



Estudo da interação da quinase de adesão focal e PARP1 em resposta ao dano ao DNA em cardiomiócitos submetidos a estresse genotóxico

Palavras-Chave: [FAK], [PARP1], [SIM]

Autores:

Sofia Giaccone Thomaz [Instituto de Física “Gleb Wataghin”]

Isabela Aparecida Moretto [Instituto de Biologia]

Prof.^a Dr.^a Aline Mara dos Santos (co-orientadora) [Instituto de Biologia]

Prof. Dr. André Alexandre de Thomaz (orientador) [Instituto de Física “Gleb Wataghin”]

INTRODUÇÃO:

Doença cardiovasculares e o câncer são as principais causas de morte nos países industrializados e podem tornar-se sinérgicas devido a complicações cardiovasculares resultantes das terapias antineoplásicas. Os fármacos antineoplásicos baseiam-se na produção de quebras no material genético da célula (efeito genotóxico). Essas quebras desencadeiam a ativação da resposta ao dano no DNA (DDR) com a atuação de proteínas sensoras, transdutoras, mediadoras e efetoras. Caso os danos não sejam reparados, a DDR ativará a morte celular, evento desejado para as células cancerígenas. O antineoplásico doxorrubicina (doxo) apresenta toxicidade cardíaca devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio.

Estudos têm indicado que a quinase de adesão focal (FAK) pode ser um modulador da DDR em cardiomiócitos frente ao estresse genotóxico. No entanto, não há dados que demonstram a atuação direta de FAK na regulação de proteínas essenciais para a DDR. Com o intuito de identificar novos interatores dessa quinase foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação do domínio FERM da FAK em células HEK 293T com a posterior identificação dos ligantes por espectrometria de massas. Entre os interatores, encontrou-se a PARP1, que apresenta função conhecida na resposta ao dano no DNA. Dessa forma, nesse trabalho, foi investigada a interação da FAK com PARP1 em miócitos H9C2 em condições basais e após a indução de estresse genotóxico pelo tratamento com doxo.

OBJETIVO:

Foi investigado se FAK interage com PARP1 em miócitos H9C2 em condições basais e se o estresse genotóxico modula essa interação. A fim de facilitar a análise, foi dividido o objetivo geral nos objetivos específicos listados abaixo:

1. Avaliar se ocorre co-localização da FAK com PARP1 em miócitos H9C2 em condições basais, por meio de microscopia SIM.
2. Avaliar a interação entre FAK e PARP1 em miócitos H9C2 em condições basais por experimentos de imunoprecipitação.
3. Avaliar se o estresse genotóxico pelo tratamento com doxorubicina modula a co-localização da FAK com PARP1 em miócitos H9C2, por meio de microscopia SIM.
4. Avaliar se o estresse genotóxico pelo tratamento com doxorubicina modula a interação entre FAK e PARP1 em miócitos H9C2 por experimentos de imunoprecipitação.

MÉTODOLOGIA:

Após o cultivo dos miócitos H9C2, o grupo positivo foi tratado com doxo (1 μ M;12h). Ambos os grupos foram marcados com os respectivos anticorpos para FAK, pFAK (fosforilada Y397) e PARP1. As imagens foram obtidas com Structured Illumination Microscopy (SIM) e analisadas utilizando *ImageJ* e *scrpits* em Python. Foram realizados experimentos de Imunoprecipitação (IP) e *Western Blotting* (WB) para análise de interação entre as proteínas, junto com estudos de co-localização por microscopia de super-resolução.

Além disso, a fim de quantificar os dados obtidos com a microscopia SIM, foi realizada a análise da intensidade de fluorescência de FAK total, FAK fosforilada (pFAK) e PARP1 encontradas no núcleo. Essa análise foi realizada utilizando o ImageJ para identificar os planos que compõem o núcleo (pela presença do DNA marcado com DAPI), realizando neles um *z-project* (com a soma dos *stacks*). Com a ajuda do filtro de *threshold* foi selecionada a região do núcleo. Nesse sítio, houve a coleta dos dados na célula (fluorescência média, densidade integrada e *raw* densidade integrada) e da área do núcleo. Além de coletar dados de 3 *backgrounds* diferentes. Dessa forma, pode-se calcular o CTCF (*corrected total cellfluorescence*) para cada proteína, utilizando a fórmula:

$$CTCF = \text{densidade integrada} - (\text{área selecionada} \times \text{fluorescência média do background})$$

Com o valor de CTCF da proteína em cada célula, houve o cálculo da média desses valores em células controle e tratadas com doxo e do erro padrão da média. Foi utilizado a distribuição t de *Student* para o cálculo do valor-p.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As imagens de SIM permitiram observar a co-localização entre FAK e PARP1 no núcleo de miócitos H9C2 controles e tratados com doxo na região próxima ao DNA. Nesse último caso, pode-se perceber um aumento da co-localização dessas proteínas. O mesmo comportamento foi observado entre pFAK e PARP1, com uma maior colocalização no núcleo para células tratadas com doxo. O relatório pode ser verificado nas imagens abaixo.

