

TALITA MIGUEL MARIN

**MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DA QUINASE DE
ADESÃO FOCAL POR ESTÍMULO MECÂNICO EM
MIÓCITOS CARDÍACOS:**

importância da tirosino-fosfatase SHP-2

CAMPINAS

2006

TALITA MIGUEL MARIN

**MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DA QUINASE DE
ADESÃO FOCAL POR ESTÍMULO MECÂNICO EM
MIÓCITOS CARDÍACOS:
importância da tirosino-fosfatase SHP-2**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de
concentração Medicina Experimental*

ORIENTADOR: PROF.DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M338m Marin, Talita Miguel
Mecanismos de ativação da quinase de adesão focal por estímulo mecânico em miócitos cardíacos: importância da tirosina-fosfatase SHP-2. / Talita Miguel Marin. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Kleber Gomes Franchini
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1Miócitos cardíacos. 2. Proteína tirosina quinase. 3. Proteína tirosina fosfatase. 4. Hipertrofia ventricular esquerda. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles: Mechanisms of focal adhesion kinase activation for mechanical stimulation in cardiac myocytes: importance of tyrosine phosphatase SHP-2

Keywords:

- **Myocytes cardiac**
- **Protein tyrosine kinase**
- **Protein tyrosine phosphatase**
- **Hypertrophy, Left Ventricular**

Área de Concentração: Medicina experimental

Titulação: Mestrado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Prof^o.Dr^o.Kleber Gomes Franchini

Prof^a.Dr^a.Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Prof^a Dr^a Rosana Almada Bassani

Data da defesa: 13 - 07 - 2006

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Carla Roberta de Oliveira Carvalho

2. Prof(a). Dr(a) Rosana Almada Bassani

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13/07/2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Mário Odilon e Maria Teresa que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida e que são responsáveis pela concretização desse sonho; aos meus irmãos Daniela e Rodrigo por toda a ajuda.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio imprescindível

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, por proporcionar a oportunidade de participar de tão séria equipe de pesquisa, pela confiança depositada em meu trabalho, pela amizade e compreensão, pelo grande apoio, incentivo e inestimável ajuda profissional e intelectual, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Rodrigo Miguel Marin pela ajuda profissional e oportunidade de conhecer essa equipe de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mário Saad por permitir a utilização do espaço físico, e equipamentos de seu laboratório.

Aos técnicos Antônio Calixto, Jackeline de Lima e Thaís H. Theizen pela imensa ajuda na realização dos experimentos e pela amizade.

A secretária Márcia Story pela amizade e por toda ajuda no trabalho burocrático

A Rosana Yuri Inoue pela grande ajuda experimental no início deste trabalho

Aos especiais amigos:

Prof. Dr. Ítalo José da Cruz Rigotti por estar sempre disposto a me socorrer nos momentos mais críticos, por todo apoio e ajuda na realização deste trabalho, paciência e amizade.

Leandro Martins de Souza Bueno pela imensa e fundamental ajuda experimental e intelectual, disposição em me auxiliar em todos os momentos de necessidade, apoio e amizade.

Eloize Chiarreotto Ropelle, Luiz Arruda Rolim Filho, Silvana Aparecida Rocco, Cinira Soledade, Marcelo Mantovani, Daniela Crossara-Alberto por todo apoio, companheirismo e amizade.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório:

Wilson Nadruz Júnior pela valiosa ajuda

Ana Carolina Dekcman por toda ajuda experimental

Carolina F. M Clemente pelo grande auxílio profissional

Marcus, Cláudia, Thaís Tornatore, Carla, Michel, Ana Helena, Alisson, pela amizade e ajuda.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Médicas

Ao meu namorado Rodolfo B. Diniz pelos ensinamentos, incentivo e compreensão.

“Se você conta com alguém que tem menos qualidades que você, isso levará à sua degeneração. Se você conta com alguém com qualidades iguais às suas, você permanece onde está. Somente quando conta com alguém cujas qualidades são superiores às suas é que você atinge uma condição sublime.”
(Dalai Lama)

“O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto; a sabedoria é humilde por não saber mais.” **(William Cowper)**.

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxi</i>
ABSTRACT	<i>xxxv</i>
INTRODUÇÃO	39
OBJETIVOS	49
MATERIAL E MÉTODOS	53
RESULTADOS	67
DISCUSSÃO	87
CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

[¹²⁵ I]	isótopo de 125 iodo
μM	micromolar
10'	dez minutos
30'	trinta minutos
60'	sessenta minutos
ANF	fator natriurético atrial
Anti-FAK	anticorpo contra a FAK
Anti-pFAK	anticorpo contra a forma fosforilada da FAK
Anti-SHP-2	anticorpo contra a SHP-2
BSA	albumina de soro bovino
C	amostras controle
Ca ⁺⁺	cálcio
cDNA	DNA complementar
CO ₂	dióxido de carbono
CoAo	coarctação da aorta
DNA	ácido desoxribunucleico
dNTP	Mix de Dioxinucleotídeos (A,T,C e G)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido NNNNtetracético etileno glicol bis (2 aminoetiléter)
Erk1/2	quinase Responsiva a estímulos extracelulares (subfamília das MAPKs)

FAK	quinase de Adesão Focal (Focal Adhesion Kinase)
FC	frequência cardíaca
g	gramas
Grb2	proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GST	glutathiona S-transferase
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HEPES	Ácido (hidroxi-piperazina) etanosulfônico
IB	imunoblotting
IP	imunoprecipitado
IPTG	isopropiltiogalactosídeo
Kb	kilobases
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilo Dalton
M	molar
mA	miliampères
MAPKs	quinase ativada por mitógeno
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MHC	Cadeia pesada da miosina
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
mV	milivolts

MVRN	miócitos ventriculares de ratos neonatos
Na ₂ HPO ₄	hidrogênio fosfatato de sódio (monobásico)
NaCl	cloreto de sódio
NaF	fluoreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	diidrogênio fosfato de sódio (dibásico)
NaO ₃ V	ortovanadato de sódio
NaP	pirofosfato de sódio
°C	graus Celsius
O ₂	oxigênio
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonila
PP2	(4-Amino -5-(4 - clorofenil)-7-(t- butil) pirazolo[3,4- d]pirimidina.
PS	pressão sistólica
PTP	sítio catalítico da SHP-2
PTP-GST	sítio catalítico recombinante da SHP-2.
R	raio da câmara
RhoA	GTPase de baixo peso molecular, membro da família Ras
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	sódio dodecil- sulfato- gel de poliacrilamida

SH2	segunda homologia ao Src
SH3	terceira homologia ao Src
SHP-2	proteína tirosino- fosfatase que contém 2 domínios SH2
Src	quinases relacionadas ao oncogene do sarcoma de Roux
T	tensão
TFMS	bis(4-Trifluorometilsulfonamidofenil)- 1,4 - diisopropilbenzeno
Tris	tri(hidroximetil)- aminometano
Tyr	tirosina
Tyr397	resíduo de tirosina da FAK no domínio N-terminal
V	volts
VE	Ventrículo Esquerdo

		PÁG.
Figura 1-	Estrutura linear de uma proteína Shp.....	47
Figura 2-	Representação esquemática do aparato utilizado para estiramento mecânico em células cardíacas isoladas.....	57
Figura 3-	Exemplos de registros de pressão arterial obtidos em experimento de coarctação da aorta.....	58
Figura 4-	Representação esquemática do modelo utilizado nos experimentos <i>in vivo</i>	59
Figura 5-	Representação esquemática de um vetor de expressão plasmidial p-GEX.....	64
Figura 6-	<i>Immunoblotting (IB)</i> representativo das quantidades totais de FAK em miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e <i>Immunoblotting (IB)</i> representativo da fosforilação da FAK em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos..	70
Figura 7-	<i>Immunoblotting</i> representativo das quantidades totais de SHP-2 em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e <i>Immunoblotting (IB)</i> da associação entre FAK e SHP-2 em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos.....	71
Figura 8-	<i>Immunoblotting (IB)</i> representativo das quantidades totais de FAK em cardiomiócitos de ratos isolados e em cultura submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e <i>Immunoblotting (IB)</i> representativo da fosforilação da FAK em cardiomiócitos de ratos isolados e em cultura, controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos.....	72

Figura 9-	<i>Immunoblotting</i> representativo das quantidades totais de SHP-2 em cardiomiócitos, isolados e em cultura, de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e <i>Immunoblotting (IB)</i> da associação entre FAK e SHP-2 em cardiomiócitos, Isolados e em cultura, de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos.....	73
Figura 10-	Imagem de microscopia confocal de fluorescência de cardiomiócitos isolados de corações de ratos neonatos controle.....	74
Figura 11-	Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-FAK em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 60 minutos.....	75
Figura 12-	Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada Ao imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 60 minutos.....	76
Figura 13-	Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-FAK em cardiomiócitos isolados e em cultura controles e submetidas ao estiramento mecânico por 60 minutos.....	77
Figura 14-	Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em cardiomiócitos isolados e em cultura controles e submetidas ao estiramento mecânico por 10 e 60 minutos.....	77
Figura 15-	Foto de gel de poliacrilamida 12% de eletroforese por SDS-- Page para análise da expressão da enzima recombinante PTP-GST. <u>DH5α</u> - pGex-3T: homogenato do lisado bacteriano de <i>E. coli</i> <u>DH5α</u> não induzido (NI) e induzido (IND) contendo plasmídeo, precipitado purificado.....	78

Figura 16-	Gráfico representativo do comportamento enzimático da proteína recombinante.....	79
Figura 17-	<i>Immunoblotting</i> representativo das quantidades totais de FAK e <i>Immunoblotting</i> e gráfico representativo da desfosforilação da FAK pelo PTP-GST <i>in vitro</i> em extrato de miocárdio de ratos controle e submetidos a sobrecarga mecânica por 60 minutos.....	80
Figura 18-	Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em cardiomiócitos isolados e em cultura controles e tratados com TFMS.....	81
Figura 19-	<i>Immunoblotting</i> e gráfico representativo da fosforilação da FAK em resíduo de tirosina 397- cardiomiócitos controle e estirados por 10 e 60 minutos, tratados ou não tratados com TFMS.....	82
Figura 20-	<i>Immunoblotting (IB)</i> representativo das quantidades totais de SHP-2 em cardiomiócitos, isolados e em cultura, de ratos controle e submetidos ao tratamento com TFMS. Gráfico e <i>Immunoblotting</i> da associação entre FAK e SHP-2 em cardiomiócitos, isolados e em cultura, de ratos controle e submetidos ao tratamento com TFMS. Gráfico representativo da associação FAK/SHP-2 em cardiomiócitos isolados e em cultura controles e tratados com TFMS.....	83
Figura 21-	Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao Imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em MVRNs controles e tratados com PP2. Valores percentuais médios (n = 2).....	84
Figura 22-	Gráfico e gel da PCR da expressão gênica da cadeia pesada da β -miosina em MVRNs controle e submetidos ao tratamento com TFMS e com TFMS + PP2.....	85

RESUMO



Arrazoado. A Quinase de Adesão Focal (FAK) é ativada e contribui para a regulação da sinalização que determina as alterações fenotípicas de cardiomiócitos estimulados mecanicamente. A regulação da atividade da FAK é complexa e depende de mecanismos intramoleculares e da cooperação com a tirosino-quinase Src. Há evidências de que a tirosino-fosfatase SHP-2 contribui para a regulação do nível de fosforilação em resíduos de tirosina e, portanto da atividade da FAK em miócitos ventriculares de ratos neonatos em cultura (MVRNs). Este estudo objetivou examinar se a SHP-2 modula o nível de fosforilação da FAK em MVRNs. Examinamos se em MVRNs controle (i.e. não submetido a estímulo mecânico), a atividade da SHP-2 contribui para o baixo nível de fosforilação em tirosina da FAK e se em MVRNs submetidos a estímulos mecânicos a inibição da atividade da SHP-2 paralela a dissociação FAK/SHP-2 exerce papel permissivo na elevação da fosforilação da FAK.

Material e Métodos. Utilizou-se modelo de sobrecarga pressora por coarctação da aorta em ratos (miocárdio-VE) e estiramento *in vitro* em MVRNs. As abordagens experimentais incluíram técnicas de imunoprecipitação, western blot, imunohistoquímica, atividade de tirosino fosfatase *in vitro*, expressão de SHP-2 recombinante e avaliação da expressão do gene da cadeia pesada de beta-miosina (β - miosina).

Resultados. A coarctação da aorta (miocárdio-VE) e o estiramento (MVRNs) aumentaram a fosforilação da FAK no resíduo tirosina 397, em miocárdio-VE (200%) e em MVRNs estirados (75%). A FAK imunoprecipitada de amostras controles, encontrou-se associada a SHP-2 e o estímulo mecânico acompanhou-se de redução dessa associação, no miocárdio (60%) e em MVRNs (84%). Experimentos com imunohistoquímica e microscopia confocal demonstraram co-localização da FAK e da SHP-2 em MVRNs controle. Ocorreu redução da atividade de tirosino-fosfatase em imunoprecipitados de anticorpo anti-FAK (25%) e anticorpo anti-SHP-2 (25%) de miocárdio-VE de animais submetidos à coarctação da aorta, e anti-FAK (20%) e anti-SHP-2 (40%) de MVRNs estirados. A SHP-2 recombinante foi capaz de reduzir (70%) *in vitro* a fosforilação da FAK ativada por estímulo mecânico. Ocorreu aumento (125%) da quantidade de FAK fosforilada em MVRNs controles tratados com TFMS (inibidor seletivo da atividade da SHP-2); naqueles submetidos ao estiramento, o aumento em relação aos MVRNs estirados, mas não tratados com TFMS, foi menor

(40%). Ocorreu paralelamente, diminuição (40%) da associação FAK/SHP-2 e aumento da expressão do gene fetal da cadeia pesada da β - miosina (110%) em MVRNs tratados com TFMS; Os MVRNs tratados concomitantemente com TFMS e PP2 (inibidor farmacológico da FAK), apresentaram atenuação desse aumento (25%).

Conclusão. Os dados sugerem que a SHP-2 modula o nível de fosforilação da FAK em MVRNs, exercendo papel inibitório na ativação da FAK, contribuindo para o seu baixo nível de fosforilação em MVRNs e miocárdio na ausência de estímulo mecânico. A diminuição da associação FAK/SHP-2, da atividade específica da SHP-2 em MVRNs ou miocárdio submetidos a estímulos mecânicos e o aumento da fosforilação da FAK mediante tratamento dos MVRNs com TFMS, indicam que a redução da atividade da SHP-2 e da associação a FAK, é um importante mecanismo que colabora para o aumento de fosforilação da FAK em MVRNs submetidos a estímulos mecânicos sustentados. O aumento da expressão da cadeia pesada da β – miosina conseqüente à inibição da atividade da SHP-2 e a atenuação desse aumento, perante a concomitante inibição da atividade da FAK, corrobora nossa hipótese de que a SHP-2 modula a ativação da FAK em cardiomiócitos, influenciando a reprogramação gênica característica da ativação da sinalização hipertrófica, por estímulo mecânico.

ABSTRACT



Mechanical forces drive changes in cardiac myocyte function and structure that occur in response to hemodynamic overload. Focal Adhesion Kinase (FAK) has been implicated in the sensing and transduction of mechanical forces into biochemical events in cardiac myocytes. This study was performed to examine whether the protein tyrosine-phosphatase SHP-2 plays a role in baseline and stretch induced FAK activation and signaling in cultured neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs). NRVMs were subjected to cyclic stretch up to 60 min, studied by coimmunoprecipitation, immunoblotting, tyrosine-phosphatase activity assay, RT-PCR, and used in assays utilizing recombinant SHP-2 catalytic domain. Analysis was extended to NRVMs treated with Shp2 inhibitor TFMS and with FAK/Src Inhibitor PP2. FAK had a relatively low basal level of phosphorylation at Tyr397 in non-stretched NRVMs. Cyclic stretch (1HZ, 10%) induced rapid and sustained (up to 60 min) increases in phosphorylation of FAK at Tyr397. The results of coimmunoprecipitation assays indicated that FAK and SHP-2 are associated in non-stretched NRVMs, but cyclic stretch markedly reduced (to 25% and 60% after 10 and 60 min, respectively) the amount of SHP-2 recovered from the anti-FAK antibody precipitates. The tyrosine phosphatase activity of the anti-SHP-2 immunocomplex taken from non-stretched cardiac myocytes was relatively high, but it was markedly reduced (to ~60% after 10 and 60 min) in samples of stretched cells. The recombinant PTP domain of SHP-2 was demonstrated to be able to dephosphorylate the native FAK immunoprecipitated from NRVMs. The inhibition of SHP-2 activity by the pharmacological inhibitor TFMS markedly increased FAK phosphorylation at Tyr397 in non-stretched NRVMs to levels comparable to those seen in stretched cells. Treatment with TFMS lasting for 4h was accompanied by a marked increase (to ~200) the expression of beta-myosin heavy chain mRNA in non-stretched NRVMs. This effect was attenuated by ~25% in NRVMs simultaneous treated with the FAK/Src inhibitor PP2. In conclusion, the present data demonstrated that the basal FAK phosphorylation at Tyr397 is modulated by SHP-2 and that inhibition of SHP-2 during cyclic stretch has a permissive role on FAK activation by mechanical stress. Our results also establish the tight regulation of FAK phosphorylation by SHP-2 as a potential counter-regulatory signaling in the control of the hypertrophic genetic program in cardiac myocytes.

INTRODUÇÃO



A hipertrofia cardíaca é frequentemente interpretada como uma resposta adaptativa à sobrecarga das câmaras coração. Quando instalada, determina o restabelecimento da tensão na parede das câmaras sobrecarregadas. (Grossman, Jones & McLaurin, 1975; Sodomisha & Izumo, 1997; Russell, Mothagh, Ashley, 2000; Frey et al., 2004). No entanto, paradoxalmente, a presença de hipertrofia isolada ou associada ao remodelamento do ventrículo esquerdo, independente da doença primária que os tenha originado, são fatores de grande impacto na evolução clínica e prognóstico de pacientes cardiopatas (Levy . et al., 1990; St. John. Sutton. M. et al., 1994).

Sobrecargas hemodinâmicas prolongadas são causa e também consequência de doenças que acometem o coração (Katz ; 1990). Tensões geradas durante o ciclo cardíaco podem ativar mecanismos de crescimento hipertrófico nas células do miocárdio, em especial nos miócitos cardíacos (Sadoshima, Izumo, 1997; Omens, 1998). A hipertrofia dos cardiomiócitos é caracterizada pelo aumento do tamanho celular, da síntese de proteínas do sarcômero e daquelas associadas às diversas organelas e citoesqueleto extra-sarcomérico dos cardiomiócitos (Frey . et al; 2004).

Vários fatores humorais como peptídeos vasoativos, catecolaminas, citocinas e fatores de crescimento podem contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, porém o estímulo mecânico é considerado o fator mais relevante na indução da hipertrofia do miocárdio decorrente de sobrecarga mecânica (Chien , Olson, 2002; Knoll, Hoshijima, Chien. 2003). Estiramento e aumento de tensão passiva, decorrentes de sobrecargas mecânicas, são considerados fatores importantes para a ativação de mecanismos adaptativos estruturais e funcionais do miocárdio nas doenças cardíacas (Katz; 1990; Sadoshima , Izumo, 1997; Omens , 1998).

Forças mecânicas localizadas ativam mecanismos de sinalização em cardiomiócitos, levando à indução da expressão de programas gênicos específicos, relacionados ao remodelamento estrutural e funcional do miocárdio (St. John. Sutton. M. et al., 1994; Lammerding, Kamm, Lee; 2004). Isto inclui a expressão proteínas sarcoméricas e extra-sarcoméricas próprias da vida fetal. Quando sustentado, o estímulo mecânico contribui para a degeneração e morte dos miócitos cardíacos, além do

estabelecimento da fibrose miocárdica que, em conjunto, resultam em remodelamento e falência cardíacas (Katz, 1990; Chien, 1999; Lammerding, Kamm, Lee; 2004).

O termo mecanotransdução pode ser definido como a resposta bioquímica da célula ao estímulo mecânico (Lammerding, Kamm, Lee; 2004). Esta definição tem como base a percepção de forças mecânicas originadas do ambiente extracelular que, por sua vez, são transduzidas para o interior da célula através da geração de sinais bioquímicos. Esses sinais, então, dão origem a respostas apropriadas que levam a alterações na estrutura e função celular (Samarel ; 2005).

A mecanotransdução no cardiomiócito é um processo particularmente complexo. Estas células respondem tanto a forças mecânicas externas, como também a forças intrínsecas geradas no sarcômero dos cardiomiócitos, que são transmitidas para células adjacentes e para a matriz extracelular. Sinais originados de estímulos mecânicos afetam a regulação do desempenho cardíaco e também dos mecanismos envolvidos na proliferação, diferenciação, crescimento e sobrevivência celular (Samarel, 2005). Assim, o entendimento das bases celulares e moleculares do processo de mecanotransdução é relevante no concernente à compreensão da função e estrutura do coração sadio ou doente.

Evidências obtidas em modelos experimentais e em formas específicas de miocardiopatia de origem genética indicam que o citoesqueleto dos cardiomiócitos tem função importante na transdução de eventos mecânicos em eventos bioquímicos (Sussman, McCulloch , Borg, 2002; Epstein, Davis, 2003, Peng. et al, 2005). As regiões de contato entre estruturas do citoesqueleto sarcomérico e não-sarcomérico de cardiomiócitos e elementos da matriz extracelular, conhecidas como costâmeros, são consideradas como potenciais sítios de transdução de sinais mecânicos em sinais bioquímicos (Sussman, McCulloch, Borg, 2002; Epstein, Davis, 2003; Lammerding J, Kamm, Lee; 2004; Samarel ,2005).

Dentre as proteínas sarcoméricas, citam-se as responsáveis por ligar os filamentos à linha Z e a própria linha Z, que é responsável pela sustentação e ancoragem das proteínas contráteis. O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui filamentos de actina e filamentos intermediários que conectam sarcômeros paralelo entre si com o sarcolema e

com membranas de organelas intracelulares. O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui os microtúbulos, que estabelecem conexões longitudinais entre as estruturas sub-celulares dos miócitos cardíacos (Scopacasa, Teixeira, Franchini; 2003). Como sustentam e ancoram as estruturas sub-celulares, as proteínas do citoesqueleto sofrem tensão e se deformam podendo servir como transdutores de força nos miócitos cardíacos (Sussman, McCulloch, Borg, 2002; Epstein, Davis, 2003).

Também importante, no contexto da mecanotransdução, é a capacidade do citoesqueleto de ancorar e controlar a atividade de moléculas sinalizadoras que, uma vez ativadas, podem coordenar a expressão gênica e as respostas fenotípicas a estímulos mecânicos (Burridge, Chrzanowaska-Wodnicka, 1996; Janmey, 1998).

Demonstramos anteriormente (Franchini et al.; 2000) que a quinase de adesão focal (FAK – *Focal Adhesion Kinase*), se expressa em abundância no miocárdio, sendo rapidamente ativada por estímulos mecânicos. Esta molécula sinalizadora foi originalmente descrita (Hanks et al., 1992; Schaller et al., 1992) em células em cultura como uma proteína tirosina quinase localizada nos sítios de adesão ao substrato, o que despertou o interesse de caracterizá-la como um sinalizador envolvido na mecano-transdução entre o ambiente e as células. Vários estudos têm relacionado a FAK à hipertrofia cardíaca (Nemoto, Sheng, Lin, 1999; Seko et al., 1999; Pham, et al., 2000; Kuppuswamy, 2002; Aikawa et al., 2002; Torsoni et al., 2003 a ; Yi, et al. , 2003; Nadruz et al., 2005; Torsoni et al., 2005; Peng et al, 2006) bem como ao processo de remodelamento cardíaco (Mansour et al., 2004).

Em nossos estudos iniciais também demonstramos que a FAK está associada à fração dos filamentos de actina não-sarcomérica dos miócitos cardíacos e que sua ativação acompanha-se de ativação de vias de sinalização celular envolvidas no crescimento hipertrófico e de outras vias envolvidas na sobrevivência celular. Em corações isolados (Domingos et al.; 2002), verificamos que a ativação da FAK é determinada pelo estiramento passivo do miocárdio, mais do que por tensões ativas.

A ativação da FAK depende da auto-fosforilação do resíduo de tirosina 397 (Tyr397) no domínio N-terminal da molécula (Polte, Hanks, 1995; Calalb, Polte, Hanks, 1996; Franchini et al., 2000; Torsoni, 2003). A Tyr397 fosforilada recruta outra

tirosino-quinase conhecida como Src, que, uma vez ativada fosforila os resíduos Tyr576-577 da FAK, incrementando sua atividade (Calalb, et al., 1995; Owen et al., 1999; Webb et al., 2004). A ativação local da FAK também promove recrutamento e agregação (“clusters”) de outras moléculas de FAK, amplificando o sinal do complexo protéico. A Src ativada também promove a fosforilação de resíduos adicionais da FAK como a Tyr 925, responsável por ativar vias de sinalização envolvidas no crescimento celular. Esta seqüência de ativação da FAK, bem como a estreita cooperação entre FAK e Src, inicialmente demonstradas em outros tipos celulares, foi confirmada, em nossos estudos anteriores, em cardiomiócitos em resposta a estímulos mecânicos (Franchini, 2000; Domingos, 2002; Torsoni, 2003).

Demonstramos que o estiramento aplicado diretamente em cardiomiócitos de ratos neonatos provoca a ativação da FAK (Torsoni, 2003). Neste estudo também demonstramos que a ativação da FAK por estiramento não depende da ativação de fatores parácrinos, o que indica ser a ativação da FAK, pelo estiramento, dependente de mecanismo intrínseco do miócito ligado diretamente ao estímulo mecânico. Esta idéia foi confirmada em estudo recente do nosso laboratório (Fonseca et al., 2005) que demonstrou, através de sondagens com sistema de duplo-híbrido, ensaios de “pull-down” e imunohistoquímica, a associação direta entre a FAK com a região C-terminal da cadeia pesada de miosina, bem como a dependência desta associação para a ativação da FAK pelo estímulo mecânico em cardiomiócitos. Verificamos, que a ativação da FAK é acompanhada pela formação de agregados dessa molécula (clusters) e pela translocação destes agregados, para outros sítios sub-celulares como a linha Z, os costâmeros e núcleo.

Também demonstramos (Torsoni et al., 2003 a; Nadruz et al., 2005; Torsoni et al., 2005), que a ativação da FAK por estiramento em miócitos cardíacos tem papel crítico na regulação da re-expressão de genes do programa fetal induzida por estímulo mecânico. Existe ampla constatação experimental (Schaub et al., 1997; Hoshijima, Chien, 2002) de que a re-expressão do programa gênico fetal é essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos. A demonstração da importância da FAK para a expressão de

ANF em resposta ao estiramento indica o potencial desta enzima como elemento de controle das alterações fenotípicas dos cardiomiócitos induzidas por estímulos mecânicos.

