Estudo funcional da interação entre PTK2 e PARP1 em cardiomiócitos submetidos a estresse genotóxico

Palavras-Chave: [PTK2], [PARP1], [DOXO], [SIM]

Autores:

Sofia Giaccone Thomaz [Instituto de Física "Gleb Wataghin"]

Pedro Víctor de Carvalho Costa [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:

Doenças como o câncer e complicações cardiovasculares podem tornar-se sinérgicas, devido a consequências cardiovasculares resultantes das terapias antineoplásicas. Os fármacos utilizados no tratamento 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. Quando os danos não são reparados, a DDR ativa a morte celular (apoptose), o que é desejado para as células cancerígenas. Um fármaco antineoplásico muito utilizado é a doxorrubicina (doxo), que apresenta toxicidade cardíaca pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, causando morte dos miócitos.

Estudos indicaram que a quinase de adesão focal (PTK2) pode ser um modulador da DDR em cardiomiócitos frente ao estresse genotóxico. Para identificar parceiros de interação com a PTK2 relacionados a resposta ao dano no DNA, foi realizado experimentos de co-imunoprecipitação (Co-IP) do domínio FERM da PTK2, seguido da identificação dos interatores por espectrometria de massas, encontrando a PARP1, que é reconhecida por ser uma proteína essencial para o reparo de quebras de dupla fita no DNA. Resultados obtidos no projeto anterior de IC, demonstraram por microscopia SIM que a PTK2 e a PARP1 se colocalizam no núcleo em células tratadas com doxo, assim como houve a validação de sua interação por experimentos de Co-IP e Western Blotting (WB). Nesse projeto, foi dado continuidade ao projeto anterior, aprofundando os estudos de interação entre PTK2 e PARP1, verificando o efeito da inibição farmacológica dessas proteínas, isoladamente e em conjunto, na DDR e na modulação da localização subcelular dessas proteínas, em específico, nos sítios de ɣH2AX.

OBJETIVOS:

Neste projeto foi investigado se ocorre a modulação da resposta ao dano no DNA e do recrutamento de PTK2 e PARP1 para os sítios de danos no DNA (γH2AX) em miócitos H9C2 após a inibição farmacológica de PARP1 durante o estresse genotóxico. Essa investigação foi realizada através de análises de co-localização por microscopia de superresolução.

METODOLOGIA:

Após o cultivo dos miócitos H9C2, houve a separação das células em alguns grupos, como presentes na tabela abaixo. Nas células que foram inibidas, o inibidor é diluído em DMSO, dessa forma, para manter a qualidade da análise, foi realizado o tratamento dos grupos controles com DMSO.

Grupo de células	**Exposição à Doxorrubicina (1μM;12h) ou à DMSO**			
Grupos controle:	Tratado com doxo	Sem tratamento com doxo	-	-
Grupos com inibição de PARP (Olaparibe):	Doxorrubicina + Olaparibe	Doxorrubicina + DMSO	Controle + Olaparibe	Controle + DMSO

Tabela 1. Grupos de células analisados

Todos os grupos foram marcados com os respectivos anticorpos para PTK2, PARP1 e γH2AX. As imagens foram obtidas com Structured Illumination Microscopy (SIM) e analisadas utilizando ImageJ e scripts em Python. Foram realizados estudos de colocalização 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 PTK2 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 para o cálculo do CTCF (corrected total cell fluorescence) para cada proteína.

Com o valor de CTCF da proteína em cada célula, houve o cálculo da média desses valores em cada grupo de células e do erro padrão da média. Foi utilizado a distribuição t de Student para o cálculo do valor-p. Além disso, utilizando o find maxima do Image J foi contado o número de focos de γH2AX em cada caso e observado células com cluster de PTK2 no núcleo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Inicialmente, houve a visualização das proteínas nos locais de danos de miócitos H9C2, com o auxílio da microscopia SIM, em dois casos distintos: controle e com estresse genotóxico (tratamento com doxo), onde PARP1 é identificada pela coloração vermelha, PTK2 pela cor verde e γH2AX em

magenta. Para melhor visualização da colocalização, foi realizado um Z-stack de uma área do núcleo, permitindo constatar pontos de associações das proteínas próximos a locais de danos (setas brancas) principalmente após o tratamento com doxorrubicina.

