



ESTUDO FUNCIONAL DOS SÍTIOS NUCLEARES DE BCLAF1 E SUA RELAÇÃO COM O CONTROLE DE QUALIDADE PROTEICO DA QUINASE FAK EM MIÓCITOS CARDÍACOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA

Palavras-Chave: Cardiotoxicidade; resposta ao dano no DNA; sobrevivência.

Beatriz R. I. Rodrigues¹; Isabela A. Moretto¹; , Gabriel M. Quaglia¹; Ana P. Samogim¹; Mariana C. Silva¹; Hernandes F. Carvalho²; Andre A. Thomaz^{2,3}; Aline M. Santos^{2,4}

¹Estudante do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

²Pesquisador, Instituto Nacional de Fotonica Aplicada à Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

³Professor pesquisador do Instituto de Física de "Gleb Wataghin", Departamento de Eletrônica Quântica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

⁴Professora pesquisadora do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

INTRODUÇÃO:

FAK/PTK2 é uma tirosina-quinase do tipo não receptor, envolvida na mecano-sinalização iniciada por integrinas e na sinalização mediada por receptores de citocinas e fatores de crescimento [1-4]. Trabalhos recentes têm demonstrado que FAK nuclear pode interagir com fatores de transcrição como MEF2C, p53 e GATA, promovendo a regulação do crescimento celular, proliferação, sobrevivência e diminuição das respostas inflamatórias [6-9].

Os dados da literatura demonstram que a interação de FAK com p53 é fundamental para o controle dos níveis de p53 e da sobrevivência celular [6]. Por outro lado, em resultados obtidos no projeto de Iniciação Científica (PIBIC 2020-21), demonstramos que FAK nuclear interage com Bclaf1, uma proteína nuclear que participa da estabilização de proteínas durante a resposta ao dano no DNA (DDR) e também no controle da morte celular [10-12], em cardiomioblastos ventriculares H9c2 em condições basais e de estresse genotóxico (Fig. 1).



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 com IgG, como controle experimental (IgG). N=3 grupos experimentais.

Uma vez que BCLAF1 se reorganizou em clusters nucleares durante o tratamento doxo, foram realizados experimentos de imunofluorescência com marcação tripla. As análises por SR-SIM revelaram que, após estresse oxidativo e genotóxico promovido pelo tratamento com doxo, Bclaf1 se reorganiza em agregados proteicos, nos quais FAK encontra-se sequestrada em seu interior (Fig. 2).

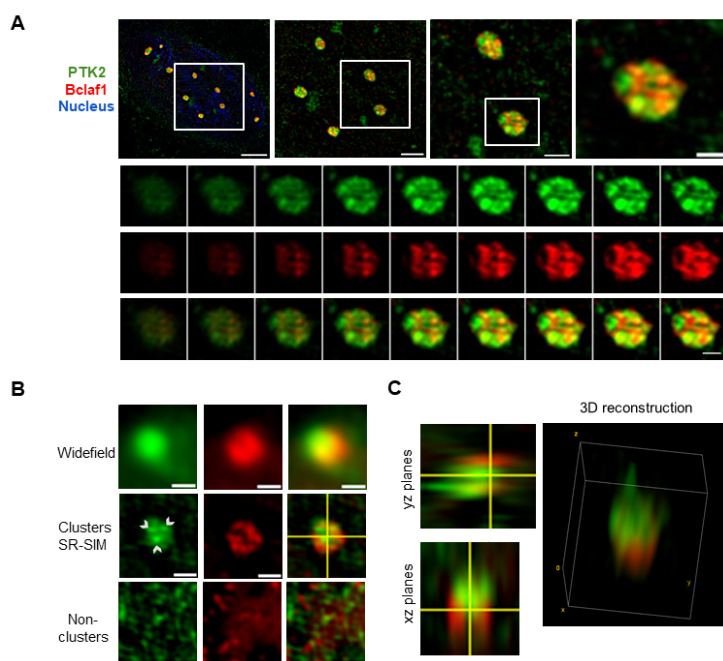


Figura 2. A. Imagens de imunofluorescência de cardiomiócitos sob estresse genotóxico com estruturas puntiformes de Bclaf1 com FAK ao redor do cluster. **B.** Exemplos de áreas de clusters e randômica. **C.** Construção em 3D da área de um cluster de Bclaf1 com FAK associada.

Nossa hipótese foi que essas estruturas puntiformes de Bclaf1 apresentam propriedades semelhantes a chaperonas para estabilizar e proteger FAK da ubiquitinação e degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo.

