



Estudo do controle de qualidade proteico da quinase PTK2 durante o estresse genotóxico em miócitos cardíacos

Palavras-Chave: Cardiotoxicidade, PTK2, controle de qualidade proteico, VCP/p97.

Guilherme Missio¹; Isabela A. Moretto¹; Ana P. Samogim¹; Mariana C. Silva¹; Pedro V. C. Costa¹; Hernandes F. Carvalho²; André 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

1 INTRODUÇÃO

A proteína tirosina quinase 2 (PTK2), é uma tirosino-quinase do tipo não receptor que apresenta papel essencial no desenvolvimento embrionário e na patogênese de doenças humanas, como o câncer e doenças cardiovasculares [2, 3]. A PTK2 também atua como uma plataforma de interação (*scaffold protein*), sendo crítica para a regulação de diversos processos, como motilidade, proliferação, sobrevivência, inflamação, angiogênese, diferenciação e crescimento em diferentes tipos celulares [4 - 8].

Novos estudos têm indicado que a quinase PTK2 pode ser um importante modulador da resposta ao dano no DNA (DDR) em cardiomiócitos tratados com doxorubicina (doxo) e em outros tipos celulares frente ao estresse oxidativo e genotóxico [1,2]. Cheng e colaboradores demonstraram que camundongos knockout para PTK2 apresentaram aumento acentuado de apoptose nos cardiomiócitos e disfunção cardíaca após exposição a doxo [1]. Além disso, esses autores demonstraram que a superexpressão de uma forma ativa de PTK2 nos miócitos promoveu resistência a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina [1].

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que ocorre acúmulo de PTK2 no núcleo de miócitos H9c2 tratados com doxo (1 uM; 12h), indicando que essa quinase é sensível ao estresse genotóxico. No entanto, também foi observado que ocorre uma redução da expressão dessa proteína, por experimentos de *western blotting*, e a formação de agregados proteicos nucleares, detectados por microscopia de Super Resolução por Iluminação Estruturada (SR-SIM) (Figura 1). Esses dados indicam que durante o estresse genotóxico e oxidativo, ocasionados pelo tratamento com doxo, PTK2 pode ter sua estrutura desestabilizada, processo que pode culminar na sua agregação/degradação ou modificação pós-traducional por componentes do controle de qualidade proteico celular.

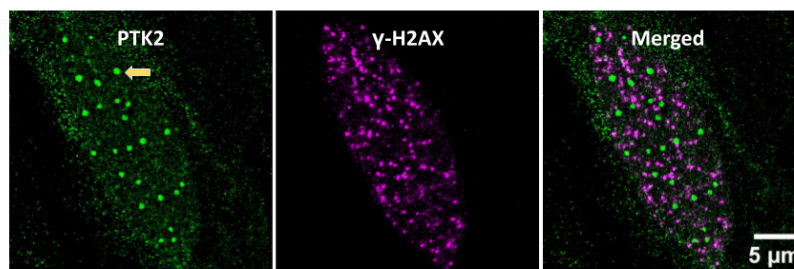


Figura 1: Tratamento com doxo promove agregação de PTK2 no núcleo de miócitos H9c2. Imagens de microscopia SR-SIM obtidas de células tratadas com doxo (1 μ M; 12h). Na imagem representativa PTK2 está marcada em verde (canal 488nm) e γ -H2AX, marcador de quebra no DNA, em magenta (647nm). A seta indica um aglomerado de PTK2.

2 OBJETIVOS

1. Verificar se a redução da expressão de PTK2 induzida pelo tratamento com doxo é consequência do aumento na taxa de degradação dessa quinase por proteassomos.
2. Analisar se os clusters nucleares de PTK2, induzidos pelo tratamento com doxo, estão relacionados às modificações pós-traducionais resultantes da atuação do sistema de qualidade proteico que operam no núcleo durante o estresse genotóxico.
3. Verificar se a chaperona VCP participa do controle de qualidade proteico nuclear de PTK2 .

2 METODOLOGIA

Para avaliar a presença de colocalização entre PTK2 e as proteínas SUMO, ubiquitina e VCP, as células foram tratadas com doxorubicina (1 μ M;12h), fixadas com paraformaldeído 4%, permeabilizadas com 0,8% de Triton e bloqueadas com BSA 5% em PBS. Posteriormente, foram incubadas com os anticorpos primários contra PTK2 (Invitrogen; AHO0502) e SUMO (Invitrogen; 33-2400), ou Ubiquitina (Invitrogen; 13-1600) ou VCP (Invitrogen; MA3-004). Após a lavagem, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários e, em seguida, montaram-se as lâminas com ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (ThermoFisher) para demarcação do núcleo. Com as lâminas prontas, foram utilizadas técnicas de microscopia de Super-Resolução por Iluminação Estruturada (SR-SIM) para aquisição de imagens, as quais foram analisadas pelo software ImageJ (Fiji) e scripts em Python.

