



## ESTUDO DA INTERAÇÃO E LOCALIZAÇÃO SUBNUCLEAR DAS PROTEÍNAS FAK E BCLAF1 DURANTE A RESPOSTA AO ESTRESSE GENOTÓXICO EM MIÓCITOS H9c2

**Palavras-Chave:** Cardiotoxicidade, quimioterapia, resposta ao dano no DNA.

RODRIGUES, B. R. I.<sup>1</sup>, MORETTO, I. A.<sup>1</sup>, MACHERINI, G. Q.<sup>1</sup>; DA SILVA, F. J. T. N. P.<sup>1</sup>; THOMAZ, A. A.<sup>2,3</sup>; SANTOS, A. M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>IB-UNICAMP, Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

<sup>2</sup>IFGW-UNICAMP, Instituto de Física de "Gleb Wataghin", Departamento de Eletrônica Quântica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

<sup>3</sup>INFABIC-UNICAMP, Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

### INTRODUÇÃO

A proteína tirosina quinase 2 (FAK/PTK2) é uma proteína da família tirosino-quinases do tipo não-receptor crucial para a regulação de funções celulares distintas [1-5]. Estudos com foco na sinalização ativada por quimioterápicos antineoplásicos em miócitos cardíacos vêm demonstrando a importância da FAK para a sobrevivência e resistência celular frente ao estresse genotóxico [6]. Dados preliminares de experimentos de co-imunoprecipitação (co-IP) demonstraram que FAK interage com proteínas que modulam a resposta ao dano no DNA (DDR), como a BCLAF1.

Durante essa resposta, BCLAF1 promove a transcrição do gene TP53 por meio da interação com PKC $\delta$ , processo que culmina em morte celular por apoptose [7]. Também foi demonstrado que BCLAF1 regula o processamento de mRNAs de proteínas envolvidas no reparo do DNA e apresenta-se localizada em pontos nucleares distintos durante o estresse genotóxico [8]. Este trabalho teve como objetivo validar se o estresse genotóxico promove ativação da FAK e sua interação com a proteína BCLAF1 em miócitos H9c2. Também foi objetivo desse projeto descrever a localização subcelular dessas proteínas após o estresse genotóxico.

### METODOLOGIA

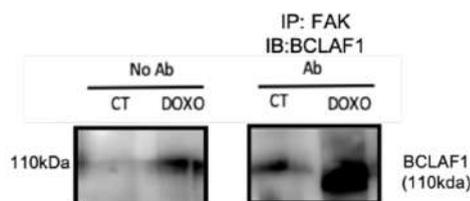
Com a finalidade de validar a interação entre FAK e BCLAF1, experimentos de co-IP e western blotting foram realizados utilizando-se anticorpos específicos para cada uma das proteínas. Para avaliar a ativação de FAK e a distribuição das proteínas BCLAF1 e FAK em condições basais e sob estresse genotóxico, miócitos H9c2 foram separados em grupos controle e tratados com doxo (1 $\mu$ M; 12h), imunomarcados para ambas proteínas e também para  $\gamma$ -H2AX. Posteriormente, foram obtidas imagens por microscopia de super-resolução por iluminação estruturada (SR-SIM), que foram analisadas pelo software ImageJ (Fiji) e scripts em Python.

Foram obtidos os valores de intensidade integrada de fluorescência no núcleo para análise de expressão de BCLAF1 e FAK. Além disso, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os diferentes canais para determinar a taxa de colocalização das proteínas.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1. BCLAF1 interage com FAK em células em condições basais e mais intensamente em células tratadas com doxo

A fim de validar a interação entre FAK e BCLAF1 em células H9c2 (cardiomioblastos ventriculares) foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação utilizando-se miócitos controle e submetidos ao estresse genotóxico. Na figura 1 observa-se a banda correspondente à BCLAF1 no imunoprecipitado de FAK tanto no controle quanto no grupo doxo. Notou-se também que o estresse genotóxico, promovido pela exposição à doxorubicina, aumentou a associação de FAK com a proteína BCLAF1 em miócitos H9c2.

