



Estudo do papel da miosina Va no transporte citoplasma-núcleo da quinase de adesão focal (FAK) por técnicas avançadas de microscopia

MORETTO, I. A.; PEREIRA, S. A. M.; THOMAZ, A. A.; SANTOS, A. M.

INTRODUÇÃO

A quinase de adesão focal é uma enzima pertencente à família de tirosina-quinases do tipo não-receptor, expressa na maioria dos tecidos e tipos celulares. Já está bem estabelecido que FAK atua tanto no compartimento nuclear como no citoplasma [1, 2]. No núcleo, FAK interage e regula fatores de transcrição induzindo sua ubiquitinação e degradação, como ocorre com p53 e GATA4; enquanto no citoplasma, possui função canônica nas adesões focais e migração celular. Apesar de ser translocada para o núcleo em diversas condições, os mecanismos de transporte de FAK entre os compartimentos citoplasmático e nuclear ainda não foram elucidados.

A miosina Va (mio-Va), por sua vez, é uma mecanoenzima que possui uma estrutura muito adaptada ao transporte de cargas pelos filamentos de actina. Esta mecanoenzima apresenta funções no transporte e ancoramento de estruturas e moléculas nos diferentes compartimentos celulares. Estudos recentes vêm demonstrando funções citoplasmáticas e nucleares para os membros da família de miosinas V, no entanto, a participação dessa mecanoenzima no transporte entre os compartimentos nuclear e citoplasmático permanece pouco explorada [3-5].

Dados obtidos anteriormente por nosso grupo demonstraram que a mio-Va interage com FAK em extratos totais de células em cultura e em experimentos com proteínas recombinantes purificadas (*Pull Down*). No entanto, não foi investigado se esse motor molecular interage com FAK no compartimento nuclear ou se ele atua no transporte dessa quinase entre os compartimentos citoplasmático e nuclear.

OBJETIVO

Demonstrar que a mio-Va está colocalizada com a quinase de adesão focal no núcleo de fibroblastos e que esse motor molecular é importante para o transporte citoplasma-núcleo da FAK por técnicas avançadas de microscopia, como Super-Resolução do tipo Iluminação Estruturada (SR-SIM) e *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (STORM).

RESULTADOS

1. FAK colocaliza com miosina V no citoplasma e núcleo de fibroblastos NIH-3T3

Para demonstrar a existência de interação entre FAK e a miosina V nos compartimentos citoplasmático e nuclear, foi células NIH-3T3 foram imunomarcadas para essas duas proteínas e analisadas por SR-SIM. Nas imagens de super-resolução ampliadas, nota-se que há pontos de colocalização distribuídos na região adjacente à

marcação do DNA com DAPI, na interface entre núcleo e citoplasma (Fig. 1A e B). A distribuição característica desses pontos na região do envoltório nuclear, indica uma possível atuação da mio-Va no transporte citoplasma-núcleo ou, vice-versa, da FAK. Observa-se também a presença de colocalização tanto na região nuclear como citoplasmática dessas proteínas (Fig. 1B e C). No núcleo, há um grande agregado proteico com ampla colocalização de FAK e mio-Va. Na região citoplasmática, observa-se a distribuição característica de FAK e mio-Va pelas fibras de estresse. Nota-se pontos de colocalização e pontos intercalados de FAK e mio-Va nessas fibras, indicando um possível transporte citoplasmático da FAK, baseado em mio-Va, pelos filamentos de actina (Fig. 1C).

