



Miosina Va regula o transporte intracelular da quinase de adesão focal (FAK)

Palavras-Chave: Miosina V, FAK, SIM

Autores/as:

Giovana Gouvêa [Departamento de Eletrônica Quântica, Instituto de Física Gleb Wataghin]

Isabela Moretto [Departamento de Biologia Estrutural e Funcional]

Prof.^a. Dr.^a Aline Mara dos Santos (co-orientadora) [Departamento de Biologia Estrutural e Funcional]

Prof. Dr. André Alexandre de Thomaz (orientador) [Departamento de Eletrônica Quântica, Instituto de Física Gleb Wataghin]

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 é importante para a localização de FAK nos diferentes compartimentos celulares, como núcleo e adesões focais. Portanto, este trabalho teve como objetivo demonstrar o papel da miosina Va no transporte de FAK entre distintos compartimentos celulares.

METODOLOGIA

1. Silenciamento gênico da miosina Va

Os fibroblastos foram expandidos para uma taxa celular de $1,5 \times 10^4$ em placas de cultivo de 24 poços com lamínulas de 12mm de diâmetro. Para a diminuição da expressão da miosina Va, foram utilizados RNAs pequenos de interferência (*small interfering RNA* - siRNA). O grupo controle foi incubado com siRNA *scramble*, enquanto o grupo silenciado foi incubado com siRNA MYO5A, contendo a sequência referente à miosina Va, ambos na concentração de 30 nM. As sequências de siRNA foram complexadas com 2,8 μ L do reagente de transfecção lipofectamina em meio DMEM puro e incubadas por 20 minutos para a formação do complexo de transfecção. Em seguida, foram acrescentados 1400 μ L de meio DMEM puro para totalizar o volume final, de forma a obtermos 1750 μ L de meio de transfecção para siScramble e para siMyoVa. Posteriormente, essa solução foi distribuída entre os poços com fibroblastos no volume de 250 μ L por poço e incubadas em estufa a 37° C por 48 horas.

Após o período de incubação, o meio DMEM puro foi trocado por meio DMEM completo (com 10% de SFB e 1% de antibiótico) e as células foram mantidas em cultura por mais 24 horas para sua recuperação. Em seguida, foram processadas para a marcação por imunofluorescência.

2. Imunofluorescência

Para avaliar a distribuição das proteínas FAK e miosina Va, fibroblastos NIH-3T3 foram cultivados em lamínulas, mantidos em meio DMEM completo, separados em grupos silenciados para miosina Va e controle, fixados com paraformaldeído 4%, permeabilizados com 0,8% de triton e bloqueados com BSA 5% em PBS. Em seguida, foram incubados com anticorpos nas combinações: FAK e miosina Va e FAK e paxilina na diluição recomendada no *datasheet*, por 30 minutos. Posteriormente, foram lavados com PBS e marcados com anticorpos secundários do tipo Alexa na diluição de 1:2000, à temperatura ambiente, também por 30 minutos. Por fim, foram lavados com PBS e as lâminas foram montadas com *ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI*, corante que permite a marcação do DNA para a delimitação do núcleo durante as análises por microscopia do tipo SR-SIM.

3. Aquisição de imagens

A distribuição subcelular de FAK e miosina Va foi avaliada pela técnica de Structured Illumination Microscopy (SR-SIM), que permite uma resolução de aproximadamente 100 nm. A aquisição, reconstrução e alinhamento das imagens foram realizadas no microscópio Zeiss Elyra com o software Zeiss ZEN 2012 SP1 (*black edition, version 8.1.5.484*) instalado no INFABIC (Instituto Nacional de Ciência e Fotônica Aplicada à Biologia Celular).

4. Análise de imagens

A análise das imagens obtidas foi realizada através do software Fiji (<https://fiji.sc/>), seguindo os seguintes passos:

1. Open>Split Channels

2. Escolha dos canais associados a FAK e paxilina
3. Seleção dos Z-stacks mais adequados para análise das adesões focais
4. Image>Stacks>Z Project>Average Intensity
5. Seleção do canal da FAK e/ou paxilina
6. Ajuste de brilho e contraste através da ferramenta Brightness/Contrast
7. Image>Adjust>Threshold para selecionar os pixels com intensidade do sinal de FAK e/ou paxilina
8. Selecionar, através do comando Analyze>Analyze Particles, todas as partículas, sendo o valor mínimo escolhido para análise igual a 0 microns²
9. As partículas selecionadas foram, então, adicionadas ao ROI Manager e salvas para futuras análises.

