

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

María José González Armijos

O CÁLCIO LIBERADO PELO RECEPTOR DO INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO DA ISOFORMA III (ITPR3) ATIVA A FORMAÇÃO DE FILAMENTOS DE ACTINA NUCLEAR: uma nova via de sinalização com potencial teranóstico para o câncer

Belo Horizonte

2025

María José González Armijos

O CÁLCIO LIBERADO PELO RECEPTOR DO INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO DA ISOFORMA III (ITPR3) ATIVA A FORMAÇÃO DE FILAMENTOS DE ACTINA NUCLEAR: uma nova via de sinalização com potencial teranóstico para o câncer

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em bioquímica e imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em bioquímica e imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Dawidson A. Gomes

Coorientadora: Dra. Michele A. Rodrigues

Coorientador: Michael H Nathanson

Belo Horizonte

2025

043

Armijos, María José González.

O cálcio liberado pelo receptor do inositol 1,4,5-trifosfato da isoforma III (ITPR3) ativa a formação de filamentos de actina nuclear: uma nova via de sinalização com potencial terapêutico para o câncer [manuscrito] / María José González Armijos. – 2025.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Dawidson A. Gomes. Coorientadora: Dra. Michele A. Rodrigues; Coorientador: Michael H Nathanson.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Cálcio. 3. Citoesqueleto de Actina. 4. Inositol 1,4,5-Trifosfato. 5. Miosina não Muscular Tipo IIA. I. Gomes, Dawidson Assis. II. Rodrigues, Michele Angela. III. Nathanson, Michael H. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARÍA JOSÉ GONZÁLEZ ARMIJOS.

Aos trinta dias do mês de setembro de 2025 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O cálcio liberado pelo receptor do inositol 1,4,5-trifosfato da isoforma III (ITPR3) ativa a formação de filamentos de actina nuclear: uma nova via de sinalização com potencial teranóstico para o câncer", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dawidson Assis Gomes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Célio de Castro Júnior (Santa Casa de Misericórdia-BH), aprovada; Dr. Breno de Mello Silva (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dr. Gregory Thomas Kitten (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Michael H. Nathanson - Coorientador (Yale University School of Medicine), aprovada; Dra. Michele Angela Rodrigues - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Dawidson Assis Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

(X) APROVADA

() REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de setembro de 2025.

Documento assinado digitalmente



CELIO JOSE DE CASTRO JUNIOR
Data: 06/10/2025 09:23:30-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Célio de Castro Júnior (Santa Casa de Misericórdia-BH)

Documento assinado digitalmente



BRENO DE MELLO SILVA
Data: 05/10/2025 01:11:07-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Breno de Mello Silva (Universidade Federal de Ouro Preto)

Documento assinado digitalmente



GREGORY THOMAS KITTEN
Data: 03/10/2025 14:30:07-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Gregory Thomas Kitten (UFMG)

Documento assinado digitalmente



ERICH BIRELLI TAHARA
Data: 06/10/2025 15:00:51-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)



Dr. Michael H. Nathanson - Coorientador (Yale University)

Documento assinado digitalmente



MICHELE ANGELA RODRIGUES

Data: 01/10/2025 19:05:42-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Michele Angela Rodrigues - Coorientadora (UFMG)

Documento assinado digitalmente



DAWIDSON ASSIS GOMES

Data: 01/10/2025 19:14:05-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Dawidson Assis Gomes - Orientador (UFMG)

Este trabalho dedico a Deus pela vida e força para finalizar está última etapa da pós-graduação. A meus pais María Armijos e José Gonzalez (+) por me ensinarem o caminho da humildade e da perseverança. A meu esposo Luis Viteri, meu amor e amigo por me levantar cada vez que caí e as minhas irmãs Marisol e Yajaira, pelo amor. Meu sobrinho Camilo Alejandro por me lembrar a criança que existe em meu interior.

Agradecimentos

Meu maior agradecimento a Deus pela vida da minha mãe Maria Victoria, pelo amor, pelas palavras de carinho e força nos momentos difíceis, muito obrigada mãe. Também agradeço a meu Pai Jose Gonzalez (+). Pai, cumpri nosso sonho e envio abraços até o céu, meu amor.

A meu padrasto Manuel Guamán pela confiança e pelas palavras de carinho e força que sempre me deu, obrigada por ser um bom padrasto.

A meu esposo Luis Viteri, companheiro de aventuras, de ciência e convivência, obrigada pelo amor, ajuda e compressão que me deu durante toda minha vida estudantil.

A minhas irmãs por serem meu pilar e sempre estarem prontas para me ajudarem quando mais precisei. A meu sobrinho Camilo Alejandro, que faz minha vida mais bonita e com seu sorriso me devolve o dia gris em azul. Ao nosso pet Arthur, que só com olhar já muda o meu dia para melhor.

Meu infinito agradecimento ao professor Dawidson Assis Gomes, por abrir as portas do seu laboratório, me ensinar com muito carinho, me dar conselhos e pela ajuda e confiança dada a mim durante o doutorado, muito obrigada pai científico.

Ao professor Michael H. Nathanson do departamento de medicina interna da Universidade de Yale (USA), expresso meu agradecimento por confiar em mim e me acolher em seu laboratório durante o último ano do meu doutorado. Obrigada professor por me coorientar e me ter dado a oportunidade de aprender novas técnicas, metodologias e por me permitir avançar.

À Dra. Michele Rodrigues pela amizade, coorientação e por ter aberto as portas para mim não só do seu conhecimento, mas também de sua casa.

Meu agradecimento ao governo brasileiro que através das agências de fomento tornaram a realização desse trabalho possível. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; APQ-03132-18; APQ-02135-24), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Rede Mineira de Engenharia de Tecidos e Terapia Celular (REMETTEC; FAPEMIG; RED00213-23), Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Oncologia (ReMPTO; RED00059-23; FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq;

307998/2022-3; 442098/2023-5; 446384/2024-0) por apoiarem este trabalho. Ao CNPq pela bolsa concedida para meu doutorado no programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia tanto no Brasil quanto meu doutorado sanduiche nos Estados Unidos (442098/2023-5); obrigada Brasil.

A meus Amigos do Biolink: Josimar Batista, meu querido amigo e confidente; Clara Fernandez, amiga do “vamos tomar um cafezinho”; Thais Bassani, nossa alegria do laboratório que deixa os dias mais leves; Mauro, o pós-doc disposto a ajudar sempre, obrigada pelas dicas; as ICs Vanessa e Erica, por me ensinarem a ter paciência e me lembrar de quando eu também era IC.

Quero agradecer também aos meus amigos do programa da Pós-graduação que sempre me acompanharam e estiveram comigo me dando palavras de alento e força: Manuela, Hellen, Mateus, Luiz Pedro, Amanda e Fred e Laura.

Meus agradecimentos aos técnicos da UFMG, Samuel Rocha e as duas Nathalias, obrigada pela ajuda prestada durante a aquisição das imagens e pelas longas conversas que tivemos. Aos técnicos do Laboratório na Universidade de Yale, Emma e Matheus deixo meu agradecimento eterno, já que sem vossa ajuda minha permanência e meu caminhar na universidade de Yale, teria sido bem mais difícil. Obrigado por seus ensinamentos, sua predisposição a me ajudar sempre e por seus conselhos.

Finalmente quero deixar minha imensa gratidão a Cladiana Gomes Aparecida, minha companheira de república em Belo Horizonte. Muito obrigada Clau por ter sido amiga, companheira e nunca ter me deixado sozinha desde que cheguei ao Brasil, você foi um pilar fundamental na minha vida e um exemplo a seguir.

"É por meio da educação que a filha de um fazendeiro pode se tornar médica, que o filho de um mineiro pode se tornar o chefe de uma mina, que o descendente de um camponês pode se tornar o presidente de uma grande nação"

Nelson Mandela

Resumo

O cálcio (Ca^{2+}) é um importante segundo mensageiro que atua em funções como proliferação, migração e regulação da expressão gênica. Esse íon é armazenado em organelas celulares, como no retículo endoplasmático (RE) e envelope nuclear. A liberação deste íon no citoplasma tem início com a ativação de receptores de membrana, que por sua vez ativam as fosfolipases C (PLC). As PLCs hidrolisam o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), gerando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). Em seguida, o IP₃ se liga aos receptores de IP₃ (ITPRs), promovendo a liberação de Ca^{2+} no citoplasma ou núcleo. No entanto, evidências indicam que o núcleo celular possui uma maquinaria de liberação de Ca^{2+} , mas as funções do Ca^{2+} nuclear ainda são pouco conhecidas. O objetivo deste trabalho foi estudar a função e a interação do ITPR isoforma 3 (ITPR3) com a miosina não muscular IIa (MYH9) e a β -actina no núcleo. Inicialmente realizaram-se ensaios de Western Blot e de espectrometria de massa nas frações nucleares das células U2OS WT e MDCK.2; que permitiram evidenciar a expressão e interação da β -actina (ACTB) com a MYH9 e o ITPR3. Paralelamente, foram realizados ensaios de imunofluorescência em células U2OS WT, MDCK, NIH/3T3, MzChA1 e MzChA KO para o ITPR3, onde observou-se a interação nuclear das MYH9, β -actina e o ITPR3. Posteriormente, ensaios de Ca^{2+} foram conduzidos em células U2OS WT e NIH/3T3 para avaliar a capacidade do Soro Fetal Bovino (SBF), ionomicina e fator do crescimento epidermal (EGF) como estimuladores da liberação de Ca^{2+} nuclear. Para elucidar o mecanismo de liberação do Ca^{2+} no núcleo, as células U2OS WT e NIH/3T3 foram transfectadas com a “Nuclear Actin Chromobody” (nAC), construção que possibilita a visualização dos filamentos de actina nucleares, estimuladas com os três agonistas e as imagens foram obtidas por microscopia. Em seguida, o ITPR3 foi silenciado em células U2OS nAC e NIH/3T3 nAC; ensaios de microscopia após estimular as células com os agonistas previamente descritos também foram realizados. Para corroborar esses resultados, efetuou-se o ensaio de Ca^{2+} e ensaio de formação de filamentos de actina nuclear em células U2OS WT infectadas com adenovírus que expressam somente a proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP), os tampões de IP₃ com sinal de localização nuclear (mRPP-IP₃-NLS) ou IP₃ sinal de exclusão nuclear (mRPF-IP₃-NES), seguidos de estimulação com EGF. Por fim, usou-se o banco de dados GEPIA2 para analisar a superexpressão de ITPR3, MYH9 e β -actina em diversos tipos de tumores. Em resumo, o estudo confirma, por múltiplas técnicas, a expressão e interação de ITPR3, MYH9 e β -actina no núcleo de várias linhagens celulares, além de demonstrar que o ITPR3 é responsável pela liberação de Ca^{2+} nuclear importante para a formação dos filamentos de actina nucleares. Essa via de sinalização pode estar envolvida na progressão tumoral, conferindo potencial valor terapêutico às proteínas estudadas.

Palavras-Chave: núcleo., inositol 1,4,5-trifosfato da isoforma III (ITPR3)., MYH9., ACTB (β -actina)., cálcio e filamentos de actina.

Abstract

Calcium (Ca^{2+}) is an important second messenger involved in functions such as proliferation, migration, and regulation of gene expression. This ion is stored in cellular organelles such as the endoplasmic reticulum (ER) and the nuclear envelope. Its release into the cytoplasm begins with the activation of membrane receptors, which in turn activate phospholipase C (PLC). PLCs hydrolyze phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), generating diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). IP3 then binds to IP3 receptors (ITPRs), promoting Ca^{2+} release into the cytoplasm or nucleus. However, evidence indicates that the cell nucleus possesses its own machinery for Ca^{2+} release, though the functions of nuclear calcium remain poorly understood. The aim of this study was to investigate the function and interaction of ITPR isoform 3 (ITPR3) with non-muscular myosin IIa (MYH9) and β -actin in the nucleus. Initially, Western blot and mass spectrometry assays were performed on nuclear fractions of U2OS WT and MDCK.2 cells, revealing expression and interaction of β -actin (ACTB) with MYH9 and ITPR3. In parallel, immunofluorescence assays for ITPR3 were conducted in U2OS WT, MDCK, NIH/3T3, MzChA1, and MzChA1 KO cells, where nuclear interaction between MYH9, β -actin, and ITPR3 were observed. Subsequently, Ca^{2+} assays were performed in U2OS WT and NIH/3T3 cells to evaluate the ability of fetal bovine serum (FBS), ionomycin, and epidermal growth factor (EGF) to stimulate nuclear Ca^{2+} release. To elucidate the mechanism of nuclear Ca^{2+} release, U2OS WT and NIH/3T3 cells were transfected with the “Nuclear Actin Chromobody” (nAC), a construct that enables visualization of nuclear actin filaments. These cells were stimulated with the three agonists, and imaging was performed using microscopy. Next, ITPR3 was knockdown in U2OS nAC and NIH/3T3 nAC cells, followed by microscopy assays after stimulation with the same agonists. To corroborate these findings, a Ca^{2+} assay and nuclear actin filament formation assay were conducted in U2OS WT cells infected with adenoviruses expressing only monomeric red fluorescent protein (mRFP), nuclear-localized IP3 buffers (mRFP-IP3-NLS) or nuclear-excluded IP3 (mRFP-IP3-NES), followed by EGF stimulation. Finally, the GEPIA2 database was used to analyze the overexpression of ITPR3, MYH9, and β -actin in various types of tumors. In summary, the study confirms, using multiple techniques, the expression and interaction of ITPR3, MYH9, and β -actin in the nucleus of several cell lines. It also demonstrates that ITPR3 is responsible for nuclear calcium release, which is necessary for the formation of nuclear actin filaments. This signaling pathway may be involved in tumor progression, conferring potential theranostic value to the proteins studied.

Keywords: nucleus., inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform III (ITPR3)., MYH9., ACTB (β -actin)., calcium., actin filaments.

Lista de figuras

Figura 1. Liberação do Ca^{2+} mediante os receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPRs).....	22
Figura 2. Tipos de invaginações da membrana nuclear.	23
Figura 3. Esquema da sinalização nuclear via ITPR3.	26
Figura 4. Importação e exportação da actina no núcleo.	28
Figura 5. Representação da MYH9.....	29
Figura 6. Análise da expressão diferencial do interactoma do ITPR3 comparando as frações nucleares e não nucleares de células MDCK.	45
Figura 7. Interactoma nuclear da β -actina em células U2OS tratadas com latrunculina B.	47
Figura 8. Interação do ITPR3 com o complexo actina-miosina.	48
Figura 9. Expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina na fração nuclear de células U2OS.	49
Figura 10. Expressão de ITPR3, MYH9 e β -actina na fração nuclear de células NIH/3T3.	50
Figura 11. Expressão de ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações nuclear e não nuclear em células MDCK.	51
Figura 12. Western blot das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina no núcleo das células MzChA1 WT e MzChA1 KO.	52
Figura 13. Localização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células U2OS WT, NIH/3T3 e MDCK.	53
Figura 14. Reconstrução tridimensional evidenciando a colocalização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células U2OS.....	54
Figura 15. Reconstrução tridimensional evidenciando a colocalização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células NIH/3T3..	55
Figura 16. Reconstrução tridimensional evidenciando a colocalização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células MDCK.	56
Figura 17. Expressão e colocalização das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina.	57
Figura 18. Soro fetal bovino e Ionomicina estimulam a libertação de Ca^{2+}	60
Figura 19. Formação de Filamentos de F-actina em Células U2OS.	62
Figura 20. Formação de Filamentos de F-actina em Células NIH/3T3.	63
Figura 21. EGF induz a formação de filamentos de actina em células U2OS.	64

Figura 22. Silenciamento de ITPR3 em células U2OS WT e Formação da Actina Nuclear em células U2OS nAC.....	66
Figura 23. Silenciamento de ITPR3 em células NIH/3T3 e Formação da Actina Nuclear em células NIH/3T3 nAC.	67
Figura 24. O IP3-NLS inibe a sinalização de Ca²⁺ induzida por EGF em células U2OS.....	69
Figura 25. A superexpressão de ITPR3, MYH9 e β-actina diminui a sobrevivência dos pacientes com câncer.	71

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências do ITPR3 utilizadas no silenciamento do ITPR3 em células U2OS e NIH/3T3.....	41
Tabela 2. Lista das 20 proteínas, mas abundantes na fração nuclear de células MDCK.....	46
Tabela 3. Lista das 9 proteínas mais abundantes no grupo de células U2OS não tratadas com com Lat-B.	48

Lista de abreviaturas e siglas

ACTB: β -actina

ATCC: The American Type Culture Collection

BSA: Albumina Sérica Bovina

DAG: Diacilglicerol

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Fator de Crescimento Epidermal

EN: Envelope Nuclear

RE: Retículo endoplasmático

Fluo-4 AM: Fluo-4 acetoximetil ester.

GBM: Glioblastoma

GPCR: Receptores acoplados a proteína G

G418: Geneticina

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanossulfônico

IMN: Membrana nuclear interna

IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato

IP3-NES: Tampão de IP3 com sinal de exclusão nuclear (IP3-NES)

IP3-NLS: Tampão de IP3 com sinal de localização nuclear (IP3-NLS)

ITPR3: Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato da isoforma III

Lat-B: Latrunculina B

MDCK: Células do rim de cachorro adulto

mRFP: proteína fluorescente vermelha monomérica

MS: Espectrometria de massa

MYH9: Miosina 2A não muscular

nAC/ TagGFP: nanoanticorpo para actina nuclear (*Nuclear Actin Chromobody*)

NES: Sinal de exclusão nuclear

NIH/3T3: Fibroblastos do embrião do rato NIH/swiss

NLS: Sinal de localização nuclear

OMN: Membrana nuclear externa

Opti-MEM™: Meio essencial mínimo otimizado para uso reduzido de soro

PAAD: Adenocarcinoma Pancreático

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

Pen/Strept/Anfot: Penicilina, estreptomicina e anfotericina

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PLC: Fosfolipases C

RTK: Receptores de tirosina cinase

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

U2OS: Células do Osteosarcoma Humano

Sumário

1. Introdução	19
2. Revisão de literatura	20
2.1. O Cálcio e o Retículo endoplasmático	20
2.2. O envelope nuclear e o retículo nucleoplasmático	22
2.3. A família dos ITPRs	24
2.4. Actina	27
2.5. Família das Miosinas	28
3. Justificativa	31
4. Objetivos	32
4.1. Objetivo Geral	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. Metodologia	33
5.1. Cultura Celular	33
5.2. Imunoprecipitação	34
5.3. Análises de espectrometria de massa	35
5.4. Análises de bioinformática para caracterização do complexo proteico e de possíveis sinais de localização nuclear das proteínas estudadas	36
5.5. Fracionamento celular e Western Blot	36
5.6. Imunofluorescência das proteínas β -Actina, MYH9 e ITPR3 nas células U2OS WT, NIH/3T3 e nas células MDCK	37
5.7. Estabelecimento de células estáveis com a construção nAC	38
5.8. Formação dos filamentos de actina em células U2OS WT e NIH/3T3, estimuladas com SFB e ionomicina	39
5.9. Silenciamento do ITPR3 nas células U2OS e NIH/3T3 expressando à nAC, seguido por Western blot	40
5.10. Formação dos filamentos de actina em células as U2OS nAC e NIH/3T3 nAC, silenciado o ITPR3 e estimuladas com soro ou ionomicina	41

5.11. Experimentos com os adenovírus para expressão dos tampões de IP3	41
5.12. Experimentos de sinalização de Ca^{2+} em células U2OS WT	42
5.13. Experimento de decurso temporal em células expressando o nanoanticorpo nAC para observar a formação dos filamentos de actina nuclear	43
5.14. Análises da expressão da MYH9 e ITPR3 em tumores	43
5.15. Análises estatísticas	43
6. Resultados	44
6.1. O ITPR3 forma um complexo com a MYH9 e β -actina	44
6.2. O ITPR3, MYH9 e β -actina são expressas no núcleo	49
6.3. Expressão e colocalização nuclear do complexo ITPR3, MYH9 e β -actina.	52
6.4. Soro fetal bovino e ionomicina induzem a elevação de Ca^{2+} .	57
7. Discussão	72
8. Conclusão	76
9. Referências Bibliográficas	76
Anexo 1. Trabalho publicado	89

1. Introdução

O cálcio (Ca^{2+}) é um segundo mensageiro que regula processos celulares como diferenciação ([Ma, Ding, Liu, & Wu, 2023](#)), proliferação ([Prevarskaya, Ouadid-Ahidouch, Skryma, & Shuba, 2014](#)), tráfego de membranas ([Sargeant & Hay, 2022](#)) e morte celular ([DerMardirossian, 2024](#)). Nas células a concentração de Ca^{2+} varia dependendo da sua localização subcelular e do tipo de organela, diferindo entre o citoplasma e o núcleo ([Berridge, Lipp, & Bootman, 2000](#); [Dawidson Assis Gomes, de Miranda, Faria, & Rodrigues, 2021](#); [Zajac, Modi, & Krishnan, 2022](#)). O retículo endoplasmático (RE) é um dos principais reservatórios intracelulares de Ca^{2+} , que contém duas famílias de receptores liberadores de Ca^{2+} : receptores de rianodina (RYR) e receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPRs) ([Berridge, 1993](#); [David L Prole & Colin W Taylor, 2019](#)). Em vertebrados, todas as isoformas dos ITPRs são encontradas tanto no citoplasma quanto nas membranas do envelope nuclear ([Echevarría, Leite, Guerra, Zipfel, & Nathanson, 2003](#)).

Os ITPRs são expressos na maioria das células de animais, mas cada uma das isoformas tem função e expressão dependente do tipo de célula ([D. L. Prole & C. W. Taylor, 2019](#)). Por exemplo: a isoforma 1 do ITPR (ITPR1) está envolvida em processos como a fertilização e atua no sistema nervoso ([Mikoshiba, 2015](#)). O ITPR2 está localizado na região apical dos hepatócitos ([Nakayama et al., 2010](#)), enquanto a ITPR3 está presente em células epiteliais, onde participa da regulação da secreção ([Mangla, Guerra, & Nathanson, 2020](#); [Minagawa et al., 2007](#)) e está envolvido na progressão de alguns tumores ([M. Zhang et al., 2021](#)). Um estudo recente demonstrou que a ITPR3 interage com a proteína MYH9 no citoplasma e possivelmente no núcleo ([Michele A Rodrigues et al., 2022](#)). Outro estudo, relatou que a formação dos filamentos de actina nucleares depende da liberação de Ca^{2+} ([Y. Wang et al., 2019](#)). Assim, desenvolvemos uma hipótese que o Ca^{2+} liberado via o ITPR3 poderia ser necessário para a formação de filamentos de actina no núcleo.

As miosinas são conhecidas por seu papel na coordenação com a actina, influenciando diversos processos celulares, como motilidade, contração, adesão e migração celular ([Vicente-Manzanares, Ma, Adelstein, & Horwitz, 2009](#); [Gengtai Ye et al., 2020](#)). Além disso, as miosinas podem atuar como transportadoras e âncoras

moleculares, dependendo de sua capacidade de se ligar à actina ([Houdusse & Sweeney, 2016](#)). Mutações na β -actina podem levar à disfunção celular. A inibição da actina nuclear prejudica a transcrição ([Dopie, Skarp, Kaisa Rajakylä, Tanhuanpää, & Vartiainen, 2012](#); [Kelsch & Tootle, 2018](#)), além de ter sido associada a síndrome cerebrofrontofacial de Baraitser-Winter (BWCFF) ([Di Donato et al., 2014](#)). Por outro lado, mutações em *MYH9* têm sido associadas ao rápido desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão ([Katono et al., 2015](#)), leucemia mieloide aguda ([Yu et al., 2017](#)), câncer gástrico ([G. Ye et al., 2017](#)), glioma ([Z. Chen et al., 2023](#)) e câncer de cólon ([Liao et al., 2017](#)), devido a alterações na estrutura da actina, promovendo a metástase ([Surcel et al., 2019](#)). O silenciamento de *MYH9* pode inibir ou retardar a progressão do carcinoma hepatocelular ([X. Lin et al., 2020](#)) e a ausência completa de *MYH9* resultou na morte embrionária em camundongos ([Mhatre et al., 2007](#)).

Conforme relatado na literatura, o ITPR3 é responsável pelo fluxo de Ca^{2+} intracelular via RE e esse íon exerce uma função também no núcleo. Além disso, as proteínas ITPR3, *MYH9* e β -actina estão envolvidas em diversos processos tumorigênicos. Diante disso, este estudo tem como objetivo analisar a expressão e associação do ITPR3 com a *MYH9* e a β -actina no núcleo celular. Adicionalmente, estudamos o mecanismo de liberação do Ca^{2+} nuclear e sua relação com a formação de filamentos de actina, bem como o papel funcional do ITPR3 nesse contexto.

2. Revisão de literatura

2.1. O Cálcio e o Retículo endoplasmático

O Ca^{2+} regula múltiplas funções, isto acontece porque sua concentração é regulada em termos de amplitude, tempo e espaço. Por exemplo, a concentração de Ca^{2+} na célula pode ser regulada de maneira independente nos diferentes compartimentos celulares ([Berridge et al., 2000](#); [Dawidson Assis Gomes et al., 2021](#)). Além disso, a concentração de Ca^{2+} no interior da célula depende do seu status metabólico, por exemplo: quando as células estão em repouso a concentração é de aproximadamente 100 nM, mas após estímulos podem aumentar para concentrações de 1000 nM ([Berridge et al., 2000](#); [Szent-Györgyi, 1975](#)).

O incremento da concentração de Ca^{2+} não depende só do meio extracelular, a célula contém organelas que estocam e liberam este íon. Um das principais organelas armazenadoras de Ca^{2+} é o RE, podendo armazenar de 100 a 800 μM e as variações do Ca^{2+} podem provocar mudanças nas funções da célula ([Bravo-Sagua et al., 2020](#); [Carreras-Sureda, Pihán, & Hetz, 2018](#); [Szent-Györgyi, 1975](#)).

O RE apresenta duas famílias de receptores que são capazes de liberar Ca^{2+} , os RyR e de ITPR. Ambos receptores apresentam 3 isoformas em mamíferos que são expressas de acordo com o tipo celular ([Carreras-Sureda et al., 2018](#)). Os ITPRs são ativos como tetrâmeros que podem ser estar configurados como homo e heterotetrâmeros e a abertura dos destes receptores é mediada pelo IP3 ([Berridge, 1998](#)). Este lipídeo é formado a partir da ativação da enzima PLC, que hidrolisa PIP2 em DAG e IP3, levando a liberação de Ca^{2+} do RE ([Berridge, 1993](#); [Bird & Putney, 1996](#); [David L Prole & Colin W Taylor, 2019](#)) (**Figura 1**). A membrana do RE é contígua com a membrana do envelope nuclear e os ITPRs têm sido encontrados nas membranas do envelope nuclear. Os ITPRs podem liberar Ca^{2+} no interior do núcleo e os aumentos de Ca^{2+} no núcleo podem controlar processos com a proliferação celular ([Rodrigues et al., 2007](#)), mas ainda pouco se conhece sobre as funções do Ca^{2+} nuclear.

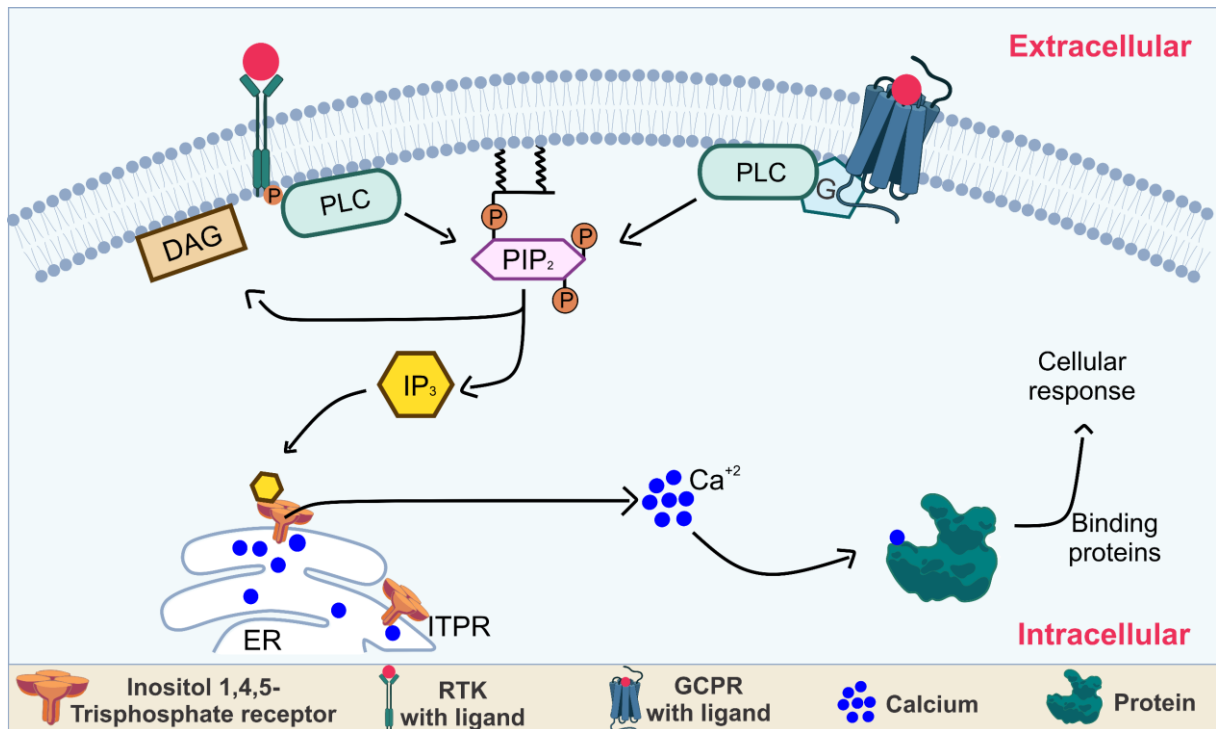


Figura 1. Liberação do Ca^{2+} mediante os receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPRs). DAG = diacilglicerol; GCPR = receptores acoplados a proteína G (G). ER = retículo endoplasmático; IP3 = Inositol 1,4,5-trifosfato; ITPR = Receptores de IP3; PIP2 = fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PLC = fosfolipase C; RTK = Receptores de tirosina cinase. A liberação de Ca^{2+} via os ITPRs levam a ativação de proteínas dependentes de Ca^{2+} .

