

ANÁLISE DO PAPEL DA MIOSINA Va NO TRANSPORTE DA TIROSINA KINASE II EM MIÓCITOS H9c2 SOB ESTRESSE GENOTÓXICO

Palavras-Chave: FAK, MIOSINA Va, SIM

Autores/as:

Milena Maria Souza de Andrade; Camila Soares Aguiar; Isabela Aparecida Moretto [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Aline Mara dos Santos (Co-orientadora); Prof. Dr. André Alexandre de Thomaz
(orientador) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

As complicações cardiovasculares decorrentes de terapias antineoplásicas tornaram-se um grande problema de saúde pública, visto que a taxa de sobrevivência após o diagnóstico de câncer vem aumentando nos últimos anos. A cardiotoxicidade resultante da quimioterapia com doxorubicina (doxo) é uma condição grave e pode evoluir para cardiomiopatia crônica e óbito. Estudos com foco na sinalização ativada por terapias antineoplásicas mostram a importância da quinase de adesão focal (FAK) para a sobrevivência celular e resistência ao tratamento com doxo, porém, essa sinalização é pouco compreendida. Resultados anteriores mostram que a FAK interage fisicamente com a miosina Va e essas proteínas estão co-localizadas em adesões focais e no núcleo de células em condições basais. Esses dados sugerem que as miosinas V podem ser importantes para a distribuição subcelular da FAK e, mais especificamente, para sua localização no núcleo e nas adesões focais. Neste trabalho nosso objetivo foi verificar se o silenciamento da Miosina Va afetaria a localização da FAK no núcleo, mais especificamente nos sítios de danos ao DNA (DDR) após tratamento com doxo em cardiomiócitos H9c2. Imagens de microscopia de iluminação estruturada de super resolução (SR-SIM) mostraram um aumento na concentração de FAK no núcleo após o tratamento com doxo em células silenciadas para miosina Va. Também notamos que FAK e miosina Va são encontradas próximas a aglomerados, conhecidos como clusters, perto de locais de dano ao DNA em algumas células tratadas com doxo, e que o silenciamento de miosina Va não interrompeu o acúmulo de FAK nesses locais. Nossos dados indicam que a Miosina Va está ligada à remoção de FAK de diferentes compartimentos subcelulares e o núcleo.

Tirosina Quinase 2

A tirosina quinase 2 (PTK2), também conhecida como quinase de adesão focal (FAK), é uma tirosina quinase do tipo não receptor crucial para a regulação de funções celulares distintas, como sobrevivência, migração e proliferação celular [1-6]. Estruturalmente, a FAK é composta por um domínio N-terminal (FERM), um linker de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, um domínio catalítico central e uma porção C-terminal, que contém um domínio conhecido como focal-adhesion targeting (FAT) (**Figura 1**) [7, 8].

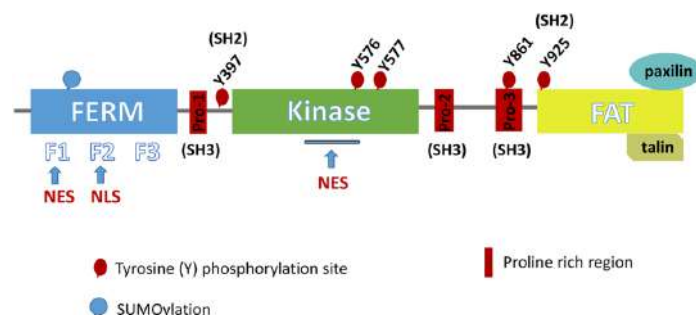


Figura 1. Esquema da disposição dos domínios da PTK2 (FAK). Os resíduos tirosina envolvidos na sua ativação e sinalização estão indicados. NES e NLS presentes nos domínios FERM e kinase e os sítios de ligação à paxilina e talina, estão representados. Modificado de Zhou, J et al., 2019 [9].

Miosina Va

As miosinas são mecano-enzimas que convertem energia química em força mecânica por meio da hidrólise de ATP, processo que ocorre ao longo dos filamentos de actina [10, 11], sendo a miosina Va atuante como um motor molecular intracelular. A miosina Va apresenta 3 domínios em sua estrutura: a cabeça, o pescoço e a cauda (**Figura 2**). A cabeça está situada na região N-terminal, e a cauda está situada na região C-terminal, sendo subdividida em 3 subdomínios: proximal, medial e globular [11, 12].

