

Efeitos da inibição da quinase FAK na via de sinalização ATM/Chk2/p53/p21 durante a resposta ao dano no DNA em cardiomiócitos

Aluna responsável: Lara Basseres Novais, IB UNICAMP
Orientadora: Aline Mara dos Santos, IB UNICAMP
Co-orientador: André Alexandre de Thomaz, IFGW UNICAMP

Palavras-Chave: Resposta ao dano no DNA, FAK, Sinalização

Introdução

A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (doxo) é um dos efeitos colaterais mais importantes deste quimioterápico, provocando cardiomiopatias em pacientes oncológicos. Apesar de causar citotoxicidade em células tumorais, a doxo apresenta ação sistêmica, gerando efeitos colaterais indesejados. Ainda que na faixa de dose recomendada, a doxo pode causar cardiomiopatias subclínicas e danos irreversíveis no coração.⁴ Para lidar com as quebras de DNA causadas durante o estresse genotóxico gerado pela doxo as células ativam vias de resposta ao dano de DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*).^{5,6} Uma das principais vias ativadas durante a DDR é a via da ATM, Chk2, p53 e p21.⁶ Nesse contexto, estudos mostram que a proteína FAK (quinase de adesão focal) tem um efeito pró-sobrevivência celular e é encontrada no núcleo durante estresse genotóxico de cardiomiócitos^{7,8,9,10}, tendo um papel na regulação da degradação de p53 como plataforma de interação entre p53 e MDM2.¹¹ Isso indica que a FAK pode ter um papel relevante na sinalização de resposta ao dano ao DNA (DDR) em cardiomiócitos embora os mecanismos moleculares pelos quais FAK atua na manutenção da sobrevivência celular durante esse estresse, especialmente aqueles relacionados à sua função quinase, ainda são pouco explorados.¹² Neste projeto buscamos investigar o impacto da inibição da quinase FAK na ativação e distribuição das proteínas da via de resposta ao dano no DNA ATM/Chk2/p53/p21 e o efeito dessa inibição na viabilidade celular frente o estresse genotóxico causado por doxorubicina.

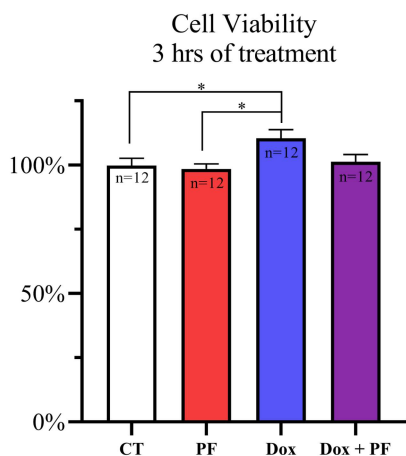
Resultados

Efeito da inibição de FAK na viabilidade de cardiomiócitos tratados com doxorubicina

A realização de ensaios MTT para os grupos de tratamento: controle (CT), inibidor de FAK (PF), doxorubicina (Dox) e inibidor de FAK simultâneo à doxorubicina (Dox+PF); demonstraram que com 3 horas de tratamento (Figura 1.a) a variação na viabilidade celular entre os grupos é sutil, sendo que observamos um aparente aumento de viabilidade no grupo Dox. Isto pode ser explicado por uma taxa de proliferação celular ligeiramente diferente entre os poços. Apesar do efeito negativo da doxorubicina na viabilidade celular ser amplamente conhecido, nossos dados indicam que 3 horas de tratamento não foram suficientes para os efeitos genotóxicos da doxorubicina causarem perda de viabilidade.

Em vista desse resultado inicial realizamos um novo ensaio no qual o tratamento com doxorubicina por 3 horas foi mantido, mas em seguida as células foram deixadas por mais 24 horas em meio controle ou inibidor de FAK de acordo com o tratamento inicial. Ademais, esse experimento também foi repetido com o tempo de recuperação de 48 horas que apresentou resultados muito similares à recuperação de 24 horas (Figura 1.b).

a.



b.

