácidos nucleicos.

Agente estressor - qualquer elemento físico, químico ou biológico que cause estresse no organismo em estudo.

