



## **Novas funções nucleares da proteína tirosina quinase 2 (PTK2) em miócitos cardíacos submetidos ao estresse genotóxico: a interação com a helicase DDX5**

**Palavras-chaves: PTK2; DDX5; estresse genotóxico; interação proteica.**

Ana Paula Samogim<sup>1</sup>, Antônio Dosualdo Neto<sup>1</sup>, Isabela Aparecida Moretto<sup>1</sup>, Gabriel Macherini Quaglia<sup>1</sup>, André Alexandre de Thomaz<sup>2,3</sup>, Aline Mara dos Santos<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 (PTK2) é uma proteína da família tirosino-quinases do tipo não-receptor fundamental para a regulação de funções celulares distintas, como migração e proliferação celular. No citoplasma, tem papel crucial na sinalização mediada por integrinas e receptores de fatores de crescimento. Já no núcleo, interage com fatores de transcrição e regula processos como sobrevivência, diferenciação e crescimento hipertrófico. Estudos recentes vêm demonstrando a importância da PTK2 para a sobrevivência celular frente ao estresse genotóxico em miócitos cardíacos tratados com quimioterápicos antineoplásicos. No entanto, os mecanismos moleculares regulados por PTK2 durante esse estresse são pouco compreendidos. Com o intuito de identificar novos parceiros de interação de PTK2, experimentos de co-imunoprecipitação foram realizados e revelaram que PTK2 interage com a helicase DDX5 em células HEK293T. Esta proteína, da família das RNA-helicases, está intimamente relacionada com o controle da transcrição e processamento do pré-mRNA. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos validar a interação entre PTK2 e DDX5 em miócitos cardíacos H9c2 controle e submetidas ao estresse genotóxico pelo tratamento com doxorrubicina (dox), além de verificar a distribuição subcelular de PTK2 e DDX5 por microscopia de super-resolução do tipo iluminação estruturada (SR-SIM).

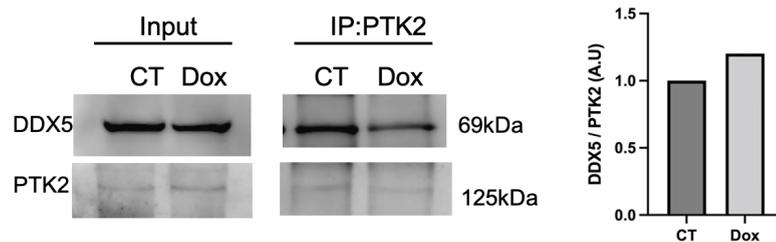
### **Métodos**

Para as análises de distribuição de DDX5 e PTK2, foi realizado o cultivo de células H9c2, da linhagem de células de cardiomioblastos ventriculares, que foram subdivididas em grupo controle e grupo submetido a estresse genotóxico por tratamento com doxorrubicina (1 $\mu$ M; 12h). Os ensaios de

imunofluorescência foram realizados através de imunomarcações com anticorpos específicos para DDX5 e PTK2, além de marcações do núcleo e actina. As imagens de imunofluorescência foram adquiridas pelo microscópio Zeiss Elyra disponível no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia (INFABIC). Os sinais de fluorescência foram excitados e coletados pela objetiva alpha Plan-Apochromat 63x/1,46 Oil DIC M27 Elyra. As análises das imagens foram feitas através do programa ImageJ (Fiji) e scripts desenvolvido em Python. Além disso, foram realizados ensaios de *Western Blotting* para verificação da expressão de DDX5 e ensaios de Co-imunoprecipitação (Co-IP) para validação da interação de DDX5 e PTK2 a partir de extratos totais de células do grupo controle e do grupo submetido ao estresse genotóxico pela exposição à dox.

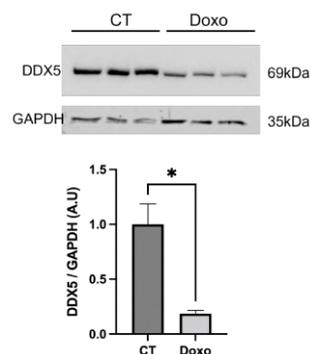
## Resultados e Discussão

Resultados obtidos de experimentos de Co-IP validaram a interação, previamente identificada, entre PTK2 e DDX5 em miócitos H9c2 controle e expostos à dox (Fig. 1). Também foi observado que houve uma tendência ao aumento na interação entre essas duas proteínas durante o estresse genotóxico, no entanto, novos experimentos serão realizados para confirmar este dado.