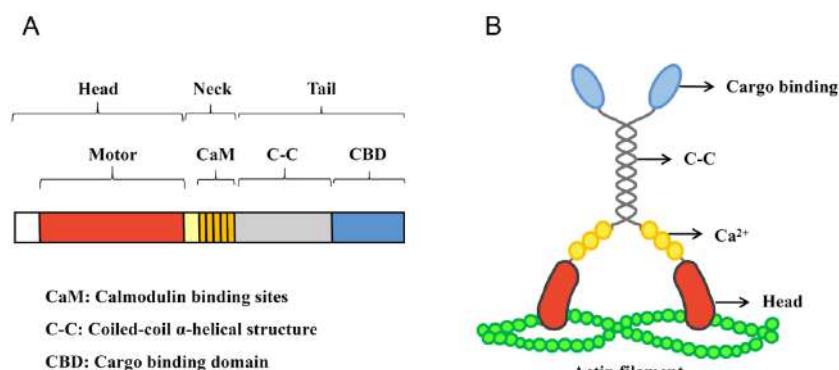


Figura 2. Esquema da disposição dos domínios da miosina Va. Os domínios estão indicados e representados por diferentes cores [13].

METODOLOGIA:

A cultura de célula utilizada nesta pesquisa foi subdividida em quatro grupos: $siRNA^-$ (controle e doxo), células não silenciadas para miosina Va, e $siRNA^+$ (controle e doxo), células silenciadas para miosina Va, onde foi realizado no grupo doxo o tratamento com a doxorubicina (doxo) por 12h. Para a preparação da amostra foi realizada uma imunofluorescência contra $\gamma H2AX$ (cinza), miosina Va (vermelho) e FAK (verde). A aquisição, reconstrução e alinhamento das imagens foram realizadas com microscopia de alta resolução (SIM) no microscópio Zeiss Elyra PS1 com o software Zeiss ZEN 2012 PS1 (black edition, version 8.1.5.484) instalado no INFABIC (Unicamp). Por fim para análise de imagem foi utilizado o software ImageJ, onde para melhor visualização e análise do comportamento e interação da FAK e da Myo Va, foi realizado um Z-Stack, que consiste em somar todos os planos das imagens. E para a elaboração dos gráficos aqui presentes utilizamos o software Python, na qual foram utilizadas medidas feitas no ImageJ da intensidade de fluorescência, onde tiramos uma média e calculamos seu erro padrão, também foi realizado um teste estatístico 'shapiro wilk' (onde valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significantes), a fim de averiguar a normalidade da distribuição. A partir desse teste foi possível chegar ao valor-p, que para distribuições normais é definido pelo teste-t e para as não normais pelo teste Mann Whitney.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Dados de microscopia de super-resolução por iluminação estruturada – SIM (Structured Illumination Microscopy), demonstraram que a FAK e a miosina Va têm uma distribuição nuclear e citoplasmática em miócitos H9c2 em condições basais.

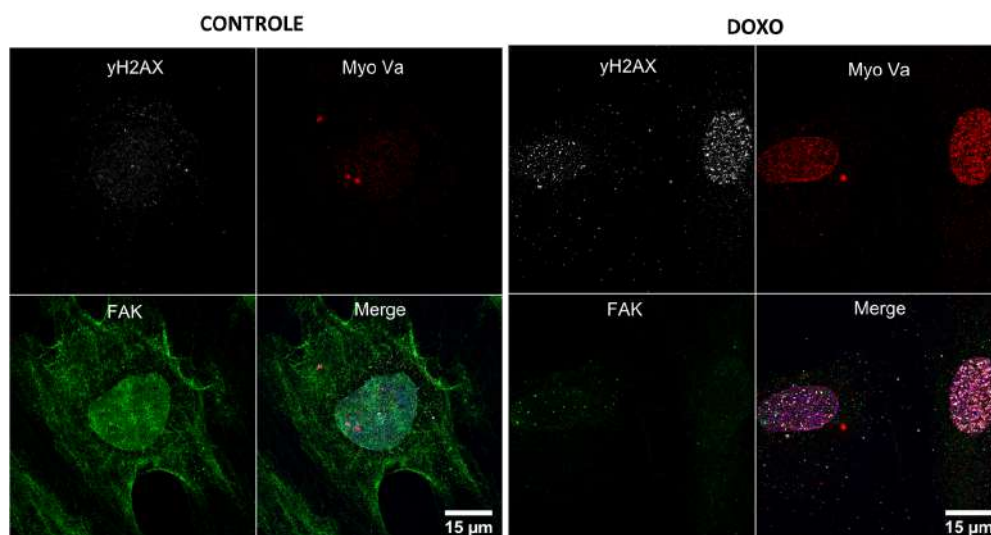


Figura 3. Imagens representativas de microscopia SIM, na qual cardiomiócitos controle (CT) e tratados com doxo foram fixados e processados para imunofluorescência utilizando-se anticorpos contra γ H2AX (cinza), miosina Va (vermelho) e FAK (verde). Sobreposição dos sinais de fluorescência γ H2AX (cinza), miosina Va (vermelho), FAK (verde) e DAPI (azul).

