UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGÊNICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

JOHNNY ALEX ROCKENBACH ZENZEN

**Estímulo por soro em fibroblastos quiescentes induz a fosforilação
da miosina-Va e sua localização em adesões focais**

Ribeirão Preto – SP

2016

JOHNNY ALEX ROCKENBACH ZENZEN

**Estímulo por soro em fibroblastos quiescentes induz a fosforilação
da miosina-Va e sua localização em adesões focais**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências,
área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Ribeirão Preto – SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Rockenbach, Johnny Alex Zenzen

Estímulo por soro em fibroblastos quiescentes induz a fosforilação da miosina-Va e sua localização em adesões focais / Johnny Alex Rockenbach Zenzen; orientador: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico. – Ribeirão Preto, SP.

62p; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1- Miosina Va; 2- Adesão Focal; 3- FAK; 4- Quiescência

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Johnny Alex Rockenbach Zenzen

Título: Estímulo por soro em fibroblastos quiescentes induz a fosforilação da miosina-Va e sua localização em adesões focais

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A minha mãe, que foi mãe e pai. Que me criou com amor e sabedoria e que me permitiu crescer e ‘sair para o mundo’, mas me dá muitos motivos para sempre querer ficar.

AGRADECIMENTOS

- A minha orientadora, Profa. Dra. Enilza M. Espreafico, pela confiança em meu trabalho, paciência, aprendizado e orientação. Pelo entusiasmo com a nossa pesquisa e finalmente por ser uma grande cientista e buscar sempre fazer ciência de qualidade com alto impacto e relevância. É uma honra poder trabalhar ao seu lado, aprendendo cada vez mais.
- A minha mãe, que mesmo distante apoia cada decisão e me dá suporte e força para continuar. Tudo que conquistei até hoje, é em resultado dos seus conselhos, amor, compreensão, carinho e paciência. E a minha irmã, que é a melhor irmã do mundo, e me dá muito orgulho. Amo vocês.
- Às Profa. Dra. Munira M.A. Baqui, Constance Oliver, Roy E. Larson, Ricardo G.P Ramos, Maria Célia Jamur, Maria Luisa Paçó-Larson, Ângela Cruz e Maria Cristina Roque-Barreira, pelos anticorpos, reagentes e equipamentos emprestados, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.
- A todos os docentes do Programa de Biologia Celular e Molecular, que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação acadêmica e crescimento profissional.
- À Silmara, pela dedicação ao nosso laboratório e pela paciência, e por sempre me ajudar com dúvidas nos protocolos e nos cálculos de concentração.
- À Joana, por zelar pela limpeza do laboratório e cuidado com nossos materiais, permitindo a realização deste trabalho e dos demais no laboratório.
- Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, em especial à Vani por sempre fazer o café que nos mantém focados durante o dia, também à Carol, Roseli, Mara, Elizabete, Viviane, Tania, Izilda, Sílvia e o Anderson.
- Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifóton, e à Roberta pela paciência e ajuda no multifóton e nas dúvidas sobre imagens e microscopia.
- Às secretárias Lúcia, Camila e Gabriela pela ajuda e paciência.
- À minha namorada Roberta, pelo amor, carinho, paciência, e por estar ao meu lado mesmo nos momentos difíceis.
- À Carmen ou “Carmãe”. Por sempre me ajudar a corrigir os meus erros e a crescer como pesquisador. Também por todos os conselhos e correções de resumos, resultados, projeto, e da dissertação.

- À Anelisa pela ajuda com o projeto de mestrado e por me ajudar a dar os primeiros passos dentro do laboratório
- Aos amigos da pós-graduação, Mario, Gerardo, Felipe, Denyse, Camlia, Julliane, Frank, Luís, Rodolfo, Gustavo, Juliana, Douglas, Giovana, Lucas, Carlos Jr., Estela, Paula, Mariana por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis e compartilharem da mesma angústia e alegria da vida de fazer pesquisa.
- Aos amigos do laboratório, os antigos e os recentes pela companhia, amizade, paciência e incentivo. Carmen, Anelisa, Carlos, Cibele, Denise, Mariani, Roberto, Rodrigo, Rui, Cristiano e Lucas.
- À minha família, que sempre me incentivou e acreditou em mim e nos meus objetivos.
- À Capes, FAPESP, CNPq, Faepa e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que forneceram suporte financeiro e estrutura para que este trabalho fosse realizado.

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso o universo de cada um se resume ao tamanho de seu saber”.

Albert Einstein

RESUMO

ROCKENBACH, J. A. Z. **Estímulo por soro em fibroblastos quiescentes induz a fosforilação da miosina-Va e sua localização em adesões focais.** 2016. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

A montagem e desmontagem das adesões focais (AF) desempenham um papel fundamental em diversos processos celulares, incluindo migração celular e sobrevivência. Resultados prévios do nosso laboratório mostram que fibroblastos nulos ou silenciados para miosina-Va sofrem um atraso na desmontagem das adesões, sugerindo um papel para a miosina-Va neste processo. Neste trabalho, visamos analisar a dinâmica de montagem das AF em fibroblastos murinos imortalizados NIH3T3, utilizando sondas fluorescentes para visualização de componentes de adesão focal. A formação das AF foi analisada após estímulo por soro de células quiescentes, o que leva a intensa polimerização de actina, reorganização do citoesqueleto e montagem das AF. A cinética de montagem das AF foi observada em ensaios ao longo do tempo, de células fixadas em 0, 5, 15, 30, 120 minutos após estímulo, e marcadas para miosina-Va fosforilada (p-miosina-Va, S1650), FAK fosforilada (p-FAK, Y397), vinculina, dinamina-2, integrina- β 1, faloidina, Ki67 e DAPI. Os nossos resultados mostraram um aumento de fluorescência de p-miosina-Va por todo o citoplasma após a estímulo com soro, e revelaram que a p-miosina-Va co-localiza com pFAK nas AF logo após o estímulo, essa localização da p-miosina-Va nas AF diminui ao passar do tempo e retorna após 120 minutos. Isto é consistente com os resultados anteriores de um papel da miosina-Va na dinâmica das AF. Também é possível perceber uma maior concentração de p-miosina-Va e dinamina-2 na região perinuclear, 5 minutos após estímulo, e o espalhamento de ambas as proteínas pelo citoplasma com o passar do tempo. Demonstramos, por Western blotting, que o estímulo por soro não causa alteração na quantidade total de miosina-Va em nenhum dos tempos analisados em relação à condição de quiescência, mas induz, após 5 e 15 minutos, um aumento apreciável de p-miosina-Va, que sofre queda e variações nos tempos posteriores. Para nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração de que a fosforilação da miosina-Va aumenta em resposta ao soro e estamos investigando se este evento está ligado à dinâmica das adesões focais em fibroblastos.

Palavras-chave: Miosina Va, Adesão Focal, FAK, Quiescência.

ABSTRACT

ROCKENBACH, J. A. Z. **Estímulo por soro em fibroblastos quiescentes induz a fosforilação da miosina-Va e sua localização em adesões focais.** 2016. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

The assembly and disassembly of focal adhesions (FA) play a critical role in several cellular process, including cell migration and survival. Previous work from our laboratory showed that fibroblasts without myosin-Va show a delay in focal adhesion disassembly, suggesting a role for myosin-Va in this process. In this work, we aim at imaging the dynamics of focal adhesion disassembly and reassembly in cells, with fluorescent probes for visualization of focal adhesion components. Here, we used murine NIH3T3 fibroblasts to analyze FA formation after serum stimulation of quiescent cells, which leads to intense polymerization of actin and reorganization of the cytoskeleton and FA assembly. The kinetics of FA assembly was observed in a time-course assay of cells fixed at 0, 5, 15, 30 and 120 min after serum stimulation, and stained for phosphorylated myosin-Va (p-myosin-Va, S1650), phosphorylated FAK (p-FAK, Y397), vinculin, phalloidin and DAPI. Our results showed an increase of p-myosin-Va staining throughout the cytoplasm upon serum stimulation, and revealed that p-myosin-Va does not colocalize with FAK in FA at early time points. However, colocalization is observed after 30 to 120 min. This is consistent with previous results of a role for myosin-Va in FA disassembly. It is also possible to observe a higher concentration of p-myosin-Va and dynamin-2 in the perinuclear region 5 minutes after stimulation, and the spreading of both proteins in the cytoplasm over time. We demonstrate by Western blotting that serum stimulation does not cause change in total amount of myosin-Va, in any of the times analyzed in relation to the quiescent condition, but induces, after 5 and 15 minutes, an appreciable increase of p-myosin-Va suffering drop and variations in the later times. To our knowledge, this is the first demonstration that phosphorylation of myosin-Va increases in response to serum and we are investigating whether this event is connected to the dynamics of focal adhesions in fibroblasts.