Nosso laboratório tem estudado novas funções do Ca^{2+} nuclear via os ITPRs. Atualmente estudamos se o Ca^{2+} nucleoplasmático pode participar da regulação do complexo de actina e miosina no núcleo.

2.2. O envelope nuclear e o retículo nucleoplasmático

O envelope nuclear (NE) é uma estrutura com duas bicamadas de fosfolipídios e assim possui uma membrana interna (INM) e outra externa (ONM) ([Henretta & Lammerding, 2025](#)). A membrana do RE é contínua com ONM e a INM. Sendo assim, o envelope nuclear também é reservatório de Ca^{2+} intracelular, o qual é também chamado de retículo nucleoplasmático (RN) ([Dawidson Assis Gomes et al., 2021](#); [Malhas, Goulbourne, & Vaux, 2011](#)). O termo RN tem sido principalmente utilizado para dar destaque a função do NE em liberar Ca^{2+} para o interior do nucleoplasma, bem como em estudos da biogênese das invaginações do NE.

A ONM apresenta uma distância de aproximadamente 50 nm da INM ([Cain & Starr, 2015](#); [Hampoelz, Andres-Pons, Kastitis, & Beck, 2019](#)), entre estas membranas se encontra uma rede de proteínas, as quais são importantes para a regulação

da expressão gênica, organização dos cromossomos, entre outras funções ([Gauthier & Comaills, 2021](#)). Além disso, a ONM e INM encontram-se complexos de poros nucleares (NPC), os quais regulam o transporte de moléculas entre o citosol ao núcleo e vice-versa ([Gauthier & Comaills, 2021](#); [Hampoelz et al., 2019](#)). Por outro lado, o NE pode apresentar invaginações. Estas invaginações foram observadas numa ampla gama de tipos de células e tecidos desde a década de 1960 ([Bourgeois, Hemon, & Bouteille, 1979](#)). As invaginações do NE podem ser profundas e ramificadas ([Schermelleh et al., 2008](#)). Estas invaginações se enquadram em duas classes principais ([Malhas et al., 2011](#)), ver Figura 2. As invaginações do tipo I correspondem aquelas em que apenas a membrana nuclear interna se projeta para o interior do nucleoplasma (**Figura 2a**). Por outro lado, as invaginações do tipo II envolvem tanto a membrana interna quanto a membrana externa, formando prolongamentos que penetram no nucleoplasma (**Figura 2b**). Já na Figura 2c, observa-se que algumas células não apresentam invaginações nucleares.

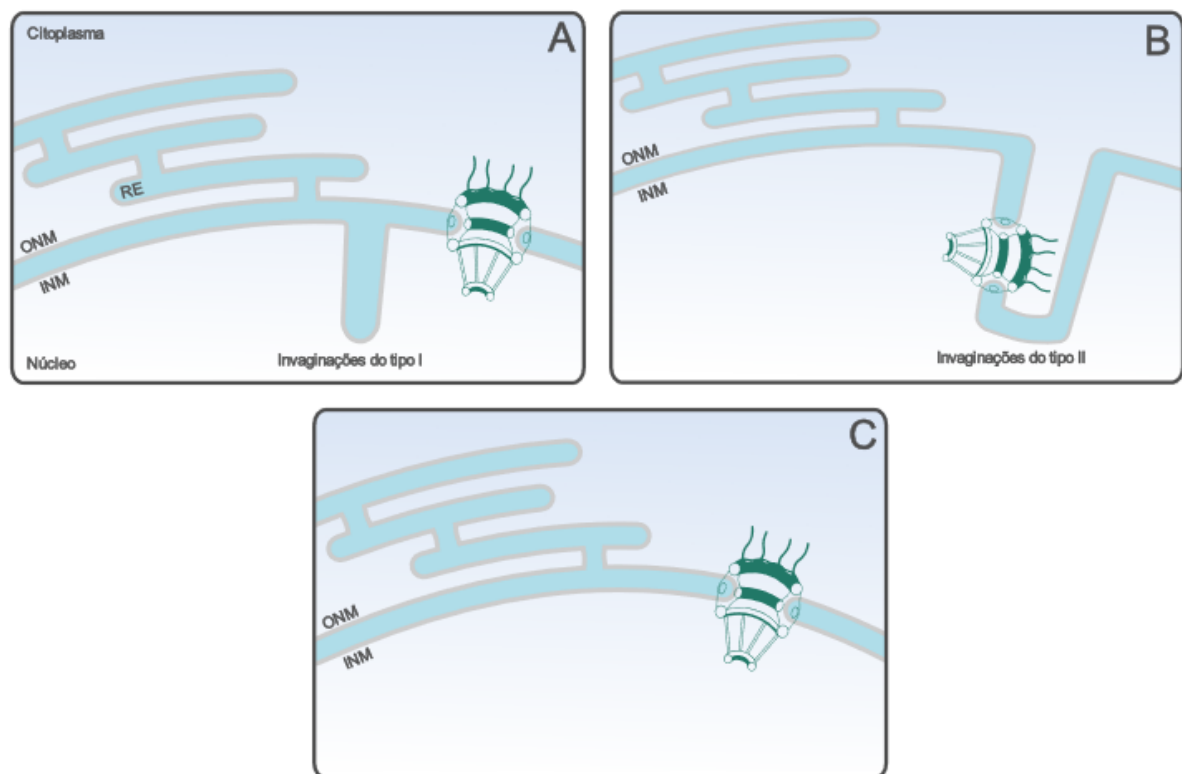


Figura 2. Tipos de invaginações da membrana nuclear. a) observa-se as invaginações de tipo I, invaginações somente da INM. b) invaginação de tipo II, invaginações da INM e ONM. c) Algumas células não possuem invaginações do envelope nuclear.

2.3. A família dos ITPRs

A família dos ITPRs é importante para o controle da concentração de Ca^{2+} ([Mangla et al., 2020](#)). Esta família de receptores em vertebrados é composta por três isoformas: ITPR1, ITPR2 e ITPR3 ([Mikoshiba, 2015](#); [David L Prole & Colin W Taylor, 2019](#)). Cada isoforma cumpre papéis importantes nos seres vivos, por exemplo, o ITPR1 é importante na fertilização e nos mamíferos é altamente expresso no sistema nervoso e células endoteliais ([Gorza, Schiaffino, & Volpe, 1993](#)), o ITPR2 é encontrada nas células do miocárdio ([Verma, Hirsch, & Snyder, 1992](#)) e o ITPR3 está presente em células epiteliais e pode controlar a secreção ([Mangla et al., 2020](#); [Mikoshiba, 2015](#); [Nakayama et al., 2010](#)).

Estes receptores são de grande importância e suas alterações podem levar a doenças em animais e humanos. O ITPR1 é uma das proteínas mais abundantes no sistema nervoso central de mamíferos e os camundongos “knockout” para esta isoforma morrem ainda no útero ([Huh & Yoo, 2003](#); [Y. Zhang, Feng, Wu, & Derynck, 1996](#)). Além disso, quando o ITPR1 se encontra ausente fora do sistema nervoso pode afetar a interação com outras proteínas e modificar genes como o gene associado à ataxia espinocerebelosa tipo 15 (SCA15); o que leva ao desenvolvimento de ataxias ([Hara et al., 2008](#)). Esta isoforma se encontra relacionada com o síndrome de Gillespie e fertilização anormal ([Miyazaki et al., 1992](#); [Tada, Nishizawa, & Onodera, 2014](#); [Yamazaki et al., 2011](#)).

A isoforma ITPR2 atua na regulação de Ca^{2+} em hepatócitos e as mutações da mesma nos animais está relacionada com o envelhecimento celular ([Arige et al., 2022](#)); além disso, a perda do ITPR2 em camundongos leva na diminuição da senescência das células ([Ziegler et al., 2021](#)). Nos humanos esta isoforma é responsável da anidrose, síndrome de Sjögren, carcinomas renais, leucemia mieloide aguda, entre outras ([Kerkhofs et al., 2018](#); [Klar et al., 2014](#)).

O ITPR3 regula os níveis de Ca^{2+} , essenciais para a homeostase celular ([W. Chen et al., 2024](#)), o aumento da expressão do ITPR3 está relacionado com diferentes tipos de câncer como o glioblastoma, câncer de mama, câncer gástrico, colangiocarcinoma e o câncer das células escamosas ([Hedberg et al., 2016](#); [Michele A Rodrigues et al., 2022](#); [Ueasilamongkol et al., 2020](#); [Y.-C. Yang et al., 2017](#); [Zheng et al., 2022](#)).

Até o momento pouco se sabe sobre como o aumento da expressão do ITPR3 pode estar relacionado com o câncer. Foi estudado que o ITPR3 no citoplasma pode levar a transmissão de sinais de Ca^{2+} entre o RE e a mitocôndria e a diminuição da expressão do ITPR3 pode levar a resistência à apoptose ([Mendes et al., 2005](#); [Ueasilamongkol et al., 2020](#)).

Além disso, quando há uma super expressão do ITPR3, ocorre um aumento na invasão e migração das células cancerígenas ([Kang et al., 2010](#); [Vautrin-Glabik, Botia, Kischel, Ouadid-Ahidouch, & Rodat-Despoix, 2018](#)), e quando apresenta redução do ITPR3, existe uma diminuição na invasão e migração das células cancerígenas ([Kang et al., 2010](#)). A sinalização de Ca^{2+} dependente dos ITPRs no citoplasma já foi relacionada com a organização da actina em células endoteliais humanas ([B. H. Lin, Tsai, Lii, & Wang, 2016](#)). Porém ainda não foi estudado como os ITPRs podem interagir e regular o complexo de actina e miosina no citoplasma ou núcleo.

Até o momento, o mecanismo mais estudado para a liberação do Ca^{2+} nuclear é por meio da ativação dos ITPRs (**Figura 3**). Todas as isoformas de ITPRs foram localizadas ao longo do nucleoplasma e em ambas as membranas do NE ([Echevarría et al., 2003](#); [Huh & Yoo, 2003](#); [Yoo, Nam, Huh, Park, & Huh, 2005](#)). [Nguyen, Lutter, and Hackstadt \(2018\)](#). Neste trabalho estamos demonstrando pela primeira vez que o ITPR3 facilita a formação dos filamentos de actina nucleares. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o ITPR3 pode colocalizar com a miosina não muscular de classe II (non-muscle myosin IIA, NMIIA ou MYH9) ([Michele A Rodrigues et al., 2022](#)). Esta observação levou a hipótese que o ITPR3 pode interagir com o complexo de actina e miosina. Esta interação pode levar a liberação de Ca^{2+} via ITPR3, que pode ser importante para facilitar a ativação do complexo de actina e miosina.

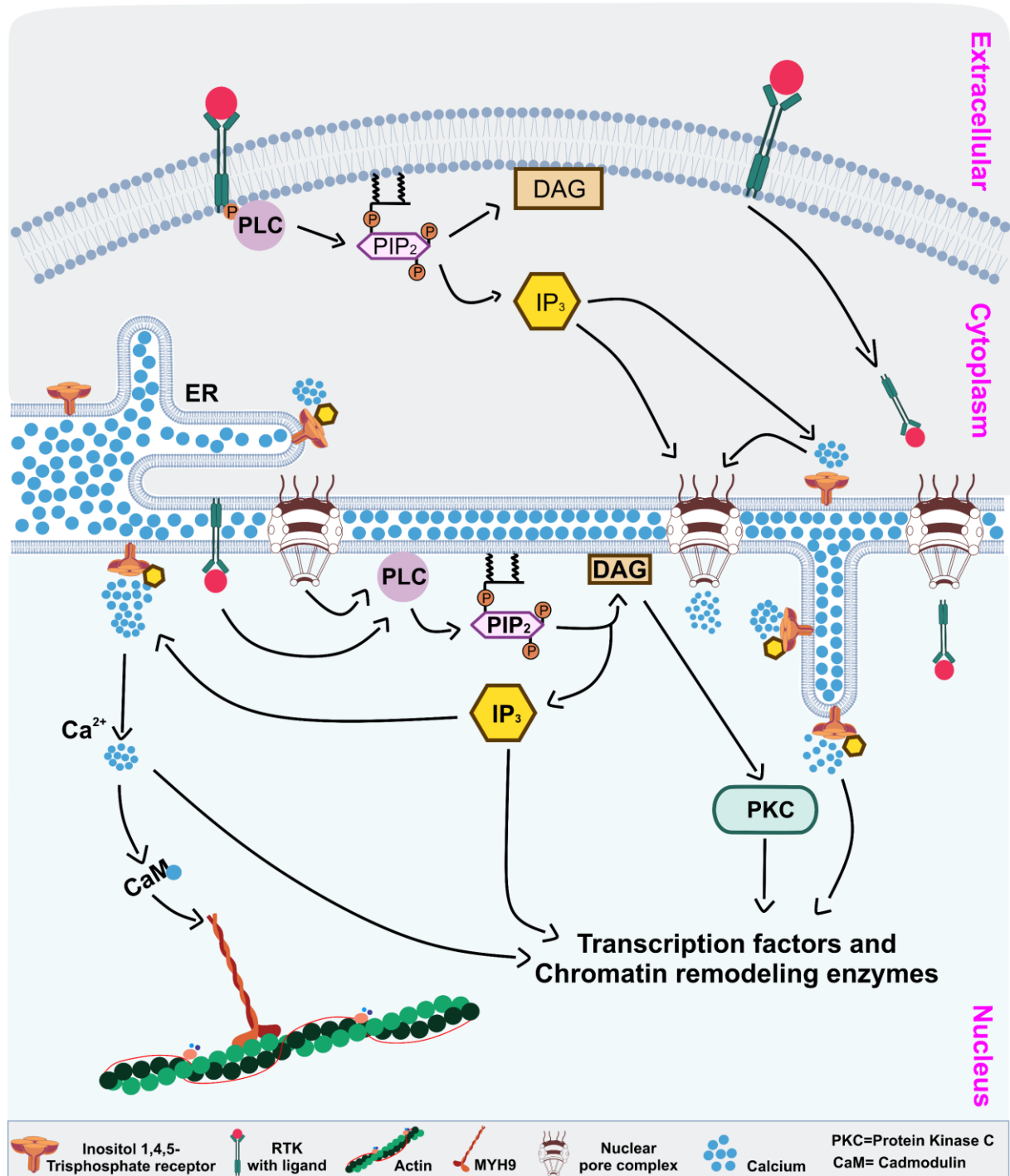


Figura 3. Esquema da sinalização nuclear via ITPR3. Os receptores com seus ligantes presentes no núcleo ativam as PLCs, promovendo a hidrólise do PIP₂ e gerando DAG e IP₃. Este, por sua vez, estimula os ITPR3 localizados no núcleo, resultando na liberação de Ca²⁺, que induz a formação de filamentos de actina.

2.4. Actina

A actina foi descoberta em 1942, no músculo de coelho, e é uma das proteínas mais abundantes nas células apresentando duas formas: a actina globular (em monômeros; actina G) e a filamentar (polimérica, actina F). Esta proteína apresenta seis isoformas, duas não musculares: β -actina (ACTB) e γ -actina (ACTG1) e quatro musculares: α -actina esquelética, α -actina cardíaca, α -actina de músculo liso e γ -actina de músculo liso ([Müller et al., 2013](#); [Vandekerckhove & Weber, 1978](#)). Cada uma das isoformas cumpre diferentes funções, como a motilidade (γ -actina) e contração (β -actina) que são essenciais para a célula. No entanto, a expressão de cada isoforma depende da linhagem celular ([Khaitlina, 2001](#)). A única diferença das isoformas β e γ está nos últimos quatro aminoácidos da posição n-terminal ([Perrin & Ervasti, 2010](#); [Vandekerckhove & Weber, 1978](#)), e as mudanças conformacionais das isoformas desta proteína, podem levar as células cancerígenas a gerarem metástase ([Nowak, Kochman, & Malicka-Błaszczewicz, 1999](#); [Pokorna et al., 1994](#)).

A actina é uma proteína essencial para a sobrevivência de todos os organismos vivos e apresenta diversas funções como: transcrição, proliferação, movimento, reparação do DNA, organização na cromatina, entre outras ([Baarlink et al., 2017](#); [Hurst, Shimada, & Gasser, 2019](#); [Perrin & Ervasti, 2010](#)). As funções desta proteína têm sido bem elucidadas no citoplasma, mas suas funções no núcleo ainda são pouco estudadas. De acordo com [Gong et al. \(2021\)](#) a actina pode ser importada para o núcleo através dos poros nucleares. Além disso, [Dopie et al. \(2012\)](#); [Hurst et al. \(2019\)](#) relataram que a actina pode ser importada ao núcleo em forma de monômeros mediante a importina-9 e [Stüven, Hartmann, and Görlich \(2003\)](#) demonstraram que esta proteína é exportada do núcleo pela exportina-6 (**Figura 4**) em mamíferos.

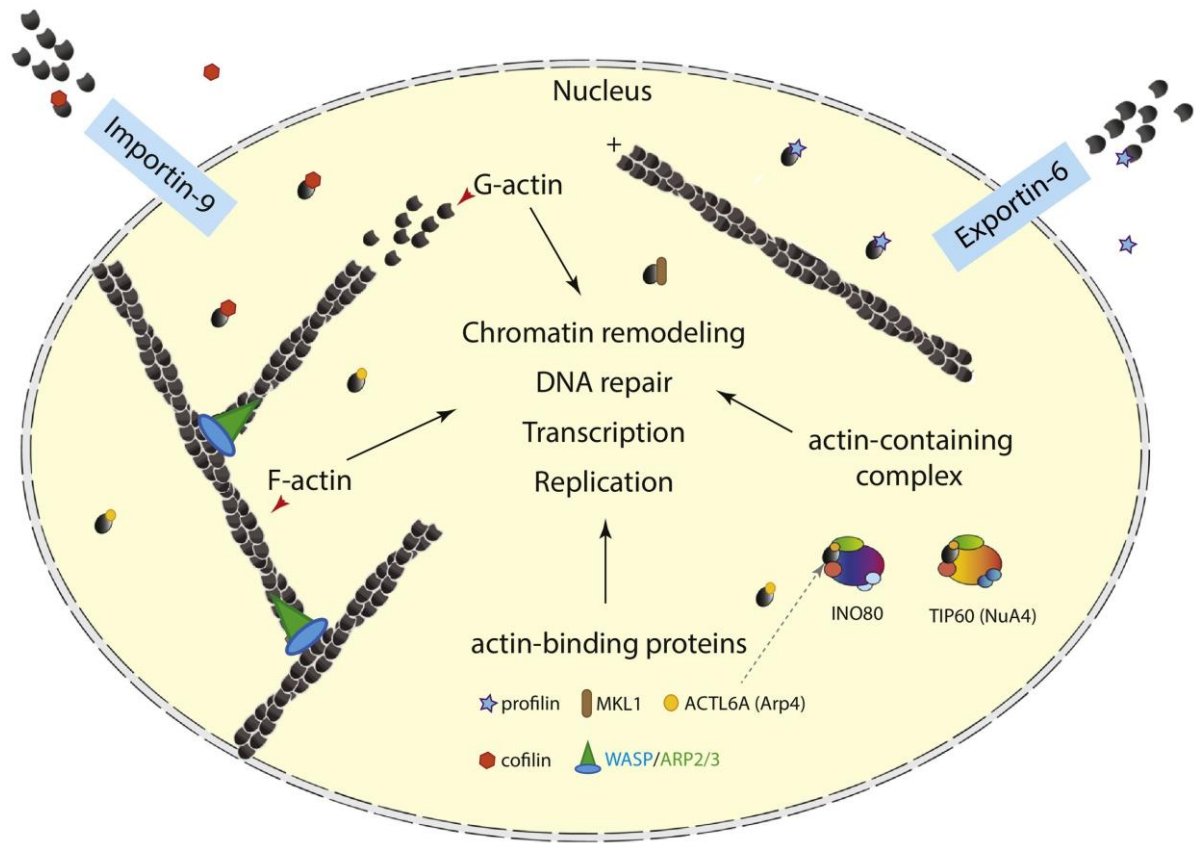


Figura 4. Importação e exportação da actina no núcleo. Observa-se a importina-9 levando monômeros de actina com ajuda da cofilina até o núcleo e a exportina-6, levando monômeros de actina do núcleo para o citoplasma através da profilina ([Hurst et al., 2019](#)).

A função da actina no núcleo tem sido relacionada com a expressão gênica ([Davidson & Cadot, 2021](#); [Tiina Viita & Maria K Vartiainen, 2017](#); [Tiina Viita & Maria K. Vartiainen, 2017](#)). Como a formação de filamentos de actina no núcleo é um tópico novo, investigamos se a β -actina pode formar filamentos no núcleo e se a formação destes filamentos pode depender de sinais nucleares de Ca^{2+} . Além disso, verificamos se há formação de um complexo entre ITPR3 e MYH9 na porção nuclear.

2.5. Família das Miosinas

As miosinas são conhecidas como proteínas motoras e compreendem uma grande família. Na atualidade, são descritas 35 classes de miosinas e estas proteínas são importantes para ajudarem a manter a homeostase celular. Entre as funções que as miosinas cumprem, podemos citar: a migração, adesão e transdução de sinais ([Berg, Powell, & Cheney, 2001](#); [Kruppa & Buss, 2021](#); [Z. Liu et al., 2011](#)). Nos humanos, são conhecidas 20 classes de miosinas ([Trivedi, Nag, Spudich, Ruppel, &](#)

[Spudich, 2020](#)). A holoenzima da miosina consiste em cadeias pesadas e leves ([Heissler & Sellers, 2014](#)). A cadeia pesada de miosina é composta por um domínio motor N-terminal, um domínio em pescoço central e um domínio C-terminal. O domínio motor medeia a interação dependente de ATP com o citoesqueleto de F-actina. O domínio C-terminal determina o estado oligomérico da cadeia pesada e a interação com parceiros de ligação ou compartimentos celulares ([Roberts et al., 2004](#)) (**Figura 5**). As cadeias leves de miosina são membros da família da Calmodulina (CaM) ou das famílias de genes relacionados com a CaM. Estas proteínas são dependentes de Ca^{2+} e responsáveis por ativarem a função motora de diversas miosinas.

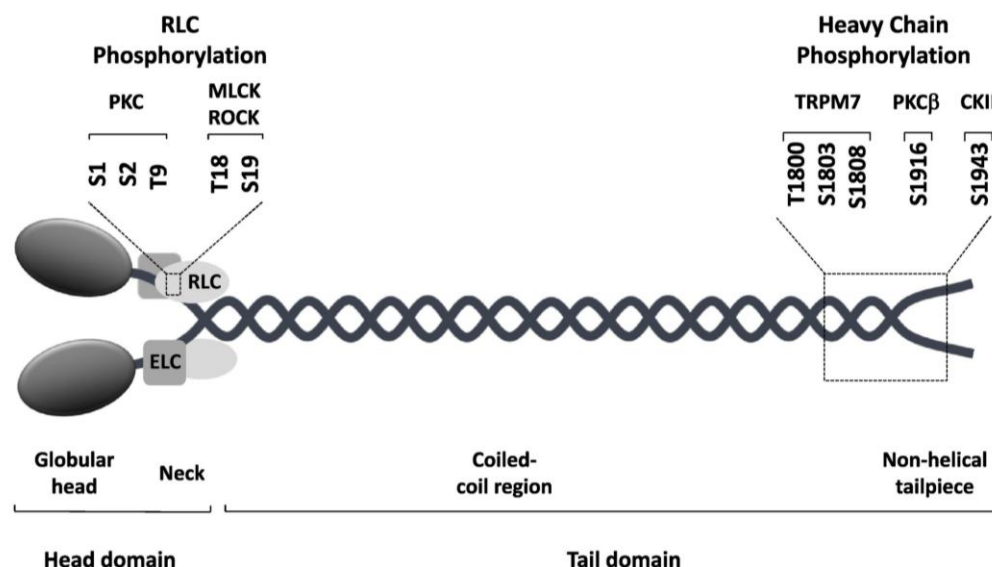


Figura 5. Representação da MYH9. É uma molécula hexamérica e apresenta um dímero de cadeias pesadas, duas cadeias leves reguladoras (RLC) e duas cadeias essenciais (ELC). As cadeias pesadas apresentam o domínio da cabeça N-terminal e pescoço e o domínio da calda C-terminal. Nas RLC observa-se resíduos de serina e treonina e quinases. Nas cadeias pesadas observa-se outras proteínas essenciais para a fosforilação ([Pecci, Ma, Savoia, & Adelstein, 2018](#)).

As miosinas podem atuar como transportadoras moleculares e âncoras que dependem da sua capacidade de ligação com a actina e ATPase para realizarem sua função ([Houdusse & Sweeney, 2016](#)). As miosinas dentro do núcleo têm sido frequentemente negligenciadas devido a sua importância já descrita nos processos citoplasmáticos. No entanto, recentemente, foi demonstrado que seu papel no núcleo é importante para diferentes funções celulares ([Cook & Toseland, 2021](#)). Atualmente sete tipos de miosina foram identificadas dentro do núcleo, entre estas a MYH9, e elas apresentam diferentes funções, sendo uma destas a regulação da transcrição. No

entanto, quando se encontram desreguladas podem causar danos ao DNA ([Hofmann, Johnson, Klapczynski, Fan, & de Lanerolle, 2006](#); [Hurst et al., 2019](#)).

A miosina não muscular (NMII) é encontrada nos músculos, liso, esquelético e cardíaco e em outras células eucariotas. Esta miosina apresenta três subclasses: NMIIA, NMIIB, NMIIC e são codificadas pelos genes *MYH9*, *MYH10* e *MYH14*, respectivamente ([Marigo et al., 2004](#)). A *MYH9* está presente em quase todos os tipos de tecidos e sua estrutura apresenta duas cadeias pesadas, duas cadeias leves regulatórias e duas cadeias leves essenciais (**Figura 5**), as quais são importantes para a contração quando ocorre sua interação com a actina ([B. Wang et al., 2019](#)).

A *MYH9* é expressa em células não musculares e redundante no cromossomo 22q12.3 ([Pecci et al., 2018](#)). A principal função da *MYH9* é converter a energia química em mecânica, mediante a hidrólise de ATP, e assim participa de alguns processos celulares como a divisão celular, contração, migração e transdução de sinais ([M. Chen et al., 2021](#)). Até o momento foram descritas sete mutações na *MYH9*, levando a doenças renais e surdez grave em período precoce (antes dos 40 anos) e perda da visão ([Pecci et al., 2014](#)). Além disso, esta proteína tem sido relacionada a facilitação da invasão e metástase em células de adenocarcinoma gástrico ([Gengtai Ye et al., 2020](#)) e a perda da *MYH9* pode conduzir ao carcinoma nas células escamosas e morte do feto em camundongos ([Anne Conti et al., 2015](#)).

No presente trabalho estudamos a expressão nuclear do ITPR3, a liberação e função do Ca^{2+} nuclear e a formação dos filamentos de actina nucleares via a interação do ITPR3 com o complexo *MYH9* e β -actina.

3. Justificativa

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), o câncer é a principal causa de morte no mundo, apesar dos avanços terapêuticos e foi registrado em 2020 cerca de 10 milhões de mortes em todo o mundo ([WHO, 2022](#)). No Brasil até o ano de 2017 foram registrados 27.195 casos e em 2018 foram registrados 16.011 novos casos ([Câncer, 2022](#)). Esta enfermidade acarreta diversos efeitos negativos, tanto para o país, quanto a nível pessoal e social.

Quando esta enfermidade é detectada a tempo, em alguns tipos de tumores a pessoa tem alta probabilidade de cura ([WHO, 2022](#)). Entretanto, muitos tipos de tumores ainda não possuem tratamento eficaz e outros tipos de tumores possuem alta taxa de recidiva. Então, é muito importante estudar novas vias de sinalização, com a finalidade de gerar novos tratamentos, para os casos em que ainda não tem solução. Diversos pesquisadores já têm demonstrado individualmente, que a superexpressão da actina, MYH9 e do ITPR3 estão associadas a diferentes tipos de tumores. No entanto, a maioria desses estudos se concentram na atuação dessas proteínas na porção citoplasmática da célula. Isso reforça a relevância da investigação de uma nova via de sinalização envolvendo essas proteínas no compartimento nuclear, a qual pode representar um alvo promissor para o diagnóstico ou tratamento do câncer.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Estudar a interação e a função do ITPR3 com o complexo da MYH9 e β -actina no núcleo.

4.2. Objetivos específicos:

- ✓ Demonstrar a interação do complexo do ITPR3 com a MYH9 e β -actina utilizando análises de imunoprecipitação seguida de espectrometria de massa.
- ✓ Investigar a expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina no núcleo através de ensaios de fracionamento nuclear seguida de Western Blot.
- ✓ Estudar a interação e a colocalização do complexo β -Actina, MYH9 e ITPR3 por microscopia confocal e de super-resolução.
- ✓ Verificar a formação de filamentos de actina no núcleo, mediante técnicas de microscopia com a construção Nuclear Actin Chromobody® (TagGFP2).
- ✓ Realizar ensaios de *knockdown* e *knockout* para o ITPR3 para verificar a participação deste receptor na formação dos filamentos de actina.
- ✓ Demonstrar se o IP3 é importante para a formação dos filamentos de actina mediante o uso dos tampões de IP3 nucleares (IP3-NLS) e citosólicos (IP3-NES).
- ✓ Estudar o impacto da expressão de MYH9, β -actina e ITPR3 através de análises de sobrevivência de pacientes com diferentes tipos de câncer.