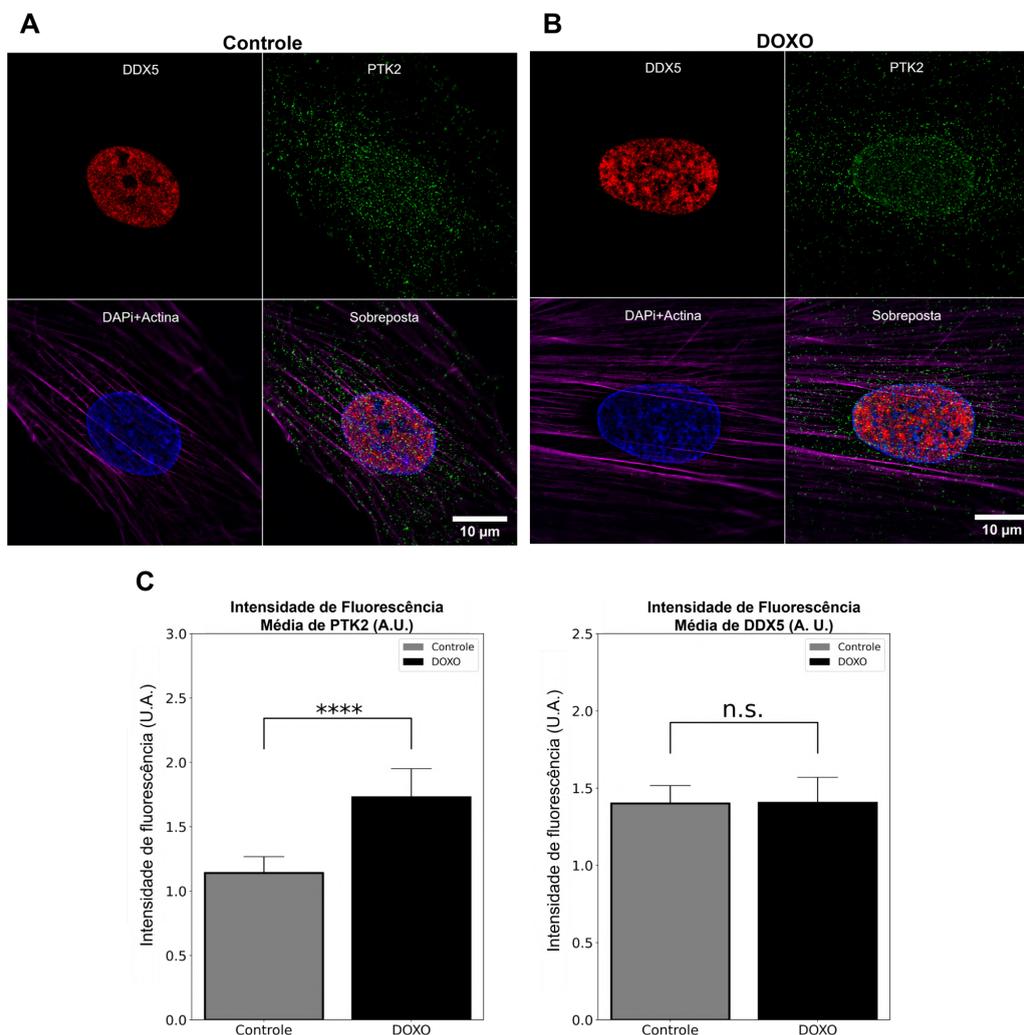
**Figura 1.** Experimentos de Co-IP seguidos por Western Blotting demonstraram interação entre PTK2 (FAK) e DDX5 em extratos totais de células controle (CT) e tratadas com doxorubicina (Doxo).

Com o intuito de verificar a expressão de DDX5 em células H9c2 controle e submetidas a estresse genotóxico, ensaios de *Western Blotting* foram realizados demonstrando que a expressão da helicase diminuiu estatisticamente em células tratadas com doxorubicina em relação às células do grupo controle (Fig. 2).