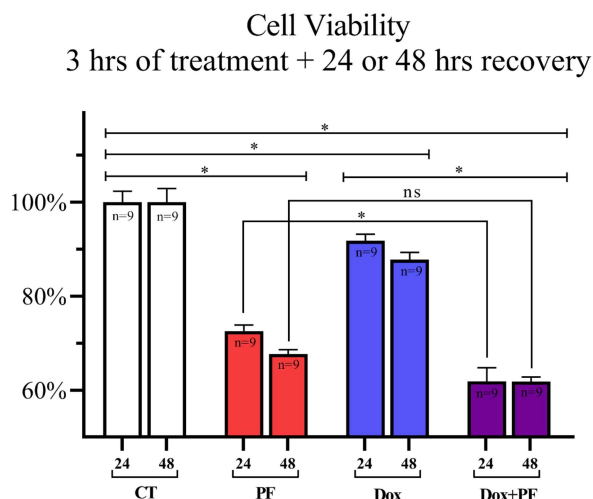


Figura 1. A inibição de FAK durante o tratamento com doxorubicina diminui a viabilidade celular de cardiomiócitos. A viabilidade celular foi verificada por ensaios de MTT em células H9c2 diferenciadas nos grupos: controle (CT), 10 μ M de inibidor de FAK (PF), 1 μ M de doxorubicina (Dox) e 10 μ M de inibidor de FAK simultaneamente com 1 μ M de doxorubicina (Dox+PF) **a.** 3 horas de tratamento (n=12) **b.** 3 horas de tratamento com doxorubicina seguido de 24 ou 48 horas de recuperação com inibidor de FAK nos grupos aplicáveis (n=9). Em ambos os casos

(a,b), os dados apresentaram distribuição normal e foram comparados por *one way ANOVA* (do inglês *analysis of variance*) sendo a significância estatística considerada $p < 0,05$. Nos gráficos está representada a média dos grupos \pm SEM.

Com esse tratamento foi possível observar uma diminuição na viabilidade celular entre CT e Dox indicando que, a longo prazo, as 3 horas de tratamento com doxorubicina causam uma diminuição na viabilidade celular dos cardiomiócitos. Além disso, foi registrada uma significativa diminuição na viabilidade celular de PF em relação ao CT, mostrando que um longo tratamento com PF (24 e 48 horas) é letal para as células. Nossa hipótese para esse resultado está relacionado às funções da FAK na adesão focal e sobrevivência celular, assim sua inativação constante pode levar a problemas de adesão das células ao substrato e ativação de morte celular. Por fim, observamos o resultado mais relevante do ensaio: Dox+PF tem a maior perda de viabilidade quando comparado aos demais grupos; ou seja, a inibição de FAK ao longo da resposta celular ao tratamento com doxorubicina piora a sobrevivência celular frente ao tratamento.

Efeitos da inibição da FAK na localização subcelular das proteínas ATM, Chk2 e p53 em cardiomiócitos tratados com doxorubicina

Para iniciar a caracterização do efeito da doxorubicina em paralelo à inibição de FAK nos cardiomiócitos vista no ensaio MTT, foram realizadas imunofluorescências marcando a FAK e as proteínas da via de interesse: ATM, Chk2 e p53.

Ao observar a marcação de FAK (Figura 2) foi encontrado que os grupos tratados com doxorubicina apresentavam maior intensidade de fluorescência de FAK no núcleo, indicando que durante o estresse genotóxico FAK é translocada para o núcleo das células. Ademais, nos grupos tratados com inibidor de FAK foi possível observar a formação de agregados de FAK no núcleo, e que durante o estresse genotóxico (Dox+PF) esses agregados parecem ser menores e mais brilhantes. Uma hipótese possível para esse comportamento é que estes agregados de FAK formados após o tratamento com PF são resultado do processo de agregação nuclear dessa quinase