5. Metodologia

5.1. Cultura Celular

As células utilizadas neste trabalho foram quatro linhagens; sendo as U2OS WT (**ATCC® HTB-96**) derivadas das células de osteossarcoma humano, NIH/3T3 (**ATCC® CRL-1658**) proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo, as células MDCK.2 (**ATCC® CRL-2936**) isoladas do túbulo renal distal de *Canis familiaris*, MzChA-1 WT e MzChA-1 KO procedente do ducto biliar adenocarcinoma. Todas as linhagens foram obtidas da “*American Type Culture Collection*” (Manassas, VA – USA).

As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular T75 cm² (Sarstedt) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, número de catálogo: 11965-092) com alta concentração de glicose e mantidas em atmosfera úmida a 37°C e 5% do CO₂. Ao DMEM foi adicionado 5 mM bicarbonato de sódio (VE-TEC) e o pH do meio foi ajustado a 7,2. Ao meio líquido pronto foi adicionado 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e antibióticos e antimicótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B; Sigma-Aldrich). Este meio foi chamado de DMEM completo. O meio foi filtrado em uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm (Merck-Millipore).

Nas culturas o meio foi trocado a cada dois dias e quando a confluência celular atingia entre 80% e 90%, as subculturas foram realizadas. Em cada repique as garrafas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino de Dulbecco sem Ca²⁺ e Mg²⁺ (PBS, Gibco, número de catálogo: 10010-023) e adicionou-se tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, número de catálogo: 12605-010) durante 5 minutos para o desprendimento das células U2OS e MDCK. Entretanto, empregou-se 3 minutos de tripsina para as células NIH/3T3. Para inibir a tripsina foi usado 10 mL de DMEM completo, as células foram transferidas para uma nova garrafa de cultura (2 mL da cultura anterior para cada 10 mL DMEM completo).

5.2. Imunoprecipitação

Para o ensaio de imunoprecipitação foram utilizadas quatro garrafas T75 contendo as células U2OS WT, duas destas foram tratadas com 200 nM de Latrunculina B (Lat-B, Sigma-Aldrich, número de catálogo: 0567263-2) por 12 horas e duas garrafas foram usadas como controles (células não tratadas). Em seguida, realizou-se a extração das proteínas não nucleares e nucleares das células U2OS WT.

Para o fracionamento celular, as células foram lavadas com PBS 1x, e adicionado o tampão de lise (20 mM HEPES, pH 7,0, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5% Nonidet P-40) contendo 1% de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich, número de cat. P8340 e P0001). As amostras foram homogeneizadas por vórtex por 1 minuto e incubadas no gelo por 10 minutos, e por fim, realizada a centrifugação a 1.500×g por 5 minutos a 4°C para sedimentação do núcleo. O sobrenadante foi centrifugado a 16000×g por 20 minutos a 4°C e coletado, consistindo na fração não-nuclear. O pellet nuclear foi lavado três vezes com tampão de lise para remoção dos contaminantes da fração não nuclear. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em tampão NETN (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCL, pH 8,0, 0,5% Nonidet P-40), a mistura foi brevemente sonicada por 1 minuto. O lisado nuclear foi coletado após centrifugação a 16000×g, 20 minutos a 4°C. Em seguida 500 µg do lisado nuclear foi submetido a imunoprecipitação com 10 µL do anticorpo anti β-actina (Sigma-Aldrich, número de cat. A5441), durante 1 hora sobre agitação a 4°C. Passado este tempo foram adicionados 40 µL das *beads* magnéticas e incubados por 4 horas, sobre agitação a 4°C. As *beads* foram concentradas usando um suporte magnético e lavadas. Esta etapa foi repetida por 5 vezes com 500 µL de PBS. No final as *beads* foram novamente ressuspendidas com 60 µL de tampão de amostra 1x (Thermo Scientific™, número de catálogo 39000).

Em seguida as amostras foram fervidas por 5 min e colocadas em um gel de poli(acrilamida de 4 a 20% e corridas por 10 min a 100V. O gel foi corado com comassie azul durante 30 min sob agitação e descorado até a visualização das bandas. Finalmente, as amostras foram enviadas para as análises de espectrometria de massa.

As células MDCK também foram submetidas ao fracionamento celular para obtenção das frações não nucleares e nucleares, conforme o protocolo descrito acima para as células U2OS. Em seguida, 500 µg do lisado nuclear e não nuclear foram submetidos a imunoprecipitação contendo 5 µg do anticorpo monoclonal para o ITPR3 (BD-Biosciences, número de catálogo: 610313), durante 1 hora sob agitação a 4°C. Passado este tempo, foram adicionados 40 µL das *beads* magnéticas e incubados por 4 horas, sobre agitação a 4°C. As *beads* foram concentradas usando um suporte magnético e lavadas por 5 vezes com 500 µL de PBS. No final as *beads* foram resuspendidas com 60 µL de tampão de amostra (“Lane Marker Reducing Sample Buffer” -Thermo Scientific™, número de catálogo 39000).

Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min e corridas em gel de poliacrilamida de 4 a 20% por 10 min a 100V. O gel foi corado com comassie azul durante 30 min sob agitação e descorado até a visualização das bandas. Finalmente, o pedaço do gel contendo as proteínas foi cortado e enviado para as análises de espectrometria de massa na “*MS & Proteomics Resource*” na Universidade de Yale.

5.3. Análises de espectrometria de massa

A espectrometria de massa (MS) foi realizada no departamento “*MS & Proteomics Resource*” da Universidade de Yale, seguindo o protocolo descrito por ([Rodrigues et al., 2022b](#)). As bandas obtidas foram cortadas e submetidas a análise proteômica chamada de “Gel Protein ID”. Os produtos foram diluídos e fracionados por cromatografia líquida de alto desempenho, interfaceando um espectrômetro de massa de quadrupolo de ionização por eletrospray. Os espectros foram analisados usando o Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Uma proteína foi considerada identificada quando há cinco ou mais correspondências de peptídeos, cada uma com score Mascot ion > 30.

Foi utilizado o banco de dados do “*National Center for Biotechnology Information*” para anotação das proteínas. As análises dos dados foram realizadas no software Scaffold 5 ou versão superior (*Proteome Software, Inc.*).

5.4. Análises de bioinformática para caracterização do complexo proteico e de possíveis sinais de localização nuclear das proteínas estudadas

Para estas análises foi utilizado o programa STRING (<https://string-db.org/>) para confirmar as possíveis interações encontradas nas análises de MS em relação ao complexo da β -actina no núcleo das células U2OS, foram utilizados os parâmetros de especificidade do 97% entre as interações das proteínas com a β -actina.

5.5. Fracionamento celular e Western Blot

Para o fracionamento celular, seguido de Western Blot para cada linhagem celular, foram utilizadas duas garrafas de T75 cm² das células, seguindo o protocolo previamente descrito por [de Miranda et al. \(2019\)](#); [Dawidson A Gomes et al. \(2008\)](#). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford em placas de 96 poços ([Bradford, 1976](#)). Resumidamente, 2 μ L das proteínas foram incubadas com 148 μ L de água e este volume foi adicionado de 150 μ L de reagente Bradford (Sigma-Aldrich, número de catálogo: B6916). Após 2 minutos foi realizada a leitura no leitor de placas com uma absorvância de 595 nm. A determinação da concentração das proteínas foi gerada a partir de uma curva padrão com concentrações entre 2,5-20 μ g/ml da Albumina de Soro Bovina (BSA, Sigma-Aldrich).

As análises por *Western Blot* para cada linhagem celular foram realizadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 8% ou 10%. Foram aplicados 30 μ g de proteína com tampão de amostra “*Non-reducing Lane Marker*” (Thermo Scientific™, Número de catálogo: 39001) adicionado de 200 mM de Ditioneitol (DTT) como agente desnaturante. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Plus Protein*™ (Bio-Rad), que também foi adicionado para identificar a localização das proteínas no gel. A separação das proteínas foi realizada por eletroforese a 100 V durante 90 minutos. Em seguida, cada gel foi transferido a membranas de PVDF utilizando o sistema semiseco (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*, Bio-Rad) a 20 V por 90 minutos. Depois desse período, as membranas foram bloqueadas por uma hora em solução de bloqueio composta por 5% de leite em pó desnatada em solução salina e tampoadada com Tris com adição de 1% de Tween-20 (TBST). As membranas foram incubadas overnight com anticorpo policlonal anti MYH9 (Invitrogen, número de catálogo: Pas-17025) coelho na diluição 1:1000, foram lavadas 3 vezes com TBST por 10

minutos. As membranas foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário anticoelho conjugado com HRP (Cell Signaling, número de catálogo: A27036) na diluição 1:2000, foram lavadas 3 vezes com TBST. Finalmente, as membranas foram incubadas com 2 mL da solução Super Signal™ West Pico, (ThermoFisher, número de catálogo: 1863096) por 5 minutos e reveladas com a solução reveladora (Kodak, número de catálogo: 8610248) e fixadora (Kodak, número de catálogo: 1562826).

Foram realizados os mesmos procedimentos com os outros anticorpos. O segundo anticorpo utilizado foi o anti lâmina B1 policlonal feito em coelho (Abcam, número de catálogo: Ab16048), na diluição de 1:1000 e o secundário foi anticoelho HRP (Cell Signaling, número de catálogo: A27036) na diluição 1:2000. O terceiro anticorpo primário incubado foi o anti α -tubulina feito em camundongo (Sigma-Aldrich-número de catálogo: T6199), na diluição 1:5000 e o secundário foi o anticamundongo HRP (Invitrogen, número de catálogo: A28177) na diluição 1:10000. O quarto anticorpo incubado foi o anti β -actina feito em camundongo (Sigma, número de catálogo: A5441), na diluição 1:5000 e o anticorpo secundário foi o anti camundongo HRP (Invitrogen, número de catálogo: A28177), na diluição 1:10000. O último anticorpo utilizado foi o anti ITPR3 (BD-Biosciences, número de catálogo: 610313), feito em camundongo na diluição 1:500 e o anticorpo secundário foi o anti camundongo HRP (Invitrogen, número de catálogo: A28177) na diluição 1:5000.

Todas as membranas foram relevadas e digitalizadas; e posteriormente foram realizadas as análises quantitativas no software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

5.6. Imunofluorescência das proteínas β -Actina, MYH9 e ITPR3 nas células U2OS WT, NIH/3T3 e nas células MDCK

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados de acordo com o método descrito por ([Rodrigues et al., 2007](#)). As lamínulas de 22 × 22 mm (Electron Microscopy Sciences) foram flambadas em bico de Bunsen e colocadas em cada uma das placas de 35 mm (Sarstedt, número de catálogo: 3516). As células foram plaqueadas em uma densidade de 2×10^5 células e mantidas a 37°C e 5% CO₂ *overnight*.

As células U2OS foram fixadas com metanol gelado (-20°C) PA por 10 minutos. Após fixação as lamínulas foram lavadas por 3 vezes com PBS, 5 min cada

lavagem. Em seguida, a preparação foi permeabilizada com a solução de 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, número de catálogo: 9002-93-1) em PBS por 10 min, lavamos 3 vezes com PBS por 5 min. A seguir, foi adicionado solução de bloqueio contendo 1% de BSA em PBS por 30 min por 12 h a 4°C. Após o bloqueio, foi adicionado 100 µL dos anticorpos primários, sendo estes os anti MYH9 (ThermoFisher) e anti-ITPR3 (BD-Biosciences, número de catálogo: 610313) em diluição 1:100 e incubados overnight a 4°C. Seguidamente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 min cada e seguiu-se com a incubação dos anticorpos secundários por 1 hora, em PBS contendo BSA 1%. Os anticorpos secundários usados foram o anti coelho Alexa Fluor 546 (Invitrogen) e anti camundongo Alexa Fluor 647 (Invitrogen) na diluição de 1:1000. Depois de três lavagens com PBS adicionamos o anticorpo conjugado da β -actina, Alexa Fluor 488 (Invitrogen, número de catálogo: MA1-140-A488), na diluição 1:1000 durante 1 hora. Seguidamente lavou-se com PBS 1x por três vezes durante 5 minutos cada lavagem para depois adicionar 1 µg/mL da sonda nuclear Hoechst 33258 (Life Technologies). Após de duas lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas usando Hydromount (National Diagnostics). Para os controles negativos os anticorpos primários foram omitidos da reação.

O mesmo experimento foi realizado com as células NIH/3T3 e MDCK. As imagens foram obtidas no microscópio Leica GSD/TIRF HP com a objetiva de imersão a óleo de 160x e uma abertura numérica (NA) de 1,43; posteriormente foram analisadas no software LAS X 3D.

5.7. Estabelecimento de células estáveis com a construção nAC

As células U2OS expressando o nanoanticorpo nAC foram estabelecidas conforme as instruções do fabricante; (<https://knowledge.lonza.com/downloads-set.ashx?assetId=28243>), para obter a melhor concentração do antibiótico G418 para a seleção das células estáveis.

Foi estabelecida uma concentração de 1 mg/mL de G418 para a seleção das células U2OS nAC expressando a construção plasmidial. As células U2OS nAC foram plaqueadas na densidade 2×10^5 em placas de 6 poços e incubadas overnight a 37°C. Após este período as células U2OS foram transfectadas em meio OPTI-MEM com 2.5 µL de Lipofectamine 2000 ou 3000 e utilizando 100 ng de DNA da construção

nAC - *TagGFP2* (Chromotek), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). As células foram incubadas em meio OPTI-MEM durante 4 horas a 37°C; após o meio foi trocado por DMEM completo e incubado a 37°C durante 48 horas. Passado este tempo o meio foi trocado por DMEM completo contendo 1 mg/mL de G418 e quando as células estavam expressando o plasmídeo foram transferidas para uma garrafa T-75 e mantidas a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂ ([Gomes et al., 2008](#)).

As células NIH/3T3 foram transfectadas em suspensão, seguindo o protocolo descrito por [Dalby et al. \(2004\)](#) com pequenas modificações. As células NIH/3T3 foram plaqueadas em placas de seis poços, com uma densidade de 2×10^5 por poço em meio Opti-MEM (Invitrogen). Em seguida, num tubo de 1,5 mL foi adicionado 500 µL de Opti-MEM + 100 ng de DNA (*nAC*). Em outro tubo, foi adicionado 500 µL de Opti-MEM + 5 µL de Lipofectamine 3000 por 5 minutos. Passado este tempo, o DNA foi adicionado ao tubo contendo a lipofectamina durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionado 100 µL do conteúdo em cada poço e as células foram deixadas na estufa por 48 horas a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂. Passado este tempo o antibiótico G418 foi adicionado em uma concentração de 1,25 mg/mL em ambas as células, quando estas estavam expressando o plasmídeo, foram transferidas para uma garrafa T-75 e mantidas com o antibiótico a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂ ([Gomes et al., 2008](#)).

5.8. Formação dos filamentos de actina em células U2OS WT e NIH/3T3, estimuladas com SFB e ionomicina

As células U2OS e NIH/3T3 estáveis foram cultivadas em lamínulas previamente esterilizadas na densidade 2×10^5 e incubadas overnight a 37°C. Em seguida, o meio foi trocado por DMEM incompleto (sem soro) e as células foram incubadas durante 12 horas; e em seguida estimuladas com 20% de SFB ou com 2 µg/mL de ionomicina durante 30, 60, 120 ou 240 segundos; após de cada período de estimulação as células foram lavadas rapidamente com PBS 1x e fixadas com metanol gelado durante 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, durante 5 minutos e foi adicionado 1µg/mL da sonda nuclear Hoechst 33342 (Life Technologies). Finalmente, após serem lavadas mais duas vezes com PBS, as lamínulas

foram montadas usando Hydromount (National Diagnostics). Para os controles negativos as células não foram estimuladas.

As imagens foram coletadas no microscópio Leica GSD/TIRF HP com a objetiva de imersão a óleo de 63x e uma abertura numérica (NA) de 1,43. As imagens foram analisadas no software LAS X 3D.

5.9. Silenciamento do ITPR3 nas células U2OS e NIH/3T3 expressando à nAC, seguido por Western blot

As células U2OS estáveis (nAC) foram plaqueadas em lamínulas. Para o silenciamento utilizamos dois tubos (para cada sequência), no primeiro foi colocado 2 µL de Lipofectamina 2000 e no segundo 2 µL (40 nM) de siRNAs para o *ITPR3* (ver tabela 1) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Passado esse tempo misturamos o conteúdo dos tubos contendo a lipofectamina com os tubos contendo o siRNAs e incubamos por 20 minutos a temperatura ambiente. Depois foi adicionado 100 µL do conteúdo em cada poço das células plaqueadas e incubamos durante 6 horas a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂. Passadas as 6 horas, o meio OPTI-MEM foi trocado por meio DMEM sem PSA e as células foram incubadas por 72h a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂.

Finalmente realizamos a extração das proteínas e em sequência foi realizado o ensaio de Western Blot (protocolo do 5.5), para verificar o silenciamento do ITPR3.

Foram utilizadas três sequências de siRNA e 40 nM para cada sequência de ITPR3 (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências do ITPR3 utilizadas no silenciamento do ITPR3 em células U2OS e NIH/3T3

ID sequen- cia	Sequência	ID / REF
hs.Ri. ITPR3 13.1	5'-GGACUGACAAGAAUAACGAGCAUCA-3'	M548894811 / 442784242
hs.Ri. ITPR3 13.2	5'-GACAUCAUGGUCACUAAGCCCAACC-3'	M548894813 / 442784245
hs.Ri. ITPR3 13.3	5'-CAGUUUACCUUAAUGCCUUAGCAGA-3'	M548894815 / 442784248
Scramble	(DsiRNA) 5 nmol, controle negativo	51-01-14-04 Lot: 0000729978.

5.10. Formação dos filamentos de actina em células as U2OS nAC e NIH/3T3 nAC, silenciado o ITPR3 e estimuladas com soro ou ionomicina

O silenciamento das células foi realizado em células U2OS nAC e NIH/3T3 nAC, seguindo o procedimento previamente descrito (item 5.9). Depois foi realizada a estimulação das células de acordo como foi descrito na seção 5.8 e as imagens foram obtidas no microscópio Leica GSD/TIRF HP com a objetiva de imersão a óleo de 63x e uma abertura numérica (NA) de 1,43. As imagens foram analisadas no software LAS X 3D.

5.11. Experimentos com os adenovírus para expressão dos tampões de IP3

As células U2OS contendo a construção Actina Chromobody foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 , em lamínulas de 22 x 22 mm utilizando DMEM completo e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 12 horas. As células foram transduzidas com 100 MOIs (Multiplicidade de Infecção) com os adenovírus para expressar o mRPF-IP3-NES, mRFP-IP3-NLS e somente a mRFP durante 48h, após o meio foi lavado com PBS 1x e trocado por DMEM incompleto (sem SFB) durante 12 horas. Após esse período as células foram estimuladas com os agonistas: 20% de SFB ou 200 ng de EGF durante 30, 60 ou 120 segundos. Em seguida, fixou-se as células durante 10 minutos com formaldeído ao 4% (ThermoScientific, número de catálogo: 043368.9M). As células foram lavadas duas vezes durante 5 minutos com PBS 1x e a sonda Hoechst foi adicionada por 10 minutos; seguidamente outras duas lavagens foram feitas e foram

montadas com o ProLong (ThermoFisher, número de catálogo: P36934). O mesmo procedimento foi realizado com as células controle, a diferença foi que um controle não foi estimulado e outro foi estimulado com o agonista durante 60s.

Finalmente as imagens foram coletadas no microscópio da Leica usando a objetiva plana-apocromática com aumento de 63x e abertura numérica (N.A) de 1,47, contendo óleo como meio de imersão. As análises foram realizadas no próprio programa da Leica LAS X.

5.12. Experimentos de sinalização de Ca^{2+} em células U2OS WT

Inicialmente, as lamínulas de 22 × 22 mm (Electron Microscopy Sciences) foram flambadas, para garantir a esterilidade, e colocadas em placas de 35 mm (Sartstedt). As células foram plaqueadas em uma densidade de 2×10^5 células e mantidas a 37°C overnight em DMEM completo, depois as células foram transduzidas com 100 MOI dos vírus contendo o mRPF-IP3-NLS, mRFP-IP3-NES ou mRFP durante 48 horas. No dia seguinte o meio foi trocado por DMEM sem SFB e incubou-se a 37°C em estufa de CO₂ por mais 12h. Passado este período as células foram lavadas e adicionou-se a solução fisiológica contendo HEPES 1x (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 1,2 mM KH₂PO₄ (anidro), 1,25 mM CaCl₂·2H₂O), mais 5 μM da sonda Fluo 4-AM (Life Technologies) por 20 minutos na estufa a 37°C. Após a incubação com a sonda foram realizadas duas lavagens rápidas com solução com HEPES, para garantir a retirada do excesso da sonda no meio. As lamínulas contendo as células foram transferidas para uma câmara de perfusão customizada e levadas ao microscópio Opterra que é um microscópio confocal “swept-field” da Bruker. Foi realizado uma varredura sem agonistas por 60 segundo antes de adicionar os agonistas. Em seguida, foram adicionados 200 ng de EGF para estimular as células e observar a detecção de Ca^{2+} . Foi usada a objetiva com aumento de 40x, com abertura numérica (N.A) de 1,4 contendo óleo como meio de imersão. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ.

5.13. Experimento de decurso temporal em células expressando o nanoanti-corpo nAC para observar a formação dos filamentos de actina nuclear

O experimento de decurso temporal foi realizado utilizando o método descrito por [Dawidson A Gomes et al. \(2008\)](#). Primeiro, as lamínulas de 22 × 22 mm (Electron Microscopy Sciences) foram flambadas e colocadas em placas de 35 mm (Sarstedt). As células U2OS expressando a construção nAC foram plaqueadas com 2×10^5 e mantidas a 37°C overnight. O meio foi trocado por DMEM sem soro e foram incubadas a 37°C overnight. No dia seguinte, o meio foi retirado e adicionado 1 mL de tampão HEPES. As lamínulas foram analisadas no microscópio confocal Zeiss LSM 880 utilizando o software ZEN2. Foi utilizada a objetiva plana-apocromática com aumento de 63x, com abertura numérica (NA) de 1.4, contendo óleo como meio de imersão. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ. O mesmo procedimento foi realizado com as células NIH/3T3.

5.14. Análises da expressão da MYH9 e ITPR3 em tumores

Foi realizado análises da expressão do gene MYH9 e do ITPR3 em tecidos tumorais e não tumorais. Utilizamos a base de dados de perfis de expressão gênica GEPIA 2 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), dados obtidos do atlas do genoma de câncer (TCGA). Posteriormente, com esta mesma ferramenta foram realizadas as análises da curva de sobrevida dos pacientes comparando a expressão da MYH9 em diferentes tipos de tumores.

5.15. Análises estatísticas

As análises de espectrometria de massa foram realizadas com o software Scaffold versão 4 ou 5 (<https://www.proteomesoftware.com/products/scaffold-5>) ([Shibata et al., 2013](#)). Foi utilizado um limiar de identificação de peptídeos maior que 95% e pelo menos 5 peptídeos com um limiar precisão maior que 99,9%. para a anotação das proteínas nas análises realizadas. Neste programa analisou-se a abundância relativa das proteínas que se encontravam na porção nuclear e não nuclear das células MDCK e das frações nucleares da U2OS tratadas ou não tratadas com latrunculina B. Foi aplicado o teste *t-Student* com o $P < 0.05$ (dados MDCK) ou com o $P < 0.01$ (dados da U2OS WT). Para as análises de Western Blot e

Ca²⁺ foram realizadas pelo software ImageJ, seguido pelas análises estatísticas utilizando o software GraphPad Prism 10.3, com significância de $*P < 0.05$. Finalmente as análises da sobrevida dos pacientes foram realizadas no software de banco de dados GEPIA considerando um valor $*P < 0.05$.

6. Resultados

6.1. O ITPR3 forma um complexo com a MYH9 e β -actina

O nosso grupo de pesquisa caracterizou que o ITPR3 interage com a MYH9 e que esta interação poderia ocorrer no núcleo ([Michele A Rodrigues et al., 2022](#)). Para testar esta hipótese, realizamos um fracionamento de proteínas nucleares e não nucleares em células MDCK, seguido de imunoprecipitação do ITPR3. Realizou-se uma análise de expressão diferencial do interactoma do ITPR3 entre a fração nuclear e não nuclear utilizando o software Scaffold (test-t, $P < 0,05$). Na Figura 6A, observa-se que o ITPR3 está mais abundante na fração nuclear em relação a fração não nuclear. Na Figura 6B e 6C, tanto no gráfico de vulcão (volcano plot) quanto no diagrama de Venn demonstram a identificação de 20 proteínas mais abundantes na fração nuclear. Entre essas proteínas, destacam-se a MYH9 e a β -actina (Tabela 2, Figura 6C). Na Tabela 2, estão listadas as 20 proteínas mais abundantes na fração nuclear das células MDCK, sendo o ITPR3 a proteína de maior abundância, o que demonstra que a metodologia de imunoprecipitação empregada foi eficaz para concentrar o alvo de interesse. Esses resultados sugerem que o ITPR3 pode formar um complexo com a β -actina e a MYH9.

Em seguida, foram realizadas análises de imunoprecipitação da β -actina nas frações nucleares de células U2OS, tanto não tratadas quanto tratadas com latrunculina B, um composto que inibe a formação de filamentos de actina. Este experimento teve como objetivo identificar proteínas envolvidas na formação dos filamentos de actina. A análise diferencial do interactoma da β -actina nas frações nucleares dessas células foi feita no software Scaffold (teste t, $P < 0,01$). Os resultados demonstraram que a MYH9 estava mais abundante no grupo não tratado com latrunculina B, sendo essa proteína a única em comum entre as 20 mais abundantes do interactoma nuclear do ITPR3 e as 9 proteínas mais enriquecidas do grupo não tratado com latrunculina B do interactoma da β -actina (Figura 7B e C). No gráfico de vulcão, a MYH9 foi destacada (Figura 7B e Tabela 3). Além disso, identificaram-se 571 proteínas nas células

U2OS tratadas com latrunculina B em comparação com apenas 9 nas não tratadas (Figura 7C).

Para verificar se todas as proteínas da Tabela 3 participam da mesma rede de interação, utilizou-se a ferramenta STRING (<https://string-db.org/>). O resultado confirmou que as nove proteínas identificadas formam uma única rede de interação com a β -actina (score de confiança médio = 0,400). Na Figura 7C, observa-se que β -actina e MYH9 ocupam posições centrais na rede.

A interação entre MYH9 e β -actina foi confirmada pelo uso da ferramenta GeneMania, por meio de uma análise abrangente do proteoma do ITPR3, MYH9 e β -actina. Os resultados revelaram interações entre MYH9, ITPR3 e β -actina em diferentes linhagens celulares (Figura 8). Estes dados sugerem que a interação entre ITPR3, MYH9 e β -actina e este complexo pode ocorrer em diferentes tipos celulares de espécies distintas.

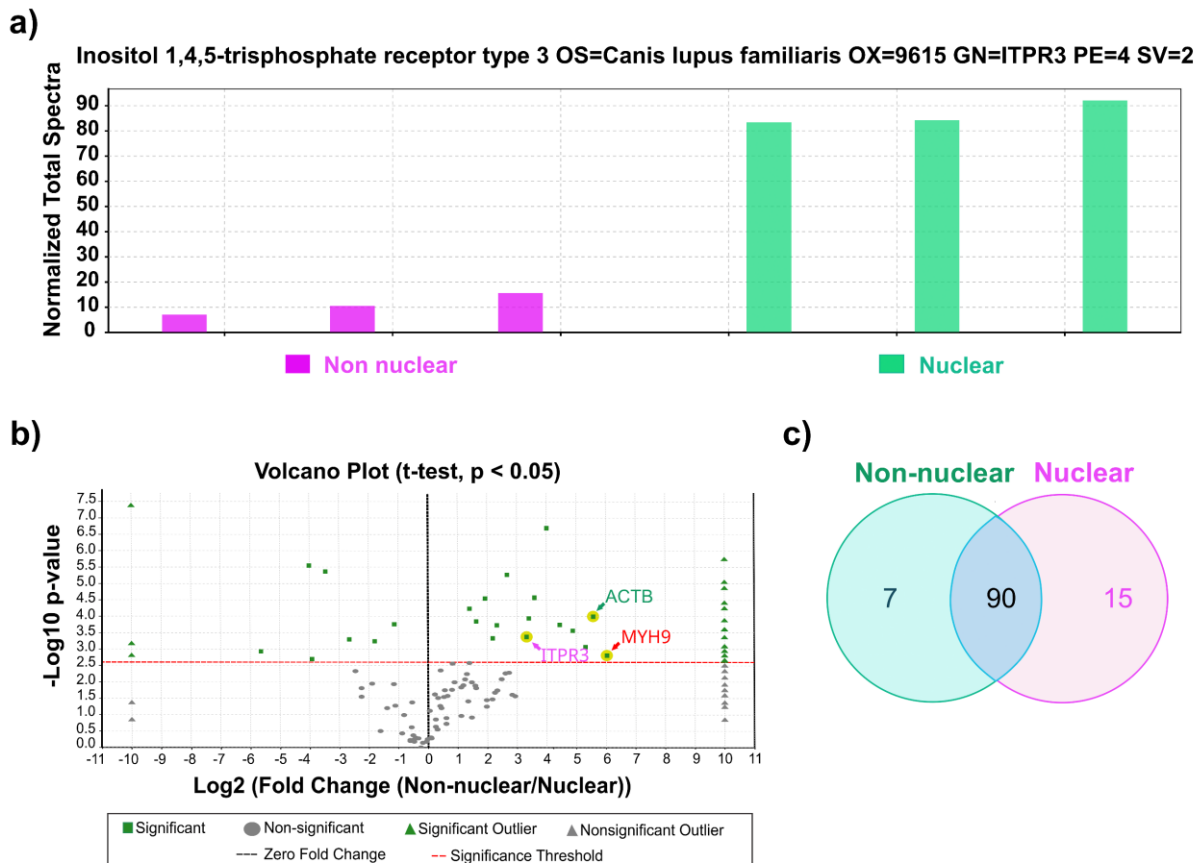


Figura 6. Análise da expressão diferencial do interactoma do ITPR3 comparando as frações nucleares e não nucleares de células MDCK. Foi realizado imunoprecipitação do ITPR3 após fracionamento celular das células MDCK seguida de análise de espectrometria

de massas. a) Comparação da expressão do ITPR3 nas frações nuclear e não nuclear de células MDCK. b) Gráficos de vulcão ilustrando a expressão de ITPR3 nas frações não-nuclear e nuclear das células MDCK. c) Diagrama de Venn mostrando as proteínas diferencialmente abundantes: sete proteínas na fração não nuclear (rosa), 20 proteínas na fração nuclear (verde) e 90 proteínas em ambas as frações.