**Figura 2.** Diminuição na expressão de DDX5 em células tratadas com doxo. Imagens representativas obtidas por Western Blotting e gráfico em barras correspondentes a quantificação da expressão de FAK normalizada por GAPDH em extratos totais de células controle (CT) e tratadas com doxorubicina (Doxo). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Valores de  $p < 0,005$  foram considerados significativos.

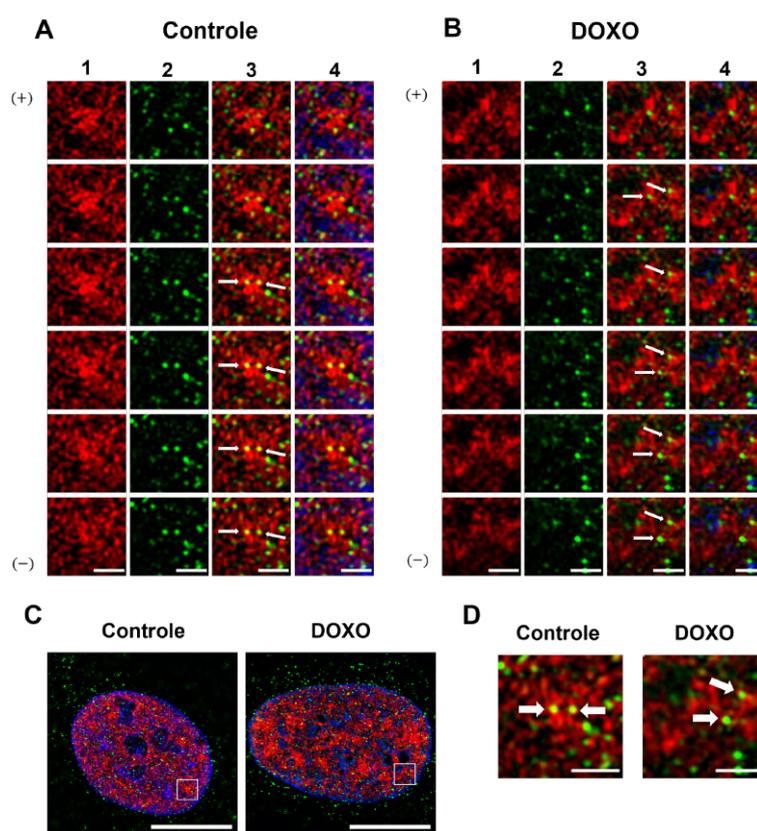
Análises de microscopia de super resolução de células H9c2 controle demonstraram que PTK2 e DDX5 apresentam uma distribuição homogênea no núcleo, sendo que DDX5 está excluída das regiões de nucléolo (Fig. 3A). Ainda, PTK2 está distribuída por todo citoplasma e também nas adesões focais da célula. No grupo de células tratadas com doxo (Fig. 3B), DDX5 se apresenta distribuída de forma heterogênea, acumulando-se em pontos distribuídos ao longo do núcleo, regiões essas com menos densidade de DNA. Também foi observado um aumento da localização de PTK2 no núcleo após o tratamento com dox.



**Figura 3.** Imagens de microscopia SR-SIM obtidas de células controle (A) e tratadas com doxorubicina (B). As imagens foram compostas pelos planos nos quais notou-se a presença de DNA, pela marcação com DAPI, excluindo-se os planos dos extremos inferior e superior do núcleo. Nas imagens representativas, PTK2 (FAK) está marcada em verde (canal 488nm), o DNA em azul (canal 405nm), o citoesqueleto de actina está marcado em magenta (canal 647nm) e a helicase DDX5 está marcada em vermelho (546nm). C. Gráficos de intensidade de

fluorescência média de PTK2 e DDX5 em núcleos de células do grupo controle e do grupo de células tratadas com doxorubicina. De forma que “n.s.” demonstra que o valor-p foi superior ao nível de significância 0.05 ( $p > 0.05$ ). Os dados são descritos com a média  $\pm$  erro padrão da média.