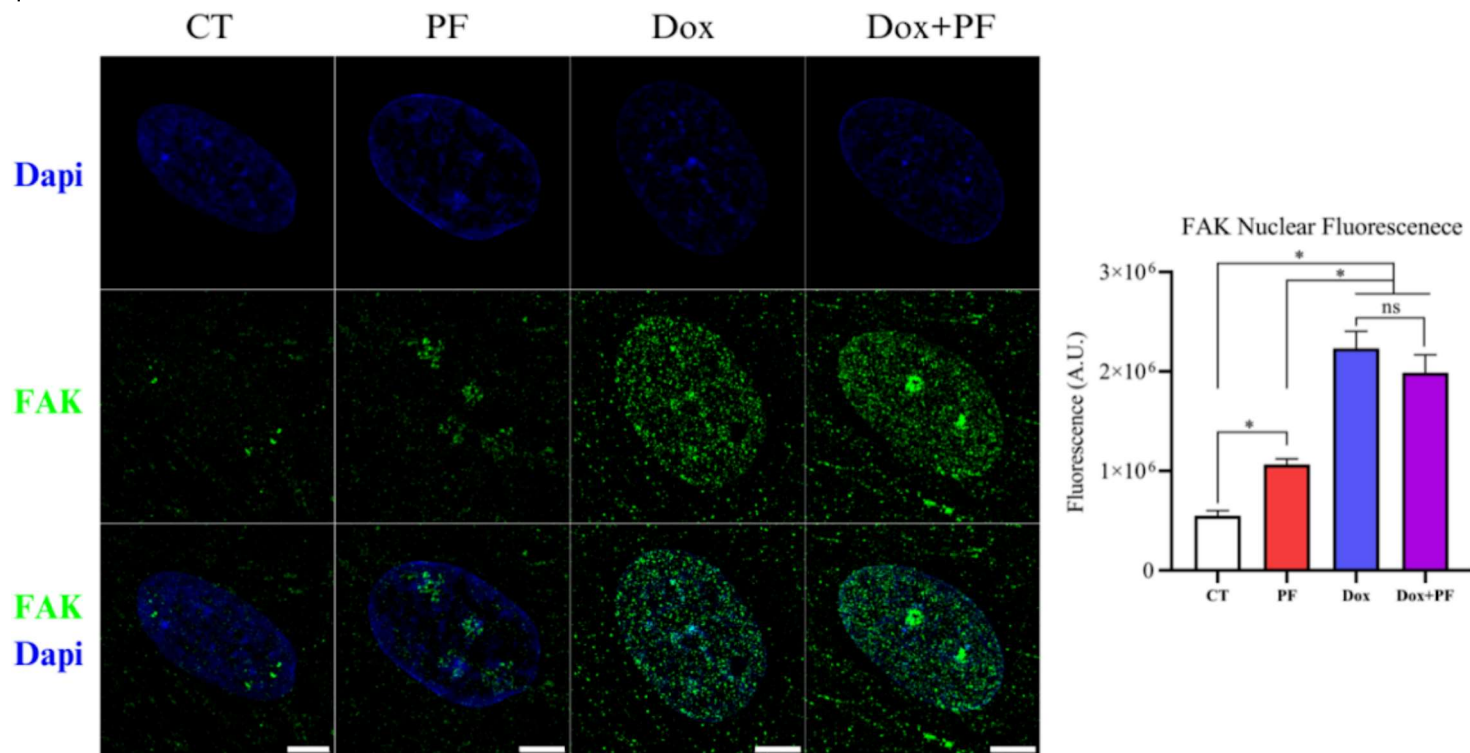


Figura 2. O tratamento com doxorubicina aumenta a intensidade de fluorescência nuclear de FAK e a inibição de FAK propicia a formação de agregados de FAK no núcleo. Os cardiomiócitos não foram tratados (CT) ou foram tratados por 3 horas com 10 μ M de inibidor de FAK (PF), 1 μ M de doxorubicina (Dox) ou 10 μ M de inibidor de FAK simultaneamente com 1 μ M de doxorubicina (Dox+PF). Na esquerda estão as imagens de microscopia de super resolução por iluminação estruturada, adquiridas no microscópio Zeiss Elyra marcando o núcleo com dapi (azul) e FAK (verde). Na direita está a representação quantitativa da intensidade de fluorescência de FAK nos núcleos dos cardiomiócitos, sendo que o número de núcleos quantificados para cada grupo foi: CT (n=27), PF (n=45), Dox (n=32), Dox+PF (n=30). Os dados não apresentaram distribuição normal e foram então comparados pelo teste *Kruskal-Wallis* sendo as comparações individuais entre cada grupo feitas pelo teste *Dunn* não corrigido. No gráfico está representada a média dos grupos \pm SEM. Escala de 5 μ m.

Em seguida, foi realizada uma marcação para ATM (Figura 3.A), em que foi possível verificar que o tratamento com doxorubicina aumentou drasticamente a intensidade de fluorescência nuclear dessa proteína (Figura 3.C), o que indica que a célula está respondendo ao tratamento através da via de ATM. Assim, pudemos concluir que, apesar das 3 horas de tratamento com dox não afetar a viabilidade celular, a via de sinalização ao dano de DNA já é ativada neste período.