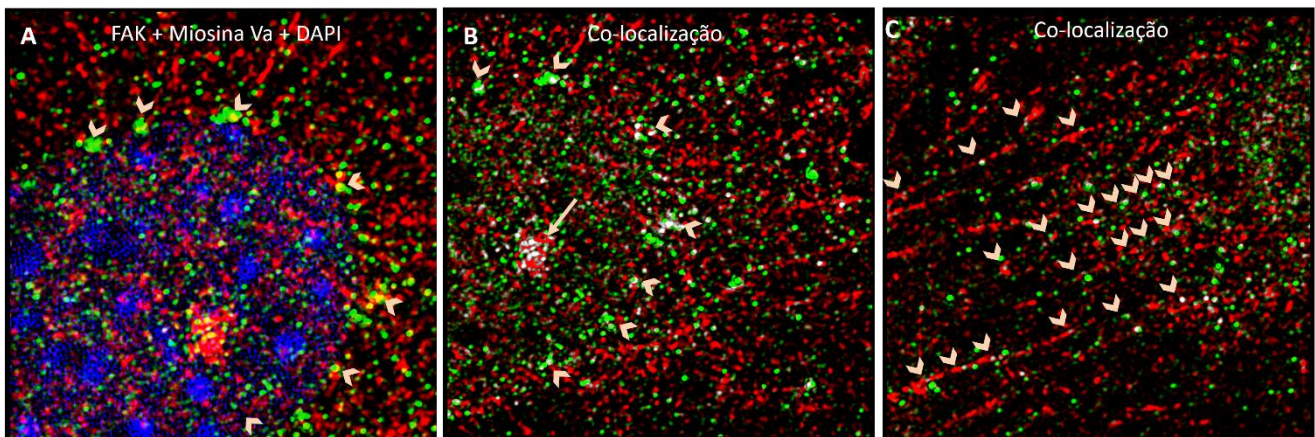


Figura 1. Imagens de sobreposição e colocalização das proteínas FAK e mio-Va no citoplasma e núcleo de células NIH-3T3, obtidas por SR-SIM. Distribuição de FAK e mio-Va nas regiões nuclear, perinuclear e citoplasmática. **A.** Imagem de colocalização de FAK e mio-Va, com acúmulo dessas proteínas em pontos específicos da região ocupada pelo envoltório nuclear (cabeças de seta). **B.** Intensa colocalização entre essas proteínas (seta). **C.** Distribuição de FAK e mio-Va pelas fibras de estresse (cabeças de seta).

2. FAK colocaliza com miosina V na região perinuclear de fibroblastos NIH-3T3

As imagens de SR-SIM também evidenciaram uma região de grande acúmulo de FAK e p-miosina V (p-mio V) no espaço perinuclear, provável região de localização do centróssomo (Fig. 2D). Além disso, foi evidenciado que há pontos de colocalização entre FAK e miosina V nesse espaço (Fig. 2B e C). Ficou evidente o acúmulo de FAK num ponto justaposto ao envoltório nuclear e a colocalização entre esta quinase e a p-mio V nesta mesma região (Fig. 2).

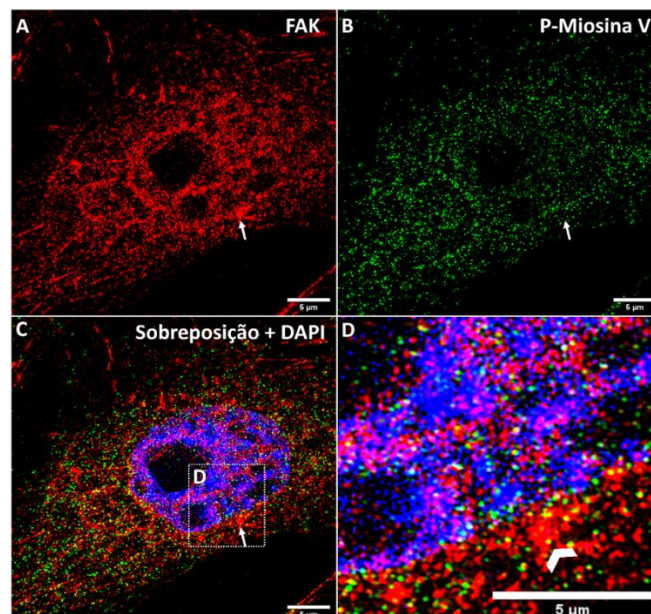


Figura 2. Imagem SR-SIM de fibroblastos NIH-3T3 imunomarcados para FAK (A) e p-mio V (B). C. Sobreposição dos sinais de fluorescência de FAK, p-mio V e DAPI. D. Cabeça de seta aponta acúmulo de FAK na região perinuclear.

3. Interação entre FAK e Miosina V por microscopia de super-resolução do tipo STORM

Com o intuito de aumentar a resolução das imagens e definir as estruturas com maior precisão, foram obtidas imagens pela técnica de STORM. De forma inédita, foi possível observar a formação de vesículas (~300nm de diâmetro) revestidas por FAK e com um ponto centralizado de p-mio V (Fig. 3A). É possível notar a presença destas vesículas no interior do compartimento nuclear, delimitado pela elipse amarela (Fig. 3B). Com uma subsequente ampliação dessa imagem (Fig. 3C e Fig. 3D), ficou evidente a presença dessas estruturas vesiculares formadas por FAK e que apresentam um ponto central de p-mio V (setas). A presença da miosina nessas estruturas vesiculares é um indício do envolvimento desse motor molecular no transporte de vesículas revestidas por FAK entre os compartimentos subcelulares.

