



AValiação Funcional da Interação entre TiroSina Kinase II (FAK) e Miosina Va em Miócitos H9c2 sob Estresse Genotóxico

Palavras-Chave: FAK, MIOSINA Va, SIM

Autores(as):

MILENA ANDRADE¹, PEDRO CARVALHO², INGRID BRITO², ISABELLA MORETTO² – UNICAMP
Prof.^a Dr.^a Aline Mara dos Santos² (Co-orientadora); Prof. Dr. André Alexandre de Thomaz¹ (orientador) – UNICAMP

¹Departamento de eletrônica quântica

²Departamento de biologia celular e estrutural

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. Nesse projeto foram realizados experimentos de microscopia de super-resolução (SIM) com o intuito de verificar se a inibição da FAK (PTK2) afetam o transporte da FAK para os sítios de dano no DNA após estresse genotóxico causado por tratamento com quimioterápico antineoplásico.

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].

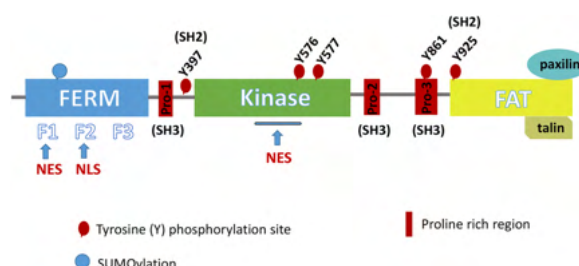


Figura 1. Esquema da disposição dos domínios da PTK2 (FAK). Os resíduos tirosina envolvidos na sua ativação e sinalização estão indicados. NES e NLS presentes nos domínios FERM e kinase e os sítios de ligação à paxilina e talina, estão representados. Modificado de Zhou, J et al., 2019 [9].

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].

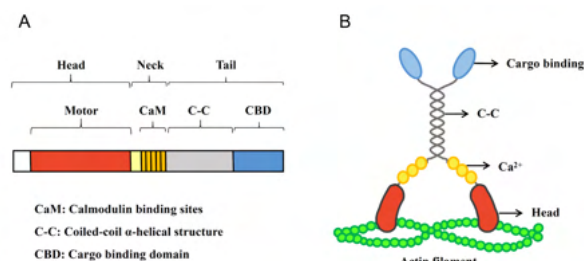


Figura 2. Esquema da disposição dos domínios da miosina Va. Os domínios estão indicados e representados por diferentes cores [13].

METODOLOGIA:

A 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). As células utilizadas foram cardiomiócitos H9c2 tratados por 12 horas com doxorubicina e inibidor PF para FAK, divididos em dois grupos: tratados apenas com doxo e tratados com doxo mais inibidor. Para análise de imagem foi utilizado o software ImageJ, 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 Whitne.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Interação da FAK com a miosina Va – Tratamento com doxo

Dados de microscopia de super-resolução por iluminação estruturada – SIM (*Structured Illumination Microscopy*) (**Figura 3**), demonstraram que a FAK e a miosina Va têm uma distribuição nuclear e citoplasmática em miócitos H9c2 em condições basais.