Em conjunto, os resultados de nossos estudos anteriores indicaram que a FAK comporta-se como transdutor de estímulos mecânicos em sinais bioquímicos no miocárdio. No entanto, ainda não estão esclarecidos vários aspectos, tanto dos mecanismos que iniciam, como dos mecanismos que contribuem para a sustentação da ativação da FAK em cardiomiócitos submetidos a estímulos mecânicos. Neste contexto, um dos aspectos intrigantes revelados em estudos anteriores (Fonseca et al., 2005) é o fato de a FAK translocar-se de seu sítio na banda A do sarcômero, onde está associada com a porção C-terminal da cadeia pesada de miosina, para outros sítios subcelulares em resposta a estímulos mecânicos. Tanto os mecanismos envolvidos na translocação como os mecanismos responsáveis pela sustentação da fosforilação em tirosina e, conseqüentemente, da atividade da FAK após a translocação subcelular, são totalmente desconhecidos.

Hipótese

Temos como hipótese que a elevada fosforilação da FAK em resíduos de tirosina e, presumivelmente sua elevada atividade, em cardiomiócitos submetidos a estímulo mecânico agudo e sustentado é, em parte, devida à supressão da atividade de tirosino-fosfatases.

Esta hipótese encontra sustentação em diversas evidências experimentais obtidas em outros tipos celulares que mostram que a atividade da FAK é regulada por sua associação com a tirosino-fosfatase SHP-2 (Lin et al. ; 2004) que é capaz de desfosforilar a FAK em sítios de tirosina específicos (Tsuda, 1998; Feng, 1999; Manes et al., 1999; Wang. et al., 2005).

Há demonstrações anteriores de que a inativação da SHP-2 leva a um aumento na fosforilação e, conseqüentemente, ativação da FAK (Yu et al., 1998; Wichert G.von. et al. , 2003). Há evidências também de que a regulação da ativação da

FAK por estímulo mecânico via integrina/citoesqueleto depende da modulação da atividade da SHP-2 (Wichert G.von. et al. , 2003).

Estudos em células epiteliais gástricas mostraram que é ativação enzimática da SHP-2 que controla diretamente os níveis de fosforilação da FAK nos casos de gastrite, úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico infectados por *Helicobacter Pylori* CagA (Tsutsumi et al; 2006). Em células não cardíacas, existe ampla constatação experimental do papel da SHP-2, na montagem/ desmontagem e amadurecimento dos complexos de adesão bem como nos processos de motilidade celular, organização do citoesqueleto e miogênese, muitas vezes, através da modulação da atividade da FAK (Yu et al., 1998; Manes et al, 1999; Oh E.-S. et al, 1999; Masato, 2000; Wichert G.von. et al. , 2003; Kontaridis et al. ; 2004; Wang. et al., 2005). A ativação da SHP-2 também está envolvida com o mecanismo de apoptose em cardiomiócitos, através da desfosforilação em Tyr da FAK (Rafiq et al.; 2006).

A SHP-2 é uma enzima citosólica ubíqua, da superfamília das proteínas tirosino-fosfatases (PTPs) que pertence à sub-família das SHPs, proteínas altamente conservadas, cuja característica principal é possuir dois domínios SH2 na região amino-terminal (N-SH2 e C-SH2) ligados em série com o domínio catalítico PTP. (Figura. 1) (Neel, Gu, Pao; 2003). O domínio catalítico PTP possui especificidade para hidrolisar resíduos de tirosina fosforilados.

Por possuir dois tipos de domínios que podem se ligar a resíduos de tirosina fosforilados dos substratos, a SHP-2 participa de diversas vias de sinalização (Feng, 1999; Neel, Gu, Pao, 2003; Stoker, 2005), incluindo vias envolvidas na hipertrofia miocárdica (Nakaoka et al.; 2003).

A influência da SHP-2 sobre os cardiomiócitos ainda não está bem elucidada. Sabe-se que pacientes com a Síndrome do Leopardo desenvolvem miocardiopatia hipertrófica, e que na Síndrome de Leopardo ocorre uma redução da atividade da SHP-2 (Woywodt, 1998). Já em pacientes com a Síndrome de Noonan, na qual a atividade da SHP-2 está aumentada, o miocárdio se apresenta com espessura diminuída quando comparado ao normal (Tartaglia, 2005). Assim se faz necessário o entendimento da

participação da SHP-2 nos mecanismos de sinalização do cardiomiócito, em especial dos mecanismos que envolvem mecanotransdução e gênese da hipertrofia cardíaca.

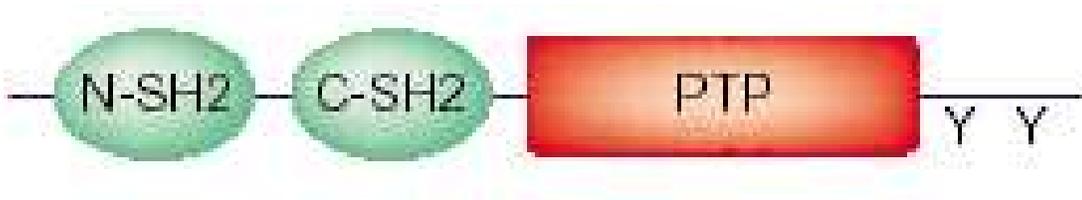


Figura 1- Estrutura linear de uma proteína Shp. (Modificado de NEEL B.G, GU H., PAOL., 2003)

OBJETIVOS



O presente estudo foi planejado para avaliar:

- 1) se a atividade da SHP-2 contribui para a manutenção de níveis reduzidos de fosforilação em tirosina da quinase de adesão focal em cardiomiócitos não submetidos a sobrecarga
- 2) se a modulação da atividade da SHP-2 pelo estímulo mecânico contribui para a fosforilação da FAK em cardiomiócitos submetidos a estímulos mecânicos agudos e sustentados.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos do presente estudo foram utilizadas amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo de corações de ratos e miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRN) submetidos a estiramento *in vitro*. Detalhes sobre os procedimentos e técnicas utilizadas foram descritos em publicações anteriores (Franchini et al., 2000; Franchini, 2003; Domingos et al., 2002; Torsoni et al., 2003 a; Torsoni et al., 2003 b; Nadruz et al., 2003 a; Nadruz et al., 2003 b; Nadruz et al., 2005; Torsoni et al., 2005).

Reagentes. No presente estudo foram utilizados meio de cultura DMEM, soro equino, soro fetal bovino da Gibco BRL Co. Pancreatina foi adquirida da Sigma, colagenase tipo II da Worthington. Proteína A/G plus e anticorpos policlonais anti-Fak (C-20) e anti-cSrc (B-12), e monoclonais anti-SHP-2 (SC40), foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (USA). Anticorpos policlonais anti-pSrc⁴¹⁸ e anti-pFak³⁹⁷ da Biosource International (USA). Kit de quimioluminescência foi adquirido da Pearson (USA). Anticorpos secundários marcados com fluoróforos ALEXA para imunohistoquímica foram adquiridos da Molecular Probes (Inc.).

3.1- Tirosino-Fosfatase SHP-2 Recombinante

A construção da tirosino-fosfatase SHP-2 recombinante foi cordialmente cedida pelo Dr. Eugene Chin do departamento de Patologia e Laboratório de Medicina, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brown, Providence, RI, USA (Tong, 2002). De acordo com os autores (Tong, 2002) o gene foi inserido em vetor de expressão pGEX-3T (Amersham Biosciences), resultando na construção, com atividade confirmada.

3.2- Animais

Foram utilizados ratos Wistar, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas-SP, com peso entre 200e 250g e ratos Wistar neonatos de 1-2 dias de vida.

3.3- Isolamento e estiramento de miócito ventricular de ratos neonatos

Detalhes da técnica de extração e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRN) foram descritos anteriormente (Torsoni et al., 2003 a; Nadruz et al., 2003 a).

Os corações foram retirados de ratos neonatos Wistar (1-2 dias), cortados em 4 pedaços e submetidos à digestão branda em solução tampão de ADS (6,8g de NaCl, 4,76g de Hepes Salt, 0,12g de NaH₂PO₄, 1g de glicose, 0,4g de KCl e 0,10 MgSO₄, H₂O q.s.p 100ml p/ ADS 10X e 1000ml para ADS 1X, pH 7,35) com colagenase/pancreatina, centrifugação a 3000 rpm, 37°C, por 5 minutos e pré-plaqueamento em placa de petri de vidro. Após 6 ciclos de digestão e pré- plaqueamento, os cardiomiócitos foram separados em gradiente de Percoll por centrifugação, por 30 min, 3000 rpm, 37 °C. Após a separação, as células foram colocadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) enriquecido com 5% de soro fetal bovino e 10% de soro eqüino e acrescido de 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e 100uM de Bromodioxiidina. As células foram plaqueadas em placas com base de silicone recoberta com colágeno tipo I (Bioflex) para estiramento à vácuo biaxial cíclico em Sistema Flexercell 3000T (Flexercell International, USA). Antes do estiramento, as células permaneceram em cultura com meio DMEM enriquecido com soros por 36- 40 horas. Após o meio de cultura foi trocado por DMEM sem adição de soro no qual as células permaneceram por, no mínimo, 24 horas antes de serem estiradas.

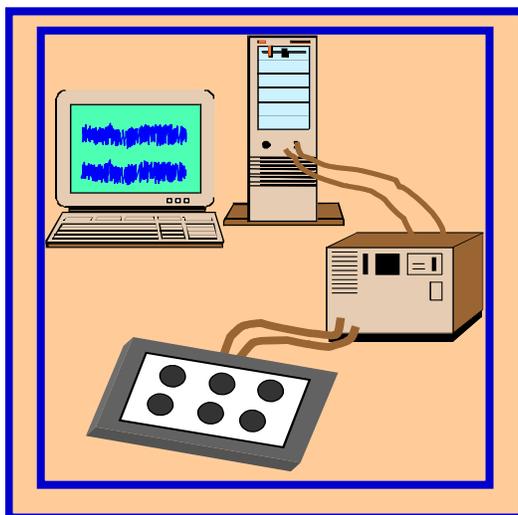


Figura 2- Representação esquemática do aparato utilizado para estiramento mecânico em células cardíacas isoladas.

3.4- Modelo animal de sobrecarga de pressão

Logo após a monitorização hemodinâmica (descrita a seguir), a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo, a aorta torácica transversa dissecada e um “clamp” de prata (diâmetro interno - 50 μ m) foi colocado na croça da aorta entre o tronco braquiocefálico e a artéria carótida comum esquerda produzindo aumento da resistência ao fluxo sanguíneo e conseqüente sobrecarga de pressão no coração. A cavidade torácica foi fechada e os ratos mantidos anestesiados. Foram estudados os ratos em períodos que variaram de 10 minutos a 1 hora após constrição da aorta. A sobrecarga de pressão foi considerada satisfatória quando o “clamp” produziu um aumento de 40 a 50mmHg na pressão sistólica da aorta ascendente (mensurada através da artéria carótida direita) sem induzir a uma queda significativa nos níveis pressóricos da aorta abdominal (mensurada através da artéria femoral) (Figura 3). Os animais controle foram submetidos à cirurgia fictícia, com abertura da cavidade torácica, porém sem colocação do clamp de prata.

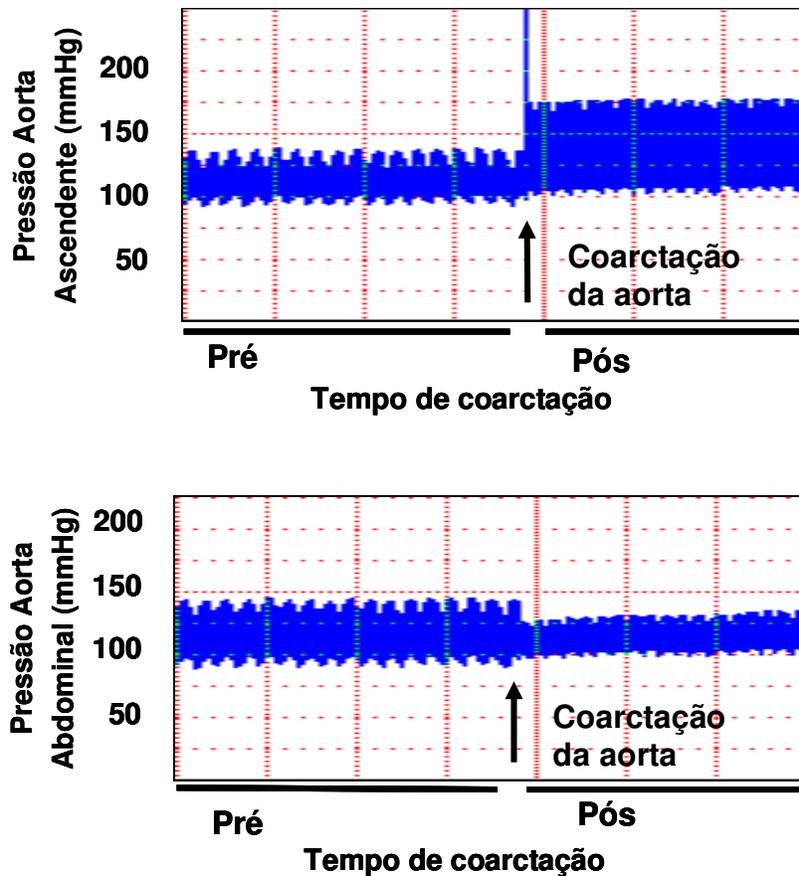


Figura 3- Exemplos de registros de pressão arterial obtidos em experimento de coarctação da aorta.

3.5- Monitorização hemodinâmica

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de cetamina (Ketalar, Parke-Davis, Brasil) e diazepam (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil). Esta mistura foi administrada na proporção de 10mg de cloridrato de cetamina para 0,07mg de diazepam, e a dose aplicada foi de 0,3mL/100g de peso corporal do animal. Em seguida, os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C e submetidos à monitorização da pressão arterial através de inserção de cateteres de polietileno (PE50 – Clay Adams, Parsipany, EUA) nas artérias carótida direita e femoral direita, os quais estavam acoplados a transdutores de pressão COBE (Arvada, CO, EUA). O sinal da

pressão arterial foi amplificado por um amplificador GP4A Stemtech (Stemtech, Milwaukee, WI, USA). Este se comunicava a um conversor analógico-digital, conectado a um computador contendo o programa WINDAQ-PRO (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA) para monitoração hemodinâmica contínua e gravação de dados. Os sinais foram gerados a uma frequência de amostragem de 100Hz e gravados em canais individuais (Figura 4).

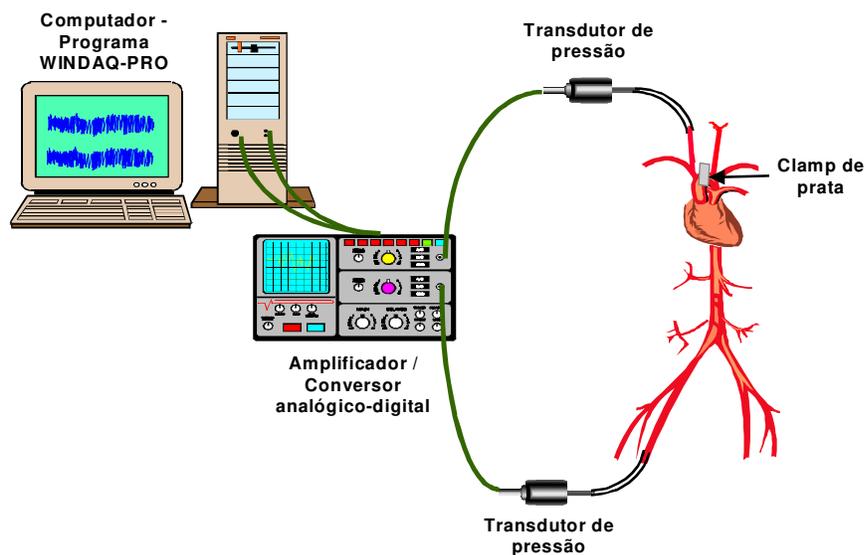


Figura 4- Representação esquemática do modelo utilizado nos experimentos *in vivo*.

3.6- Western Blot

Detalhes da técnica de Western Blot foram descritos anteriormente (Franchini et al.; 2000). Resumidamente, amostras de miocárdio de ratos ou MVRN foram homogenizadas em tampão de solubilização. Os extratos resultantes foram submetidos a SDS-PAGE e as proteínas específicas identificadas através de anticorpos específicos e quimioluminescência em membranas de nitrocelulose.

3.7- Imunoprecipitação e preparação de extratos totais

Corações rapidamente removidos, cortados em pequenos pedaços e homogeneizados imediatamente em aproximadamente 10 volumes de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, Tris-HCl 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para a análise por extrato total e imunoprecipitação. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BIURETO. Para o protocolo de imunoprecipitação, foi feita a reação do sobrenadante com 10µg de anticorpos primários, estando as amostras mantidas sob agitação leve na câmara fria durante a noite. 50µl de Proteína A-Sepharose 6MB foram acrescentados a cada amostra, mantendo-as sob agitação na câmara fria por mais duas horas. Após centrifugação por 20 minutos a 11000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado submetido à lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem para imunoprecipitado (Tris-HCl 100mM, pH 7,4, EDTA 1mM, Triton X-100 0,5%, ortovanadato de sódio 2mM). Os mesmos procedimentos foram realizados com MVRN, diferindo apenas no que diz respeito à extração, pois foram extraídos da placa de silicone, homogeneizados com passagens repetidas por seringa de insulina e as proteínas dosadas pelo método de Lowry.

3.8- Ensaio de Atividade Fosfatase *in vitro*

Corações rapidamente removidos, cortados em pequenos pedaços e homogeneizados imediatamente, em aproximadamente 1,5 volumes de tampão de lise para fosfatase (EDTA 5mM, Tris-HCl 20mM, PMSF 2mM, EGTA 1mM, NaCl 130mM e aprotinina) a 4°C usando um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Logo em seguida, foi adicionado 10% de Triton do valor adicionado de tampão (150µl) e a amostra foi mantida por, no mínimo, 40 min em gelo. Após, os extratos

foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para a análise por imunoprecipitação.

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de BIURETO (20µl do sobrenadante + 1000µl do Biureto). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm, depois de reservar as amostras no escuro por 15 minutos. Para o protocolo de imunoprecipitação, foi feita a reação do sobrenadante com 10µg de anticorpos primários, estando as amostras mantidas sob agitação leve na câmara fria durante a noite. 40µl de Proteína A-Sepharose 6MB foram acrescentados a cada amostra, mantendo-as sob agitação na câmara fria por mais duas horas. Após centrifugação por 15 minutos a 11000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi submetido à lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem e ensaio para fosfatase (400µl por amostra) (Hepes 100mM, pH 7,6, NaCl 150mM, EDTA 2mM, DTT 1mM, BSA 0,5 mg/ml). O precipitado (amostra) foi ressuspendido em 50µl de tampão de lavagem e ensaio para fosfatase e em seguida a ele foi adicionado o peptídeo específico fosforilado no resíduo tirosina 527 (*pp60^{c-src} C-terminal phosphoregulatory peptide- Thr- Ser- Thr Glu- Pro- Gln- Tyr (PO₃H₂)- Gln- Pro- Gly- Glu- Asn- Leu-* BIOMOL Research Laboratories; USA) numa quantidade adequada para concentração final de 200ul. A amostra foi incubada 1 hora a 30^o C.

Após a incubação, uma alíquota de 40µl foi transferida para uma placa de Elisa (placa de 96 poços), à qual foi adicionada 100µl do reagente Biomol Green (Reagente for Phosphatase Detection; BIOMOL Research Laboratories, USA). A Absorbância foi medida após 30 minutos da adição do Biomol Green, em aparelho Leitor de Elisa (Labsystems Multishlan MS, Uniscience do Brasil), a 595nm. Os mesmos procedimentos foram realizados com MVRN, diferindo apenas no que diz respeito à extração, pois foram extraídos da placa de silicone, homogeneizados com passagens repetidas por seringa de insulina e as proteínas dosadas pelo método de Lowry.

3.9- Imunocitoquímica e avaliação com microscopia confocal

A análise imunocitoquímica das proteínas foi realizada utilizando-se MVRNs.

Os MVRNs foram fixados com paraformaldeído 4%, sacarose 4% e triton 0,6% em PBS 0,1M, pH 7,4, por 15 minutos em temperatura ambiente. As células fixadas foram pré-incubadas em tampão de bloqueio (leite desnatado 3%, triton 0,6% em PBS 0,1M) por 45 minutos em temperatura ambiente, seguido por incubação com anticorpos primários (anti-FAK e anti- SHP-2) durante a noite a 4°C. O material foi lavado com PBS 0,1M e incubado por 2 horas a 25°C com os seguinte anticorpos secundários: goat anti rabbit Alexa flúor®; após, as lâminas foram montadas. Os sinais positivos foram visualizados por microscopia confocal a *laser* (Zeiss LM510). Na ausência de anticorpos primários, o uso de anticorpos secundários (controle negativo) não produziu marcação significativa.

3.10- Obtenção, expressão e purificação do sítio ativo da tirosino-fosfatase SHP-2 recombinante (PTP-GST)

A construção contendo o gene do sítio ativo da tirosino-fosfatase SHP-2 (PTP-GST) foi gentilmente cedida pelo Dr. Eugene Chin do departamento de Patologia e Laboratório de Medicina, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brown, Providence, RI, USA (Tong, 2002). Nos foi enviado, disperso em papel de filtro. O plasmídeo pGEX-3T (Figura 5) possui um gene de seleção de crescimento de bactérias para ampicilina. Esse material contendo a construção foi ressuspenso em tampão TE (Tris-EDTA, pH 8) a 65°C durante cinco minutos, com a finalidade de extrair a construção fixada no papel, e armazenado-a a -20°C. Para garantir uma quantidade suficiente e um estoque permanente, a PGEX-3T foi transformada em bactéria de clonagem *E. coli* DH5- α , por eletroporação, obtendo com isso uma cultura permanente de bactérias capaz de produzir em grande quantidade a construção de interesse.

Para expressão e obtenção da proteína tirosino-fosfatase SHP-2 recombinante (PTP-GST), as bactérias de clonagem transformadas foram plaqueadas em meio Luria- Bertani-ágar-ampicilina para obtenção de colônias isoladas. Foi feito então um pré-inóculo das colônias em meio líquido Luria-Bertani-ampicilina, permanecendo em crescimento over-night a 37°C. No dia seguinte verteu-se um pequeno volume (10 mL) do pré-inóculo em 500 mL de meio líquido de cultura Luria-Bertani-ampicilina e este

incubado a 37°C, sob agitação, por aproximadamente 4 horas. A monitoração do crescimento ótimo das bactérias foi feita pela leitura da densidade óptica (OD), em espectrofotômetro (600nm), de pequenos volumes retirados de hora em hora do meio. Atingida a OD de 0,5-0,6 (representativo de crescimento ótimo bacteriano), foi adicionado 0,1mM de IPTG (agente indutor artificial) pra indução da expressão da proteína recombinante, permanecendo por mais 4 horas sob agitação. Após esse tempo, o meio de cultura foi então centrifugado à 5000 rpm por 10 minutos para separação do pellet bacteriano. Estes foram coletados e lisados enzimaticamente por lisozima, termicamente através de uma alternância de ciclos (6) de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho a 42°C, e mecanicamente por sonicação (três pulsos de ultra-som de intensidade máxima, por 10 segundos). O homogenato resultante foi ultra-centrifugado a 23000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e purificado através de incubação deste com beads de GST (Glutathione SepharoseTM 4 Fast Flow – Amersham Biociences) por 4 horas; após, essa suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 20 min e o precipitado (proteína recombinante (PTP-GST) + beads de GST) foi coletado e armazenado a -80⁰C em tampão contendo 5mM de DTT, 50mM pH 7,4 Hepes, 150mM NaCl e 10% Glicerol . Toda comprovação da indução e expressão da proteína foi obtida por eletroforese da fração solúvel, resultante de cultura bacteriana não induzida e induzida com IPTG, bem como a comprovação da purificação feita com o precipitado purificado, em gel de poliacrilamida a 12%. A banda de proteína visualizada correspondente à PTP-GST é aquela situada entre a faixa de 50 a 75 KDa, sendo menos intensa para a não induzida (ver Figura 13).

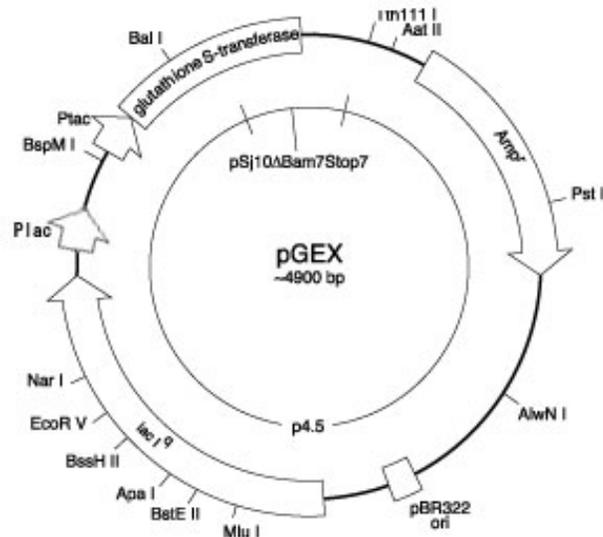


Figura 5- Representação esquemática de um vetor de expressão plasmidial p-GEX

3.11- Ensaio enzimático com tirosino-fosfatase SHP-2 recombinante (PTP-GST)

A atividade do sítio catalítico da SHP-2 (PTP-GST) foi avaliada em Leitor de Elisa. A mistura reacional (100 μ L) foi composta de tampão contendo 100 mM de HEPES, pH 7,6, 150 mM NaCl 20mM EDTA, 1mM DTT, 0,5 mg/ml de Albumina Bovina, e diferentes concentrações de SHP-2 recombinante (proteínas purificada- PTP-GST). A reação foi iniciada com a adição, à mistura, de 200 μ M de peptídeo pp60^{c-src}, conforme protocolo de Atividade Fosfatase descrito, e conduzida à 30°C por 1 hora. Alíquotas (40 μ L) foram retiradas e transferidas para a placa de 96 poços na qual a reação foi paralisada através da adição de 100 μ L de Biomol Green. Decorrido o tempo de 30 minutos após a paralisação, foi realizada a leitura de absorvância das amostras em Leitor de Elisa no comprimento de onda de 595 nm. A partir da leitura das amostras, uma curva da atividade da proteína recombinante (Figura 16) foi construída e uma concentração de proteína adequada de trabalho pôde ser estipulada.

3.12- Ensaio de Desfosforilação da FAK pelo Sítio Ativo Recombinante (PTP-GST) da tirosino-fosfatase SHP-2

Para a realização do ensaio de desfosforilação, a FAK foi imunoprecipitada de extratos de ventrículo esquerdo de corações de ratos Wistar controle e coarctado por 60 minutos.