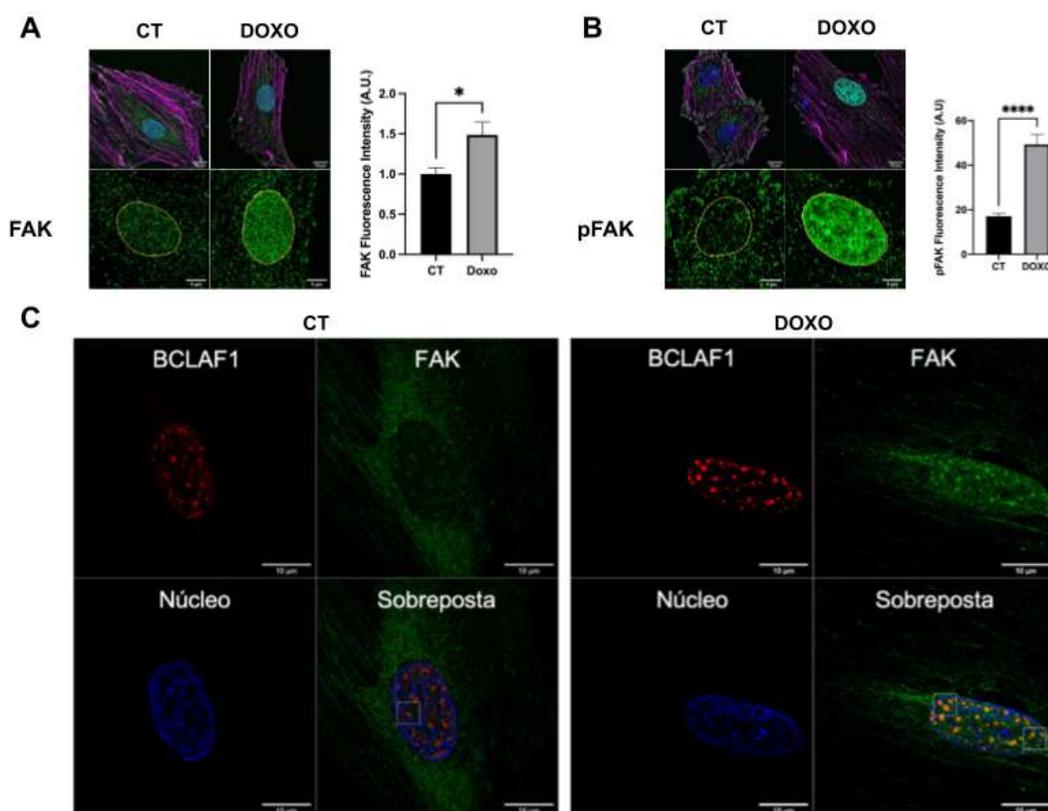


**Figura 1.** FAK interage com BCLAF1 em extratos de células controle e tratadas com doxorubicina. Experimentos de Co-IP seguidos por *western blotting* confirmaram a interação entre FAK e BCLAF1. Extratos totais obtidos de células controle e tratadas com doxorubicina (doxo) foram incubados apenas com a resina, na ausência do anticorpo anti-FAK, como controle experimental (No ab). N=2 grupos experimentais.

## 2. FAK e BCLAF1 co-localizam no núcleo de miócitos H9c2 e o estresse genotóxico modula essa co-localização

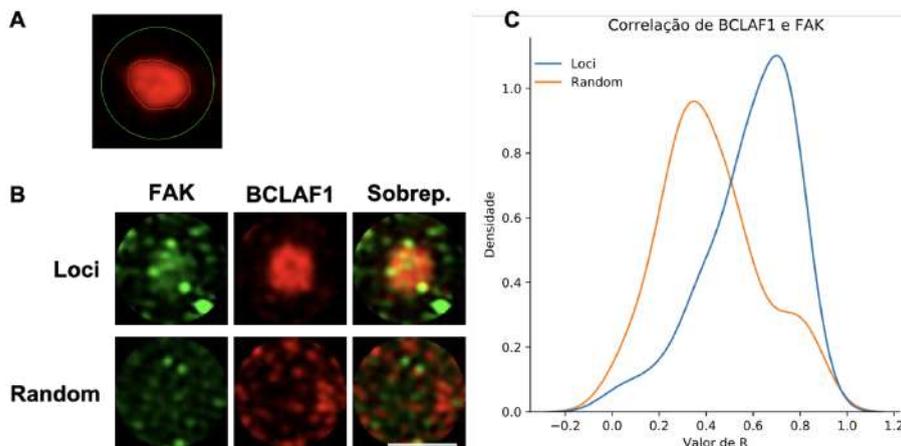
Dada a importância de BCLAF1 no reparo ao dano no DNA e sua intensa interação com FAK, foi verificado se há colocação dessas duas proteínas no compartimento nuclear e se o estresse genotóxico causado pelo tratamento com o doxo modula essa distribuição. As células H9c2 foram divididas em grupos controle e tratadas com doxo (1 $\mu$ M), por 12h.