METODOLOGIA:

A fim de averiguar funcionalmente a interação entre FAK e Bclaf1 em miócitos H9c2, foi realizado o silenciamento gênico de Bclaf1. Para isso, os miócitos foram divididos em um grupo silenciado para Bclaf1 e um grupo *siControl*, tratado com uma sequência aleatória de siRNA. Posteriormente, os miócitos foram subdivididos em um grupo controle e um tratado com 1 μ M de doxo, por 12h (grupos: *siControl*; *siControl* + doxo; *siBclaf1*; *siBclaf1* + doxo).

Para a verificação da expressão das proteínas, foram realizados ensaios de *western blotting*. Com a finalidade de visualizar a distribuição e modificações pós-traducionais das proteínas frente aos diferentes tratamentos, foram empregadas técnicas de imunomarcção e microscopia de super resolução por iluminação estruturada (SR-SIM), utilizando anticorpos contra FAK, Bclaf1 e ubiquitina. As imagens obtidas foram analisadas pelo software ImageJ (Fiji) e scripts em Python.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Silenciamento gênico de Bclaf1 promove desorganização dos *clusters* de FAK no núcleo

Para avaliar a importância da interação entre FAK e Bclaf1 para a formação dos *clusters* de FAK, foi realizado o silenciamento gênico de Bclaf1. Análises de western blotting confirmaram o silenciamento gênico de Bclaf1 (Fig. 3).

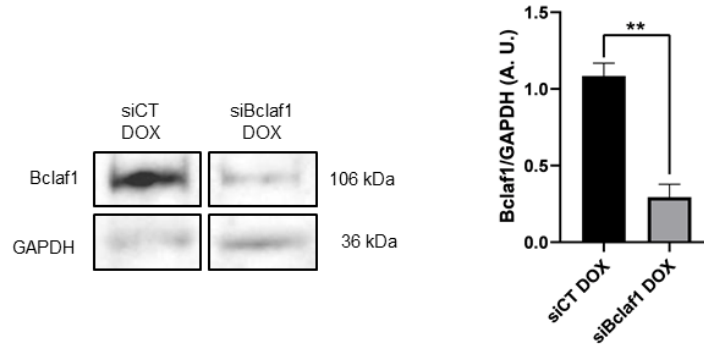


Figura 3. Silenciamento gênico de Bclaf1 em cardiomiócitos H9c2. Extratos de cardiomiócitos H9c2 tratados com doxo transfetados com siControl ou siBclaf1. O gráfico de barras mostra as leituras densitométricas de imunotransferências Bclaf1 normalizadas por GAPDH de células H9c2 tratadas com doxo transfetadas com siCT ou siBclaf1.

Os experimentos de microscopia evidenciaram que o silenciamento de Bclaf1 aboliu a formação de *clusters* nucleares de Bclaf1, o que impactou na formação dos aglomerados de FAK durante o estresse genotóxico em miócitos tratados com doxo (Fig. 4A-B). A redução dos níveis de Bclaf1 e da formação dos *clusters* de FAK culminou na formação de agregados amorfos de FAK e na redução dos níveis totais dessa quinase nos miócitos (Fig. 4C-E), indicando um aumento da sua degradação.

