

ALINE MARA DOS SANTOS

**Avaliação Funcional e Estrutural da Interação
entre a Quinase de Adesão Focal e a Miosina
Sarcomérica**

**Campinas - SP
2011**

ALINE MARA DOS SANTOS

**Avaliação Funcional e Estrutural da Interação
entre a Quinase de Adesão Focal e a Miosina
Sarcomérica**

Dissertação de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

**Campinas - SP
2011**

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

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

Sa59a Santos, Aline Mara dos
Avaliação funcional e estrutural da interação entre a quinase de adesão focal e a miosina sarcomérica / Aline Mara dos Santos. --
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Kleber Gomes Franchini
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sinalização Celular. 2. Quinase de Adesão Focal. 3. Cadeias pesadas de miosina. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em Inglês: Structural and functional assessment of the interaction between focal adhesion kinase and sarcomeric myosin

Keywords: • Cellular Signaling
• Focal Adhesion Kinase
• Myosin heavy chain

Titulação: Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes
Prof. Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio
Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Prof. Dr. Luciana Bolsoni Lourenço

Data da defesa: 15.02.201

Banca examinadora da tese de Doutorado

Aline Mara dos Santos

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

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini

Kleber Franchini

2. Prof(a). Dr(a). Gilberto de Nucci

Gilberto de Nucci

3. Prof(a). Dr(a). Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

4. Prof(a). Dr(a). Marcelo Damario Gomes

Marcelo Damario Gomes

5. Prof(a). Dr(a). Andre Luis Berteli Ambrosio

Andre Luis Berteli Ambrosio

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

Data: 15/02/2011

À minha querida mamãe (*in memoriam*),
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela oportunidade concedida e pelo apoio inestimável para a minha formação acadêmica.

À Prof.^a Dr. Deborah Schechtman pelo apoio, amizade e pelo auxílio no desenho racional de peptídeos.

Ao Prof. Dr. Fábio Gozzo e a Mariana Fioramonte pelo auxílio nos experimentos de espectrometria de massas.

À Prof.^a Dr. Íris Torriani e ao Dr. Júlio César da Silva pelo auxílio na técnica de SAXs.

Aos amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, principalmente ao Alisson Campos Cardoso, à Michelle Bueno Antunez e à Talita Miguel Marin, que tanto contribuíram para a realização deste estudo.

Ao meu marido, Clever Geraldo Mendes, pela paciência e por todo apoio e companheirismo.

Aos meus pais, Geraldo Alves dos Santos e Josefina Maria Romão dos Santos, e aos meus irmãos, Odirlei, Wilton, Wellington, Tatiany, Camila e Ellen (*in memoriam*), pelo incentivo e apoio que foram imprescindíveis para a concretização deste ideal.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

“A arte de escutar é como uma luz que dissipa a escuridão da ignorância.”

Dalai Lama

1.Introdução	25
1.1 Hipertrofia cardíaca	27
1.2 Mecanotransdução e hipertrofia em miócitos cardíacos	28
1.3 Citoesqueleto dos miócitos cardíacos	32
1.3.1 Discos-Z.....	34
1.3.2 Costâmeros	34
1.3.3 O citoesqueleto de actina-miosina	37
1.4 Quinase de Adesão Focal.....	40
1.5 Hipótese	49
1.6 Objetivos	49
2. Material e Métodos	51
2.1 Proteínas recombinantes	53
2.2 Purificação de miosina sarcomérica	55
2.3 Ensaio de Ligação	55
2.4 <i>Far Western Blot</i>	56
2.5 <i>Pull-Down</i>	57
2.6 Ensaio de tirosina quinase <i>in vitro</i>	58
2.7 Imunoprecipitação	58
2.8 Isolamento e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos	59
2.9 Desenho dos siRNAs	60
2.10 Síntese dos siRNAs.....	60
2.11 Transfecção de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura	62
2.12 Tratamento dos miócitos cardíacos em cultura.....	62
2.13 Análises por microscopia de fluorescência.....	63
2.14 Isolamento de miócitos ventriculares de ratos adultos	63
2.15 Marcação do domínio FERM com FITC	64
2.16 <i>Decoration</i>	64
2.17 Análise da área superficial dos miócitos cardíacos	65
2.18 Desenho racional de peptídeos	65
2.19 Acoplamento de peptídeos a colunas HiTrap NHS-activated HP e identificação de ligantes.....	66
2.20 Extração de peptídeos intracelulares e detecção de FP-1	67
2.21 Detecção quantitativa de mRNAs.....	68
2.22 <i>Cross linking</i> acoplado à espectrometria de massas	69
2.23 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)	71

2.24 Modelagem de corpo-rígido a partir dos dados de SAXS	73
2.25 <i>Docking</i> molecular	73
2.26 Análise estatística	74
3.Resultados.....	75
3.1 FAK interage fisicamente com a porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica	77
3.2 Ativação da FAK <i>in vitro</i> reduz sua ligação à miosina sarcomérica	78
3.3 Miosina sarcomérica reduz atividade da FAK <i>in vitro</i>	79
3.4 Domínio FERM da FAK medeia a interação FAK/porção c-terminal da miosina de cadeia pesada	81
3.5 Associação basal entre FAK e miosina nativa.....	83
3.6 Co-localização e interação da FAK e miosina em miócitos cardíacos	87
3.7 Estiramento cíclico reduz a interação FAK/miosina cardíaca	90
3.8 Tratamento com agonista farmacológico que ativa FAK não interfere na interação FAK/miosina cardíaca.....	92
3.9 Silenciamento da miosina sarcomérica resulta em aumento da fosforilação da FAK.....	93
3.10 Identificação de um possível sítio de interação entre FAK/miosina através do desenho racional de peptídeos.....	95
3.11 FP-1 reduz a interação FAK/miosina e leva à ativação e redistribuição subcelular da FAK em MVRNs.....	100
3.12 Superexpressão da FAK leva à hipertrofia de miócitos cardíacos.....	104
3.13 Tratamento com FP-1 induz o crescimento hipertrófico de miócitos cardíacos...	107
3.14 Efeito pró-hipertrófico de FP-1 é mediado pela ativação da via mTOR	111
3.15. Análise estrutural da interação entre o domínio FERM da FAK e a porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica.....	114
4.Discussão	129
4.1 A interação FAK/miosina e a mecanotransdução em miócitos cardíacos	131
4.2 Bases estruturais da regulação da FAK pela interação de seu domínio FERM com a porção C-terminal da miosina sarcomérica	132
4.3 Interação FERM/miosina regula a quiescência basal da FAK em miócitos cardíacos.....	135
4.4 Interação FAK/miosina é sensível ao estresse mecânico.....	139
4.5 FAK e a interação FAK/miosina no crescimento celular em miócitos cardíacos ..	141
4.6 Ativação da FAK regula a via AKT/ mTOR	145
5. Conclusão	149
6. Referências	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Eletromicrografia de transmissão e esquema do citoesqueleto celular do miócito cardíaco...	33
Figura 02. Proteínas associadas ao disco Z e as regiões de costâmero em miócitos cardíacos..	35
Figura 03. Citoesqueleto de actina-miosina..	39
Figura 04. Esquema da disposição dos domínios da FAK..	42
Figura 05. Estrutura tridimensional da conformação autoinibitória da FAK.	44
Figura 06. Sistema de estiramento biaxial Flexercell FX3000.....	59
Figura 07. Reação de <i>cross linking</i> com o reagente DSS.....	70
Figura 08. Íons característicos do padrão de ionização do reagente DSS...	71
Figura 09. FL-FAK fisicamente interage com a porção C-terminal da cadeia pesada de miosina sarcomérica em fusão com GST.	77
Figura 10. Ativação da FAK reduz sua ligação à porção C-terminal da miosina sarcomérica <i>in vitro</i>	79
Figura 11. GST-Mio reduz ativação da FAK em ensaio de fosforilação <i>in vitro</i>	80
Figura 12. GST-FERM precipita a porção C-terminal da miosina expressa com cauda de histidina (His-Mio)..	82
Figura 13. GST-Mio precipita His-FERM.	83
Figura 14. GST-FERM interage com miosina sarcomérica de extrato de miócitos cardíacos de ratos neonatos..	84
Figura 15. Miosina cardíaca purificada de ventrículo esquerdo de ratos neonatos interage com o domínio FERM da FAK.	85
Figura 16. <i>Far western blotting</i> indica interação do domínio FERM da FAK com miosina de extrato celular de MVRNs e miosina purificada de ventrículo esquerdo de ratos neonatos	86
Figura 17. FAK se co-localiza com miosina cardíaca em NVRMs.....	87
Figura 18. Imunoprecipitação de FAK e Miosina em extratos de MVRNs.	88
Figura 19. <i>Decoration</i> indica que o domínio FERM da FAK é responsável pela sua localização com a miosina sarcomérica em miócitos adultos.	89
Figura 20. Miosina interage com FAK em ensaios de imunoprecipitação em extratos ventriculares de ratos adultos e de ligação em coluna com FERM covalentemente ligado..	90
Figura 21. Estiramento cíclico leva a ativação da FAK	91
Figura 22. Estresse mecânico modula a interação FAK/miosina cardíaca.....	92