Os imunoprecipitados de FAK foram incubados com 3µg do sítio ativo recombinante da SHP-2 (PTP-GST) em 60µl de tampão contendo 50mM HEPES pH 7,0, 20mM NaCl e 1mM DTT, por 20 minutos a 30 °C . Após a incubação os imunoprecipitados de FAK foram lavados três vezes com o tampão de lavagem contendo 0,4 mM PMSF, 50mM Tris- HCl ,150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 25mM NaF, 5mM NaP ,1mM OrtoV , 0,1mg/ml Aprotinina, 1mM DTT e 1% Triton X- 100 .

Em seguida procedeu-se com protocolo de *Western Blot*, usando anticorpo anti-fosfotirosina 397 da FAK (Ren et al.; 2004).

3.13- Tratamento de cardiomiócitos de ratos wistar neonatos, isolados e em cultura com inibidor específico da SHP-2 bis(4-Trifluorometilsulfonamidofenil)-1,4-diisopropilbenzeno (TFMS)

Os MVRNs foram extraídos e cultivados conforme descrito na secção de materiais e métodos e tratados com inibidor seletivo da SHP-2 (TFMS- diluído em DMSO 10mg/ml), na concentração de 1,8 µM, , por 45 minutos.

Em seguida procedeu-se com protocolo de extração destas células e de *Western Blot*, usando anticorpo anti-fosfotirosina 397 da FAK .

3.14- RT- PCR

Cardiomiócitos isolados e em cultura foram extraídos e homogeneizadas em TRIzol e o RNA total foi isolado por precipitação com isopropil como descrito anteriormente (Nadruz Jr W. et al., 2003). Uma alíquota de 100 ng de RNA total foi usada para a síntese de cDNA com sistema de pré-amplificação Superscript (Life Technologies) de acordo com

o fabricante. O cDNA foi amplificado por PCR com *Taq* DNA polimerase com oligonucleotídeos derivados dos genes, β -miosina (5'-CCAACACCAACCTGTCCAAGTTC-3' and 5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3') e gene da β -actina (5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3' and 5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Life Technologies. As condições de amplificação consistiram de 25 ciclos como descrito: desnaturação a 95°C por 1.30min, anelamento a 47°C (β -Actina) e (β -miosina) por 30seg, e extensão a 68°C por 2 min. Os produtos da PCR foram fracionados pelo tamanho por eletroforese em gel de agarose 2%. Após os géis foram corados com Brometo de Etídeo e as bandas de DNA visualizadas em um trasluminador de UV. As amplificações foram feitas com os dois primers simultaneamente (multiplex).

3.15- Análise Estatística

Os dados foram apresentados em forma de médias e erro padrão. Diferenças entre valores médios de dois grupos foram testadas através do Teste T de Student e diferenças entre três ou mais grupos foram testadas por análises de variância (ANOVA) sendo o teste *post hoc* o de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS



4.1- Efeito da sobrecarga pressora aguda no miocárdio sobre a expressão e fosforilação da FAK em resíduo de tirosina 397

Inicialmente, foram realizados experimentos utilizando-se a técnica de Western Blot para determinar os níveis de expressão e fosforilação da FAK no ventrículo esquerdo de ratos controle ou submetidos a coarctação da aorta. Extratos totais de ventrículo esquerdo controle ou submetido a sobrecarga pressora aguda (10, 30 e 60 minutos) foram separados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas separadas no gel foram então transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram então incubadas com anticorpo policlonal contra a porção carboxi-terminal da FAK e com anticorpo fosfo-específico contra a forma fosforilada da FAK em sua tirosina 397.

Conforme demonstrado na Figura 6, o estímulo mecânico não produziu alterações significativas na expressão da FAK quando as amostras de VE submetidos à sobrecarga foram comparadas às amostras controle. No entanto, ocorreu aumento expressivo da quantidade de FAK reconhecida pelo anticorpo fosfo-específico anti-FAK-397 nas amostras de corações submetidos a sobrecarga pressora. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores de nosso laboratório (Franchini, 2000; Fonseca et al. , 2005)

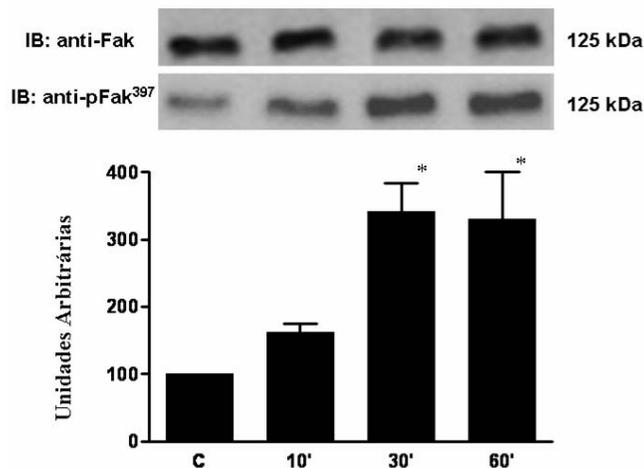


Figura 6- *Immunoblotting* representativo das quantidades totais de FAK em miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e *Immunoblotting* representativo da fosforilação de FAK em resíduo de tirosina 397 em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 4).

* p < 0,05 comparado à amostra controle

4.2- Efeito da sobrecarga pressora aguda sobre a expressão da SHP-2 e sobre a associação entre a FAK e a SHP-2 em miocárdio de ratos

Para determinar os níveis de expressão da SHP-2, extratos totais obtidos de ventrículos esquerdos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda (10, 30 e 60 minutos) foram separados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Membranas de nitrocelulose com as proteínas transferidas foram incubadas com anticorpo monoclonal contra a porção carboxi-terminal da SHP-2.

Para avaliar a associação entre a FAK e a SHP-2 utilizamos a técnica de imunoprecipitação. As proteínas foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-FAK e as proteínas separadas em gel de SDS-poliacrilamida. As membranas com as proteínas

imunoprecipitadas foram então incubadas com anticorpos monoclonais contra a porção C-terminal da SHP-2. Como demonstrado na Figura 7, o estímulo mecânico não produziu alterações significativas nos níveis de expressão da SHP-2. No entanto, a constrição da aorta causou uma tendência à diminuição da associação entre a FAK e a SHP-2 constatada pela diminuição do conteúdo de SHP-2 nos imunoprecipitados de FAK.

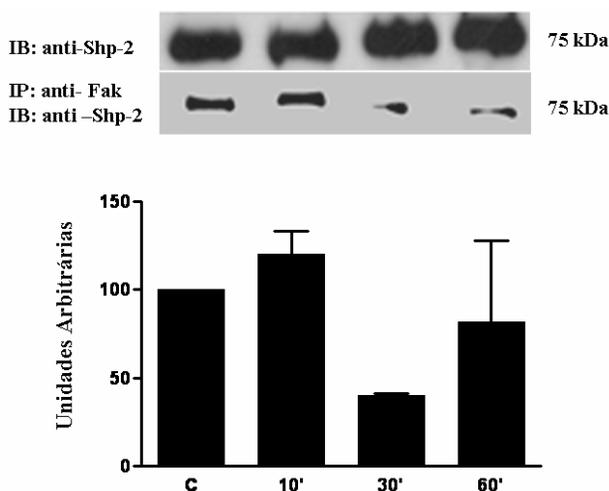


Figura 7- *Immunoblotting* representativo das quantidades totais de SHP-2 em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e *Immunoblotting* da associação entre FAK e SHP-2 em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 4).

4.3- Efeito do estiramento sobre a expressão e fosforilação da FAK em MVRNs

Apesar de ser um bom modelo para a avaliação de mecanismos de sinalização, a utilização de miocárdio obtido de ventrículo esquerdo submetido a sobrecarga de pressão apresenta restrições quanto à especificidade do tipo celular envolvido e a influência de fatores externos aos cardiomiócitos. Assim, experimentos adicionais foram realizados para avaliar se a associação FAK/SHP-2 e a atividade da SHP-2 são reguladas pelo estímulo mecânico em cardiomiócitos de ratos neonatos mantidos em cultura (Torsoni et al.; 2003; Torsoni et al.; 2005).

Neste experimento foram utilizados MVRNs sobre placa de silicone. Grupos diferentes de placas foram submetidos a estiramentos controlados pelo período de 10, 30 e 60 minutos. As células, controle e estiradas, foram coletadas e seus extratos processados para a realização de experimentos com a técnica de western blot com anticorpos anti-FAK e fosfo-específico anti-FAK-397. Para determinar os níveis de expressão e fosforilação da FAK, os extratos totais obtidos de MVRNs controle ou daqueles submetidos ao estiramento (10, 30 e 60 minutos) foram separados através de eletroforese em gel de SDS- poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose as quais foram então incubadas com anticorpo policlonal contra a porção carboxi-terminal da FAK, com anticorpos fosfo-específicos da FAK.

Conforme demonstrado no gráfico da Figura 8, o estímulo mecânico aplicado sobre os MVRNs em placa de silicone, assim como no modelo animal, não produziu alterações significativas na expressão da FAK quando as amostras provenientes de células submetidas ao estiramento foram comparadas as controle. No entanto, o estímulo mecânico causou uma tendência ao aumentou a fosforilação da FAK em tirosina 397, conforme já demonstrado em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Torsoni et al.; 2003; Torsoni et al.; 2005; Nadruz et al., 2005)

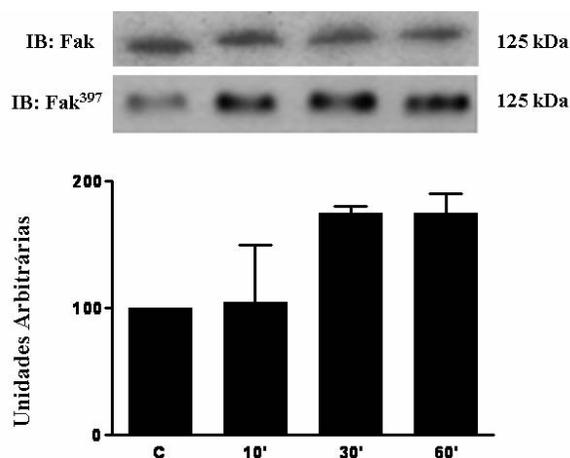


Figura 8- *Immunoblotting* representativo das quantidades totais de FAK em MVRNs submetidos à estiramento por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e *Immunoblotting* representativo da fosforilação de FAK em MVRNs, controle e submetidos à estiramento por 10, 30 e 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 4).

4.4- Efeito do estiramento sobre a expressão da SHP-2 e sobre a associação entre FAK e SHP-2 em MVRNs

Neste experimento extratos de MVRNs (controle e estirados) foram utilizados para imunoprecipitação e western blot com anticorpos anti-FAK e anti-SHP-2. Para determinar a expressão da SHP-2, extratos totais obtidos de MVRNs controle ou daqueles submetidos a estiramento (10, 30 e 60 minutos) foram separados em gel de SDS-poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose, que foram então incubadas com anticorpo monoclonal anti-SHP-2. Para a avaliação da associação entre a FAK e a SHP-2, extratos totais foram incubados com anticorpos contra a porção C-terminal da FAK, obtendo-se assim os imunoprecipitados (IP) de FAK.

Como demonstrado no gráfico da Figura 9, o estiramento aplicado diretamente sobre os cardiomiócitos não modificou a expressão da SHP-2, porém, resultou em uma diminuição acentuada da associação entre a FAK e a SHP-2, constatada pela redução do conteúdo de SHP-2 nos imunoprecipitados (IP) de FAK, assemelhando-se ao resultado observado em modelo de rato submetidos a constrição aguda da aorta.

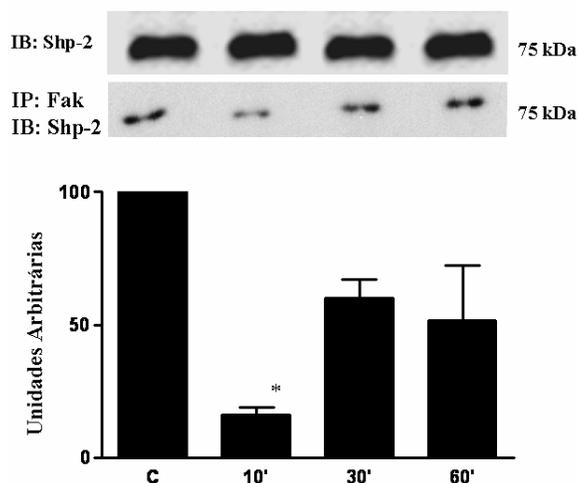


Figura 9- *Immunoblotting* representativo das quantidades totais de SHP-2 em MVRNs controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Gráfico e *Immunoblotting* da associação entre FAK e SHP-2 em MVRNs controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 10, 30 e 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 4).

* $p < 0,05$ comparado à amostra controle.

4.5- Avaliação da localização da FAK e da SHP-2 em MVRNs controles e submetidos a estímulo mecânico

A atividade e função de proteínas de sinalização guardam relação estreita com sua localização em estruturas sub-celulares. Técnicas de imunohistoquímica associadas a microscopia confocal permitem não apenas localizar proteínas em sítios sub-celulares, mas também avaliar a co-localização de proteínas que cooperam entre si em vias de sinalização celular. Para a avaliação da localização da SHP-2 e da FAK, os MVRNs foram extraídos, fixados em lâminas, duplamente marcados com anticorpos anti-FAK e anti-SHP-2 e analisados com microscopia confocal.

Para a execução desse experimento, os MVRNs foram extraídos, isolados e cultivados conforme protocolo descrito na secção de materiais e métodos. Após a extração os cardiomiócitos foram fixados em lâminas revestidas com poli-L-lisina e submetidos a reações de marcação com anticorpos específicos contra a FAK e SHP-2. A análise das células foi realizada por microscopia confocal de fluorescência. Os resultados deste protocolo permitiram definir a localização sub-celular de SHP-2 e sua relação com a localização da FAK.

Como mostrado na Figura 10, em cardiomiócitos controle, a FAK (marcação vermelha) e a SHP-2 (marcação verde) se co-localizam (marcação amarela - sobreposição verde / vermelho).

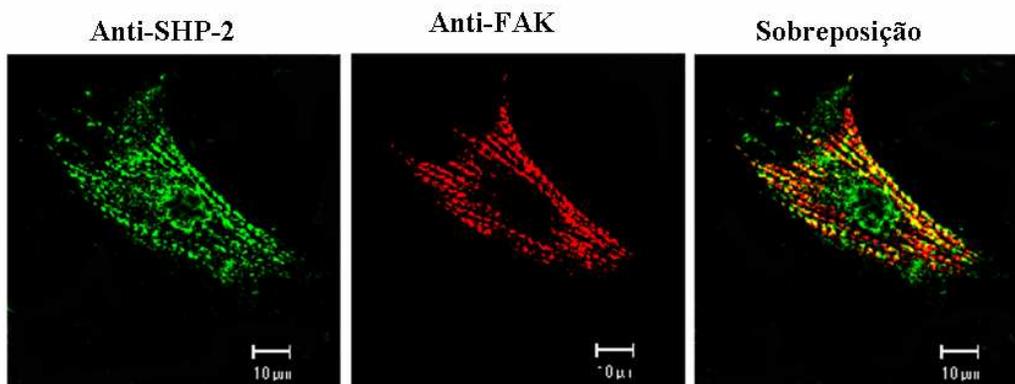


Figura 10- Imagem de microscopia confocal de fluorescência de MVRNs controle .

4.6- Efeito da sobrecarga pressora aguda, por coarctação da aorta, sobre a atividade de tirosino-fosfatase de imunoprecipitados de anticorpo anti-FAK e anti-SHP-2

Extratos de ventrículo esquerdo de ratos controle ou submetidos à coarctação da aorta pelo período de 60 minutos, foram imunoprecipitados com anticorpo anti-FAK e anti-SHP-2. Os imunoprecipitados bem como amostras de extrato total foram submetidos a ensaios de atividade de tirosino-fosfatases *in vitro* com substrato específico. Os resultados destes experimentos permitiram avaliar, de forma direta, a atividade de SHP-2 e de outras tirosinas fosfatases em cardiomiócitos e sua associação com a FAK.

Como demonstrado no gráfico da Figura 11, a atividade de tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-FAK diminuiu (25%) nas amostras de animais coarctados por 60 min; o mesmo ocorreu nos imunoprecipitados de anti-SHP-2 de amostras de animais coarctados por 60 min, nos quais a atividade de tirosina-fosfatase diminuiu (25%) quando comparada a dos imunoprecipitados de amostras controle, conforme demonstrado no gráfico da Figura 12. A atividade de tirosino-fosfatase de extratos totais de coração controle e a de corações submetidos a coarctação da aorta foram semelhantes (resultados não mostrados).

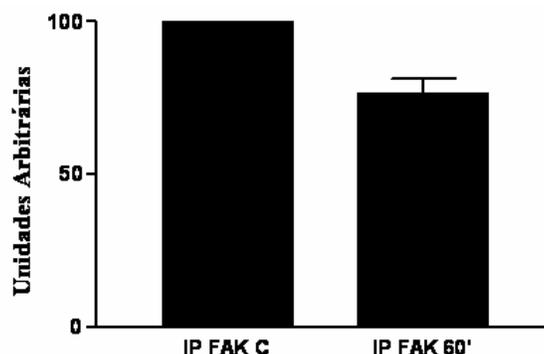


Figura 11- Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-FAK em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 3).

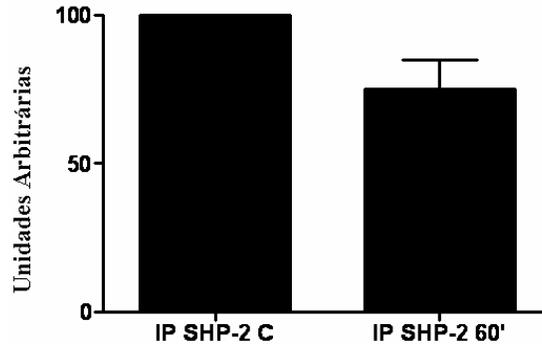


Figura 12- Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em miocárdio de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 3).

4.7- Efeito do estiramento de MVRNs sobre a atividade de tirosino-fosfatase de imunoprecipitados de anticorpos anti-FAK e anti-SHP-2

Os extratos totais de MVRNs controle e estirados pelo período de 10 e 60 minutos, foram imunoprecipitados com anti-FAK e anti-SHP-2. Os imunoprecipitados foram submetidos a ensaios de atividade de tirosino-fosfatases *in vitro* com substrato específico. Os resultados destes experimentos permitiram avaliar, de forma direta, a atividade de SHP-2 e de outras possíveis tirosino-fosfatases em cardiomiócitos e sua associação com a FAK.

Conforme pode ser visto na Figura 13, as amostras de cardiomiócitos estiradas por 60 min apresentaram uma atividade de tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anti-FAK menor (20 %) quando comparadas às amostras controle.

Os resultados apresentados na Figura 14 indicam uma diminuição substancial da atividade de tirosino-fosfatase dos imunoprecipitados de anticorpo anti-SHP-2 em amostras de MVRNs estirados por 10 minutos (40%) e 60 minutos (35%) em relação às amostras controle.

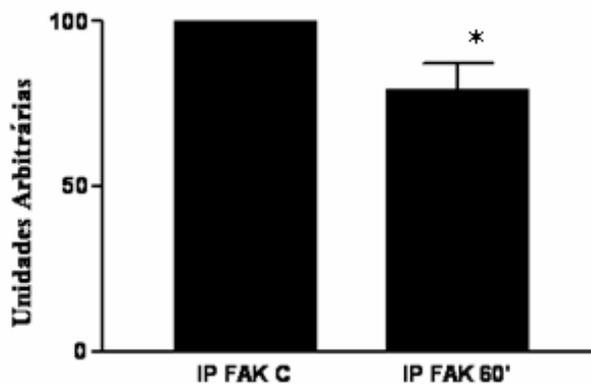


Figura 13- Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-FAK em MVRNs controles e submetidos ao estiramento mecânico por 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 5).

* p < 0,05 comparado à amostra controle.

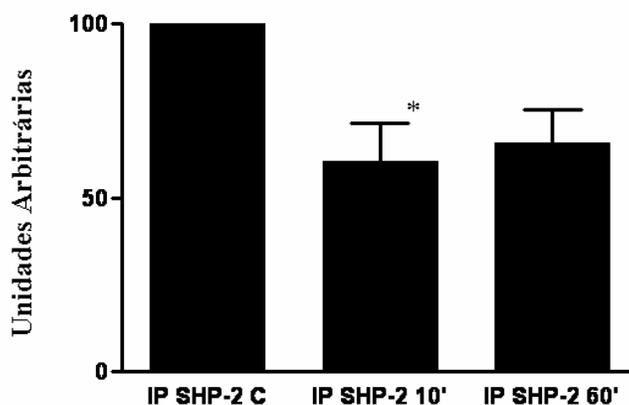


Figura 14- Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em MVRNs controles e submetidos ao estiramento mecânico por 10 e 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 4).

* p < 0,05 comparado à amostra controle.

4.8- Expressão e ensaio de atividade enzimática da tirosino-fosfatase SHP-2 (sítio catalítico ativo recombinante PTP-GST)

Para avaliar a hipótese de que a SHP-2 participa na regulação do nível de fosforilação da FAK em tirosina, realizamos ensaios com o domínio catalítico PTP recombinante da tirosino-fosfatase SHP-2. A Figura 15 mostra gel representativo da expressão e purificação da proteína recombinante PTP-GST.

Para confirmar a atividade da proteína recombinante, bem como para determinar a concentração ótima de trabalho, foram realizados ensaios de atividade de tirosino-fosfatase com a proteína recombinante purificada. Como indicado na Figura 16, os ensaios com PTP-GST recombinante indicaram consumo do substrato (peptídeo fosforilado pp60^{c-Src}) acrescentado ao meio de reação em concentração fixa de 200µM de forma concentração enzima dependente.

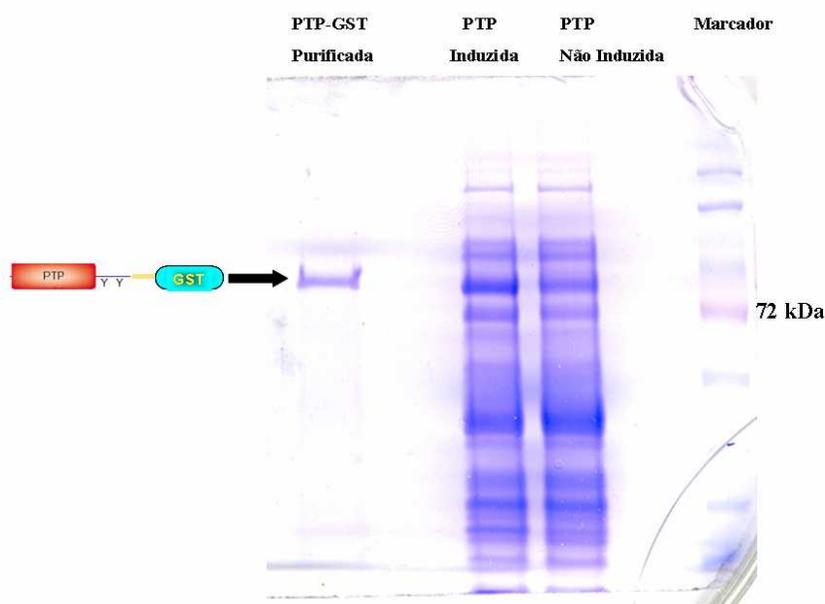


Figura 15- Foto de gel de poliacrilamida 12% de eletroforese por SDS-Page para análise da expressão da enzima recombinante PTP-GST. DH5α- pGex-3T: homogenato do lisado bacteriano de *E. coli* DH5α não induzido e induzido contendo plasmídeo e precipitado purificado.

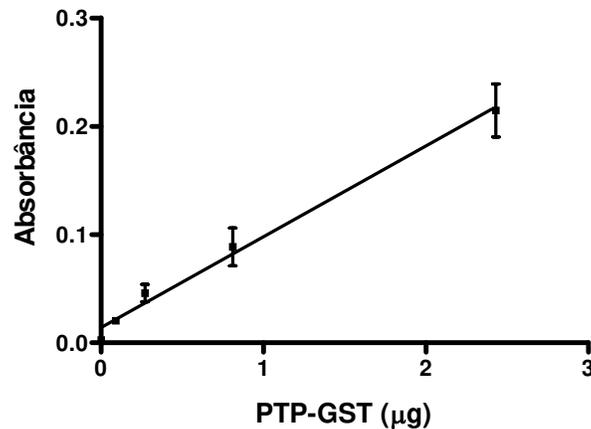


Figura 16- Gráfico representativo do comportamento enzimático da proteína recombinante.

Notar ao aumento linear da atividade da enzima, proporcional à sua concentração no meio; e o ponto de saturação da atividade para a dada quantidade de substrato, que se deu em torno de 3µg de quantidade de enzima para 200µM de substrato.

4.9- Efeito da atividade enzimática da SHP-2 sobre a fosforilação da FAK - Ensaio de desfosforilação da FAK *in vitro* pelo PTP-GST

Para a realização do ensaio de desfosforilação foram realizados experimentos utilizando-se técnicas de imunoprecipitação e western blot para determinar os níveis de expressão e fosforilação da FAK, bem como da expressão da SHP-2. Para a avaliação do efeito enzimático da SHP-2 sobre a fosforilação da FAK, extratos totais obtidos de ventrículo esquerdo controle ou daqueles submetidos à sobrecarga aguda por 60 minutos, foram incubados com anticorpos contra a porção C-terminal da FAK, obtendo-se assim os imunoprecipitados de FAK. Os imunoprecipitados de FAK foram incubados com PTP-GST recombinante e a reação neutralizada com tampão de lavagem. Em seguida, as proteínas da reação foram separadas através de eletroforese em gel SDS-poliacrilamida e western blot com anticorpo anti-FAK, anti-fosfo-específicos FAK 397.

Conforme demonstrado no Gráfico da Figura 17, os níveis de fosforilação da FAK diminuíram de forma expressiva nas amostras tratadas com a proteína recombinante (PTP) em relação aos controles (não-tratados), evidenciando que a SHP-2 tem atividade enzimática sobre a FAK hipofosforilada (miocárdio não submetido ao estímulo mecânico) e hiperfosforilada (miocárdio submetido ao estímulo mecânico) obtida do miocárdio de ratos. Não houve alteração das quantidades totais de proteínas no ensaio.

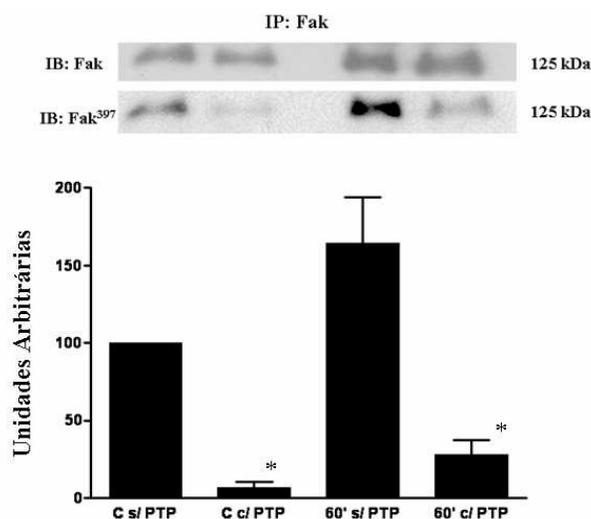


Figura 17- *Immunoblotting* representativo das quantidades totais de FAK e *Immunoblotting* e gráfico representativo da desfosforilação da FAK pelo PTP-GST *in vitro* em extrato de miocárdio de ratos controle e submetidos a sobrecarga mecânica por 60 minutos. Valores percentuais médios (n = 4).