Para a verificação da expressão das proteínas, as células foram tratadas com doxorubicina (1 μ M;12h) e com o inibidor de proteassomos MG-132 (10 μ M;12h). Em seguida, os extratos proteicos foram obtidos para os ensaios de western blotting e o RNA total extraído para a realização da técnica PCR quantitativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Agregados nucleares de PTK2 estão co-localizados com SUMO em miócitos tratados com doxorubicina

A partir da técnica SR-SIM foi possível observar que em células controle há uma distribuição relativamente homogênea de SUMO e PTK2 no núcleo e citoplasma, sem a presença de aglomerados densos para ambas as proteínas. A sumoilação pode atuar na regulação da localização subcelular de proteínas, nas ligações proteína-DNA e proteína-proteína, regulação transcricional, reparo no DNA e organização genômica [9]. Na imagem sobreposta foi possível observar alguns pontos de colocalização esparsos, no núcleo e citoplasma. Por sua vez, nas células tratadas com doxo observou-se uma maior concentração nuclear de PTK 2 e SUMO, com a formação de aglomerados

visíveis no núcleo. Na imagem sobreposta foi possível observar intensa co-localização entre SUMO e PTK2.

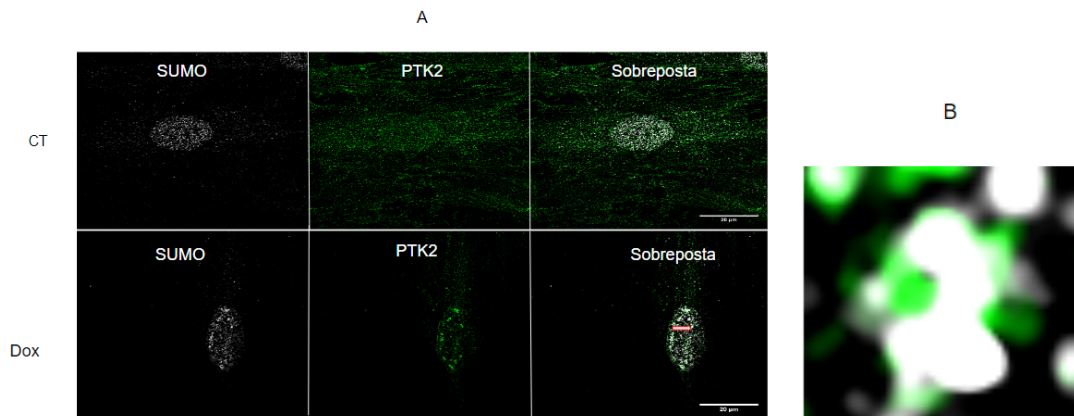


Figura 2: A. Células controle (linha superior) e tratadas com Doxo (linha inferior), marcadas com anticorpos fluorescentes para PTK2 (canal 488), em verde, e SUMO (canal 647), em cinza. B. Imagem aproximada do último quadro de células tratadas com doxo, da figura A, na região indicada pela seta. É possível observar pontos de co-localização entre SUMO e o cluster de PTK2.

Na imagem B observa-se, à direita, uma ampliação do aglomerado nuclear de PTK2 com intensa marcação de SUMO, indicando que PTK2 está SUMOilada durante o estresse oxidativo e genotóxico induzidos pelo tratamento com doxo.

Estudos demonstraram que a SUMOilação de PTK2 é importante para a abertura da conformação autoinibitória da PTK2, que cursa com o deslocamento espacial do domínio FERM em relação ao domínio quinase, possibilitando a autofosforilação do resíduo tirosina 397 da PTK2 [10], evento que leva ao recrutamento da Src e posterior fosforilação da alça de ativação do domínio quinase, promovendo a ativação total do domínio catalítico de PTK2 [11]. Dessa forma, nossos dados indicam que a SUMOilação da PTK2 é umas das respostas ativadas durante o estresse genotóxico, processo que pode culminar na ativação desta quinase e também como uma marca sinalizadora para a atuação da maquinaria do sistema de qualidade proteico da célula [12, 13].