Figura 23. Ativação da FAK por agonista farmacológico não interfere na interação FAK/Miosina Cardíaca.....	93
Figura 24. Silenciamento da Miosina Sarcomérica em MVRNs..	94
Figura 25. Silenciamento da miosina sarcomérica leva a um aumento na fosforilação da FAK.	95
Figura 26. Desenho racional de peptídeos.....	97
Figura 27. Posição dos peptídeos FP1 e FP-2 na estrutura cristalográfica do domínio FERM da FAK.	98
Figura 28. FP-1 interage com miosina de extrato citoplasmático de ventrículo esquerdo de ratos adultos.....	99
Figura 29. FP-1 Diminui a interação entre FL-FAK e GST-Mio <i>in vitro</i>	100
Figura 30. Detecção do peptídeo FP-1 em extratos de MVRNs por LC-MS/MS.....	101
Figura 31. Tratamento com FP-1 reduz a interação FAK/Miosina... ..	102
Figura 32. Tratamento com FP-1 induz fosforilação da FAK de forma dose dependente.....	103
Figura 33. Tratamento com FP-1 ocasiona redistribuição da FAK para o núcleo celular.	104
Figura 34. Superexpressão de Myc-FAK em miócitos cardíacos ventriculares de ratos neonatos em cultura... ..	105
Figura 35. Superexpressão de Myc-FAK leva à hipertrofia de MVRNs em cultura.....	106
Figura 36. Tratamento com FP-1 leva à hipertrofia de MVRNs em cultura... ..	108
Figura 37. Silenciamento gênico da FAK em MVRNs em cultura demonstrado por PCR quantitativo.	109
Figura 38. Diminuição dos níveis de expressão da FAK em MVRNs em cultura tratados com siRNA... ..	110
Figura 39. Silenciamento gênico da FAK impede o efeito pro-hipertrófico de FP-1 em MVRNs em cultura.....	111
Figura 40. Tratamento com FP-1 estimula a ativação da via mTOR em MVRNs em cultura... ..	113
Figura 41. Tratamento com rapamicina impede o efeito hipertrófico de FP-1 em MVRNs em cultura.....	114
Figura 42. Co-purificação do complexo FERM/C-terminal da Miosina Sarcomérica.... ..	115
Figura 43. Ensaio de <i>cross linking</i> com o reagente DSS.....	116
Figura 44. Corrida cromatográfica, espectros de MS e MS/MS, respectivamente... ..	117
Figura 45. Identificação dos peptídeos ligados pelo reagente de <i>cross-linking</i>	118

Figura 46. Superfície do domínio FERM da FAK com destaque para a posição das lisinas 110 e 255 e para a fenda formada entre os subdomínios no domínio FERM.....	119
Figura 47. Representação em fitas do domínio FERM da FAK.....	121
Figura 48. Dados de SAXs do complexo FERM/C-terminal da miosina.....	123
Figura 49. Modelo do complexo FERM/C-terminal da miosina obtido por modelagem de corpo rígido baseado nos dados de SAXS.....	124
Figura 50. Modelos do complexo FERM/C-terminal da miosina obtidos por <i>docking</i> molecular.....	126
Figura 51. Posição das lisinas identificadas pela técnica de <i>cross linking</i> acoplada à espectrometria de massas no modelo do complexo FERM/miosina.....	127
Figura 52. Modelo de interação entre os domínios FERM e quinásico e a miosina sarcomérica.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP	- Peptídeo natriurético atrial
ATP	- Adenosina tri-fosfato
CT	- Controle
DMEM	- Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbelcco
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTT	- 1,4-Dithiothreitol
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	- <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	- <i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAT	- <i>Focal Adhesion Targeting</i>
FERM	- 4.1, ezrina, radixina e moesina
FL-FAK	- <i>Full length FAK</i>
GAPDH	- <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Grb2	- Growth factor receptor-bound protein 2
GST	- Glutathione S-Transferase
IPTG	- Isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo
JNK	- Jun N-terminal kinase
KDa	- KiloDalton
MAP	- Proteína ativada por mitógeno
MyBPc	- <i>Myosin binding protein C</i>
Mdm2	- <i>Mouse double minute 2</i>
MOPS	- N-morpholino propanesulfonic acid

mTOR	- <i>mammalian target of rapamycin</i>
MVRN	- miócitos ventriculares de ratos neonatos
pb	- Pares de base
PBS	- Tampão salina fosfato
PCR	- Reação de polimerização em cadeia
RMSD	- Root Mean Square Deviation
RT-PCR	- Reação de transcrição reversa
qPCR	- PCR quantitativo
Php	- Fenilefrina
PI3 quinase	-Phosphoinositide 3-kinases
PTK2	-Protein tyrosine kinase 2
PMSF	- Phenylmethanesulphonyl fluoride
RNA	- Ácido ribonucleico
mRNA	- RNA mensageiro
SERCA	- <i>Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SHP2	- Src homology 2-containing tyrosine phosphatase
siRNA_{FAK}	. Small interference RNA para a FAK
S6K	. P70-S6 Kinase
TSC2	- <i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
U.A.	- Unidades Arbitrárias

A tirosino-quinase de adesão focal (FAK) tem papel crítico na mediação da migração, sobrevivência e proliferação celular. Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que a FAK é ativada pelo estresse mecânico em miócitos cardíacos e que ela se co-precipita com a miosina sarcomérica. No presente trabalho foi demonstrado que o domínio FERM da FAK medeia a interação com a miosina sarcomérica, sendo que esta interação leva à inibição da autofosforilação da FAK, enquanto que a ativação prévia da FAK reduz sua interação com a miosina *in vitro*. Ensaios de *cross linking* acoplado a espectrometria de massas e espalhamento de raios X a baixos ângulos demonstraram que a miosina interage em uma fenda localizada entre os subdomínios do domínio FERM. Experimentos de microscopia confocal demonstraram que estas proteínas estão co-localizadas em miócitos cardíacos de ratos neonatos e adultos. Ensaios de imunoprecipitação revelaram que aproximadamente 40% da FAK está basalmente associada à miosina sarcomérica enquanto que, após o estiramento celular esta associação reduziu paralelamente à ativação da FAK. A porcentagem de FAK associada à miosina não se alterou com a ativação da FAK após tratamento com fenilefrina, diferente da ativação pelo estresse mecânico. A interferência na interação FAK/miosina pelo silenciamento gênico da miosina culminou com a ativação da FAK e o tratamento dos miócitos cardíacos com o peptídeo FP-1, derivado do subdomínio F2 do domínio FERM, levou a uma diminuição na interação FAK/miosina e ao aumento na fosforilação/ativação da FAK. O tratamento prolongado com FP-1 resultou em hipertrofia dos miócitos cardíacos de ratos neonatos, efeito concomitante à ativação da via de sinalização Akt, TSC2 e S6Kinase. Tanto o silenciamento da FAK quanto o tratamento com rapamicina bloquearam a hipertrofia decorrente do tratamento com FP-1. Os dados deste trabalho indicam que a interação da FAK com a miosina sarcomérica é sensível ao estresse mecânico e que possui papel regulatório na manutenção da quiescência basal da FAK e no controle das vias de sinalização mediadas por esta quinase, como a via de crescimento celular AKT/mTOR/S6Kinase, em miócitos cardíacos em cultura.

Palavras chave: Sinalização Celular, Mecanotransdução, Quinase de Adesão Focal, Miosina, Miócitos Cardíacos.

ABSTRACT

The Focal Adhesion Kinase (FAK) plays a critical role in mediating the migration, survival and cell proliferation. Previous studies from our laboratory demonstrated that FAK is activated by mechanical stress in cardiac myocytes and it co-immunoprecipitate with sarcomeric myosin. Here, we demonstrated that the FAK FERM domain mediates the interaction with sarcomeric myosin, and that this interaction leads to inhibition of FAK autophosphorylation *in vitro*, whereas the previous activation of FAK reduces its affinity to myosin. A model based on small angle X-ray scattering analyses and crosslinking technology coupled with mass spectrometry indicated that a cleft in FERM domain is critical to the interaction of FAK to myosin. Confocal microscopy experiments showed that these proteins are colocalized in cardiomyocytes of neonatal and adult rats. Immunoprecipitation assays revealed that approximately 40% of FAK is basally associated with sarcomeric myosin while cardiomyocyte stretching reduced this association in parallel with FAK activation. The percentage of FAK associated with myosin was not change in response to FAK activation by treatment with phenylephrine, unlike in response to FAK by mechanical stress. The interference in the FAK/Myosin interaction by myosin silencing approach culminated with the activation of FAK. The treatment of cells with the FP-1 peptide, derived from the FAK FERM domain, lead to a decrease in the interaction with sarcomeric myosin and an increase in FAK activation. Prolonged treatment with FP-1 resulted in morphological hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes which was an effect concomitant with activation of the Akt, TSC2 and S6Kinase signaling pathway. Both FAK silencing and the rapamycin treatment blocked the morphological hypertrophy resulting of the treatment with FP-1. This study indicated that the interaction of FAK with sarcomeric myosin is sensitive to mechanical stress and it has regulatory role in maintaining of FAK quiescence and control of signaling pathways mediated by this kinase, such as cell growth via AKT/mTOR/S6Kinase in cardiac myocytes in culture.