Tabela 2. Lista das 20 proteínas, mas abundantes na fração nuclear de células MDCK

Número de acesso	Nome da proteína	Peso Molecular (kDa)	t-test (p-value)
E2RMC0	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	304	< 0.00010
F1PLS4	Cluster of Vimentin	58	0.081
O18840	Cluster of Actin	24	0.073
F1Q0N9	Cluster of Keratin 19	42	0.003
F1PLV2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	25	0.00039
F1PHS5	Plectin	534	0.00092
J9JH91	Cluster of Envoplakin	64	0.066
F1Q0H6	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	234	0.0016
J9NU37	Periplakin	308	0.002
E2QW54	LIM domain and actin binding 1	204	<0.00010
F1PW98	Cluster of Uncharacterized protein	85	0.00084
Q6TEQ7	Cluster of Annexin A2	55	0.0002
F1PTY1	Keratin, type II cytoskeletal 1	39	0.0015
E2REU6	Cluster of Uncharacterized protein	50	0.0025
J9NYB5	Uncharacterized protein	313	0.0015
F1PIQ7	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	281	0.0097
E2R0F2	Cluster of Filamin B	130	0.011
F1PNH8	ITPR interacting domain containing 2	77	<0.00010
J9NSL9	Sciellin	21	0.025
F1P9J3	Myosin-9	226	0.04

A cor magenta destaca o ITPR3, a cor verde é a β -actina e vermelha é a MYH9.

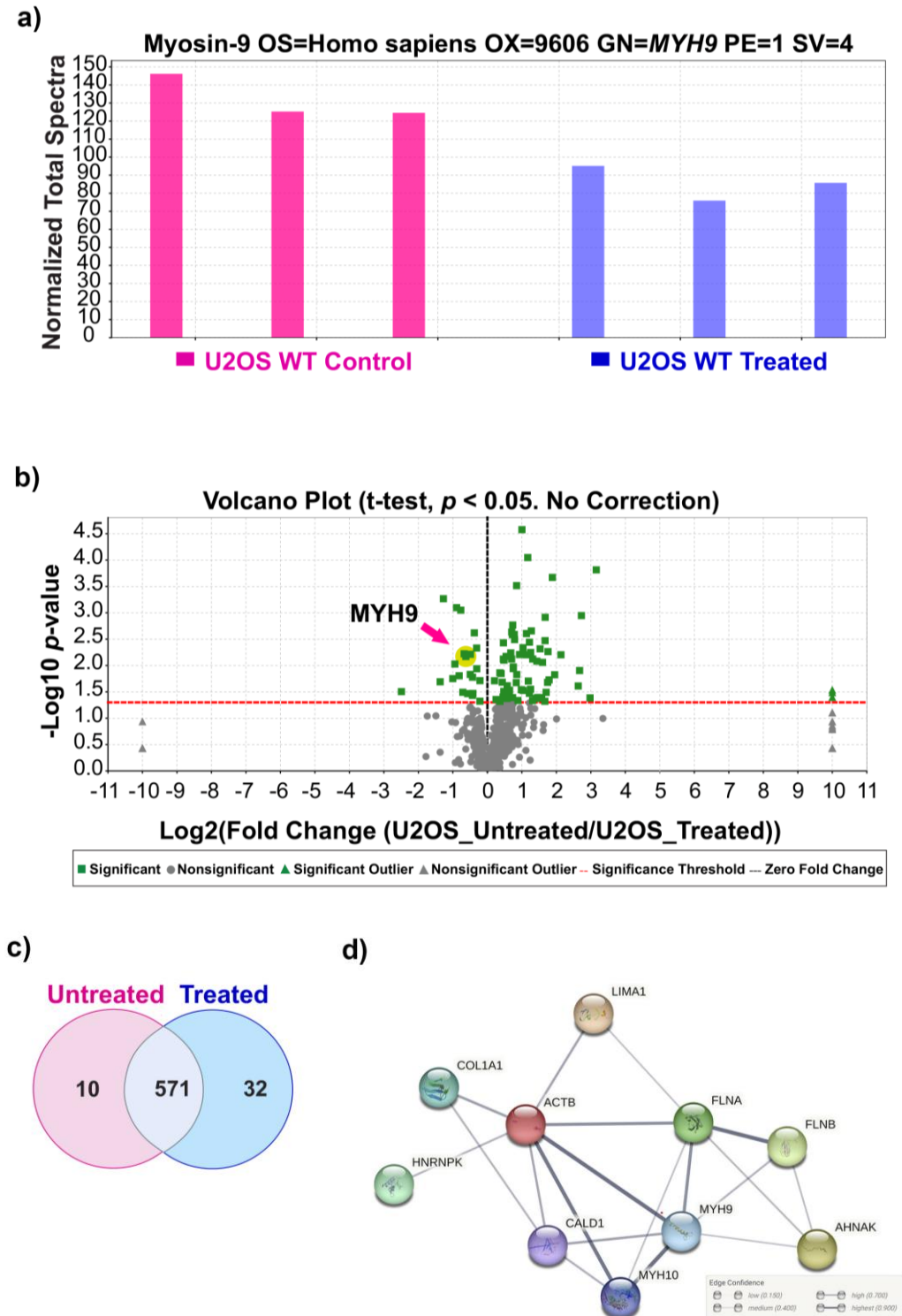


Figura 7. Interactoma nuclear da β -actina em células U2OS tratadas com latrunculina B. Foi realizado imunoprecipitação da β -actina após fracionamento nuclear seguida de análise de espectrometria de massas em células U2OS tratadas e não tratadas com latrunculina B (lat-B). a) Expressão de MYH9 em células U2OS não tratadas e tratadas com lat-B. b) Gráfico em vulcão das proteínas diferencialmente abundantes que interagem com a β -actina entre os grupos tratados (direita) e não tratados (esquerda) com lat-b. c) Diagrama de Venn das proteínas diferencialmente expressas nos dois grupos. d) As dez proteínas no grupo não tratado fazem parte da rede de interação da β -actina. Score de interação de confiança média = 0.400.

Tabela 3. Lista das 9 proteínas mais abundantes no grupo de células U2OS não tratadas com com Lat-B.

ID numbers	Protein name	<i>t</i> -test (<i>P</i> -value)
O75369	Filamin-B	0.01
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	0.01
P21333	Filamin-A	0.01
P35579	Myosin-9	0.01
P35580	Myosin-10	0.01
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0.01
Q05682	Caldesmon	0.01
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	0.01
Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	0.01

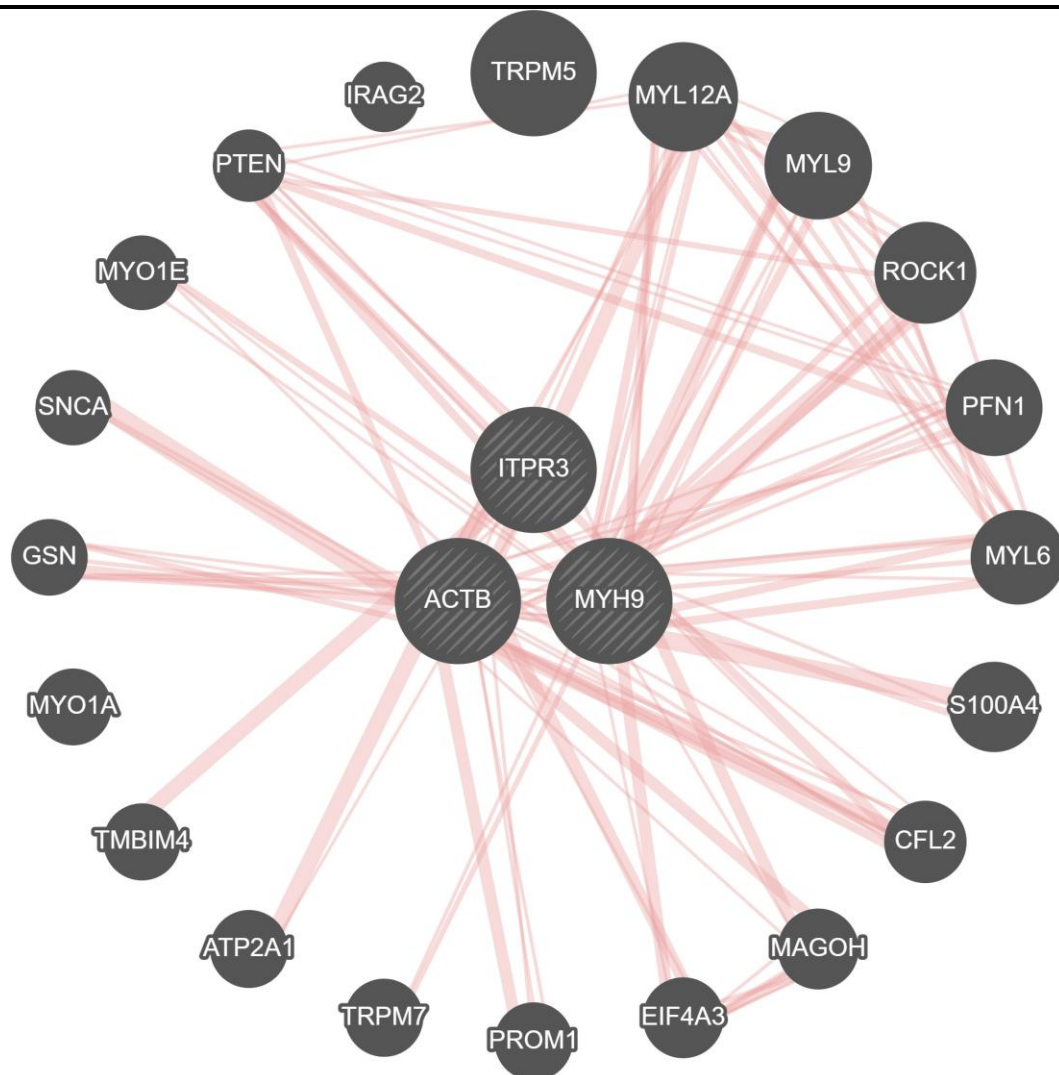


Figura 8. Interação do ITPR3 com o complexo actina-miosina. GeneMania data-base (<https://genemania.org/>). Demonstração da rede de interação do complexo ITPR3 com ACTB e MYH9.

6.2. O ITPR3, MYH9 e β -actina são expressas no núcleo

Foi realizado o fracionamento celular seguido de análise por Western Blot em células U2OS WT, NIH/3T3 e MDCK. Nas células U2OS WT foi possível detectar a expressão nuclear de MYH9, ITPR3 e β -actina (**Figuras 9a**). Como controles de pureza das frações, foram utilizadas a lâmina B1, marcador específico do envelope nuclear, e a α -tubulina, marcador citoplasmático, ausente na fração nuclear.

Nas células U2OS WT, a expressão nuclear de ITPR3 foi maior em relação à sua expressão citoplasmática ($P < 0,0001$), com uma diferença de $81,12 \pm 9,612\%$ (**Figura 9b**). Entretanto, a expressão nuclear de MYH9 foi reduzida ($P < 0,0001$, apresentando uma diferença de $70,97 \pm 11,37\%$ (**Figura 9c**). Por outro lado, a β -actina não apresentou diferença entre as frações nuclear e citoplasmática ($P > 0,05$) (**Figura 9d**).

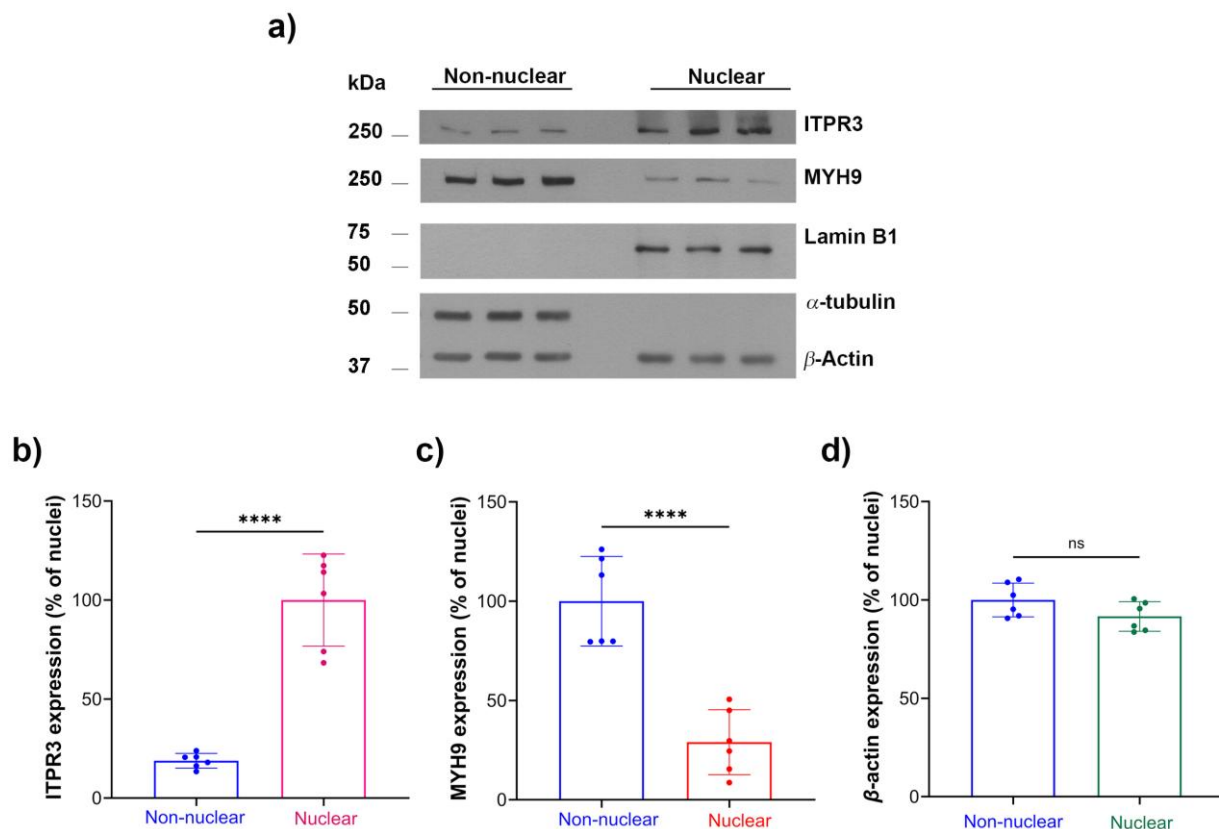


Figura 9. Expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina na fração nuclear de células U2OS. Western blot após fracionamento das frações nucleares e não nucleares. a) Western blot representativo da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações nucleares e não nucleares. A lâmina B1 foi utilizada como controle da fração nuclear e a α -tubulina como controle da fração citoplasmática. b-c) Quantificação da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações não nucleares e nucleares. Os dados foram normalizados como percentagem da fração nuclear. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste-t. As barras representam ($\% \pm SD$), sobre as barras se observa ns = não significativo, **** $P < 0,0001$, N = 6

Adicionalmente, nas células NIH/3T3 também foi possível observar a expressão das três proteínas na fração nuclear e não nuclear (**Figura 10a**). Porém, a expressão do ITPR3 e MYH9 não apresentou diferença entre a porção nuclear em comparação à citoplasmática ($P = 0,1740$) e MYH9 ($P = 0,1688$) (**Figuras 10b,c**). Apenas a β -actina apresentou um aumento na fração citoplasmática ($P = 0,0198$), com uma diferença de $15,63 \pm 5,647\%$ entre as duas frações (**Figura 10d**). Ressalta-se que não houve contaminação cruzada entre as frações, conforme demonstrado pelos controles com lâmina B1 (marcador nuclear) e α -tubulina (marcador citoplasmático).

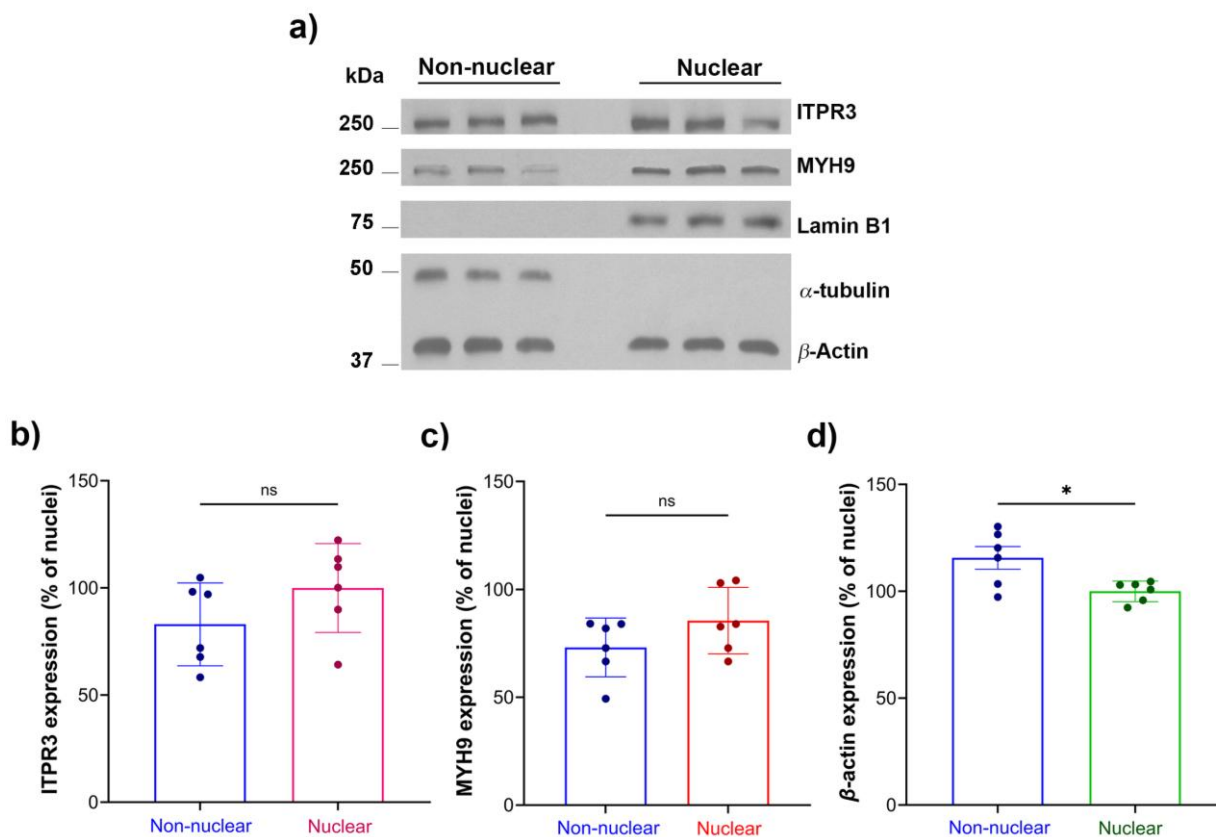


Figura 10. Expressão de ITPR3, MYH9 e β -actina na fração nuclear de células NIH/3T3. Western blot após fracionamento das frações nucleares e não nucleares. a) Western Blot representativo da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações nucleares e não nucleares, foi utilizado a lâmina B1 como controle da porção nuclear e tubulina como controle da porção citoplasmática. b-c) Quantificação da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações não nucleares e nucleares. Os dados foram normalizados como percentagem da fração nuclear. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste-t. As barras representam ($\% \pm SD$), sobre as barras se observa ns = não significativo, $*P < 0,01$. N= 6

Similarmente, observou-se a expressão das três proteínas nas células MDCK. Conforme mostrado na **Figura 11a**, o ITPR3 apresentou maior quantidade na fração nuclear em comparação a fração citoplasmática ($P < 0,0001$), com uma diferença de

$86,72 \pm 8,654\%$. A MYH9 também foi maior na fração nuclear ($P < 0,0001$), com uma diferença de $76,95 \pm 8,355\%$ (**Figura 11b**). Em contraste, a β -actina apresentou maior expressão na fração citoplasmática em relação à nuclear ($P < 0,0001$), com uma diferença de $41,64 \pm 4,536\%$ (**Figura 11d**).

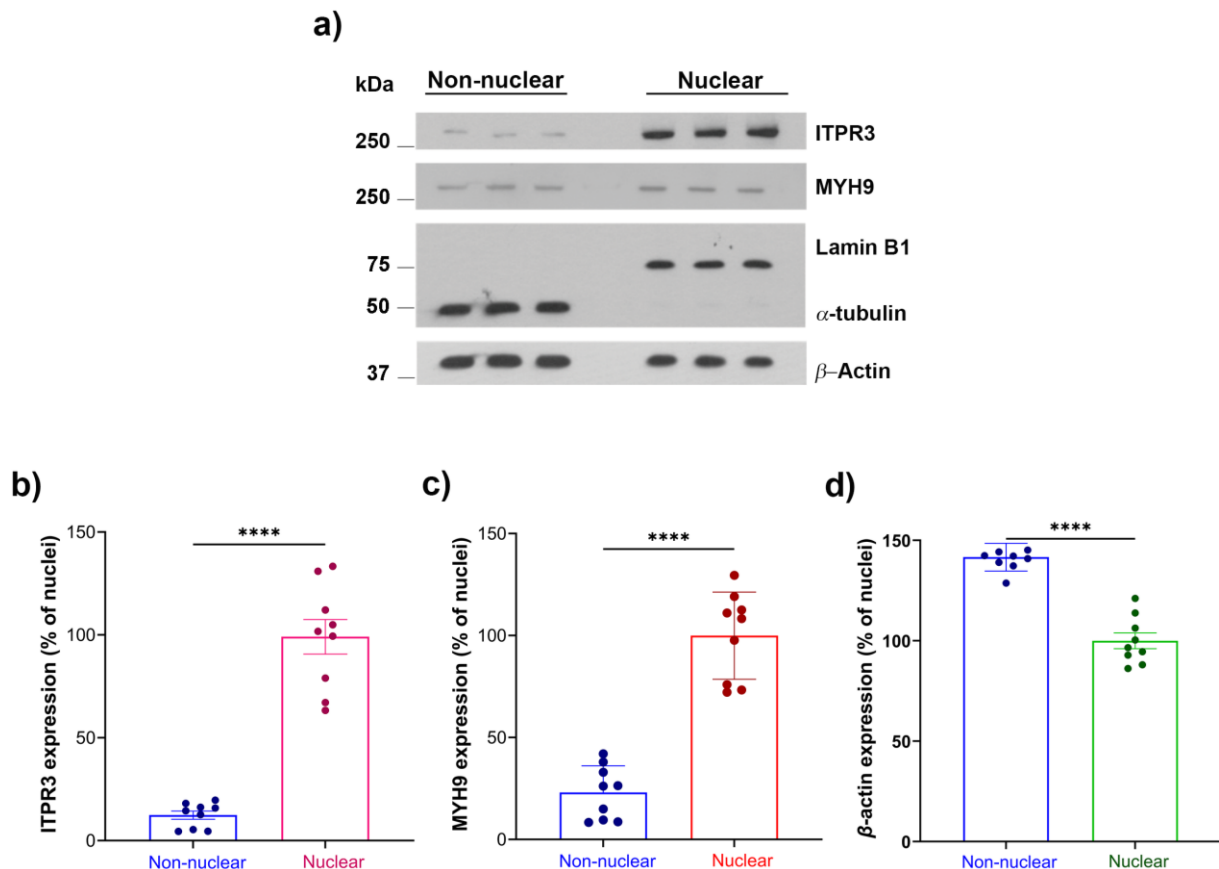


Figura 11. Expressão de ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações nuclear e não nuclear em células MDCK. Western blot após fracionamento das frações nucleares e não nucleares. a) Western Blot representativo da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações nucleares e não nucleares, foi utilizado a lâmina B1 como controle da porção nuclear e tubulina como controle da porção citoplasmática. b-c) Quantificação da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações não nucleares e nucleares. Os dados foram normalizados como porcentagem da fração nuclear. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste-t. As barras representam ($\% \pm SD$), sobre as barras se observa ns = não significativo, **** $P < 0,0001$. N= 9

Nas linhagens celulares MzChA1 WT e MzChA1 KO, foi realizado exclusivamente o fracionamento nuclear. A **Figura 12a** apresenta os níveis de expressão de ITPR3, MYH9 e β -actina. A proteína ITPR3 foi detectada apenas nas células MzChA1-WT, estando ausente nas células MzChA1 KO ($P < 0,0022$), com uma diferença média de $103,3 \pm 9,492$, confirmando o estado de knock-out de ITPR3 (**Figura 12b**).

A expressão de MYH9 foi superior nas células MzChA1 WT em comparação com as MzChA1 KO ($P < 0,0001$) (**Figura 12c**). Por outro lado, a expressão de β -actina não apresentou diferença entre as duas linhagens celulares ($P > 0.05$) (**Figura 12d**).