Keywords: Myosin Va, Focal Adhesions, FAK, Quiescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho hipotético esquemático da miosina Va	17
Figura 2 - Endocitose dependente de clatrina	20
Figura 3 - Estrutura e sítios de fosforilação da FAK	21
Figura 4 - Teste de especificidade do anticorpo 9E6	33
Figura 5 - Ausência de soro induz perda das AFs mesmo antes da quiescência	35
Figura 6 - Estímulo por soro induz intensa polimerização de actina, reorganização do citoesqueleto e montagem das AF	37
Figura 7: Localização subcelular de vinculina e p-miosina-Va após estímulo por soro	39
Figura 8: Quantificação de fluorescência e <i>Western Blot</i>	40
Figura 9: Estímulo por soro induz a localização da pMVa nas AF	42
Figura 10: Correlação entre pMVa e pFAK nas adesões focais	43
Figura 11: Localização intracelular da integrina $\beta 1$ após estímulo por soro	45
Figura 12: Localização intracelular da dinamina 2 após estímulo por soro	47

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 Miosinas	14
1.2 Miosina V	14
1.3 Migração e Adesão	17
1.4 FAK e Dinamina	20
1.5 Contexto	20
2. Objetivos	24
2.1 Objetivos Gerais	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. Materiais e Métodos	26
3.1 Cultivo Celular	26
3.2 Ensaio de Privação de soro	26
3.3 Produção de anticorpos 9E6 (p-miosina-Va)	26
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)	27
3.5 Imunodeteção de Proteínas (<i>Western Blot</i>)	27
3.6 Ensaio de estímulo por soro após quiescência	28
3.7 Anticorpos primários e secundários utilizados neste trabalho	28
3.8 Imunomarcção de Fluorescência	29
3.9 Quantificação da fluorescência das adesões focais	30
4. Resultados	32
4.1 Produção e especificidade do anticorpo 9E6	32
4.2 Análise de quiescência e formação das adesões focais	33
4.3 Efeitos do estímulo por soro na localização e fosforilação de MVa	37

4.4 Efeitos do estímulo por soro na localização de pMVa e proteínas de adesão focal	40
5. Discussão	48
6. Conclusões	52
6.1 Soro induz a entrada no ciclo celular	52
6.2 Estímulo por soro induz fosforilação da MVa em fibroblastos quiescentes	52
6.3 p-miosina-Va localiza-se nas adesões focais	52
6.4 Distribuição de p-miosina-Va é semelhante a distribuição celular de Dyn2	52

Introdução

---

1. Introdução

1.1 Miosinas

As miosinas fazem parte de uma grande família de proteínas motoras baseadas em actina encontradas em todos os organismos eucarióticos. São proteínas compostas por uma ou duas cabeças motoras, um domínio regulatório ligante de cadeias leves e uma cauda de estrutura, extensão e funções variadas. A cabeça se liga aos filamentos de actina e hidrolisa ATP para gerar energia para caminhar sobre os filamentos de actina. A cauda geralmente medeia as interações com moléculas das ‘cargas’ que são transportadas pelo motor, ou com outras subunidades de miosina (Larson, 1996). As miosinas podem participar da citocinese, fagocitose, extensão do cone de crescimento, tráfego de vesículas e organelas (Berg, 2001; Mermall et al., 1998). Controlam também a organização da actina, morfologia celular e migração (Makowska et al, 2015).

O genoma humano codifica 40 genes de miosinas que podem ser divididas em 12 classes (Peckham; Knight, 2009), e além de funções citoplasmáticas, algumas exercem funções nucleares participando do ciclo celular, proliferação e translocação de cromossomos (Lanerolle; Serebryanny, 2011). Elas são classificadas em convencionais, onde seus dímeros de cadeias pesadas formam filamentos bipolares, e não-convencionais, por serem incapazes de formar filamentos bipolares (Hartman e Spudich 2012). As miosinas convencionais podem ser subdivididas em miosinas não musculares, que formam filamentos bipolares curtos e miosinas musculares, que formam filamentos bipolares constituídos por dezenas/centenas de moléculas de miosina, fundamentais para o funcionamento contrátil nos tecidos musculares.

1.2 Miosina V

A estrutura da miosina V, uma miosina não-convencional, é composta por um domínio motor denominado cabeça, o qual contém o sítio de ligação para o ATP e para a F-actina, e se localiza na região N-terminal da proteína, seguida por um domínio estrutural chamado de

pescoço, que é sua estrutura mais notável ao microscópio eletrônico. Por fim, há uma cauda C-terminal na proteína, a qual se liga as vesículas e componentes transportados pela miosina (Espreafico *et al.*, 1992; Larson, 1996). No pescoço se encontra o sítio de ligação à calmodulina (CaM), a qual juntamente com o cálcio é necessária para o transporte de vesículas (Reck-Peterson *et al.*, 2000). Essas miosinas se movem gradativamente ao longo da actina antes de se desligarem, e por possuírem duas cabeças podem dar vários passos sobre os filamentos de actina como uma molécula única (Howard, 1997; Hartman e Spudich 2012). Esses passos da miosina V sobre a actina são de 37nm cada, e são feitos de “mão em mão”, onde cada cabeça ligada a actina se move de uma vez (Yildiz *et al.*, 2003). O tamanho dos passos da MVa sobre a actina é definido pelo comprimento do pescoço (Sakamoto *et al.*, 2005), e dependem da hidrólise do ATP, após a hidrólise a cabeça da miosina V se desprende da actina e dá um passo à frente, se ligando novamente a actina. Então, a cabeça que ficou para trás é fosforilada e o processo se repete (Volkman *et al.*, 2005)

A fosforilação e ativação da miosina V é feita pela proteína quinase II (CaMKII), essa fosforilação ocorre na cauda, na Serina-1650 (Karcher *et al.*, 2001). Sítio reconhecido pelo anticorpo (9E6), produzido e caracterizado por Pranchevicius e colaboradores (2008) e utilizado neste trabalho.

Existem três isoformas de miosinas V codificadas em humanos (MVa, MVb e MVc) e diferencialmente expressas. Miosina Vb está envolvida com reciclagem de receptores da membrana plasmática, e mutações nesse gene estão associadas com a doença de inclusão de microvilosidades (Knowles *et al.*, 2014) e a miosina Vc está associada ao tráfego de grânulos de secreção, sobretudo em glândulas exócrinas (Rodriguez; Cheney, 2002).

A miosina Va (**FIGURA 1**) desempenha importantes funções na célula, como reciclagem de receptores de membrana e exocitose (Woolner; Bement, 2009), transporte de vesículas (Langford, 2002), ancoragem e transporte de proteínas e mRNAs (McCaffrey; Lindsay, 2012). A miosina Va é mais expressa em linhagens celulares de cânceres altamente metastáticos e está envolvida na migração celular de células tumorais (Lan *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2013). O silenciamento da miosina Va prejudica o espalhamento das células, propriedade que é dependente das adesões focais (FAs), a migração e a invasão celular, bem como o crescimento independente de ancoragem (Alves *et al.*, 2013). A miosina Va também pode ter uma interação indireta com microtúbulos atuando no transporte de melanossomos (Wu *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 1996; Bizário *et al.*, 2002), e servir como um suporte para a cinesina, permitindo à última percorrer uma distância maior sobre os microtúbulos (Ali *et al.*, 2008).

A rede de conexão entre miosina Va e a actina representa um modelo conservado, o qual medeia o transporte de curta distância de organelas (Evans et al., 2014). Mutações na MVa em humanos levam a defeitos como síndrome de Griscelli (Menasche et al., 2003), uma doença caracterizada por defeitos na pigmentação e sintomas neurológicos graves (Meschede et al., 2008). Os defeitos na pigmentação são devidos aos problemas com o tráfego de melanossomos, o qual necessita de MVa. Os melanócitos deficientes em miosina-Va apresentam agregação dos melanossomos na região perinuclear (Mercer et al., 1991; Nascimento et al., 1996; Wu et al., 1997). A razão para isso, é que os melanossomos, os quais são transportados a longa distância por cinesinas, sobre microtúbulos, falham em ficar ancorados na periferia celular e retornam para a região do centrossomo carregados por dineína (Wu et al., 1998; Bizário et al., 2002; Wu et al., 2002). Existe também uma associação da miosina-Va ao melanossomo que envolve a formação de um complexo trimérico entre Rab27a, que se ancora à membrana do melanossomo via lipídeo ligado covalentemente à molécula protéica; melanofilina, que serve como uma proteína adaptadora e a miosina-Va (Strom et al., 2002)

Figura 1: Desenho hipotético esquemático da miosina Va. ELC.: cadeia leve essencial, CaM: calmodulina, PEST: sítio específico de clivagem pela calpaína. Em verde o sítio de fosforilação reconhecido pelo anticorpo de p-miosina-Va (9E6). Os números indicados no esquema correspondem ao aminoácido onde começa cada domínio. (Adaptado de Borges, 2012).

1.3 Migração e Adesão

A migração celular é um processo fundamental para a sobrevivência e proliferação celular, tem como principais objetivos a organização tecidual, organogênese e homeostase (Ridley et al., 2003). Na migração ocorre uma intensa reorganização do citoesqueleto de actina, e também um rearranjo das adesões focais a modo de dar tração à célula e também permitir que ela saia do lugar (Vicente-Manzanares et al., 2005). O ciclo de endocitose e exocitose das integrinas auxilia na regulação da adesão celular, migração e a manutenção da polaridade. As adesões focais aderem a célula à matriz extracelular e são constituídas por aglomerados de integrina associadas com grandes complexos de sinalização (BurrIDGE et al., 1996). Para que a célula possa migrar, essas adesões precisam ser desmontadas na parte traseira e novas adesões montadas na parte dianteira da célula migratória (Alahari; Reddig; Juliano, 2002). A endocitose e exocitose da integrina ocorrem na parte dianteira e traseira da célula e a endocitose pode ocorrer através de mecanismos endocíticos dependentes e não dependentes de clatrina (Caswell; Vadrevuand; Norman, 2009), ou dependentes de caveolina (Shi; Sottile, 2008). No entanto, o mecanismo de internalização das integrinas ocorre dependendo do tipo e contexto celular (Onodera; Nam; Sabe, 2013). Onde a endocitose de integrina $\alpha 5 \beta 1$ em fibroblasto é dependente de clatrina e microtúbulos (Ezratty et al., 2009), e em miofibroblastos ela é dependente de caveolina (Shi; Sottile, 2008).