Ademais, também observamos que o co-tratamento com a doxorubicina e o inibidor da FAK (Dox+PF) promoveu uma alteração na distribuição de ATM e FAK, as quais aparentam estar menos co-localizadas (Figura 3.B sobreposição indicada pelas setas vermelhas) em comparação com o tratamento com doxorubicina (Dox), indicando que a atividade catalítica da FAK é importante para a distribuição de ATM e para a co-localização de ambas no núcleo durante o tratamento com doxorubicina (Figura 3.B). Os padrões de localização nuclear

observados nos tratamentos apoiam a hipótese de que existe uma interação entre FAK e ATM durante o estresse genotóxico em cardiomiócitos, o que pode contribuir para a atividade pró-sobrevivência da FAK.

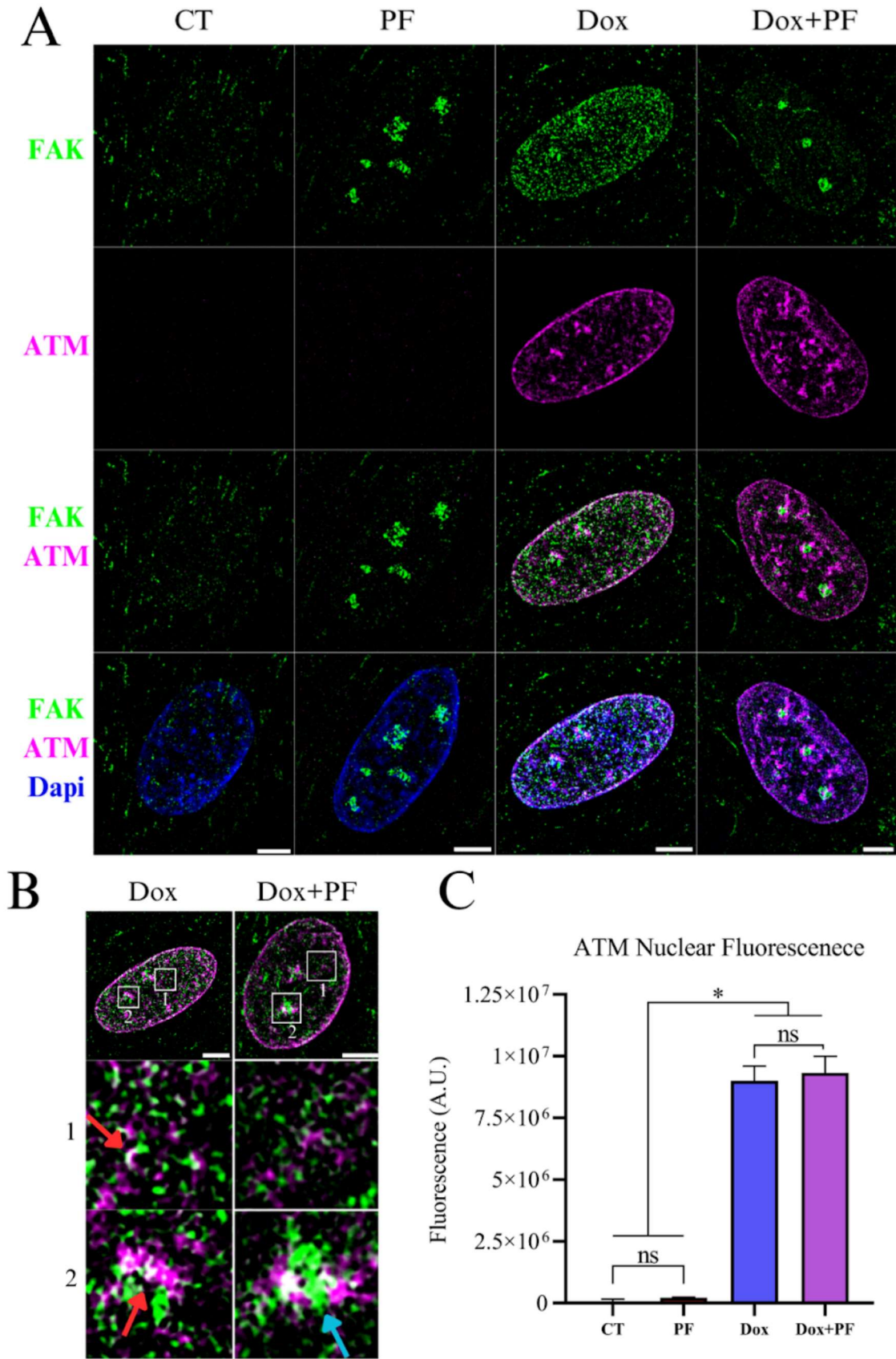


Figura 3. O tratamento com doxorrubicina promove aumento drástico na intensidade de fluorescência nuclear de ATM, validando a eficiência do tratamento na deflagração da via de interesse. Os cardiomiócitos não foram tratados (CT) ou foram tratados por 3 horas com 10 μ M de inibidor de FAK (PF), 1 μ M de doxorrubicina (Dox) ou 10 μ M de inibidor de FAK simultaneamente com 1 μ M de doxorrubicina (Dox+PF). Escala de 5 μ m. **A.** Imagem de microscopia de super resolução por iluminação estruturada, adquirida no microscópio Zeiss Elyra marcando o núcleo com dapi (azul), FAK (verde) e ATM (magenta). **B.** Imagem de microscopia de super resolução por iluminação estruturada, adquirida no microscópio Zeiss Elyra marcando FAK (verde) e ATM (magenta), evidenciando a co-localização das duas proteínas (branco) pelas setas vermelhas. **C.