Os dados obtidos de experimentos de microscopia SR-SIM revelaram que em miócitos H9c2 em condições basais, ambas as proteínas encontram-se homogêneas e amplamente distribuídas pelo núcleo. Com o estresse genotóxico, ocorreu um aumento da concentração de FAK e também de sua ativação/fosforilação no núcleo (Fig.2A-B). Também foi observado que o estresse genotóxico promoveu uma redistribuição de FAK e de BCLAF1. Esta proteína passou a agrupar-se em pontos (*clusters*) distribuídos ao longo do núcleo, nos quais observou-se também um acúmulo de FAK (Fig.2C).



**Figura 2.** A-B. Tratamento com doxo altera a redistribuição e ativação nuclear de FAK. Imagens representativas de microscopia SR-SIM compostas pelos planos nos quais notou-se a presença de DNA, pela marcação com DAPI, excluindo-se os planos dos Esseeextremos inferior e superior do núcleo. A região nuclear foi delimitada para quantificação da intensidade de fluorescência da proteína FAK e de sua versão fosforilada (pFAK). Abaixo, regiões nucleares ampliadas. Ao lado, gráficos em barras demonstrando a quantificação de FAK e pFAK nuclear em células controle (CT) e tratadas com doxo. Verde: FAK; Magenta: Filamentos de actina (Faloidina); Azul: Núcleo (DAPI). C. Tratamento com doxo promove associação de FAK com BCLAF1. Imagens de microscopia SR SIM obtidas de células controle e tratadas com doxo. Nas imagens representativas, FAK está marcada em verde (canal 488nm), o DNA em azul (canal 405nm) e a BCLAF1 em vermelho (647nm).

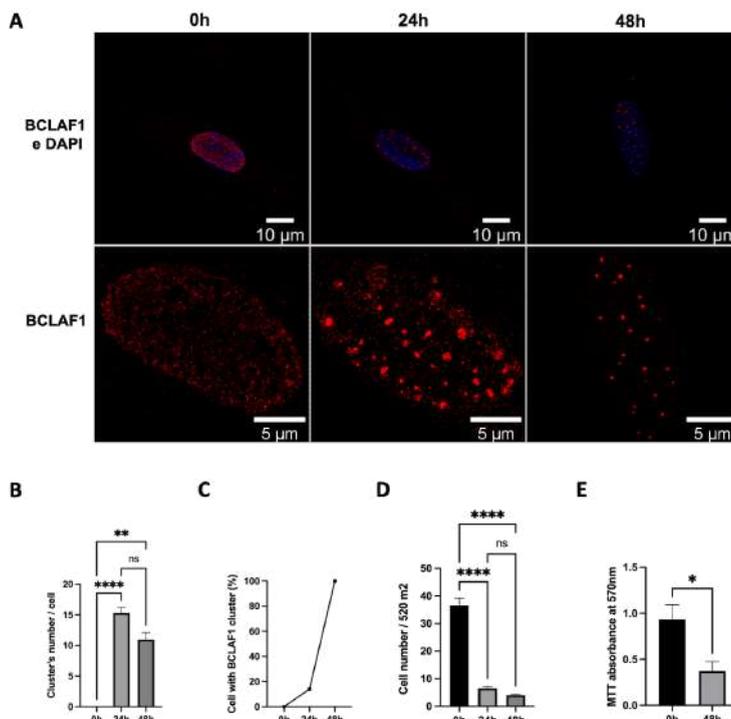
Para quantificar a colocalização de FAK nos *clusters* nucleares de BCLAF1 foi calculado o Coeficiente de Correlação de Pearson (R) pixel a pixel entre os canais da FAK e da BCLAF1. Os dados obtidos demonstraram uma maior taxa de colocalização dessas proteínas nas regiões dos *clusters* de BCLAF1 em relação às áreas randômicas (Fig. 3).



**Figura 3.** Clusters de BCLAF1 sequestram FAK durante estresse genotóxico. **A-B.** Áreas de *clusters* de BCLAF1 foram selecionadas utilizando-se o programa ImageJ (Fiji). Foram coletadas 72 áreas de *clusters* de BCLAF1 e 72 áreas randômicas. Escala: 1 $\mu$ m. **C.** Histograma dos coeficientes de correlação pixel a pixel entre BCLAF1 e FAK nos *clusters* de BCLAF1 e áreas randômicas (Correlação de Pearson).