Pode-se ver que na imagem (**Figura 3**) da célula controle há baixa intensidade da Myo Va em comparação ao grupo tratado com doxo ocorrendo o contrário com FAK, apresentando uma maior intensidade no grupo controle. Além disso, é clara a presença dos sítios de dano no DNA no grupo tratado com doxo pelo alto número de focos de γ H2AX. Na **Figura 4** observa-se um zoom da região nuclear das células da **Figura 3** e a medida da intensidade média de fluorescência e número médio de focos de γ H2AX para cada grupo experimental. É possível notar que o número médio de focos γ H2AX está na faixa de 400 focos por núcleo, e que a intensidade de fluorescência da miosina tem um aumento de quase 60% e a intensidade de FAK diminui por volta de 40% em células tratadas com doxo.

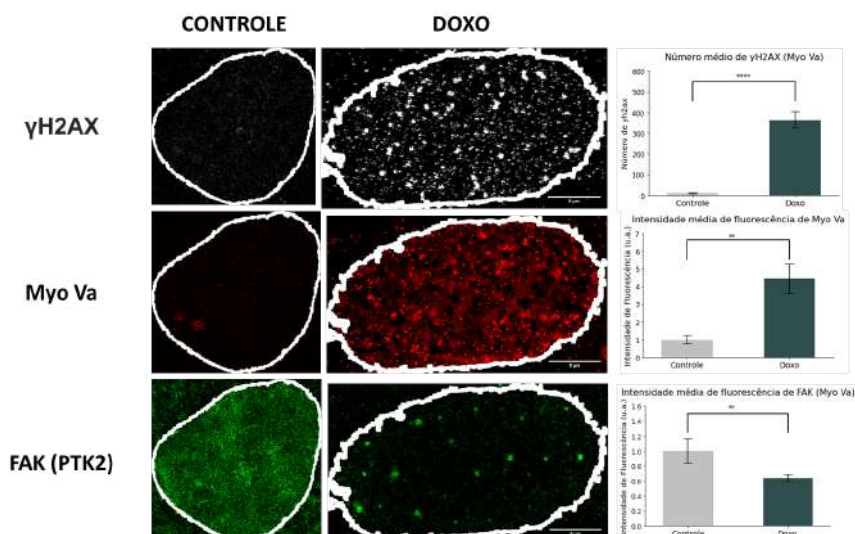


Figura 4. As imagens à esquerda contêm zoom do núcleo de cardiomiócitos controle e tratados com doxo; os gráficos em barras demonstram o número médio de γ H2AX, e a intensidade média de fluorescência da miosina Va e da FAK respectivamente, no núcleo de cardiomiócitos controle e tratados com doxo, N = 25 células controle e 31 células doxo.

Analogamente, encontra-se em cardiomiócitos silenciados para a miosina Va (Knockdown) uma distribuição nuclear e citoplasmática de FAK e da Myo Va. Destaca-se que com o silenciamento da miosina é perceptível (**Figura 5**) um aumento da intensidade de FAK no núcleo e uma redução da intensidade de miosina Va em células tratadas com doxo.