** Representação quantitativa da intensidade de fluorescência de ATM nos núcleos dos cardiomiócitos, sendo que o número de núcleos quantificados para cada grupo foi: CT (n=27), PF (n=45), Dox (n=32), Dox+PF (n=30). Os dados não apresentaram distribuição normal e foram então comparados pelo

teste *Kruskal-Wallis* sendo as comparações individuais entre cada grupo feitas pelo teste *Dunn* não corrigido. No gráfico está representada a média dos grupos +/- SEM.

Além disso, ao marcar Chk2, verificamos também um aumento nítido na intensidade de fluorescência nuclear dessa proteína nos grupos tratados com doxorubicina (Figura 4), coerente com o aumento de ATM visto anteriormente e corroborando a eficiência do tratamento na ativação da via. Surpreendentemente, entre os grupos tratados com doxorubicina foi encontrado um aumento significativo de Chk2 no núcleo durante a inibição de FAK. Apesar de ainda ser necessário aprofundar estas análises, sobretudo com relação à distribuição nuclear de FAK e Chk2, uma hipótese para esse aumento nuclear de Chk2 após a inibição de FAK é que a perda de uma possível interação direta entre FAK e Chk2 no núcleo quando FAK é inativada resulta em menor atividade de Chk2, desencadeando um processo de retroalimentação compensatória que aumenta a expressão de Chk2 ou seu transporte para o núcleo. Alternativamente, essa mudança vista em Chk2 pode ser um efeito indireto da inibição, relacionada à interação entre FAK e ATM, já que ATM é a quinase diretamente responsável pela ativação de Chk2.