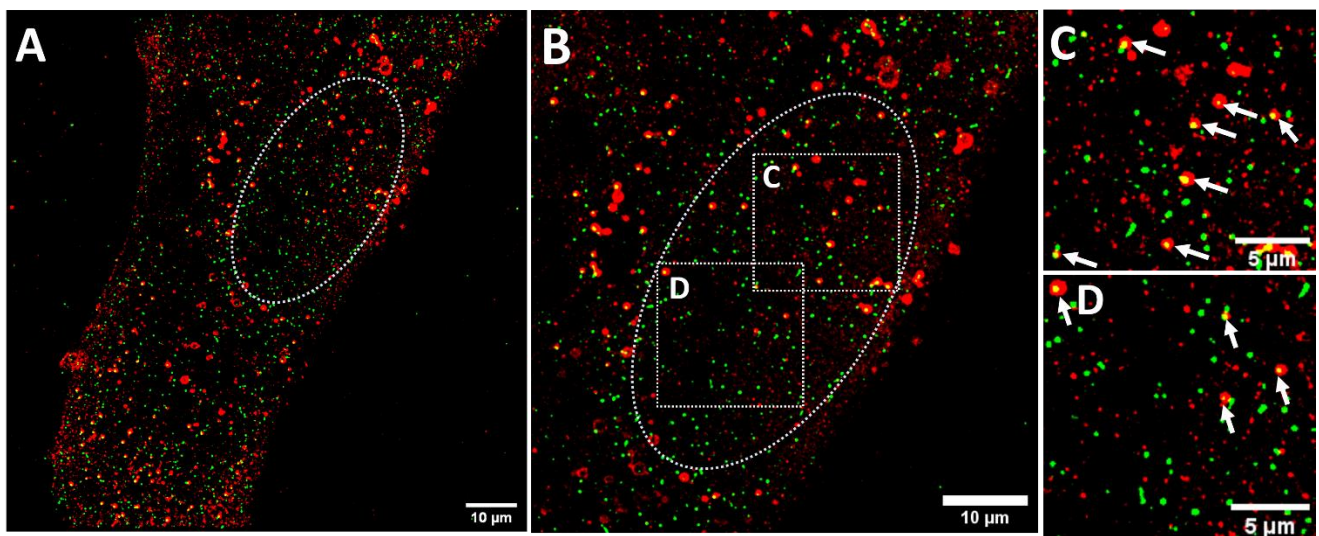


Figura 3. A. Fibroblasto imunomarcado para FAK (vermelho) e p-mio V (verde), com região do núcleo circundada por uma elipse. B. Núcleo de fibroblasto ampliado. C e D. Setas indicam as estruturas vesiculares compostas por FAK e p-mio V na região nuclear.

Outras imagens, obtidas pela técnica de STORM, reforçaram a presença de estruturas vesiculares como as observadas na figura anterior. Na figura 4, observa-se um fibroblasto, cujo foco foi dado na região mais basal da célula com o intuito de destacar a região perinuclear. Nessa região observou-se um grande acúmulo de vesículas de tamanhos distintos, que variaram de 300 a 1000nm de diâmetro.