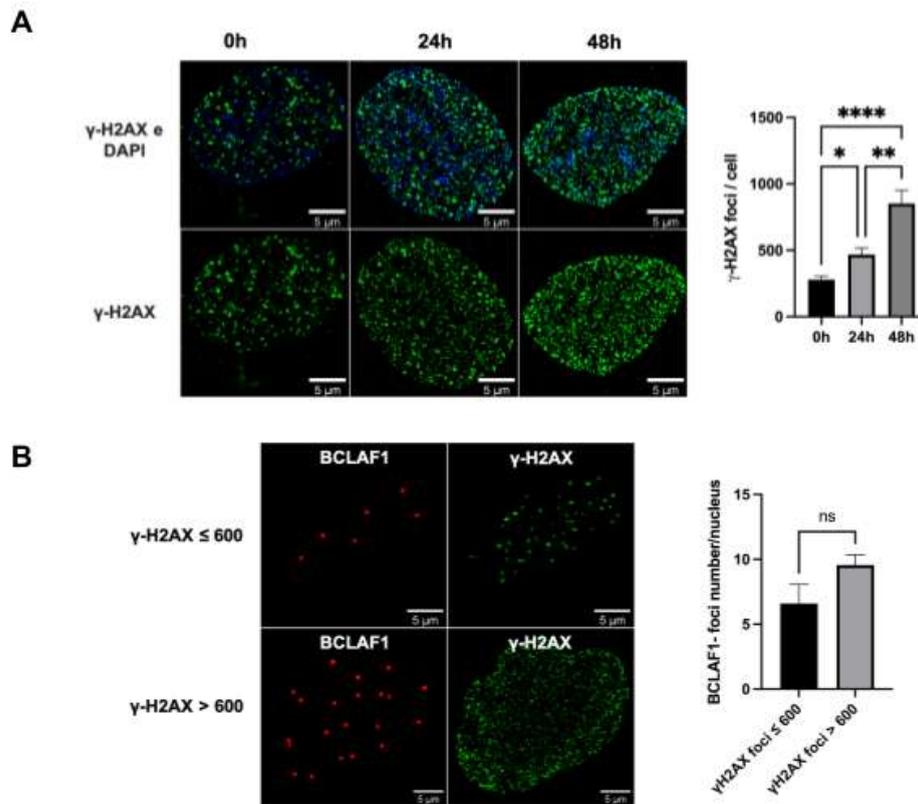
### 3. *Clusters* de BCLAF1 estão presentes em células com danos extensos no DNA

Para analisar a relação entre a extensão de danos no DNA e formação dos *clusters* de BCLAF1, foi realizado um experimento em células expostas à doxorrubicina (1 $\mu$ M) por 3h, e posteriormente, essas células foram mantidas em cultura por 0h, 24h e 48h após exposição à doxo. Os dados de SR-SIM demonstraram que BCLAF1 se distribui de forma difusa e homogênea pelo núcleo após 3h de exposição à doxo e que após 24h e 48h do período de exposição à doxo, ocorre a formação dos *clusters* (fig. 4A e B). Após 48h, 100% das células apresentaram os *clusters* (fig 4C) e, além disso, houve uma intensa morte celular nesse período (fig 4D e E).



**Figura 4.** A formação de focos de BCLAF1 ocorre após estresse genotóxico. **A.** Imagens de SR-SIM demonstram que após 3h de exposição à doxo (0h) não há formação de *clusters* de BCLAF1, apenas a distribuição difusa dessa proteína pelo núcleo. Após 24h da exposição, nota-se a formação dos focos dessa proteína. Com o decorrer de 48h, é possível observar BCLAF1 concentrada apenas nos focos, sem a distribuição difusa encontrada em células controle ou com zero horas após a exposição a doxo. **B.** O gráfico demonstra a quantidade de *clusters* de BCLAF1 nas células tratadas com doxo (3h; 1 $\mu$ M) logo após o tratamento (0h) e com 24 e 48h após a exposição. **C.** O gráfico demonstra a porcentagem de células com *clusters* de BCLAF1 nos três tempos estudados. **D-E.** Gráficos em barras demonstram a densidade celular em imagens de 520  $\mu$ m<sup>2</sup> de área e a redução da absorção em experimento de MTT.