As adesões focais (AFs) são cruciais para a migração celular e são formadas por agrupamentos de proteínas em sítios onde o citoesqueleto de actina está conectado à matriz extracelular (MEC). Esta ligação ocorre através de integrinas transmembrânicas e proteínas associadas como FAK (quinase de adesão focal), talina, vinculina, paxilina e zixina (Webb; Parsons; Horwitz 2002).

As integrinas são glicoproteínas transmembrana, heterodiméricas, compostas por subunidades α e β associadas não-covalentemente, tendo sua porção extracelular ligando-se às proteínas da matriz extracelular e sua porção intracelular conectando-se a filamentos de actina (Shin; Wolgamott; Yoon, 2012). Esses heterodímeros altamente expressos na superfície celular participam de vários processos biológicos, tais como organização tecidual, crescimento, diferenciação, apoptose e estão envolvidas em processos como inflamação e câncer (Brakebusch et al., 1997).

Além disso, as integrinas participam da sinalização celular *inside-out* e *outside-in*, transmitindo sinais mecânicos e químicos fundamentais para a sobrevivência e proliferação

celular, remodelamento e migração celular (Guo; Giancotti, 2004). Um dos mecanismos utilizados pela célula para a manutenção do bom funcionamento das integrinas é a endocitose. O ambiente ácido dos endossomos primários desligaria a integrina de fragmentos ligados a ela, garantindo assim que os heterodímeros endocitados possam se ligar novamente à matriz quando reciclados à membrana plasmática (Caswell; Norman, 2006).

As Rabs, “Ras-associated binding”, são membros da família Ras de pequenas GTPases e participam do transporte regulado de vesículas para a superfície celular, a partir do trans-Golgi ou a partir de endossomos de reciclagem. As vias de reciclagem de integrinas mais estudadas apoiam-se nas famílias de Rab GTPases, Rab4, Rab11A e Rab25 (Mitra et al., 2012; Cheng et al., 2014; Amornphimoltham et al., 2013). A reciclagem rápida (*short-loop*) via Rab4, estimulada por fatores de crescimento como o PDGF, carrega entre outras moléculas a integrina $\alpha v \beta 3$. Ela é dependente da atividade da proteína quinase D1 (PKD1) e inibe a reciclagem longa (*long-loop*) via Rab11 que transporta a integrina $\alpha 5 \beta 1$ (White, Caswell; Norman, 2007).

A miosina V também está presente em todos os passos do transporte de vesículas intracelulares (Jin et al., 2001), e a miosina Va se liga a várias Rabs GTPases e juntas auxiliam em muitos processos de tráfego intracelular. As Rabs também recrutam miosinas Va para melanossomos (como mencionado anteriormente), endossomos e outras organelas celulares (Seabra; Coudrier, 2004). Ela possui 3 domínios de ligação com as Rabs e existem vários graus de co-localização entre a miosina Va e Rabs dentro de células de mamíferos, como por exemplo, nas células de neuroblastoma humano (Lindsay et al., 2013).

Células tumorais e células associadas a tumores em sua grande maioria apresentam expressão alterada de receptores celulares como as integrinas, e isso auxilia em uma variedade de efeitos celulares que resultam em progressão tumoral e metástase (Onodera; Nam; Sabe 2013). Uma grande variedade de integrinas contribui para a progressão tumoral, e como muitos tumores sólidos se originam de células epiteliais, as integrinas expressas pelas células epiteliais são geralmente mantidas no tumor, embora os níveis de expressão possam ser alterados (Desgrosellier e Cheresch, 2010).

A desmontagem das AFs dependente de clatrina se dá por endocitose das integrinas, após o recrutamento de dinamina para as AFs (Chao e Kunz, 2009). A via dependente de clatrina ocorre quando a integrina na membrana se liga a Numb, um adaptador de carga específico da endocitose. Numb possui um domínio de ligação à fosfotirosina, o qual se liga diretamente as subunidades $\beta 1$ das integrinas e epsina-15, uma proteína integral de membrana, ubiquitinada, envolvida em criar curvatura da membrana. A clatrina, por sua vez, se liga ao

adaptador AP-2, o qual se liga tanto à epsina-15 quanto à clatrina (Caswell e Norman 2008). Esse complexo juntamente com a dinamina fazem a endocitose dependente de clatrina (**FIGURA 2**).

Muitos estímulos extracelulares como o fator de crescimento epidérmico (EGF) podem induzir a endocitose de integrinas (Ning et al., 2007). Após serem internalizadas para os endossomos primários, as integrinas podem ser direcionadas para a reciclagem ou para a degradação. Essa reciclagem pode ser parte da chamada ‘alça-longa’ (*long-loop*), via Rab11 a partir do compartimento de reciclagem perinuclear ou ‘alça-curta’ (*short-loop*), diretamente dos endossomos primários para a membrana plasmática, via Rab4 (Roberts et al., 2001).

Figura 2: Endocitose dependente de clatrina. Numb possui um domínio de ligação à fosfotirosina o qual se liga diretamente as subunidades $\beta 1$ das integrinas. A clatrina se liga a um adaptador, o AP-2 o qual se liga tanto à epsina-15 quanto à clatrina, e a epsina-15 se liga a Numb. Modificado de Caswell e Norman 2008.

1.4 FAK e Dinamina

A FAK (*Focal Adhesion Kinase*) é composta por regiões ricas em prolina e um domínio FAT na região C-terminal, um domínio quinase central, e possui na região N-terminal um domínio FERM (Mitra et al., 2005) (**FIGURA 3**). O domínio FERM leva e organiza proteínas na membrana células, e é um importante regulador da atividade de FAK (Baines et al., 2014). Esse domínio da FAK pode se ligar à região citoplasmática da integrina B1 (Schaller et al., 1995), constituindo um sítio de sinalização intracelular. O domínio FERM da FAK facilita a sinalização do receptor tirosina-quinases, tais como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) (Frame et al., 2010).

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 3: Estrutura e sítios de fosforilação da FAK. Em azul o domínio FEM onde se ligam os receptores de fator de crescimento, como PDGFR e EGFR. Em marrom o domínio quinase onde ocorre a fosforilação na tirosina 397, essencial para a ativação da quinase. E em roxo o domínio FAT, onde ocorre a interação com talina e paxilina (Mitra et al., 2005).

Um domínio de ligação, o qual contém o principal sítio de fosforilação na tirosina 397 conecta os domínios FERM e quinase central, a fosforilação da tirosina 397 é uma auto-fosforilação que gera o motivo reconhecido por Src e PI3K (Parsons, 2003). A principal função do domínio FAT é o direcionamento da FAK para o complexo de adesão focal, e mutações

nesse domínio podem levar a uma perda desse direcionamento ou a uma deficiência na interação com paxilina (Prutzman et al., 2004).

A internalização das integrinas para dissociação dos contatos focais requer a presença de FAK. Ambas podem ser recicladas de volta para a membrana para a formação de novas adesões focais (Ezratty et al., 2005). Muitas evidências sugerem FAK como uma molécula chave nos processos de tumorigênese e progressão tumoral, por promover a sobrevivência, proliferação, migração e invasão das células tumorais. A FAK também regula a migração celular por modular a formação e desacoplamento do citoesqueleto de actina, através de seus efeitos na subfamília de RhoGTPases (Zhao; Guan, 2009).

A Dinamina (Dyn) é uma GTPase essencial para a fissão da membrana, cuja ação completa a atividade de endocitose mediada por clatrina (Ferguson; De Camilli, 2012). Existem três parálogos de dinaminas expressas em mamíferos, Dyn1, Dyn2 e Dyn3 (Ferguson et al., 2009), as quais são expressas diferencialmente em diferentes tecidos, sendo a Dyn2 responsável pela correta endocitose de integrinas $\beta 1$ em células endoteliais (Lee et al., 2014). Dyn2, juntamente com a FAK, também é necessária para a desmontagem das adesões focais (Ezratty et al., 2005).

A Dyn2 é recrutada para a adesão focal pela FAK e ali fosforilada pela quinase Src, sendo esse complexo Dyn2-FAK-Src essencial para o turnover das AFs, e mutantes da Dyn são incapazes de realizar a formação desse complexo e a desmontagem das AFs (Wang et al., 2011).

1.5 Contexto

O conhecimento dos processos celulares é de grande relevância para entendermos melhor como a célula funciona e, assim, podermos gerar novos meios de combate a doenças, como por exemplo o câncer. A possível função da miosina Va na dinâmica das AFs foi inicialmente proposta por Nader (2008) em sua dissertação de mestrado. Ele mostra que a miosina Va se liga, fisicamente, à FAK e é requerida para o transporte desta quinase para os filopódios. Mostra ainda que fibroblasto humanos derivados de paciente com Síndrome de Griscelli-tipo 1 (nulos para miosina-Va) apresentam uma taxa de migração menor que fibroblastos de um doador sadio. Posteriormente, o envolvimento da miosina Va na dinâmica

das AFs foi reforçado no trabalho de doutorado de Ramão (2014), que mostra que a miosina Va é requerida para a desmontagem das AFs induzida por microtúbulos e seu silenciamento reduz a migração celular. Essa possível função é uma possibilidade atraente para preencher uma lacuna quanto aos detalhes dinâmicos da formação e dissociação das AFs. Deste modo, o entendimento do possível mecanismo envolvendo a miosina Va e componentes da adesão focal é de grande relevância no campo da biologia celular.