Keywords: Cellular Signaling, Mechanotransduction, Focal Adhesion Kinase, Myosin, Cardiomyocytes.

1.Introdução

1.1 Hipertrofia cardíaca

Nas doenças do coração, ocorre aumento da massa do miocárdio (i.e hipertrofia) e alterações de forma e dimensão das câmaras cardíacas (i.e. remodelamento) consequência da atuação de fatores como redução da capacidade contrátil do miocárdio, aumento da volemia, aumento da resistência ao fluxo de sangue entre compartimentos ou combinações destes fatores.

Apesar de qualquer uma das câmaras cardíacas poderem apresentar hipertrofia e remodelamento, o maior interesse, pela frequência e importância clínica, se concentra na hipertrofia e remodelamento do ventrículo esquerdo. A presença de hipertrofia e/ou remodelamento, independentemente da doença primária que os tenha originado, tem grande impacto na evolução clínica de pacientes cardiopatas (Levy et al., 1990; Sutton et al., 1994) e representam fatores independentes de risco cardiovascular (Levy et al., 1990; Pfeffer and Braunwald, 1990; Sutton et al., 1994)

O aumento do risco cardiovascular nos pacientes com hipertrofia do ventrículo esquerdo está associado à maior predisposição a infartos do miocárdio, ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca e ao aparecimento de arritmias ventriculares graves (Lorell and Carabello, 2000). Da mesma forma, a dilatação do ventrículo esquerdo correlaciona-se com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca e arritmias graves (Pfeffer and Braunwald, 1990; Sutton et al., 1994; Vasan et al., 1997).

A natureza progressiva das alterações funcionais do ventrículo esquerdo hipertrófico e/ou dilatado possui íntima relação com as alterações estruturais do miocárdio que incluem hipertrofia e degeneração dos miócitos cardíacos, fibrose, alterações da microcirculação e infiltração de células inflamatórias que ocorrem em intensidades variáveis, dependendo do estágio evolutivo. Estas alterações produzem desarranjos irreversíveis da histoarquitetura do miocárdio, o que limita a eficiência das terapêuticas disponíveis para o tratamento da insuficiência cardíaca, principalmente nos estágios mais avançados. Avanços no conhecimento da patogenia e fisiopatologia das alterações estruturais do miocárdio deverão permitir o estabelecimento de novas modalidades terapêuticas com potencial para reduzir a elevada morbi-mortalidade associada à insuficiência cardíaca.

As alterações estruturais do miocárdio são atribuídas à ação complexa de fatores neuro-humorais (angiotensina II, catecolaminas, citocinas e fatores de crescimento) e biomecânicos em miócitos cardíacos e fibroblastos. Porém, estímulos mecânicos gerados em consequência de alterações primárias da capacidade contrátil, aumento da volemia e/ou aumento da resistência ao fluxo de sangue, são necessários para a instalação das alterações estruturais do miocárdio nas várias cardiopatias (Cooper, 1987; Lorell and Carabello, 2000).

1.2 Mecanotransdução e hipertrofia em miócitos cardíacos

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 miócitos cardíacos, que são transmitidas para células adjacentes e para a matriz extracelular. Para responder aos estímulos mecânicos, o sistema de

mecanotransdução existente nestas células deve ser capaz de converter sinais físicos em respostas bioquímicas. Para isto, este sistema deve possuir uma comunicação com a membrana celular a fim de sentir a tensão na membrana, deve possuir elementos responsáveis pela transdução do sinal e, ainda, vias de sinalização mecanorresponsivas (Vogel and Sheetz, 2006).

Estudos demonstram que a tensão aplicada na membrana celular age como um regulador da atividade biomecânica (Huxley and Simmons, 1971) e a força resultante desta tensão é suficiente para alterar a atividade enzimática de uma extensa variedade de enzimas (Sheetz and Dai, 1996). Estas alterações podem ser decorrentes de alterações conformacionais na estrutura destas proteínas, o que levaria à exposição de sequências críticas de aminoácidos e possibilitaria a interação com o substrato ou com outras proteínas (Vogel and Sheetz, 2006).

Em miócitos ventriculares de ratos neonatos em cultura (MVRNs), o estiramento mecânico leva à ativação de múltiplos sistemas de segundo mensageiros (Sadoshima and Izumo, 1993; Vandeburgh and Kaufman, 1979). Após o estiramento celular observa-se à ativação das fosfolipases C, D e A2; de tirosino quinases, como a SRC e a quinase de adesão focal (FAK); das quinases ativadas por mitógenos (MAP-kinases) e seus ativadores; da *c-Jun N-terminal protein kinases* (JNK); da proteína quinase C (PKC) e da P70 S6 kinase, entre outras (Sadoshima and Izumo, 1993; Sadoshima et al., 1992; Yamazaki et al., 1995; Yamazaki et al., 1993). Estas modificações decorrentes do aumento da tensão afetam a regulação do desempenho cardíaco e podem culminar no processo de hipertrofia celular (de

Rooij et al., 2005; Engler et al., 2006; Paszek et al., 2005; Samarel, 2005; Wozniak et al., 2003).

Em geral, o desenvolvimento da hipertrofia em miócitos cardíacos é caracterizado pela expressão de genes de resposta imediata, re-expressão de genes fetais, pelo aumento na síntese protéica e pelo aumento no volume celular (Sussman et al., 2002).

A primeira resposta à sobrecarga hemodinâmica é a indução de proto-oncogenes (como o *c-fos*, *c-jun* e o *c-myc*) e dos genes das *Heat Shock Proteins* (como as *hsp70*), também conhecidos como genes de resposta imediata (Izumo et al., 1988; Komuro et al., 1988; Mulvagh et al., 1987). Após a resposta imediata, grupos de genes fetais passam a ser re-expressos, um mecanismo adaptativo à situação de sobrecarga. Por exemplo, ocorre a re-expressão nos miócitos cardíacos dos genes da α -actina de músculo esquelético e a expressão da isoforma β da miosina da cadeia pesada (β -*Myosin heavy chain* - MHC), a qual é, energeticamente, mais eficiente no processo de contração (Schwartz et al., 1986). Além disso, ocorre a re-expressão do Fator Natriurético Atrial (ANP) pelas células ventriculares, o qual é expresso na vida pós-natal apenas pelas células atriais (Izumo et al., 1988; Mercadier et al., 1989).

O aumento do volume celular em miócitos cardíacos é um processo de extrema importância biológica. Em situações de estresse, que requerem aumento na demanda de trabalho, estas células promovem um aumentando na síntese de proteínas, principalmente daquelas envolvidas no processo de contração celular (Sussman et al., 2002). Este aumento na síntese protéica se reflete em um aumento na massa e no tamanho celular, caracterizando

o processo de hipertrofia. Uma importante via no processo de crescimento celular é a via da mTOR (*mammalian target of rapamycin*), uma serina/treonina quinase, que integra sinais nutricionais, sinais advindos de mitógenos e de situações de estresse para regular o crescimento celular (Lee et al., 2007; Wullschleger et al., 2006). mTOR é regulada negativamente, de forma indireta, pelo complexo formado por TSC1/TSC2 (*Tuberous sclerosis complex 1/2*), o qual pode ser regulado diretamente por ERK1/2 e pela PI3 Kinase, via AKT (Del Re et al., 2008; Parsons, 2003). Os principais alvos da mTOR no controle do crescimento celular são as proteínas S6 kinase e a proteína 4EBP1. A fosforilação e ativação de S6 kinase pela mTOR culmina com a fosforilação da proteína ribossomal S6, que aumenta a biogênese ribossomal, e com a fosforilação do fator de elongação eEF2, facilitador do processo de tradução celular. Já a fosforilação inibitória da proteína 4EBP1 faz com que 4EBP1 deixe de inibir o fator de iniciação IF4E, aumentando assim a tradução CAP dependente. A fosforilação dos efetores da mTOR pode ser inibida pela rapamicina, um inibidor específico da mTOR (Lee et al., 2007; Wullschleger et al., 2006).