O mesmo tratamento de 3h foi realizado a fim de analisar a extensão de danos no DNA pela marcação de  $\gamma$ -H2AX (verde). Esse experimento revelou um aumento significativo da quantidade dos sítios de  $\gamma$ -H2AX até 48h após o período de exposição à doxo (figura 5A). Foi observado também uma tendência ao aumento no número de *clusters* de BCLAF1 em células com maior presença de sítios de  $\gamma$ -H2AX, como observado na figura 5B. Esses dados indicam que há um aumento no número de *clusters* de BCLAF1 em células com danos extensos no DNA.

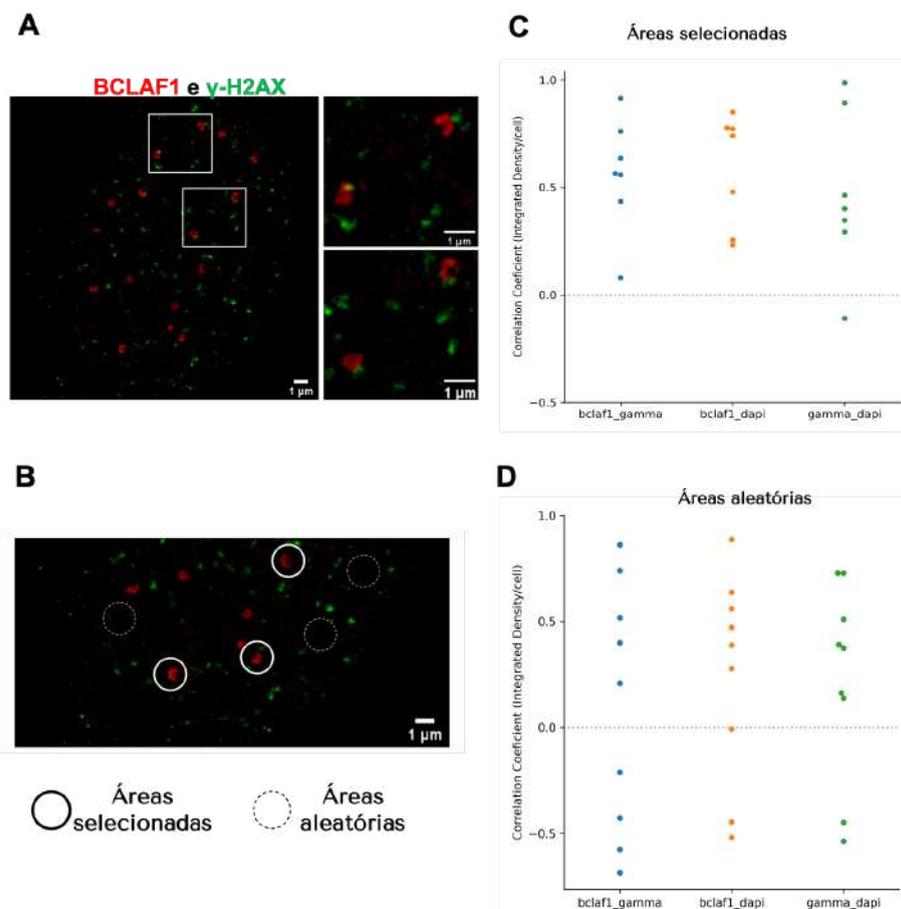


**Figura 5.** A formação de *clusters* de BCLAF1 é aumentada em células com danos extensos no DNA. **A.** A formação de sítios de  $\gamma$ -H2AX aumenta ao longo do tempo após período de exposição à doxo. Imagens demonstram núcleos de miócitos H9c2 após 0h, 24h e 48h de exposição à doxo (3h; 1 $\mu$ M). Os sítios de  $\gamma$ -H2AX estão marcados em verde (canal 488nm). Observa-se sítios mais difusos e em menor quantidade em 0h após o tratamento e o aumentando no número desses sítios após 24h e 48h do período de exposição. Ao lado, gráfico demonstra a quantificação dos focus de  $\gamma$ -H2AX ao longo dos diferentes tempos após a exposição à doxo. **B.** *Clusters* de BCLAF1 são mais numerosos em células com maior número de focus de  $\gamma$ -H2AX. Imagens demonstram núcleos de células após 48h de incubação com doxo (1 $\mu$ M; 3h). Os *clusters* de BCLAF1 (vermelho) e  $\gamma$ -H2AX (verde) estão evidenciados. Ao lado, gráfico demonstra uma tendência ao aumento no número de *clusters* de BCLAF1 com o aumento do número de sítios de  $\gamma$ -H2AX.