Esse procedimento foi realizado para o canal da fluorescência da paxilina, FAK e miosina Va para verificação da co-localização entre FAK e paxilina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de observar os efeitos no transporte da FAK pela miosina Va, essa proteína foi silenciada e imagens de microscopia de super-resolução foram obtidas. Nas imagens, é possível observar a sobreposição dos sinais de fluorescência da FAK e da paxilina, uma proteína de marcação das adesões focais. Nota-se que a célula silenciada para miosina Va apresenta-se mais retraída espacialmente do que a célula controle.

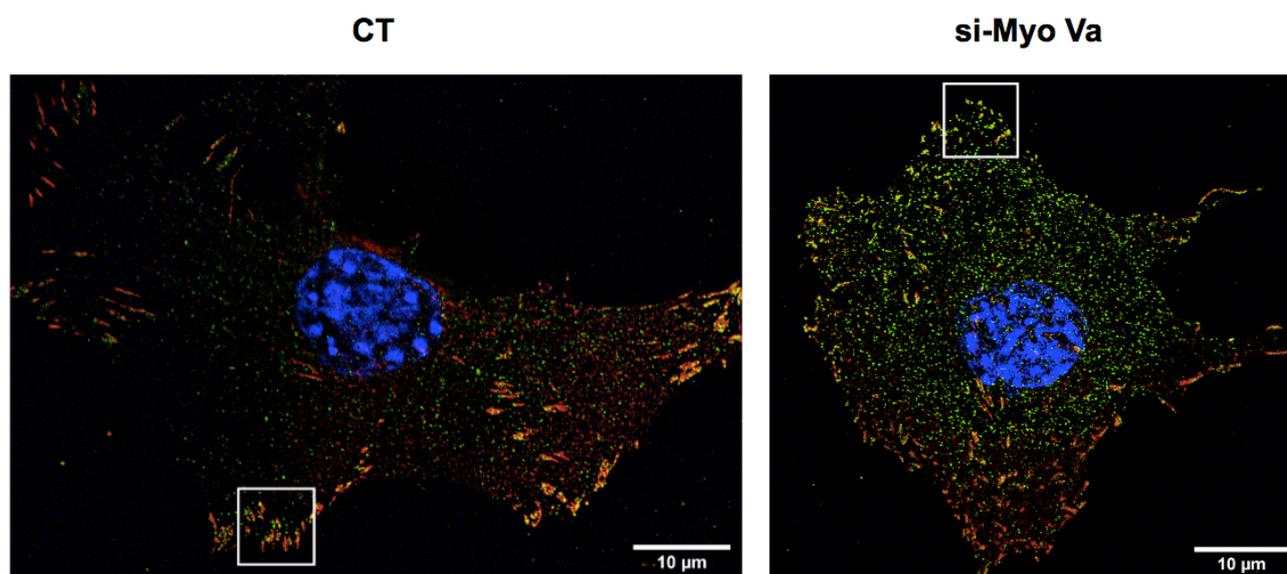


Figura 1. Imagens representativas de microscopia de Super-Resolução do tipo Iluminação Estruturada (SR-SIM), na qual células NIH-3T3 controle (CT) e silenciadas para miosina Va (si-Myo Va) foram fixadas e processadas para imunofluorescência utilizando-se anticorpos contra FAK (verde) e paxilina (vermelho). Sobreposição dos sinais de fluorescência de FAK (verde), paxilina (vermelho) e DAPI (azul).

As adesões focais de células controle (CT) apresentam-se maiores, mais maduras e com direcionalidade bem definida. Nas células silenciadas para a miosina Va (si-Myo Va), as adesões focais encontram-se desorganizadas, pequenas e pouco maduras.