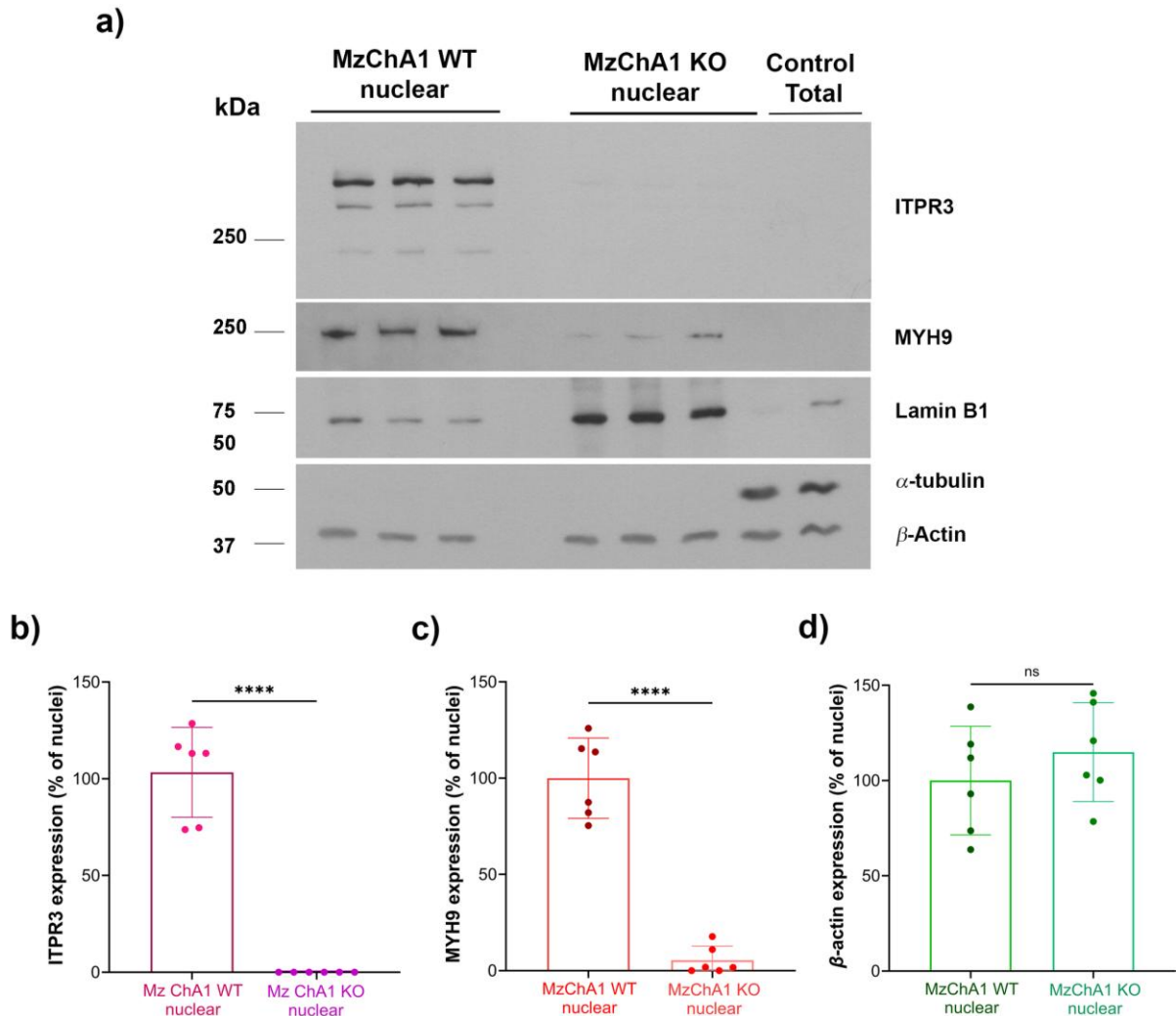


Figura 12. Western blot das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina no núcleo das células MzChA1 WT e MzChA1 KO. Western blot após fracionamento das frações nucleares e não nucleares. a) Western Blot representativo da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações nucleares e não nucleares, foi utilizado a lâmina B1 como controle da porção nuclear e tubulina como controle da porção citoplasmática. b-c) Quantificação da expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina nas frações não nucleares e nucleares. Os dados foram normalizados como porcentagem da fração nuclear. Barras representam ($\% \pm SD$). ns = sem diferenças. **** $P < 0,0001$. N=6

6.3. Expressão e colocalização nuclear do complexo ITPR3, MYH9 e β -actina.

Por meio de ensaios de imunofluorescência em células U2OS WT, NIH/3T3 e MDCK, foi investigada a expressão e colocalização nuclear de ITPR3 com MYH9 e β -actina. O ITPR3 foi visualizado em magenta, a MYH9 em vermelho e a β -actina em verde, enquanto os núcleos foram marcados em azul, e em seguida todos os canais

combinados (*merged*). Evidencia-se a colocalização dessas proteínas no núcleo, sendo possível observar os pontos de contato em branco, que indicam a interação entre ITPR3, MYH9 e β -actina (**Figura 13**).

a)

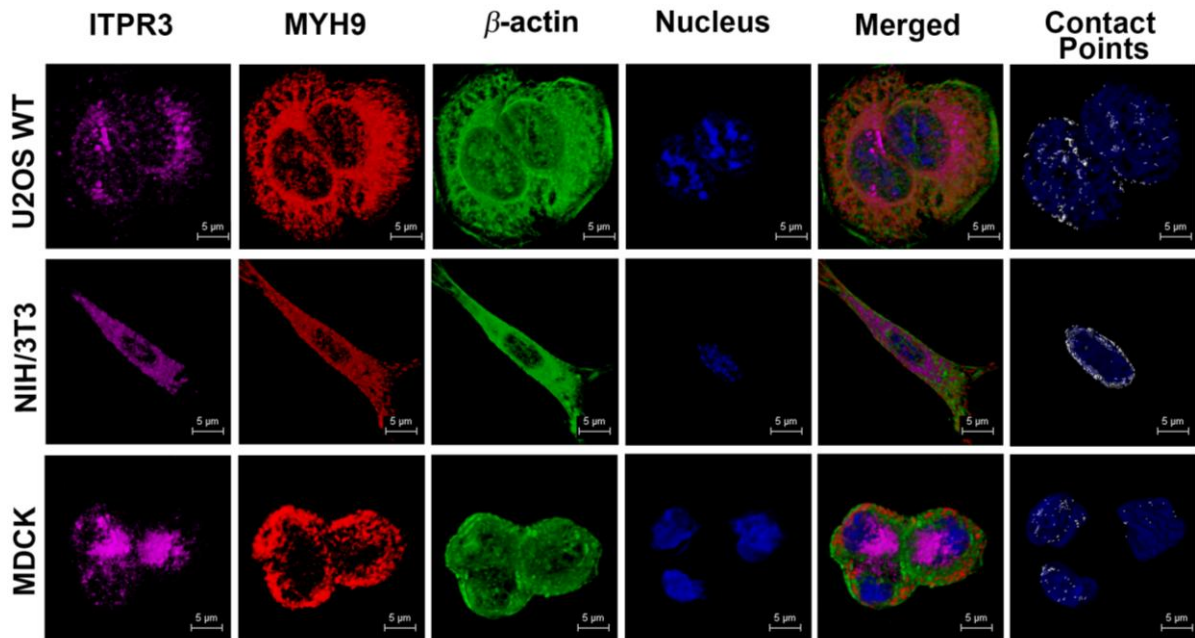


Figura 13. Localização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células U2OS WT, NIH/3T3 e MDCK. a) Imagens representativas de células U2OS WT, NIH/3T3 e MDCK com a presença do ITPR3 (magenta), MYH9 (vermelho), β -actina (verde), os núcleos corados com Hoechst (azul). O *merged* é a imagem de sobreposição dos quatro canais combinados e os pontos de contato das três proteínas na porção nuclear podem ser observados em brancos. Imagem representativa. N=6.

Além disso, por meio de análises tridimensionais com reconstrução ortogonal (imagens 3D), foi possível visualizar as interações nucleares entre ITPR3 (magenta), MYH9 (vermelho) e β -actina (verde) nas células U2OS WT, destacadas por setas brancas (**Figuras 14**).

b)

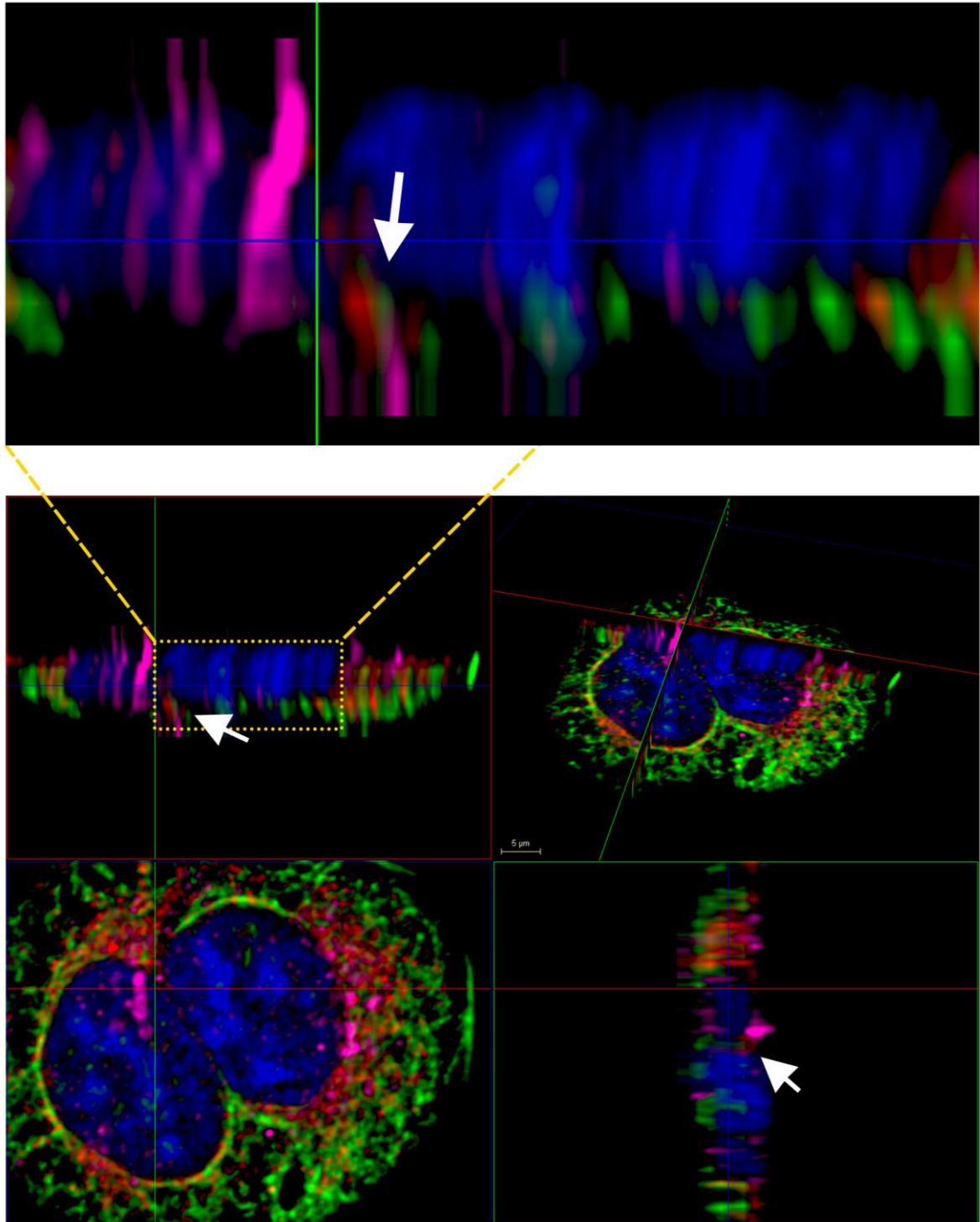


Figura 14. Reconstrução tridimensional evidenciando a colocalização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células U2OS. Imagem ortogonal das células U2OS WT, as setas brancas mostram a interação das três proteínas no núcleo das células.

Da mesma forma, na imagem tridimensional da célula NIH/3T3 observa-se a expressão e interação nuclear da MYH9 com a β -actina e o ITPR3 (setas brancas), tanto no eixo X como no Y (**Figura 15**).

c)

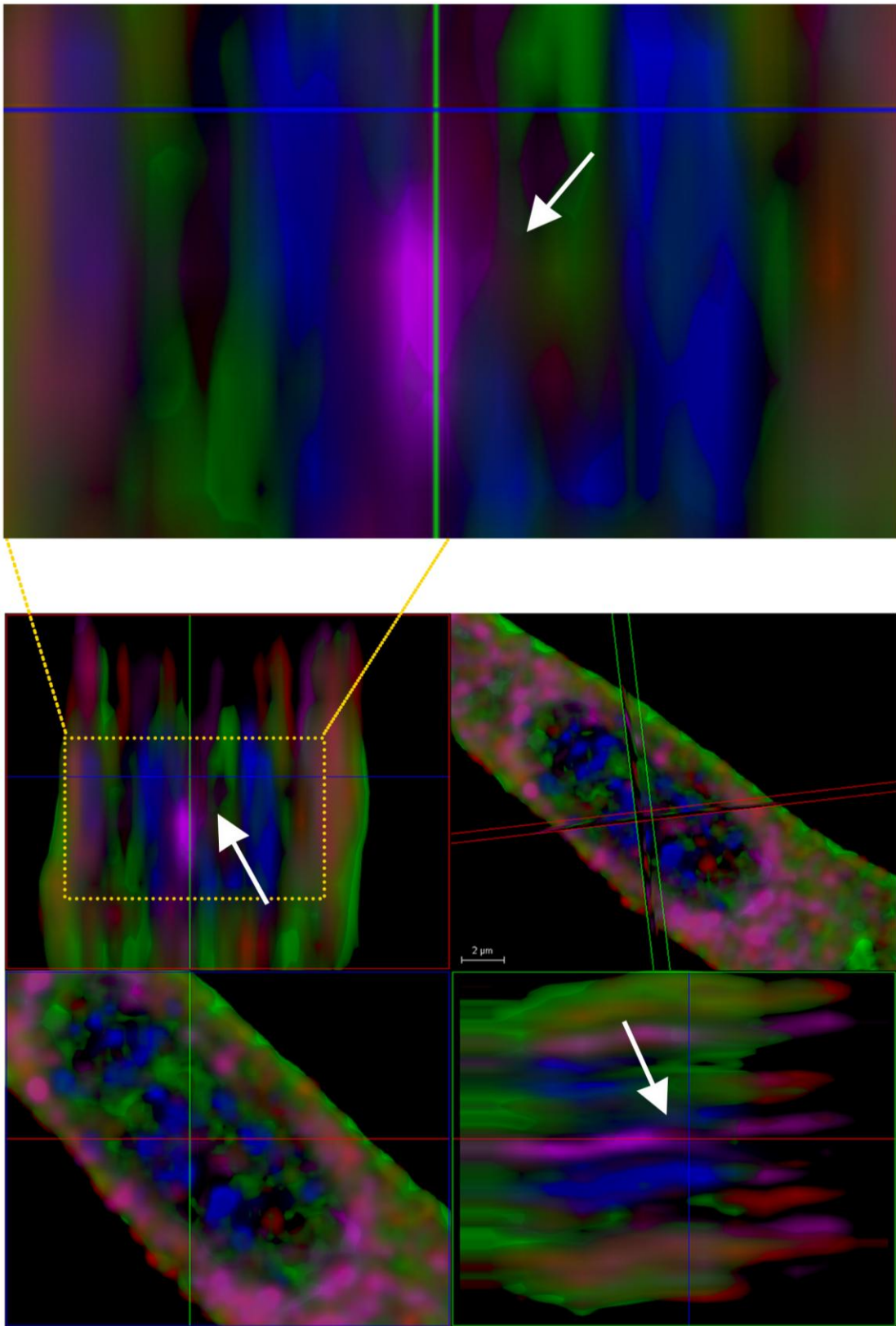


Figura 15. Reconstrução tridimensional evidenciando a colocalização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células NIH/3T3. Imagem ortogonal obtida por microscopia de fluorescência, na qual setas brancas assinalam regiões de potencial interação entre as três proteínas no interior do núcleo celular.

Na reconstrução ortogonal das células MDCK também foi possível demonstrar a expressão, localização e interação das três proteínas (**Figura 16**). Observa-se nas setas brancas no plano X e Y.

d)

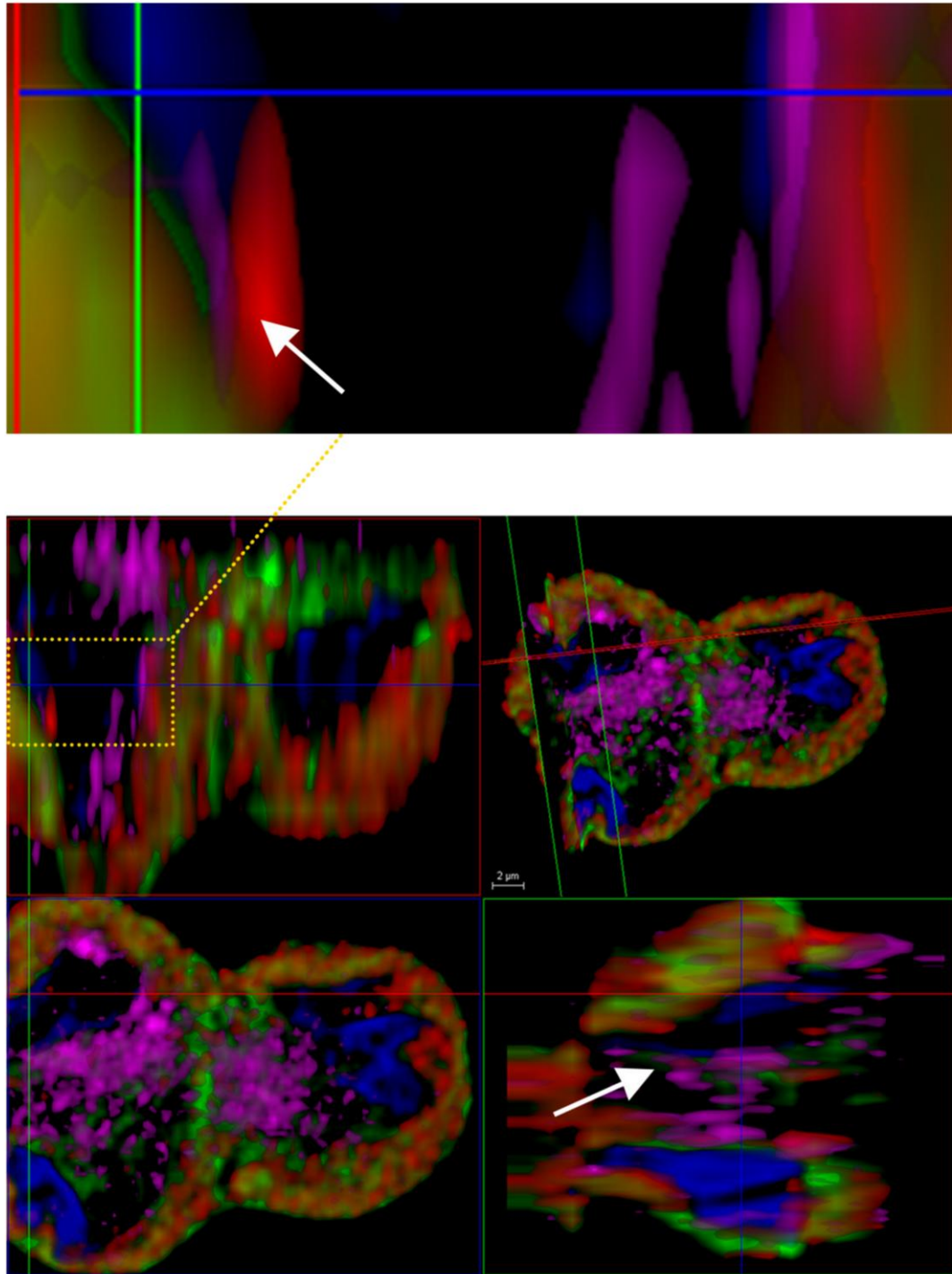


Figura 16. Reconstrução tridimensional evidenciando a colocalização nuclear das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células MDCK. Imagem ortogonal obtida por microscopia de fluorescência, na qual setas brancas assinalam regiões de potencial interação entre as três proteínas no interior do núcleo celular.

Além disso, é evidente a expressão e interação do ITPR3, MYH9 e β -actina nos núcleos das células MzChA1 WT (linhagem de colangiocarcinoma humano) (**Figura 17a superior**). No entanto, nas células MzChA1 KO (knockout para ITPR3), foi observada apenas a expressão nuclear de MYH9 e β -actina (**Figura 17a inferior**).

a)

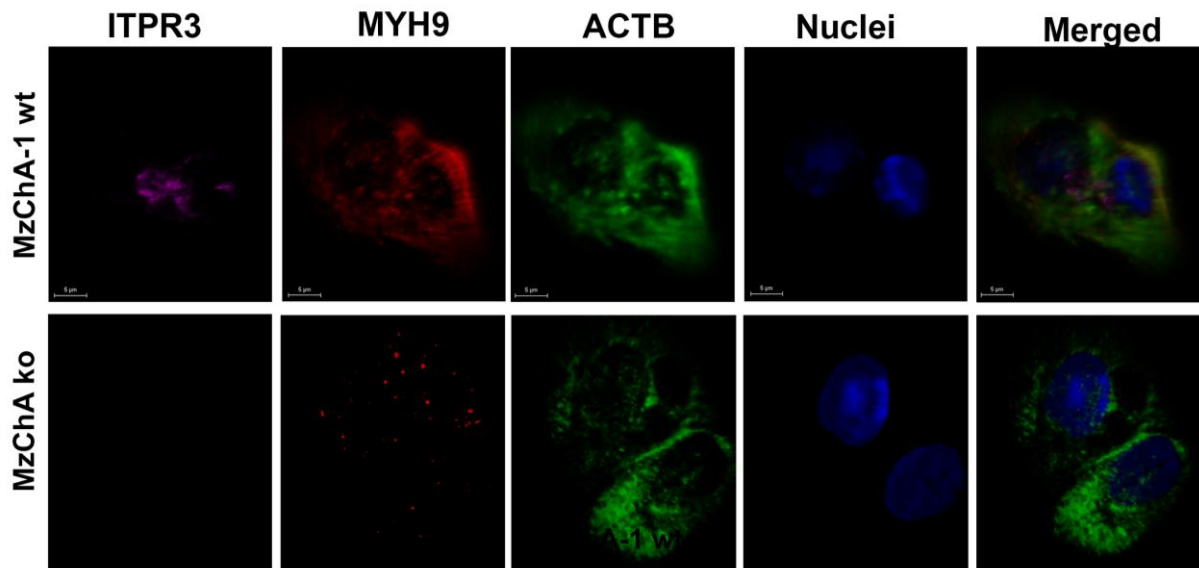
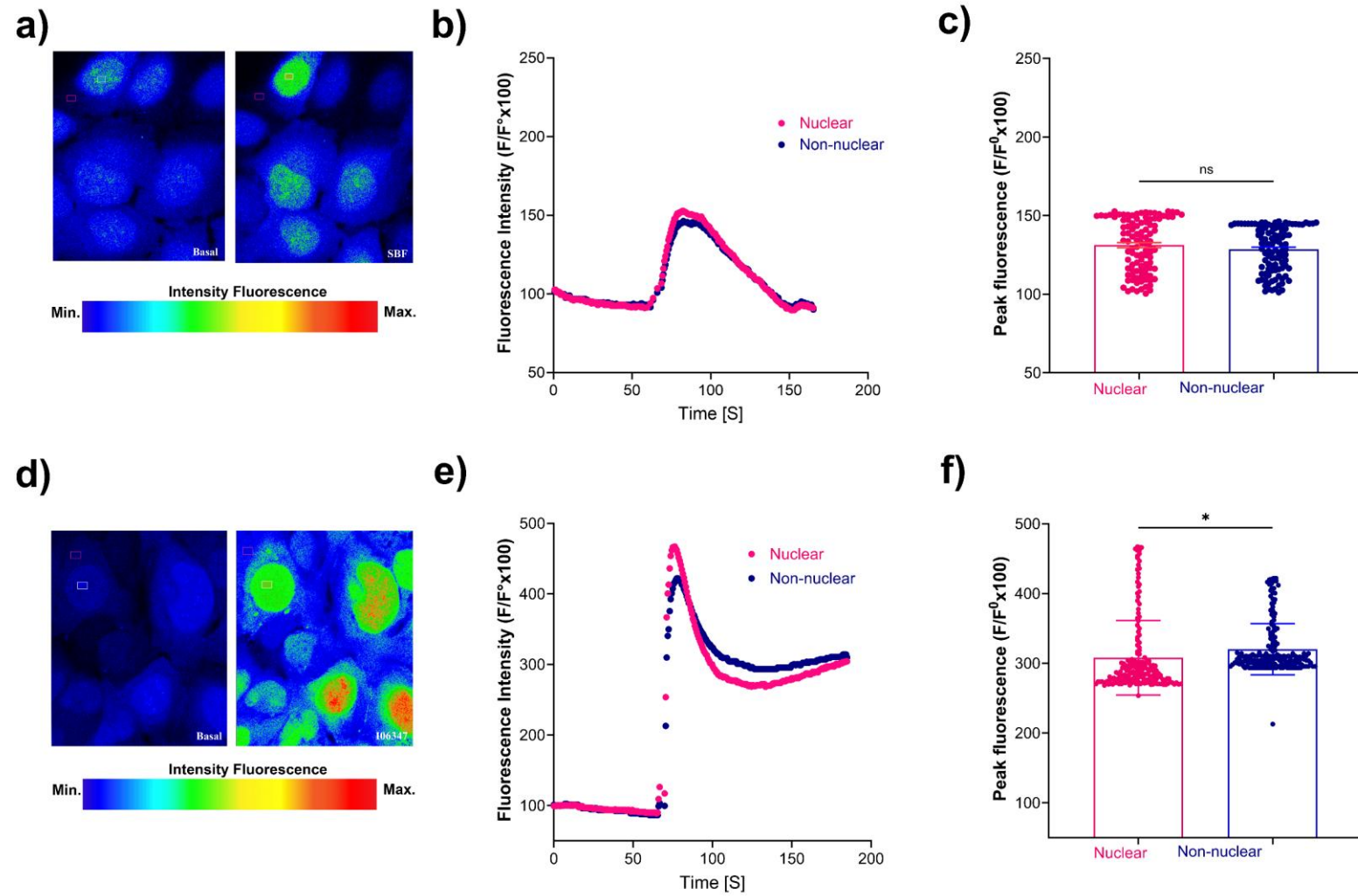


Figura 17. Expressão e colocalização das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina. a) ITPR3, MYH9 e β -actina. (N=4).

6.4. Soro fetal bovino e ionomicina induzem a elevação de Ca^{2+} .

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro capaz de estimular funções importantes, como contração muscular, proliferação celular e transcrição gênica. Neste ensaio, as células U2OS e NIH/3T3 foram estimuladas com soro fetal bovino e ionomicina para verificar se eles induzem aumento do Ca^{2+} intracelular. As células foram cultivadas em meio sem soro por 12 horas e incubadas por 20 minutos com 5 μM de Fluo-4 AM. Em seguida, foram transferidas para uma câmara de perfusão para observar, por microscopia confocal possíveis elevações nos níveis de Ca^{2+} induzidos pelos agonistas. Foi realizado um ensaio de decurso temporal em que as células U2OS WT e NIH/3T3 foram estimuladas com 20% SFB ou 2,5 μM de ionomicina. Ambos os agonistas provocaram aumento dos níveis de Ca^{2+} no núcleo e no citoplasma dessas células (**Figura 18**).

Observou-se que a marcação basal do Fluo-4 AM no núcleo de células U2OS WT em repouso é maior que no citoplasma (**Figuras 18a**) e depois da estimulação com SFB houve liberação do Ca^{2+} tanto no núcleo como no citoplasma (**Figuras 18b**). A comparação do pico da intensidade do sinal de Ca^{2+} no núcleo e no citoplasma das células U2OS WT estimuladas com SFB não mostrou diferença entre os dois compartimentos de 0.8792 ± 1.824 ($P > 0,05$) (**Figura 18c**). Na **figura 18d**, nota-se a marcação basal da sonda Fluo-4 AM nas células em repouso e depois da estimulação com ionomicina. Após de estimular com ionomicina, foi possível observar o incremento do Ca^{2+} no núcleo e citoplasma (**Figura 18e**), além os análises mostraram que houve maior liberação do Ca^{2+} nuclear que citoplasmático 12.21 ± 4.81 ($P < 0,01$) (**Figura 18f**), entretanto a intensidade do Ca^{2+} com ionomicina foi maior que a intensidade com SFB. O mesmo experimento foi realizado nas células NIH/3T3. Na **Figura 18g** podemos observar as células em repouso e depois da estimulação com SFB, na **figura 18h**, é possível observar a liberação do Ca^{2+} tanto no núcleo como no citoplasma, além o pico do sinal de Ca^{2+} apresentou diferença entre o núcleo e o citoplasma de 19.42 ± 8.357 ($P < 0,02$) (**Figuras 18i**). Contudo, na **figura 18j** se observa as células em estado basal e após estimulação com ionomicina, este agonista também foi capaz de liberar o Ca^{2+} nuclear e citoplasmático (**Figura 18k**); onde o núcleo exibiu maior aumento do sinal de Ca^{2+} ao comparar com o citoplasma 36.02 ± 11.85 ($P < 0,003$) em relação ao núcleo (**Figuras 18l**).



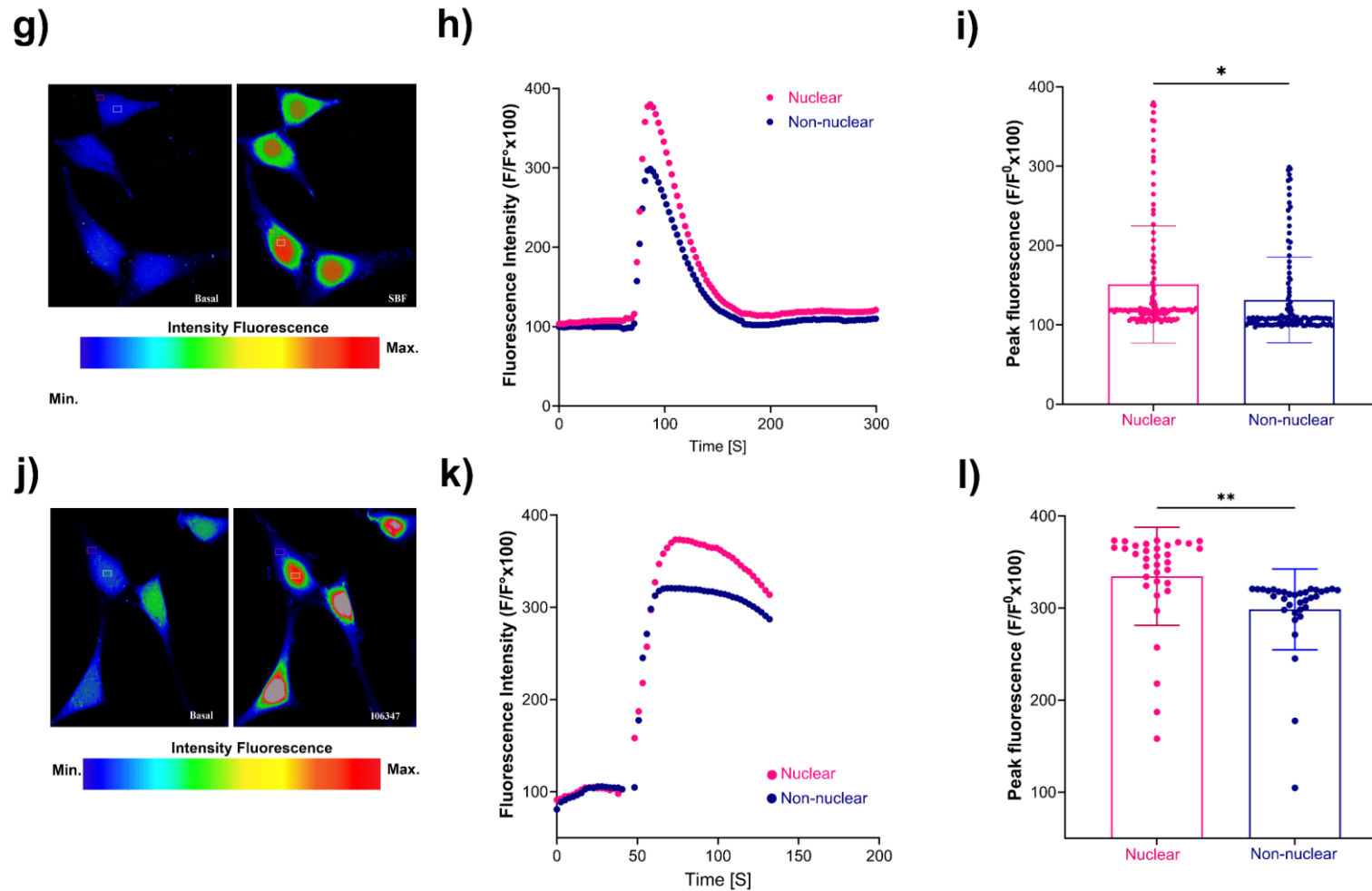


Figura 18. Soro fetal bovino e Ionomicina estimulam a libertação de Ca^{2+} . a) Imagem representativa das células U2OS WT. b e c) intensidade do Ca^{2+} no núcleo e citoplasma após estimulação com SFB. d) células U2OS WT em repouso. e, f) pico de intensidade do Ca^{2+} estimuladas com ionomicina. g) células NIH/3T3 em repouso, não estimuladas. h, i) pico de intensidade de Ca^{2+} células estimuladas com SFB. j) células NIH/3T3 em repouso. k, l) intensidade do Ca^{2+} após de serem estimuladas com ionomicina. Experimentos representativos de N = 3. (t-test); * $P < 0.05$, ns = não significativo. Experimentos realizados na objetiva a óleo de 60x.