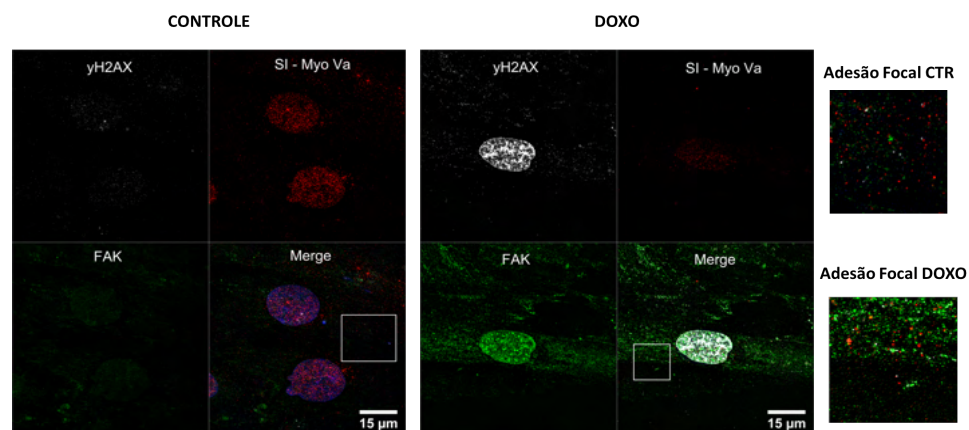


Figura 3. Imagens representativas de microscopia SIM, na qual cardiomiócitos controle (CT) e tratados com doxo foram fixados e processados para imunofluorescência utilizando-se anticorpos contra γ H2AX (cinza), Miosina Va (vermelho) e FAK (verde). Sobreposição dos sinais de fluorescência γ H2AX (cinza),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

Na imagem 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.

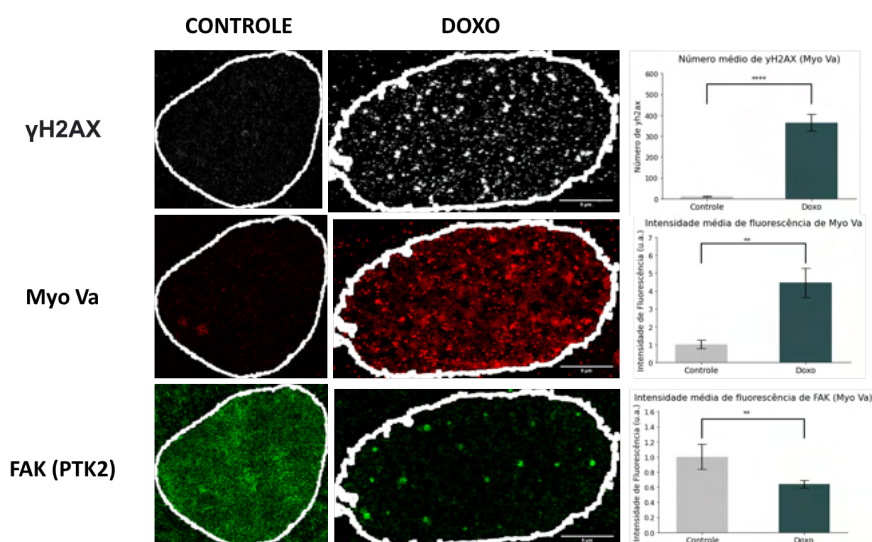


Figura 4. As imagens à esquerda contém zoom do núcleo de de cardiomiócitos controle e tratados com doxo; os gráficos em barras demonstram o número médio de γ H2AX, e a intensidade média de fluorescência da Miosina Va e da FAK, respectivamente no núcleo de cardiomiócitos controle e tratados com doxo,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

Interação da FAK com a miosina Va – Tratamento com doxo + silenciamento da myo Va e inibição da FAK

Analogamente, encontra-se tanto em cardiomiócitos tratados com doxo e silenciados para a miosina Va (Knockdown), quanto inibidos para FAK, 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 relação às células tratadas apenas com doxo. Já com a inibição da FAK há um aumento na intensidade da myo Va em relação às células silenciadas, contudo, há apenas um leve aumento na intensidade em comparação às células apenas tratada com doxo (**Figura 5**).

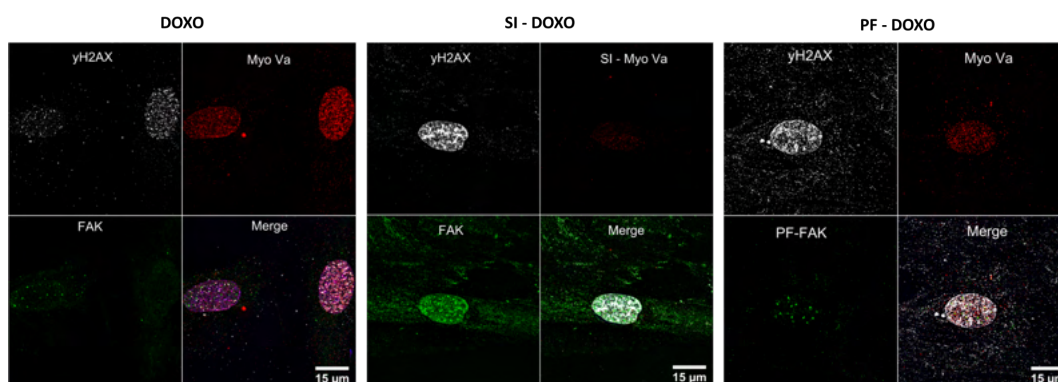


Figura 5. Imagens representativas de microscopia SIM, na qual cardiomiócitos tratados apenas com doxo, silenciados para miosina Va e tratados com doxo, inibidos para FAK e tratados com doxo, foram fixados e processados para imunofluorescência utilizando-se anticorpos contra γ H2AX (cinza), Miosina Va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