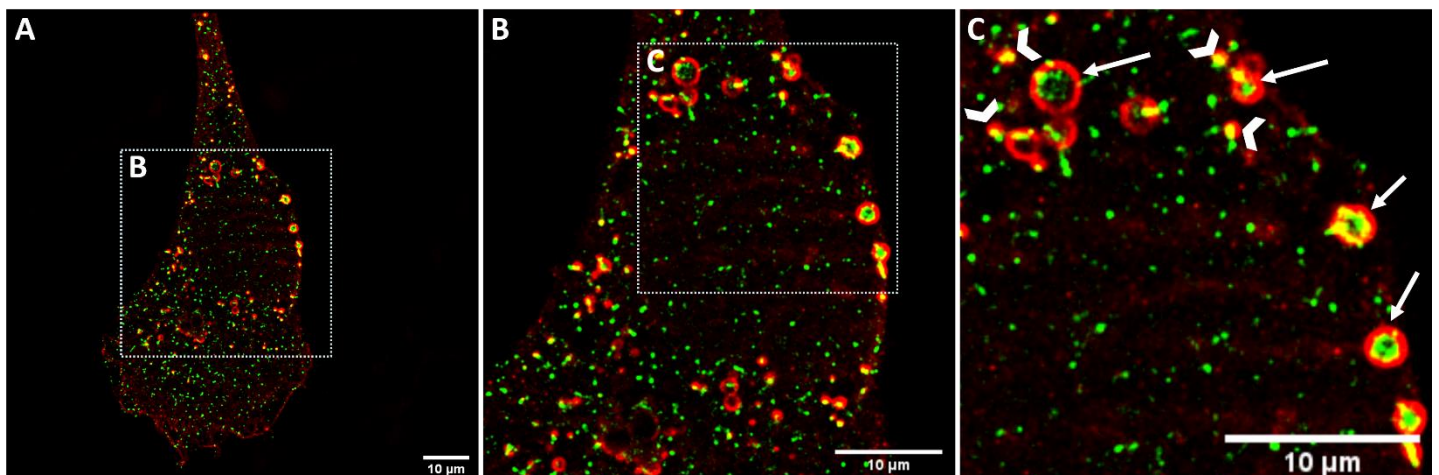


Figura 4. A. Sobreposição dos sinais de fluorescência de FAK e p-miosina V, demonstrando as regiões nuclear e perinuclear, ricas em vesículas constituídas de FAK e p-miosina V, que foram ampliadas para a obtenção da imagem B. **B.** Região perinuclear com vesículas compostas por FAK e p-miosina V, demonstrando diferentes padrões de tamanho. **C.** Cabeças de setas indicam vesículas com um padrão de menor tamanho e que apresentam um ponto central de miosina V, enquanto as setas indicam vesículas de maior circunferência.

Pela técnica de STORM foi possível observar estruturas vesiculares de diferentes diâmetros no compartimento nuclear, no citoplasma e também no espaço perinuclear. As vesículas encontradas no espaço virtual do envoltório nuclear (~800nm de diâmetro), as quais apresentaram-se em sua maioria revestidas por FAK e com miosina V em seu interior, podem estar relacionadas ao transporte vesicular de cargas pelas membranas do envoltório nuclear, como o descrito para a reciclagem de constituintes nucleares [6, 7]. Experimentos futuros de super-resolução com marcação de proteínas específicas da membrana do envoltório nuclear e experimentos de microscopia eletrônica serão realizados para confirmar essa hipótese.

4. Redução da expressão da mio-Va por silenciamento gênico resulta acúmulo de FAK no compartimento nuclear

Em seguida, foi verificado se o silenciamento gênico da mio-Va modula a distribuição subcelular da FAK. Os dados obtidos de três grupos experimentais demonstraram que a redução da expressão da mio-Va resultou num aumento da localização da FAK no compartimento nuclear. Os dados do silenciamento indicaram fortemente que a mio-Va pode atuar no transporte de FAK do núcleo em direção a regiões subcelulares, como fibras de estresse e as adesões focais. Novos experimentos de silenciamento serão realizados para confirmar essa hipótese.