6.4.1. Formação dos filamentos de actina após estímulo com SFB, ionomicina e EGF.

A literatura descreve o uso do “Nuclear Actin Chromobody” — um nano anti-corpo contra a actina com sinal de localização nuclear (NLS) ligado ao TagGFP2 — para monitorar a dinâmica dos filamentos de actina ([Tamura et al., 2024](#); [Y. Wang et al., 2019](#)). Para avaliar a dinâmica da formação dos filamentos de actina no núcleo as células U2OS que expressam de forma estável o constructo nAC foram estimuladas com 20% de FBS por 240 segundos, para observar a formação de filamentos de actina em tempo real (**Figura 19a**). Esse resultado foi confirmado em células fixadas, nas quais a formação mais significativa ocorreu entre 30 e 60 segundos $13 \pm 0.5\%$ e $14 \pm 0.5\%$ $P < 0,0001$ como podemos observar no gráfico em azul (**Figura 19a, direita**). Quando estimuladas com ionomicina por 120 segundos, a formação de filamentos de actina no núcleo foi observada (**Figura 19b, esquerda inferior**). Em células fixadas, o pico máximo de formação, em magenta, ocorreu aos 15 segundos $13 \pm 2\%$ (**Figura 19b, direita inferior**).

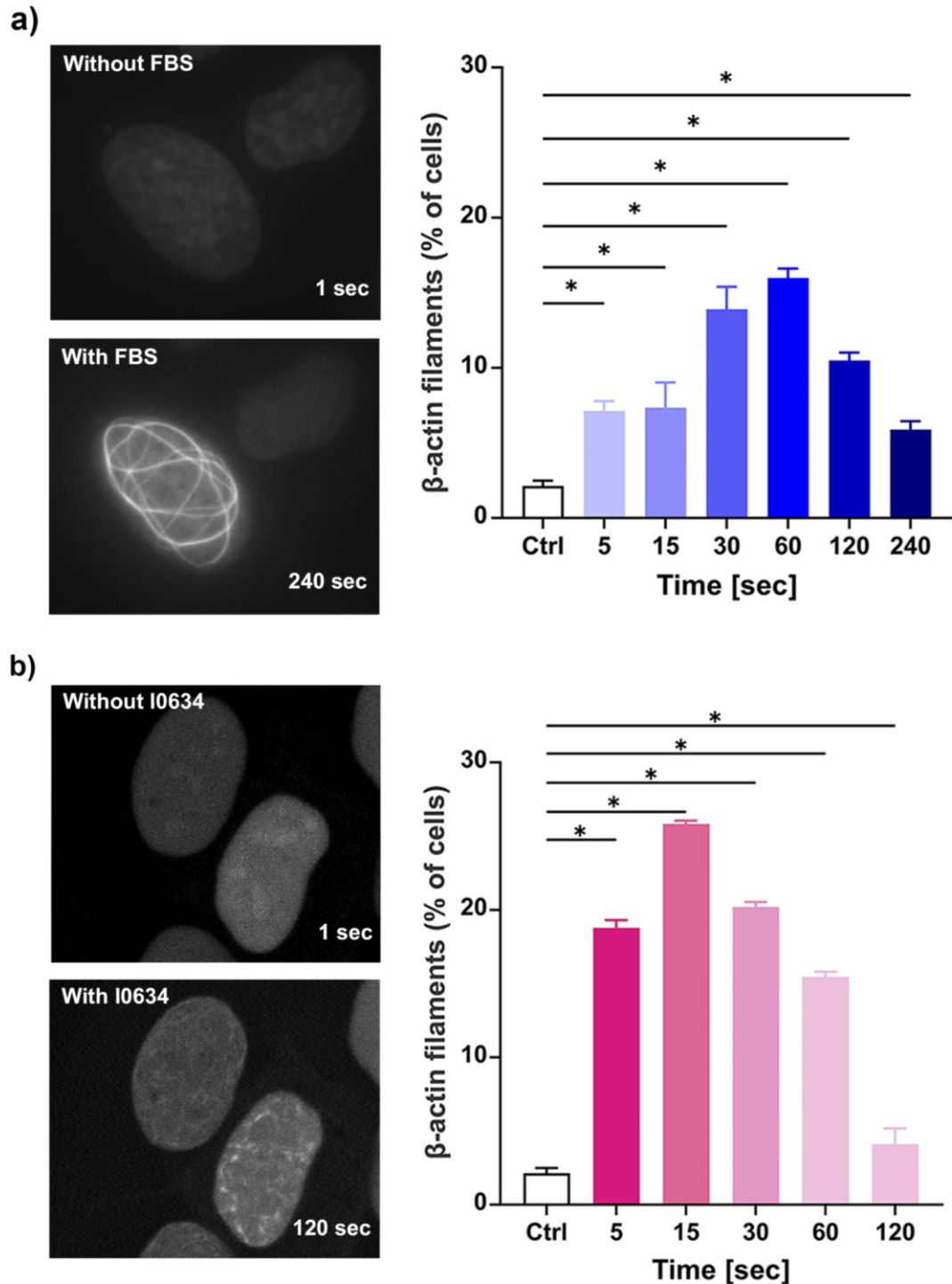


Figura 19. Formação de Filamentos de F-actina em Células U2OS. a) Imagens de células U2OS: células não estimuladas (superior), células estimuladas com 20% de FBS (inferior) e porcentagem das células fixadas em diferentes tempos após a estimulação (azul). b) Imagens de células U2OS: não estimuladas (superior), estimuladas com ionomicina (inferior) e porcentagem formação dos filamentos de actina após a estimulação com ionomicina (magenta). Os experimentos foram realizados com microscópio LSM 880, utilizando objetiva de 60× (N.A. 1,3). N = 515 células. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes, * $P < 0,05$.

Similarmente, em células NIH/3T3 fixadas, a formação de filamentos foi induzida por ambos os agonistas com picos máximos aos 30 segundos para FBS $43 \pm 2\%$ (**Figura 20a**) e 15 segundos para ionomicina $37 \pm 3\%$ (**Figura 20 b**).

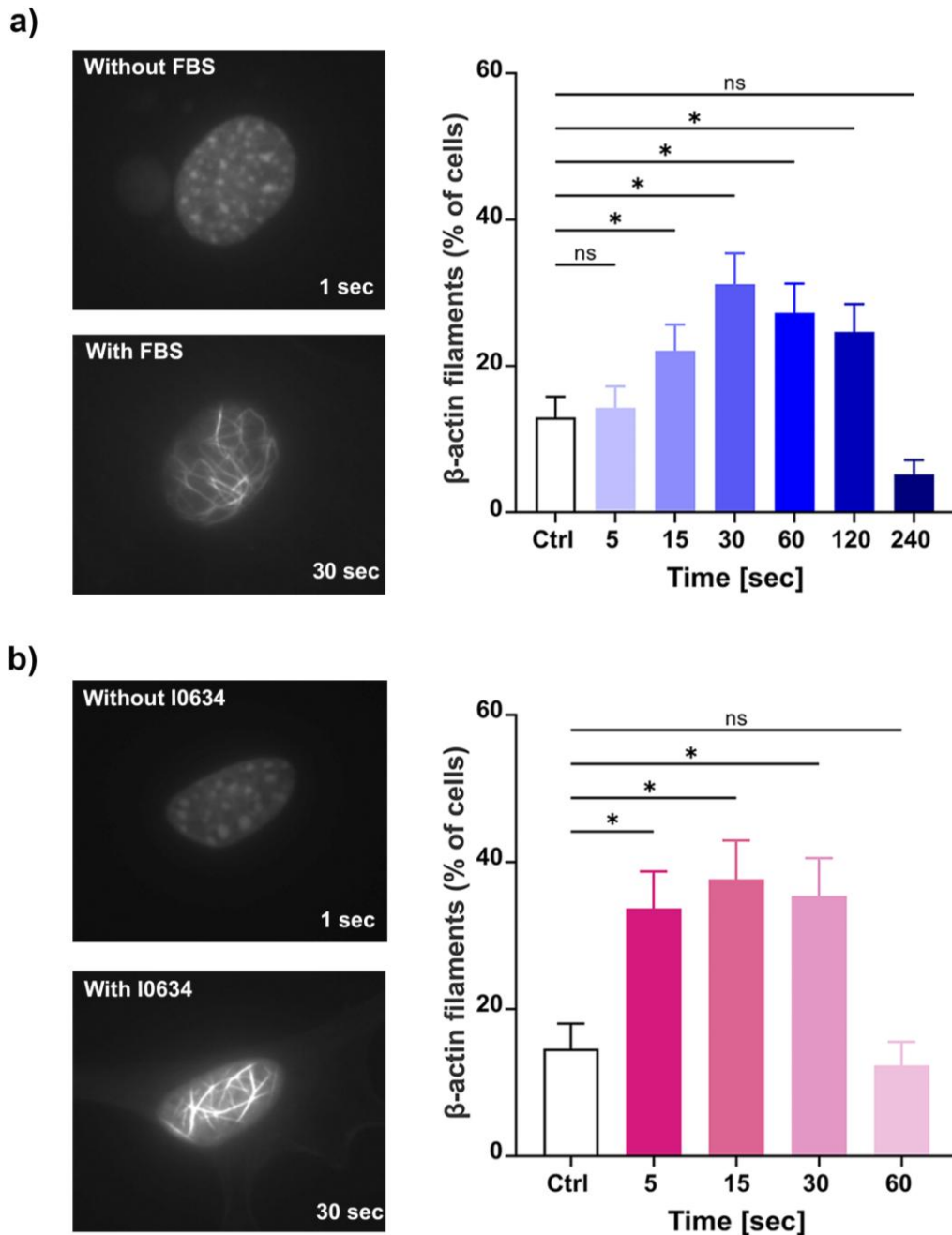


Figura 20. Formação de Filamentos de F-actina em Células NIH/3T3. a) Imagens do núcleo de células NIH/3T3: célula não estimulada (superior), formação de filamentos após a estimulação (inferior) e gráfico com a porcentagem de formação de filamentos de actina em diferentes tempos após estímulo com FBS (azul). b) Superior célula não estimulada, inferior célula estimulada. Em magenta porcentagem da formação dos filamentos após estímulo com ionomicina. Os experimentos foram realizados com microscópio LSM 880, utilizando objetiva de 60 $\times$ (N.A. 1,3). N = 313 células. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes * $P < 0,05$, ns = não significativo.

Além disso, o EGF foi utilizado como um dos agonistas para estimular a formação de filamentos de actina nas células U2OS. Após a aplicação do EGF, observou-se a organização desses filamentos, atingindo seu pico em 60 segundos $19 \pm 3\%$ $P < 0,001$, evidenciado pelo gráfico representativo (**Figura 21**).

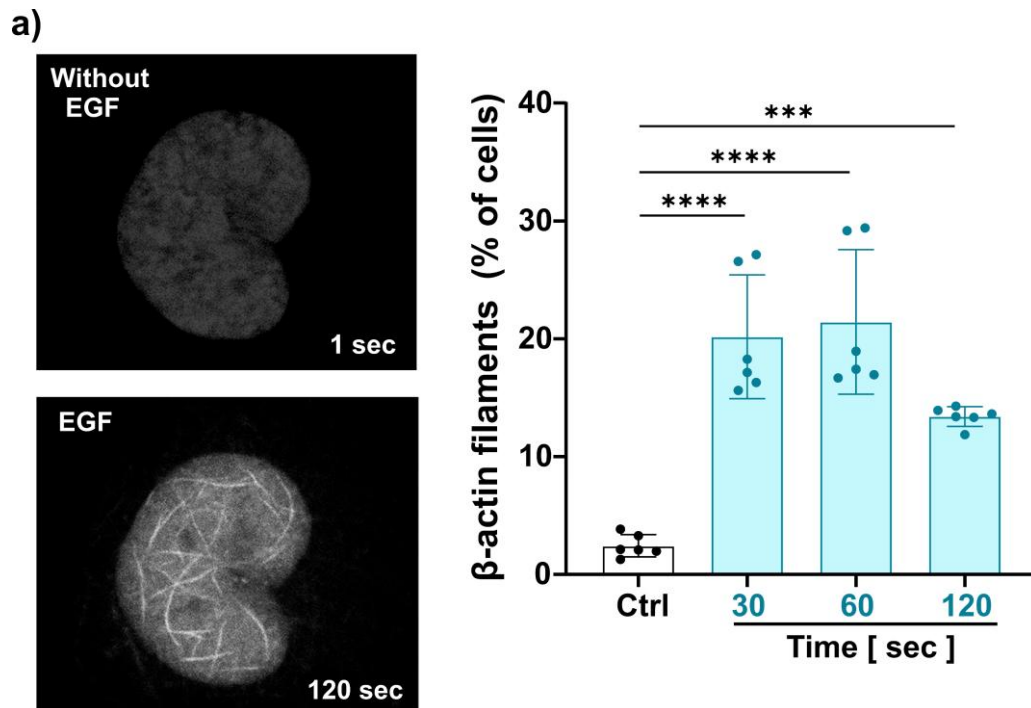


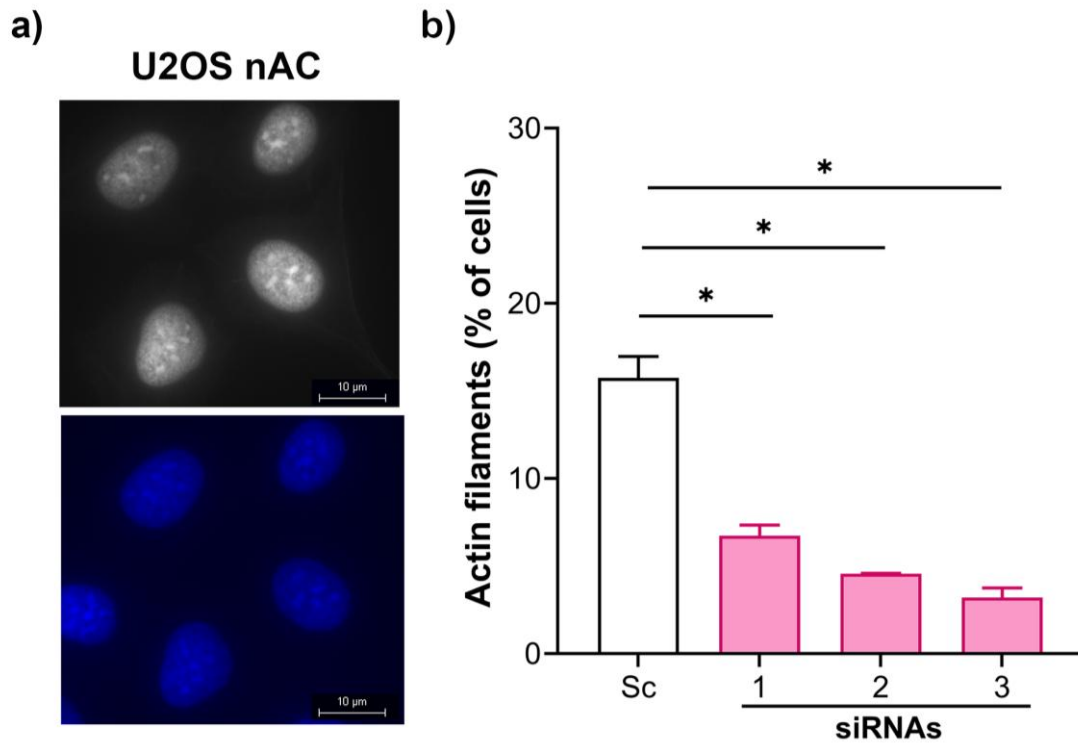
Figura 21. EGF induz a formação de filamentos de actina em células U2OS. a) Imagens de células U2OS não estimulada (azul) e estimulada com 200 ng/mL de EGF (verde): porcentagem dos filamentos de actina após a estimulação (gráfico representativo). Os experimentos foram realizados com microscópio Leica SP8, utilizando objetiva de 60 $\times$ (N.A. 1,3). N = 515 células por cada repetição. Foram realizados 3 experimentos independentes $P < 0,001$.

6.5. Silenciamento de ITPR3 em células U2OS WT e NIH/3T3.

O ITPR3 é responsável pela liberação de Ca^{2+} ([Berridge et al., 2000](#)). Para investigar seu papel na formação de filamentos de actina no núcleo, foi utilizada a técnica de silenciamento gênico por siRNA (small interfering RNA) para diminuir a expressão do ITPR3 em células U2OS e NIH/3T3, expressando a actina chromobody, utilizando três sequências diferentes de siRNA.

Nas **figuras 22a** superior representa células U2OS nAC sem estimular e a figura inferior são células estimuladas com FBS. Nossos resultados demonstraram que o silenciamento de ITPR3 reduziu em $57 \pm 4\%$, $71 \pm 4\%$ e $80 \pm 4\%$, com as sequências de sRNA 1, 2 e 3, respectivamente, a formação de filamentos de actina após

estimulação com SFB nas células U2OS WT ($P < 0,05$) (**Figuras 22b**). A eficiência do silenciamento foi confirmada por Western Blot (**Figura 22c**); as três sequências de siRNA reduziram em $44 \pm 8\%$, $43 \pm 8\%$ e $68 \pm 8\%$ a expressão de ITPR3 em comparação ao controle em células U2OS ($P < 0,05$) (**Figura 22d**) e não houve diferença na expressão da actina (**Figura 22e**).



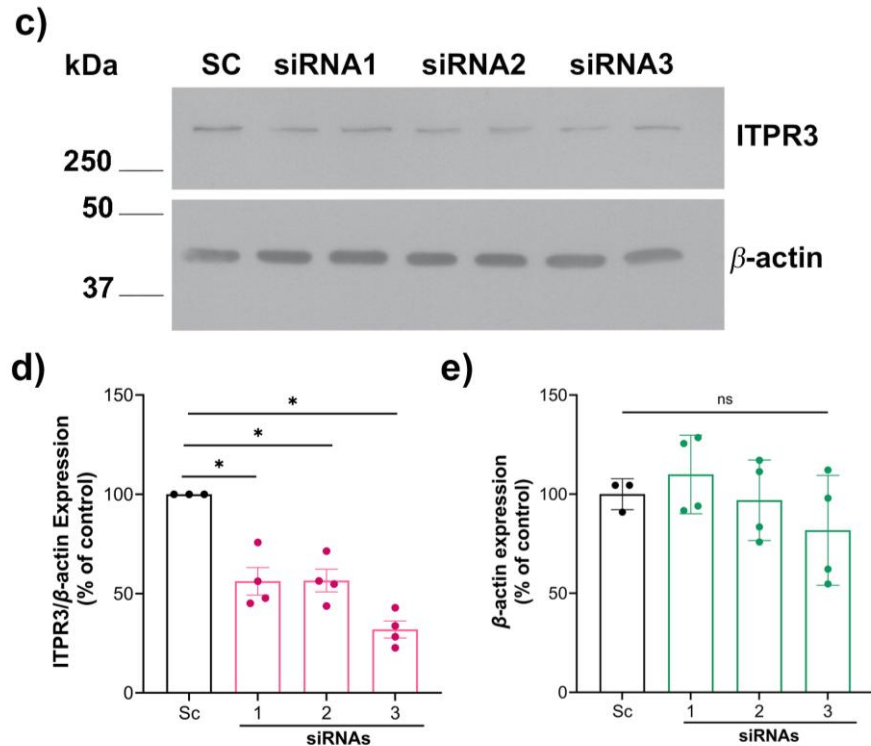


Figura 22. Silenciamento de ITPR3 em células U2OS WT e Formação da Actina Nuclear em células U2OS nAC. a) Formação de filamentos de β -actina após do silenciamento de ITPR3 e estimulação com SFB. N = 116. b) Porcentagem total da expressão do ITPR3 mediante Western Blot. N = 4. O controle negativo utilizado foi o siRNA Scramble. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA, ns = não significativo, * $P < 0,05$.

Por outro lado, na **Figura 23a** superior se observa células NIH/3T3 nAC não estimuladas e na figura inferior as células estimuladas com FBS. Foi possível observar que nas células NIH/3T3 nAC também houve decréscimo da formação dos filamentos de actina e este efeito foi maior com a sequência 3 ($P < 0,0001$) (**Figura 23b**). A eficácia do silenciamento do ITPR3 nestas células foi evidenciada por Western Blot (**Figura 23c**) e não se observou diferença no controle com as sequências 1 e 2 ($P > 0,05$). Entretanto, houve diminuição do 90% utilizando a sequência 3 ($P < 0,0001$) (**Figura 23d**) e a expressão da actina não mostrou diferença significativa nas três sequências comparadas com o controle (**Figura 23e**).

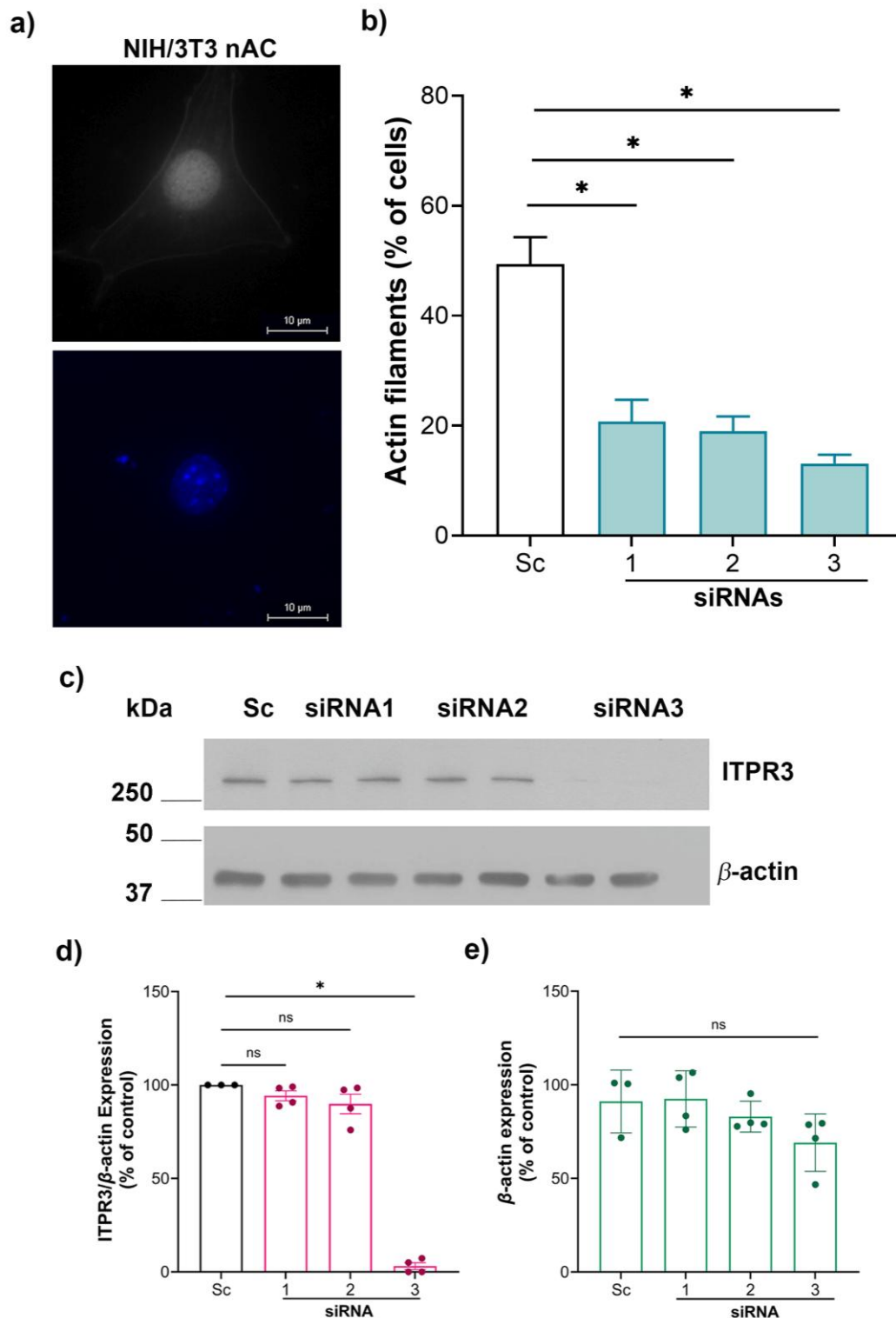


Figura 23. Silenciamento de ITPR3 em células NIH/3T3 e Formação da Actina Nuclear em células NIH/3T3 nAC. a) Formação de filamentos de β -actina após do silenciamento de ITPR3 e estimulação com SFB. N = 116. b) Porcentagem total da expressão do ITPR3 mediante Western Blot N = 4. O controle negativo utilizado foi o siRNA Scramble. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA (ns = não significativo; *P < 0,05).

6.6. O tampão de IP3 NLS bloqueia o cálcio nuclear após a estimulação com EGF

De acordo com os resultados do silenciamento de ITPR3 em células U2OS e NIH/3T3, reforça-se a hipótese de que agonistas como FBS, EGF e ionomicina estimulam o ITPR3, promovendo a liberação de Ca^{2+} , que por sua vez é responsável pela formação de filamentos de actina no núcleo.

Para investigar este mecanismo, foi realizado um ensaio de Ca^{2+} em células U2OS WT infectadas apenas com mRFP, células U2OS WT infectadas com os buffers IP3-NLS e IP3-NES (**Figura 24a**). As células foram estimuladas com EGF (200 ng/mL) para avaliar se esse agonista poderia induzir um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Antes da estimulação, as células foram cultivadas em meio sem soro por 12 horas e incubadas com 5 μM de Fluo-4 AM por 22 minutos. Em seguida, foram transferidas para uma câmara de perfusão, onde a variação dos níveis de Ca^{2+} foi monitorada em tempo real por microscopia confocal (OPTERRA). Observou-se que o EGF aumentou os níveis de Ca^{2+} no núcleo e no citoplasma das células U2OS WT. Não foram observadas diferenças nas células estimuladas com EGF quando comparadas com as células controle infectadas apenas com mRFP e células infectadas com o IP3-NES ($P > 0.05$). Entretanto, o pico da intensidade dos sinais de Ca^{2+} do núcleo apresentou diminuição de $26 \pm 1\%$ ($P < 0.0001$), nas células infectadas com o buffer IP3-NLS (**Figura 24b e 24c**).

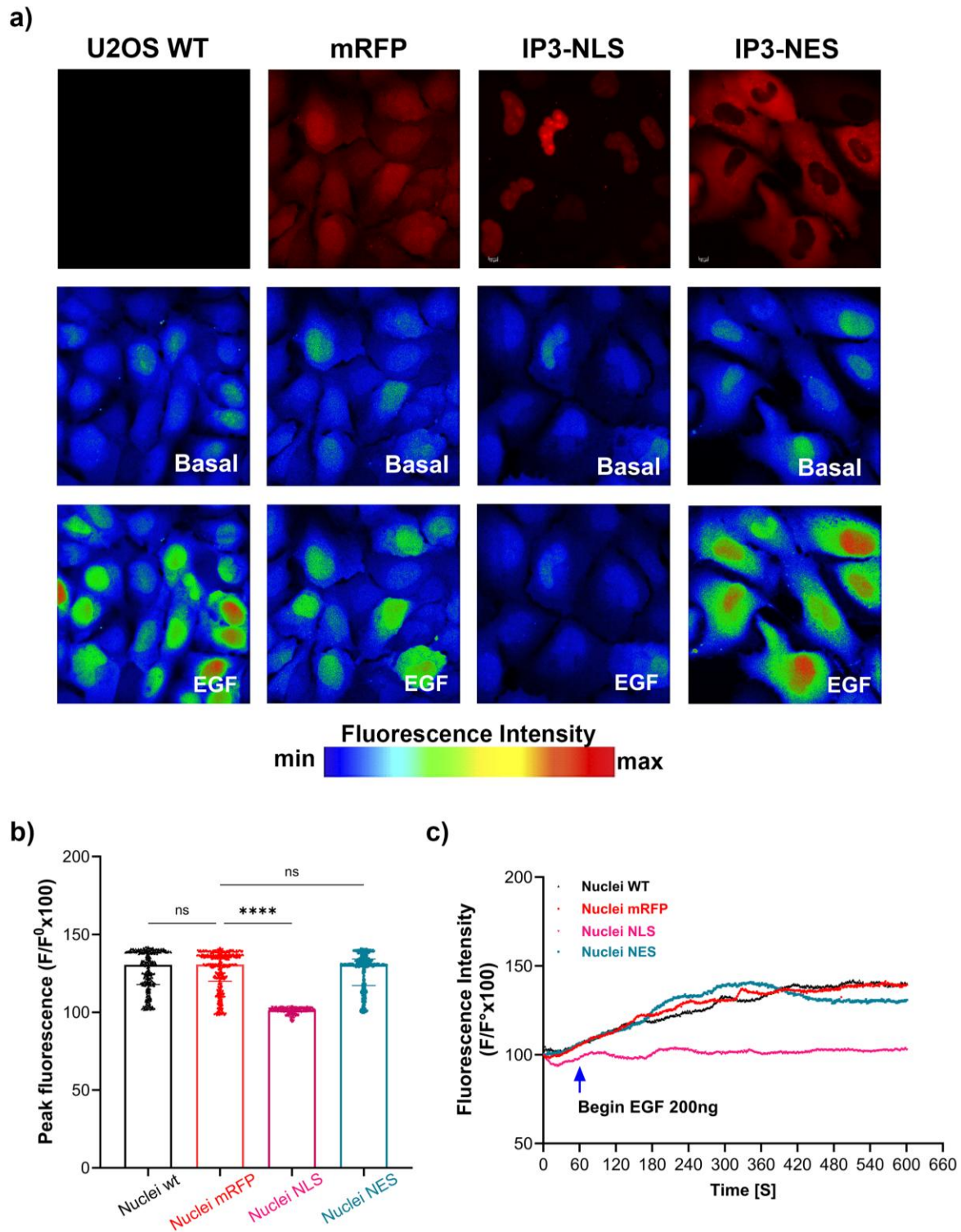


Figura 24. O IP3-NLS inibe a sinalização de Ca^{2+} induzida por EGF em células U2OS. a) As células foram marcadas com a sonda Fluo-4 AM e analisadas por microscopia de varredura (swept-field). As células foram infectadas com adenovírus para expressar os tampões de IP3-NLS ou IP3-NES, ou apenas mRFP (controle). b) A quantificação do pico de intensidade do sinal de Ca^{2+} no núcleo mostra que o EGF aumenta os níveis de cálcio nuclear, e esse aumento é bloqueado apenas quando o IP3 é tamponado no núcleo. c) Intensidade de fluorescência nas regiões nucleares. Dados representativos de $n = 3$ experimentos independentes. As imagens foram adquiridas com o microscópio Opterra, utilizando objetiva de 40 $\times$, ns = não significativo; **** $P < 0,0001$.