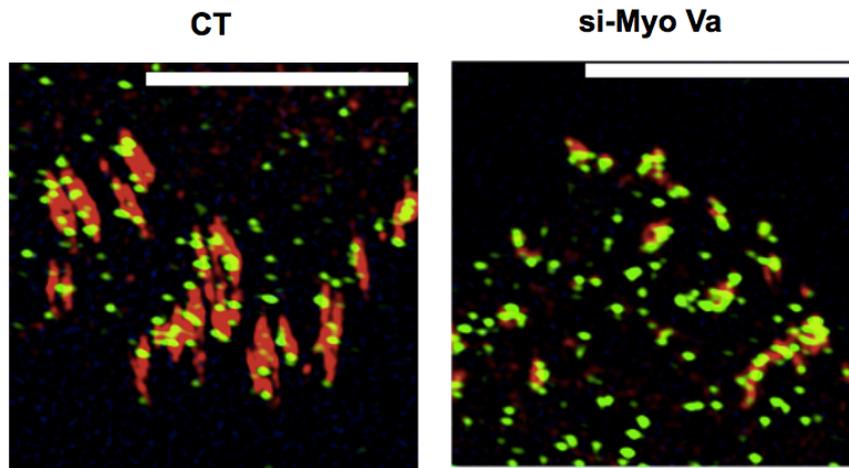


Figura 2. Regiões de adesões focais selecionadas na Figura 1 ampliadas. Observa-se uma desorganização na direcionalidade das adesões focais na célula silenciada para miosina Va (si-Myo Va) quando comparado com as adesões focais da célula controle (CT). Barra de escala = 5 μ m. Sobreposição dos sinais de fluorescência de FAK (verde) e paxilina (vermelho).

Análises das áreas das adesões focais dos grupos de células controle e silenciadas para miosina Va confirmam as evidências visuais apontadas acima. Observa-se, na Figura 2, uma maior quantidade de adesões focais maduras nas células controle, uma vez que essas possuem maiores quantidades de adesões focais com área maiores que 1 μ m² em relação ao grupo de células silenciadas para miosina Va. Nota-se uma maior quantidade de adesões focais imaturas, com áreas entre 0,2 e 0,3 μ m², em células silenciadas. Essa análise aponta para um provável envolvimento da miosina Va no processo de maturação e montagem das adesões focais em fibroblastos NIH-3T3.

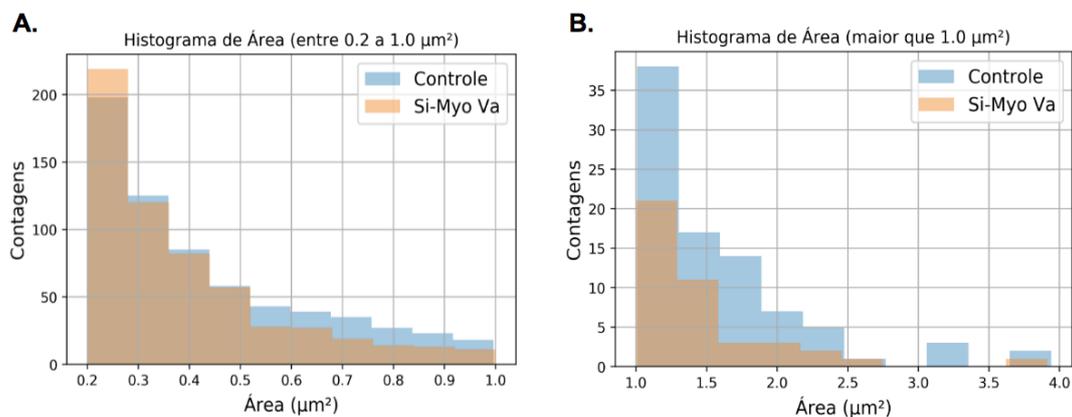


Figura 3. Silenciamento da miosina Va indicia uma maior quantidade de AFs maduras em células controle. **(A)** Histograma apresenta a quantidade de AFs por área em células controle e silenciadas para miosina Va (si-Myo Va) para uma distribuição de áreas entre 0,2 e 1 μ m². **(B)** Histograma apresenta a quantidade de AFs por área em células controle e silenciadas para miosina Va (si-Myo Va) para uma distribuição de áreas maiores que 1 μ m². **(A)** N = 957 adesões focais em células controle (CT). N = 867 adesões focais em células silenciadas para miosina Va (si-Myo Va). **(B)** N = 96 adesões focais em células controle (CT). N = 83 adesões focais em células silenciadas para miosina Va (si-Myo Va).