No presente trabalho, utilizamos fibroblastos murinos NIH3T3 por serem células modelo no estudo de migração e adesão. Formam adesões bem visíveis ao microscópio. No estado de quiescência perdem suas adesões e fibras de estresse, as quais se restabelecem rapidamente após estímulo por soro fetal bovino (SFB) ou por ácido lisofosfatídico (LPA) (Ridley; Hall, 1992). O LPA é um componente do soro que induz aumento intracelular de cálcio, ativação da via de MAP-quinase, migração e proliferação celular (Knowlden; Georas, 2013). Os fibroblastos NIH3T3 constituem também um modelo bem estabelecido para estudo da formação das AFs, em resposta a despolimerização dos microtúbulos por nocodazol, e desmontagem em resposta a repolimerização dos microtúbulos (Ezratti et al., 2005). Estudamos aqui, a localização celular da p-miosina-Va juntamente com proteínas envolvidas na dinâmica das AFs nos fibroblastos NIH3T3, em estado de quiescência e após estímulo por soro quando a formação das adesões focais é grandemente ativada.

Objetivos

---

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar o efeito do estímulo por soro sobre a fosforilação e localização da miosina-Va (pMVa-S1650) e relacionar o comportamento da proteína com o processo de formação das adesões focais em fibroblastos.

2.2 Objetivos específicos

1) Cultivar hibridoma para produção dos anticorpos monoclonais 9E6, previamente obtidos (Pranchevicius et al., 2008), e testar a especificidade dos anticorpos produzidos.

2) Estabelecer no laboratório o cultivo dos fibroblastos imortalizados NIH-3T3 e as condições para induzir quiescência e o estímulo por soro, como um modo de ativar a formação das adesões focais.

3) Analisar o efeito do estímulo por soro sobre a localização e expressão da miosina-Va total e da forma fosforilada de miosina-Va (pMVa-S1650), em fibroblastos quiescentes NIH3T3.

4) Analisar a localização da forma fosforilada de miosina-Va (pMVa-S1650) em relação aos constituintes de adesões focais, vinculina, FAK, integrina e a proteína envolvida em endocitose de integrinas, dinamina, durante a cinética de formação das adesões focais que se segue ao estímulo dos fibroblastos quiescentes por soro.

Materiais e Métodos

---

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultivo Celular

Para estudar o papel da miosina-Va em diferentes processos, foram utilizados fibroblastos murinos de origem embrionária – NIH 3T3 (gentilmente cedidos pelo Dr. Gregg Gundersen (Columbia University - NY)), cultivados em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies), pH 6,9 suplementado com 10% de soro de fetal bovino (SFB) e sem adição de antibióticos.

Para desprendimento das linhagens celulares foi utilizada solução de Tripsina-EDTA em PBS. Todas as células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.2 Ensaio de Privação de Soro

Para o ensaio de privação de soro, as células NIH3T3 foram cultivadas em laminulas até atingirem a confluência de 80% e lavadas com meio de cultivo sem soro 3-4 vezes antes de serem deixadas em cultura em meio DMEM sem soro por 48 horas, ou por tempo inferior conforme indicado em cada experimento.

3.3 Produção de anticorpos 9E6 (p-miosina-Va)

Os hibridomas foram construídos por Pranchevicius e colaboradores (2008). As células foram descongeladas e cultivadas em DMEM 10%. Após adesão na placa de cultura e atingirem uma confluência de 80%, o meio foi trocado por DMEM 10% fresco e deixado por 4 dias, e então o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. Os anticorpos coletados foram usados para *western blot* na concentração 1:1 em TBS/T, e para imunofluorescência na concentração de 1:50 em TBT/T-BSA 2%.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Para verificação das amostras protéicas a eletroforese foi realizada usando o sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmli e Favre (1973), em mini-géis (10x9x0,05cm) constituídos de um gel de empilhamento (5%) e um de separação de 8% a 12% de acordo com a massa molecular da proteína em questão. O padrão de peso molecular utilizado foi DualXtra (BioRad).

Todas as amostras, antes de serem aplicadas em SDS-PAGE, foram solubilizadas em tampão de amostra 2X e fervidas por 5 minutos. Cada amostra foi aplicada nos volumes e 20uL. Para a corrida da eletroforese foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25mM; glicina 187mM e SDS 0,1%), com amperagem inicial de 15mA, passando-se para 20mA após a entrada das amostras no gel de separação. Em seguida, foram imediatamente submetidos à transferência para membranas de nitrocelulose (BioRad) após o término da corrida.

3.5 Imunodeteção de Proteínas (*Western Blot*)

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram eletrotransferidas a 35V overnight a 4°C para uma membrana de nitrocelulose (BioRad), utilizando-se o tampão de transferência [Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; etanol 18.5% e SDS 0,1%]. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau 0,5% em ácido tricloroacético (TCA) 0,3% por 10 minutos, sob agitação. A seguir foi lavada com água para remover o excesso de corante e possibilitar a visualização das amostras e eficiência da transferência.

Antes da imunomarcção, os sítios inespecíficos foram neutralizados com solução de bloqueio (5% de leite desnatado em pó ou soro albumina bovina em TBS/T [Tris HCl 50mM pH8,0; NaCl 150mM, e Tween-20 0,05% (V/V)] sob agitação contínua por 1h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3x em TBS/T, sob agitação contínua à temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo primário de interesse diluído em TBS/T por 1h sob agitação.

A membrana foi novamente lavada, 4x por 5 minutos em TBS/T, sob agitação contínua à temperatura ambiente para retirar o anticorpo primário não ligado. Foi acrescentado então o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído em TBS/T e a membrana, mais uma vez, incubada por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Para a retirada do anticorpo secundário não ligado, a membrana foi lavada 4x por 5 minutos em TBS/T, sob agitação contínua à temperatura ambiente.

A membrana foi banhada com soluções caseiras ECL (Enhanced chemiluminescence), solução I [0,11M Tris/HCL pH 8,5; 2,78mM Luminol (3-aminophthalhydrazide – Sigma); 0,44mM ácido p-cumárico (Sigma); 98,4% H₂O] e solução II [0,02% H₂O₂; 0,1M Tris/HCL pH 8,5; 89,9% H₂O] na proporção de de 1:1 por 1 minuto. E exposta para captação de imagens utilizando câmera CCD do equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Foram adquiridas imagens a cada 30 segundos e o tempo total de exposição variou de acordo com a amostra em questão.

3.6 Ensaio de estímulo por soro após quiescência

Para este ensaio, utilizamos fibroblastos murinos NIH 3T3. Após 24h do plaqueamento (aproximadamente confluentes – 100%) as células foram privadas de soro por 48h. Então, foi dado o estímulo com DMEM 10% de soro. As células foram lisadas para *western blot*, ou fixadas com paraformaldeído 4% em temperatura ambiente por 10 minutos e preparadas para imunomarcação. Os tempos de estímulo com soro foram de 0 (sem estímulo), 5, 15, 30 e 120 minutos.

3.7 Anticorpos primários e secundários utilizados neste trabalho

- 9E6 (anti p-miosina-Va), (Pranchevicius, 2008), utilizado na diluição 1:50;
- Cauda Medial (anti miosina Va total), (Bizário et al., 2002), utilizado na diluição 1:100;
- pFAK (Invitrogen #44624G), utilizado na diluição 1:100;
- Vinculina (Sigma #V4139), utilizado na diluição 1:100;

- Dyn2 (abcam #ab3457), utilizado na diluição 1:100;
- Integrina $\beta 1$ (abcam #95623), utilizado na diluição 1:100;
- γ -tubulina (Sigma #T6557), utilizado na diluição 1:10.000;
- Ki67 (abcam #ab6526), utilizado na diluição de 1:200;
- Anticorpo donkey anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:300;
- Anticorpo donkey anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 594 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:300;
- Anticorpo donkey anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:300;
- Anticorpo donkey anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 594 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:300;
- Anticorpo donkey anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 633 (Life Technologies #A21070), utilizado na diluição 1:300;
- Marcador nuclear DAPI (Dihidrocloreto de 4',6 diamino-2-fenilindol – Molecular Probes), utilizado na concentração de 2 μ g/mL;
- Texas Red-Faloidina (Molecular Probes), utilizado na concentração de 1:100;
- Anticorpo policlonal de cabra anti IgG de camundongo conjugado a HRP (Horse Radish Peroxidase, Promega), utilizado na diluição de 1:2.000;
- Anticorpo policlonal de cabra anti IgG de coelho conjugado a HRP (Horse Radish Peroxidase, Promega), utilizado na diluição de 1:10.000;

3.8 Imunomarcção de fluorescência

Para este ensaio, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma), por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,3% por 10 minutos à temperatura ambiente e então submetidas a três lavagens de 5 minutos em PBS 1X. Os aldeídos livres formados no processo de fixação com paraformaldeído

foram bloqueados com Glicina 250 mM em PBS, por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com PBS 1X.

Os sítios inespecíficos foram então bloqueados com BSA 2% em PBS 1X durante 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram incubadas por 1h a temperatura ambiente com o anticorpo primário devidamente diluído em solução de bloqueio e previamente centrifugado a 10.000xg por 1h a 4°C. As lamínulas foram então novamente submetidas a 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com radical fluorescente, diluído em solução de bloqueio.