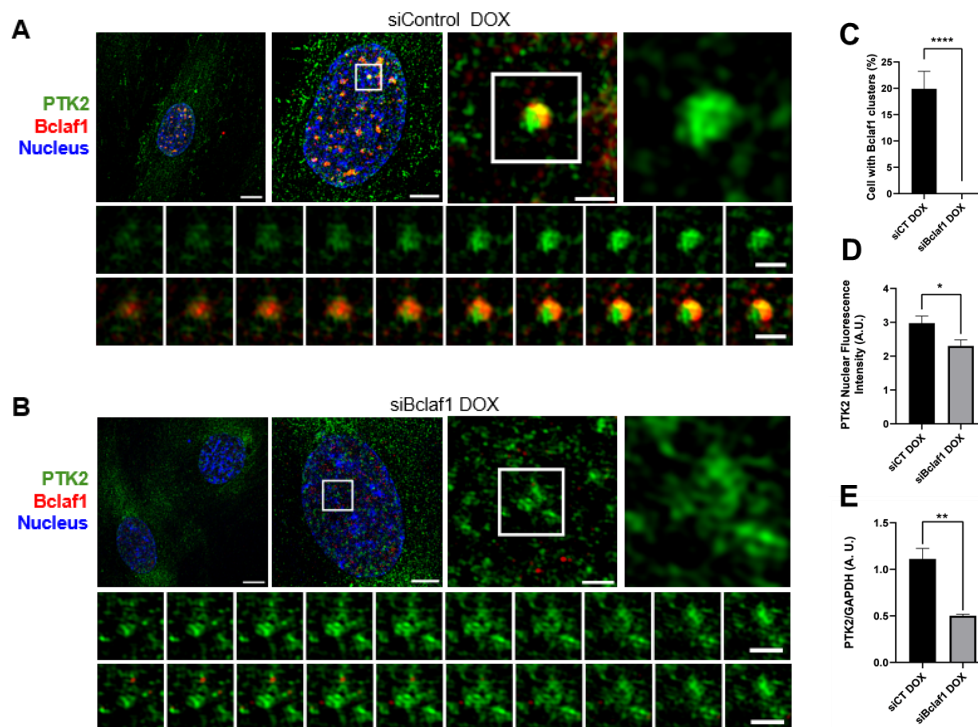


Figura 4. Silenciamento gênico de Bclaf1. **A e B.** Células siControl DOXO demonstraram a presença de *clusters* de FAK, enquanto que células silenciadas para Bclaf1, a frequência dessas estruturas diminui. Verde: FAK; Vermelho: Bclaf1; Azul: DNA. **C.** Gráficos quantitativos do número de células com *clusters* de Bclaf1 e FAK em SiControl - doxo e SiBclaf1 - doxo. **D.** Intensidade de fluorescência nuclear de FAK SiControl - doxo e SiBclaf1 -

doxo após tratamento com doxo. **E.** Gráfico de barras mostra as leituras densitométricas do imunoblot de FAK normalizados por GAPDH de células H9c2 tratadas com doxo transfetadas com *SiControl* - doxo e *SiBclaf1* - doxo.

2. Bclaf1 atua como chaperona protegendo FAK da ubiquitinação e degradação

Por fim, para avaliar se Bclaf1 atua como chaperona na estabilização de FAK e manutenção dos seus níveis durante o estresse genotóxico, investigamos se os complexos de Bclaf1 impedem a ubiquitinação dessa quinase. Para isso, tratamos os miócitos com doxo e com o inibidor de proteassomos MG-132, para impedir a degradação de proteínas ubiquitinadas pelos proteassomos, promovendo seu acúmulo. Nossos dados demonstraram que FAK associada aos complexos de Bclaf1 foi protegida da ubiquitinação e consequente degradação em proteassomos (Fig 5A). Por outro lado, a inibição dos proteassomos promoveu o acúmulo de FAK ubiquitinada no núcleo dos miócitos (Fig 5B). Por fim, o silenciamento de Bclaf1, além de induzir intensa ubiquitinação e degradação de FAK, resultou em redução da viabilidade celular, confirmando a importância da formação dos clusters nucleares de FAK e Bclaf1 para a sobrevivência dos miócitos durante o estresse induzido por doxorubicina (Fig 5C-D).