* p < 0,05 comparado às amostras controle.

4.10- Efeito do tratamento de MVRNs com TFMS sobre atividade de tirosino-fosfatase de imunoprecipitados de anticorpos anti-SHP-2

Para a avaliação da efetividade da inibição da atividade enzimática da SHP-2 pelo inibidor seletivo TFMS, foram utilizados MVRNs, controle e tratados com TFMS na concentração de 1,8 μ M, por 45 minutos. Os extratos totais de MVRNs controle e tratados com TFMS foram imunoprecipitados com anti-SHP-2. Os imunoprecipitados foram

submetidos a ensaios de atividade de tirosino-fosfatases *in vitro* com substrato específico. Os resultados destes experimentos permitiram avaliar, de forma direta, a inibição da atividade de SHP-2 pelo inibidor seletivo, conforme demonstrado no gráfico Figura 18.

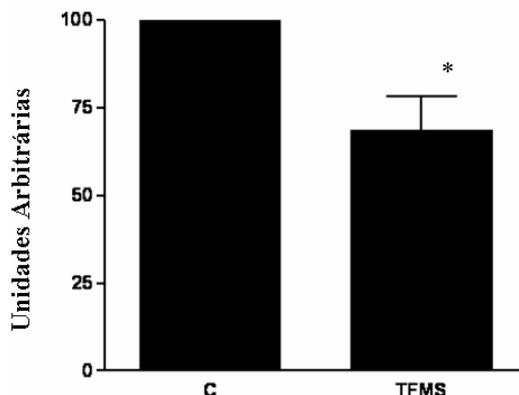


Figura 18- Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em MVRNs controles e tratados com TFMS. Valores percentuais médios (n = 4).

* p < 0,05 comparado à amostra controle.

4.11- Efeito da inibição farmacológica da atividade enzimática da SHP-2 *in vitro* sobre a fosforilação da FAK

Para a avaliação do efeito da inibição da atividade enzimática da SHP-2 sobre a fosforilação da FAK foram utilizados MVRNs controle e estirados por 10 e 60 minutos. Os cardiomiócitos foram tratados com TFMS (inibidor seletivo da SHP-2) na concentração de 1,8 μ M, por 45 minutos. Em seguida, os extratos totais dos cardiomiócitos tratados ou não com TFMS foram separados através de eletroforese em gel SDS-poliacrilamida e submetidos a western blot com anticorpos anti-fosfo-FAK Tyr-397.

Conforme demonstrado no Gráfico da Figura 19, os níveis de fosforilação da FAK no resíduo de tirosina 397 aumentaram expressivamente nas amostras controles tratadas com TFMS, em relação às células controle (não-estiradas) não tratadas,

evidenciando que a SHP-2 tem atividade regulatória sobre os níveis de fosforilação da FAK em cardiomiócitos de ratos. Ocorreu também aumento na fosforilação da FAK no resíduo tirosina 397 nas amostras estiradas por 10 e 60 minutos tratadas com TFMS em relação às amostras estiradas não tratadas. O aumento, no entanto foi menor já que a fosforilação da FAK nos cardiomiócitos já aumenta significativamente após o estiramento. Não houve alterações na expressão de FAK nas amostras.

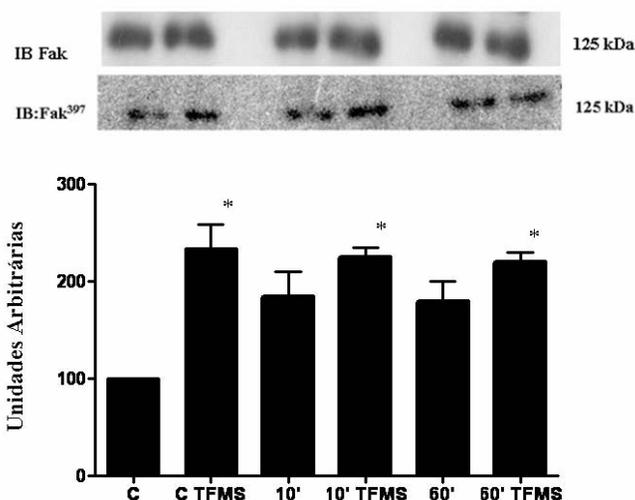


Figura 19- Immunoblotting e gráfico representativo da fosforilação da FAK em resíduo de tirosina 397 - MVRNs controle e estirados por 10 e 60 minutos, tratados ou não tratados com TFMS. Valores percentuais médios (n = 4).

* $p < 0,05$ comparado à amostra controle.

4.12- Efeito da inibição da atividade enzimática da SHP-2 *in vitro* sobre a associação FAK /SHP-2

Para a avaliação do efeito da inibição da atividade enzimática da SHP-2 sobre a associação FAK/SHP-2, foram utilizados MVRNs controle e tratados com TFMS (inibidor seletivo da SHP-2) na concentração de 1,8 μ M, por 45 minutos. Os extratos totais foram incubados com anticorpos contra a porção C-terminal da FAK, obtendo-se assim os imunoprecipitados de FAK. Em seguida os extratos totais dos cardiomiócitos tratados ou

não com TFMS foram separados através de eletroforese em gel SDS-poliacrilamida e submetidos a western blot com anticorpos anti-SHP-2.

Conforme demonstrado, no Gráfico da Figura 20, há uma tendência à diminuição da associação FAK/ SHP-2 nas amostras tratadas com TFMS em relação às células controle (não-estiradas) não tratadas, sugerindo que a atividade da SHP-2 tem papel regulatório sobre a associação FAK/SHP-2 em cardiomiócitos de ratos.

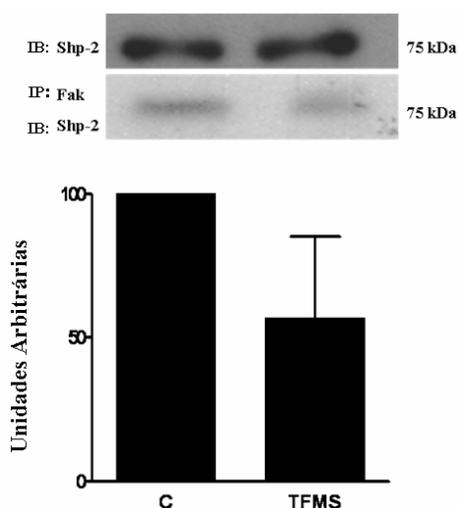


Figura 20- *Immunoblotting* representativo das quantidades totais de SHP-2 em MVRNs controle e submetidos ao tratamento com TFMS. Gráfico e *Immunoblotting* da associação entre FAK e SHP-2 em MVRNs controle e submetidos ao tratamento com TFMS. Gráfico representativo da associação FAK/SHP-2 em MVRNs controles e tratados com TFMS. Valores percentuais médios (n = 4).

4.13- Efeito do tratamento de MVRNs com inibidor farmacológico da FAK (PP2) sobre atividade de tirosino-fosfatase de imunoprecipitados de anticorpos anti-SHP-2

Para a avaliação da efeito do tratamento de MVRNs com PP2, sobre a atividade enzimática da SHP-2, foram utilizados MVRNs, controle e tratados com PP2 na concentração de 1,8 μ M, por 4 horas. Os extratos totais de MVRNs controle e tratados com

PP2 foram imunoprecipitados com anti-SHP-2. Os imunoprecipitados foram submetidos a ensaios de atividade de tirosino-fosfatases *in vitro* com substrato específico. Os resultados destes experimentos permitiram avaliar, de forma direta, a influência do uso de um inibidor da FAK sobre a atividade de SHP-2 em MVRNs, conforme demonstrado no gráfico Figura 21.

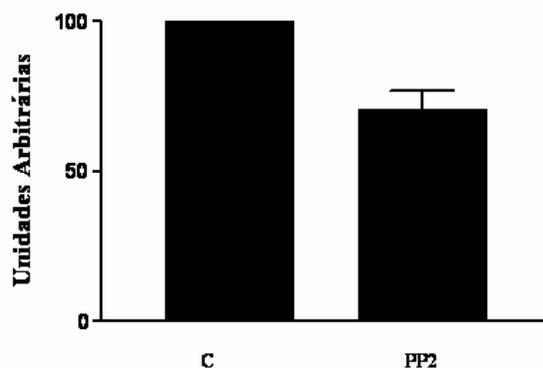


Figura 21- Gráfico representativo da atividade tirosino-fosfatase associada ao imunoprecipitado de anticorpo anti-SHP-2 em MVRNs controles e tratados com PP2. Valores percentuais médios (n = 2).

4.14- Efeito da inibição da atividade enzimática da SHP-2 pelo tratamento de MVRNs com TFMS sobre a expressão gênica de β -miosina

Para a avaliação do efeito da inibição da atividade enzimática da SHP-2 sobre a expressão de genes marcadores de hipertrofia, como o da β -miosina, foram utilizados MVRNs controle e tratados com TFMS (inibidor seletivo da SHP-2) na concentração de 1,8 μ M, por 4 horas. Conforme demonstrado na Figura 22, houve aumento substancial na expressão do gene da β -miosina quando a atividade da SHP-2 foi inibida farmacologicamente. Em adição, houve atenuação desse aumento quando a atividade da SHP-2 foi inibida simultaneamente à inibição farmacológica da atividade da FAK através do tratamento dos MVRNs com PP2.

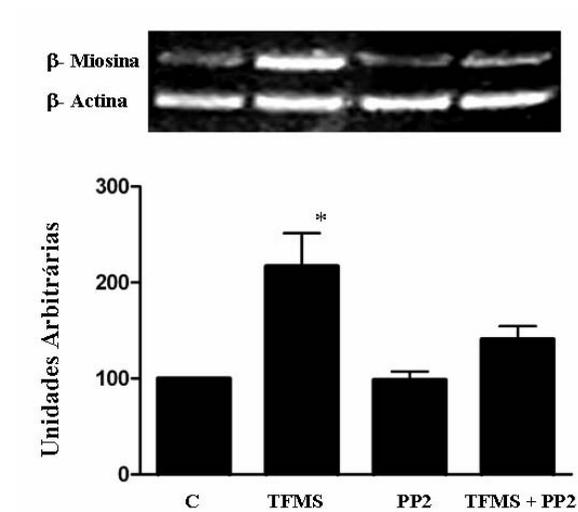


Figura 22- Gráfico e gel representativos da PCR da expressão gênica da β -miosina em MVRNs controle e submetidos ao tratamento com TFMS, PP2, e com TFMS + PP2. Valores percentuais médios (n = 6).

* $p < 0,05$ comparado à amostra controle.

DISCUSSÃO

No presente estudo examinamos o papel da atividade tirosino-fosfatase SHP-2 na modulação dos níveis de fosforilação em tirosina da FAK, em MVRNs submetidos ou não a estímulo mecânico (estiramento).

Nossos resultados mostraram que a FAK no estado basal (hipofosforilada), presente em cardiomiócitos não estirados encontra-se associada à SHP-2 e que mediante ao estímulo mecânico, que sabidamente aumenta a fosforilação em tirosina da FAK, ocorreu redução da associação FAK/SHP-2. Complementando esse dado, experimentos, nos quais foram utilizadas técnicas de imunohistoquímica, mostraram a co-localização da FAK e da SHP-2 em cardiomiócitos isolados e em cultura de ratos neonatos (MVRNs) controles (não estirados). Estes resultados sugerem que o aumento da fosforilação em tirosina da FAK, induzido pelo estímulo mecânico, deva-se, pelo menos em parte, à dissociação do complexo FAK/SHP-2. No intuito de avaliar se a associação FAK/SHP-2 tem relação com o estado de ativação da SHP-2, realizaram-se experimentos nos quais foi verificada a atividade de tirosino-fosfatase de imunoprecipitados de anticorpo anti-FAK e anti-SHP-2, de extratos totais de ventrículo esquerdo (VE) de ratos controle ou submetidos à sobrecarga pressora e também de MVRNs controle ou submetidos ao estiramento. Verificou-se que na situação controle (no VE e em MVRNs), na qual a FAK e SHP-2 estão associadas, há atividade de tirosino-fosfatase relacionadas ao imunoprecipitado de anticorpo anti-FAK e anti-SHP-2 e que nos imunoprecipitados obtidos de extratos totais de VE e de MVRNs submetidos ao estímulo mecânico, a atividade de tirosino-fosfatase relacionada a ambos imunoprecipitados estava relativamente diminuída.

Juntos, estes primeiros dados que mostram que a dissociação FAK/SHP-2 ocorre mediante estímulo mecânico e que esta dissociação é acompanhada da redução da atividade de tirosino-fosfatases, sugerem uma relação entre a atividade da SHP-2 e sua associação com a FAK.

O mecanismo pelo qual a SHP-2 exerce sua função, bem como seus alvos específicos na célula, ainda não estão bem elucidados. Nossos achados colocam em pauta os mecanismos responsáveis pela regulação da atividade da SHP-2 em cardiomiócitos e seu papel no controle de cascatas de sinalização.

A regulação da atividade da SHP-2 é feita através de um mecanismo de ligação e recrutamento da SHP-2 por proteínas que possuem sítios de Tyr fosforilados ou domínios ligantes como os SH2, que se ligam aos resíduos de tirosinas fosforilados da cauda C-terminal da SHP-2. No estado basal o domínio N-SH2 interage com o domínio PTP, em forma de “loop” prevenindo o acesso do substrato ao sítio catalítico. A ativação da SHP-2 tem sido descrita como dependente da ligação de uma proteína fosforilada em resíduo de tirosina nos domínio N-SH2. (Hof. et al, 1998; Feng, 1999; Neel, Lu, Pao, 2003). De acordo com esse modelo a relativa atividade basal alta da SHP-2 vista em MVRNs não estirados poderia ser devida ao recrutamento e ligação da SHP-2 a complexos de proteínas fosforiladas em tirosina. Proteínas de sinalização adaptadoras, como Gab1 (ligante associado 1 à Grb2) e a SHPS-1 (receptor glicoproteico), são conhecidos substratos da SHP-2 (Madruga et al, 1996). Por exemplo, a proteína adaptadora Gab1 que pode ser fosforilada em resíduos de tirosina por múltiplos receptores e não receptores tirosino-quinase, tem sido vista como interativa com a SHP-2 e mediadora dos efeitos dessa em cardiomiócitos (Nakaoka et al.; 2003), sendo que a SHP-2 torna-se muito ativa quando ligada a fosfo-tirosina, e particularmente quando ligada a Gab1 (Madruga et. al, 1996; Feng, 1999; Cunnick et al, 2000; Ren et al.,2004)

Contudo, a demonstração deste trabalho de que o tratamento dos cardiomiócitos não estirados com PP2 reduz a atividade associada ao imunoprecipitado de anti- SHP-2, pode indicar que a alta atividade fosfatase basal relativa da SHP-2 vista nessas células, está relacionada com a ativação local desta fosfatase, quando ligada à FAK fosforilada, pois apesar, do aumento da fosforilação da FAK ocorrer em resposta ao estímulo extracelular, esta mantém no estado basal, certo nível de fosforilação e atividade (Abedi, Dawes and Zachary; 1995)

Propomos que a dissolução da ligação existente entre FAK e SHP-2 ocorra mediante ao estímulo mecânico, induzida por uma mudança conformacional, ou pela desativação da SHP-2 através de um mecanismo de autodesfosforilação; O fenômeno de outodesfosforilação é característico dessa enzima quando não associada à uma proteína ligante (Lu, Shen, Cole, 2003; Araki, Nawa, Neel, 2003).

A dissociação FAK/SHP-2 permite que a FAK aumente sua autofosforilação no resíduo tirosina 397. Assim é possível que a baixa fosforilação da FAK em MVRNs não estirados, deva-se a ação enzimática de fosfatase da SHP-2 e que a dissociação dessas duas moléculas seja suficiente para que a FAK se auto-fosforile. Resultados obtidos em estudos nos quais foram realizados ensaios de desfosforilação da FAK pelo sítio ativo recombinante da SHP-2 (PTP-GST), corroboram a idéia de que a SHP-2 possivelmente regule a fosforilação da FAK de forma direta, através da ação fosfatase. Vimos que o PTP-GST foi capaz de desfosforilar a FAK nativa, em seu resíduo de tirosina 397, *in vitro*, sugerindo que o mesmo possa ocorrer *in vivo*.

Nossos estudos mostram que, mediante inibição farmacológica da atividade da SHP-2, a fosforilação da FAK em tirosina 397 aumenta em MVRNs não estirados. Mostramos ainda que a inibição da atividade da SHP-2 potencia a fosforilação da FAK induzida pelo estiramento em MVRNs. O uso do inibidor farmacológico da SHP-2 causou também uma diminuição da associação FAK/SHP-2 em cardiomiócitos não estirados. Esses dados reforçam ainda mais a hipótese de que a associação FAK/SHP-2 tem relação com o estado de atividade da SHP-2 no cardiomiócito e que esta última exerce papel regulatório negativo sobre os níveis de fosforilação da FAK. A redução da atividade da SHP-2 e da associação com a FAK, muito provavelmente, tem um papel permissivo e prolongador da fosforilação e ativação da FAK em cardiomiócitos submetidos ao estímulo mecânico.

Sugere-se que a intensa ativação da FAK pelo estímulo mecânico, seja dependente do recrutamento e agregação da FAK e da Src, que adicionalmente incrementa a atividade da FAK através de transfosforilação desta e pelo recrutamento de moléculas adicionais de FAK para regiões subcelulares específicas, dos cardiomiócitos (Franchini, 2000; Domingos, 2002; Torsoni, 2003). Nesse sentido, pode-se supor que em cardiomiócitos não estirados, o nível basal de fosforilação do complexo FAK/Src, ainda que baixo, poderia promover o recrutamento e ativação da SHP-2, que por sua vez, então, preveniria a agregação e ativação acentuada da FAK.

Dado o estímulo mecânico, a ativação simultânea de grande quantidade de moléculas de FAK e a dissociação da SHP-2 do complexo FAK/Src poderia exercer um papel permissivo no prolongamento da fosforilação da FAK.

O presente estudo pontua a possibilidade de que a redução da atividade fosfatase da SHP-2 em MVRNs estirados está de alguma forma relacionada com a redução de sua associação com a FAK e presumivelmente a proteínas regulatórias não conhecidas. Estudos futuros serão necessários para a confirmação desse mecanismo. Dessa maneira é possível que a influência basal negativa da SHP-2 sobre a fosforilação da FAK seja dependente de um mecanismo regulatório iniciado pela fosforilação local do complexo FAK/Src e o pronto recrutamento da SHP-2.

Estudos anteriores do laboratório mostraram que a ativação da FAK acompanha-se da indução da re-expressão de genes fetais, marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca, como o do ANP e da cadeia pesada da β -miosina e que a inibição da atividade da FAK através do tratamento de MVRNs com PP2 reduz a indução da expressão desse genes pelo estímulo mecânico (Torsoni et al., 2003a; Torsoni et al., 2005) Experimentos de RT-PCR de MVRNs tratados com TFMS demonstraram aumento de expressão do mRNA do gene próprio da vida fetal, da cadeia pesada da β -miosina. Assim, sugerimos que a interferência na sinalização celular que envolve a SHP-2 tem impacto sobre a reprogramação gênica característica da sinalização dos mecanismos envolvidos na gênese da hipertrofia cardíaca. Objetivando verificar se esse impacto foi mediado por alterações na ativação da FAK, causadas pela inibição da SHP-2, tratou-se concomitantemente, os MVRNs não estirados, com PP2 e TFMS. Vimos então, uma atenuação da indução da expressão de β -miosina., mediante à inibição da FAK simultânea à da SHP-2. Dessa forma, pode-se afirmar que a SHP-2 controla a atividade da FAK em cardiomiócitos, e que esse mecanismo regulatório, tem impacto sobre a re-expressão de genes fetais marcadores de hipertrofia cardíaca.

Dado que a FAK é um importante regulador da expressão gênica induzida por estímulo mecânico, serão abertas perspectivas de que o controle da atividade de SHP-2 possa influenciar de forma decisiva a resposta de cardiomiócitos ao estímulo mecânico. Será importante, neste caso, entender os mecanismos responsáveis pela redução da atividade da SHP-2 induzida pelo estímulo mecânico, bem como os mecanismos responsáveis pela redução na associação FAK/SHP-2. A interferência em tais mecanismos poderia contribuir para a inibição da hipertrofia de cardiomiócitos, sendo potencialmente útil como abordagem terapêutica em doenças cardíacas.

CONCLUSÃO

Com base em nossos achados, podemos concluir que:

A atividade SHP-2 regula a atividade da FAK em cardiomiócitos, modulando seus níveis de fosforilação, sendo importante na manutenção do estado hipofosforilado da FAK em células não estiradas e na manutenção do estado hiperfosforilado da FAK em células estiradas, influenciando a reprogramação gênica característica da ativação da sinalização hipertrófica, pelo menos em parte, através do controle da atividade da FAK.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Abedi H., Dawes K., and Zachary I. Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1995; 270: 11367-11376

Ahmad S, Banville D, Zhao Z, H Fischer E, Shen S H. A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; March 15; 90(6): 2197–2201.

Aikawa R., Nagai t. , Kudoh S., Zou Y. , Tanaka M., Tamura M., Akazawa H., Takano H. Nagai R., Komuro I. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension* 39: 233-238.

Allard JD, Chang HC, Herbst R, McNeill H , Simon MA. The SH2-containing tyrosine phosphatase corkscrew is required during signaling by sevenless, Ras1 and Raf . *Development* 1996; 122, 1137-1146

Araki T., Nawa H., Neel BG. Tyrosyl Phosphorylation of SHP-2 Is Required for Normal ERK Activation in Response to Some, but Not All, Growth Factors. *JBC* 2003; 278 (45):41677- 41684

Burrige K., Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12:463–519.

Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 1995; 15:954-963.

Calalb MB, Zhang X., Polte TR, Hanks SK. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228(3): 662-8.

Chien KR, and Olson EN. Converging pathways and principles in heart development and disease: *Cell* 2002;110:153–162.

Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell.* 1999; 98: 555-558.

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18:637–706

Cunnick Jess M., Dorsey Jay F., Munoz-Antonia Teresita, Mei Lin, Wu Jie Requirement of SHP2 Binding to Grb2-associated Binder-1 for Mitogen-activated Protein Kinase activation in Response to Lysophosphatidic Acid and Epidermal Growth Factor. *Biol Chem* 2000; 275: (18) 13842-13848.

Cunnick Jess M., Meng Songshu, Ren Yuan, Desponte Caroline , Wang Hong-Gang, Djeu Julie Y., Wu Jie. Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway by SHP2. *J Biol Chem* 2002; 277(11)9498-9504.

Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz WJr, Franchini KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2002; 282: H556–H564.

Epstein ND, Davis JS. Sensing stretch is fundamental. *Cell* 2003; 112:147–150.

Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 47-54.

Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB., Crosara-Alberto DP, Kobarg J, Franchini KG. Targeting to C-Terminal Myosin Heavy Chain May Explain Mechanotransduction Involving Focal Adhesion Kinase in Cardiac Myocytes. *Circ Res* 2005; 96: 73 - 81.

Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA., Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 2000; 87: 558-565.

Franchini KG. Hipertrofia Cardíaca: Mecanismos Moleculares. *Rev Brasileira de Hipertensão* 2001; 8: 125 – 142.

Freeman RM, Plutzky Jr, J, Neel BG. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of Drosophila corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(23): 11239–11243.

Frey N, Katus HA., Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? *Circulation*. 2004; 109: 1580 - 1589.

Grossman W, Jones D. & McLaurin. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975; 56: 56- 64.

Hamlet m. RJ, Perkins Lizabeth A. Analysis of Corkscrew Signaling in the Drosophila Epidermal Growth Factor receptor Pathway during Myogenesis. Genetics Society of America. 2001.

Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal Adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. Proc. Natl. Acad. Sci 1992; 89: 8487-8491.

Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S. Erc MJ., Shoelson SE. Crystal structure of tyrosine phosphatase SHP-2. Cell. 1998; 92: 441-450

Hoshijima M., Chien KR. Mixed signals in heart failure: cancer rules. J Clin Invest 2002; 109:849-855.

Inagaki K, Yamao T, Noguchi T, Matozaki T, FuKunaga K, Takada T, Tetsuya H, Akira S, Lacalle RA, Mira E, Gómez-Moutón C, Baranda S, Jiménez-, Martínez-A C., Mañes S. Specific SHP-2 partitioning in raft domains triggers integrin-mediated signaling via Rho activation . The Journal of Cell Biology 2002;157 (2): 1 15, 277–289

Itoh M, Yoshida Y, Nishida K, Narimatsu M, Hibi M, Hirano T. Role of Gab1 in Heart, Placenta, and Skin Development and Growth Factor- and Cytokine-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Activation . Mol Cell Biol. 2000; 20(10): 3695–3704.

Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. Physiol Rev 1998; 78: 763–781.

Katz AM. The cardiomyopathy of overload: A major determinant of prognosis in congestive heart failure. N Engl J Med 1990; 322:100-110.

Knoll R, Hoshijima M, and Chien K. Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. J Mol Med 2003.81:750–756.

Kodama A, Matozaki T, Fukuhara A, Kikyo M, Ichihashi M, TakaiY. Involvement of an SHP-2-Rho Small G Protein Pathway in Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor–induced Cell Scattering. Molecular Biology of the Cell 2000; 11: 2565–2575.

Kontaridis MI, Eminaga S, Fornaro M, Zito CI, Sordella R, Settleman J, Bennett AM. SHP-2 Positively Regulates Myogenesis by Coupling to the Rho GTPase Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 5340 - 5352.

Kuppuswamy D. Importance of integrin signaling in myocytes. *Circ Res* 2002; 90: 1240-1242.

Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in Cardiac Myocytes. *Ann N.Y Acad Sci* 2004; 1015:53-70

Lehr S, Kotzka J, Herkner A, Klein E, Snethoff C. Identification of tyrosine phosphorylation site in human Gab-1 protein by EGF receptor kinase in vitro. *Biochemistry* 1999 38: 151 -159

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli W. P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990, 322:1561-6.

Lin S-Yo, Shital R, Zhiyong Z, Michele D, Katherine A. Siminovitch, Donald R. Branch, and Beatrice H. The Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1 Regulates the Phosphorylation of α -Actinin. *J Biol Chem* 2004; 279: 25755-25764.

Lu W, Shen K, Cole PA Chemical dissection of the effects of tyrosine phosphorylation of SHP-2. *Biochemistry* 2003 13;42(18):5461-8

Madruga- Holgado M. Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK., Wong a J. A Grb2- associated docking protein in EGF-and insulin-receptor signaling. *Nature* 1996; 379: 560-564.

Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, Zhao ZJ, Lacalle RA, Martinez-AC. Concerted Activity of Tyrosine Phosphatase SHP-2 and Focal Adhesion Kinase in Regulation of Cell Motility. *Mol Cell Biol* 1999; 19(4): 3125 - 3135.

Mansour H, Tombe PP, Samarel AM, Russell B. Restoration of Resting Sarcomere Length After Uniaxial Static Strain Is Regulated by Protein Kinase C ϵ and Focal Adhesion Kinase. *Circ. Res.* 2004; 94: 642 - 649.

Martinka P, Fielitz J, Patzak A, Regitz-Zagrosek V, Persson PB, Stauss HM. Mechanisms of blood pressure variability-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in mice with impaired baroreflex. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2005; 288: 767 - 776.

Masato. SHPS-1 regulates integrin- mediated cytoskeletal reorganization and cell motility. *EMBO*. 2000; 19: 6721-6731.

Nadruz. JrW, Kobarg CB, Kobarg J, Franchini KG. C-Jun is regulated by a combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003.(b)

Nadruz. JrW., Kobarg CB, Constancio SS, Corat PDC, Franchini KG. Load-Induced Transcriptional Activation of c-jun in Rat Myocardium: Regulation by Myocyte Enhancer Factor 2. *Circ Res* 2003 ; 92: 243 - 251.(a)

Nakaoka Y. et al. Activation of gp130 Transduces Hypertrophic Signal Through Interaction of Scaffolding/Docking Protein Gab1 With Tyrosine Phosphatase SHP2 in Cardiomyocytes. *Circ Res*. 2003; 93:221-229.

Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(6): 284-93.

Nemoto S, Sheng Z, Lin A. Opposing effects of Jun Kinase and p38 mitogen-activated protein kinase on cardiomyocytes hypertrophy. *Mol Cell Biol*. 1999; 18: 3518-3526.

Oh E.-S., Gu H, Saxton TM., Timms JF, Hausdorff S, Frevert EU, Kahn BB, Pawson T, Neel BG, Thomas SM. Regulation of Early Events in Integrin Signaling by Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Mol Cell Biol* 1999; 19(4): 3205 - 3215.

Omens JH. Stress and strain as regulators of myocardial growth. *Prog Bioph and Molec Biol* 1998; 69:559-572.

Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto – and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion- dependent tyrosine phosphorylation of pyk2. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4806-4818.

- Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003; 116: 1409-1416.
- Peng Xu. et al. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2006, 116:217-227.
- Pham CG, Harpf AE, Keller RS, Vu HT, Shaw-Yung Shai., Loftus JC, Ross RS. Striated muscle-specific beta (1D) – integrin and Fak are involved in cardiac myocytes hypertrrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H2916- 2926
- Pixley FJ, Lee PSW, Condeelis JS, Stanley ER. Protein Tyrosine Phosphatase Φ Regulates Paxillin Tyrosine Phosphorylation and Mediates Colony-Stimulating Factor 1-Induced Morphological Changes in Macrophages. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 1795 - 1809.
- Polte TR., Hanks SK. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130^{Cas}) are elevated in cytoskeletal-associated fractions following adhesion and Src transformation: requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem.* 1997; 272:5501-5509.
- Rafiq K, Kolpakov MA, Abdelfettah M, Streblow DN, Hassid A, Dell'Italia LJ, and Sabri A. Role of protein tyrosine phosphatase SHP-2 in focal adhesion kinase downregulation during neutrophil cathepsin G-induced cardiomyocytes anoikis. *JBC, 2006 (In press)*
- Ren Y, Meng S, Mei L, Zhao ZJ, Jove R, Wu J. Roles of Gab1 and SHP2 in Paxillin Tyrosine Dephosphorylation and Src Activation in Response to Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem.* 2004 279: 8497-8505
- Rigacci S, Rovida E., Sbarba PD, Berti A. Low Mr Phosphotyrosine Protein Phosphatase Associates and Dephosphorylates p125 Focal Adhesion Kinase, Interfering with Cell Motility and Spreading. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 41631 - 41636.
- Russel B, Monthagh D, Ashley WW. Form Follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol.* 2000; 65: 45-79.
- Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:551-571.

Samarel Allen M. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *AJP – Heart* 2005;289:2291-2301.

Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR., Reynolds AB., Parson JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 5192- 5196.

Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A. and Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991, 83: 504–514.

Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med* 1997; 75:901-920.

Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71:435-478.

Schwaiger I., Sattler C, Hostetter DR, Rief M. The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nature Materials* 2002; 1:232-235.

Scopacasa BS, Teixeira VP, Franchini KG. Colchicine attenuates left ventricular hypertrophy but preserves cardiac function of aortic-constricted rats. *J Appl Physiol* 2003; 94:1627-1633.

Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen – activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125 FAK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259: 8-14.

Shen Y, Schaller MD. Focal Adhesion Targeting: The Critical Determinant of FAK Regulation and Substrate Phosphorylation. *Mol Biol Cell* 1999; 10(8): 2507 - 2518.

St. John Sutton M., Pfeffer MA, Plappert T. et al. for the SAVE Investigators. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89: 68–75.

Stoker AW. Protein tyrosine phosphatases and signaling. *J.Endocrinol* 2005; 185: 19 - 33.

Sugden PH. Ras, Akt, and Mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res.* 2003; 93: 1179-1192.

Sussman M., McCulloch A, Borg TK. Dance Band on the Titanic: Biomechanical Signaling in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* 2002; 91: 888 – 898.

Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: genetic and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005; 6: 45-68.

Tong WR, Hong KY, Wang Xu-D, Ling MY, Dragoi AM, Chung AS, Campbell AG, Han Zhi-Yong, Feng Gen-Sheng, Chin EY. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem.* 2002; 277: 47572 - 47580.

Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz Jr W, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003; 93: 140 – 147. (a)

Torsoni AS, Fonseca PM, Crosara-Alberto DP, Franchini KG. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284:C1411-C1419. (b)

Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, Franchini KG. RhoA/ Rock signaling is critical to Fak activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289: H1488 - H1496.

Tsuda m, Matozaki T, Fukunaga K, Fujioka Y, Imamoto A., Noguchi T, Takada T, Yamao T, Takega H, Ochi F, YAMAMOTO T, KASUGA M. Integrin-mediated Tyrosine Phosphorylation of SHPS-1 and Its Association with SHP-2. ROLES OF Fak AND Src FAMILY KINASES. *J Biol Chem* 1998; 273: 13223 - 13229

Tsutsumi R, Takahashi A, Takeshi A, Higashi H, and Hatakeyama M. Focal Adhesion Kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 Complexed with *Helicobacter Pylori* CagA *Mol Cell Biol,* 2006; 26(1): 261-276.

Vogel W, Lammers R, Huang J, Ullrich A. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* 1993 12; 259(5101):1611-4.

Wang FM, Liu HQ, Liu SR, Tang SP, Yang L, Feng GS. SHP-2 promoting migration and metastasis of MCF-7 with loss of E-cadherin, dephosphorylation of FAK and secretion of MMP-9 induced by IL-1beta in vivo and in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89(1): 5-14.

Wang H-B., Dembo M., Hanks SK, Wang Y-L. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 11295-11300.

Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 2004; 6(2): 154-61.

Wichert G. von, Haimovich B, Feng G.-S, Sheetz MP. Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *EMBO J* 2003; 22(19): 5023 - 5035.

Wilcox-Adelman, SA, Denhez, F, Goetinck PF. Syndecan-4 Modulates Focal Adhesion Kinase Phosphorylation. *J Biol Chem* 2002; 277: 32970-32977.

Woywodt A, Welzel J, Haase H, Duerholz A, Wiegand U, Potratz J, Sheikhzadeh A. Cardiomyopathic lentiginosis/ Leopard syndrome presenting as sudden cardiac arrest. *CHEST*. 1998; 113(5): 1415-1417.

Xu F, Zhao R, Peng Y, Guerrah A, Zhao ZJ. Association of Tyrosine Phosphatase SHP-2 with F-actin at Low Cell Densities. *J Biol Chem* 2001; 276(31): 29479 - 29484.

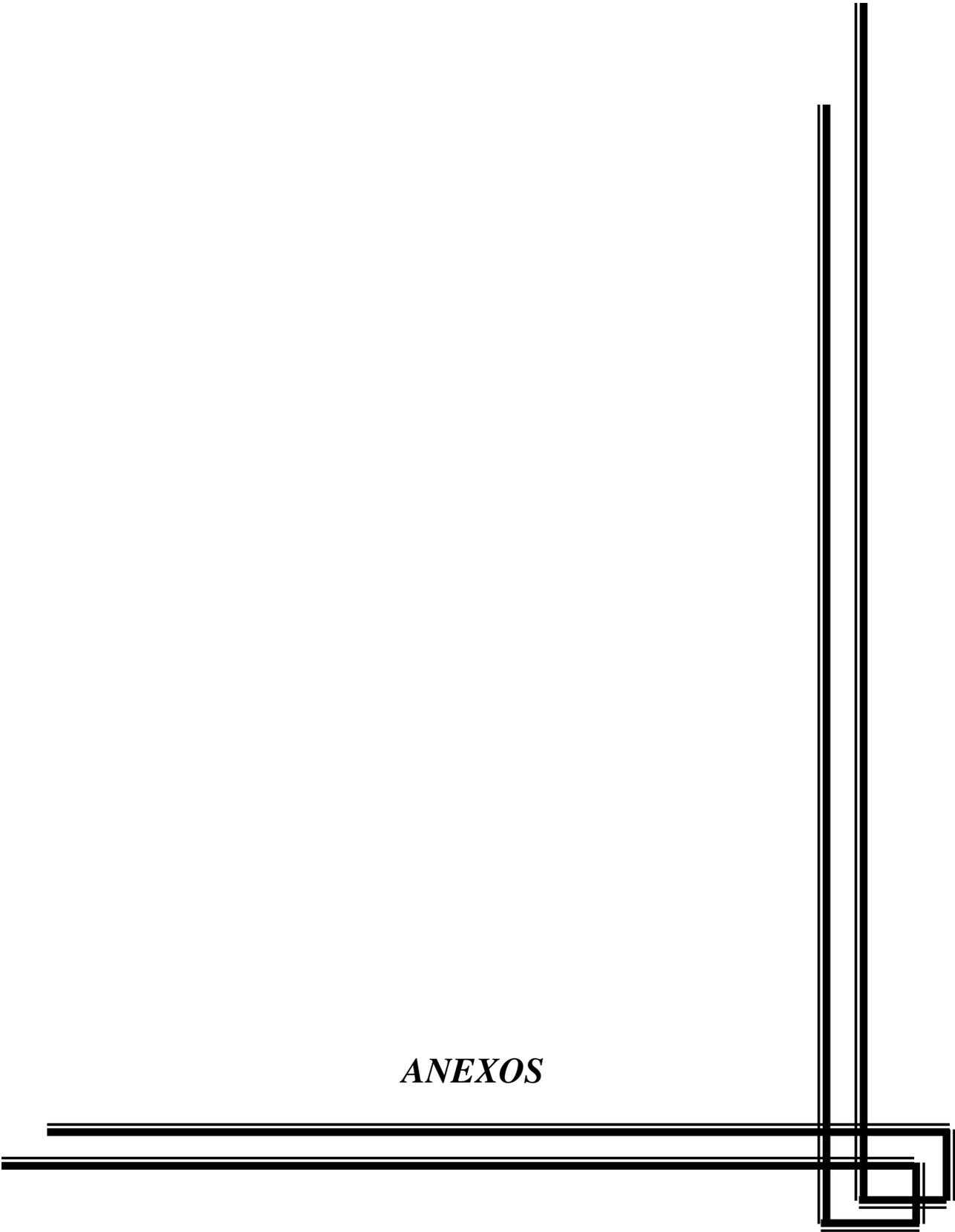
Yi XP, Wang X, Gerds AM, Li F. Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium. *Hypertension* 2003; 41:1317-1323.

Yu D-H, Qu. C-I, Henegariu O, Lu X, Feng G-S. Protein-tyrosine Phosphatase Shp-2 Regulates Cell Spreading, Migration, and Focal Adhesion. *J Biol Chem* 1998; 273: 21125 - 21131.

Zeng L, Si X, Yu W-P, Le HT, Ng KP, Teng RMH, Ryan K, Wang D. Z.-M, Ponniah S, Pallen CJ. PTP{alpha} regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol* 2003; 160(1): 137 - 146.

Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen G, Araki T, Luo J, Thompson JA, Schraven BL, Philips MR, Neel BG. Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell*. 2004 ; 13;13(3):341-55.

ANEXOS





RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes

Adriana S. Torsoni, Talita M. Marin, Lício A. Velloso and Kleber G. Franchini

Am J Physiol Heart Circ Physiol 289:1488-1496, 2005. First published May 27, 2005;
doi:10.1152/ajpheart.00692.2004

You might find this additional information useful...

This article cites 44 articles, 33 of which you can access free at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/289/4/H1488#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/289/4/H1488>

Additional material and information about *AJP - Heart and Circulatory Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpheart>

This information is current as of September 4, 2006 .

AJP - Heart and Circulatory Physiology publishes original investigations on the physiology of the heart, blood vessels, and lymphatics, including experimental and theoretical studies of cardiovascular function at all levels of organization ranging from the intact animal to the cellular, subcellular, and molecular levels. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2005 by the American Physiological Society. ISSN: 0363-6135, ESN: 1522-1539. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.



RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes

Adriana S. Torsoni, Talita M. Marin, Licio A. Velloso, and Kleber G. Franchini

Department of Internal Medicine, School of Medicine, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Submitted 13 July 2004; accepted in final form 9 May 2005

Torsoni, Adriana S., Talita M. Marin, Licio A. Velloso, and Kleber G. Franchini. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1488–H1496, 2005. First published May 27, 2005; doi:10.1152/ajpheart.00692.2004.—Focal adhesion kinase (FAK) has been shown to be activated in cardiac myocytes exposed to mechanical stress. However, details of how mechanical stimuli induce FAK activation are unknown. We investigated whether signaling events mediated by the RhoA/Rho-associated coiled coil-containing kinase (ROCK) pathway are involved in regulation of stretch-induced FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷ in neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs). Immunostaining showed that RhoA localized to regions of myofilaments alternated with phalloidin (actin) staining. The results of coimmunoprecipitation assays indicated that FAK and RhoA are associated in nonstretched NRVMs, but cyclic stretch significantly reduced the amount of RhoA recovered from anti-FAK immunoprecipitates. Cyclic stretch induced rapid and sustained (up to 2 h) increases in phosphorylation of FAK at Tyr³⁹⁷ and ERK1/2 at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴. Blockade of RhoA/ROCK signaling by pharmacological inhibitors of RhoA (*Clostridium botulinum* C3 exoenzyme) or ROCK (Y-27632, 10 μ mol/l, 1 h) markedly attenuated stretch-induced FAK and ERK1/2 phosphorylation. Similar effects were observed in cells treated with the inhibitor of actin polymerization cytochalasin D. Transfection of NRVMs with RhoA antisense oligonucleotide attenuated stretch-induced FAK and ERK1/2 phosphorylation and expression of β -myosin heavy chain mRNA. Similar results were seen in cells transfected with FAK antisense oligonucleotide. These findings demonstrate that RhoA/ROCK signaling plays a crucial role in stretch-induced FAK phosphorylation, presumably by coordinating upstream events operationally linked to the actin cytoskeleton.

mechanical stress; hypertrophy; cell signaling

INCREASED BIOMECHANICAL STRESS can drive changes in cardiac myocytes that are implicated in myocardial hypertrophy and failure (7, 19). Numerous signal transduction pathways have been shown to be activated in cardiac myocytes subjected to mechanical stimuli (35). Signals originating from multiple pathways converge intracellularly, leading to altered gene expression and protein synthesis, which result in the hypertrophic growth of cardiac myocytes. However, the mechanism by which mechanical forces are sensed and converted to biochemical signals remains largely unknown. Recent developments in this field indicate that the integrity of structures such as the Z disk, costamere, and intercalated disk is critically important to the ability of cardiac cells to appropriately respond to mechanical stress (4, 11, 21, 32, 37, 41). It has been hypothesized that such structures participate in monitoring of mechanical force

and in communication of strain to signaling molecules in cardiac myocytes (12, 29, 37).

Focal adhesion kinase (FAK), a tyrosine kinase linked to integrin signaling (15, 24, 42), has been shown to be rapidly activated by mechanical stimuli in cardiac myocytes (2, 5, 9, 12, 13, 23, 34, 39). Several lines of evidence support a role for FAK in the regulation of early gene transcription in response to hypertrophic agonists and mechanical stress (10, 22, 28, 38, 39), indicating that this kinase may coordinate the convergence of multiple signaling pathways involved in the hypertrophic growth of cardiac myocytes. However, the molecular mechanism responsible for FAK activation by mechanical stress in cardiac myocytes remains elusive. We recently showed (12, 39) that FAK activation by mechanical stress is accompanied by its aggregation at myofilaments, Z disks, and costameres, implying that this kinase might be directly activated by mechanical stress in cardiac myocytes. On the other hand, FAK activation in neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) by agonists such as endothelin has been demonstrated (16) to be dependent on activation of the RhoA/Rho-associated coiled coil-containing protein kinase (ROCK) signaling pathway, which drives the assembly and rearrangement of actin filaments. The demonstration that cytochalasin D, a potent inhibitor of actin polymerization, markedly attenuated endothelin-induced FAK phosphorylation (16) revealed the importance of the assembly of actin filaments in FAK activation by this agonist. Similarly, FAK activation by mechanical stress has been suggested to depend on a cooperative interaction with actin filaments (13, 39, 40), raising the possibility that FAK activation by mechanical stimuli may also be dependent on RhoA/ROCK signaling. Further support for this idea is provided by data (20, 40) indicating that RhoA and ROCK, similar to FAK, are rapidly but transiently activated by mechanical stress in cardiac myocytes. However, the role of RhoA/ROCK in activation of FAK by mechanical stress in cardiac myocytes has not been established.

Thus, to gain insight into the activation of FAK by mechanical stress in cardiac myocytes, we tested the hypothesis that the RhoA/ROCK signaling pathway plays a role in stretch-induced FAK activation in NRVMs. By preventing RhoA/ROCK signaling through pharmacological inhibition with C3 exoenzyme or transfection with the RhoA antisense oligonucleotide or the ROCK-specific inhibitor Y-27632, we showed that RhoA/ROCK signaling is critical to stretch-induced FAK activation as well as to regulation of stretch-induced expression of β -myosin heavy chain (β -MHC) in cardiac myocytes.

Address for reprint requests and other correspondence: K. G. Franchini, Dept. de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz,” 13081-970 Campinas, SP, Brazil (e-mail: franchin@unicamp.br).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Bioflex (Flex I) collagen culture plates were obtained from Flexcell International (catalog no. 35-P-1001C, type I); protein A conjugated with ^{125}I from Du Pont-New England Nuclear; Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), horse serum, and fetal bovine serum from GIBCO BRL; pancreatin and angiotensin II (ANG II) from Sigma; collagenase type II from Worthington; rabbit polyclonal antibodies to FAK and ERK1/2 and mouse monoclonal RhoA antibody from Santa Cruz Biotechnology; rabbit polyclonal antibodies to FAK phosphorylated at Tyr³⁹⁷ and ERK1/2 phosphorylated at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ from Biosource International; and cytochalasin D, *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme, Y-27632 (an ROCK inhibitor), and DuP-753 from Calbiochem. Oligonucleotides were synthesized by Life Technologies.

NRVM culture. Primary cultures of NRVMs from 1- to 2-day-old Wistar rats were prepared as previously reported (39). Briefly, the myocytes were purified on a discontinuous Percoll gradient, suspended in plating medium containing 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, and 0.5% penicillin-streptomycin, and plated in type I collagen Bioflex plates coated with gelatin at 5×10^5 cells/well. After 24 h, the medium was replaced with serum-free DMEM and incubated for 24–48 h under 95% air-5% CO₂ before use. NRVMs cultured in Bioflex plates were stretched in a Flexcell FX-3000 strain unit to 115% of resting length at a frequency of 1 Hz (0.5 s of stretch and 0.5 s of relaxation) for variable periods, depending on the protocol. Control nonstretched NRVMs were also cultured in Bioflex plates and incubated in serum-free medium. At the conclusion of the experimen-

tal protocols, cells were scraped from membranes and lysed for immunoblotting for analysis of β -MHC expression or fixed for confocal immunofluorescence analysis.

Immunoblotting. NRVMs were lysed in assay lysis buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 mM PMSF, and 0.25 mM Na₃VO₄). The samples were centrifuged for 20 min at 11,000 g, and the soluble fraction was resuspended in 50 μl of Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/ml bromophenol blue, 0.12 M Tris·HCl, pH 6.8, and 0.28 M β -mercaptoethanol) before separation on 8% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gels to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% skim milk-TBST buffer (10 mM Tris·HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20). Membranes were exposed to primary antibodies overnight at 4°C, washed in TBST, and exposed to ^{125}I -labeled protein A.

Subcellular fractionation. Subcellular fractionation was carried out as previously described (12) with modifications for use with NRVMs. Briefly, NRVMs were collected in solubilization buffer (0.32 M saccharose, 10 mM Tris·HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, and 0.1 mg/ml aprotinin) and homogenized by 10 passages of the cell suspension through a 26.5-gauge needle. The extracts were centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C to obtain the precipitates containing the nuclear fraction. The supernatant, which was enriched with membrane, myofibrils, and soluble proteins, was saved. Proteins of nuclear and supernatant fractions were quantified by the Bradford method.

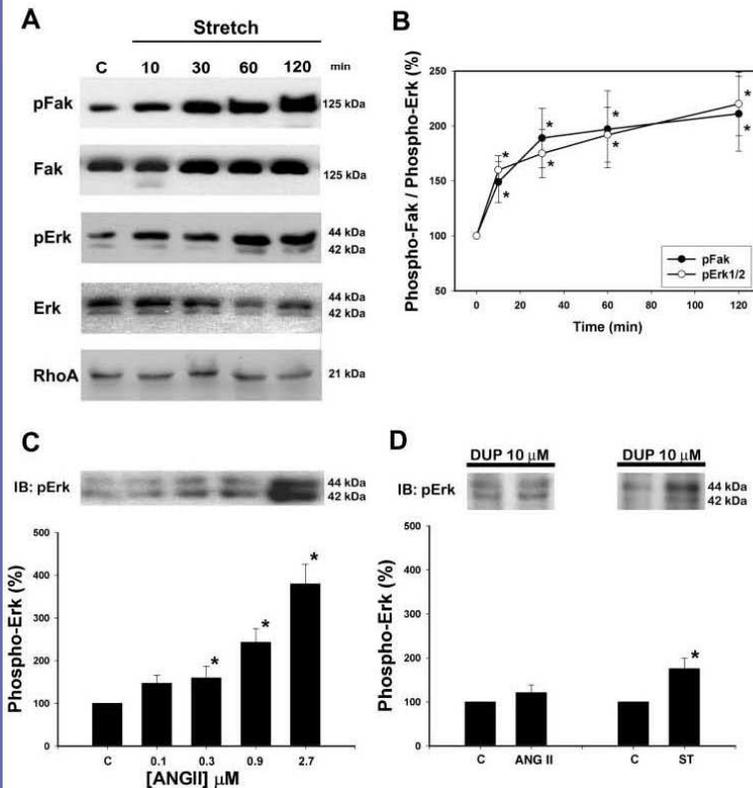


Fig. 1. Cyclic stretch-induced focal adhesion kinase (FAK) and ERK1/2 phosphorylation. Neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) were stretched to 115% for 10, 30, 60, and 120 min at 1 Hz. **A:** Western blots of whole cell extracts probed with antibodies that recognize RhoA, FAK phosphorylated at Tyr³⁹⁷ (pFAK), unphosphorylated FAK, ERK1/2 phosphorylated at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (pERK1/2), and unphosphorylated ERK1/2. **B:** densitometric analysis of 4 Western blot experiments performed with antibodies against pFAK and pERK1/2 normalized by total FAK and ERK1/2, respectively. **C:** representative immunoblot (IB) and results from scanning densitometry showing average (4 experiments) percent changes in amount of pERK1/2 in ANG II-treated cells compared with control (c). **D:** representative blots probed with pERK1/2 antibody and average results from densitometric analysis of NRVMs treated with ANG II (2.7 $\mu\text{mol/l}$) + DuP-753 (DuP, 10 $\mu\text{mol/l}$) and stretched to 115% for 30 min. * $P < 0.05$ compared with nonstretched cells.

Equal amounts of total protein were denatured after addition of Laemmli buffer and boiling at 100°C for 5 min and subjected to SDS-PAGE.

Oligodeoxynucleotides. FAK antisense oligodeoxynucleotide (ODN) was a 16-mer (5'-GATAAGCAGCTGCCAT-3') directed against initiation of the translation site of the rat FAK mRNA sequence. The FAK sense sequence (5'-CGGCTAACCGAAGTGA-3') was used as control. RhoA antisense ODN was a 16-mer (5'-TCCTGATGGCAGCCAT-3') directed against initiation of the translation site of the rat RhoA mRNA sequence. The RhoA sense sequence (5'-GTTAATCTTGCAGGTA-3') was used as control. All bases were phosphorothioate protected and obtained from Life Technologies. The sequences were confirmed in the GenBank database for uniqueness. Transfections of NRVMs with ODNs were performed as previously described (26). Cells were serum starved for 6 h and transfected with 1 $\mu\text{mol/l}$ antisense or sense ODN and 12 μg of Lipofectin in serum-starved DMEM without antibiotics (1 ml final volume) for 6 h. NRVMs were washed with DMEM and maintained in DMEM containing 10% serum for 18 h before use in experiments.

RT-PCR analysis. NRVMs were homogenized in TRIzol reagent, and total RNA was isolated by precipitation with isopropyl as previously described (26). A 5- μg aliquot of total RNA was used for cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified by PCR using *Taq* DNA polymerase with oligonucleotides derived from the β -MHC gene (5'-CCAACACCAACCTGTCCAAGTTC-3' and 5'-TGCAAAGGCTCCAGGCTGAGGGC-3') or β -actin gene (5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3' and 5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'). Oligonucleotides were synthesized by Life Technologies. The amplification conditions consisted of 25 cycles as follows: denaturing at 94°C for 2 min, annealing at 45°C (β -actin) and 54°C (β -MHC) for 1

min, and extension at 72°C for 2 min. PCR products were size fractionated with agarose gel electrophoresis. After the gels were stained with ethidium bromide, the DNA bands were visualized with a UV transilluminator.

Immunohistochemistry and laser confocal analysis. NRVMs were fixed with 4% paraformaldehyde and 4% sucrose in 0.1 mol/l phosphate-saline buffer, pH 7.4, for 15 min at room temperature. The slides were preincubated in blocking buffer (3% nonfat dry milk in 0.1 mol/l PBS) containing 0.6% Triton X-100 for 45 min at room temperature and incubated overnight with the primary monoclonal RhoA antibody and then with rabbit anti-mouse biotin-conjugated secondary antibody and streptavidin-Cy2 (1:500 in PBS) and rhodamine-conjugated phalloidin at 4°C. Positive immunoreactivity was visualized by laser confocal scanning (Zeiss LM510). In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

Statistical analysis. Data are presented as percent changes compared with controls. Densitometric readings were subjected to statistical analysis. Differences between the mean values of the densitometric readings were tested by ANOVA and Bonferroni's multiple-range test. $P < 0.05$ indicated statistical significance.