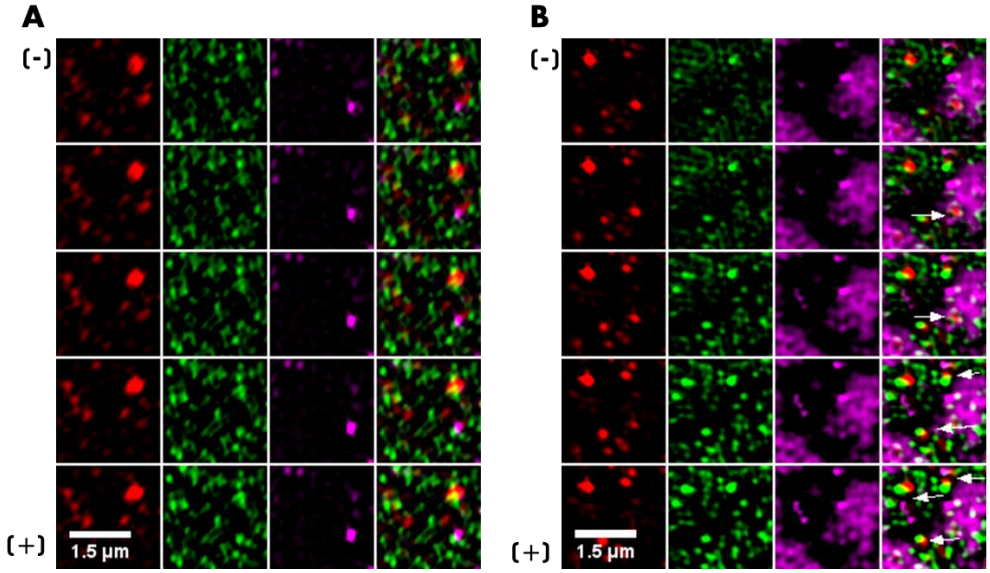

Figura 1. *Nas imagens **A** e **B**, a primeira coluna, da direita para a esquerda, representa o canal de PARP1 (647nm), a segunda coluna apresenta a PTK2 (488nm), a terceira mostra os locais de danos marcados com e $\gamma H2AX$(546nm) e, por último, há a sobreposição de PARP1 (vermelho), PTK2 (verde) e e $\gamma H2AX$(magenta). **A.** Z-stack de miócito H9C2 controle. **B**. Z-stack de célula tratada com doxo. O (-) indica a região basal da célula, enquanto (+) a região apical da célula.*

Houve também a verificação do aumento da presença de γH2AX no núcleo das células que foram submetidas ao tratamento com o fármaco antineoplásico, corroborando a presença de estresses oxidativos e, consequentemente, mostrando a extensão do dano no DNA. Isso foi feito com o auxílio da microscopia SIM, junto com a quantificação dos dados obtidos.

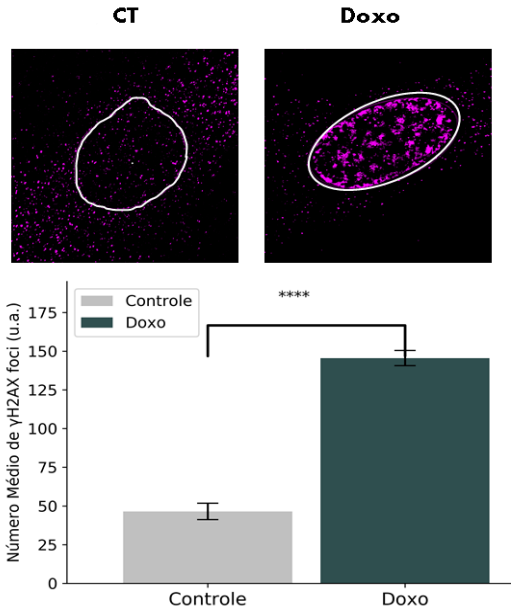

Figura 2. *Gráfico do número médio de $\gamma H2AX$* foci *presente no núcleo do modo como descrito. De forma que (****) significa que o valor-p foi inferior ao nível de significância (0.001).*