Além da resposta efetuada pelas proteínas sinalizadoras, o estresse mecânico também leva a abertura de canais iônicos mecanossensíveis (Sadoshima and Izumo, 1997; Vogel and Sheetz, 2006). Alguns destes canais respondem ao estresse proveniente da bicamada lipídica enquanto outros, fisicamente conectados ao citoesqueleto e/ou à matriz extracelular, recebem e respondem à força transmitida por esses compartimentos (Vogel and Sheetz, 2006). Estes canais sensíveis ao estiramento permitem a passagem dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Ruknudin et al., 1993). A sinalização pelo íon cálcio tem sido reportada por ter papel na regulação da expressão gênica e da atividade contrátil em miócitos cardíacos submetidos ao estresse mecânico (Hongo et al., 1996; Kudoh et al., 2003). Além disso, também tem sido

demonstrado que o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} pode contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por diversos mecanismos, como por exemplo, pelo aumento da atividade da PKC, seguida por aumentos na expressão gênica de *c-fos*, α -actina de músculo esquelético (Komuro et al., 1991), β -MHC (Kariya et al., 1991) e ANP (Shubeita et al., 1992); pela ativação da proteína quinase dependente de cálcio, calmodulina, a qual leva ao aumento da expressão de *c-fos* (Rosen et al., 1995); e pela regulação da proteína fosfatase calcineurina, que leva ao aumento da transcrição pela regulação do fator de transcrição GATA4 (Molkentin et al., 1998).

Também importante no contexto da mecanotransdução é a capacidade do citoesqueleto do miócito cardíaco de ancorar e controlar a atividade das moléculas sinalizadoras que, uma vez ativadas, podem coordenar a expressão gênica e as respostas fenotípicas aos estímulos mecânicos (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Janmey, 1998; Sussman et al., 2002).

1.3 Citoesqueleto dos miócitos cardíacos

No cardiomiócito, o citoesqueleto é composto pelo citoesqueleto sarcomérico e extra-sarcomérico (Fig. 01). O citoesqueleto extra-sarcomérico é formado principalmente pelos filamentos de actina, pelos filamentos intermediários que conectam sarcômeros paralelos entre si com o sarcolema e com membranas de organelas intracelulares e pelos microtúbulos, que estabelecem conexões longitudinais entre as estruturas sub-celulares dos miócitos cardíacos. Já o citoesqueleto sarcomérico é constituído principalmente pelas proteínas responsáveis por ligar os filamentos ao disco-Z, as que compõem o próprio disco-Z

(estrutura responsável pela sustentação e ancoragem das proteínas contráteis) e pelos filamentos de actina e miosina (Scopacasa et al., 2003).

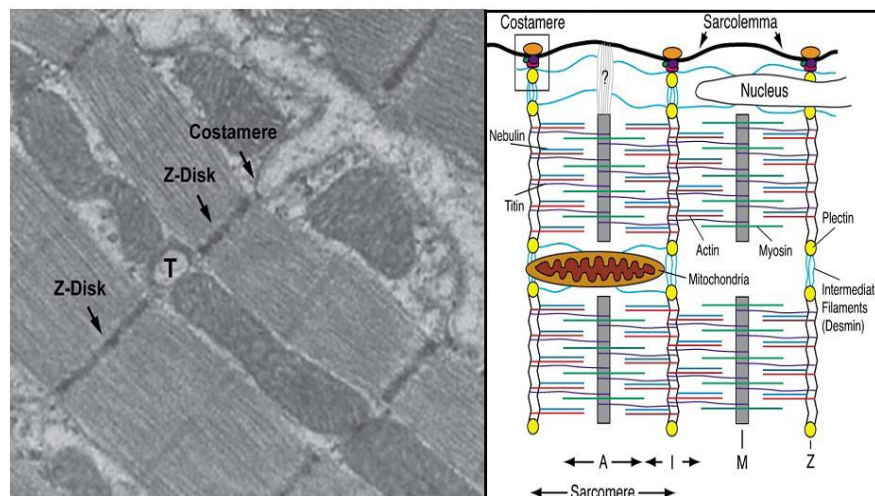


Figura 1. Eletromicrografia de transmissão e esquema do citoesqueleto celular do miócito cardíaco. T corresponde ao túbulo T, A representa a banda sarcomérica constituída principalmente pelos filamentos grossos de miosina; I representa a banda formada principalmente pelos filamentos finos de actina; Z corresponde ao disco Z, M a banda onde os filamentos de miosina estão ancorados (Modificado de Clark e colaboradores, 2002).

Evidências obtidas em modelos experimentais e em formas específicas de miocardiopatia de origem genética demonstraram que a transdução de sinais físicos em bioquímicos depende da integridade de estruturas subcelulares como os costâmeros e os discos Z, uma vez que as moléculas sinalizadoras que se concentram nestas regiões são passíveis de serem ativadas por alterações conformacionais das proteínas estruturais, causadas pelo estresse mecânico (Samarel, 2005; Sussman et al., 2002).

1.3.1 Discos-Z

Os discos-Z são as regiões que delimitam lateralmente os sarcômeros. Eles funcionam como sítios de ancoragem para a titina, nebulina e para os filamentos finos de actina de sarcômeros vizinhos, que se sobrepõe nestas regiões e são interligados pela α -actinina. Como estas regiões são responsáveis pela ancoragem de proteínas do citoesqueleto sarcomérico, os discos-Z são tidos como condutores primários da força gerada pela contração. Os discos-Z de miofibrilas paralelas são alinhados entre si, o que coordena as contrações das miofibrilas individuais para um ponto único, onde o disco-Z é ligado à membrana da célula muscular, nas regiões dos costâmeros. Os filamentos intermediários, abundantes na periferia do disco-Z, provavelmente participam na ligação entre as miofibrilas adjacentes (Clark et al., 2002; Hoshijima, 2006).

Evidências sobre a associação entre proteínas dos discos-Z e proteínas sinalizadoras, como quinases, fosfatases e proteínas ligadoras de cálcio, indicam uma potencial participação do disco-Z no desenvolvimento da hipertrofia miocárdica, miopatias e insuficiência cardíaca (Clark et al., 2002).

1.3.2 Costâmeros

Os costâmeros são estruturas perisarcolemas subcelulares alinhadas preferencialmente com os discos Z (Fig. 02). São formados por uma rede complexa de proteínas que, além de flanquearem o disco Z, conectam seus elementos aos elementos da matriz extracelular e, além disso, aos miócitos cardíacos vizinhos (Epstein and Davis, 2003; Hoshijima, 2006; Lammerding et al., 2004; Samarel, 2005; Sussman et al., 2002). Os

costâmeros são tidos como estruturas de transmissão lateral de força, evento importante para contração coordenada das miofibrilas cardíacas e também para a mecanotransdução no cardiomiócito, funcionando como um sensor lateral (Hoshijima, 2006).

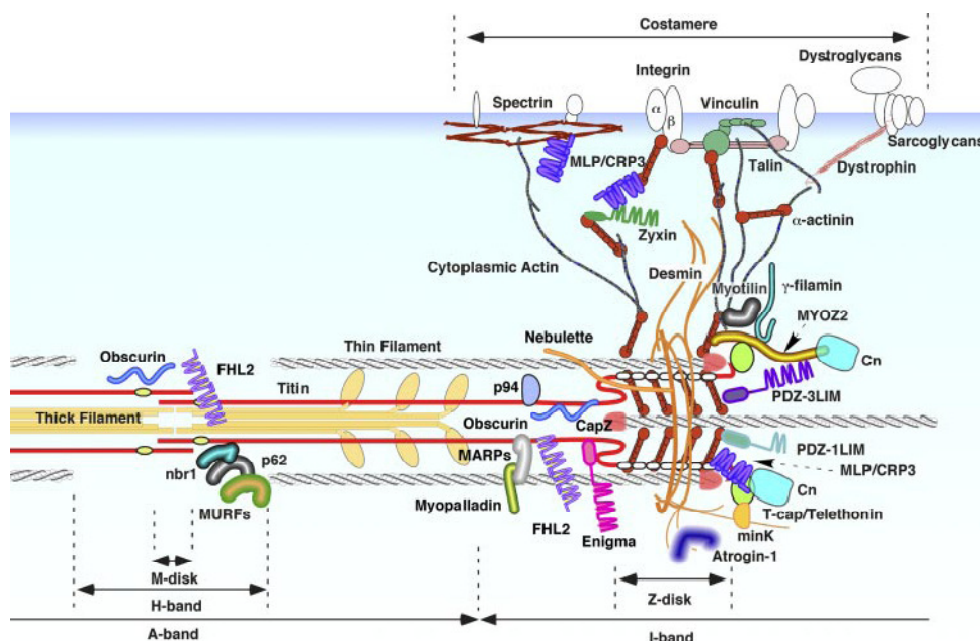


Figura 02. Proteínas associadas ao disco Z e às regiões de costâmero em miócitos cardíacos. Muitas destas proteínas vêm sendo associadas a eventos de mecanotransdução que modulam funções intracelulares (Hoshijima, 2006).

Dois complexos protéicos macromoleculares distintos, o complexo integrina e o complexo distrofina-glicoproteína (DGC), podem desempenhar papéis regulatórios importantes na região dos costâmeros.