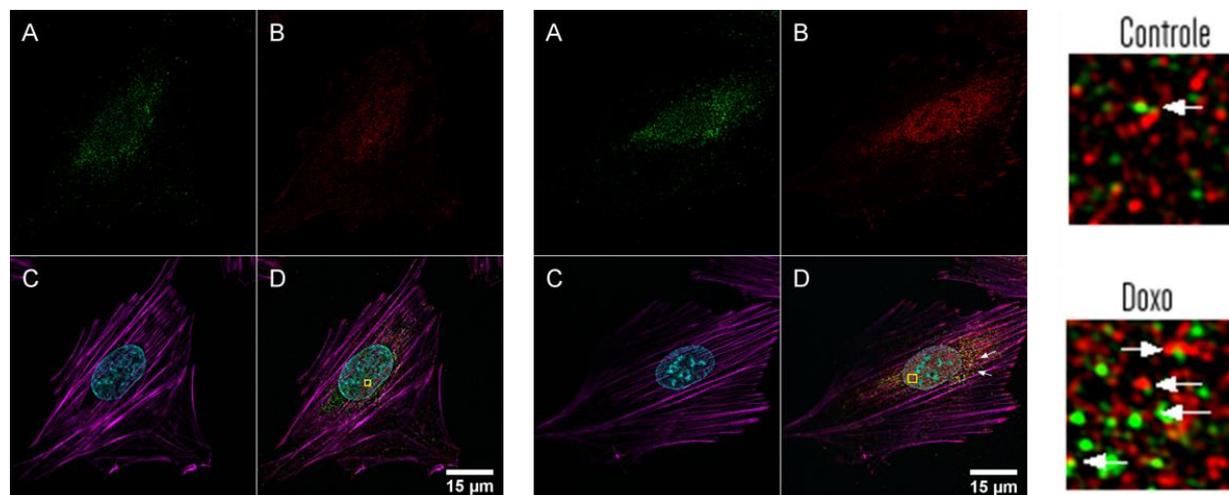


Figura 1. Tratamento com doxo promove a associação de FAK com PARP1. A primeira imagem representa uma célula controle e a segunda, uma célula tratada com doxo. As imagens foram compostas a partir dos planos que compõem o núcleo (onde se nota a presença do DNA marcado com DAPI), excluindo os demais planos. Nas imagens, o DNA está marcado em ciano (canal 405nm), a PARP1 em verde (488nm), a FAK em vermelho (546nm) e o citoesqueleto de actina em magenta (647nm). As setas indicam a possível região do centrossomo. Os quadrados delimitados em amarelo correspondem à região retradas nas imagens ampliadas com as setas indicando as regiões de sobreposição de PARP1 e FAK.