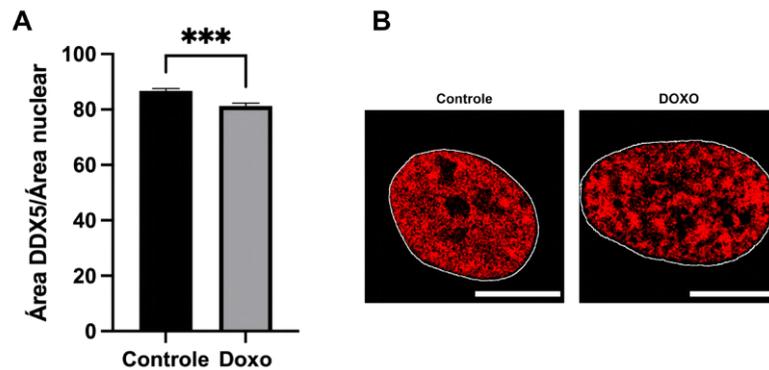
A fim de analisar a distribuição de PTK2 e DDX5 foram realizadas imagens ampliadas de *Z-stack* a partir de secções retangulares (em branco) de uma célula controle e uma célula tratada com dox (Fig. 4C). Assim, observa-se uma distribuição difusa da PTK2 no núcleo das células controle e submetidas a estresse genotóxico. Diferentemente, a helicase DDX5 se distribui de maneira mais distinta nas células tratadas com doxo, demonstrando certo acúmulo em sítios específicos (Fig. 4B). Essas regiões com aglomerados de DDX5 estão dispostas em regiões menos densas de DNA. Além disso, as proteínas, PTK2 e DDX5 apresentam pontos de co-localização nas células dos dois grupos, indicados pelas setas brancas (Fig. 4D).



**Figura 4.** A-B. *Z-stack* (stacks 11-16) de célula controle e tratada com dox, respectivamente. Na primeira coluna (1) observa-se a distribuição de DDX5 (canal 546nm), na segunda coluna (2) observa-se a marcação de PTK2 (canal 488nm), na terceira coluna (3) há uma sobreposição dos dois canais DDX5 e PTK2 e, na quarta coluna (4), temos a sobreposição dos canais de PTK2, DDX5 e DNA (canal 405nm). C. Imagens ampliadas do núcleo da célula do grupo controle e do grupo tratada com dox. D. Imagem ampliada dos penúltimos stacks das células controle e tratadas com dox. Barra de escala em A,B e D = 1 $\mu$ M. Barra de escala em C = 10 $\mu$ M (-) região basal da célula; (+) região apical da célula.

Ademais, verificou-se as porcentagens que a área da helicase DDX5 ocupa nos núcleos das células controle e submetidas a estresse genotóxico. Essas análises demonstraram que DDX5 está distribuída amplamente, ocupando uma maior área em células controle. Por outro lado, em células

tratadas com doxo, a porcentagem da área nuclear ocupada pela helicase é menor, demonstrando o acúmulo de DDX5 em certas regiões subnucleares nas células submetidas a estresse genotóxico.



**Figura 5.** Porcentagem de DDX5 no núcleo de células controle e tratadas com doxorubicina. **A.** Gráfico da área de DDX5 sobre a área nuclear das células controle e tratadas com doxo. **B.** Imagens de microscopia SR-SIM obtidas de uma célula controle e uma célula tratada com doxo com marcação de DDX5 em vermelho (canal 647 nm). A região delimitada em branco foi necessária para a quantificação das porcentagens da área de DDX5 sobre a área nuclear. Barra de escala: 10µm.

Os dados de expressão e distribuição de DDX5 indicam que pode haver uma agregação e aumento da degradação dessa helicase durante o estresse genotóxico.

## Conclusão

Em conclusão, verificou-se que PTK2 e DDX5 apresentaram uma distribuição homogênea pelo núcleo de miócitos em condições basais. No entanto, o tratamento com doxo resultou em acúmulo de DDX5 em regiões subnucleares específicas, as quais podem estar relacionadas ao reparo do DNA ou ao processamento de mRNAs sintetizados durante a resposta ao estresse genotóxico. Por outro lado, a agregação observada, juntamente com a redução da expressão de DDX5 em células tratadas com doxo, pode estar relacionada com a degradação da helicase após o estresse oxidativo, secundário ao tratamento com o quimioterápico doxorubicina. Esse processo pode impactar na atuação de PTK2 e de DDX5 durante o estresse genotóxico acentuado, contribuindo para os efeitos deletérios desta quimioterapia sobre as células do coração.