No complexo integrina-citoesqueleto, o domínio citoplasmático da integrina fornece âncoras críticas para o citoesqueleto de actina e para o complexo multi-molecular formado nas regiões dos costâmeros. Entre as proteínas deste complexo, algumas apresentam funções

celulares bastante reconhecidas, como as tirosinas quinases do tipo não receptor, como a quinase de adesão focal (FAK), tirosina quinases da família Src, e proteína quinase ligada à integrina (ILK), proteínas do citoesqueleto, tais como talina, vinculina e mediadores de sinais, como as *small GTP-binding proteins* (Rac, Rho, Cdc42) (Ervasti, 2003; Miranti and Brugge, 2002; Ross, 2004; Samarel, 2005).

A maioria das evidências experimentais de que o complexo integrina-citoesqueleto apresenta função na mecanotransdução em miócitos cardíacos proveio de estudos de deleção ou bloqueio da função de suas proteínas estruturais ou de sinalização. Como exemplo, a deleção da β_1 -integrina resulta em cardiomiopatia dilatada (Shai et al., 2002) e ratos com deleção da vinculina não toleraram aumento da pós-carga ventricular esquerda (Zemljic-Harpf et al., 2004). Além disso, deleção ou bloqueio da função da FAK resulta em comprometimento da resposta celular ao estresse mecânico (DiMichele et al., 2006; Peng et al., 2006).

Além do complexo integrina-citoesqueleto, o complexo distrofina-glicoproteína também constitui um importante complexo de mecanotransdução presente nos costâmeros (Lapidos et al., 2004). A distrofina está fortemente ligada ao sarcolema das regiões costaméricas por interações com as proteínas distroglicanas, distrobrevinas, sintrofinas e filamentos de γ -actina (Ervasti, 2003; Rybakova et al., 2000; Straub et al., 1992). Essas conexões parecem estabilizar o sarcolema contra forças físicas aplicadas nos costâmeros durante a contração muscular ou o estiramento. Assim, em humanos e camundongos com distrofia muscular de Duchene, a insuficiência de distrofina leva a uma desorganização das regiões costaméricas e ruptura da integridade do sarcolema (Blake et al., 2002).

Além da necessidade da integridade estrutural dos costâmeros e discos-Z e o agrupamento de proteínas de sinalização nestes locais para uma resposta adequada dos miócitos cardíacos ao estresse mecânico, também importante é a capacidade dos filamentos do citoesqueleto de propagar o estresse mecânico por longas distâncias (Ingber, 2005; Wang and Suo, 2005). Isso sugere a existência de mecanosensores e componentes de sinalização distantes daqueles localizados na membrana extracelular (Vogel and Sheetz, 2006).

Estudos recentes também têm destacado, além da tensão aplicada na membrana celular, a importância da tensão gerada internamente pelo citoesqueleto de actina-miosina como regulador das atividades celulares (Clark et al., 2007; Engler et al., 2006; Frey et al., 2006; Pasapera et al.).

1.3.3 O citoesqueleto de actina-miosina

No cardiomiócito, o citoesqueleto de actina-miosina (Fig. 03) é o principal responsável por regular a contratilidade gerada no meio intracelular e, conseqüentemente, por gerar tensão no citoesqueleto (Krendel and Mooseker, 2005).

A actina é a proteína mais abundante do músculo e o principal constituinte dos filamentos delgados. Ela apresenta-se sob a forma de polímeros longos (actina F) formados por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) torcidas uma sobre a outra, em uma dupla hélice. Cada meia-volta da hélice de actina F é composta por 7 monômeros de actina G, que interagem entre si e com a miosina sarcomérica (Clark et al., 2002).

A miosina tipo II (miosina sarcomérica) é a principal proteína motora responsável pelos movimentos de contração e relaxamento dos sarcômeros (Clark et al., 2002). Esta é uma proteína hexamérica composta por um par de cadeias pesadas (MHCII), um par de cadeias essenciais e um par de cadeias regulatórias. O par de cadeias pesadas é constituído por um domínio motor conservado, localizado na região N-terminal, responsável por dirigir o movimento ao longo dos filamentos de actina; por um “pescoço”, que funciona como um braço rígido de alavanca e gera movimento no domínio motor e por uma região C-terminal de α -hélice disposta em *coiled-coil*, não conservada, que termina com uma cauda não helicoidal. A cadeia essencial se liga na região do pescoço e promove integridade estrutural ao domínio motor, já a cadeia regulatória regula a atividade de ATPase da miosina. A miosina tipo II se organiza em filamentos bipolares através de interações eletrostáticas entre as caudas em *coiled-coil* (Hostetter et al., 2004). O domínio motor de cada filamento se associa com filamentos de actina de orientação oposta. A atividade ATPásica de cada cabeça de miosina é ativada mediante a interação com a actina, gerando o complexo da actomiosina (Clark et al., 2002; Steinmetz et al., 1997). A interação entre actina e miosina é altamente modulada por um complexo regulatório formado pela tropomiosina e troponina na dependência de Ca^{2+} (Weber & Murray, 1973). Com o movimento simultâneo das cabeças da miosina ao longo dos filamentos de actina, a miosina tipo II gera o movimento de contração e também tensão no córtex celular (Clark et al., 2007).

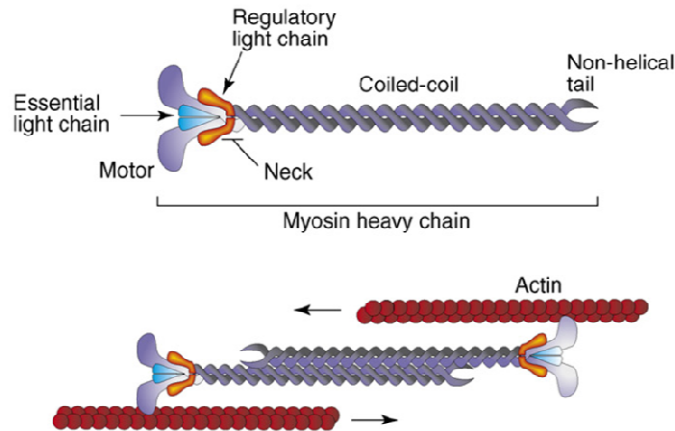


Figura 03: Citoesqueleto de actina-miosina. Painel superior: esquema do monômero de miosina tipo II. Painel inferior: esquema da organização dos filamentos de miosina e sua interação com os filamentos de actina (Clark et al., 2007).

A manutenção da homeostase tensional, processo no qual a célula estabelece um balanço entre as forças externas aplicadas, através do contato da célula com a matriz extracelular e a contratilidade gerada internamente através da interação actina-miosina tipo II é necessária para a manutenção de funções celulares básicas (de Rooij et al., 2005; Engler et al., 2006; Gupton and Waterman-Storer, 2006; Paszek et al., 2005; Wozniak et al., 2003). A tensão gerada internamente é responsável pela proliferação celular, diferenciação, locomoção do corpo celular e a desorganização das adesões celulares na região posterior da célula e por promover a contração celular em células especializadas (Ridley et al., 2003). A desregulação das vias que controlam a homeostase tensional pode contribuir para a patogênese de várias doenças (Engler et al., 2006), o que sugere a existência de mecanismos capazes de sentir a tensão gerada internamente, pelo citoesqueleto de actina-miosina, e convertê-la em sinais bioquímicos de sinalização celular (Clark et al., 2007; Pasapera et al.).

Considerando a diversidade de proteínas mecanosensores, é possível que a transdução dos sinais mecânicos em processos bioquímicos ative várias vias de sinalização que possam interagir para produzir uma resposta funcional controlada. No entanto, apesar de ser bem conhecido o fato de o estresse mecânico promover vários efeitos na estrutura e função celular, ainda pouco se sabe sobre quais moléculas são diretamente ativadas pelo estresse e como o estímulo mecânico é convertido em sinais intracelulares que culminam com a regulação da expressão gênica e das funções celulares (Ingber et al., 1994; Vandeburgh and Kaufman, 1979).

Assim, o entendimento das bases celulares e moleculares do processo de mecanotransdução é relevante no que concerne à compreensão da fisiologia e fisiopatologia do miócito cardíaco e do coração como um todo.

1.4 Quinase de Adesão Focal

Estudos prévios sobre mecanismos patogênicos da hipertrofia e insuficiência cardíacas desenvolvidos pelo laboratório (Clemente et al., 2005; Domingos et al., 2002; Fonseca et al., 2005; Franchini et al., 2000; Kobarg et al., 2005; Marin et al., 2008; Nadruz et al., 2005; Torsoni et al., 2003), com foco na sinalização celular ativada por estímulos mecânicos em miócitos cardíacos, demonstraram a importância crítica da sinalização pela quinase de adesão focal (FAK) para as alterações fenotípicas dos miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos. O conjunto dos dados obtidos sugere a FAK como alvo potencial para interferência no processo de transformação fenotípica de miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos.