3.2 Interação entre as proteínas PTK2 e ubiquitina não ocorre no interior dos clusters nucleares de PTK2

Novamente, notou-se que, nas células controle, a distribuição das proteínas ubiquitina e PTK2 é homogênea, também com maior marcação no interior do núcleo (Fig. 4). Por outro lado, nas células que receberam o tratamento com doxorubicina, a distribuição de PTK2 e ubiquitina se concentra fortemente no interior do núcleo (Fig. 4). Como descrito anteriormente, PTK2 se organizou em *clusters* densos e bem visíveis, com algumas regiões de co-localização com ubiquitina em torno desses aglomerados, ou seja, na PTK2 dispersa pelo núcleo. No entanto, não foram observados pontos de co-localização entre PTK2 e ubiquitina nas regiões internas aos *clusters*. A ubiquitinação é uma forma de modificação pós-traducional, e acontece a partir de ligações covalentes isopeptídicas entre a glicina carboxi-terminal da ubiquitina e o grupo ϵ -amino da lisina na proteína alvo [14], formando uma cauda de poliubiquitinas. A cauda de poliubiquitinas é reconhecida como um sinal de degradação, enviando a proteína mal enovelada para ser degradada pelo proteassomo [14].

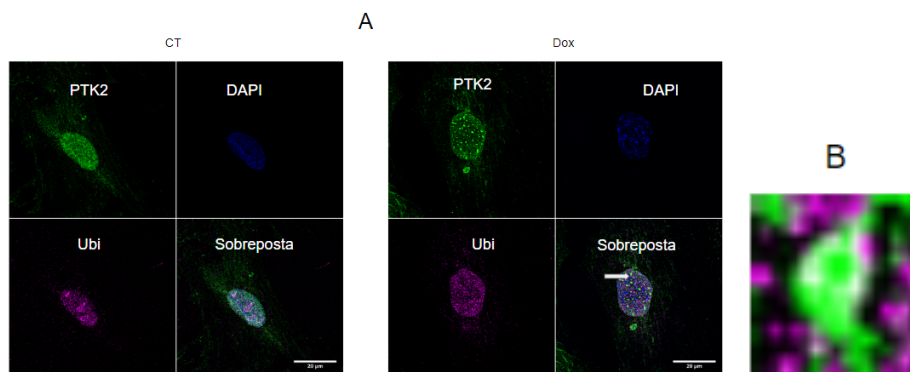


Figura 4: A. Células marcadas com PTK2 (canal 488), em verde, ubiquitina (canal 546), em roxo, e DAPI (canal 405), em azul, em células controle, à esquerda, e tratadas com doxorubicina, à direita. B. Imagem aproximada da região indicada pela seta, do último quadro de células tratadas com doxorubicina. A ubiquitina não se encontra no interior dos clusters de PTK2.

Esse dado indica que a PTK2 contida nos clusters não está disponível para ubiquitinação pelo sistema ubiquitina-ligase, diferente da PTK2 distribuída pelo núcleo, o que significa que a PTK2 é protegida contra a degradação, o que favorece a sobrevivência celular durante o estresse.

3.3 VCP se localiza em posições adjacentes aos clusters de PTK2

A proteína VCP, em células tratadas com doxorubicina, se encontra em regiões adjacentes aos aglomerados de PTK2, formando uma espécie de rede em seu entorno, como observado na figura 5. A chaperona VCP possui atividade de AAA+ ATPase, o que permite o desenovelamento de proteínas para degradação em proteassomos, na desmontagem de complexos proteicos e no desenovelamento de proteínas agregadas ou mal dobradas [15]. A atuação desta chaperona nos agregados nucleares de PTK2 pode indicar seu envolvimento no controle de qualidade dessa quinase. Isso torna a VCP parte importante da via de regulação da qual a PTK2 participa, permitindo a estabilização de sua estrutura e seu bom funcionamento celular durante situações de estresse.

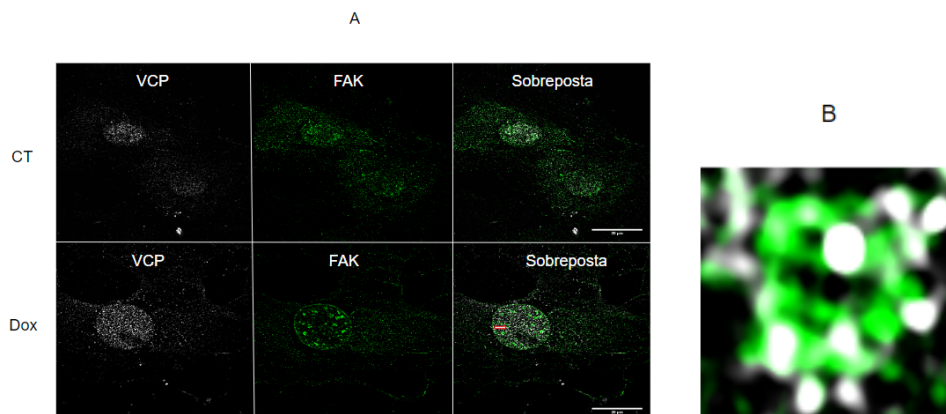


Figura 5: A. Células controle (acima) e tratadas com doxorubicina (abaixo), marcadas com anticorpos fluorescentes para VCP (canal 647), em cinza, BCLAF1 (canal 546), em vermelho, e PTK2 (canal 488), em verde. B. Imagem aproximada da sobreposição dos canais da célula tratada com doxo.. Pode-se observar a VCP atuando em regiões adjacentes aos clusters de PTK2.