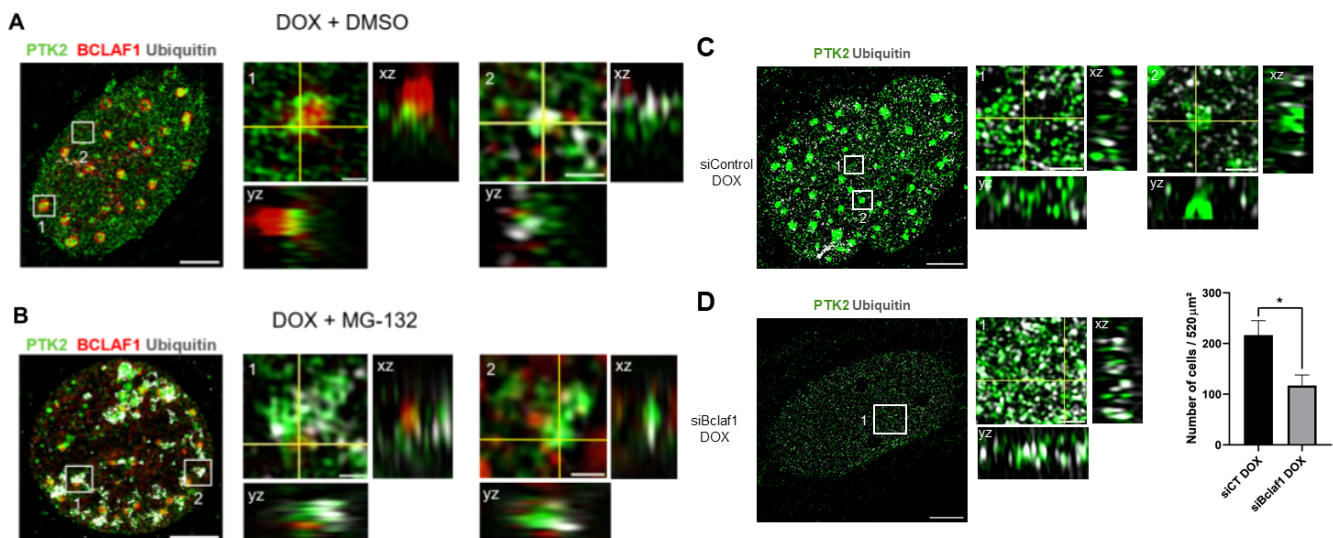


Figura 5. BCLAF1 tem potencial como uma chaperona interagindo na estabilização de FAK. **A.** FAK e BCLAF1 estão concentrados em cluster de BCLAF1 no núcleo. 1. Ligação de FAK a BCLAF1. 2. FAK livre no núcleo, fora do cluster, ubiquitinada. **B.** A inibição do proteassoma leva ao acúmulo de FAK no núcleo, em agregados enriquecidos com ubiquitina. 1. FAK está concentrada em um agregado de forma de rede. 2. FAK é ubiquitinada nos clusters. Verde: FAK; Vermelho: BCLAF1; Cinza: Ubiquitina. **C.** Complexos macromoleculares de FAK no tratamento com *siControl* doxo em cardiomiócitos H9c2. **D.** A imagem mostra a interrupção de Complexos macromoleculares FAK no tratamento *siBclaf1* doxo. O gráfico de barras mostra uma redução no número de células após o silenciamento de Bclaf1 em cardiomiócitos tratados com doxo.

CONCLUSÕES:

Bclaf1 é essencial em diferentes eventos celulares, como na regulação do destino celular durante a resposta ao dano do DNA [10-12]. FAK em condições de estresse genotóxico, tem papel pró-sobrevivência, atuando no controle dos níveis de p53 via interação com a ubiquitina ligase-MDM2 e também na ativação de AKT/mTOR [6, 13]. Nossos dados demonstraram que em cardiomiócitos sob estresse genotóxico, promovido pelo tratamento com o quimioterápico doxorubicina, Bclaf1 forma

estruturas puntiformes e sequestra FAK em suas cavidades, protegendo-a da ubiquitinação e degradação, processo essencial para a sobrevivência do miócito cardíaco e, conseqüentemente, para o funcionamento do coração. Entender os mecanismos de sinalização ativados pelo estresse genotóxico pode contribuir para futuras abordagens que visam a redução dos efeitos nocivos dos quimioterápicos sobre as células do coração.

BIBLIOGRAFIA:

1. 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.
2. 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.
3. Hytönen, V.P., and Wehrle-Haller, B. (2016). Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Exp Cell Res* 343, 35-41.
4. 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.
5. Bell, S., and Terentjev, E.M. (2017). Focal Adhesion Kinase: The Reversible Molecular Mechanosensor. *Biophys J* 112, 2439-2450.
6. 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.
7. Lim, S.T., Miller, N.L., Chen, X.L., Tancioni, I., Walsh, C.T., Lawson, C., Uryu, S., Weis, S.M., Cheresch, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2012). Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. *J Cell Biol* 197, 907-919.
8. Lim, S.T. (2013). Nuclear FAK: a new mode of gene regulation from cellular adhesions. *Mol Cells* 36, 1-6.
9. Cardoso, A.C., Pereira, A.H., Ambrosio, A.L., Consonni, S.R., Rocha de Oliveira, R., Bajgelman, M.C., Dias, S.M., and Franchini, K.G. (2016). FAK Forms a Complex with MEF2 to Couple Biomechanical Signaling to Transcription in Cardiomyocytes. *Structure* 24, 1301-1310.
10. Lee, Y.Y., Yu, Y.B., Gunawardena, H.P., Xie, L., and Chen, X. (2012). Bclaf1 is a radiation-induced H2AX-interacting partner involved in γ H2AX-mediated regulation of apoptosis and DNA repair. *Cell Death Dis* 3, e359.
11. 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.
12. 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.
13. Marin, T.M., Clemente, C.F., Santos, A.M., Picardi, P.K., Pascoal, V.D., Lopes-Cendes, I., Saad, M.J., and Franchini, K.G. (2008). Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res* 103, 813-824.