RESULTS

Cyclic stretch induces FAK and ERK1/2 activation in NRVMs. Cardiac myocytes were extracted from 1- to 2-day-old neonatal rats and cultured on silicone plates for 72 h before they were subjected to cyclic stretch (to 115% at 1 Hz) for 10–120 min. Cyclic stretch of NRVMs induced rapid (10 min) and sustained (up to 120 min) FAK and ERK1/2 activation (Fig. 1A), as indicated by increases in the amount of FAK and

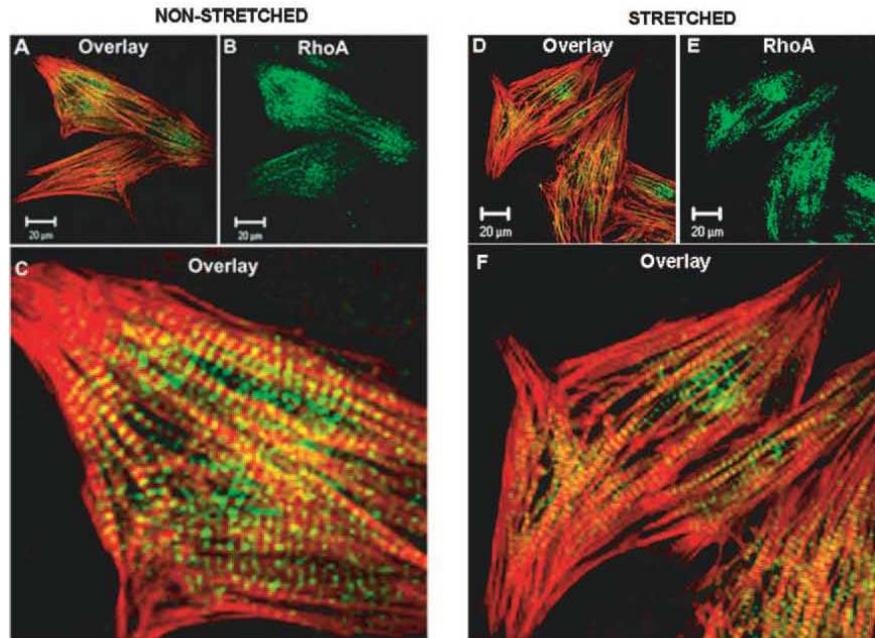


Fig. 2. RhoA localization in NRVMs. Nonstretched (A–C) and stretched (D–F) NRVMs were double labeled with RhoA antibody and rhodamine-conjugated phalloidin (actin filament labeling) and viewed under a laser confocal microscope.

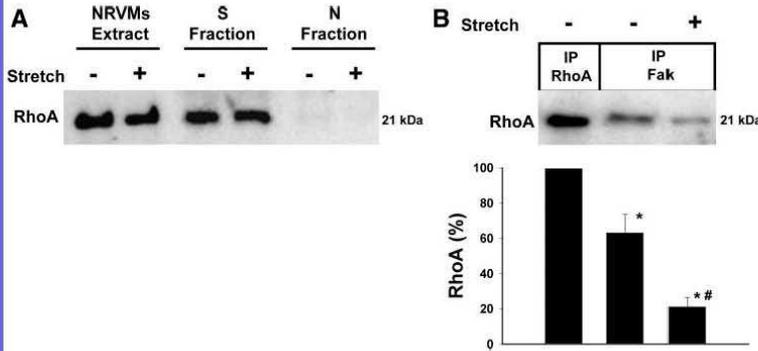


Fig. 3. *A*: representative blot of NRVM total extracts and subcellular fractions [nuclear (N) and cytosolic/membrane (S)] probed with RhoA antibody. Samples are pools of 6 wells. *B*: representative immunoblots obtained with RhoA antibody of anti-RhoA and anti-FAK immunoprecipitates (IP) from extracts of nonstretched NRVMs and NRVMs stretched for 120 min and average (4 individual experiments) results from densitometric analysis of anti-RhoA staining of anti-RhoA and anti-FAK immunoprecipitates. * $P < 0.05$ compared with anti-RhoA immunoprecipitate. # $P < 0.05$ compared with anti-FAK immunoprecipitate of nonstretched cells.

ERK1/2 detected by specific antibodies against FAK phosphorylated at Tyr³⁹⁷ and ERK1/2 phosphorylated at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴. The amount of FAK, ERK1/2, and RhoA did not change in stretched compared with nonstretched NRVMs. The percent changes in phosphorylation of FAK at Tyr³⁹⁷ and ERK1/2 at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ normalized by the amount of FAK and ERK1/2, respectively, are summarized in Fig. 1*B*.

ANG II may act as an autocrine/paracrine mediator of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy (1, 31). FAK and RhoA have been shown to be activated in response to G

protein-coupled receptor agonists, including ANG II (10, 16, 33). We recently showed that FAK phosphorylation induced by cyclic stretch still activates FAK in NRVMs treated with the AT₁ receptor antagonist DuP-753, indicating that stretch and ANG II activate FAK by distinct mechanisms (39). We examined whether ANG II mediates the activation of ERK1/2 phosphorylation at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ induced by cyclic stretch in NRVMs. ANG II induced concentration-dependent increases of ERK1/2 phosphorylation in NRVMs (Fig. 1*C*). This effect was completely inhibited by addition of the AT₁ receptor-

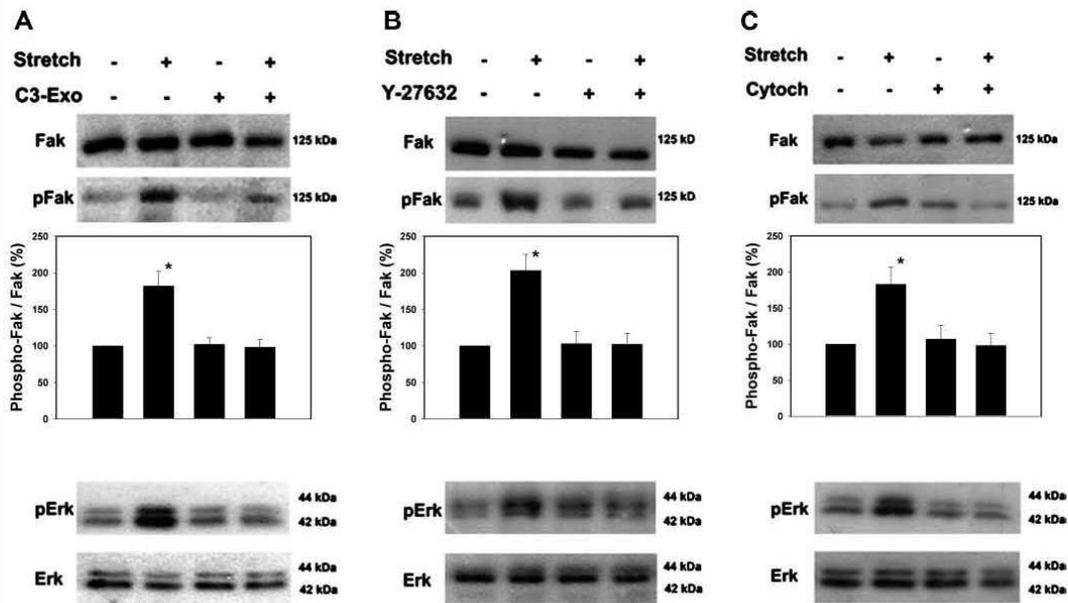


Fig. 4. Inhibition of RhoA/ROCK signaling reduces stretch-induced FAK and ERK1/2 activation in NRVMs. *A*: representative Western blots performed with FAK, pFAK, ERK1/2, and pERK1/2 antibodies in cells treated with the RhoA inhibitor *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme (C3-Exo) and average (5 experiments) results from densitometric analysis with pFAK antibody normalized by total FAK. *B*: representative Western blots performed with FAK, pFAK, ERK1/2, and pERK1/2 antibodies in cells treated with the ROCK inhibitor Y-27632 and average (4 experiments) results from densitometric analysis performed with pFAK antibody normalized by total FAK. *C*: representative Western blots performed with FAK, pFAK, ERK1/2, and pERK1/2 antibodies in cells treated with the inhibitor of actin organization cytochalasin D (Cytoch) and average (4 experiments) results from densitometric analysis performed with pFAK antibody normalized by total FAK. * $P < 0.05$ vs. untreated nonstretched cells.

specific antagonist DuP-753 (10 $\mu\text{mol/l}$, 1 h) to the culture medium, indicating that ANG II-induced ERK1/2 phosphorylation occurred via AT₁ receptor-dependent signaling (Fig. 1D). Cyclic stretch still increased ERK1/2 phosphorylation at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ in DuP-753-treated NRVMs, although it was markedly attenuated compared with the response in untreated cells (Fig. 1D).

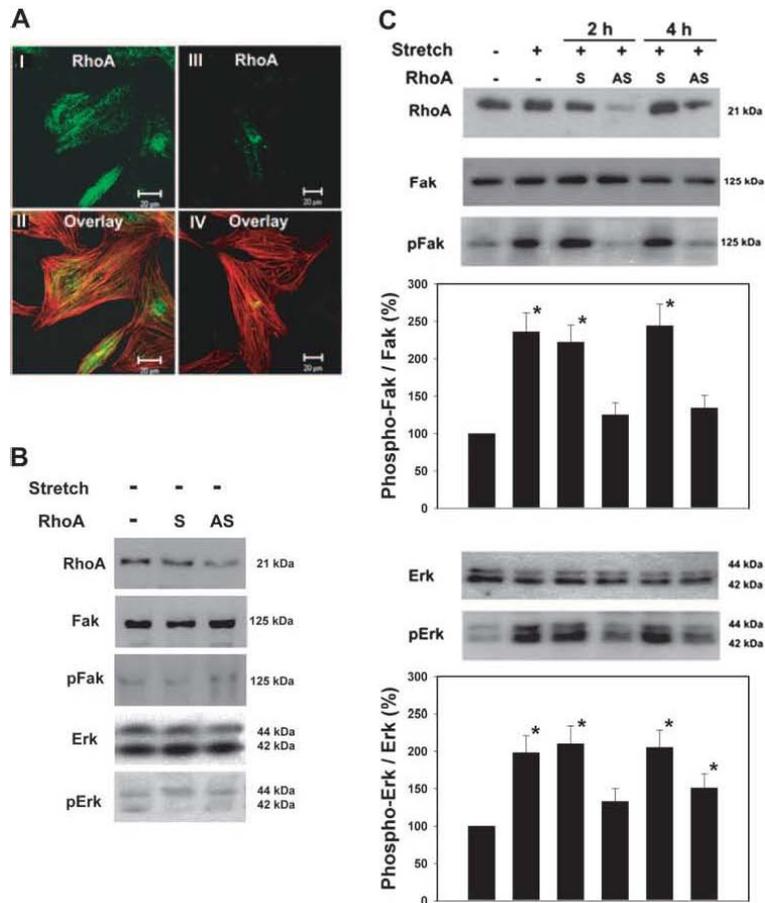
FAK and RhoA are associated in nonstretched NRVMs. FAK phosphorylation by 30 min of cyclic stretch is accompanied by its aggregation at myofilaments of NRVMs (39). We examined RhoA localization and distribution in nonstretched and stretched NRVMs. A representative example of NRVMs double stained with RhoA antibody and rhodamine-conjugated phalloidin is shown in Fig. 2, A–C. Anti-RhoA staining shows a sarcomeric striated pattern alternated with actin labeling, suggesting its localization in the A bands or the nearby structures. In stretched cells, anti-RhoA staining still showed a sarcomeric striated pattern alternated with actin labeling, but a distinct staining of nuclear or perinuclear areas was also observed. To further examine the subcellular distribution of

RhoA in NRVMs, we performed immunoblotting analysis of subcellular fractions. RhoA could not be detected in the nuclear fraction of nonstretched or stretched cells (Fig. 3A), indicating that the anti-RhoA staining in the nuclear area of stretched NRVMs is probably due to a perinuclear location.

The association of RhoA and FAK was indicated by the demonstration that, in extracts of nonstretched NRVMs, FAK is coimmunoprecipitated with RhoA. Cyclic stretch lasting for 120 min was accompanied by a reduction in the association of FAK with RhoA (Fig. 3B). Comparisons with the amount of RhoA precipitated with RhoA antibody allow us to estimate that ~60% of RhoA is associated with FAK in nonstretched NRVMs.

FAK activation by stretch is dependent on RhoA activity. We next examined the effect of C3 exoenzyme on FAK activation induced by mechanical stress in NRVMs. C3 exoenzyme selectively ADP-ribosylates small G proteins of the Rho subfamily at Asn⁴¹, thereby blocking their action (17). Although pretreatment with C3 exoenzyme had no effect on basal FAK phosphorylation, it markedly inhibited the stretch-induced

Fig. 5. RhoA antisense oligodeoxynucleotide (ODN) attenuates stretch-induced FAK and ERK1/2 activation in NRVMs. **A:** laser confocal analysis of control (*I* and *II*) and antisense-transfected (*III* and *IV*) NRVMs double labeled with phalloidin and RhoA antibody and cultured in medium containing serum for 18 h. **B:** representative immunoblots of extracts from nonstretched and stretched NRVMs transfected with antisense and sense RhoA ODNs and exposed to RhoA, FAK, pFAK, ERK1/2, and pERK1/2 antibodies and average (3 experiments) results from densitometric analysis performed with pFAK and pERK1/2 antibodies normalized by total FAK and ERK1/2, respectively. * $P < 0.05$ vs. nontransfected nonstretched cells.



FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷ (Fig. 4A). Notably, inhibition of FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷ by cyclic stretch in NRVMs was accompanied by a reduction in stretch-induced ERK1/2 phosphorylation at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴.

Next, we investigated whether signaling by ROCK, a RhoA downstream serine kinase involved in the actin filament organization, mediates stretch-induced activation of FAK in NRVMs. The cells were pretreated with the selective ROCK inhibitor Y-27632 (10 μ mol/l) for 1 h and then stretched for 30 min. Stretch-induced FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷ was markedly reduced after Y-27632 treatment (Fig. 4B), but no change was observed in basal FAK phosphorylation or expression compared with untreated cells. ERK1/2 phosphorylation at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ was also markedly reduced in stretched myocytes treated with Y-27632.

Because in nonmyocyte cells RhoA/ROCK signaling has been implicated in the organization of stress fibers (17), we next examined the influence of cytochalasin D, which induces actin filament disassembly, in the stretch-induced FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷. NRVMs pretreated with cytochalasin D exhibited a marked reduction in stretch-induced FAK and ERK1/2 phosphorylation (Fig. 4C).

We further examined the role of RhoA proteins in stretch-induced FAK activation by transfecting NRVMs with RhoA antisense. The effectiveness of RhoA oligonucleotide antisense was demonstrated by its ability to specifically reduce RhoA expression in NRVMs. Immunofluorescence (Fig. 5A) and immunoblotting (Fig. 5, B and C) analysis showed that transfection with RhoA antisense markedly reduced the expression of RhoA in NRVMs but did not change the morphology or viability of NRVMs. Transfection with RhoA antisense or sense did not change FAK or ERK1/2 baseline expression and phosphorylation (Fig. 5B). The reduction of RhoA expression by RhoA antisense oligonucleotide markedly reduced the stretch-induced phosphorylation of FAK at Tyr³⁹⁷ and ERK1/2 at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (Fig. 5C).

Figure 6 summarizes the effect of transfection with FAK sense or antisense oligonucleotides on stretch-induced phosphorylation of FAK at Tyr³⁹⁷ and ERK1/2 at Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ in NRVMs. Transfection with FAK sense oligonucleotide did not change the stretch-induced FAK or ERK1/2 phosphorylation compared with data presented in Fig. 1B. Transfection with FAK antisense oligonucleotide significantly reduced FAK expression, abolished stretch-induced FAK phosphorylation, and markedly attenuated ERK1/2 phosphorylation.

RhoA and FAK influence stretch-induced hypertrophic gene activation. To test the role of RhoA and FAK in the stretch-mediated hypertrophic response of NRVMs in vitro, we examined the influence of transfections with RhoA or FAK antisense oligonucleotides on expression of the β -MHC transcript. RhoA or FAK sense and antisense oligonucleotides did not change baseline expression of the β -MHC transcript in nonstretched NRVMs (Fig. 7A). Cyclic stretch for 2–4 h markedly increased the amount of the β -MHC transcript expressed by NRVMs (Fig. 7B). Transfection with RhoA or FAK antisense oligonucleotides significantly reduced the stretch-induced expression of β -MHC in NRVMs, whereas transfection with sense oligonucleotides did not change the stretch-induced expression of β -MHC in NRVMs.

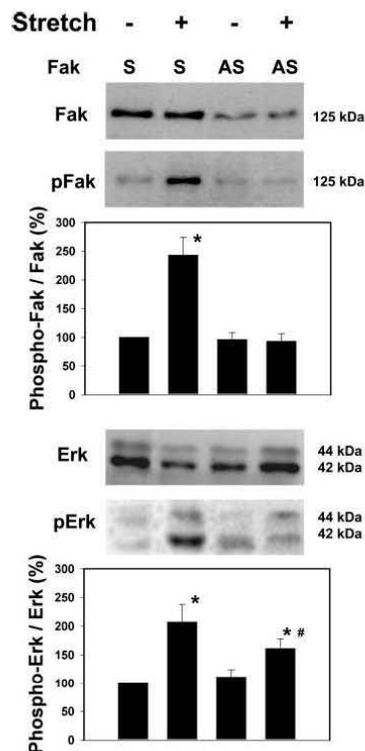
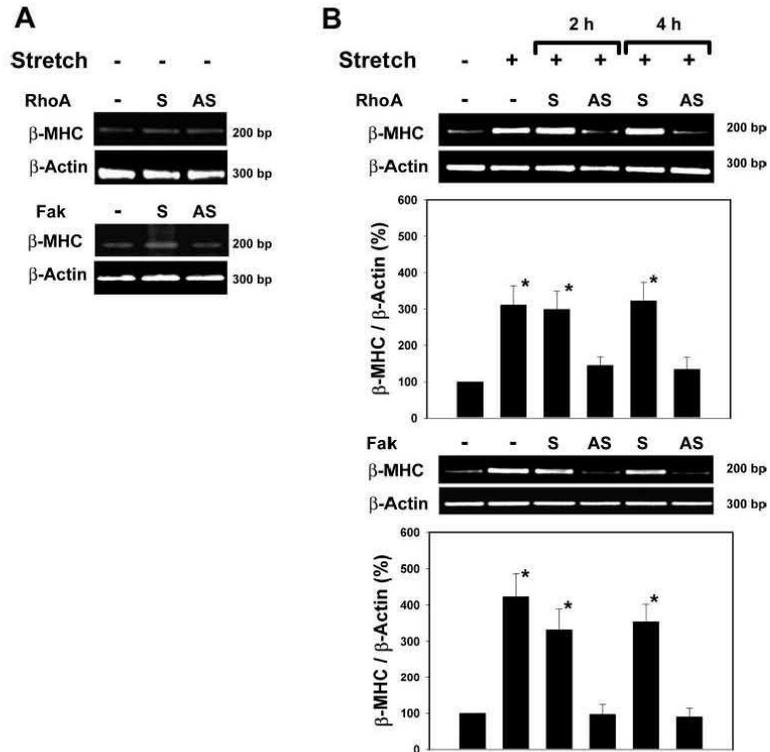


Fig. 6. FAK antisense ODN reduces stretch-induced FAK and ERK1/2 phosphorylation. Representative Western blots performed with FAK, pFAK, ERK1/2, and pERK1/2 antibodies with extracts of nonstretched or stretched NRVMs transfected with FAK sense or antisense ODNs and average (4 experiments) results of densitometric analysis of Western blots performed with pFAK and pERK1/2 antibodies normalized by total FAK and ERK1/2, respectively. * $P < 0.05$ vs. sense ODN-transfected nonstretched cells. # $P < 0.05$ vs. antisense ODN-transfected nonstretched cells.

DISCUSSION

Here we show that stretch-induced FAK activation in NRVMs is controlled by the RhoA/ROCK signaling pathway. This finding is supported by our demonstration that 1) prevention of RhoA signaling by the selective Rho inhibitor *C. botulinum* C3 exoenzyme or reduction of RhoA expression by transfecting cells with RhoA oligonucleotide antisense markedly attenuated stretch-induced FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷ in NRVMs and 2) treatment of NRVMs with the ROCK pharmacological inhibitor Y-27632 markedly attenuated stretch-induced FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷. The interaction of RhoA and FAK was further supported by the demonstration that RhoA can be recovered from anti-FAK immunoprecipitates. Stretch-induced FAK phosphorylation was also reduced by cytochalasin D, suggesting that the influence of RhoA/ROCK signaling on FAK activation is dependent on the integrity of nonsarcomeric actin filaments. Additionally, it was shown that inhibition of FAK or RhoA signaling, by specific antisense oligonucleotides, attenuated the stretch-induced expression of

Fig. 7. RhoA and FAK antisense ODNs block stretch-induced β -myosin heavy chain (β -MHC) mRNA expression in NRVMs. *A*: RT-PCR of β -MHC and β -actin mRNA in nonstretched NRVMs transfected with RhoA or FAK sense or antisense ODNs. *B*: RT-PCR of β -MHC and β -actin mRNA in nonstretched and stretched NRVMs transfected with RhoA sense or antisense ODNs and average (3 experiments) results of densitometric analysis of β -MHC normalized by β -actin. * $P < 0.05$ vs. nontransfected nonstretched cells.



β -MHC mRNA in NRVMs, supporting the idea that RhoA/ROCK and FAK signaling cooperate in the control of hypertrophic gene expression in response to mechanical stress in cardiac myocytes.

RhoA/ROCK signaling influences FAK activation by cyclic stretch. Similar to FAK, RhoA has been shown to be rapidly activated by mechanical stress in cardiac myocytes (1, 20, 39). Our present data indicate that RhoA/ROCK signaling is upstream from stretch-induced FAK activation in NRVMs. Accordingly, in nonmyocyte cells, RhoA activation increases, whereas its inhibition attenuates, FAK phosphorylation (8). This also agrees with previous data indicating that FAK mediates the effects of RhoA signaling triggered by constitutively active RhoA or activation of G protein-coupled receptors in cardiac myocytes (16, 43). Given that the RhoA/ROCK signaling pathway regulates the assembly of stress fibers (17), it is conceivable that the marked reductions of stretch-induced FAK phosphorylation in NRVMs treated with RhoA/ROCK inhibitors or cytochalasin D are related to a common impairment in the assembly of actin filaments. This implies that stretch- or agonist-induced FAK phosphorylation in NRVMs is dependent on the organization and, presumably, contractility of actin stress fibers. Although NRVMs lack bona fide actin stress fibers, they possess a highly developed actin cytoskeletal meshwork closely related to sarcomeres, organelles, and sarcolemma (6, 30, 32); therefore, it is possible that, on mechan-

ical stress, actin reorganization would drive FAK recruitment at specific subcellular sites. This idea is supported by data (8) indicating that actin filaments play an essential role in the recruitment of FAK and other signaling molecules to specific subcellular structures and also by our previous demonstration that FAK phosphorylation is accompanied by its clustering at subcellular structures such as myofilaments, Z disks, and costameres (12, 39). Further studies are necessary to determine how mechanical stress and RhoA/ROCK signaling promote the remodeling of actin filaments and contribute to FAK phosphorylation and relocation in cardiac myocytes.

Anti-RhoA staining was found to be intercalated with actin staining in nonstretched and stretched NRVMs, suggesting that RhoA is localized at the sarcomeric A bands. In stretched cells, anti-RhoA staining was also found in the area of the cell nucleus, indicating that RhoA might be located at nuclear or perinuclear sites in stretched NRVMs. Immunoblotting analysis of NRVM fractions showed that RhoA could not be detected in the nuclear fraction, indicating that RhoA is probably located at perinuclear structures in stretched cells. These data indicate that the location of RhoA in stretched NRVMs contrasts to the previously demonstrated location of FAK, in that RhoA staining seems to show no major change in its location in stretched compared with nonstretched cells. This indicates that activation by mechanical stress is not accompanied by major changes in the distribution of RhoA in cardiac myocytes.

This assumption is further supported by our demonstration that cyclic stretch reduced the amount of RhoA in the precipitates of FAK antibody. This also agrees with data from a previous study (18) indicating that, on activation, RhoA, as well as ROCK, is recruited to local actin stress fibers (18). In contrast, a recent study (20) showed that a significant fraction of RhoA is localized in purified caveolae and that stretch results in the dissociation of RhoA from the caveolar fraction of NRVMs. Differences in the experimental approach, i.e., immunostaining vs. biochemical separation, and the relatively low resolution of immunofluorescence to detect minor displacement of proteins in cells might explain the apparent discrepancy in the results.

Regulation of stretch-induced hypertrophic genes by RhoA/FAK signaling. We have shown that RhoA signaling plays a critical role in stretch-induced expression of β -MHC. In addition, the demonstration that inhibition of RhoA/ROCK signaling markedly attenuated stretch-induced FAK activation and that FAK antisense oligonucleotide induced a comparable reduction of stretch-induced expression of β -MHC supports the idea that FAK mediates the influence of RhoA on stretch-induced gene expression in NRVMs. Previous studies showed that RhoA (1, 20, 25, 43) and FAK (22, 38, 39) control expression of the fetal gene atrial natriuretic factor in cardiac myocytes in response to hypertrophic agonists and mechanical stress. Collectively, these data are consistent with a critical role for RhoA/ROCK and FAK signaling in promoting expression of the hypertrophic genetic program by mechanical stress in cardiac myocytes.

The present results also outline a pathway involving RhoA/ROCK and FAK as upstream mediators of stretch-induced ERK1/2 phosphorylation. Additionally, we have demonstrated that the mechanisms implied in stretch-induced ERK1/2 activation do not depend on AT₁ receptor activation. This suggests that the activation of this pathway by mechanical stress is not dependent on autocrine/paracrine mechanisms mediated by ANG II. RhoA (1, 10, 20, 27, 44) and FAK (9, 13) signaling have been implicated in the regulation of ERK1/2 and other MAP kinases. However, the role of RhoA signaling in mediating stretch-induced ERK1/2 activation in cardiac myocytes is controversial. It has been shown (20) that inhibition of RhoA signaling by disruption of its proper location on caveolae does not prevent ERK1/2 phosphorylation by steady stretch. Similar to our present data, it was recently demonstrated (27) that RhoA is an important regulator in mediating the phosphorylation of ERK1/2 by cyclic stretch in NRVMs. Thus discrepancies in the results concerning the role of RhoA signaling on stretch-induced ERK1/2 activation might be dependent on differences in signal transduction pathways elicited by steady vs. cyclic stretch.