FAK é uma proteína pertencente à família de tirosinas quinases não receptores, expressa na maioria dos tecidos e tipos celulares. Ela é altamente conservada evolutivamente desde os organismos mais simples às diferentes espécies de mamíferos. Foi identificada em 1992 independentemente por Steve Hanks, Jun-Lin Guan e Michael Schaller como um substrato do oncogene Src e, em células normais, como uma proteína altamente fosforilada em tirosina, localizada em sítios de adesão enriquecidos em integrinas, conhecidos como sítios de adesão focal (Mitra et al., 2005). Desde então, sua função biológica em diversos processos celulares como motilidade, proliferação, diferenciação celular, sobrevivência e invasibilidade vêm sendo demonstrada (Cary et al., 1996; Hauck et al., 2001; Ilic et al., 1995; Owens et al., 1995; Sieg et al., 2000; Sieg et al., 1999; Taylor et al., 2001; Wang et al., 2001).

Ela é composta por um domínio N-terminal, um *linker* de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, um domínio catalítico central e um domínio C-terminal. O domínio C-terminal é composto por um sítio rico em prolina (domínio de reconhecimento SH3) e por um domínio C-terminal conhecido como *focal-adhesion targeting* (FAT) (Dunty et al., 2004; Mitra et al., 2005) (Fig. 04). FAT é composto por 4 α -hélices (Arold et al., 2002; Hayashi et al., 2002), é crítico para a localização da FAK nos pontos de adesão focal, via ligação à paxilina e não parece estar envolvido na regulação catalítica da FAK (Lietha et al., 2007). O domínio catalítico (resíduos 411-687) apresenta um *loop* de ativação que contém os resíduos tirosinas 576 e 577, conhecido como alça de ativação. O *linker* que conecta este domínio ao domínio N-terminal, contém o resíduo tirosina 397, importante para a autofosforilação e ativação da FAK e também um sítio de reconhecimento SH3 rico em prolina (PxxP) (Ceccarelli et al., 2006; Lietha et al., 2007). O domínio N-terminal possui uma sequência de

aminoácidos homóloga ao domínio FERM (band 4.1, ezrina, radixina e moesina) encontrado em proteínas que ligam o citoesqueleto à membrana plasmática, no entanto, a função deste domínio na FAK ainda não está totalmente esclarecida.

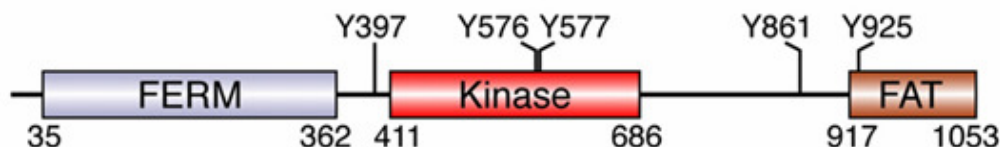


Figura 04. Esquema da disposição dos domínios da FAK. Os resíduos tirosina envolvidos na ativação da FAK estão indicados (Lietha et al., 2007).

O domínio FERM da FAK possui aproximadamente 300 aminoácidos, que estão organizados em três subdomínios, conhecidos como F1, F2 e F3, intimamente associados, formando uma compacta estrutura em forma de roseta (Ceccarelli et al., 2006) (Fig. 05). O subdomínio F1 (resíduos 33-127) exibe uma estrutura semelhante à ubiquina e consiste em cinco folhas β capeadas por uma α -hélice. O subdomínio F2 (resíduos 128-253) é formado por 5 α -hélices e 4 destas hélices estão dispostas de forma semelhante à encontrada em proteínas que se ligam à acyl-CoA. O subdomínio F3 (resíduos 254-352) é constituído por um β -sanduíche, composto por 7 folhas β , capeado por uma α -hélice COOH-terminal. F3 se assemelha a plestrina. Os domínios homólogos a plestrina apresentam a mesma estrutura tridimensional dos domínios de ligação à fosfotirosinas e dos domínios EVH1. Esses domínios apresentam sítios de ligação para diversas proteínas e fosfolípidos. Tanto o subdomínio F3, de alguns domínios FERM, quanto os ligantes de fosfotirosinas, ligam-se a peptídeos que se encaixam entre uma extremidade do β -sanduíche e a α -hélice COOH-terminal (Ceccarelli et al., 2006).

FERM interage de forma auto-inibitória com o domínio quinásico (Lietha et al., 2007). No estado auto-inibitório, o domínio FERM se estende pelos lobos C e N do domínio quinásico, inclusive pela alça de ativação desse domínio, que contém os resíduos tirosina 576 e 577. O maior contato entre os dois domínios ocorre entre o subdomínio F2 e o lobo C do domínio quinásico. Uma porção do linker entre FERM e o domínio quinásico, que contém o resíduo de autofosforilação, tirosina 397, faz uma interação do tipo folhas β antiparalelas com subdomínio F1 de FERM e também estabelece contato com o lobo N-terminal do domínio quinásico (Fig. 05) (Lietha et al., 2007). A porção amino terminal do *linker*, que contém um sítio de reconhecimento para domínios SH3, encontra-se localizado, no estado inativo da proteína, na fenda formada entre os subdomínios F1 e F3, fazendo diversas interações com resíduos destes subdomínios (Ceccarelli et al., 2006). De forma interessante, mutação na lisina 38, pertencente ao subdomínio F1, parece aumentar a fosforilação em tirosina 397 e consequentemente, aumentar a atividade desta quinase (Cohen and Guan, 2005b). Esta mutação possivelmente desestabiliza a interação entre o *linker* e o domínio FERM (Lietha et al., 2007).

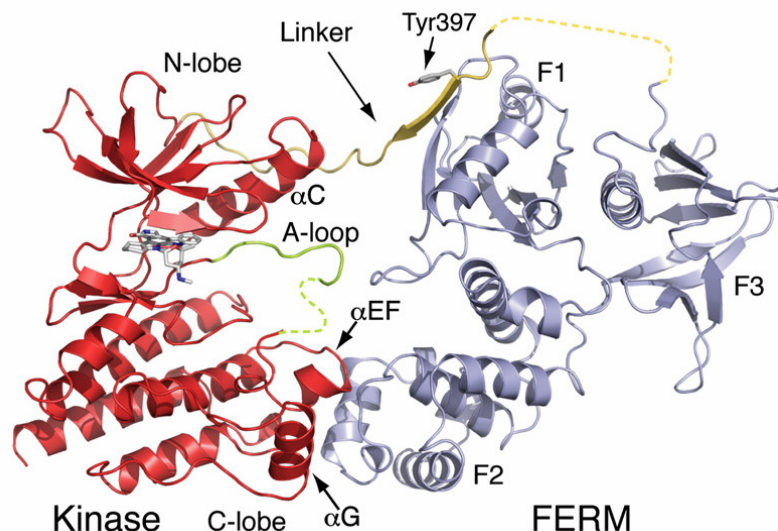


Figura 05. Estrutura tridimensional da conformação auto-inibitória da FAK. A estrutura é composta pelo domínio FERM, *linker* entre os domínios FERM e quinásico e o domínio quinásico (Lietha et al., 2007).

A forma auto-inibitória da FAK parece ser mantida por diversos mecanismos, entre eles cita-se: a disposição do domínio FERM, que bloqueia a fosforilação dos resíduos tirosina 576 e 577 pela Src; o bloqueio físico da fenda catalítica aos substratos (promovido pela interação do domínio FERM com o quinásico); e a inibição da autofosforilação do resíduo tirosina 397 que encontra-se “sequestrado” do sítio ativo pelo subdomínio F1 do domínio FERM (Frame et al.; Lietha et al., 2007).

A autofosforilação da tirosina 397, possivelmente regulada pelo posicionamento deste resíduo no domínio FERM, que pode ocorrer tanto em *cis* como em *trans*, é um evento chave na ativação da FAK e também para a fosforilação de outros resíduos de tirosina importantes para sua função biológica (Calalb et al., 1995; Schlaepfer et al., 1994; Toutant et al., 2002). A importância deste evento reside no fato de que a fosforilação da tirosina 397 da FAK leva

a criação de um sítio de alta afinidade para a ligação de proteínas com domínio SH2, incluindo aquelas da família das Src quinases (c-Src, Fyn) (Cobb et al., 1994). Após a ligação da c-Src no sítio que contém a tirosina 397 fosforilada, Src transfosforila outros resíduos de tirosina da FAK (Calalb et al., 1995; Calalb et al., 1996; Schlaepfer et al., 1994). A fosforilação das duas tirosinas localizadas na alça de ativação, tirosinas 576 e 577, potencializa sua atividade de quinase (Calalb et al., 1995), enquanto a fosforilação da tirosina 925 habilita um sítio para a ligação do domínio SH2 da Grb2, que pode mediar a ativação da ERK ½ através do recrutamento e ativação de Ras (Schlaepfer et al., 1994). A tirosina 397 fosforilada também é um sítio de acoplamento para a fosfatidilinositídeo 3'-OH-quinase (PI 3-quinase) (Chen et al., 1996) que ativa vias anti-apoptóticas mediadas pela AKT (Sonoda et al., 2000).