Após, foi realizada a inibição, por 12h, da proteína PARP1 e analisado o que modificou na distribuição das proteínas e do dano nas células H9C2. Foi possível verificar que a inibição resultou em uma concentração de PARP1 ao redor do núcleo tanto com tratamento com doxo quanto sem, entretanto a PARP1 não se acumulou no núcleo após o estresse oxidativo, como ocorre em células que não foram inibidas.

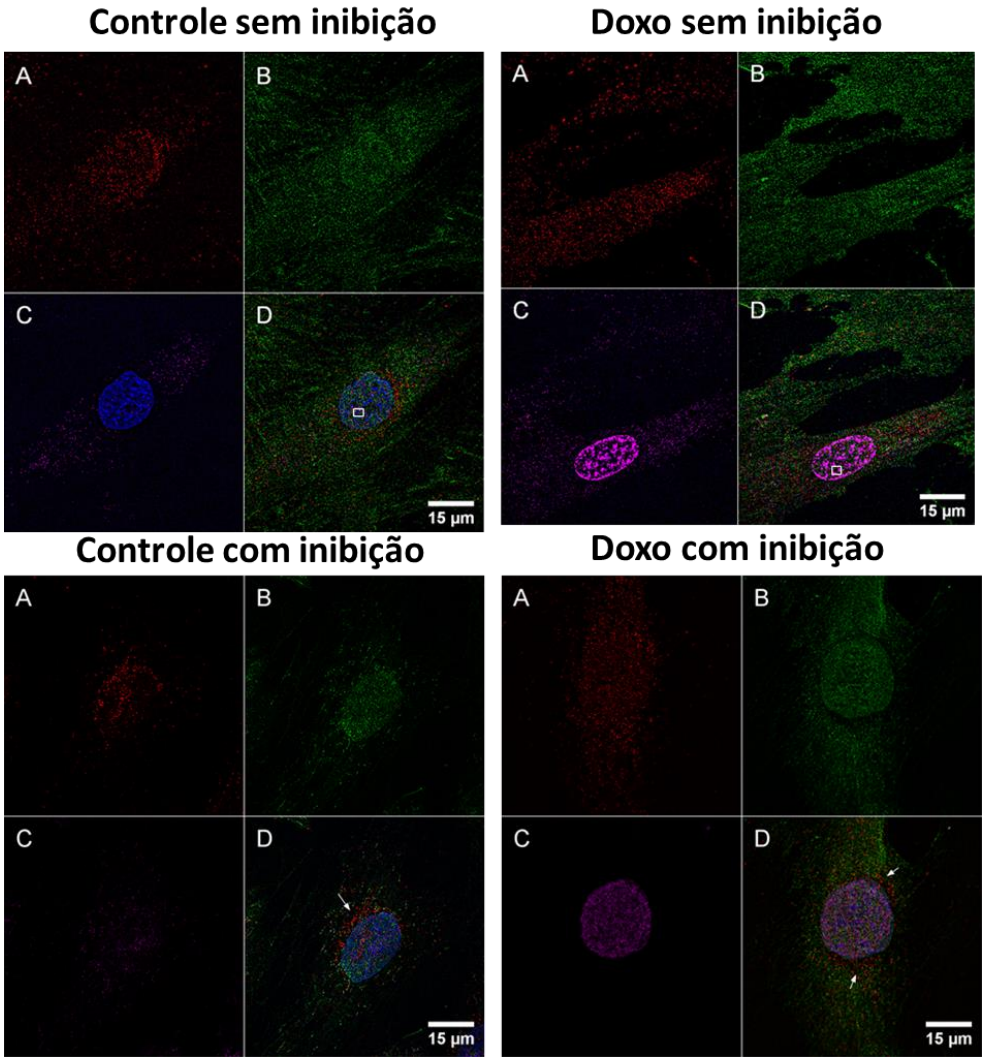

***Figura 3**. As imagens representam células controles e tratadas com doxo após a inibição de PARP1 e sem a inibição..As imagens foram compostas com os planos que compõem o núcleo (onde se nota a presença do DNA marcado com DAPI), excluindo os demais planos. Nas imagens, o DNA está marcado em azul (canal 405nm), a PARP1 em vermelho (647nm), a PTK2 em verde (488nm) e γH2AX em magenta (546nm). As setas indicam as regiões de concentração de PARP1.*