#### 4. Os *clusters* de BCLAF1 apresentam uma interface de associação com $\gamma$ -H2AX loci

Em seguida, foi avaliada a distribuição dos *clusters* de BCLAF1 em relação aos sítios de  $\gamma$ -H2AX, marcador da presença de dano no DNA. Em miócitos tratados com doxorubicina por 12 horas e imunomarcados para BCLAF1 e  $\gamma$ -H2AX, foi possível notar a presença dos *clusters* nas proximidades dos sítios de  $\gamma$ -H2AX, com uma interface de interação com essas regiões (fig. 6A).

Os dados quantitativos mostram uma correlação positiva da intensidade integrada de fluorescência dos *clusters* de BCLAF1 em relação aos esses sítios de  $\gamma$ -H2AX, em comparação às regiões randômicas (fig. 6C-D).



**Figura 6.**  $\gamma$ -H2AX e BCLAF1 apresentam uma interface de interação durante o estresse genotóxico. **A.** Imagens de super-resolução demonstram  $\gamma$ -H2AX (verde) e BCLAF1 (vermelho), evidenciando a relação espacial destas proteínas após o estresse genotóxico. **B.** Para a análise desta correlação pixel a pixel da localização de  $\gamma$ -H2AX em relação aos sítios de BCLAF1, foram selecionadas áreas de *clusters* BCLAF1 (círculo contínuo) e áreas aleatórias (círculos pontilhados) no núcleo dos miócitos. Em seguida, foi avaliada a correlação entre os canais de BCLAF1 e  $\gamma$ -H2AX por um script escrito em Python. **C.** Gráfico demonstra correlação entre BCLAF1 e  $\gamma$ -H2AX em áreas com *clusters* (Correlação de Pearson). **D.** O gráfico demonstra a correlação dos canais em áreas selecionadas aleatoriamente.

## CONCLUSÃO

O estresse genotóxico induz um aumento da localização nuclear de FAK, da sua ativação e também interação com a proteína BCLAF1. Durante a resposta ao dano no DNA ocorre um aumento da clusterização de BCLAF1 em pontos distribuídos ao longo do núcleo e FAK encontra-se sequestrada nestas regiões. A presença dos *clusters* de BCLAF1, os quais apresentam uma interface de interação com os sítios de  $\gamma$ -H2AX, está relacionada com a extensão dos danos no DNA, uma vez que há um aumento no número de células com *clusters* quando há maior número de sítios de  $\gamma$ -H2AX.

Estes achados permitiram a formulação de um modelo no qual BCLAF1 sequestra FAK, inibindo a interação dessa quinase com a proteína p53 e com a ubiquitina-ligase MDM2, mecanismo que resulta na ubiquitinação e degradação de p53. Dessa forma, em miócitos com danos extensos no DNA, ocorre o acúmulo de p53 e o desencadeamento da morte celular por apoptose, processo que pode contribuir para os efeitos nocivos dos quimioterápicos sobre as células do coração.

## BIBLIOGRAFIA

- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
- Hall, J.E., Fu, W., and Schaller, M.D. (2011). Focal adhesion kinase: exploring Fak structure to gain insight into function. *Int Rev Cell Mol Biol* 288, 185-225.
- Hytönen, V.P., and Wehrle-Haller, B. (2016). Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Exp Cell Res* 343, 35-41.
- Tomakidi, P., Schulz, S., Proksch, S., Weber, W., and Steinberg, T. (2014). Focal adhesion kinase (FAK) perspectives in mechanobiology: implications for cell behaviour. *Cell Tissue Res* 357, 515-526.
- Bell, S., and Terentjev, E.M. (2017). Focal Adhesion Kinase: The Reversible Molecular Mechanosensor. *Biophys J* 112, 2439-2450.
- Lim, S.T., Chen, X.L., Lim, Y., Hanson, D.A., Vo, T.T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S.J., Schlaepfer, D.D., and Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 29, 9-22.
- Liu, H., Lu, Z.G., Miki, Y., and Yoshida, K. (2007). Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 27, 8480-8491.
- Vohhodina, J., Barros, E.M., Savage, A.L., Liberante, F.G., Manti, L., Bankhead, P., Cosgrove, N., Madden, A.F., Harkin, D.P., and Savage, K.I. (2017). The RNA processing factors THRAP3 and BCLAF1 promote the DNA damage response through selective mRNA splicing and nuclear export. *Nucleic Acids Res* 45, 12816-12833.