Terminada a incubação, as células foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com PBS 1X. Procedeu-se com a montagem das lamínulas sobre lâminas com a solução de montagem Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences) e selagem com esmalte cosmético. As lâminas foram observadas e documentadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifoton (LMMM) com microscópio confocal AxionObserver (Zeiss, Jena, Germany).

3.9 Quantificação da fluorescência das adesões focais

As regiões de interesse (ROIs), AFs, foram demarcadas utilizando o canal de pFAK, e as mesmas (ROI) foram quantificadas em ambos os canais (pFAK e p-miosina-Va). Dessa maneira foram selecionadas 400 AF e a fluorescência nessas 400 ROIs foram quantificadas pela fórmula: **CTCF: Densidade integrada – (Área da adesão selecionada X A média de fluorescência de *background*)**. Onde a densidade integrada é a quantidade de fluorescência e foi medida utilizando o programa Image J. As quantificações das 400 adesões em ambos os canais foram cruzadas e analisadas pelo programa GraphPad Prism 6.

Resultados

---

4. Resultados

4.1 Produção e especificidades do anticorpo 9E6

O anticorpo 9E6 utilizado neste trabalho reconhece o domínio contendo a S1650 fosforilada, localizada na cauda globular da miosina Va. Os hibridomas foram produzidos por Pranchevicius e colaboradores (2008), e armazenados em nitrogênio líquido. Para a nova produção de anticorpos, os hibridomas foram descongelados, colocados em cultura até atingirem uma confluência de 80%. O meio então foi renovado, e após 4 dias em cultura, o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C . A especificidade do anticorpo 9E6 foi testada por *western blot* (**FIGURA 4**), utilizando a linhagem celular B16-F10 como controle, pois tem o gene selvagem para miosina Va, e a linhagem S91-6, a qual é mutante para miosina Va e produz uma forma truncada do mRNA, devido a um defeito no splicing do RNA. Esses anticorpos reconhecem fortemente a miosina Va em células de melanoma B16 e mostraram-se específicos, dada a ausência de marcação de um polipeptídeo de mesma massa molecular correspondente em lisado total de células S91. Algumas bandas fracamente marcadas, abaixo de 200 kDa, devem corresponder a produtos de degradação e forma truncada (nas células S91), e acima de 200 kDa, a miosina Va que tende a agregar.

Figura 4: Teste de especificidade do anticorpo 9E6. *Western blot* realizado com o sobrenadante coletado em diferentes datas (26/05/14 e 01/08/14). O sobrenadante foi coletado dos hibridomas e congelado, para uso o anticorpo foi completamente descongelado e colocado sobre a membrana 1:1 com TBT-T. Como controle positivo foi utilizado a linhagem B16, e controle negativo a linhagem S91-6. A miosina Va tem um peso molecular aproximado de 190 kDa.

4.2 Análise de quiescência e formação das adesões focais

Para estabelecimento das condições de quiescência e ativação da formação das AFs após estímulo por soro, analisamos culturas de células privadas de soro por 24 e 48 horas, quanto ao estado de quiescência e à presença de adesões focais. Para isto, utilizamos anticorpos para Ki67, uma proteína predominantemente nuclear que marca exclusivamente células engajadas no ciclo de divisão celular, e anticorpos para vinculina, constituinte de adesões focais. Ki67 é um reconhecido marcador de células em proliferação, e a ausência de marcação nuclear indica que a célula parou de ciclar, pois essa proteína não está presente em células na fase G₀ (Koda et al., 2004).

Os resultados obtidos mostram que 24h de privação de soro já é suficiente para a perda das adesões focais, embora as células ainda não estejam quiescentes, o que se pode inferir pela presença nuclear de Ki67, mesmo antes do estímulo por soro (**FIGURA 5A**). Após 48h sob privação de soro, as células são negativas para a marcação de Ki67 nuclear, indicando que já saíram do ciclo celular e estão quiescentes (**FIGURA 5B**). Podemos observar aqui que as células não precisam estar em plena quiescência para perder as adesões focais, isso ocorre mesmo em apenas 24h de privação de soro, indicando a necessidade de algum componente do soro para a manutenção das adesões focais, as quais aparentemente são desmontadas e deixam de ser formadas na ausência de soro (**FIGURA 5**).

Podemos observar também que as células privadas de soro por apenas 24h (**FIGURA 5A**), que ainda não estão quiescentes, tem um rápido aumento de Ki67 nuclear após o estímulo por soro, indicando uma possível progressão no ciclo celular. Enquanto as células privadas de soro por 48h e quiescentes levam em torno de 30 minutos para saírem do estado de quiescência, e apresentarem marcação nuclear de Ki67 (**FIGURA 5B**).

Figura 5: Ausência de soro induz perda das AFs mesmo antes da quiescência: As células (NIH 3T3) foram privadas de soro por 24h ou 48h e então, estimuladas com DMEM 10%, fixadas com paraformol 4% e marcadas com Ki67, vinculina e DAPI. **A)** Células privadas de soro por 24h, e mesmo antes de entrarem em quiescência as células já perdem as adesões focais. A marcação Ki67 positiva no núcleo indica que a célula não está em G₀. **B)** Células privadas de soro por 48h estão quiescentes e começam a sair de G₀ após 15 minutos de estímulo. Imagens obtidas com microscópio confocal AxionObserver (Zeiss, Jena, Germany). Objetiva 63x de imersão a óleo. Imagens ajustadas com ImageJ. Barra de escala: 10μm.

Para verificar a presença de fibras de estresse e AFs nas células quiescentes, e a formação de ambas após estímulo por soro, utilizamos um experimento bem descrito na literatura (Chrzanowska-Wodnicka; Burridge, 1994; Ridley; Hall, 1992), de estímulo com soro fetal bovino em células quiescentes. Após atingirem uma confluência de 80% as células foram privadas de soro por 48h e então foi dado o estímulo com soro. Observamos que as células quiescentes não possuem AFs e nem fibras de estresse (**FIGURA 6**), corroborando com os dados da literatura (Ridley; Hall, 1992).

Também como já demonstrado na literatura, as fibras de estresse e as AFs se formam rapidamente após o estímulo, mas também podemos perceber que os contatos focais aumentam de tamanho e número ao passar do tempo, se tornando expressivamente maiores passados 120 minutos de estímulo (**FIGURA 6**). Com esse experimento é possível analisar a formação das adesões focais, e apesar de ser bastante estudada, ainda não se há certeza da participação da miosina-Va nesse processo. Assim, podemos acompanhar a formação das AFs, a localização intracelular dos componentes das adesões e da miosina-Va.

Observamos também mostra que as adesões focais se estabelecem nas extremidades das fibras de estresse, além de ser possível observar a presença nuclear da vinculina, como já mostrado por Chrzanowska-Wodnicka e Burridge (1994).

Figura 6: Estímulo por soro induz intensa polimerização de actina, reorganização do citoesqueleto e montagem das AF: NIH3T3 quiescentes foram estimuladas com DMEM 10% (soro fetal bovino) por 120 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% em diferentes tempos. Tempo 0' (células quiescentes, privadas de soro por 48h), e tempos 5', 15', 30' e 120' (minutos de estímulo). Anticorpos utilizados foram vinculina e a faloidina (F-actina). Imagens obtidas com microscópio confocal AxionObserver (Zeiss, Jena, Germany). Objetiva 63x de imersão a óleo. Imagens ajustadas com ImageJ. Barra de escala: 10µm.

4.3 Efeitos do estímulo por soro sobre a localização e fosforilação de MVa

Para testar a hipótese do envolvimento da MVa na dinâmica das adesões focais, nós analisamos a localização e distribuição celular da pMVa em co-marcação com vinculina, pFAK, integrina $\beta 1$ e Dyn2 no processo de formação das adesões focais em fibroblastos murinos (NIH 3T3) quiescentes e estimulados por soro.

Primeiramente analisamos a localização e distribuição celular da MVa em co-marcação com vinculina (**FIGURA 7**), onde é possível perceber que a p-miosina-Va se espalha pelo citoplasma após estímulo por soro.

Após analisar os resultados das imunofluorescências percebemos um aumento da fluorescência da pMVa após o estímulo por soro, o qual aumenta gradativamente até 15 minutos após o estímulo, decaindo após 30 minutos (**FIGURA 8A**). O tempo 120 minutos é variável e tem intensidades diferentes de fluorescência em experimentos diferentes, e isso pode se dar por diferenças nas necessidades das células pela pMVa, onde células em migração e com tráfego de vesículas aumentado devem ter mais pMVa, uma vez que após 120 minutos a célula parece ter retomado sua atividade normal. Para nos certificarmos desse resultado, realizamos *western blot* das células quiescentes e das células após o estímulo, o qual corrobora com a imunofluorescências. Sendo que, o estímulo por soro não causa alteração na quantidade total de miosina-Va em nenhum dos tempos analisados em relação à condição de quiescência (**FIGURA 8B e D**), mas induz, após 5 e 15 minutos, um aumento apreciável de p-miosina-Va, que sofre queda e variações nos tempos posteriores (**FIGURA 8B e C**).

Figura 7: Localização subcelular de p-miosina-Va e vinculina após estímulo por soro: NIH3T3 quiescentes, privadas de soro por 48h, e então estimuladas com DMEM 10%, fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas para p-miosina-Va (9E6) e vinculina. Imagens obtidas com microscópio confocal AxionObserver (Zeiss, Jena, Germany). Objetiva x63 de imersão a óleo. Imagens ajustadas com ImageJ e o experimento repetido 3 vezes. Barra de escala: 10um.