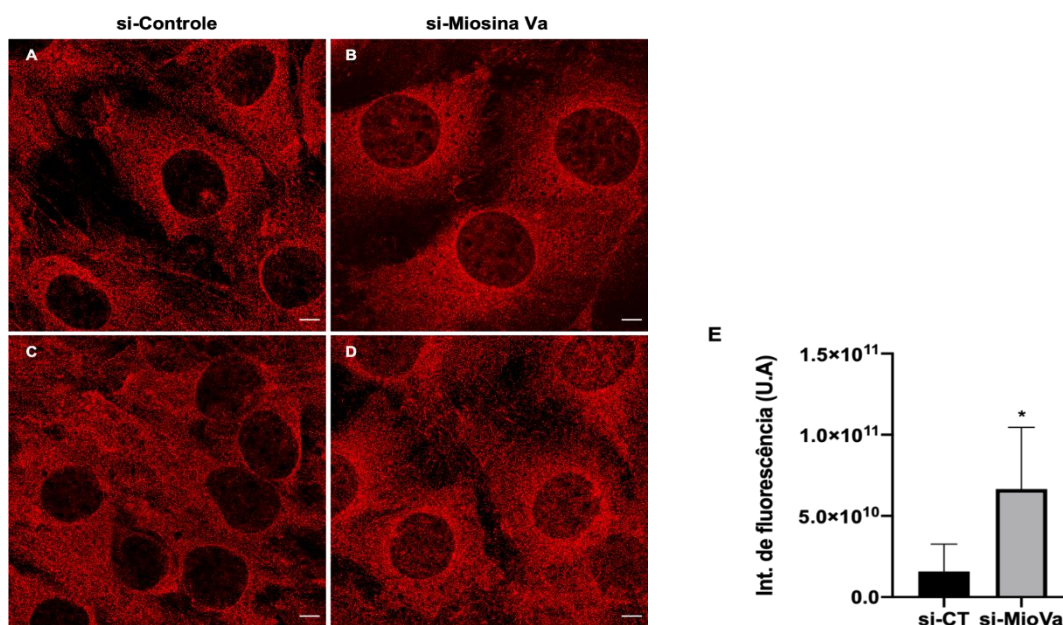


Figura 5. Silenciamento da mio-Va resulta em acúmulo de FAK no núcleo. Imagens representativas de SR-SIM de fibroblastos transfetados com si-RNA controle (A e C) e com um pool de si-RNAs específicos para a mio-Va (B e D). Barra de escala = 5µM. **E.** Gráfico em barras demonstra a intensidade de fluorescência de FAK no núcleo de fibroblastos que receberam o si-controle e daqueles que receberam o pool de si-RNAs para a mio-Va. * P<0.0001(Mann Whitney test). N = 3 experimentos independentes.

Os dados obtidos levaram a formulação da hipótese de que a miosina V seja importante, não para o transporte nuclear de FAK, mas para a retirada da FAK do núcleo após a desativação de eventos de sinalização, como a regulação da sobrevivência/morte celular após a perda parcial das adesões focais. A redução de 70% da expressão dessa miosina resultou num aumento de FAK no núcleo de aproximadamente 4 vezes em relação ao basal (Fig. 5). Os dados do silenciamento gênico, juntamente com os dados de microscopia de super-resolução,

indicam que a interação da FAK com a mio-Va pode ser importante para o transporte núcleo-citoplasma dessa quinase, visto o acúmulo de FAK no núcleo de células silenciadas para a mio-Va e a colocalização dessas proteínas nos entornos do envoltório nuclear em células controle. A atuação da miosina V no transporte do compartimento nuclear em direção ao citoplasmático já foi demonstrada anteriormente. Wilkie e colaboradores [8] relataram que mio-Va está envolvida no processo de infecção pelos vírus citomegalovírus humano e que atua no transporte dos mesmos do compartimento nuclear em direção ao citoplasmático.

Dessa forma, formulamos um modelo no qual a classe de miosinas V é necessária para a localização da FAK em regiões nucleares distintas, como os speckles, e em regiões citoplasmáticas, como as fibras de estresse e adesões focais. Após eventos de sinalização que recrutam FAK para o núcleo, o membro Va dessa classe de miosinas realiza o transporte da FAK do núcleo/região perinuclear para as regiões citoplasmáticas de origem, finalizando o evento de sinalização. Experimentos futuros que poderão corroborar essa hipótese serão realizados no laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Lim, S.T., et al., *Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression*. J Cell Biol, 2012. **197**(7): p. 907-19.
2. Schaller, M.D., *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
3. Krendel, M. and M.S. Mooseker, *Myosins: tails (and heads) of functional diversity*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 239-51.
4. Fonseca, P.M., et al., *Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes*. Circ Res, 2005. **96**(1): p. 73-81.
5. Mermall, V., P.L. Post, and M.S. Mooseker, *Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction*. Science, 1998. **279**(5350): p. 527-33.
6. Rose, A. and C. Schlieker, *Alternative nuclear transport for cellular protein quality control*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(10): p. 509-14.
7. Webster, B.M., et al., *Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4*. Cell, 2014. **159**(2): p. 388-401.
8. Wilkie, A.R., et al., *A Role for Myosin Va in Human Cytomegalovirus Nuclear Egress*. J Virol, 2018. **92**(6).