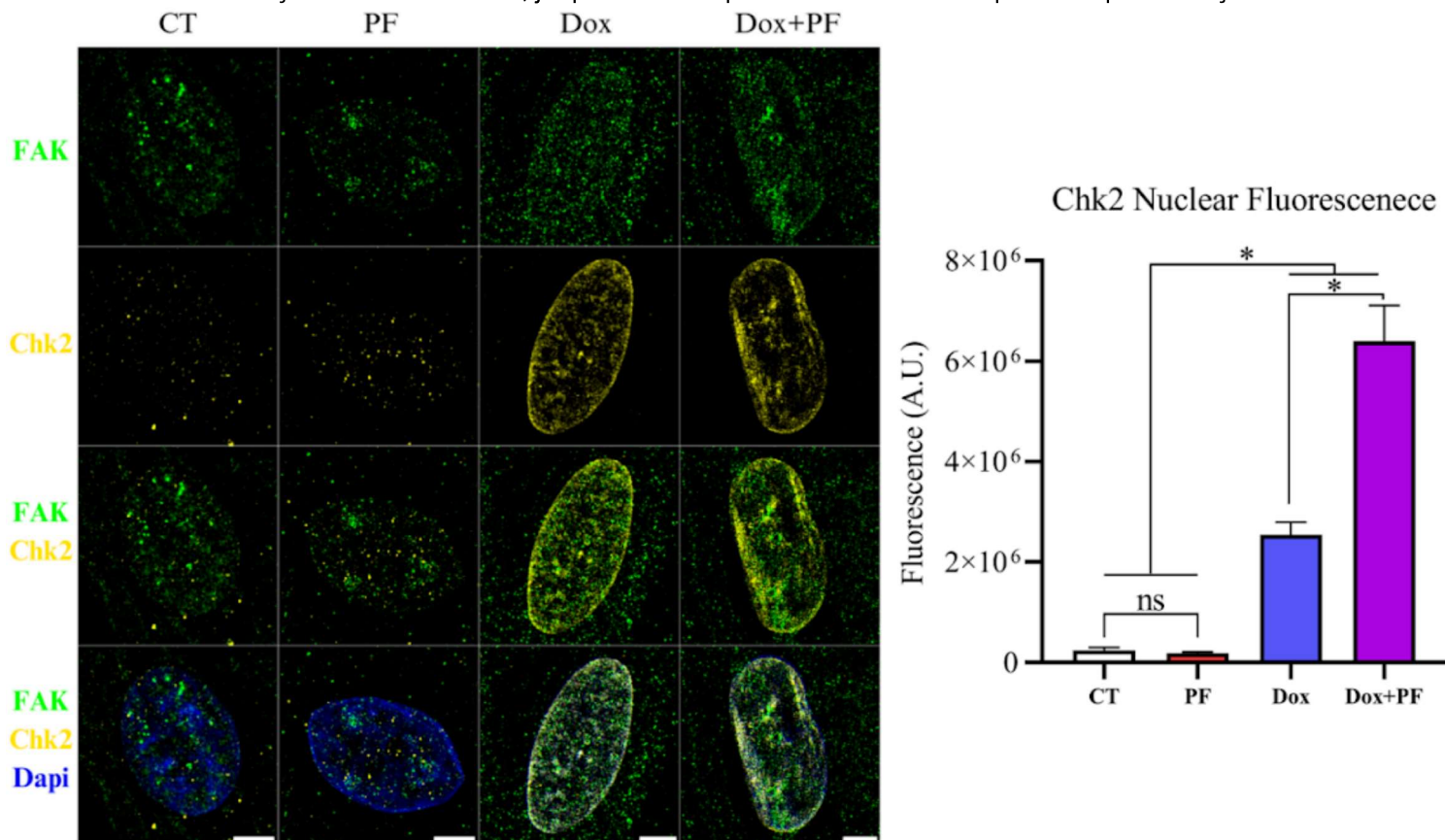


Figura 4. A inibição da FAK causa aumento na intensidade de fluorescência nuclear de Chk2 frente ao estresse genotóxico causado pela doxorubicina. Os cardiomiócitos não foram tratados (CT) ou foram tratados por 3 horas com 10 μ M de inibidor de FAK (PF), 1 μ M de doxorubicina (Dox) ou 10 μ M de inibidor de FAK simultaneamente com 1 μ M de doxorubicina (Dox+PF). Na esquerda estão as imagens de microscopia de super resolução por iluminação estruturada, adquiridas no microscópio Zeiss Elyra marcando o núcleo com dapi (azul) e FAK (verde) e Chk2 (amarelo). Na direita está a representação quantitativa da intensidade de fluorescência de Chk2 nos núcleos dos cardiomiócitos, sendo que o número de núcleos quantificados para cada grupo foi: CT (n=34), PF (n=34), Dox (n=31), Dox+PF (n=31). Os dados não apresentaram distribuição normal e foram então comparados pelo teste *Kruskal-Wallis* sendo as comparações individuais entre cada grupo feitas pelo teste *Dunn* não corrigido. No gráfico está representada a média dos grupos +/- SEM. Escala de 5 μ m.

Por fim, no caso da marcação de p53 foi também encontrado um aumento expressivo na intensidade de fluorescência nuclear durante o tratamento com doxorubicina ilustrando novamente a eficiência do tratamento em causar estresse genotóxico nos cardiomiócitos (Figura 5). Ademais, foi visto um aumento de p53 durante a inibição de FAK e uma tendência a aumento durante a inibição concomitante ao estresse genotóxico. Tendo em vista a interação já descrita entre FAK e p53, em que FAK atua como uma plataforma de interação promovendo a ubiquitinação de p53,¹¹ um aumento na intensidade de fluorescência nuclear nos grupos com FAK inibida indica que a ativação da FAK pode ser importante para a degradação adequada de p53, mas não descartamos a possibilidade desse fenômeno estar relacionado ao efeito da FAK em outro ponto da via.