Figura 8: Quantificação de marcação para pMVa por imunofluorescência e Western Blot: **A)** Quantificação da fluorescência em células NIH3T3, através do ImageJ, da p-miosina-Va ao passar do tempo, na quiescência (0') e a passados 5', 15', 30' e 120' minutos após o estímulo (n = 10 células). **B)** Western blot de células (NIH3T3) quiescentes e estimuladas por soro nos tempos indicados (MVa = Cauda Medial; pMVa = 9E6; Tub = γ -tubulina). E western blot mostrando a eficiência do anticorpo 9E6 (pMVa). Células B16 como controle para miosina Va, e células S91-6, as quais não possuem miosina Va. **C)** Quantificação do western blot de p-miosina-Va, feita pelo ImageJ. **D)** Quantificação do western blot de miosina Va total, feita pelo programa ImageJ.

4.4 Efeitos do estímulo por soro na localização de pMVa e proteínas de adesão focal

Em seguida fomos testar a nossa hipótese da MVa carregar a FAK e/ou a Dyn2, a modo de ter um papel na formação ou na desmontagem das AFs. Para isso repetimos o experimento de estímulo de soro após quiescência co-marcando p-miosina-Va e FAK (**FIGURA 9**). Observamos nesse experimento, como também no primeiro, a presença da p-miosina-Va nas adesões focais marcadas por pFAK. Essa presença se dá principalmente em 5 e 120 minutos após estímulo, sendo menos perceptível nos tempos intermediários.

Uma vez que a falta da MVa em fibroblastos prejudica a migração celular (Lan et al., 2009), a presença da MVa nas adesões focais corrobora com a nossa hipótese de um papel da MVa na dinâmica das adesões. Inferindo assim uma participação da MVa na formação das adesões, e sua presença tardia (120 minutos) nos leva a considerar que ela pode estar envolvida no turnover ou desmontagem das AFs.

O comportamento da pFAK é muito parecido com o da vinculina, aparecendo nas adesões logo após o estímulo por soro, e aumentando em número e tamanho ao passar do tempo (**FIGURA 11**). Tanto a pFAK quando a p-miosina-Va estão espalhadas pelo citoplasma, mas ambas só parecem co-localizar nas AFs.

Figura 9: Estímulo por soro induz a localização da pMVA nas AF: NIH3T3 quiescentes, sem soro por 48h, e então estimuladas com DMEM 10%, fixadas com paraformol 4% e marcadas para p-miosina-Va (9E6), pFAK (Y397) e DAPI. Imagens obtidas com microscópio confocal AxionObserver (Zeiss, Jena, Germany). Objetiva 63x de imersão a óleo. Imagens ajustadas com ImageJ e o experimento repetido 3 vezes. Barra de escala: 10µm.

Para avaliar a real presença da pMVa nas adesões, nós quantificamos a fluorescência de pFAK e p-miosina-Va nos contatos focais. Essa quantificação nos mostrou uma correlação positiva entre as duas proteínas em todos os tempos, mas apenas teve um valor significativo no tempo 5', sendo que quanto maior a fluorescência de pFAK na adesão maior também a fluorescência da pMVa (**FIGURA 10**), mostrada pela reta de regreção linear. O valor de p sendo $>0,01$ em todos os tempos, apenas indica a diferença de fluorescência entre as duas proteínas na área quantificada, enquanto o valor de r (correlação de Pearson) mostra a real correlação entre as duas fluorescências, onde há uma maior correlação entre pFAK e pMVa no tempo 5'.

Figura 10: Correlação entre pMVa e pFAK nas adesões focais: Análise da fluorescência de p-miosina-Va e pFAK nas adesões focais ao passar do tempo. Barras verticais indicam a fluorescência da miosina, e barras horizontais da FAK. A correlação linear, feita pelo Graphpad Prism 6, indica uma correlação (valor de r, correlação de Pearson) positiva entre ambas as fluorescências. A análise de regressão linear é indicada pela barra preta no gráfico. Valor de $p > 0,01$ em todos os gráficos. Foram quantificadas 400 adesões focais, em 20-30 células. **A)** 5 minutos de estímulo com soro. **B)** 15 minutos de estímulo com soro. **C)** 30 minutos de estímulo com soro. **D)** 120 minutos de estímulo com soro.

Como falamos anteriormente, a FAK internaliza sinais e é descrita na literatura interagindo com integrinas, sendo a sinalização da via integrina $\beta 1$ /FAK/ERK essencial para sobrevivência celular. A deficiência de FAK ou MVa acarreta em prejuízo na migração celular (Lan et al., 2009), portanto decidimos analisar um possível papel da MVa na localização e distribuição celular da integrina $\beta 1$. Para isso co-marcamos pMVa e $\beta 1$ após estímulo com soro.

Com esse ensaio podemos observar que nas células quiescentes ainda há pontos de acúmulos da $\beta 1$ na região central e nas bordas da célula onde muitos deles também parecem ter a presença da pMVa (**FIGURA 11**). Esses pontos se espalham após o estímulo e aumentam em tamanho da mesma maneira que as adesões marcadas por vinculina e pFAK (**FIGURA 7 e FIGURA 9**).

Figura 11: Localização da pMVa e integrina $\beta 1$ após estímulo por soro: NIH3T3 quiescentes, sem soro por 48h, e então estimuladas com DMEM 10%, fixadas com paraformol 4% e marcadas para p-miosina-Va (9E6), integrina $\beta 1$ e DAPI. Imagens obtidas com microscópio confocal AxionObserver (Zeiss, Jena, Germany). Objetiva 63x de imersão a óleo. Imagens ajustadas com ImageJ e o experimento repetido 2 vezes. Barra de escala: 10 μ m.

O próximo passo foi investigar a localização e distribuição celular da DYN2 e uma possível distribuição coincidente com a da MVa. Para isso, co-marcamos pMVa e DYN2 após estímulo com soro. Esse resultado nos mostrou uma grande co-localização entre DYN2 e pMVa na região perinuclear após 5 minutos de estímulo (**FIGURA 12**). Essa alta co-localização não é visível na co-marcação de pMVa e pFAK, ela também não aparece nas células quiescentes (tempo 0') onde é possível observar em algumas células, a presença de um acúmulo de DYN2 que podem ser vesículas carregadas por essa proteína, mas ainda precisa ser melhor investigado.

Após esse acúmulo de ambas as proteínas na região perinuclear 5 minutos após o estímulo, há uma redução das proteínas nessa região ao passar do tempo, e um retorno após 120 minutos indicando assim que a célula pode estar sofrendo um processo cíclico. Onde após uma rápida fosforilação da MVa e formação das adesões que se dá em aproximadamente 15 minutos, há uma queda de fosforilação e aparentemente uma diminuição de ambas as proteínas na região perinuclear, ambas as quais retornam em algumas células após 120 minutos.

Figura 12: Localização da pMVa e dinamina 2 após estímulo por soro: NIH3T3 quiescentes, sem soro por 48h, e então estimuladas com DMEM 10%, fixadas com paraformol 4% e marcadas para p-miosina-Va (9E6), Dyn2 e DAPI. Imagens obtidas com microscópio confocal AxionObserver (Zeiss, Jena, Germany). Objetiva 63x de imersão a óleo. Imagens ajustadas com ImageJ e o experimento repetido 2 vezes. Barra de escala: 10µm.

Discussão

---

5. Discussão

A montagem e desmontagem das adesões focais é crucial para a migração celular, e entender melhor como ocorrem esses processos é fundamental para entendermos o funcionamento das células, como e quando elas migram e também o processo de invasão no câncer. Como mostramos aqui, as AFs se formam rapidamente após estímulo por soro em células quiescentes, somente 5 minutos de estímulo já é o suficiente para a presença das proteínas de adesão formarem os contatos focais. Utilizamos no nosso trabalho o anticorpo que reconhece o sítio de autofosforilação da FAK (Y397) que ocorre nas AFs dando início as vias de sinalização intracelular de migração e progressão do ciclo celular (Schlaepfer et al., 2004). Percebemos um aumento na fosforilação da MVa no mesmo tempo de alta formação de AFs, podemos inferir um papel da MVa nessa formação.

Mesmo sendo possível perceber a presença da p-miosina-Va nas adesões focais marcadas por vinculina, há uma maior co-localização nas adesões marcadas por pFAK. Na ausência de MVa, FAK ou Dyn2 a célula tem dificuldades na migração celular (Lan et al., 2010; Deramaudt et al., 2014; Kruchten; McNiven 2006). Dessa maneira, a MVa pode ter função nesse processo, sendo carregando a FAK para adesão, facilitando a formação do complexo Src-FAK-Dyn2, ou carregando a Dyn2 para dar início a desmontagem das adesões focais.

Percebemos uma maior presença da MVa nas adesões 5 minutos após o estímulo, mas também percebemos uma maior co-localização entre p-miosina-Va e Dyn2 nesse mesmo tempo, sendo que ambas as proteínas parecem estar co-localizadas na região perinuclear e se espalham pelo citoplasma ao passar do tempo. Isso pode indicar que a MVa está auxiliando no transporte de Dyn2 para a adesão focal, a modo de servir como *tethering* para a kinesina, a qual transporta a Dyn2 sobre microtúbulos. Sendo que esse suporte gerado entre MVa e kinesina, permite à última a viajar mais longe pelos microtúbulos (Ali et al., 2008). Sendo assim, a MVa pode ter também um papel no transporte de Dyn2 para as adesões.