Estudos que antecederam a cristalização dos domínios FERM e quinásico já indicavam que o domínio FERM tem papel importante na regulação tanto da atividade quanto do estado de fosforilação em tirosina da FAK em células (Cohen and Guan, 2005a, b; Cooper et al., 2003; Toutant et al., 2002). Deleções da região N-terminal da FAK resultaram em hiperfosforilação da região C-terminal e aumento da atividade catalítica, sugerindo que o domínio FERM exerce influência inibitória no domínio catalítico da FAK, o que foi recentemente confirmado pela cristalização destes domínios (Lietha et al., 2007).

Baseado nos dados cristalográficos e funcionais, presume-se que a ativação da FAK dependa da interação com proteínas regulatórias que se ligam à região amino-terminal e/ou de modificações conformacionais intra-moleculares que impeçam a interação entre os domínios FERM e catalítico (Cooper et al., 2003; Lietha et al., 2007). Em consonância com

estas hipóteses, mutações pontuais em sítios específicos do domínio FERM provocam hipofosforilação da FAK expressa em células, possivelmente, porque as mutações impedem o domínio FERM de interagir com reguladores da ativação da FAK, o que a torna incapaz de ser completamente ativada (Dunty et al., 2004).

Além da interação interna auto-inibitória, o domínio FERM pode mediar interações com regiões citoplasmáticas de receptores, como PDGFR (Sieg et al., 2000), EGFR (Sieg et al., 2000), EphA2 (Carter et al., 2002; Miao et al., 2000), c-Met (Chen and Chen, 2006), FIP200 (Abbi et al., 2002) e β -integrinas (Guan and Shalloway, 1992; Hynes et al., 2002; Schaller et al., 1992). O posicionamento estratégico das integrinas entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, nas regiões dos costâmeros, confere a esta proteína função de acoplamento entre os ambientes mecânicos extra e intracelulares. De fato, as evidências disponíveis apontam para as integrinas na conversão de estímulos mecânicos em sinais bioquímicos nas células (Katsumi et al., 2004). Como as integrinas são destituídas de atividade enzimática intrínseca, sua participação na conversão de estímulos mecânicos em sinais bioquímicos depende do acoplamento de moléculas sinalizadoras. A localização estratégica da FAK na região intracelular de junção das integrinas com proteínas do citoesqueleto permite sua ativação pelos estímulos mecânicos, supostamente através de modificações conformacionais do complexo integrina/citoesqueleto. No entanto, são ainda desconhecidos os mecanismos moleculares pelos quais os estímulos mecânicos produzem modificações conformacionais e ativam a FAK. De maneira geral, considera-se que forças mecânicas atuem no microambiente produzindo modificações conformacionais que resultem na ativação desta quinase (Hynes, 2002; Wang et al., 2001).

Estudos anteriores demonstraram que a FAK é rapidamente ativada por sobrecarga pressórica em cultura de células ventriculares de ratos neonatos e no próprio miocárdio (Clemente et al., 2005; Domingos et al., 2002; Fonseca et al., 2005; Franchini et al., 2000; Kobarg et al., 2005; Marin et al., 2008; Nadruz et al., 2005; Torsoni et al., 2003), sendo que esta ativação acompanha-se pela reprogramação do programa gênico, sendo re-expressos genes característicos do período fetal, como a β -MHC e o ANP em células ventriculares (Torsoni et al., 2003). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a FAK contribui para o processo de hipertrofia e remodelamento cardíacos (Clemente et al., 2007; DiMichele et al., 2006; Kuppuswamy, 2002; Mansour et al., 2004; Nadruz et al., 2005; Peng et al., 2006; Pham et al., 2000; Seko et al., 1999; Torsoni et al., 2003; Torsoni et al., 2005).

Em estudos realizados por Fonseca e colaboradores (Fonseca et al., 2005), através de análise de biblioteca de cDNA de coração de rato com o sistema duplo-híbrido em levedura, verificou-se a existência de interação entre a FAK e a região C-terminal da cadeia pesada da miosina tipo II, sendo que o duplo-híbrido foi realizado com a utilização de uma isca que abrangia a região N-terminal e a região catalítica da FAK. Esta interação foi confirmada por experimentos de imunomicroscopia eletrônica, por ensaios de precipitação com proteínas recombinantes e por imunoprecipitação em extratos provenientes de corações de ratos controles e submetidos à coarctação da aorta. Estes ensaios indicaram uma diminuição da interação entre FAK e a miosina sarcomérica com 60 minutos de coarctação da aorta, apesar de não haver confirmação da interação direta entre estas proteínas (Fonseca et al., 2005).

Neste contexto, sabendo-se que FAK responde à estímulos mecânicos e que, além de interagir com proteínas costaméricas, ela também pode interagir com a miosina sarcomérica,

responsável por gerar e regular a tensão intracelular, é plausível sugerir que a ativação da FAK decorrente do estresse mecânico possa também depender da deformação da miosina sarcomérica e, conseqüentemente, que a interação com esta proteína do citoesqueleto sarcomérico possa contribuir para a manutenção da atividade basal da FAK em miócitos cardíacos.

1.5 Hipótese

A interação entre a quinase de adesão focal e a miosina sarcomérica ocorre de forma direta através do domínio FERM da FAK e é importante para a manutenção da quiescência basal da FAK e para os eventos de mecanotransdução que se relacionam aos efeitos pró-hipertróficos desta quinase em miócitos cardíacos.

1.6 Objetivos

Este trabalho possui o objetivo de caracterizar a interação entre a quinase de adesão focal e miosina sarcomérica, além de avaliar a importância desta interação na manutenção da quiescência basal da FAK e na sinalização mediada por esta quinase em miócitos cardíacos.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar a interação entre FAK e a miosina sarcomérica *in vitro*;
2. Caracterizar a interação FAK/miosina em miócitos cardíacos controles, submetidos à silenciamento gênico ou estiramento celular;
3. Avaliar o fenótipo celular após superexpressão da FAK e após interferência na interação FAK/miosina através de peptídeos racionalmente desenhados;
4. Caracterizar estruturalmente a interação FAK/miosina.

2. Material e Métodos

Reagentes. No presente estudo foram utilizados meio de cultura DMEM, soro equino, soro fetal bovino e OPTI-MEM® da Gibco BRL Co. Pancreatina foi adquirida da Sigma, colagenase tipo II da Worthington. Proteína A/G plus foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (USA). Anticorpo policlonal anti-pFAK 397 da Biosource International (USA); o anti-FAK-c 20 e o anti-FAK A-17 da Santa Cruz; o anti-miosina de cadeia pesada da Abcam; faloidina conjugada à rodamina da Molecular Probes; Ampliscribe™ T7 Transcription Kit foi obtido da Epicentre Biotechnologies. Os moldes de oligonucleotídeos foram encomendados da IDT. Trizol, SuperScript II e Lipofectamina™ foram adquiridos da Invitrogen. O meio de montagem Vectashield contendo DAPI foi adquirido da Vector Laboratories. O KIT Ampliscribe T7 high yield transcription foi adquirido da Epicentre.

2.1 Proteínas recombinantes

Os plasmídeos pGEX2T contendo as sequências codificadoras dos domínios FERM, quinásico e C-terminal da FAK em fusão com glutathione S-transferase (GST) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jun-Lin Guan (Departamento of Molecular Medicine, Cornell University college of veterinary Medicine). A proteína de fusão GST-Mio que contém o fragmento da região C-terminal da cadeia pesada de miosina sarcomérica foi clonada no pGEX5X2 (Fonseca et al., 2005). As sequências gênicas codificadoras do domínio FERM da FAK e da porção C-terminal da cadeia pesada da miosina foram clonados no vetor pQTEV com os seguintes *primers*:

FERM_S: 5'CGCGGATCCCATATGGGTGCAATGGAACGAGTATTAAAGG 3'

FERM_AS: 5'CGCAAGCTTGGATCCTCAGTCTTCCTCATCGATGATCTCTGC 3'

Myh6_S: 5' GGC CGG GGA TCC ATG GCT GAG GAG CTG AAG AAG 3'

Myh6_AS: 5' GGC CGG AAG CTT TTA TTC CTC GTC GTG CAT CTT C 3'