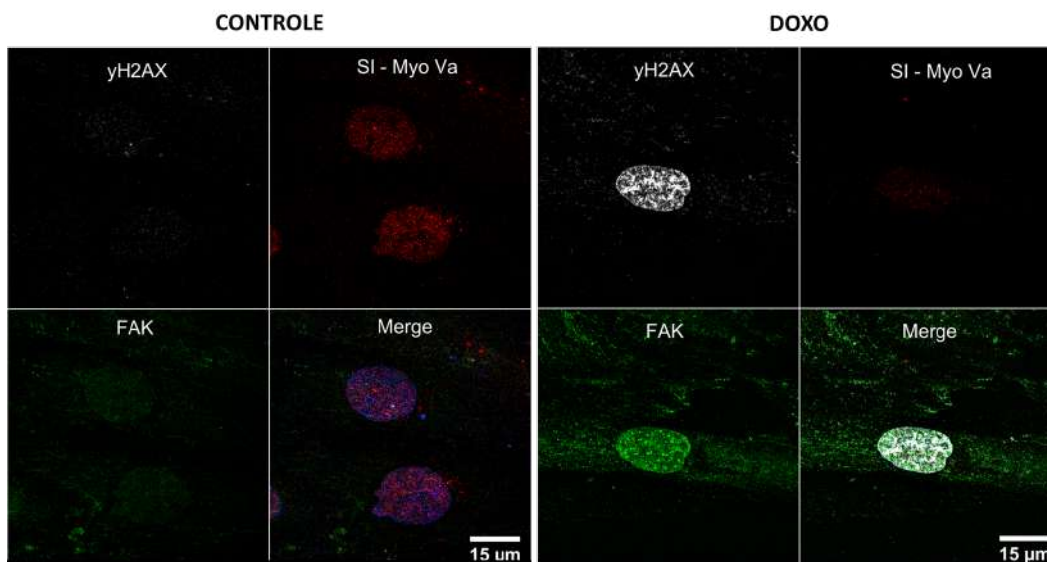


Figura 5. Imagens representativas de microscopia SIM, na qual cardiomiócitos silenciados para miosina Va, controle (CT) e doxo, foram fixados e processados para imunofluorescência utilizando-se anticorpos contra γ H2AX (cinza), miosina Va (vermelho) e FAK (verde). Sobreposição dos sinais de fluorescência γ H2AX (cinza), miosina Va (vermelho), FAK (verde) e DAPI (azul).

Em uma análise quantitativa (**Figura 6**), a partir do zoom do núcleo e dos gráficos, o número médio de focos de γ H2AX se mantém constante após o tratamento com doxo, tanto para as células não silenciadas, quanto para as silenciadas para miosina Va. Também há uma diminuição de quase 20% na intensidade da Myo Va em células silenciadas tratadas com a doxo, e um aumento na intensidade de fluorescência, de aproximadamente 50%, da FAK nuclear nas células silenciadas para Myo Va e tratadas com doxo em relação às controle. Essa mudança na distribuição de FAK, leva-se a acreditar que a Myo Va está ligada à retirada de FAK do núcleo (ou à sua manutenção no citoplasma).

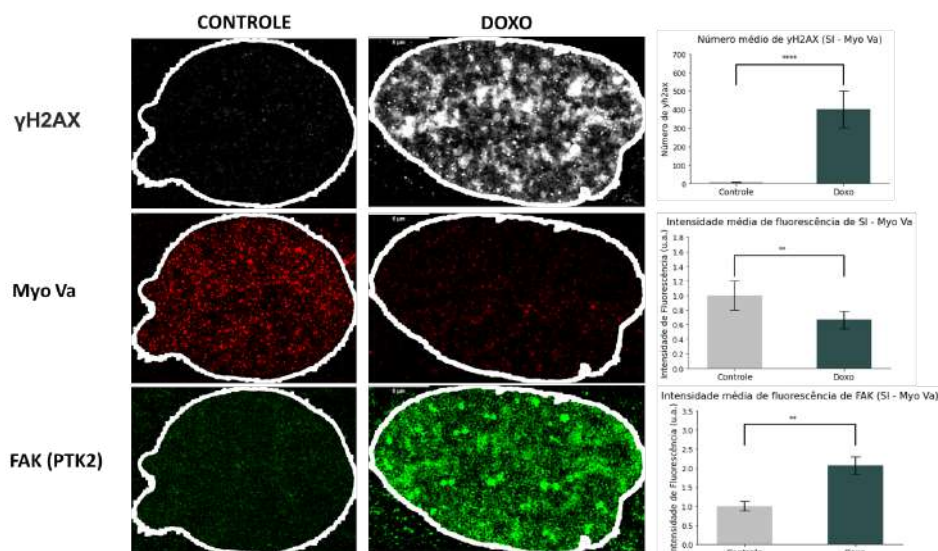


Figura 6. A imagem esquerda contém zoom do núcleo de cardiomiócitos silenciados para miosina Va, controle e tratados com doxo; A imagem direita contém gráficos em barras demonstram o número médio de γ H2AX, e a intensidade média de fluorescência da miosina Va e da FAK respectivamente, no núcleo de cardiomiócitos silenciados para miosina Va, controle e tratados com doxo, N = 19 células controle e 13 células doxo.

É importante dar destaque ao aparecimento de estruturas com um brilho mais intenso presentes no canal da FAK (verde), em células após o tratamento com a doxo (silenciadas para Myo Va ou não) próximas às regiões de dano no DNA e com presença de miosina Va (**Figura 7**). Não sabemos qual a função desses clusters no momento, mas certamente está relacionada ao estresse genotóxico já que não encontramos essas estruturas nas células controle.