A análise quantitativa (**Figura 6**) mostrou que o número médio de focos de γ H2AX, permanece praticamente constante quando as células são silenciadas para miosina Va após o tratamento com doxo. No entanto, quando as células são inibidas para a proteína FAK, esse número médio de focos de γ H2AX aumenta em quase 50%. Isso sugere que a inibição da FAK aumenta o estresse nas células e potencializa o dano ao DNA causado pela doxo. Ademais, as células silenciadas para miosina Va e tratadas com doxo apresentaram o dobro da intensidade de fluorescência da FAK nuclear em comparação com as células tratadas apenas com doxo. No caso das células tratadas com inibidores da FAK, essa intensidade aumentou apenas 50%. Essa mudança na distribuição da FAK sugere que a miosina Va está envolvida na remoção da FAK do núcleo celular ou na sua manutenção no citoplasma.

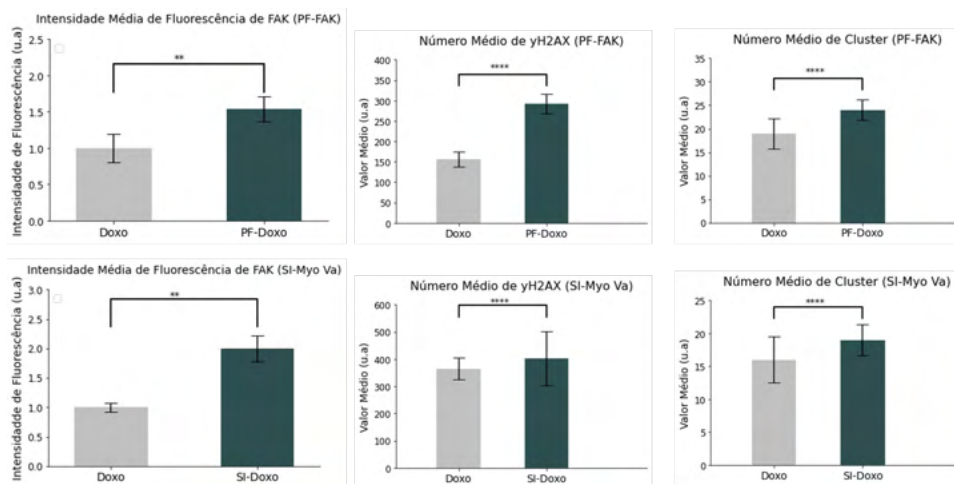


Figura 6. Gráficos em barras demonstram o número médio de γ H2AX, e a intensidade média de fluorescência da FAK, respectivamente no núcleo de cardiomiócitos tratados apenas com doxo, silenciados para Myo Va e tratados com doxo, inibidos para FAK e tratados com doxo. N = 13 células tratadas apenas com doxo, 13 células silenciadas para Myo Va e tratadas com doxo, e 11 células inibidas para FAK e tratadas com doxo.

Comparando os gráficos (**Figura 6**) de dano no DNA e de formação de clusters, que seguem o mesmo comportamento, é perceptível tanto um aumento do número médio de sítios de γ H2AX, quanto um aumento na formação de clusters (complexos macromoleculares que vão ser discutidos adiante). Isso indica que a formação de clusters está relacionada com um aumento no dano ao DNA.

Formação de complexos macromoleculares de FAK

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 próximas às regiões de dano no DNA (**Figura 7**). Não sabemos qual a função desses complexos macromoleculares no momento, mas certamente está relacionada ao estresse genotóxico já que não encontramos essas estruturas nas células controle.