ERK1/2 have been implicated as important transducers of the hypertrophic growth response in cell culture-based studies and in the intact heart (14, 31, 35, 36). Our present data suggest a role for ERK1/2 in mediating the effects of RhoA/ROCK and FAK signaling pathways in regulation of the stretch-induced expression of β -MHC in NRVMs. One potential mechanism whereby this signaling pathway promotes hypertrophy is by regulating activation of GATA4, a cardiac-expressed transcription factor, which has been demonstrated to be involved in cardiac hypertrophy and is directly regulated by ERK1/2 and p38 MAP kinase signaling effectors (3). A linkage between RhoA/ROCK and ERK1/2/GATA-4 pathways has been shown

in myocardial cell hypertrophy (44). However, the present results do not exclude the possibility that multiple downstream effectors are involved in the influence of FAK on early gene regulation in response to mechanical stress.

In conclusion, the present report demonstrates that RhoA/ROCK signaling plays a critical role in FAK activation by mechanical stress in cardiac myocytes. Furthermore, the demonstration here that RhoA and FAK signaling control the stretch-induced expression of β -MHC in NRVMs indicates that RhoA and FAK are key elements in the regulation of the hypertrophic genetic program in cardiac myocytes in response to mechanical stress. The relative importance of these mechanisms in phenotypic myocardial changes, such as hypertrophy and heart failure, needs further investigation.

GRANTS

This study was sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grants 00/05137-4 and 01/11698-1 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grants 521098/97-1.

REFERENCES

1. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Zhu W, Kadowaki T, and Yazaki Y. Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Circ Res* 84: 458–466, 1999.
2. Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, and Komuro I. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension* 39: 233–238, 2002.
3. Akazawa H and Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92: 1079–1088, 2003.
4. Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, and Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88: 393–403, 1997.
5. Bayer AL, Heidkamp MC, Patel N, Porter MJ, Engman SJ, and Samarel AM. PYK2 expression and phosphorylation increases in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H695–H706, 2002.
6. Calaghan SC, Le Guennec JY, and White E. Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 84: 29–59, 2004.
7. Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell* 98: 555–558, 1999.
8. Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, and Hynes RO. Integrin-mediated signals regulated by members of the Rho family of GTPases. *J Cell Biol* 142: 573–586, 1998.
9. Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz W Jr, and Franchini KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H556–H564, 2002.
10. Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, and Samarel AM. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1695–H1707, 2000.
11. Epstein ND and Davis JS. Sensing stretch is fundamental. *Cell* 112: 147–150, 2003.
12. Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J, and Franchini KG. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ Res* 96: 73–81, 2005.
13. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, and Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 87: 558–565, 2000.
14. Gillespie-Brown J, Fuller SJ, Bogoyevitch MA, Cowley S, and Sugden PH. The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 270: 28092–28096, 1995.



15. Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, and Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8487–8491, 1992.
16. Heidkamp MC, Bayer AL, Scully BT, Eble DM, and Samarel AM. Activation of focal adhesion kinase by protein kinase C- ϵ in neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1684–H1696, 2003.
17. Kaibuchi K, Kuroda S, and Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68: 459–86, 1999.
18. Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, and Fujiwara K. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol* 153: 569–584, 2001.
19. Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med* 121: 363–371, 1994.
20. Kawamura S, Miyamoto S, and Brown JH. Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J Biol Chem* 278: 31111–31117, 2003.
21. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, and Chien KR. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111: 943–955, 2002.
22. Kovacic-Milivojevic B, Roediger F, Almeida EAC, Damsky CH, Gardner DG, and Ilic D. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac and myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell* 12: 2290–2307, 2001.
23. Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper C, Menick DR, Zile MR, and Kuppaswamy D. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 275: 35624–35630, 2000.
24. Li S, Butler P, Wang Y, Hu Y, Han DC, Usami S, Guan JL, and Chien S. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3546–3551, 2002.
25. Morissette MR, Sah VP, Glembocki CC, and Brown JH. The Rho effector, PKN, regulates ANF gene transcription in cardiomyocytes through a serum response element. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1769–H1774, 2000.
26. Nadruz W Jr, Kobarg CB, Constancio SS, Corat PD, and Franchini KG. Load-induced transcriptional activation of *c-jun* in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. *Circ Res* 92: 243–251, 2003.
27. Pan J, Singh US, Takahashi T, Oka Y, Palm-Leis A, Herbelin BS, and Baker KM. PKC mediates cyclic stretch-induced cardiac hypertrophy through Rho family GTPases and mitogen-activated protein kinases in cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 202: 536–553, 2005.
28. Pham CG, Harpf AE, Keller RS, Vu HT, Shai SY, Loftus JC, and Ross RS. Striated muscle-specific β_{1D} -integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2916–H2926, 2000.
29. Pyle WG and Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res* 94: 296–305, 2004.
30. Rothen-Rutishauser BM, Ehler E, Perriard E, Messerli JM, and Perriard JC. Different behaviour of the non-sarcomeric cytoskeleton in neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30: 19–31, 1998.
31. Ruwhof C and van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 47: 23–37, 2000.
32. Sadoshima JI, Takahashi T, Jahn L, and Izumo S. Role of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9905–9909, 1992.
33. Salazar EP and Rozengurt E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem* 276: 17788–17795, 2001.
34. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, and Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 8–14, 1999.
35. Sugden PH. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res* 93: 1179–1192, 2003.
36. Sugden PH and Clerk A. “Stress-responsive” mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 24: 345–352, 1998.
37. Sussman MA, McCulloch A, and Borg TK. Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91: 888–898, 2002.
38. Taylor JM, Rovin JD, and Parsons JT. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275: 19250–19257, 2000.
39. Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W, Hanks SK, and Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res* 93: 140–147, 2003.
40. Torsoni AS, Fonseca PM, Crosara-Alberto DP, and Franchini KG. Early activation of p160^{ROCK} by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1411–C1419, 2003.
41. Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z, Sinagra G, Lin JH, Vu TM, Zhou Q, Bowles KR, Di Lenarda A, Schimmenti L, Fox M, Chrisco MA, Murphy RT, McKenna W, Elliott P, Bowles NE, Chen J, Valle G, and Towbin JA. Mutations in *Cypher/ZASP* in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol* 42: 2014–2027, 2003.
42. Wang HB, Dembo M, Hanks SK, and Wang YL. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11295–11300, 2001.
43. Wei L, Wang L, Carson JA, Agan JE, Imanaka-Yoshida K, and Schwartz RJ. β_1 -Integrin and organized actin filaments facilitate cardiomyocyte-specific RhoA-dependent activation of the skeletal α -actin promoter. *FASEB J* 15: 785–796, 2001.
44. Yanazume T, Hasegawa K, Wada H, Morimoto T, Abe M, Kawamura T, and Sasayama S. Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 277: 8618–8625, 2002.

Shp2 NEGATIVELY REGULATES FOCAL ADHESION KINASE IN CARDIAC MYOCYTES

Talita M. Marin, Leandro Bueno, Carolina FZ Clemente, Paty K. Picardi, Mário J. A. Saad, Kleber G. Franchini.

From The Department of Internal Medicine, School of Medicine State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Running Title: Signaling by FAK and Shp2 in cardiac myocyte

Address correspondence to: Kleber G. Franchini, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas Cidade Universitária “Zeffferino Vaz”. 13081-970 Campinas, SP, Brasil; Tel, (55) (19) 3788 8023; Fax, (55) (19) 3788 8023. E-Mail; franchin@unicamp.br

Focal adhesion kinase (FAK) is rapidly activated and coordinates the stretch-induced expression of the hypertrophic genetic program in cardiac myocytes. Herein we examined whether the protein tyrosine phosphatase Shp2 plays a role in FAK signaling in neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs). FAK had a low basal level of phosphorylation at Tyr397 in non-stretched NRVMs. Cyclic stretch (1Hz, 10%) induced rapid and sustained (up to 60 min) increases of FAK phosphorylation at Tyr397. Coimmunoprecipitation assays indicated an association of FAK and Shp2 in non-stretched NRVMs. Cyclic stretch markedly reduced (to ~20% and 50% after 10 and 60 min, respectively) the amount of Shp2 associated with FAK. The tyrosine phosphatase activity of the anti-Shp2 immune complex was relatively high in samples of non-stretched NRVMs and markedly reduced (to ~25% and ~50% after 10 and 60 min) in samples of stretched cells. The recombinant Shp2-PTP domain was shown to dephosphorylate the native FAK immunoprecipitated from NRVMs. The *in vivo* inhibition of Shp2 activity by TFMS (1,4-di-substituted, phenyl-linked *bis*-trifluoromethylsulfonamido) markedly increased FAK phosphorylation at Tyr397 in non-stretched NRVMs at levels comparable to those of stretched cells. Treatment with TFMS (4 h) also increased (to ~200%) β -myosin heavy chain mRNA in non-stretched NRVMs. This effect was attenuated by ~40% in NRVMs simultaneously treated with the FAK/Src inhibitor PP2. The present data demonstrate that Shp2 controls the basal

FAK phosphorylation at Tyr397 and that inhibition of Shp2 may have a permissive role on FAK activation by mechanical stress.

Mechanical forces are critical modulators of the changes that occur in cardiac myocyte phenotype in response to hemodynamic overload (1, 2). The mechanisms of mechano-sensing and -transduction in cardiac myocytes are still incompletely defined, but in the past few years a concept has emerged that the integrity and the complex arrangement of subcellular structures such as Z-disc and costameres are critical to the proper responses of these cells to mechanical forces (3, 4, 5). Such structures are thought to sense local strain or changes in tension and trigger the activation of signaling cascades in response to mechanical forces. In this context, several lines of evidence indicate that Focal Adhesion Kinase (FAK), a signaling protein associated with myofilaments and costameres, may have a critical role in sensing and transducing mechanical stress in cardiac myocytes (6, 7, 8, 9, 10). Several lines of evidence indicate that activated FAK coordinates the early gene transcription in response to stretch or hypertrophic agonists (7, 9, 11, 12, 13, 14). More recently, the importance of FAK to the left ventricle hypertrophy induced by pressure overload was underscored by studies in mice with specific deletion of cardiac FAK by a Cre-loxP-based conditional knockout (15).

The control of FAK activity involves complex mechanisms regulating the autophosphorylation of the Tyr397 by intra- and inter-molecular interactions. The FERM-like amino-terminus domain interacts with the

catalytic site and exerts an inhibitory influence on FAK activity (16, 17, 18). Accordingly, FAK activation can occur when a regulator binds to and removes the FERM-like domain away from the catalytic site, allowing the autophosphorylation at Tyr397 (19). A second key step to full FAK activation is the recruitment and activation of Src to the phosphorylated FAK Tyr397 via an interaction mediated by Src SH2 domain. The subsequent phosphorylation of FAK by Src enables the engagement of various downstream signaling cascades (20, 21). In addition, distinct protein tyrosine phosphatases have been implicated in the direct or indirect control of FAK phosphorylation and activity in diverse cell types. However, Shp2 seems to exert the majority of control over FAK *in vivo* (22, 23, 24, 25). So far, several studies have shown that Shp2 activation triggers FAK hypophosphorylation (22, 23, 24), but it remains unknown whether Shp2 influences FAK activity and signaling in cardiac myocytes.

In the present study, we set out to examine whether the protein tyrosine phosphatase Shp2 plays a role in controlling basal and stretch-induced FAK tyrosine phosphorylation in cardiac myocytes. Neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) were cultured on a silicone base plate and studied in non-stretched and stretched conditions. Our findings indicate that the basal phosphorylation level of FAK at Tyr397 is controlled by the protein tyrosine phosphatase Shp2 and that cyclic stretch reduces Shp2 activity, which may have a permissive role on stretch-induced FAK activation in NRVMs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents. Bioflex (Flex I) collagen culture plates were obtained from Flexcell International (catalog no. 35-P-1001C, type I); protein A conjugated with ¹²⁵I was from Du Pont-New England Nuclear; Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), horse serum, and fetal bovine serum were from GIBCO BRL; pancreatin was from Sigma; collagenase type II from Worthington; rabbit polyclonal antibodies to FAK and Shp2 were from Santa Cruz Biotechnology; rabbit polyclonal antibodies to FAK phosphorylated

at Tyr-397 was from Biosource International; TFMS (1,4-di-substituted, phenyl-linked *bis*-trifluoromethylsulfonamido) and PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) were from Calbiochem. Oligonucleotides were synthesized by Life Technologies.

NRVM culture. Primary cultures of NRVMs from 1- to 2-day-old Wistar rats were prepared as previously reported (7). Briefly, the myocytes were purified on a discontinuous Percoll gradient, suspended in plating medium containing 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, and 0.5% penicillin-streptomycin, and plated in type I collagen Bioflex plates at 5×10^5 cells/well. After 24 h, the medium was replaced with serum-free DMEM and incubated for 48 hours under 95% air-5% CO₂ before use. NRVMs cultured in Bioflex plates were stretched in a Flexcell FX-3000 strain unit by 10% of resting length at a frequency of 1 Hz (0.5 s of stretch and 0.5 s of relaxation) for variable periods, depending on the protocol. Control non-stretched NRVMs were also cultured in Bioflex plates and incubated in serum-free medium. At the conclusion of the experimental protocols, the cells were used in the various assays and in the immunofluorescence labeling performed in this study.

Immunoblotting. NRVMs were lysed in assay lysis buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 μg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, and 0.25 mM Na₃VO₄). The samples were centrifuged for 20 min at 11,000 rpm, and the soluble fraction was resuspended in 50 μl of Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/ml bromphenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M β-mercaptoethanol) before separation on 8% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gels to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% skim milk-TBST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) and exposed to primary antibodies overnight at 4°C. After washing in TBST the membranes were exposed to ¹²⁵I-labeled protein A.

Immunoprecipitation. NRVMs were homogenized in 10 volumes of solubilization buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris HCl, pH 7.4, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaF, 10 mM EDTA, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, and 0.1 mg/ml aprotinin) at 4°C. The extracts were centrifuged at 11,000 rpm at 4°C for 20 min, and the supernatant was used for the assays. Protein concentration was determined with the Lowry method. An equal amount of total protein of the supernatants of NRVMs extract was used for immunoprecipitation with specific antibodies and protein A-Sepharose 6MB.

RT-PCR analysis. NRVMs were homogenized in TRIzol Reagent, and total RNA was isolated by precipitation with isopropyl alcohol as previously described (26). An aliquot (100ng) of total RNA was used for cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified by PCR using *Taq* DNA polymerase with oligonucleotides derived from the cardiac β -myosin heavy chain (5'-CCAACACCAACCTGTCCAAGTTC-3' and 5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3') or β -actin gene (5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3' and 5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'). Oligonucleotides were synthesized by Life Technologies. The amplification conditions consisted of 25 cycles as follows: denaturing at 95°C for 1.30min, annealing at 47°C (β -actin) and (β -myosin heavy chain) for 30sec, and extension at 68°C for 2 min. PCR products were size fractionated with agarose gel electrophoresis. After the gels were stained with ethidium bromide, the cDNA bands were visualized with a UV transilluminator.

Immunohistochemistry and laser confocal analysis. NRVMs were fixed with 4% paraformaldehyde and 4% sucrose in 0.1 mol/l phosphate-saline buffer, pH 7.4, for 15 min at room temperature. The slides were preincubated in blocking buffer (3% nonfat dry milk in 0.1 mol/l PBS - 8.4 mM Na₂HPO₄, 1.9 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 150mM NaCl) containing 0.6% Triton X-100 for 45 min at room temperature and incubated overnight with the primary FAK and Shp2

antibodies and then with secondary goat anti-rabbit Alexa488-conjugated and rabbit anti-mouse Alexa568-conjugated antibody at 4°C. Positive immunoreactivity was visualized by laser confocal scanning (Zeiss LM510). In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

Recombinant Shp2-PTP. GST fusion protein Shp-2 PTP domain (residues 221-593) (27) was expressed in *Escherichia coli* DH-5 α and affinity-purified using glutathione-agarose. Three colonies of DH-5 α transformed with the plasmid pGEX 3T were grown overnight in 10 ml of LB containing 100 μ g/ml Ampicilin. Diluted (1:50) overnight cultures were grown (LB containing 100 μ g/ml Ampicilin) to midlogarithmic phase and induced for 4 hr, 37°C with 0.1 mM isopropyl P-D- thiogalactopyranoside. Bacterial pellets (50 ml of induced culture) were washed once with 10 ml of STE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) and resuspended in 10 ml of STE containing protease inhibitors, 100 μ g/ml of lysozyme. Cells were then sonicated and the lysate was clarified by ultra centrifuging. For affinity purification of GST or Shp2-PTP, lysate was adjusted to 2% Triton X-100, incubated (4 hs) with (vol/vol) glutathione agarose beads (Sigma), washed eight times with PBS buffer and resuspended in Storage Buffer (50mM Hepes, pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM DTT, 10% v/v glycerol).

Phosphatase activity. The protein tyrosine phosphatase activity (28) of the immune complex of anti-Shp2 or anti-FAK antibodies and that of Shp2-PTP were measured by hydrolysis of pp60-cSrc phosphoregulatory peptide in 50 μ l reaction mixtures containing 100 mM Hepes, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 200 μ M pp60-cSrc phosphoregulatory peptide and varying amounts of anti-Shp2 or anti-FAK immune complexes or Shp2-PTP at 30 °C for 1 h. The reaction was stopped by the addition of 100 μ l Biomol Green. The absorbance of the mixtures at 595 nm was determined in 96-well plates.

FAK tyrosine dephosphorylation assay. FAK was immunoprecipitated from NRVMs that had been serum-starved in DMEM, 0.1% BSA for 18 h. The anti-FAK immune complexes were incubated with 3 μ g of Shp2-PTPase 50mM Hepes, pH 7.0, 20mM NaCl, and 1mM dithiothreitol in an 80 μ l reaction

volume at 30 °C for 20 min. After the reaction, FAK immunoprecipitates were washed 3 times with 1 ml of Buffer A(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 25mM NaF, 5mM sodium pyrophosphate, 1mM Na₃VO₄, 2g/ml aprotinin, 2g/ml leupeptin, 100g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM dithiothreitol, 20mM *p*-nitrophenyl phosphate, 1% Triton X-100) and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. FAK tyrosine dephosphorylation was then examined by immunoblotting with FAK anti-phosphospecific antibody to Tyr-397.

Statistical analysis. Data are presented as percent changes compared with controls. Densitometric readings were subjected to statistical analysis. Differences between the mean values of the densitometric readings were tested by ANOVA and Bonferroni's multiple-range test. $P < 0.05$ indicated statistical significance.

RESULTS

Stretch modulates FAK/Shp2 association in NRVMs. FAK is maintained at low levels of basal tyrosine phosphorylation and activity in non-stretched cardiac myocytes. Cyclic stretch lasting up to 60 min increased FAK tyrosine phosphorylation at Tyr397 but it did not change FAK protein expression in NRVMs (Fig. 1A). To examine whether Shp2 interacts with and influences baseline or stretch-induced FAK phosphorylation at Tyr397 we initially performed co-immunoprecipitation assays with anti-FAK and anti-Shp2 antibodies. Relatively high amount of Shp2 was found in the immune complexes of anti-FAK antibody obtained from non-stretched cells, indicating a basal association between FAK and Shp2 in NRVMs (Fig. 1B). This association was further supported by double-labeled immunofluorescence assays in which the anti-FAK was shown to overlap the anti-Shp2 staining in NRVMs (Fig. 1C). Moreover, as shown in Fig. 1B, cyclic stretch lasting for 10 to 60 min markedly reduced the amount of Shp2 in the immune complex of anti-FAK antibody. The fall in FAK/Shp2 association in response to cell stretch occurred while there was no change in the amounts of FAK or Shp2 expressed in cardiac myocytes. Because

Shp2 is highly expressed in cardiac myocytes, we thought of estimating the fraction of Shp2 associated with FAK. This was accomplished by comparing the amount of Shp2 immunoprecipitated by excess of anti-FAK antibody with the amount of Shp2 in the anti-Shp2 immune complexes. The ability of anti-Shp2 immunoprecipitation to deplete Shp2 from NRVMs was demonstrated by the reduction of the amount of Shp2 in the supernatants to almost an undetectable level (data not shown). As demonstrated in Figure 1D, the amount of Shp2 precipitated by anti-FAK was ~20% of total Shp2 immunoprecipitated with anti-Shp2 antibody in samples of non-stretched NRVMs.

Stretch regulates Shp2 phosphatase activity in NRVMs. Next, we examined the protein tyrosine phosphatase activity of the anti-Shp2 immune complex obtained from extracts of NRVMs. As shown in Figure 2A, there was a rapid reduction (10min; by ~70%) of the phosphatase activity in the precipitates from stretched as compared to those from non-stretched NRVMs. A consistent reduction in phosphatase activity, although less intense than that seen in 10 min-stretched cells was still detected in the immunoprecipitates taken from NRVMs subjected to 30 and 60 min stretch. As shown in the representative example of Figure 2A, the amount of immunoprecipitated Shp2 was similar in samples of non-stretched or stretched NRVMs. Interestingly, the reduction in the phosphatase activity of anti-Shp2 precipitates paralleled the reduction in the FAK/Shp2 association shown in Figure 1B. In addition, we examined the protein tyrosine phosphatase activity in the immune complex of anti-FAK antibody. As shown in Figure 2B, similar to what was seen with the anti-Shp2 immune complex, beginning at relatively high levels in samples from non-stretched cells, there was a reduction in the protein tyrosine phosphatase activity in the anti-FAK immune complex obtained from extracts of stretched cells. As indicated by the representative immunoblotting of Fig. 2B, the amount of precipitated FAK was similar in samples of non-stretched or stretched NRVMs.

Recombinant PTP dephosphorylate FAK in vitro. To examine whether the catalytic activity of Shp2 can induce FAK

dephosphorylation at Tyr397, *in vitro* dephosphorylation assay was performed with recombinant Shp2-PTP and immune complexes from anti-FAK antibody obtained from extracts of non-stretched or stretched NRVMs. Figure 3A shows coomassie stained gels with the purified recombinant Shp2-PTP. The activity of Shp2-PTP was confirmed by *in vitro* phosphatase assays performed with increasing amount of the purified protein (Fig. 3B). The ability of Shp2-PTP to dephosphorylate FAK is indicated by the consistent reduction in the amount of FAK recognized by FAK Tyr397 phosphospecific antibody in samples of the anti-FAK immune complexes taken from non-stretched or stretched cells (Fig. 3C). Similar amount of FAK was immunoprecipitated from non-stretched or stretched NRVMs.

Shp2 pharmacological inhibition increases baseline FAK phosphorylation in cardiac myocytes. To examine the influence of Shp2 on FAK phosphorylation *in vivo*, we performed experiments with the pharmacological inhibitor TFMS. The ability of TFMS to inhibit the Shp2 phosphatase activity *in vivo* was tested by assaying anti-Shp2 immune complex obtained from non-stretched NRVMs treated with this compound. As shown in Figure 4A, treatment with TFMS reduced by ~50% the protein tyrosine phosphatase activity of the anti-Shp2 immune complexes taken from non-stretched cells. There was a marked increase of Tyr397 phosphorylated FAK in non-stretched NRVMs treated with TFMS (Fig 4B). Although the amount of phosphorylated FAK of stretched NRVMs treated with TFMS was higher than that of cells treated with vehicle alone, the differences did not reach statistical significance.

The protein tyrosine phosphatase activity of Shp2 has been considered to be dependent on its association with phosphorylated docking proteins via the SH2 domain (29). To test the hypothesis that the baseline activity of Shp2 of cardiac myocytes is possibly sustained by an interaction with locally restricted phosphorylated FAK/Src complexes we examined the Shp2 activity of the immune complexes of anti-Shp2 antibody obtained from NRVMs treated with the FAK/Src pharmacological inhibitor PP2. As

shown in the representative example of Figure 4C, PP2 reduced the already low basal FAK phosphorylation. This was accompanied by a reduction of basal phosphatase activity of the anti-Shp2 immune complex (by ~23%). PP2 also reduced FAK/Shp2 association in non-stretched NRVMs (Fig. 4D), indicating that the relatively high basal Shp2 phosphatase activity may be dependent on its association with FAK.

Shp2 inhibition induces β -myosin heavy chain expression in non-stretched NRVMs. We have previously shown that FAK signaling plays a critical role in the stretch-induced expression of β -myosin heavy chain that is a marker of hypertrophic genetic program, in NRVMs (7, 9, 11). Considering the demonstration here that Shp2 controls the baseline FAK phosphorylation at Tyr397 in non-stretched cells, we next examined whether the inhibition of Shp2 activity might induce the expression of β -myosin heavy chain in non-stretched NRVMs. As shown in Figure 5, treatment with TFMS induced a consistent increase in the expression of β -myosin heavy chain in non-stretched NRVMs. To examine whether this increase in the β -myosin heavy chain expression was dependent on FAK signaling, its expression was also analysed in non-stretched NRVMs that were treated simultaneously with TFMS and the FAK/Src pharmacological inhibitor PP2. Treatment with PP2 attenuated by ~60% the TFMS-induced β -myosin heavy chain expression, indicating that this effect was most dependent on FAK signaling.

DISCUSSION

FAK has been shown to maintain a relatively low basal level of phosphorylation and activity in cardiac myocytes, but upon mechanical stress it is rapidly phosphorylated on several tyrosine residues, including the autophosphorylation site at Tyr-397 (6, 8, 30). The results presented here imply the tyrosine phosphatase Shp2 as a modulator of FAK phosphorylation and activation with critical consequence for the effect of FAK signaling in the regulation of hypertrophic genetic program in cardiac myocytes.

Regulation of FAK phosphorylation by Shp2. Our data indicate that the protein tyrosine

phosphatase Shp2 is associated and plays a critical role in maintaining the relatively low level of FAK phosphorylation and activity in non-stretched cardiac myocytes. This assumption is supported by the demonstration of a marked increase of FAK phosphorylation at Tyr397 by TFMS in non-stretched NRVMs. Further support to this assumption is provided by the demonstration that FAK is associated with Shp2 and that the tyrosine phosphatase activity of anti-Shp2 or anti-FAK immune complexes are relatively high in samples of non-stretched NRVMs. Consistent with the notion that FAK is a substrate for Shp2 it was shown here that the recombinant Shp2-PTP domain is capable of dephosphorylating FAK immunoprecipitated from NRVMs. These data highlight the importance of basal Shp2 as a key regulator of FAK activity in cardiac myocytes. Similar indications that Shp2 might negatively regulate the basal level of FAK phosphorylation (22, 23, 24) have been suggested in distinct cell types and experimental models. For example, previous studies have shown that FAK was hyperphosphorylated on the autophosphorylation site (Tyr397) in Shp2^{-/-} fibroblasts in suspension (31). In addition, the demonstration here of a reduction in the FAK/Shp2 association and in the tyrosine phosphatase activity of Shp2 in parallel with the increases of FAK phosphorylation suggest that the reduction of Shp2 activity toward FAK plays a permissive role on stretch-induced FAK activation in cardiac myocytes. This implies that Shp2 may play a role as a counter-regulatory modulator of FAK signaling in stretched cardiac myocytes, with possible consequences for the effects of FAK on the regulation of cardiac phenotypic changes induced by mechanical stress.