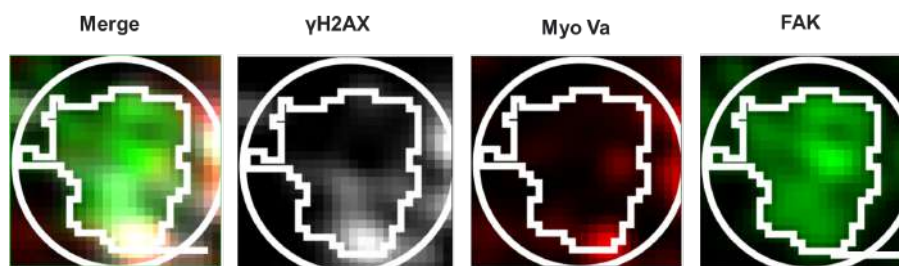


Figura 7. Ampliação de 'cluster' de FAK em cardiomiócitos tratados com doxo; da esquerda para direita sobreposição dos três canais, γ H2AX (cinza), miosina Va (vermelho) e FAK (verde) respectivamente.

CONCLUSÕES:

Dado o exposto, observamos através dos nossos dados que a Miosina Va pode ser importante para a retirada de FAK do núcleo ou a manutenção dela no citoplasma. É possível notar que, o silenciamento da Miosina Va não altera a formação de aglomerados de γ H2AX, mesmo ela tendo um aumento em concentração no núcleo de células tratadas com doxo em relação a células controle. Isso indica que a Miosina Va não está relacionada diretamente com a formação dos sítios de γ H2AX, no entanto, o aumento da concentração nuclear desse motor molecular indica que ela pode apresentar outras funções nucleares relacionadas ao estresse genotóxico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] T. JM, M. CP, N. K, R. CP, O. GK, and P. JT, "Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells," *Molecular and cellular biology*, vol. 21, no. 5, pp. 1565-1572, 2001 Mar 2001, doi: 10.1128/MCB.21.5.1565-1572.2001.
- [2] O. LV *et al.*, "Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors," *Cancer research*, vol. 55, no. 13, pp. 2752-2755, 07/01/1995 1995.
- [3] C. LA, C. JF, and G. JL, "Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn," *Journal of cell science*, vol. 109 (Pt 7), pp. 1787-1794, 1996 Jul 1996.
- [4] W. HB, D. M, H. SK, and W. Y, "Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 20, pp. 11295-11300, 09/25/2001 2001, doi: 10.1073/pnas.201201198.
- [5] S. DJ *et al.*, "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration," *Nature cell biology*, vol. 2, no. 5, pp. 249-256, 2000 May 2000, doi: 10.1038/35010517.
- [6] M. B. M. Pereira *et al.*, "αB-crystallin interacts with and prevents stress-activated proteolysis of focal adhesion kinase by calpain in cardiomyocytes," (in En), *Nature Communications*, OriginalPaper vol. 5, no. 1, pp. 1-18, 2014-10-16 2014, doi: doi:10.1038/ncomms6159.
- [7] D. JM, G.-N. V, K. ML, C. DF, E. MJ, and S. MD, "FERM domain interaction promotes FAK signaling," *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 12, pp. 5353-5368, 2004 Jun 2004, doi: 10.1128/MCB.24.12.5353-5368.2004.
- [8] M. SK, H. DA, and S. DD, "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 6, no. 1, pp. 56-58, 2005 Jan 2005, doi: 10.1038/nrm1549.
- [9] Z. J, Y. Q, and T. L, "The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review," *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, vol. 38, no. 1, p. 250, 06/11/2019 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1265-1.
- [10] T. V *et al.*, "Subcellular localization of GFP-myosin-V in live mouse melanocytes," *Journal of cell science*, vol. 112 (Pt 17), pp. 2853-2865, 1999 Sep 1999.
- [11] L. RE, "Myosin-V: a class of unconventional molecular motors," *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas*, vol. 29, no. 3, pp. 309-318, 1996 Mar 1996.
- [12] D. W. P. Jr. and J. A. Mercer, "Myosin-V: head to tail," (in En), *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, Original Paper vol. 56, no. 3, pp. 233-242, 1999 1999, doi: doi:10.1007/s000180050425.
- [13] L. YR, Z. A, D. H, N. LH, T. FQ, and Y. WX, "Myosin Va plays essential roles in maintaining normal mitosis, enhancing tumor cell motility and viability," *Oncotarget*, vol. 8, no. 33, pp. 54654-54671, 05/17/2017 2017, doi: 10.18632/oncotarget.17920.