Houve também a realização do gráfico da intensidade média de fluorescência de PARP1 e PTK2 após a inibição. Como pode-se perceber pelos gráficos, a concentração de PTK2 não se alterou após o estresse oxidativo, de forma semelhante com o que acontece quando não há inibição. Porém a PARP1 diminuiu consideravelmente sua concentração no núcleo após o tratamento com doxo, diferente do que ocorria nos grupos controles.

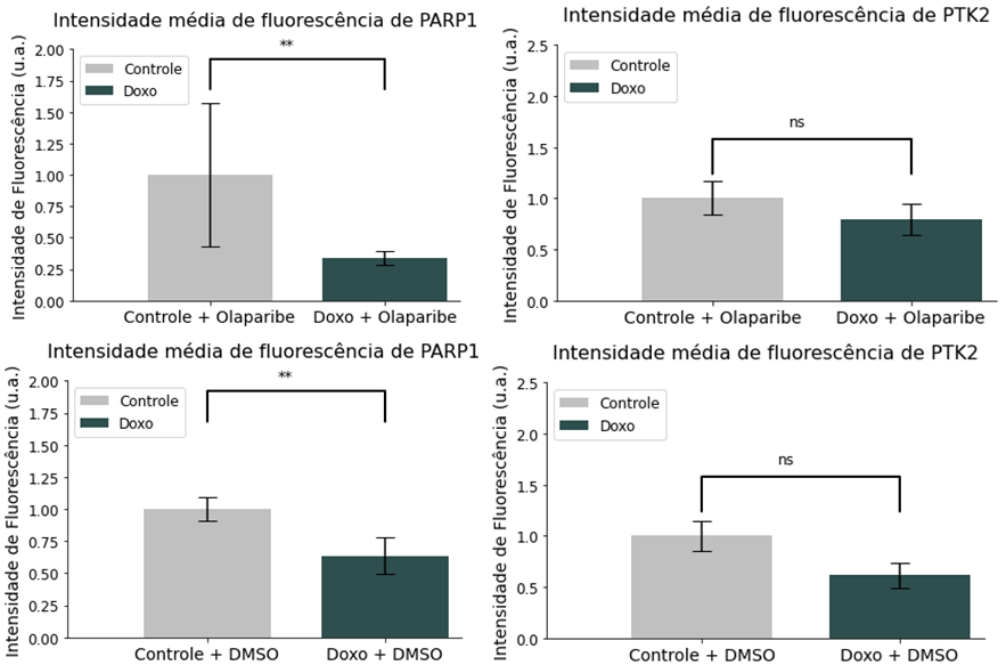

Figura 4. Gráficos das intensidades médias de fluorescência de PTK2 e PARP1 presentes no núcleo, normalizadas pela intensidade média do caso controle. De forma que (ns) significa que o valor-p foi superior ao nível de significância (0.05), (**) representa que o valor encontrado foi menor que esse nível estipulado. Os dados são descritos com a média ± erro padrão da média e olaparibe é o inibidor utilizado.

CONCLUSÕES:

Foi possível concluir que a interação entre as proteínas PTK2 e PARP1 em miócitos H9C2 podem depender da ativação da PARP1. Quando essa proteína é inibida é possível perceber uma maior concentração de PARP1 na região perinuclear tanto em células controles quanto em células sob estresse genotóxico. Porém, quando há o tratamento com doxorrubicina em células inibidas, pode-se notar que não há um aumento de concentração de PARP1 no núcleo, como acontece quando PARP1 não está inibida. Entretanto, ainda será realizada a quantificação dos dados por experimentos de Western Blot.

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.

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.