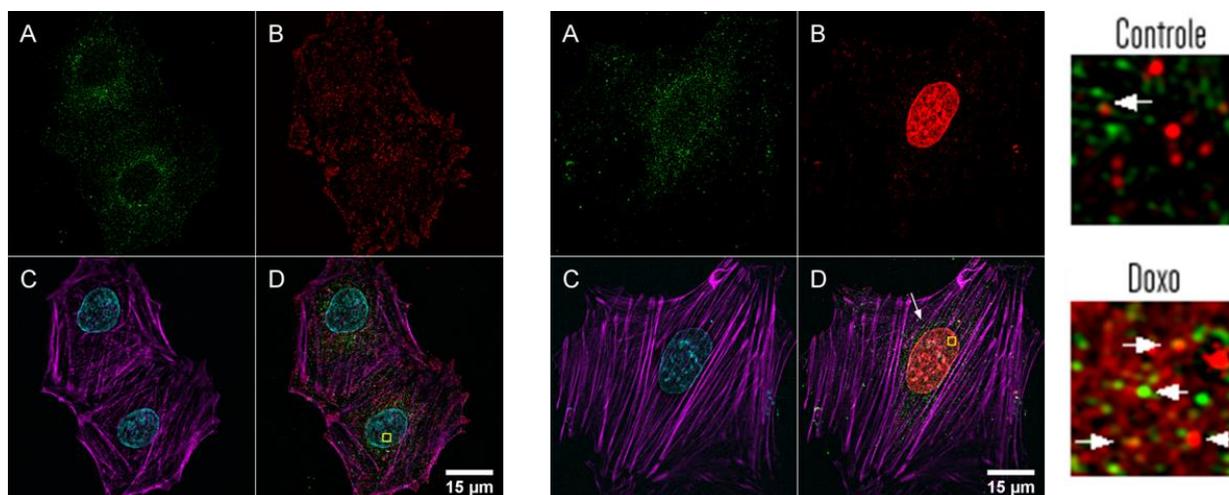


Figura 2. Associação de pFAK com PARP1 após tratamento com doxo. Imagens de microscopia SIM obtidas de miócito controle (primeira imagem) e tratado com doxo (segunda). As imagens foram compostas por planos que compõem o núcleo (presença do DNA marcado com DAPI), excluindo os outros planos. Nas imagens, o DNA está marcado em ciano (canal 405nm), a PARP1 em verde (488nm), a pFAK em vermelho (546nm) e o citoesqueleto de actina em magenta (647nm). A seta indica a possível região do centrossomo. Os quadrados delimitados em amarelo correspondem à região retradas nas imagens ampliadas com as setas indicando as regiões de sobreposição de PARP1 e pFAK.

Dados da intensidade de fluorescência de cada proteína foram obtidos como descrito na metodologia. Com isso, percebeu-se um aumento da concentração de pFAK e PARP1 no núcleo de miócitos tratados com doxo em relação a células controles, com uma leve alteração de sua

redistribuição nuclear. Os resultados descritos podem ser observados nos gráficos abaixo que relacionam as intensidades médias de fluorescência nos casos controles e após o tratamento com doxo.

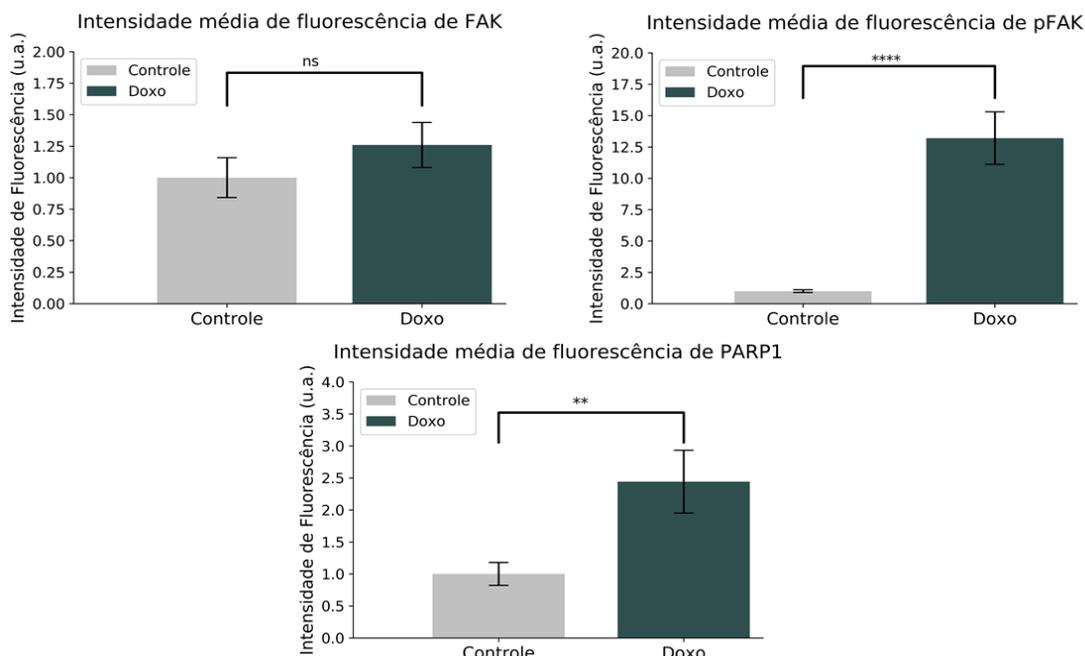


Figura 3. Gráficos das intensidades médias de fluorescência de FAK, pFAK e PARP1 presentes no núcleo, normalizadas pela intensidade média do caso controle. De forma que (ns) significa que o valor-p foi superior ao nível de significância (0.05), (**) representa que o valor encontrado foi menor que esse nível estipulado. E (****) mostra que o valor-p é menor que 0.001. Os dados são descritos com a média \pm erro padrão da média.

Houve também a realização de experimentos de imunoprecipitação (IP) seguidos de western blotting (WB) em miócitos H9C2 tratados com doxo e controle para a FAK total e FAK fosforilada (pFAK). Foi verificado que não há variação da expressão (FAK) ou da fosforilação total dessa quinase (pFAK) nas células tratadas com doxo. Além disso, foi realizado um IP para FAK seguido de WB para PARP1, mostrando que PARP1 interage com FAK tanto nos casos controles quanto nos casos tratados com doxo.