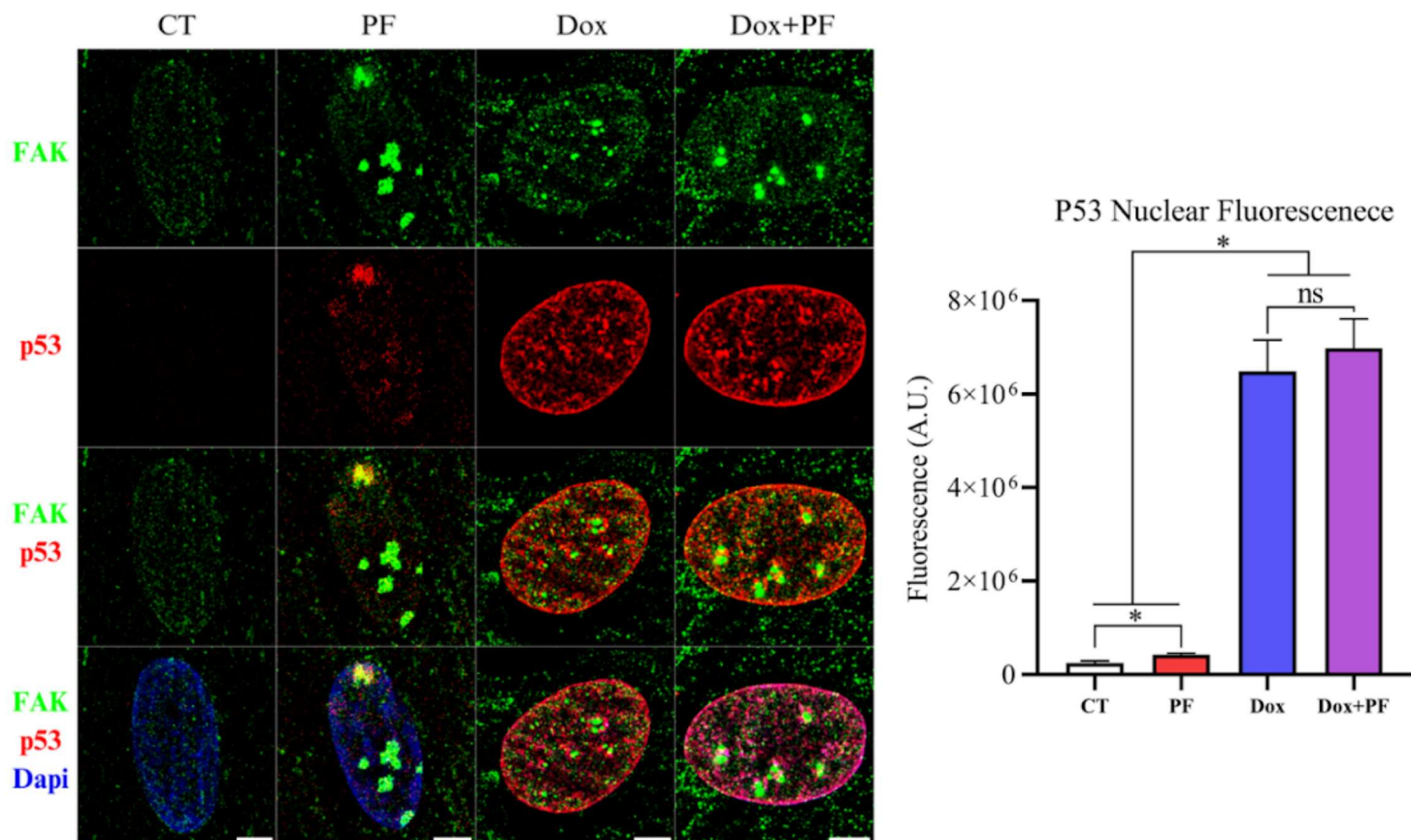


Figura 5. A inibição da FAK causa aumento na intensidade de fluorescência nuclear de p53 e essa inibição gera uma tendência a aumento frente estresse genotóxico causado por tratamento com doxorubicina. Os cardiomiócitos não foram tratados (CT) ou foram tratados por 3 horas com 10µM de inibidor de FAK (PF), 1µM de doxorubicina (Dox) ou 10µM de inibidor de FAK simultaneamente com 1µM de doxorubicina (Dox+PF). Na esquerda estão as imagens de microscopia de super resolução por iluminação estruturada, adquiridas no microscópio Zeiss Elyra marcando o núcleo com dapi (azul) e FAK (verde) e p53 (vermelho). Na direita está a representação quantitativa da intensidade de fluorescência de p53 nos núcleos dos cardiomiócitos, sendo que o número de núcleos quantificados para cada grupo foi: CT (n=34), PF (n=33), Dox (n=32), Dox+PF (n=30). Os dados não apresentaram distribuição normal e foram então comparados pelo teste *Kruskal-Wallis* sendo as comparações individuais entre cada grupo feitas pelo teste *Dunn* não corrigido. No gráfico está representada a média dos grupos +/- SEM. Escala de 5µm.

Conclusão

O tratamento com inibidor de FAK em paralelo à doxorubicina leva a uma piora significativa na viabilidade em cardiomiócitos, mas esse resultado não é visível após 3 horas de tratamento, indicando que nesse estágio as células ainda não passaram por todas as vias e processos necessários para perda de viabilidade. O tempo de tratamento foi eficiente em deflagrar a atividade da via de sinalização ao dano de DNA de interesse: ATM, Chk2, p53. Ademais, o tratamento com doxorubicina provocou a translocação de FAK para o núcleo e o tratamento com inibidor de FAK provocou a formação de agregados de FAK no núcleo. Mais especificamente, o tratamento simultâneo de doxorubicina com inibidor de FAK parece alterar a colocalização de ATM e FAK no núcleo, além de aumentar a intensidade de fluorescência nuclear de Chk2. Por fim, há indicação de que a inibição de FAK pode contribuir para a estabilização de p53 inibindo sua degradação.

Referências

- Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, Rossi F, Berrino L, Naviglio S, Urbanek K. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1521020. doi: 10.1155/2017/1521020. Epub 2017 Oct 18. PMID: 29181122; PMCID: PMC5664340.
- Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 May;7(5):335-46. doi: 10.1038/nrm1907. PMID: 16612326.
- Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019. PMID: 20965415; PMCID: PMC2988877.
- Lim ST. Nuclear FAK: a new mode of gene regulation from cellular adhesions. *Mol Cells*. 2013 Jul;36(1):1-6. doi: 10.1007/s10059-013-0139-1. Epub 2013 May 16. PMID: 23686429; PMCID: PMC3887928.
- Tavora B, Reynolds LE, Batista S, Demircioglu F, Fernandez I, Lechertier T, Lees DM, Wong PP, Alexopoulou A, Elia G, Clear A, Ledoux A, Hunter J, Perkins N, Gribben JG, Hodivala-Dilke KM. Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy. *Nature*. 2014 Oct 2;514(7520):112-6. doi: 10.1038/nature13541. Epub 2014 Jul 27. PMID: 25079333; PMCID: PMC4533916.
- Cheng Z, DiMichele LA, Rojas M, Vaziri C, Mack CP, Taylor JM. Focal adhesion kinase antagonizes doxorubicin cardiotoxicity via p21(Cip1). *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Feb;67:1-11. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.002. Epub 2013 Dec 14. PMID: 24342076; PMCID: PMC4237309.
- Tang KJ, Constanzo JD, Venkateswaran N, Melegari M, Ilcheva M, Morales JC, Skoulidis F, Heymach JV, Boothman DA, Scaglioni PP. Focal Adhesion Kinase Regulates the DNA Damage Response and Its Inhibition Radiosensitizes Mutant KRAS Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016 Dec 1;22(23):5851-5863. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2603. Epub 2016 May 24. PMID: 27220963; PMCID: PMC5122471.
- Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell*. 2008 Jan 18;29(1):9-22. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.031. PMID: 18206965; PMCID: PMC2234035.
- Sonoda Y, Matsumoto Y, Funakoshi M, Yamamoto D, Hanks SK, Kasahara T. Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem*. 2000 May 26;275(21):16309-15. doi: 10.1074/jbc.275.21.16309. PMID: 10821872.