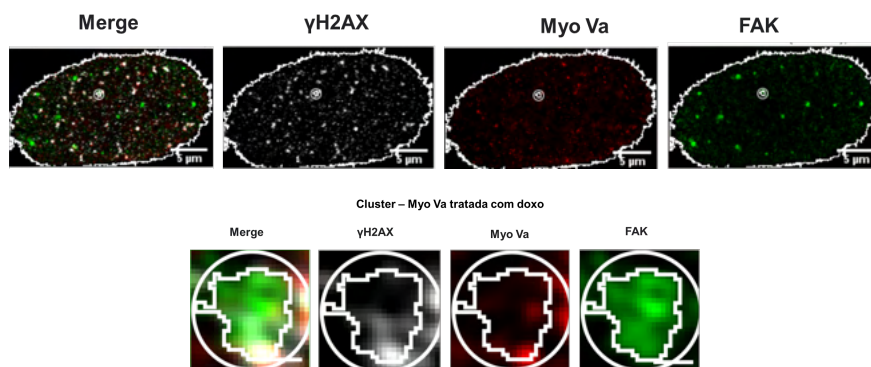


Figura 7. Primeira imagem consta um zoom do núcleo de uma célula e a segunda imagem apresenta uma ampliação de 'cluster' de FAK em cardiomiócitos tratados com doxo.

É possível notar no gráfico (**Figura 8**) que há uma maior relação entre miosina Va e FAK (PTK2) do que miosina Va e γ H2AX indicando um maior grau de interação entre miosina Va e PTK2, nas células tratadas apenas com doxo e inibidas para FAK. Nas células cuja a myo Va foi silenciada as correlações se mantiveram constantes para ambos os casos.

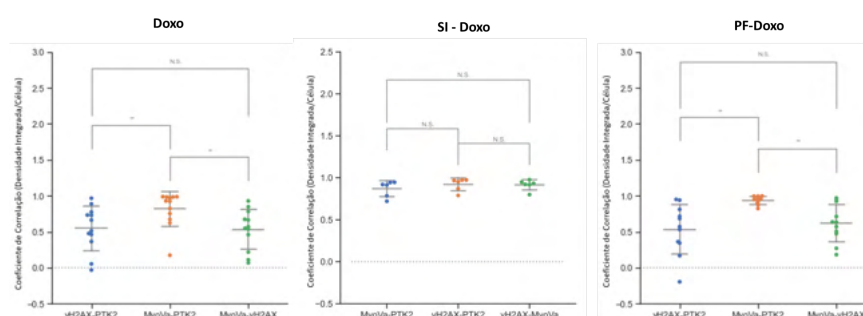


Figura 8. Gráfico de correlação integrada de clusters de FAK para células tratadas apenas com doxo, silenciadas para myo Va e tratadas com doxo, inibidas para FAK e tratadas com doxo. N = 13 células tratadas apenas com doxo, 13 células silenciadas para Myo Va e tratadas com doxo, e 11 células inibidas para FAK e tratadas com doxo.

Foi realizado também uma análise da área desses clusters quando as células foram tratadas com doxo e silenciadas para myo Va ou inibidas para FAK (**Figura 10**). Concluímos assim que o silenciamento da myo ou a inibição da FAK resulta em um aumento da área dos clusters, indicando assim uma possível desestabilização desse complexo.