A quantificação da fluorescência nas adesões marcadas por pFAK, mostra uma correlação positiva entre pFAK e p-miosina-Va 5 minutos após o estímulo, corroborando com a nossa hipótese de um papel da MVa na dinâmica das adesões, e sugere novamente que esse papel da MVa é na formação das adesões.

A integrina $\beta 1$ é o primeiro componente da adesão, a qual recruta a talina e posteriormente vinculina e outras proteínas de adesão (Wehrle-Haller, 2012), então é de se

esperar que se a vinculina e a FAK já estão presentes nas adesões focais em 5 minutos, a integrina $\beta 1$ também já esteja. Entretanto não é possível perceber um vínculo ou co-localização citoplasmática entre a p-miosina-Va e integrina $\beta 1$, embora as p-miosina-Va encontrem-se nas AFS marcadas por integrina $\beta 1$. Nesse experimento a MVa não parece ter uma relação com a integrina $\beta 1$, e a localização intracelular de ambas as proteínas não parece coincidir, exceto nas adesões focais do tempo 120'. Essa presença tardia provavelmente se dá pela possível interação da MVa com FAK ou Dyn2, pois com estas a MVa tem uma maior co-localização intracelular em diferentes tempos.

O componente do soro que induz a formação das adesões e das fibras de estresse após quiescência é o LPA (Ridley e Hall, 1992). Esse componente ativa as vias de MAP quinase desencadeando proliferação celular, vias de Rho levando a migração, via de TRIP-6 induzindo a formação das adesões focais. Também induzindo o aumento intracelular de cálcio (Knowlden e Georas, 2013), o que ativa a MVa (Krementsov, Krementsova e Trybus, 2004). Dessa maneira o LPA sozinho induz várias vias essenciais para sobrevivência, migração celular, e formação das adesões focais, inclusive o aumento do cálcio intracelular, o que leva a uma ativação da MVa, a qual propomos aqui por ter uma função direta sobre a dinâmica das adesões focais. Sendo assim, o provável responsável pelo aumento na fosforilação da MVa após estímulo por soro é o LPA.

Como podemos perceber pela quantificação da fluorescência de p-miosina-Va e pelo *western blot*, o estímulo por soro não causa alteração na quantidade total de miosina-Va em nenhum dos tempos analisados em relação à condição de quiescência, mas induz, após 5 e 15 minutos, um aumento apreciável de p-miosina-Va, que sofre queda e variações nos tempos posteriores. A queda após 30 minutos de estímulo pode ser dar devido a uma exaustão celular, a qual sofreu intensas transformações no citoesqueleto de actina, adesões focais, fosforilação da MVa entre outras vias. Ou por essa fosforilação ser uma característica cíclica da célula, onde ela aumenta e diminui ao passar do tempo, onde a célula teria picos de fosforilação, seguidos de picos de desfosforilação da MVa.

E após 120 minutos de estímulo, essa fosforilação da MVa varia em diferentes células e experimentos, devido a uma provável diferença no tráfego de vesículas, estágio do ciclo celular ou da migração celular. Uma vez que após 2h a célula provavelmente já deve ter voltado a migrar em resposta ao estímulo de LPA e PDGF (Childs et al., 1982).

Diferente do que pensávamos, a célula não precisa estar quiescente para perder as AFs e as fibras de estresse, e mostramos isso com a marcação de Ki67, uma proteína presente em G₁ mas não em G₀. E mesmo as células 24h na ausência de soro, e ainda não quiescentes já não possuem mais adesões focais, nem fibras de estresse. Ambas as quais são formadas após estímulo por soro. Isso pode inferir uma necessidade da presença de fatores de crescimento ou LPA para a correta manutenção das adesões focais. Se a MVa tiver um papel na formação da adesão, como pensamos, e no tempo 0 (24h ou 48h sem soro), podemos perceber uma baixa quantidade de p-miosina-Va nas células em relação aos tempos posteriores ao estímulo, a ausência de p-miosina-Va dificultaria a montagem das AFs. Da mesma maneira que a formação das AFs e fibras de estresse é acompanhada por um aumento da fosforilação da FAK, e que a inibição dessa fosforilação impede a montagem das AFs (Chrzanowska-Wodnicka; Burridge, 1994). A fosforilação da MVa também acompanha essa montagem, sugerindo novamente uma participação nesse processo.

Em conjunto, esses resultados indicam a miosina-Va como um provável candidato a participar da formação das adesões focais, embora ainda precise ser melhor investigada de qual maneira ela desempenha essa função. E para nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração de que a fosforilação da miosina-Va aumenta em resposta ao soro e estamos investigando se este evento está ligado a dinâmica das adesões focais em fibroblastos.

Conclusões

---

6. Conclusões

6.1 Soro induz a entrada no ciclo celular

O estímulo por soro induz a fosforilação da miosina Va em células quiescentes. O soro fetal bovino também induz a entrada no ciclo celular de células quiescentes, após 15-30 minutos de estímulo.

6.2 Estímulo por soro induz fosforilação da MVa em fibroblastos quiescentes

Estimular fibroblastos quiescentes com soro fetal bovino induz não causa alteração na quantidade total de miosina-Va em nenhum dos tempos analisados em relação à condição de quiescência, mas induz, após 5 e 15 minutos, um aumento apreciável de p-miosina-Va, que sofre queda e variações nos tempos posteriores.

6.3 p-miosina-Va localiza-se nas adesões focais

Após o estímulo por soro em células quiescentes há uma intensa formação das fibras de estresse e de adesões focais. Após esse estímulo, a p-miosina-Va se localiza nas AFs marcadas por pFAK e vinculin logo após o estímulo, e mais tardiamente nas AFs marcadas por integrina $\beta 1$.

6.4 Distribuição de p-miosina-Va é semelhante a distribuição celular de Dyn2

A distribuição intracelular da p-miosina-Va é semelhante a distribuição da dinamina, principalmente logo após o estímulo por soro, e essa co-localização é mais visível na região perinuclear, 5 minutos após o estímulo.

Referências Bibliográficas

---

7. Referências Bibliográficas

Alahari SK, Reddig PJ, Juliano RL. **Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors.** Int Rev Cytol. 2002;220:145-84.

Ali MY, Lu H, Bookwalter CS, Warshaw DM, Trybus KM. **Myosin V and Kinesin act as tethers to enhance each others' processivity.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(12):4691-6.

Alves CP, Moraes MH, Sousa JF, Pontes CL, Ramao A, Yokoyama S, et al. **Myosin-Va contributes to manifestation of malignant-related properties in melanoma cells.** J Invest Dermatol. 2013;133(12):2809-12.

Amornphimoltham P, Rechache K, Thompson J, Masedunskas A, Leelahavanichkul K, Patel V, et al. **Rab25 regulates invasion and metastasis in head and neck cancer.** Clin Cancer Res. 2013;19(6):1375-88.

Baines AJ, Lu HC, Bennett PM. **The Protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins.** Biochim Biophys Acta. 2014;1838(2):605-19.

Berg JS, Powell BC, Cheney RE. **A millennial myosin census.** Mol Biol Cell. 2001;12(4):780-94.

Bizario JC, Castro FA, Sousa JF, Fernandes RN, Damiao AD, Oliveira MK, et al. **Myosin-V colocalizes with MHC class II in blood mononuclear cells and is up-regulated by T-lymphocyte activation.** J Leukoc Biol. 2002;71(2):195-204.

Bloch W, Forsberg E, Lentini S, Brakebusch C, Martin K, Krell HW, et al. **Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis.** J Cell Biol. 1997;139(1):265-78.

Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. **Focal adhesions, contractility, and signaling.** Annu Rev Cell Dev Biol. 1996;12:463-518.

Caswell P, Norman J. **Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion.** Trends Cell Biol. 2008;18(6):257-63.

Caswell PT, Norman JC. **Integrin trafficking and the control of cell migration.** Traffic. 2006;7(1):14-21.

Caswell PT, Vadrevu S, Norman JC. **Integrins: masters and slaves of endocytic transport.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(12):843-53.

Chao WT, Kunz J. **Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins.** FEBS Lett. 2009;583(8):1337-43.

Cheng CY, Yang AC, Huang CC, Liu ME, Liou YJ, Wu JC, et al. **The association of RAB18 gene polymorphism (rs3765133) with cerebellar volume in healthy adults.** Cerebellum. 2014;13(5):616-22.

Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. **Serum contains a platelet-derived transforming growth factor.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(17):5312-6.

Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. **Tyrosine phosphorylation is involved in reorganization of the actin cytoskeleton in response to serum or LPA stimulation.** J Cell Sci. 1994;107 (Pt 12):3643-54.

Costa MC, Mani F, Santoro W, Jr., Espreafico EM, Larson RE. **Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity.** J Biol Chem. 1999;274(22):15811-9.

de Lanerolle P, Serebryanny L. **Nuclear actin and myosins: life without filaments.** Nat Cell Biol. 2011;13(11):1282-8.

Deramautd TB, Dujardin D, Noulet F, Martin S, Vauchelles R, Takeda K, et al. **Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes.** PLoS One. 2014;9(3):e92059.

Desgrosellier JS, Cheresch DA. **Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities.** Nat Rev Cancer. 2010;10(1):9-22.

Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, et al. **Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains.** J Cell Biol. 1992;119(6):1541-57.

Evans RD, Robinson C, Briggs DA, Tooth DJ, Ramalho JS, Cantero M, et al. **Myosin-Va and dynamic actin oppose microtubules to drive long-range organelle transport.** Curr Biol. 2014;24(15):1743-50.