3.4 Análise de expressão de PTK2 durante o estresse oxidativo e genotóxico causado pela exposição à doxorubicina.

As amostras que serão utilizadas nos experimentos de Western Blotting e PCR quantitativo propostos no objetivo 1 já foram coletadas e os experimentos serão realizados ainda no mês de agosto.

4 CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que em células tratadas com doxorubicina, há a formação de clusters de PTK2 rodeados por ubiquitina, com uma marcação negativa para ubiquitina em seu interior, o que indica que a PTK2 contida nos clusters não está disponível para ubiquitinação, processo que culminaria em sua degradação. Por outro lado, observou-se que PTK2 colocaliza com SUMO nesses sítios nucleares, o que indica a participação da SUMOilação na regulação de PTK2 durante a resposta ao estresse desencadeado pela doxorubicina. Nossos dados também indicaram que a interação de PTK2 com a chaperona VCP pode estar relacionada com a dinâmica organizacional dos clusters de PTK2 e com a manutenção da solubilidade dessa quinase durante o estresse oxidativo e genotóxico, evento que contribui para a manutenção da sobrevivência dos miócitos cardíacos

5 BIBLIOGRAFIA

1. Cheng, Z., DiMichele, L.A., Rojas, M., Vaziri, C., Mack, C.P., and Taylor, J.M. (2014). Focal adhesion kinase antagonizes doxorubicin cardiotoxicity via p21(Cip1.). *J Mol Cell Cardiol* 67, 1-11.
2. Tang, K.J., Constanzo, J.D., Venkateswaran, N., Melegari, M., Ilcheva, M., Morales, J.C., Skoulidis, F., Heymach, J.V., Boothman, D.A., and Scaglioni, P.P. (2016). Focal Adhesion Kinase Regulates the DNA Damage Response and Its Inhibition Radiosensitizes Mutant KRAS Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 22, 5851-5863.
3. Santos, A.M., Schechtman, D., Cardoso, A.C., Clemente, C.F., Silva, J.C., Fioramonte, M., Pereira, M.B., Marin, T.M., Oliveira, P.S., Figueira, A.C., et al. (2012). FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. *Nat Chem Biol* 8, 102-110.
4. Hytönen, V.P., and Wehrle-Haller, B. (2016). Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Exp Cell Res* 343, 35-41.
5. Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., and Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2, 249-256.
6. Schaller, M.D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 123, 1007-1013.
7. Pereira, M.B., Santos, A.M., Gonçalves, D.C., Cardoso, A.C., Consonni, S.R., Gozzo, F.C., Oliveira, P.S., Pereira, A.H., Figueiredo, A.R., Tiroli-Cepeda, A.O., et al. (2014). α B-crystallin interacts with and prevents stress-activated proteolysis of focal adhesion kinase by calpain in cardiomyocytes. *Nat Commun* 5, 5159.
8. Sun, S., Wu, H.J., and Guan, J.L. (2018). Nuclear FAK and its kinase activity regulate VEGFR2 transcription in angiogenesis of adult mice. *Sci Rep* 8, 2550.
9. Hickey CM, Wilson NR, Hochstrasser M. 2012 Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 755– 766. (doi:10.1038/nrm3478).
10. Kadaré G, Toutant M, Formstecher E, Corvol JC, Carnaud M, Bouterin MC, Girault JA. PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):47434-40. doi: 10.1074/jbc.M308562200. Epub 2003 Sep 18. PMID: 14500712.
11. Structural basis for the autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. Daniel Lieth^{1,2}, Xinming Cai³, Derek F.J. Ceccarelli⁴, Yiqun Li², Michael D. Schaller³, and Michael J. Eck¹.
12. Clemente, C.F., Xavier-Neto, J., Dalla Costa, A.P., Consonni, S.R., Antunes, J.E., Rocco, S.A., Pereira, M.B., Judice, C.C., Strauss, B., Joazeiro, P.P., et al. (2012). Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic growth by activating the AKT and mTOR pathways. *J Mol Cell Cardiol* 52, 493-501.
13. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 2006 Mar;31(1):137-55. doi: 10.1007/BF02705243. PMID: 16595883.
14. Hoppe T 2005 Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all; *Trends Biochem. Sci.* 30 183–187.
15. Xia D, Tang WK, Ye Y. Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p. *Gene.* 2016;583(1):64-77. doi:10.1016/j.gene.2016.02.042.