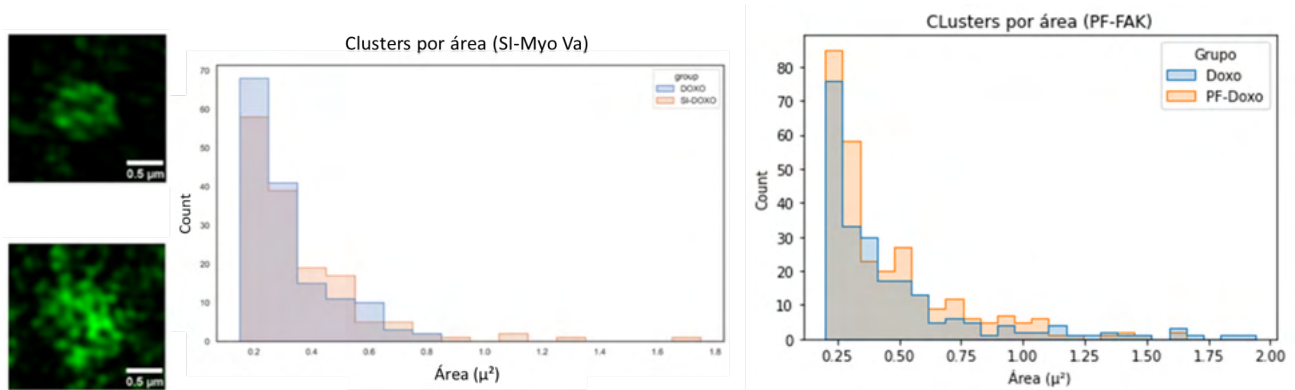


Figura 9. A esquerda imagens de clusters de FAK antes (acima) e após (abaixo) o tratamento com doxo mais silenciamento da myo Va. A direita, histogramas de clusters por área em células tratadas com doxo mais silenciamento da myo, e inibidas para FAK e tratadas com doxo. N = 13 células tratadas com doxo e silenciadas para Myo Va, 11 células tratadas com doxo e inibidas para FAK

CONCLUSÕES:

Em síntese, os resultados sugerem que a interação entre a FAK e a miosina Va desempenha um papel na regulação da localização dessas proteínas nos compartimentos subcelulares, especialmente em resposta ao estresse genotóxico causado pela doxo. A inibição da FAK afeta a distribuição dessa quinase e potencializa o dano ao DNA, enquanto a miosina Va pode estar envolvida na remoção da FAK do núcleo celular ou na sua manutenção no citoplasma. Essas descobertas contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na resposta ao estresse genotóxico e na interação entre a FAK e a miosina Va.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. D et al., "Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2017, 2017 2017, doi: 10.1155/2017/1521020.
- [2] A. SH et al., "Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 35, no. 8, pp. 893-911, 03/10/2017 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.70.5400.
- [3] J. L. Z. e. al., "2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC)," *European Journal of Heart Failure*, vol. 19, pp. 9-42, 2017, doi: 10.1002/ehfj.654.
- [4] F. S, P. EA, F. B, B. F, B. B, and S. L, "Doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with carvedilol," *Clinical cardiology*, vol. 21, no. 10, pp. 777-9, 1998 Oct 1998, doi: 10.1002/clc.4960211017.
- [5] M. G, M. P, S. E, C. G, and G. L, "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity," *Pharmacological reviews*, vol. 56, no. 2, pp. 185-229, 2004 Jun 2004, doi: 10.1124/pr.56.2.6.
- [6] Z. L and Z. B, "Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes," *Scientific reports*, vol. 7, p. 44735, 03/16/2017 2017, doi: 10.1038/srep44735.
- [7] P. E et al., "Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells," *Basic research in cardiology*, vol. 108, no. 2, 2013 Mar 2013, doi: 10.1007/s00395-013-0334-4.
- [8] P. M, S. A, and B. P, "H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy," *Journal of nucleic acids*, vol. 2010, 08/03/2010 2010, doi: 10.4061/2010/920161.
- [9] C. Z, D. LA, R. M, V. C, M. CP, and T. JM, "Focal adhesion kinase antagonizes doxorubicin cardiotoxicity via p21(Cip1.)," *Journal of molecular and cellular cardiology*, vol. 67, 2014 Feb 2014, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.002.
- [10] T. KJ et al., "Focal Adhesion Kinase Regulates the DNA Damage Response and Its Inhibition Radiosensitizes Mutant KRAS Lung Cancer," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 22, no. 23, 12/01/2016 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2603.
- [11] T. B et al., "Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy," *Nature*, vol. 514, no. 7520, 10/02/2014 2014, doi: 10.1038/nature13541.
- [12] S. FJ, J. C, and S. DD, "FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications," *Nature reviews. Cancer*, vol. 14, no. 9, pp. 598-610, 2014 Sep 2014, doi: 10.1038/nrc3792.
- [13] A. M. Santos et al., "FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy," (in En), *Nature Chemical Biology, OriginalPaper* vol. 8, no. 1, pp. 102-110, 2011-11-20 2011, doi: doi:10.1038/nchembio.717.