Ezratty EJ, Bertaux C, Marcantonio EE, Gundersen GG. **Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells.** J Cell Biol. 2009;187(5):733-47.

Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. **Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase.** Nat Cell Biol. 2005;7(6):581-90.

Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JM. **Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma.** Histopathology. 2009;54(2):254-7.

Ferguson SM, De Camilli P. **Dynamin, a membrane-remodelling GTPase.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(2):75-88.

Ferguson SM, Raimondi A, Paradise S, Shen H, Mesaki K, Ferguson A, et al. **Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits.** Dev Cell. 2009;17(6):811-22.

Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. **The FERM domain: organizing the structure and function of FAK.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(11):802-14.

Guo W, Giancotti FG. **Integrin signalling during tumour progression.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(10):816-26.

Hartman MA, Spudich JA. **The myosin superfamily at a glance.** J Cell Sci. 2012;125(Pt 7):1627-32.

Howard J. **Molecular motors: structural adaptations to cellular functions.** Nature. 1997;389(6651):561-7.

Jin Y, Atkinson SJ, Marrs JA, Gallagher PJ. **Myosin ii light chain phosphorylation regulates membrane localization and apoptotic signaling of tumor necrosis factor receptor-1.** J Biol Chem. 2001;276(32):30342-9.

Karcher RL, Roland JT, Zappacosta F, Huddleston MJ, Annan RS, Carr SA, et al. **Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II.** Science. 2001;293(5533):1317-20.

Knowles BC, Roland JT, Krishnan M, Tyska MJ, Lapierre LA, Dickman PS, et al. **Myosin Vb uncoupling from RAB8A and RAB11A elicits microvillus inclusion disease.** J Clin Invest. 2014;124(7):2947-62.

Koda M, Sulkowski S, Kanczuga-Koda L, Surmacz E, Sulkowska M. **Expression of ERalpha, ERbeta and Ki-67 in primary tumors and lymph node metastases in breast cancer.** Oncol Rep. 2004;11(4):753-9.

Krementsov DN, Krementsova EB, Trybus KM. **Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain.** J Cell Biol. 2004;164(6):877-86.

Kruchten AE, McNiven MA. **Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion.** J Cell Sci. 2006;119(Pt 9):1683-90.

Lan L, Han H, Zuo H, Chen Z, Du Y, Zhao W, et al. **Upregulation of myosin Va by Snail is involved in cancer cell migration and metastasis.** Int J Cancer. 2010;126(1):53-64.

Langford GM. **Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport.** Traffic. 2002;3(12):859-65.

Larson RE. **Myosin-V: a class of unconventional molecular motors.** Braz J Med Biol Res. 1996;29(3):309-18.

Lee MY, Skoura A, Park EJ, Landskroner-Eiger S, Jozsef L, Luciano AK, et al. **Dynamin 2 regulation of integrin endocytosis, but not VEGF signaling, is crucial for developmental angiogenesis.** Development. 2014;141(7):1465-72.

Lindsay AJ, Jollivet F, Horgan CP, Khan AR, Raposo G, McCaffrey MW, et al. **Identification and characterization of multiple novel Rab-myosin Va interactions.** Mol Biol Cell. 2013;24(21):3420-34.

Makowska KA, Hughes RE, White KJ, Wells CM, Peckham M. **Specific Myosins Control Actin Organization, Cell Morphology, and Migration in Prostate Cancer Cells.** Cell Rep. 2015;13(10):2118-25.

McCaffrey MW, Lindsay AJ. **Roles for myosin Va in RNA transport and turnover.** Biochem Soc Trans. 2012;40(6):1416-20.

Menasche G, Ho CH, Sanal O, Feldmann J, Tezcan I, Ersoy F, et al. **Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1).** J Clin Invest. 2003;112(3):450-6.

Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA. **Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus.** Nature. 1991;349(6311):709-13.

Mermall V, Post PL, Mooseker MS. **Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction.** Science. 1998;279(5350):527-33.

Meschede IP, Santos TO, Izidoro-Toledo TC, Gurgel-Gianetti J, Espreadico EM. **Griscelli syndrome-type 2 in twin siblings: case report and update on RAB27A human mutations and gene structure.** Braz J Med Biol Res. 2008;41(10):839-48.

Mitra S, Cheng KW, Mills GB. **Rab25 in cancer: a brief update.** Biochem Soc Trans. 2012;40(6):1404-8.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. **Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(1):56-68.

Nader GPF, Ramão A, Meschede I.P, Izidoro-Toledo T.C, Franchini KG, Larson RE, Espreadico EM. **Myosin-Va mediates the positioning of FAK to cortical protrusions and promotes cell spreading and motility.** Manuscrito em preparação.

Nascimento AA, Cheney RE, Tauhata SB, Larson RE, Mooseker MS. **Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V.** J Biol Chem. 1996;271(29):17561-9.

Ning Y, Buranda T, Hudson LG. **Activated epidermal growth factor receptor induces integrin alpha2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway.** J Biol Chem. 2007;282(9):6380-7.

Onodera Y, Nam JM, Sabe H. **Intracellular trafficking of integrins in cancer cells.** Pharmacol Ther. 2013;140(1):1-9.

Parsons JT. **Focal adhesion kinase: the first ten years.** J Cell Sci. 2003;116(Pt 8):1409-16.

Pranchevicius MC, Baqui MM, Ishikawa-Ankerhold HC, Lourenco EV, Leao RM, Banzi SR, et al. **Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription.** Cell Motil Cytoskeleton. 2008;65(6):441-56.

Prutzman KC, Gao G, King ML, Iyer VV, Mueller GA, Schaller MD, et al. **The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation.** Structure. 2004;12(5):881-91.

Ramão, A, Gundersen G, Espreafico ME. **Myosin promotes focal adhesion disassembly and cell migration.** Manuscrito em preparação.

Reck-Peterson SL, Derr ND, Stuurman N. **Imaging single molecular motor motility with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM).** Cold Spring Harb Protoc. 2010;2010(3):pdb prot5399.

Ridley AJ, Hall A. **The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.** Cell. 1992;70(3):389-99.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. **Cell migration: integrating signals from front to back.** Science. 2003;302(5651):1704-9.

Roberts M, Barry S, Woods A, van der Sluijs P, Norman J. **PDGF-regulated rab4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading.** Curr Biol. 2001;11(18):1392-402.

Rodriguez OC, Cheney RE. **Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells.** J Cell Sci. 2002;115(Pt 5):991-1004.

Sakamoto T, Yildez A, Selvin PR, Sellers JR. **Step-size is determined by neck length in myosin V.** Biochemistry. 2005;44(49):16203-10.

Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. **Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains.** J Cell Biol. 1995;130(5):1181-7.

Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. **Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase.** Biochim Biophys Acta. 2004;1692(2-3):77-102.

Seabra MC, Coudrier E. **Rab GTPases and myosin motors in organelle motility.** Traffic. 2004;5(6):393-9.

Shahzad MM, Lu C, Lee JW, Stone RL, Mitra R, Mangala LS, et al. **Dual targeting of EphA2 and FAK in ovarian carcinoma.** Cancer Biol Ther. 2009;8(11):1027-34.

Shi F, Sottile J. **Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover.** J Cell Sci. 2008;121(Pt 14):2360-71.

Shin S, Wolgamott L, Yoon SO. **Regulation of endothelial cell morphogenesis by the protein kinase D (PKD)/glycogen synthase kinase 3 (GSK3)beta pathway.** Am J Physiol Cell Physiol. 2012;303(7):C743-56.

Strom M, Hume AN, Tarafder AK, Barkagianni E, Seabra MC. **A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport.** J Biol Chem. 2002;277(28):25423-30.

Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. **Cell migration at a glance.** J Cell Sci. 2005;118(Pt 21):4917-9.

olkmann N, Liu H, Hazelwood L, Kremtsova EB, Lowey S, Trybus KM, et al. **The structural basis of myosin V processive movement as revealed by electron cryomicroscopy.** Mol Cell. 2005;19(5):595-605.

Wang Y, Cao H, Chen J, McNiven MA. **A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src.** Mol Biol Cell. 2011;22(9):1529-38.

Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. **Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again.** Nat Cell Biol. 2002;4(4):E97-100.

Wehrle-Haller B. **Assembly and disassembly of cell matrix adhesions.** Curr Opin Cell Biol. 2012;24(5):569-81.

Wehrle-Haller B. **Structure and function of focal adhesions.** Curr Opin Cell Biol. 2012;24(1):116-24.

White DP, Caswell PT, Norman JC. **alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration.** J Cell Biol. 2007;177(3):515-25.

Woolner S, Bement WM. **Unconventional myosins acting unconventionally.** Trends Cell Biol. 2009;19(6):245-52.

Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA, 3rd. **Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo.** J Cell Biol. 1998;143(7):1899-918.

Wu X, Bowers B, Wei Q, Kocher B, Hammer JA, 3rd. **Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor.** J Cell Sci. 1997;110 (Pt 7):847-59.

Wu X, Wang F, Rao K, Sellers JR, Hammer JA, 3rd. **Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va.** Mol Biol Cell. 2002;13(5):1735-49.

Wu XS, Tsan GL, Hammer JA, 3rd. **Melanophilin and myosin Va track the microtubule plus end on EB1.** J Cell Biol. 2005;171(2):201-7.

Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA, Ha T, Goldman YE, Selvin PR. **Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization.** Science. 2003;300(5628):2061-5.

Zhao J, Guan JL. **Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer.** Cancer Metastasis Rev. 2009;28(1-2):35-49.