6.7. Expressão do ITPR3, MYH9 e β -actina em tumores

Foi avaliado a expressão das proteínas MYH9, ITPR3 e β -actina em diferentes tipos de tumores utilizando a ferramenta GEPIA (arquivos de banco de dados públicos). As análises da expressão da MYH9, ITPR3 e β -actina nos diferentes tumores estão divididas entre alta e baixa expressão. Na **figura 25a** podemos observar que as três proteínas estão superexpressas em diversos tipos de tumores como o colangiocarcinoma, carcinoma de esôfago, glioblastoma, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de estômago e timoma ($*p < 0,05$).

Análises de sobrevida pelo modelo Kaplan-Meier foram realizadas utilizando os dados dos pacientes com os diferentes tumores como apresentado nas **Figuras 25b e 25c**. Após da análise de todos os tipos de tumores do banco de dados, foi observado dois tumores com superexpressão da MYH9, ITPR3 e β -actina, entre estes se encontram os pacientes com glioblastoma e pacientes com adenocarcinoma pancreático, foram divididos em baixa (curva em azul) e alta expressão (curva em magenta) tanto para a MYH9, ITPR3 e β -actina. Os pacientes com glioblastoma que apresentam superexpressão das três proteínas, é possível observar um $P < 0,03$, *hazards ratio* (HR) de 1.5; o que nos indica que estes pacientes com elevada expressão do ITPR3, β -actina e MYH9 têm 1.5 vezes maior probabilidade de vir a óbito; a média de sobrevida é de aproximadamente 45 meses (**Figura 25b**). Os pacientes com adenocarcinoma pancreático com alta expressão das três proteínas apresentam o $P < 0,032$, um *hazards ratio* (HR) de 1.6; o que indica que os pacientes com alta expressão do ITPR3, β -actina e MYH9 têm 1.6 vezes maior probabilidade de vir a óbito, a média de sobrevida é de aproximadamente 65 meses (**Figura 25c**).

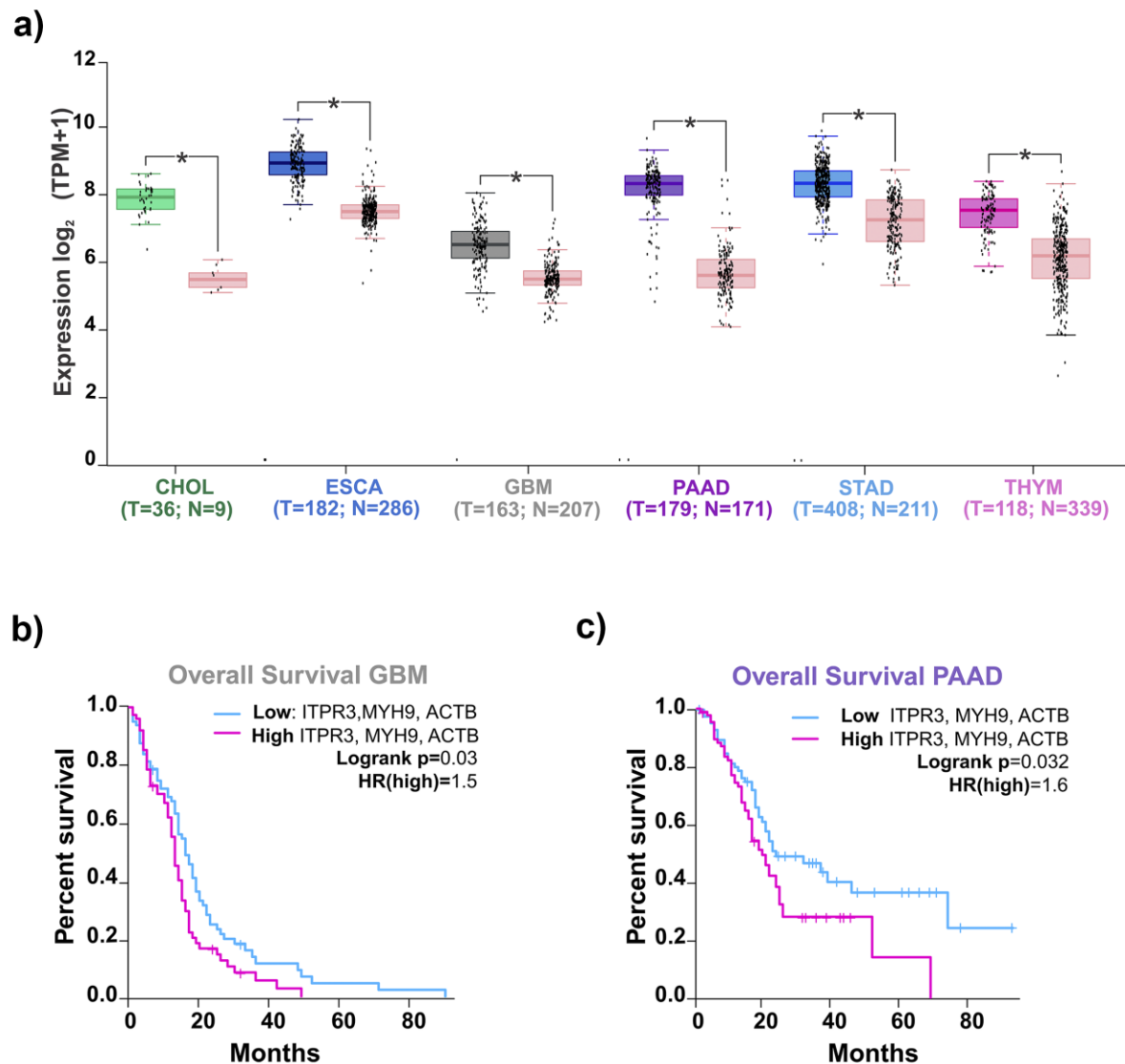


Figura 25. A superexpressão de ITPR3, MYH9 e β -actina diminui a sobrevida dos pacientes com câncer. a) A expressão de ITPR3, MYH9 e β -actina foi analisada utilizando a base de dados GEPIA. b) Probabilidade de superexpressão de ITPR3, MYH9 e β -actina em pacientes com glioblastoma. c) Análise de sobrevida comparando baixa e alta expressão de ITPR3, MYH9 e β -actina em pacientes com adenocarcinoma pancreático. Os parâmetros da análise incluíram ponto de corte $|\text{Log}_2\text{FC}| = 1$, valor de $P < 0,01$ e. Os dados foram obtidos da comparação entre dados normais do TCGA e GTEx ("Match TCGA normal and GTEx data"). A significância estatística foi definida como $*P < 0,05$. O ponto de corte para os grupos foi a mediana, com intervalo de confiança de 95%. HR = hazard ratio (razão de risco).

7. Discussão

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro envolvido em diversas funções celulares, incluindo migração ([Giannone et al., 2004](#); [S. Yang & Huang, 2005](#)), diferenciação ([Hao et al., 2018](#)), proliferação ([Park, Jang, Lee, & Lee, 2017](#); [Rodrigues et al., 2007](#)), autofagia ([Hamada et al., 2014](#)), entre outras. A liberação desse íon via o ITPR3 ([Hamada et al., 2014](#)) ocorre tanto pelo RE ([Berridge, 1993](#)) quanto no retículo nucleoplasmático ([Nakayama et al., 2010](#)). No núcleo, o Ca^{2+} se liga a proteínas dependentes de Ca^{2+} , como a calmodulina, para desempenhar várias funções ([Rasmussen & Means, 1989](#); [X. Zhang, Connolly, Levitan, Sun, & Wang, 2021](#)), que estão intimamente associadas às miosinas ([Pollard et al., 2023](#)). No entanto, há poucos estudos sobre as funções do Ca^{2+} nuclear.

Neste estudo, evidenciou-se a expressão das proteínas ITPR3, MYH9 e β -actina em células U2OS e MDCK por meio de análises proteômicas, revelando a localização dessas três proteínas tanto no citoplasma quanto no núcleo celular, além de uma interação nuclear entre elas. Ensaios de imunofluorescência e western blot realizados em cinco linhagens celulares distintas, confirmaram não apenas a expressão nuclear de ITPR3, MYH9 e β -actina, mas também a interação nuclear entre essas proteínas. Além disso, experimentos de microscopia em tempo real, silenciamento de ITPR3 por siRNA, utilização dos tampões de IP3-NLS e IP3-NES, e análise da liberação de Ca^{2+} permitiram elucidar mecanismos potenciais da formação de filamentos de actina no núcleo. Por fim, a análise de dados públicos do GEPIA2 indicou que níveis elevados de ITPR3, MYH9 e β -actina estão associados a diferentes tipos de câncer, sendo esses níveis correlacionados a menores taxas de sobrevida dos pacientes.

A interação entre actina e miosina tem sido amplamente estudada, visto que as miosinas são reconhecidas como proteínas motoras. A NMII é essencial para a contratilidade celular, influenciando diversos aspectos do comportamento das células ([Shutova et al., 2017](#)). Para promover a contração, moléculas de NMII polimerizam-se em minifilamentos bipolares ([Nagy et al., 2013](#); [Shutova et al., 2017](#)). Como descrito por [Tong et al. \(2024\)](#), as proteínas MYH9 e MYH10 também podem intensificar a interação entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria, o que mitiga o estresse do RE. Recentemente, [Gengtai Ye et al. \(2020\)](#) identificaram que a MYH9 pode interagir

com a β -actina no núcleo. No núcleo a β -actina nuclear foi demonstrada ser uma proteína importante para transcrição, e a inibição desta proteína afeta diretamente a organização tridimensional do genoma ([Mahmood, Said, Gunsalus, & Percipalle, 2023](#); [Mahmood et al., 2021](#)).

Neste trabalho foi demonstrado a interação do receptor ITPR3 com as proteínas MYH9 e β -actina no núcleo, após imunoprecipitação de ITPR3 na fração nuclear seguida de análise por espectrometria de massa. Esses resultados corroboram com os achados de [Michele A Rodrigues et al. \(2022\)](#), que demonstraram que ITPR3 interage com a MYH9 em células MDCK. As interações entre a MYH9 e actina no citoplasma foram demonstradas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos. Por exemplo, [Ke et al. \(2021\)](#) demonstraram que a proteína MYH9 se associa aos filamentos de actina nas células do núcleo pulposo vertebral, contribuindo potencialmente para a regulação do citoesqueleto de actomiosina sob estresse mecânico. Estudos [de Jong et al. \(2010\)](#), observaram interações entre MYH9 e actina em amostras de pacientes com lesões orais pré-malignas e malignas. No citoplasma é bem descrito a polimerização de filamentos de actina ativada por cálcio, formando uma rede citoplasmática chamada polimerização de actina induzida por cálcio (CIA). Essa rede é essencial para processos celulares como dinâmica mitocondrial e transporte de vesículas. [Kage, Vicente-Manzanares, McEwan, Kettenbach, and Higgs \(2022\)](#) notaram que a ausência de qualquer isoforma de NMII em células U2OS compromete a organização da polimerização de CIA. Então no citoplasma, temos a descrição da importância da MYH9 na formação de filamentos de actina induzidos por Ca^{2+} . Entretanto, no presente trabalho demonstramos pela primeira vez que a MYH9 poderia participar na formação dos filamentos de actina nucleares mediante a liberação de Ca^{2+} via ITPR3. Neste trabalho, a observação inicial da interação entre a MYH9 e actina nuclear foi possível após imunoprecipitação da β -actina na fração nuclear em células U2OS WT tratadas com Latrunculina B (Lat-B), como estratégia para selecionar proteínas que poderiam participar da formação dos filamentos de actina. As células CT não tratadas com Lat-B, demonstraram uma maior interação entre MYH9 e β -actina no núcleo, sugerindo a formação de um complexo nuclear entre estas duas proteínas quando a actina está no seu estado filamentar. E por meio da ferramenta Genemania (banco de dados públicos), confirmamos que o ITPR3 se encontra formando um complexo proteico com a MYH9 e β -actina.

A expressão de ITPR3 foi observada em todas as linhagens celulares estudadas tanto no citoplasma quanto no núcleo. A redução da expressão de ITPR3 tem sido associada a uma diminuição na invasão tumoral em glioblastoma ([Kang et al., 2010](#)) e em células mamárias ([Mound et al., 2017](#)), enquanto a superexpressão de ITPR3 tem sido vinculada à diminuição da apoptose e ao aumento da invasão tumoral ([Shibao et al., 2010](#); [Zheng et al., 2022](#)). Neste estudo também foi demonstrada a expressão da MYH9, tanto na porção citosólica como nuclear. Além disso, [Gengtai Ye et al. \(2020\)](#) e [M. Chen et al. \(2021\)](#), demonstraram a expressão de MYH9 no núcleo em células de câncer gástrico e câncer de pulmão. Nossos resultados de imunofluorescência também confirmaram a expressão e localização nuclear de ITPR3 com a MYH9 e a F-actina. Embora ([Gengtai Ye et al., 2020](#)) tenham relatado a co-localização nuclear da MYH9 com β -actina em células de câncer gástrico, nossos resultados revelam a expressão e interação do ITPR3 com MYH9 e β -actina no núcleo em cinco linhagens diferentes, tanto em células tumorais como não tumorais. A interação nuclear da MYH9, β -actina com o ITPR3, foram comprovados pelas análises de pontos de contato dessas três proteínas no núcleo das cinco linhagens celulares. Entretanto, a função deste complexo proteico nuclear ainda permanece desconhecido.

Como já mencionado, os ITPRs são os principais liberadores do Ca^{2+} ([Berridge et al., 2000](#)). O receptor ITPR3 tem sido descrito por [Huh and Yoo \(2003\)](#); [Vais et al. \(2020\)](#), como o responsável pela liberação de Ca^{2+} no citosol, mitocôndrias e possivelmente no núcleo. O núcleo possui um mecanismo semelhante ao citosol para a liberação de Ca^{2+} ([Armijos, Bassani, Fernandez, Rodrigues, & Gomes, 2024](#); [Dawidson Assis Gomes et al., 2021](#)). E diversos estudos têm demonstrado que a liberação deste íon no núcleo ocorre após a estimulação com diferentes agonistas, entre estes agonistas destaca-se a insulina ([Rodrigues, Gomes, Andrade, Leite, & Nathanson, 2008](#)), o EGF e o HGF ([De Angelis Campos et al., 2011](#); [Echevarría et al., 2003](#); [Dawidson A Gomes et al., 2008](#)) os quais são capazes de promover a liberação de Ca^{2+} no núcleo. De acordo com nossos resultados, foi demonstrado que o aumento nos níveis de este íon depende tanto do tipo celular quanto do agonista específico. Por exemplo, foi possível evidenciar que o FBS induz uma forte resposta de Ca^{2+} em células NIH/3T3 (células não tumorais de camundongo), enquanto a resposta é menos intensa em células U2OS WT (células tumorais de osteosarcoma humano), resultado similar encontrado quando a estimulação foi realizada com ionomicina.

A presença de filamentos de actina foi observada no núcleo, mais não se conhecia os mecanismos da formação destes filamentos em tempo real ([Baarlink, Wang, & Grosse, 2013](#); [Johnson et al., 2003](#)). Wang e colaboradores demonstraram que a montagem de F-actina nuclear ocorre na presença de Ca^{2+} , propondo este íon como regulador da dinâmica da actina nuclear. Confirmamos estes resultados tanto em células tumorais, como não tumorais e estimuladas tanto com SFB, ionomicina e EGF, nossos resultados demonstraram que a formação dos filamentos de actina no núcleo depende de elevações de Ca^{2+} e que esta liberação é dependente de IP3. Além disso, [Shutova et al. \(2017\)](#) mostraram que a organização da F-actina depende da cooperação com a MYH9 e o silenciamento desta miosina prejudica na migração celular. Apesar de ([Y. Wang et al., 2019](#)) ter descrito que o Ca^{2+} é essencial para a formação dos filamentos de actina no núcleo, o mecanismo de como este íon participa neste processo ainda não foi elucidado.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa já demonstraram que o núcleo tem toda a maquinaria para a liberação de Ca^{2+} via os ITPRs e considerando os resultados apresentados neste trabalho, propomos que a liberação de Ca^{2+} no núcleo pode ser mediada pela ação do ITPR3. Para comprovar o papel do ITPR3 na formação de filamentos de actina mediados por Ca^{2+} , realizamos o silenciamento desse receptor. Após a estimulação das células com SFB e ionomicina, foi observada uma redução significativa na formação de filamentos de actina no núcleo tanto de células tumorais quanto não tumorais. Destacando assim a relevância do ITPR3 no núcleo celular como canal liberador de Ca^{2+} , reforçando a ideia de que o ITPR3 atua como uma proteína importante para a liberação do Ca^{2+} em diferentes organelas, incluindo o núcleo.

A importância na elevação dos níveis de Ca^{2+} nuclear foi confirmada por meio do tamponamento de IP3 no núcleo e no citosol. As células foram transduzidas com os adenovírus IP3-NLS e IP3-NES, seguidas de estimulação com EGF (200 ng/mL). As células infectadas com o IP3-NLS apresentaram uma redução significativa no sinal de Ca^{2+} nuclear, acompanhada por uma diminuição na formação de filamentos de actina. Em contraste, nas células infectadas com o IP3-NES, não foram observadas alterações no sinal de Ca^{2+} nuclear nem na formação de filamentos de actina, quando comparadas aos grupos controle. Esses resultados, demonstram que o

tamponamento de IP3 no núcleo, mas não no citosol, compromete diretamente a sinalização de Ca^{2+} nuclear e sua associação com a polimerização da actina.

Finalmente, por meio da análise de dados públicos disponíveis no GEPIA2, observamos a superexpressão conjunta das proteínas ITPR3, β -actina e MYH9 em seis tipos de tumores. A superexpressão do ITPR3 favorece a sobrevivência de células tumorais ([Shibao et al., 2010](#)) e está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma cervical e câncer colorretal ([Moy et al., 2022](#); [Y.-C. Yang et al., 2017](#)). A superexpressão de MYH9 foi correlacionada ao câncer de ovário ([L. Liu et al., 2019](#)), adenocarcinoma pancreático ductal ([Jia et al., 2024](#)) e câncer de pulmão ([M. Chen et al., 2021](#)). Já a superexpressão de β -actina está associada ao câncer de cólon ([Simiczyjew, Mazur, Popow-Woźniak, Malicka-Błaszkiwicz, & Nowak, 2014](#)) e ao câncer de língua ([Lee et al., 2021](#)). A superexpressão da MYH9, ITPR3 e β -actina está significativamente associada a pior prognóstico e menor sobrevida dos pacientes, especialmente em casos de adenocarcinoma pancreático e glioblastoma.,

Os resultados deste trabalho identificam, pela primeira vez, o ITPR3 como uma proteína nuclear envolvida na montagem de filamentos de actina nesse compartimento. Nossos dados indicam que o tamponamento do IP3 nuclear e o silenciamento do ITPR3 reduzem a liberação de Ca^{2+} nuclear e comprometem a formação dos filamentos de actina no núcleo. Além disso, demonstramos que ITPR3, MYH9 e β -actina estão presentes no núcleo e podem atuar como potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos promissores para o câncer.

8. Conclusão

Este estudo evidencia pela primeira vez que o ITPR3, tradicionalmente associado com a liberação de Ca^{2+} no citosol, também está funcionalmente presente e ativo no núcleo e reforçamos o papel do ITPR3 nesse compartimento como fundamental na dinâmica do Ca^{2+} nuclear e na montagem de filamentos de actina nucleares de células tumorais e não tumorais. Nós demonstramos por diversas abordagens experimentais, que o ITPR3 interage com MYH9 no núcleo, formando um complexo funcional associado com a polimerização de actina nuclear. O silenciamento do ITPR3 compromete a formação dos filamentos de actina, enquanto sua superexpressão, segundo dados públicos, está associada à progressão tumoral e pior prognóstico em diversos tipos

de câncer. Além disso, a coexpressão de ITPR3, MYH9 e β -actina foi confirmada em múltiplas linhagens celulares e correlacionada a tumores humanos agressivos, sugerindo que essas proteínas podem atuar como biomarcadores de malignidade e potenciais alvos terapêuticos. Esses achados abrem novas perspectivas para a compreensão da sinalização nuclear mediada por Ca^{2+} e suas implicações no câncer, apontando para a importância de explorar o ITPR3 como uma nova via de intervenção antitumoral.

9. Referências Bibliográficas

- Anne Conti, Mary, Saleh, Anthony D., Brinster, Lauren R., Cheng, Hui, Chen, Zhong, Cornelius, Shaleeka, . . . Adelstein, Robert S. (2015). Conditional deletion of nonmuscle myosin II-A in mouse tongue epithelium results in squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 5(1), 14068. doi:10.1038/srep14068
- Arige, Vikas, Terry, Lara E., Wagner, Larry E., Malik, Sundeep, Baker, Mariah R., Fan, Guizhen, . . . Yule, David I. (2022). Functional determination of calcium-binding sites required for the activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(39), e2209267119. doi:10.1073/pnas.2209267119
- Armijos, María José González, Bassani, Thais Fernandes, Fernandez, Clara Couto, Rodrigues, Michele Angela, & Gomes, Dawidson Assis. (2024). Decoding how receptor tyrosine kinases (RTKs) mediate nuclear calcium signaling. *Advances in Biological Regulation*, 92, 101033. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2024.101033>
- Baarlink, Christian, Plessner, Matthias, Sherrard, Alice, Morita, Kohtaro, Misu, Shinji, Virant, David, . . . Grosse, Robert. (2017). A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization. *Nature cell biology*, 19(12), 1389-1399. doi:10.1038/ncb3641
- Baarlink, Christian, Wang, Haicui, & Grosse, Robert. (2013). Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL. *Science*, 340(6134), 864-867. doi:10.1126/science.1235038
- Berg, Jonathan S, Powell, Bradford C, & Cheney, Richard E. (2001). A millennial myosin census. *Molecular biology of the cell*, 12(4), 780-794.
- Berridge, Michael J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315-325. doi:10.1038/361315a0
- Berridge, Michael J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21(1), 13-26. doi:10.1016/S0896-6273(00)80510-3
- Berridge, Michael J., Lipp, Peter, & Bootman, Martin D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11-21. doi:10.1038/35036035
- Bird, G St J, & Putney, JW Jr. (1996). Effect of Inositol 1, 3, 4, 5-Tetrakisphosphate on Inositol Trisphosphate-activated Ca²⁺ Signaling in Mouse Lacrimal Acinar Cells (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6766-6770.
- Bourgeois, CA, Hemon, D, & Bouteille, M. (1979). Structural relationship between the nucleolus and the nuclear envelope. *Journal of ultrastructure research*, 68(3), 328-340.
- Bravo-Sagua, Roberto, Parra, Valentina, Muñoz-Cordova, Felipe, Sanchez-Aguilera, Pablo, Garrido, Valeria, Contreras-Ferrat, Ariel, . . . Lavandero, Sergio. (2020). Chapter Five - Sarcoplasmic reticulum and calcium signaling in muscle cells: Homeostasis and disease. In Oliver Kepp & Lorenzo Galluzzi (Eds.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 350, pp. 197-264): Academic Press.

- Cain, Natalie E., & Starr, Daniel A. (2015). SUN proteins and nuclear envelope spacing. *Nucleus*, 6(1), 2-7. doi:10.4161/19491034.2014.990857
- Carreras-Sureda, Amado, Pihán, Philippe, & Hetz, Claudio. (2018). Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium*, 70, 24-31.
- Chen, Meng, Sun, Li-Xin, Yu, Long, Liu, Jun, Sun, Li-Chao, Yang, Zhi-Hua, . . . Ran, Yu-Liang. (2021). MYH9 is crucial for stem cell-like properties in non-small cell lung cancer by activating mTOR signaling. *Cell Death Discovery*, 7(1), 282. doi:10.1038/s41420-021-00681-z
- Chen, Wanshi, Liu, Lingjuan, Tang, Ming, Li, Jiajin, Yuan, Wenjing, Yin, Dan, . . . Tian, Jie. (2024). Type I collagen-targeted liposome delivery of Serca2a modulates myocardium calcium homeostasis and reduces cardiac fibrosis induced by myocardial infarction. *Materials Today Bio*, 101162. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101162>
- Chen, Zigui, Yan, Xin, Miao, Changfeng, Liu, Longyang, Liu, Su, Xia, Ying, . . . Luo, Qisheng. (2023). Targeting MYH9 represses USP14-mediated NAP1L1 deubiquitination and cell proliferation in glioma. *Cancer Cell International*, 23(1), 220. doi:10.1186/s12935-023-03050-1
- Comajoan, Pau, Gubern, Carme, Huguet, Gemma, Serena, Joaquín, Kádár, Elisabet, & Castellanos, Mar. (2018). Evaluation of common housekeeping proteins under ischemic conditions and/or rt-PA treatment in bEnd.3 cells. *Journal of Proteomics*, 184, 10-15. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.011>
- Cook, Alexander W, & Toseland, Christopher P. (2021). The roles of nuclear myosin in the DNA damage response. *The journal of biochemistry*, 169(3), 265-271.
- Davidson, Patricia M, & Cadot, Bruno. (2021). Actin on and around the Nucleus. *Trends in cell biology*, 31(3), 211-223.
- De Angelis Campos, Ana Carolina, Rodrigues, Michele Angela, de Andrade, Carolina, de Goes, Alfredo Miranda, Nathanson, Michael H., & Gomes, Dawidson A. (2011). Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(2), 341-346. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.100>
- de Jong, Ebbing P., Xie, Hongwei, Onsongo, Getiria, Stone, Matthew D., Chen, Xiao-Bing, Kooren, Joel A., . . . Griffin, Timothy J. (2010). Quantitative Proteomics Reveals Myosin and Actin as Promising Saliva Biomarkers for Distinguishing Pre-Malignant and Malignant Oral Lesions. *PLoS one*, 5(6), e11148. doi:10.1371/journal.pone.0011148
- de Miranda, Marcelo Coutinho, Rodrigues, Michele Angela, de Angelis Campos, Ana Carolina, Faria, Jerusa Araújo Quintão Arantes, Kunrath-Lima, Marianna, Mignery, Gregory A, . . . Gomes, Dawidson A. (2019). Epidermal growth factor (EGF) triggers nuclear calcium signaling through the intranuclear phospholipase Cδ-4 (PLCδ4). *Journal of Biological Chemistry*, 294(45), 16650-16662.
- DerMardirossian, Céline. (2024). The Role of Calcium in Actin-Dependent Cell Migration and Invasion in Cancer.