The findings of the present study bring into discussion the mechanisms responsible for the regulation of Shp2 activity in cardiac myocytes and its role in the control of basal and activated FAK. Shp2 activity has been shown to be tightly regulated by a mechanism that couples its activation with recruitment by binding proteins (29). In the basal state the Shp2 N-terminal SH2 domain interacts with the PTP domain, preventing substrate access to the active site. Activation of Shp2 is critically dependent on binding of

the N-terminal SH2 domain to phosphotyrosyl protein ligands. According to this model, the relatively high baseline activity of Shp2 activity seen in non-stretched cardiac myocytes would be dependent on the recruitment and binding of Shp2 to tyrosine phosphorylated protein complexes. For example, the docking protein Gab-1, which can be phosphorylated in tyrosine residues by multiple receptor and non-receptor tyrosine kinases, has been shown to interact with and mediate the effects of Shp2 in cardiac myocytes (32). However, whether the association of Shp2 with Gab-1 plays a role on basal Shp2 activity in NRVMs remains to be explored. Alternatively, the demonstration here that PP2 reduces FAK/Shp2 association in non-stretched cardiac myocytes might indicate that the relatively high basal phosphatase activity of Shp2 is somehow related to its association with FAK. Accordingly, it has been suggested that the bulky FAK activation by growth factors or mechanical stimuli is dependent on the recruitment and clustering of additional FAK and Src molecules, that amplify FAK activity by transphosphorylating and recruiting additional FAK molecules to specific sites (7). In this regard, one might expect that in non-stretched cells a locally restricted low level of FAK/Src phosphorylation might promote the recruitment and activation of Shp2, which would in turn prevent clustering and bulky activation of FAK. This idea is supported by our demonstration here that besides the reduction in FAK/Shp2 association PP2 treatment of non-stretched NRVMs also reduced the basal level of the phosphatase activity of anti-Shp2 immune complexes. Thus it is possible that the negative influence of Shp2 on baseline FAK phosphorylation might be dependent on a very sensitive regulatory loop initiated by local FAK/Src phosphorylation and recruitment of Shp2. Upon mechanical stress, the simultaneous activation of a greater number of FAK molecules and the dissociation of Shp2 from the FAK/Src complex would favor prolonged FAK phosphorylation. Indeed, we have shown here that reductions in Shp2 activity induced either by cell stretch or TFMS is accompanied by reductions in the FAK/Shp2 association.

Regulation of gene expression by Shp2 and FAK. We demonstrated here that treatment of non-stretched NRVMs with TFMS increased β -myosin heavy chain expression by a mechanism partially mediated by FAK signaling. This accords with the notion that the increased activity of FAK plays a critical role in mobilizing signaling cascades that ultimately coordinates the changes of gene expression toward a hypertrophic phenotype in cardiac myocytes in response to stretch. It is well established that FAK activation either by mechanical stress or hypertrophic agonists mediates the activation of the hypertrophic genetic program in cardiac myocytes (7, 9, 11, 12, 14). The signaling mechanisms that mediate the pro-hypertrophic influence of FAK are still unclear, but it seems to involve pathways mediated by Erk1/2, JNK and the transcription factor MEF2 (6, 7, 9, 11).

By contrast, the involvement of Shp2 signaling in cardiac myocyte hypertrophy relies most on indirect evidence. For instance, patients with the Leopard Syndrome which results from *ptpn11* gene mutations that reduce the Shp2 activity (33), often evolve with hypertrophy cardiomyopathy (34), suggesting that the reduction in protein tyrosine phosphatase activity of Shp2, similar to the findings of the present study, enables the activation of pro-hypertrophic signaling

pathways in the myocardium. On the other hand, the *ptpn11* mutation D61G-Shp2 that enhance tyrosine phosphatase activity of Shp2 (35, 36) and recapitulates aspects of the Noonan syndrome phenotype in mice was shown to evolve with a thin myocardium, suggesting that permanently increased Shp2 phosphatase activity results in anti-hypertrophic effect. It will be interesting to determine whether FAK signaling plays a role in the pathogenesis of cardiomyopathy associated with the Leopard Syndrome.

The data of the present study argue strongly that tyrosine phosphatase activity of Shp2 negatively regulates the basal FAK phosphorylation and activity in non-stretched cardiac myocytes. This effect was shown to be potentially critical as a counter-regulatory mechanism that contributes to maintain a relatively low level of expression of hypertrophic genes in non-stretched cardiac myocytes. Additionally the present data are also compatible with the notion that the full activation of FAK by mechanical stress may depend on the inactivation of Shp2. Further studies are necessary to elucidate the mechanisms involved in the regulation of basal activity or stretch-induced inactivation of Shp2 and its role in cardiac hypertrophy and failure.

REFERENCES

1. Katz, A.M. (1994) *Ann. Intern. Med.* 121, 363–371.
2. Cooper, G. 4th. (1997) *Annu. Rev. Med.* 48, 13-23.
3. Sussman, M.A., McCulloch, A., and Borg, T.K. (2002) *Circ. Res.* 91, 888–898.
4. Knoll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H.M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M.L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N.J., Omens, J.H., McCulloch, A.D., Kimura, A., Gregorio, C.C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H.P., and Chien, K.R. (2002) *Cell* 111, 943–955.
5. Pyle, W.G., and Solaro, R.J. (2004) *Circ. Res.* 94, 296-305.
6. Franchini, K.G., Torsoni, A.S., Soares, P.H.A., and Saad, M.J.A. (2000) *Circ. Res.* 87, 558–565.
7. Torsoni, A.S., Constancio, S.S., Nadruz, W. Jr, Hanks, S.K., and Franchini, K.G. (2003) *Circ. Res.* 93, 140–147.

8. Fonseca, P.M., Inoue, R.Y., Kobarg, C.B., Crosara-Alberto, D.P., Kobarg, J., and Franchini, K.G. (2005) *Circ. Res.* 96, 73–81.
9. Torsoni, A.S., Marin, T.M., Velloso, L.A., and Franchini, K.G. RhoA/Rock signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. (2005) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1488-H1496.
10. Samarel, A.M. (2005) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H2291-H2301.
11. Nadruz, W. Jr, Corat, M.A., Marin, T.M., Guimaraes-Pereira, G.A., and Franchini K.G. (2005) *Cardiovasc. Res.* 68, 87-97.
12. Taylor, J.M., Rovin, J.D., and Parsons, J.T. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 19250–19257.
13. Eble, D.M., Strait, J.B., Govindarajan, G., Lou, J., Byron, K.L., and Samarel, A.M. (2000) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1695–H1707.
14. Kovacic-Milivojevic, B., Roediger, F., Almeida, E.A.C., Damsky, C.H., Gardner, D.G., and Ilic, D. (2001) *Mol. Biol. Cell.* 12, 2290–2307.
15. Peng, X., Kraus, M.S., Wei, H., Shen, T-L., Pariaut, R., Alcaraz, A., Ji, G., Cheng, L., Yang, Q., Kotlikoff, M.I., Chen, J., Chien, K., Gu, H., and Guan, J-L. (2006) *J. Clin. Invest.* 116, 217-227.
16. Toutant, M., Costa, A., Studler, J.M., Kadaré, G., Carnaud, M., and Girault, J.A. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7731-7743.
17. Cooper, L.A., Shen, T.L., and Guan, J.L. (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23, 8030-8041.
18. Dunty, J.M., Gabarra-Niecko, V., King, M.L., Ceccarelli, D.F.J., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24, 5353-5368.
19. Cary, L.A., Chang, J.F., and Guan, J-L. (1996) *J. Cell. Sci.* 109, 1787-1794.
20. Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 1680–1688.
21. Calalb, M.B., Polte, T.R., and Hanks S.K. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 954-963.
22. Tsuda, M., Matozaki, T., Fukunaga, K., Fujioka, Y., Imamoto, A., Noguchi, T., Takada, T., Yamao, T., Takega, H., Ochi, F., Yamamoto, T., and Kasuga, M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 13223-13229
23. Yu, D-H., Qu, C-I., Henegariu, O., Lu, X., Feng, G-S.(1998) *J. Biol. Chem.* 273, 21125 -21131.
24. Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Zhao, Z.J., Lacalle, R.A., and Martinez, A.C. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 3125-3135.
25. Oh, E.S., Gu, H., Saxton, T.M., Timms, J.F., Hausdorff, S., Frevert, E.U., Kahn, B.B., Pawson, T., Neel, B.G., and Thomas, S.M. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3205-3215.
26. Nadruz, W. Jr., Kobarg, C.B., Constancio, S.S., Corat, P.D.C., and Franchini, K.G. (2003) *Circ. Res.* 92, 243-251.
27. Wu, T.R., Hong, K.Y., Wang, Xu-D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., Campbell, A.G., Zhi-Yong, H., Gen-Sheng, F., and Chin, E.Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 277, 47572-47580.
28. Taghibiglou, G., Rashid-Kolvear, F., Iderstine, S.C.V., Le-Tien, H., Fantus, I.G., Lewis, G.F., and Adeli, K. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 793–803.
29. Neel, B.G., Gu, H., and Pao, L.(2003) *Trends Biochem. Sci.* 28, 284-293.

30. Seko, Y., Takahashi, N., Tobe, K., Kadowaki, T., and Yazaki, Y. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 8-14.
31. vonWichert, G., Haimovich, B., Feng, G-S., and Sheetz, M.P. (2003) *EMBO J.* 22, 5023-5035.
32. Nakaoka, Y., Nishida, F. Y., Izumi, M., Terai, K., Oshima, Y., Sugiyama, S., Matsuda, S., Koyasu, S., Yamauchi-Takahara, K., Hirano, T., Kawase, I., and Hirota, H. (2003) *Circ. Res.* 93, 221-229.
33. Kontaridis, M.L., Swanson, K.D., David, F.S., Barford, D., and Neel, B.G. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 6785-6792.
34. Woywodt, A., Welzel, J., Haase, H., Duerholz, A., Wiegand, U., Potratz, J., and Sheikhzadeh, A. (1998) *Chest.* 113, 1415-1417.
35. Araki, T., Mohi, M.G., Ismat, F.A., Bronson, R.T., Williams, I.R., Kutok, J.L., Yang, W., Pao, L.I., Gilliland, D.G., Epstein, J.A., and Neel, B.G. (2004) *Nat. Med.* 10, 849-857.
36. Tartaglia, M., and Gelb, B.D. (2005) *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 6, 45-68.

FOOTNOTES

We Thank Dr Eugene Y. Chin from the Department of Pathology and Laboratory Medicine, Brown University Medical School, USA that kindly provided the GST fusion protein Shp-2 PTP domain (residues 221-593) cloned in pGEX 3T.

This work was supported by grants from FAPESP – Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (01/11698-1 and 04/06191-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. 521098/97-1).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. A, NRVMs were stretched (10%) for 10 to 60 minutes and cell extracts blotted with antibodies against FAK or phosphospecific antibody directed against the autophosphorylation site of FAK (pFAK). Graph shows the percent changes in the amount of FAK detected with pFAK normalized by total FAK (NS, nonstretched; n=6). B, Representative blots showing total Shp2 and the amount of Shp2 precipitated by anti-FAK antibody. Graph shows the percent changes in the amount of Shp2 detected in anti-FAK immune complexes (n=5). C, Non-stretched NRVMs double labeled with anti-FAK and anti-Shp2 antibodies. D, The representative blot of anti-Shp2 antibody. The graph show the percent fraction of Shp2 precipitated by anti-FAK antibody in comparison with the amount of Shp2 precipitated with anti-Shp2 (n=3). * $P < 0.05$ compared with basal values.

Fig. 2. A, Representative blot of the amount of Shp2 detected in the immune complex of anti-Shp2 antibody and graph (n=6) showing the percent change in phosphatase activity of the anti-Shp2 immunoprecipitates taken from no-stretched (NS) or stretched NRVMs (10-60 min). B, Representative blot of the amount of FAK detected in the immune complex of anti-FAK antibody and graph (n=4) showing the percent change in phosphatase activity of the anti-FAK immunoprecipitates taken from no-stretched (NS) or stretched NRVMs (10-60 min). * $P < 0.05$ compared with basal values.

Fig. 3. Coomassie dyed 12% SDS PAGE showing non-induced or induced E. coli proteins and purified GST-Shp2-PTP. B, Phosphatase activity of increasing amount of the recombinant GST-Shp2-PTP. C, Representative examples of samples from anti-FAK immune complexes taken from non-stretched or stretched (60 min) NRVMs assayed with Shp2-PTP and blotted with anti-FAK or anti-pFAK antibodies. Graph (n=4) shows the percent changes of phosphorylated FAK

compared to values of immune complexes taken from non-stretched NRVMs. * $P < 0.05$ compared with values of the immune complexes taken from non-stretched NRVMs. # $P < 0.05$ compared with values of the immune complexes taken from stretched NRVMs.

Fig. 4. A. Representative blot indicating the amount of Shp2 detected in the anti-Shp2 immune complexes taken from non-stretched NRVMs. Graph shows the phosphatase activity of anti-Shp2 immune complexes of non-stretched NRVMs treated with vehicle (-) or TFMS (+). B. Representative blots of non-stretched or stretched NRVMs treated with TFMS or vehicle labeled with anti-FAK or anti-pFAK antibodies. Graph (n=4) shows the percent changes of the densitometric readings of the pFAK/FAK ratio in comparison with samples from non-stretched cells treated with vehicle. C. Representative blot indicating the amount of FAK detected with the phosphospecific antibody in non-stretched NRVMs. Graph shows the phosphatase activity of anti-Shp2 immune complexes in samples of non-stretched NRVMs treated with vehicle or PP2. D. Representative blot indicating the amount of Shp2 detected in the anti-FAK immune complexes of non-stretched NRVMs treated with vehicle (-) or PP2 (+). Graph shows the percent amount of Shp2 in the anti-FAK immune complexes in samples of non-stretched NRVMs treated with vehicle or PP2. * $P < 0.05$ compared with values of the immune complexes taken from non-stretched NRVMs.

Fig. 5. RT-PCR of β -MHC and β -actin mRNA in non-stretched NRVMs treated with TFMS or PP2 and average (4 experiments) results of densitometric analysis of β -MHC normalized by β -actin. * $P < 0.05$ compared with values of the immune complexes taken from non-stretched NRVMs.

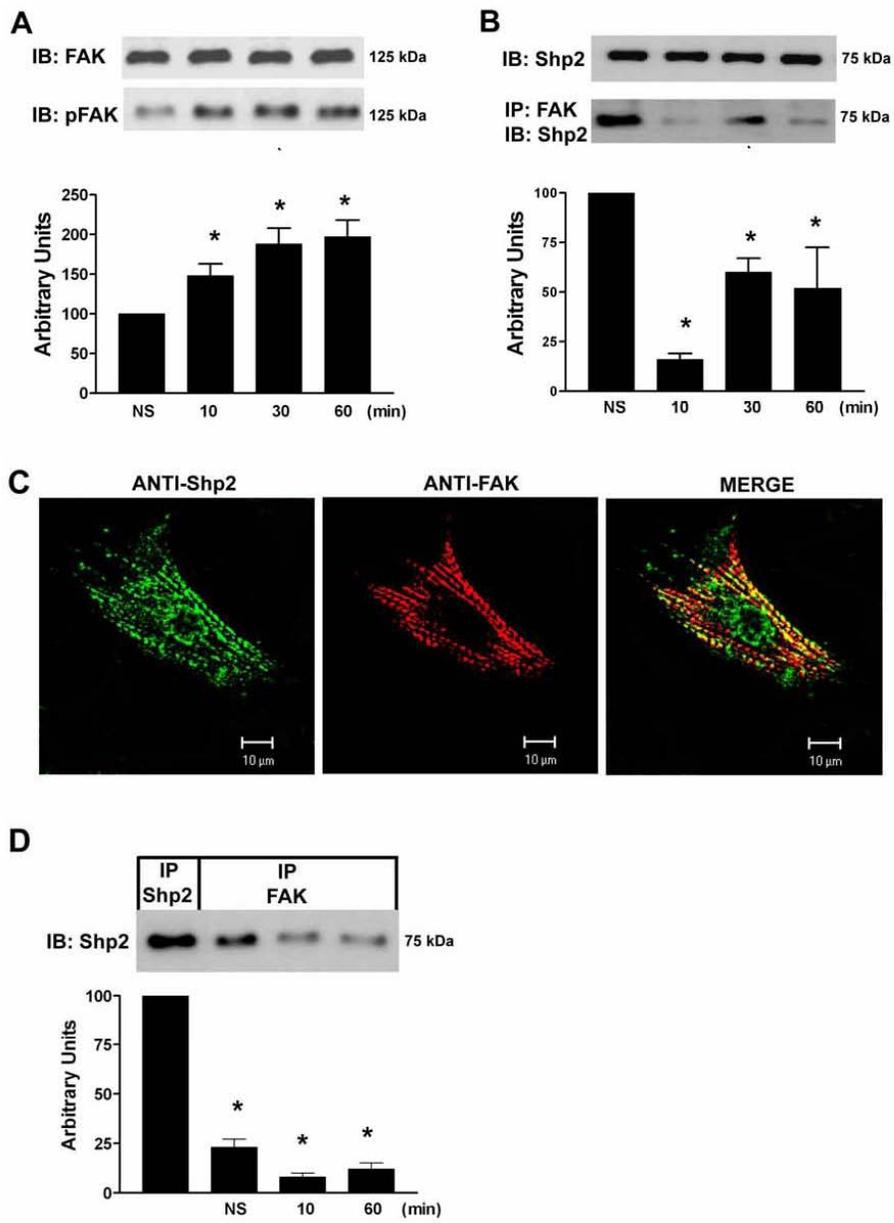


FIGURE 1.

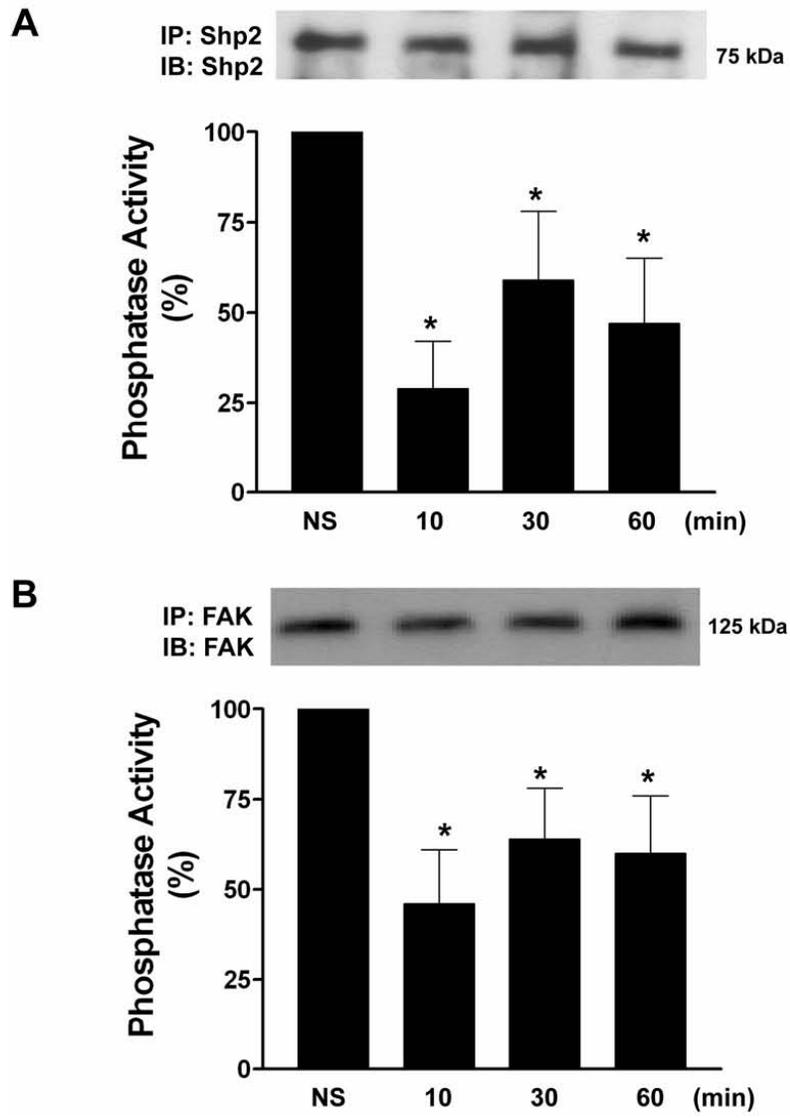


FIGURE 2.

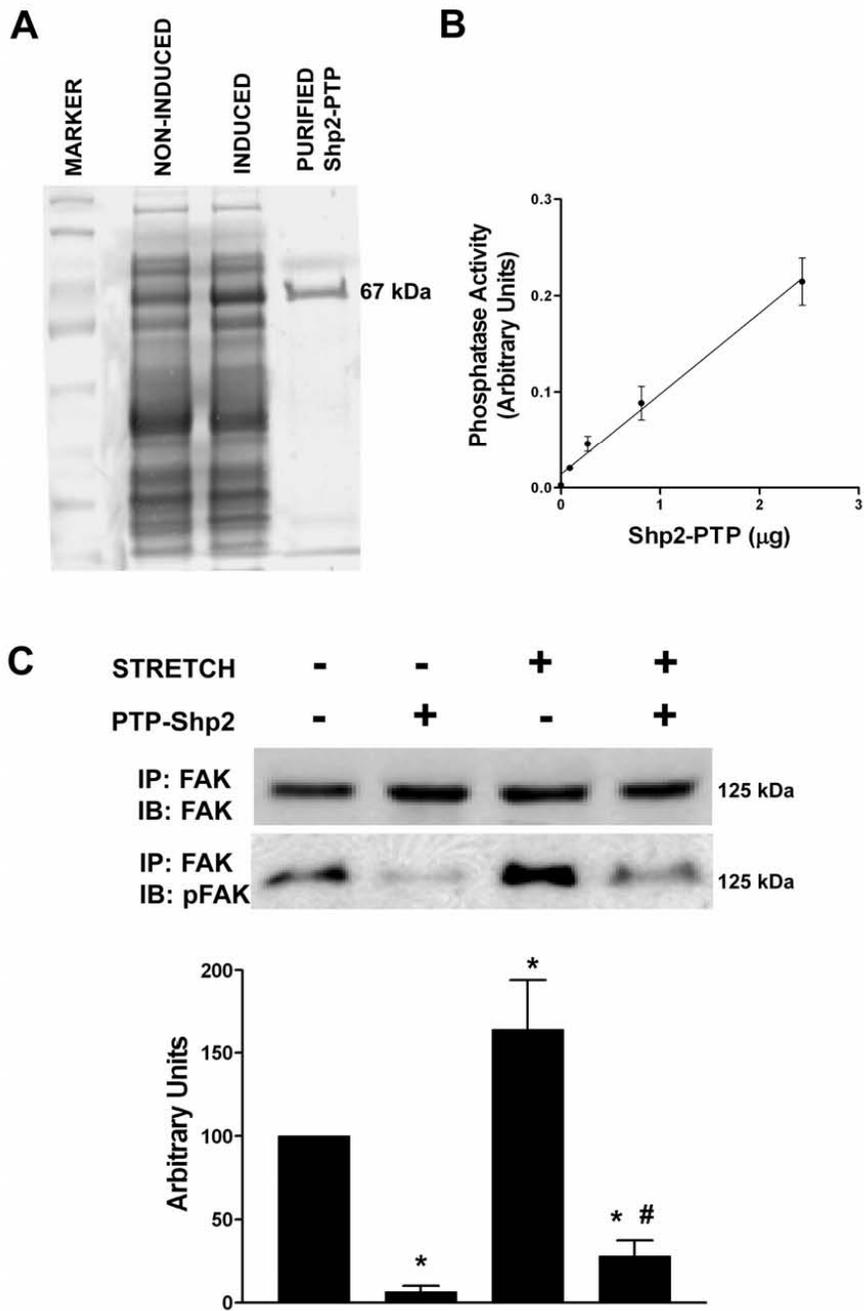


FIGURE 3.

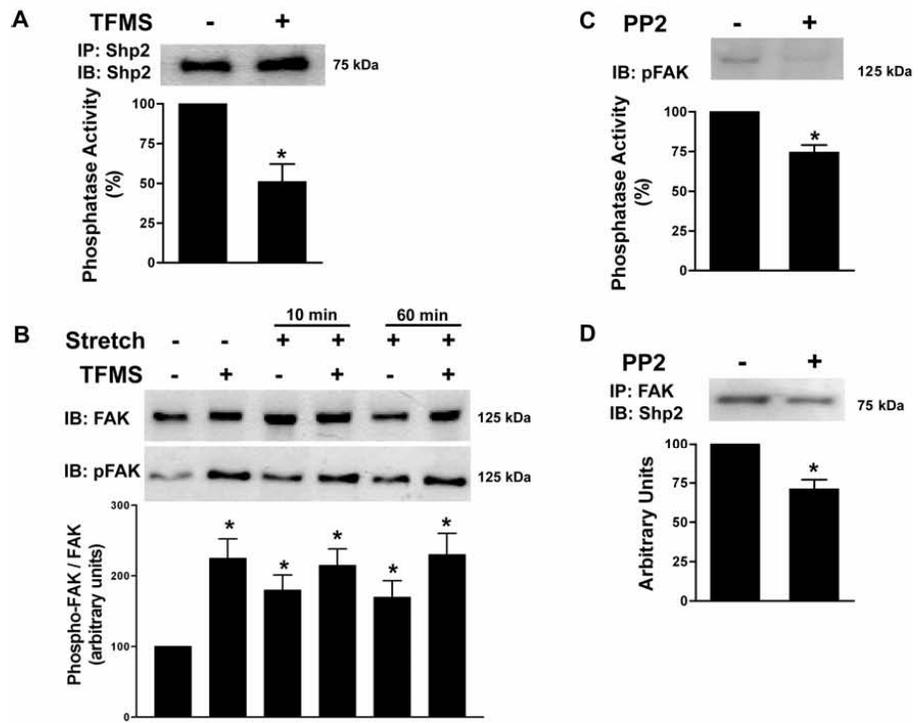


FIGURE 4

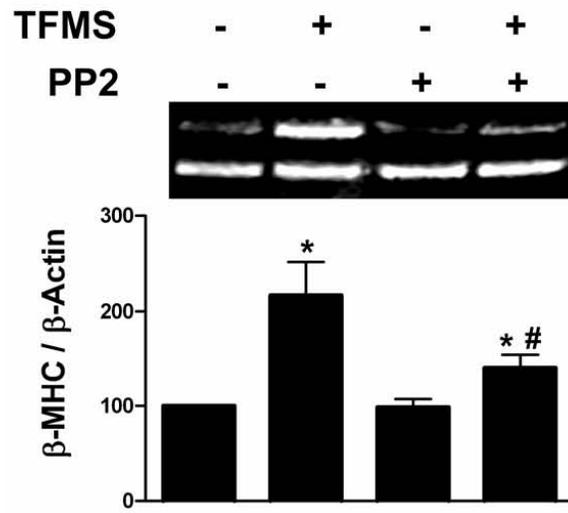


FIGURE 5