Análises obtidas através da intensidade de fluorescência da FAK e da paxilina mostram um aumento de ambas as proteínas nas adesões focais quando silencia-se a miosina Va. Esse resultado aponta para um provável papel de transporte da FAK pela miosina Va, uma vez que nota-se um acúmulo da FAK nos compartimentos celulares de células silenciadas.

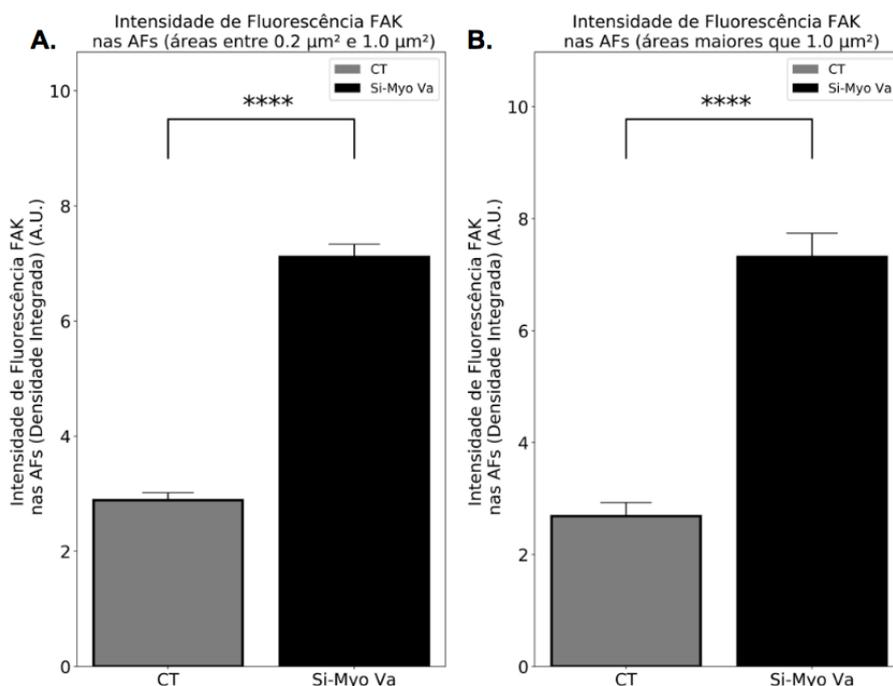


Figura 4. Gráfico em barras representa a modificação na intensidade de fluorescência de FAK para áreas entre 0.2 μm^2 e 1.0 μm^2 **(A)** e maiores que 1.0 μm^2 **(B)** devido ao silenciamento da miosina Va em células controle (CT) e silenciadas para miosina Va (si-Myo Va) nas AFs. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. **(A)** N = 957 adesões focais em células controle (CT). N = 867 adesões focais em células silenciadas para miosina Va (si-Myo Va). **(B)** N = 96 adesões focais em células controle (CT). N = 83 adesões focais em células silenciadas para miosina Va (si-Myo Va).

CONCLUSÕES

Resultados obtidos através do silenciamento gênico da miosina Va indicam fortemente que essa mecanoenzima pode atuar no transporte de FAK entre os compartimentos subcelulares, como fibras de estresse e adesões focais. Juntos, os dados apontam para a influência da miosina Va na organização celular e reciclagem das adesões focais, indicando que a miosina Va regula o transporte intracelular da quinase de adesão focal.

BIBLIOGRAFIA

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 MOOSEKER, M.S. **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., POST, P.L. and MOOSEKER, M.S. **Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction.** Science, 1998. 279(5350): p. 527-33.