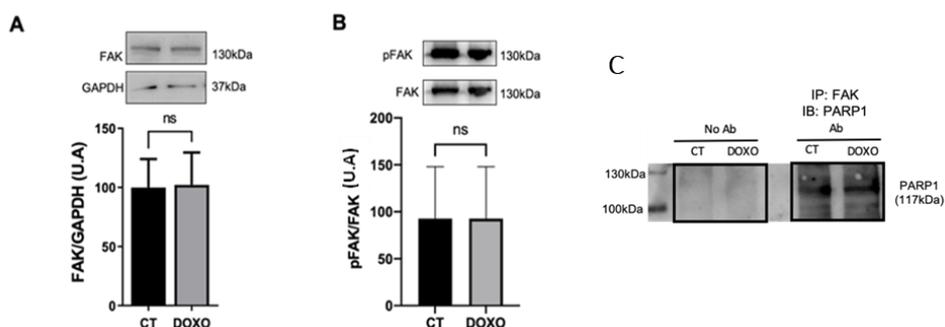


Figura 4. Imagens obtidas através de western blottings e gráfico em barras correspondente à quantificação de cada proteína normalizada por GAPDH em células controle (CT) e tratadas com doxorubicina (DOXO). **A.** Há a expressão de FAK total **B.** Apresenta a quantificação da fosforilação de FAK no resíduo tirosina 397. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média e valor-p menor que 0.05 foram considerados estatisticamente significantes. (ns) representa que os dados não são estatisticamente significantes. **C.** Experimentos de IP seguidos por western blotting. Extratos totais obtidos de células controle e tratadas com doxo foram incubados apenas com a resina, na ausência do anticorpo anti-FAK, como controle experimental (No ab), confirmando a interação entre FAK e PARP1.

CONCLUSÕES:

Levando em consideração os dados obtidos foi possível concluir que não há um aumento de expressão de FAK após o tratamento com doxo com uma indicação de uma possível redistribuição pelo núcleo. A pFAK apresenta um comportamento contrário: os dados de WB mostram que não há aumento de fosforilação total, entretanto, pelos dados das imagens pode-se perceber uma forte redistribuição de pFAK para o núcleo após o tratamento com doxo.

Foi possível também concluir que há interação entre as proteínas FAK e PARP1 em miócitos H9C2 tanto em células controles quanto em células sob estresse genotóxico provocado pelo tratamento com doxorubicina. Experimentos de IP e imagens de fluorescência indicam que essas duas proteínas interagem e participam da resposta ao dano no DNA. Principalmente pelo aumento de concentração de PARP1 e pFAK no núcleo em células tratadas com doxo.

BIBLIOGRAFIA

- B. Tavora, L. Reynolds, B. S. F. Demircioglu, I. Fernandez, T. Lechertier, D. Lees, P. Wong, A. Alexopoulou, G. Elia e e. al, **“Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy.”** *Nature*, vol. 514, 2014.
- D. Cappetta, A. De Angelis, L. Sapio, L. Prezioso, M. Illiano, F. Quaini, F. Rossi, L. Berrino, S. Naviglio e K. Urbanek, **“Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity,”** *Oxid Med Cell Longev*, 2017.
- Hammond, Luke. **“Measuring cell fluorescence using ImageJ”**. Disponível em: <<https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>>. Acesso em: 21 de fev. de 2021.
- K. Tang, J. Constanzo, N. Venkateswaran, M. Melegari, M. Ilcheva, J. Morales, F. Skoulidis, J. Heymach, D. Boothman e P. Scaglioni, **“Focal Adhesion Kinase Regulates the DNA Damage Response and Its Inhibition Radiosensitizes Mutant KRAS Lung Cancer,”** *Clin Cancer Res*, vol. 22, 2016.
- M. Podhorecka, A. Skladanowski e P. Bozko, **“H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy,”** *J Nucleic Acids*, 2010.
- S. Armenian, C. Lacchetti, B. A. J. Carver, L. Constine, N. Denduluri, S. Dent, P. Douglas, J. Durand, M. Ewer e e. al., **“Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline,”** *J Clin Oncol*, vol. 35, 2017.
- Z. Cheng, L. DiMichele, M. Rojas, C. Vaziri, C. Mack e J. Taylor, **“Focal adhesion kinase antagonizes doxorubicin cardiotoxicity via p21(Cip1).,”** *J Mol Cell Cardiol*, vol. 67, 2014.