- Di Donato, N., Rump, A., Koenig, R., Der Kaloustian, V. M., Halal, F., Sonntag, K., . . . Verloes, A. (2014). Severe forms of Baraitser–Winter syndrome are caused by ACTB mutations rather than ACTG1 mutations. *European Journal of Human Genetics*, 22(2), 179-183. doi:10.1038/ejhg.2013.130
- Dopie, Joseph, Skarp, Kari-Pekka, Kaisa Rajakylä, Eeva, Tanhuanpää, Kimmo, & Vartiainen, Maria K. (2012). Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), E544-E552.
- Echevarría, Wihelma, Leite, M Fatima, Guerra, Mateus T, Zipfel, Warren R, & Nathanson, Michael H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature cell biology*, 5(5), 440-446.
- Gauthier, Benoit R., & Comaills, Valentine. (2021). Nuclear Envelope Integrity in Health and Disease: Consequences on Genome Instability and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7281.
- Giannone, Grégory, Rondé, Philippe, Gaire, Mireille, Beaudouin, Joël, Haiech, Jacques, Ellenberg, Jan, & Takeda, Kenneth. (2004). Calcium Rises Locally Trigger Focal Adhesion Disassembly and Enhance Residency of Focal Adhesion Kinase at Focal Adhesions *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28715-28723. doi:10.1074/jbc.M404054200
- Gomes, Dawidson A, Rodrigues, Michele A, Leite, M Fatima, Gomez, Marcus V, Varnai, Peter, Balla, Tamas, . . . Nathanson, Michael H. (2008). c-Met Must Translocate to the Nucleus to Initiate Calcium Signals. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4344-4351.
- Gomes, Dawidson Assis, de Miranda, Marcelo Coutinho, Faria, Jerusa Araújo Quintão Arantes, & Rodrigues, Michele Angela. (2021). The basis of nuclear phospholipase C in cell proliferation. *Advances in Biological Regulation*, 82, 100834. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2021.100834>
- Gong, Fangping, Cao, Di, Qu, Chengxin, Yin, Dongmei, Zhao, Quanzhi, & Xiong, Erhui. (2021). Advances in the elucidation of nuclear proteins in the model plant *Arabidopsis thaliana*: based on protein interactions and bioinformatics analysis. *Journal of Plant Interactions*, 16(1), 481-493.
- Gorza, L, Schiaffino, S, & Volpe, P. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in heart: evidence for its concentration in Purkinje myocytes of the conduction system. *Journal of Cell Biology*, 121(2), 345-353. doi:10.1083/jcb.121.2.345
- Hamada, Kozo, Terauchi, Akiko, Nakamura, Kyoko, Higo, Takayasu, Nukina, Nobuyuki, Matsumoto, Nagisa, . . . Mikoshiba, Katsuhiko. (2014). Aberrant calcium signaling by transglutaminase-mediated posttranslational modification of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), E3966-E3975.
- Hampoeiz, Bernhard, Andres-Pons, Amparo, Kastitis, Panagiotis, & Beck, Martin. (2019). Structure and Assembly of the Nuclear Pore Complex. *Annual Review of Biophysics*, 48(Volume 48, 2019), 515-536. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115308>
- Hao, Helen Baixia, Webb, Sarah E., Yue, Jianbo, Moreau, Marc, Leclerc, Catherine, & Miller, Andrew L. (2018). TRPC3 is required for the survival, pluripotency and neural

- differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs). *Science China Life Sciences*, 61(3), 253-265. doi:10.1007/s11427-017-9222-9
- Hara, K., Shiga, A., Nozaki, H., Mitsui, J., Takahashi, Y., Ishiguro, H., . . . Onodera, O. (2008). Total deletion and a missense mutation of *ITPR1* in Japanese SCA15 families. *Neurology*, 71(8), 547-551. doi:doi:10.1212/01.wnl.0000311277.71046.a0
- Hedberg, Matthew L, Goh, Gerald, Chiosea, Simion I, Bauman, Julie E, Freilino, Maria L, Zeng, Yan, . . . Lui, Vivian WY. (2016). Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of clinical investigation*, 126(1), 169-180.
- Heissler, Sarah M, & Sellers, James R. (2014). Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks. *Bioarchitecture*, 4(6), 169-188.
- Henretta, Sarah, & Lammerding, Jan. (2025). Nuclear envelope proteins, mechanotransduction, and their contribution to breast cancer progression. *npj Biological Physics and Mechanics*, 2(1), 14. doi:10.1038/s44341-025-00018-2
- Hofmann, Wilma A, Johnson, Terezina, Klaczynski, Marcin, Fan, Ji-Lao, & de Lanerolle, Primal. (2006). From transcription to transport: emerging roles for nuclear myosin I. *Biochemistry and cell biology*, 84(4), 418-426.
- Houdusse, Anne, & Sweeney, H Lee. (2016). How myosin generates force on actin filaments. *Trends in biochemical sciences*, 41(12), 989-997.
- Huh, Yang Hoon, & Yoo, Seung Hyun. (2003). Presence of the inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor isoforms in the nucleoplasm. *FEBS letters*, 555(2), 411-418.
- Hurst, Verena, Shimada, Kenji, & Gasser, Susan M. (2019). Nuclear actin and actin-binding proteins in DNA repair. *Trends in cell biology*, 29(6), 462-476.
- Jia, Qinyuan, Zhu, Yuheng, Yao, Hongfei, Yin, Yifan, Duan, Zonghao, Zheng, Jiahao, . . . Liu, Wei. (2024). Oncogenic GALNT5 confers FOLFIRINOX resistance via activating the MYH9/ NOTCH/ DDR axis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death & Disease*, 15(10), 767. doi:10.1038/s41419-024-07110-w
- Johnson, Nicole, Krebs, Matthew, Boudreau, Rosanne, Giorgi, Gisele, LeGros, Mark, & Larabell, Carolyn. (2003). Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. *Differentiation*, 71(7), 414-424.
- Kage, Frieda, Vicente-Manzanares, Miguel, McEwan, Brennan C., Kettenbach, Arminja N., & Higgs, Henry N. (2022). Myosin II proteins are required for organization of calcium-induced actin networks upstream of mitochondrial division. *Molecular biology of the cell*, 33(7), ar63. doi:10.1091/mbc.E22-01-0005
- Kang, Sang Soo, Han, Kyung-Seok, Ku, Bo Mi, Lee, Yeon Kyung, Hong, Jinpyo, Shin, Hye Young, . . . Hwang, Eun Mi. (2010). Caffeine-mediated inhibition of calcium release channel inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival. *Cancer Res*, 70(3), 1173-1183.
- Katono, Ken, Sato, Yuichi, Jiang, Shi-Xu, Kobayashi, Makoto, Nagashio, Ryo, Ryuge, Shinichiro, . . . Saegusa, Makoto. (2015). Prognostic significance of MYH9 expression in resected non-small cell lung cancer. *PLoS one*, 10(3), e0121460.

- Ke, Wencan, Wang, Bingjin, Hua, Wenbin, Song, Yu, Lu, Saideng, Luo, Rongjin, . . . Yang, Cao. (2021). The distinct roles of myosin IIA and IIB under compression stress in nucleus pulposus cells. *Cell Proliferation*, 54(2), e12987. doi:<https://doi.org/10.1111/cpr.12987>
- Kelsch, Daniel J, & Tootle, Tina L. (2018). Nuclear actin: from discovery to function. *The Anatomical Record*, 301(12), 1999-2013.
- Kerkhofs, Martijn, Seitaj, Bruno, Ivanova, Hristina, Monaco, Giovanni, Bultynck, Geert, & Parys, Jan B. (2018). Pathophysiological consequences of isoform-specific IP3 receptor mutations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(11), 1707-1717.
- Khaitlina, Sofia Yu. (2001). Functional specificity of actin isoforms.
- Klar, Joakim, Hisatsune, Chihiro, Baig, Shahid M, Tariq, Muhammad, Johansson, Anna CV, Rasool, Mahmood, . . . Feuk, Lars. (2014). Abolished InsP 3 R2 function inhibits sweat secretion in both humans and mice. *The Journal of clinical investigation*, 124(11), 4773-4780.
- Kruppa, Antonina J, & Buss, Folma. (2021). Motor proteins at the mitochondria–cytoskeleton interface. *Journal of Cell Science*, 134(7), jcs226084.
- Lee, Doh Young, Kang, Young, Im, Nu-Ri, Kim, Byoungjae, Kwon, Tack-Kyun, Jung, Kwang-Yoon, & Baek, Seung-Kuk. (2021). Actin-Associated Gene Expression is Associated with Early Regional Metastasis of Tongue Cancer. *The Laryngoscope*, 131(4), 813-819. doi:<https://doi.org/10.1002/lary.29025>
- Li, Meng-Yen, Peng, Wen-Hsin, Wu, Chien-Hsun, Chang, Ya-Min, Lin, Yu-Ling, Chang, Geen-Dong, . . . Chen, Guang-Chao. (2019). PTPN3 suppresses lung cancer cell invasiveness by counteracting Src-mediated DAAM1 activation and actin polymerization. *Oncogene*, 38(44), 7002-7016. doi:10.1038/s41388-019-0948-6
- Liao, Qing, Li, Rui, Zhou, Rui, Pan, Zhihua, Xu, Lijun, Ding, Yanqing, & Zhao, Liang. (2017). LIM kinase 1 interacts with myosin-9 and alpha-actinin-4 and promotes colorectal cancer progression. *British journal of cancer*, 117(4), 563-571.
- Lin, Bo-Hong, Tsai, Ming-Hsuan, Lii, Chong-Kuei, & Wang, Tsu-Shing. (2016). IP3 and calcium signaling involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and cell rounding induced by cigarette smoke extract in human endothelial cells. *Environmental toxicology*, 31(11), 1293-1306.
- Lin, Xian, Li, Ai-min, Li, Yong-Hao, Luo, Rong-Cheng, Zou, Yu-Jiao, Liu, Yi-Yi, . . . Fang, Wei-Yi. (2020). Silencing MYH9 blocks HBx-induced GSK3 β ubiquitination and degradation to inhibit tumor stemness in hepatocellular carcinoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 13. doi:10.1038/s41392-020-0111-4
- Liu, Longyang, Yi, Juanjuan, Deng, Xiaojie, Yuan, Jianhuan, Zhou, Beixian, Lin, Zhongqiu, & Zeng, Zhaoyang. (2019). MYH9 overexpression correlates with clinicopathological parameters and poor prognosis of epithelial ovarian cancer. *Oncology letters*, 18(2), 1049-1056.
- Liu, Zhenan, Van Rossen, Elke, Timmermans, Jean-Pierre, Geerts, Albert, van Grunsven, Leo A, & Reynaert, Hendrik. (2011). Distinct roles for non-muscle myosin II isoforms in mouse hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*, 54(1), 132-141.

- Ma, Tian, Ding, Qing, Liu, Chaoxu, & Wu, Hua. (2023). Electromagnetic fields regulate calcium-mediated cell fate of stem cells: osteogenesis, chondrogenesis and apoptosis. *Stem Cell Research & Therapy*, 14(1), 133. doi:10.1186/s13287-023-03303-w
- Mahmood, Syed Raza, Said, Nadine Hosny El, Gunsalus, Kristin C., & Percipalle, Piergiorgio. (2023). β -actin mediated H3K27ac changes demonstrate the link between compartment switching and enhancer-dependent transcriptional regulation. *Genome Biology*, 24(1), 18. doi:10.1186/s13059-023-02853-9
- Mahmood, Syed Raza, Xie, Xin, Hosny El Said, Nadine, Venit, Tomas, Gunsalus, Kristin C., & Percipalle, Piergiorgio. (2021). β -actin dependent chromatin remodeling mediates compartment level changes in 3D genome architecture. *Nature Communications*, 12(1), 5240. doi:10.1038/s41467-021-25596-2
- Malhas, Ashraf, Goulbourne, Chris, & Vaux, David J. (2011). The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends in cell biology*, 21(6), 362-373.
- Mangla, Anjali, Guerra, Mateus T, & Nathanson, Michael H. (2020). Type 3 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor: A calcium channel for all seasons. *Cell Calcium*, 85, 102132.
- Marigo, Valeria, Nigro, Alessandra, Pecci, Alessandro, Montanaro, Donatella, Di Stazio, Mariateresa, Balduini, Carlo L, & Savoia, Anna. (2004). Correlation between the clinical phenotype of MYH9-related disease and tissue distribution of class II nonmuscle myosin heavy chains. *Genomics*, 83(6), 1125-1133.
- Mendes, Carolina CP, Gomes, Dawidson A, Thompson, Mayerson, Souto, Natalia C, Goes, Tercio S, Goes, Alfredo M, . . . Leite, M Fatima. (2005). The type III inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca^{2+} signals into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40892-40900.
- Mhatre, Anand N., Li, Yan, Bhatia, Nitin, Wang, Kevin H., Atkin, Graham, & Lalwani, Anil K. (2007). Generation and Characterization of Mice with Myh9 Deficiency. *NeuroMolecular Medicine*, 9(3), 205-215. doi:10.1007/s12017-007-8008-8
- Mikoshiba, Katsuhiko. (2015). Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Advances in Biological Regulation*, 57, 217-227.
- Minagawa, Noritaka, Nagata, Jun, Shibao, Kazunori, Masyuk, Anatoliy I, Gomes, Dawidson A, Rodrigues, Michele A, . . . Ehrlich, Barbara E. (2007). Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in cholangiocytes through release of ATP into bile. *Gastroenterology*, 133(5), 1592-1602.
- Miyazaki, Shun-ichi, Yuzaki, Michisuke, Nakada, Ken, Shirakawa, Hideki, Nakanishi, Setsuko, Nakade, Shinji, & Mikoshiba, Katsuhiko. (1992). Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, 257(5067), 251-255.
- Mound, A., Vautrin-Glabik, A., Foulon, A., Botia, B., Hague, F., Parys, J. B., . . . Rodat-Despoix, L. (2017). Downregulation of type 3 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor decreases breast cancer cell migration through an oscillatory Ca^{2+} signal. *Oncotarget*, 8(42), 72324-72341. doi:10.18632/oncotarget.20327

- Moy, Ryan H., Nguyen, Alexander, Loo, Jia Min, Yamaguchi, Norihiro, Kajba, Christina M., Santhanam, Balaji, . . . Tavazoie, Sohail F. (2022). Functional genetic screen identifies ITPR3/calcium/RELB axis as a driver of colorectal cancer metastatic liver colonization. *Developmental Cell*, 57(9), 1146-1159.e1147. doi:10.1016/j.devcel.2022.04.010
- Müller, Mirco, Diensthuber, Ralph P, Chizhov, Igor, Claus, Peter, Heissler, Sarah M, Preller, Matthias, . . . Manstein, Dietmar J. (2013). Distinct functional interactions between actin isoforms and nonsarcomeric myosins. *PLoS one*, 8(7), e70636.
- Nagy, A., Takagi, Y., Billington, N., Sun, S. A., Hong, D. K., Homsher, E., . . . Sellers, J. R. (2013). Kinetic characterization of nonmuscle myosin IIb at the single molecule level. *J Biol Chem*, 288(1), 709-722. doi:10.1074/jbc.M112.424671
- Nakayama, Hiroyuki, Bodi, Ilona, Maillet, Marjorie, DeSantiago, Jaime, Domeier, Timothy L, Mikoshiba, Katsuhiko, . . . Molkentin, Jeffery D. (2010). The IP3 receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circulation research*, 107(5), 659-666.
- Nguyen, Phu Hai, Lutter, Erika I, & Hackstadt, Ted. (2018). Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein MrcA interacts with the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 3 (ITPR3) to regulate extrusion formation. *PLoS pathogens*, 14(3), e1006911.
- Nowak, Dorota, Kochman, Agata, & Malicka-Błaszkiwicz, Maria. (1999). Identification of actin from hepatoma Morris 5123 cells. *Acta Biochimica Polonica*, 46(4), 949-959.
- Park, M. G., Jang, H., Lee, S. H., & Lee, C. J. (2017). Flow Shear Stress Enhances the Proliferative Potential of Cultured Radial Glial Cells Possibly Via an Activation of Mechanosensitive Calcium Channel. *Exp Neurobiol*, 26(2), 71-81. doi:10.5607/en.2017.26.2.71
- Pecci, Alessandro, Klersy, Catherine, Gresele, Paolo, Lee, Kieran J.D., De Rocco, Daniela, Bozzi, Valeria, . . . Savoia, Anna. (2014). 9-Related Disease: A Novel Prognostic Model to Predict the Clinical Evolution of the Disease Based on Genotype–Phenotype Correlations. *Human Mutation*, 35(2), 236-247. doi:<https://doi.org/10.1002/humu.22476>
- Pecci, Alessandro, Ma, Xuefei, Savoia, Anna, & Adelstein, Robert S. (2018). MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene*, 664, 152-167. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.048>
- Perrin, Benjamin J, & Ervasti, James M. (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton*, 67(10), 630-634.
- Pokorna, E, Jordan, PW, O'Neill, CH, Zicha, D, Gilbert, CS, & Veselý, P. (1994). Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell motility and the cytoskeleton*, 28(1), 25-33.
- Pollard, Luther W, Coscia, Stephen M, Rebowski, Grzegorz, Palmer, Nicholas J, Holzbaur, Erika LF, Dominguez, Roberto, & Ostap, E Michael. (2023). Ensembles of human myosin-19 bound to calmodulin and regulatory light chain RLC12B drive multimicron transport. *Journal of Biological Chemistry*, 299(2).
- Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R., & Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1638), 20130097. doi:10.1098/rstb.2013.0097

- Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2019). Structure and Function of IP(3) Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11(4). doi:10.1101/cshperspect.a035063
- Prole, David L., & Taylor, Colin W. (2019). Structure and function of IP3 receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(4), a035063.
- Rasmussen, Colin D., & Means, Anthony R. (1989). Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *The EMBO journal*, 8(1), 73-82.
- Roberts, R., Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Veigel, C., Trinick, J., . . . Kendrick-Jones, J. (2004). Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359(1452), 1931-1944. doi:10.1098/rstb.2004.1563
- Rodrigues, M. A., Gomes, D. A., Fiorotto, R., Guerra, M. T., Weerachayaphorn, J., Bo, T., . . . Nathanson, M. H. (2022). Molecular determinants of peri-apical targeting of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in cholangiocytes. *Hepatol Commun*, 6(10), 2748-2764. doi:10.1002/hep4.2042
- Rodrigues, Michele A, Gomes, Dawidson A, Andrade, Viviane A, Leite, M Fatima, & Nathanson, Michael H. (2008). Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology*, 48(5), 1621-1631.
- Rodrigues, Michele A, Gomes, Dawidson A, Cosme, Ana Luiza, Sanches, Marcelo Dias, Resende, Vivian, & Cassali, Geovanni D. (2022). Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 3 (ITPR3) is overexpressed in cholangiocarcinoma and its expression correlates with S100 calcium-binding protein A4 (S100A4). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 145, 112403.
- Rodrigues, Michele A, Gomes, Dawidson A, Leite, M Fatima, Grant, Wayne, Zhang, Lei, Lam, Wing, . . . Nathanson, Michael H. (2007). Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(23), 17061-17068.
- Sargeant, J., & Hay, J. C. (2022). Ca(2+) regulation of constitutive vesicle trafficking. *Fac Rev*, 11, 6. doi:10.12703/r/11-6
- Schermelleh, Lothar, Carlton, Peter M., Haase, Sebastian, Shao, Lin, Winoto, Lukman, Kner, Peter, . . . Sedat, John W. (2008). Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. *Science*, 320(5881), 1332-1336. doi:doi:10.1126/science.1156947
- Shibao, K., Fiedler, M. J., Nagata, J., Minagawa, N., Hirata, K., Nakayama, Y., . . . Yamaguchi, K. (2010). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium*, 48(6), 315-323. doi:10.1016/j.ceca.2010.09.005
- Shutova, Maria S., Asokan, Sreeja B., Talwar, Shefali, Assoian, Richard K., Bear, James E., & Svitkina, Tatyana M. (2017). Self-sorting of nonmuscle myosins IIA and IIB polarizes the cytoskeleton and modulates cell motility. *Journal of Cell Biology*, 216(9), 2877-2889. doi:10.1083/jcb.201705167
- Simiczjew, Aleksandra, Mazur, Antonina Joanna, Popow-Woźniak, Agnieszka, Malicka-Błaszkiwicz, Maria, & Nowak, Dorota. (2014). Effect of overexpression of β - and γ -actin isoforms on actin cytoskeleton organization and migration of human colon cancer cells. *Histochemistry and cell biology*, 142, 307-322.

- Stüven, Theis, Hartmann, Enno, & Görlich, Dirk. (2003). Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin· actin complexes. *The EMBO journal*.
- Surcel, A., Schiffhauer, E. S., Thomas, D. G., Zhu, Q., DiNapoli, K. T., Herbig, M., . . . Robinson, D. N. (2019). Targeting Mechanoresponsive Proteins in Pancreatic Cancer: 4-Hydroxyacetophenone Blocks Dissemination and Invasion by Activating MYH14. *Cancer Res*, 79(18), 4665-4678. doi:10.1158/0008-5472.can-18-3131
- Szent-Györgyi, A. G. (1975). Calcium regulation of muscle contraction. *Biophysical Journal*, 15(7), 707-723. doi:10.1016/S0006-3495(75)85849-8
- Tada, Masayoshi, Nishizawa, Masatoyo, & Onodera, Osamu. (2014). IP 3 receptors in neurodegenerative disorders: Spinocerebellar ataxias and Huntington's and Alzheimer's diseases. *Pathologies of Calcium Channels*, 579-600.
- Tamura, Isao, Miyamoto, Kei, Hatanaka, Chiharu, Shiroshita, Amon, Fujimura, Taishi, Shirafuta, Yuichiro, . . . Sugino, Norihiro. (2024). Nuclear actin assembly is an integral part of decidualization in human endometrial stromal cells. *Communications Biology*, 7(1), 830. doi:10.1038/s42003-024-06492-z
- Tong, Dongdong, Zhou, Jun, Zhou, Jing, Wang, Xiaofei, Gao, Beibei, Rui, Xiaoyi, . . . Huang, Chen. (2024). LAMC2 mitigates ER stress by enhancing ER-mitochondria interaction via binding to MYH9 and MYH10. *Cancer Gene Therapy*, 31(1), 43-57. doi:10.1038/s41417-023-00680-5
- Trivedi, Darshan V, Nag, Suman, Spudich, Annamma, Ruppel, Kathleen M, & Spudich, James A. (2020). The myosin family of mechanoenzymes: from mechanisms to therapeutic approaches. *Annual review of biochemistry*, 89(1), 667-693.
- Ueasilamongkol, Pimwipa, Khamphaya, Tanaporn, Guerra, Mateus T, Rodrigues, Michele A, Gomes, Dawidson A, Kong, Yong, . . . Ananthanarayanan, Meenakshisundaram. (2020). Type 3 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor is increased and enhances malignant properties in cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 71(2), 583-599.
- Vadnjal, Neza, Nourreddine, Sami, Lavoie, Geneviève, Serres, Murielle, Roux, Philippe P., & Paluch, Ewa K. (2022). Proteomic analysis of the actin cortex in interphase and mitosis. *Journal of Cell Science*, 135(16). doi:10.1242/jcs.259993
- Vais, Horia, Wang, Min, Mallilankaraman, Karthik, Payne, Riley, McKennan, Chris, Lock, Jeffrey T, . . . Parker, Ian. (2020). ER-luminal [Ca²⁺] regulation of InsP3 receptor gating mediated by an ER-luminal peripheral Ca²⁺-binding protein. *Elife*, 9, e53531.
- Vandekerckhove, Joel, & Weber, Klaus. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *Journal of molecular biology*, 126(4), 783-802.
- Vautrin-Glabik, Alexia, Botia, Béatrice, Kischel, Philippe, Ouadid-Ahidouch, Halima, & Rodat-Despoix, Lise. (2018). IP3R3 silencing induced actin cytoskeletal reorganization through ARHGAP18/RhoA/mDia1/FAK pathway in breast cancer cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(7), 945-958.
- Verma, A, Hirsch, D J, & Snyder, S H. (1992). Calcium pools mobilized by calcium or inositol 1,4,5-trisphosphate are differentially localized in rat heart and brain. *Molecular biology of the cell*, 3(6), 621-631. doi:10.1091/mbc.3.6.621

- Vicente-Manzanares, Miguel, Ma, Xuefei, Adelstein, Robert S, & Horwitz, Alan Rick. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(11), 778-790.
- Viita, Tiina, & Vartiainen, Maria K. (2017). From cytoskeleton to gene expression: actin in the nucleus. *The Actin Cytoskeleton*, 311-329.
- Viita, Tiina, & Vartiainen, Maria K. (2017). From Cytoskeleton to Gene Expression: Actin in the Nucleus. In Brigitte M. Jockusch (Ed.), *The Actin Cytoskeleton* (pp. 311-329). Cham: Springer International Publishing.
- Wang, B., Qi, X., Liu, J., Zhou, R., Lin, C., Shangguan, J., . . . Li, G. (2019). MYH9 Promotes Growth and Metastasis via Activation of MAPK/AKT Signaling in Colorectal Cancer. *J Cancer*, 10(4), 874-884. doi:10.7150/jca.27635
- Wang, Ying, Sherrard, Alice, Zhao, Bing, Melak, Michael, Trautwein, Jonathan, Kleinschnitz, Eva-Maria, . . . Grosse, Robert. (2019). GPCR-induced calcium transients trigger nuclear actin assembly for chromatin dynamics. *Nature Communications*, 10(1), 5271. doi:10.1038/s41467-019-13322-y
- WHO. (2022). Cancer. *World Health Organization*.
- Xue, Y., Morris, J. L., Yang, K., Fu, Z., Zhu, X., Johnson, F., . . . Huang, S. (2021). SMARCA4/2 loss inhibits chemotherapy-induced apoptosis by restricting IP3R3-mediated Ca²⁺ flux to mitochondria. *Nat Commun*, 12(1), 5404. doi:10.1038/s41467-021-25260-9
- Yamazaki, Haruka, Nozaki, Hiroaki, Onodera, Osamu, Michikawa, Takayuki, Nishizawa, Masatoyo, & Mikoshiba, Katsuhiko. (2011). Functional characterization of the P1059L mutation in the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 1 identified in a Japanese SCA15 family. *Biochemical and biophysical research communications*, 410(4), 754-758.
- Yang, Shengyu, & Huang, Xin-Yun. (2005). Ca²⁺ Influx through L-type Ca²⁺ Channels Controls the Trailing Tail Contraction in Growth Factor-induced Fibroblast Cell Migration *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 27130-27137. doi:10.1074/jbc.M501625200
- Yang, Yuh-Cheng, Chang, Tzu-Yang, Chen, Tze-Chien, Lin, Wen-Shan, Chang, Shih-Chuan, & Lee, Yann-Jinn. (2017). ITPR3 gene haplotype is associated with cervical squamous cell carcinoma risk in Taiwanese women. *Oncotarget*, 8(6), 10085.
- Ye, G., Huang, K., Yu, J., Zhao, L., Zhu, X., Yang, Q., . . . Qi, X. (2017). MicroRNA-647 Targets SRF-MYH9 Axis to Suppress Invasion and Metastasis of Gastric Cancer. *Theranostics*, 7(13), 3338-3353. doi:10.7150/thno.20512
- Ye, Gengtai, Yang, Qingbin, Lei, Xuetao, Zhu, Xianjun, Li, Fengping, He, Jiayong, . . . Lin, Tian. (2020). Nuclear MYH9-induced CTNNB1 transcription, targeted by staurosporin, promotes gastric cancer cell anoikis resistance and metastasis. *Theranostics*, 10(17), 7545.
- Yoo, Seung Hyun, Nam, Seong Won, Huh, Seong Kwon, Park, Seon Young, & Huh, Yang Hoon. (2005). Presence of a nucleoplasmic complex composed of the inositol 1, 4, 5-

trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel, chromogranin B, and phospholipids. *Biochemistry*, 44(25), 9246-9254.

- Yu, M., Wang, J., Zhu, Z., Hu, C., Ma, Q., Li, X., . . . Jin, J. (2017). Prognostic impact of MYH9 expression on patients with acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 8(1), 156-163. doi:10.18632/oncotarget.10613
- Zajac, Matthew, Modi, Souvik, & Krishnan, Yamuna. (2022). The evolution of organellar calcium mapping technologies. *Cell Calcium*, 108, 102658. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102658>
- Zhang, Mengzhao, Wang, Lu, Yue, Yangyang, Zhang, Lu, Liu, Tianjie, Jing, Minxuan, . . . Wang, Ke. (2021). ITPR3 facilitates tumor growth, metastasis and stemness by inducing the NF- κ B/CD44 pathway in urinary bladder carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 40, 1-20.
- Zhang, Xuejing, Connelly, Jaclyn, Levitan, Edwin S., Sun, Dandan, & Wang, Jane Q. (2021). Calcium/Calmodulin–Dependent Protein Kinase II in Cerebrovascular Diseases. *Translational Stroke Research*, 12(4), 513-529. doi:10.1007/s12975-021-00901-9
- Zhang, Ying, Feng, Xin-Hua, Wu, Rui-Yun, & Derynck, Rik. (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature*, 383(6596), 168-172.
- Zheng, Wangyang, Bai, Xue, Zhou, Yongxu, Yu, Liang, Ji, Daolin, Zheng, Yuling, . . . Chen, Wangming. (2022). Transcriptional ITPR3 as potential targets and biomarkers for human pancreatic cancer. *Aging (Albany NY)*, 14(10), 4425.
- Ziegler, Dorian V., Vindrieux, David, Goehrig, Delphine, Jaber, Sara, Collin, Guillaume, Griveau, Audrey, . . . Bernard, David. (2021). Calcium channel ITPR2 and mitochondria–ER contacts promote cellular senescence and aging. *Nature Communications*, 12(1), 720. doi:10.1038/s41467-021-20993-z

1 Anexo 1. Trabalho publicado

Advances in Biological Regulation 92 (2024) 101033



Contents lists available at ScienceDirect

Advances in Biological Regulation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbior





Decoding how receptor tyrosine kinases (RTKs) mediate nuclear calcium signaling

María José González Armijos, Thais Fernandes Bassani, Clara Couto Fernandez, Michele Angela Rodrigues¹, Dawidson Assis Gomes^{*,1}

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. L. Cocco

Keywords:

Nucleus

Calcium signaling

Phospholipase C

Receptor tyrosine kinases

Nucleoplasmic reticulum

Nuclear calcium

ABSTRACT

Calcium (Ca²⁺) is a highly versatile intracellular messenger that regulates several cellular processes. Although it is unclear how a single-second messenger coordinates various effects within a cell, there is growing evidence that spatial patterns of Ca²⁺ signals play an essential role in determining their specificity. Ca²⁺ signaling patterns can differ in various cell regions, and Ca²⁺ signals in the nuclear and cytoplasmic compartments have been observed to occur independently. The initiation and function of Ca²⁺ signaling within the nucleus are not yet fully understood. Receptor tyrosine kinases (RTKs) induce Ca²⁺ signaling resulting from phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) hydrolysis and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) formation within the nucleus. This signaling mechanism may be responsible for the effects of specific growth factors on cell proliferation and gene transcription. This review highlights the recent advances in RTK trafficking to the nucleus and explains how these receptors initiate nuclear calcium signaling.