As construções foram expressas em *Escherichia coli* BL21 DE3 C41. A indução da expressão das proteínas recombinantes foi efetuada em uma OD de 0,8 com 0,2 mM de IPTG por 16 horas à 18° C. Em seguida as bactérias foram concentradas em pellets e lisadas em tampão PBS (pH 7,5) com 5 mg/ml de lisozima, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 10 mM Na₃PO₄, 10 mM Na₃VO₄, 0,01 mg/ml aprotinina, 2 mM PMSF, 0,2% de triton e 2% de sulfato de streptomicina e 5mM de B-mercaptoetanol. Em seguida, os lisados foram sonicados com 3 pulsos de 10 segundos com intervalos de 20 segundos entre eles. As amostras foram então centrifugadas por 40 minutos a 4°C a 20000 g. Os sobrenadantes com as proteínas recombinantes com cauda de GST foram purificados com o uso de pérolas de glutathione sepharose (Amersham). As pérolas foram previamente lavadas 3 vezes em tampão PBS com 1% de Triton X-100 e 1 vez em tampão PBS sem Triton. Após incubação por 1 hora com o sobrenadante, as pérolas foram lavadas 3 vezes com PBS acrescido de inibidores de proteases e 5mM de B-mercaptoetanol. As proteínas ligadas foram, quando necessário, eluídas com glutathione reduzida (GE) em PBS. Os lisados com as proteínas recombinantes com cauda de histidina foram injetados em colunas de purificação do tipo HisTrap® HP (5 mL; GE) e as proteínas ligadas por afinidade foram eluídas com um gradiente de imidazol (0-100% de 500mM). Em seguida as proteínas foram purificadas por exclusão de tamanho em coluna Superdex 200 26/60 (GE) acoplada ao sistema AKTA-FPLC (Amersham-Biosciences) em tampão PBS acrescido de 5mM de B-mercaptoetanol. Após a eluição das proteínas recombinantes, estas foram concentradas utilizando-se o concentrador Centriprep® Millipore, submetido à centrifugação a 4000 g,

4°C. As proteínas recombinantes foram então mantidas à - 4° C por um prazo máximo de uma semana.

2.2 Purificação de miosina sarcomérica

A extração e purificação de miosina sarcomérica de corações de ratos neonatos foi efetuada segundo o protocolo descrito anteriormente por Tyska e colaboradores (Tyska et al., 2000). Resumidamente, os corações foram extraídos de ratos neonatos (1-2 dias) e homogeneizados em tampão com alta concentração salina (0,3mol/L KCl, 0,15mol/L K₂HPO₄, 0,01mol/L Na₄PO₇, 0,001mol/L MgCl₂, 0,002mol/L DTT, 0,1M NaF, 0,001M EDTA, 0,001M NaVO₄, 2mM PMSF, 0,1mg/ml aprotinina, pH 6.8), incubados a 4°C por 20 minutos e então ultracentrifugados por 60 min (150000g, 4°C, Beckman). O sobrenadante foi transferido para um tubo falcon, diluído 50X em tampão com 2mM de DTT e incubado por 60 min em gelo para precipitação da miosina. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a miosina precipitada foi centrifugada em ultra centrífuga (50000g, 20 min, 4°C). O sobrenadante desta centrifugação foi então descartado e a miosina precipitada foi ressuspendida em 0,025M imidazol, 0,004M MgCl₂, 0,01M DTT, 0,001M EGTA e 0,3M KCl (pH 7,4) com glicerol 50% e armazenados à -20°C.

2.3 Ensaio de Ligação

O ensaio de ligação foi adaptado do protocolo descrito anteriormente por Obermann e colaboradores (Obermann et al., 1997). Miosina purificada de ventrículos de ratos neonatos foi suspensa em Tampão I (50mM KCl, 5mM NaH₂PO₄, pH 7,0) para

permitir a formação de filamentos. De 0,5-2,0µg de miosina foi adicionada às membranas de nitrocelulose e após secagem, por período de 12 horas, as membranas foram bloqueadas por 30 minutos com 1% BSA (Albumina Bovina de Soro), 0.2% Tween-20, 100mM KCl, 20mM imidazol-HCl pH 7,0, 1mM DTT. As membranas individuais foram incubadas por 1 hora com 50µg de cada um dos fragmentos recombinantes da FAK (GST-FERM, GST-KINASE, GST-cTERM) ou GST. Após 3 lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-GST, anti-FAK N-terminal (anti-FAK A-17) ou anti-FAK C-terminal (anti-FAK c-20). As membranas foram lavadas e incubadas com 5µCi [I^{125}] de proteína A (30µCi/µg) por 4 horas à temperatura ambiente e posteriormente lavadas e expostas a filmes de Raio X.

2.4 Far Western Blot

O protocolo utilizado foi adaptado do descrito anteriormente por Yohannan e colaboradores (Yohannan et al., 1999). Para a obtenção do extrato de miocárdio, ventrículos de ratos neonatos (1-2 dias de vida) foram extraídos e congelados em nitrogênio líquido, macerados e homogeneizados em tampão de extração (100mM Tris pH 7,5, 10mM EDTA, 100mM NaF, 10mM Na₃PO₄, 10mM Na₃VO₄, 2mM PMSF, 0,1mg/ml aprotinina). A proteína total foi quantificada e 50-100µg do extrato total foi aplicada em um gel de poliacrilamida (12%). Na coluna paralela do gel foi aplicada a amostra de miosina purificada e o gel foi então resolvido por eletroforese unidimensional. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM Glicina pH 8,3) a 84V por 30min; 91V por 30min e 100V for 30min. Após a transferência, as membranas foram incubadas por 30 min em tampão HBB (25mM Hepes-

KOH pH 7,5, 25mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT) com 6M Uréia. Em seguida, foram feitas incubações sucessivas em HBB a concentrações decrescentes de uréia (3M, 1M, 500mM, 100mM, 50mM, 10mM, 5mM, 1mM, 0.5mM, 0.1mM) por 15 min em cada concentração. As membranas foram então mantidas por 12 horas em incubação com 0.1mM uréia em tampão HBB à 4°C e, em seguida, lavadas 3X em solução Tris-Tween (20 mM Tris, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1 % Tween 20) e bloqueadas 40 min com leite desnatado 5% em solução Tris-Tween. Em seguida, as membranas foram lavadas 3X e incubadas por 12 horas a 4°C com 4µg GST-FERM /ml de tampão de hibridação (20mM Hepes-KOH pH7,5, 75mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 0,1% NP-40, 1% leite desnatado). Posteriormente, as membranas foram lavadas 3X com tampão HBB por 10 min e incubadas com os anticorpos anti-FAK N-Terminal ou anti-GST por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas 3X e incubadas com 5µCi [I¹²⁵] proteína A (30µCi/µg) por 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente as membranas foram lavadas, secadas e expostas a filmes de Raio-X.

2.5 Pull-Down

Os fragmentos GST-FERM (~76 kDa), GST-QUINASE (~55kDa), GST-cTERMINAL (~72kDa) e GST-Mio (48kDa) ligados a perolas de glutathiona sefarose foram incubados com os respectivos alvos. GST foi utilizado como controle para ligação não-específica. Após a precipitação, os pellets foram lavados e resolvidos em SDS-PAGE e as membranas incubadas com o anticorpo primário específico. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram incubadas com 5µCi [I¹²⁵] proteína A (30µCi/Ug)

por 4 horas à temperatura ambiente. As membranas foram posteriormente secadas e expostas a filmes de Raio X.

2.6 Ensaio de tirosina quinase *in vitro*

Experimentos foram realizados com FAK humana recombinante expressa em sistema de baculovírus. Resumidamente, 1,5 µg da FAK foi incubada com 5µl de solução de ATP (4mM MgCl₂, 16mM MOPS, 0.4mM EDTA, 10µCi of [γ -³²P] ATP, 500µM ATP, pH 7,5) e 10µl de 25mM Hepes, 50mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,5, 50% glicerol com e sem GST-Mio. As reações foram incubadas a 37°C, por 2 horas, 200rpm e em seguida inibidas pela adição de tampão de Laemmli e fervura por 5 min. As amostras foram então separadas em SDS-PAGE. Em seguida procedeu-se o *western blotting* com os anticorpos específicos.

2.7 Imunoprecipitação

Extratos de miócitos cardíacos de ratos neonatos foram preparados com tampão de lise (Triton X-100 1%, Tris-HCl 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/ml de aprotinina) a 4°C. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para os ensaios de imunoprecipitação. A determinação da concentração da proteína foi realizada através do método de *Lowry*. Para o protocolo de imunoprecipitação, foi adicionado, a ~700µg de extrato total, 10µg de anticorpo específico, sendo as amostras mantidas sob agitação leve na câmara fria por 16 horas. 50µl de proteína A-Sepharose 6MB foram adicionadas as amostras que permaneceram sob agitação na

câmara fria por mais 2 horas. Após centrifugação por 1 minuto a 800 rpm, 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido a 3 lavagens com tampão de lavagem (Tris-HCl 100mM, pH 7,4, EDTA 1mM, Triton X-100 0,5%, ortovanadato de sódio 2mM). O precipitado foi então separado em SDS-PAGE e o *western blotting* realizado com os anticorpos específicos.

2.8 Isolamento e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos

Detalhes da técnica de extração e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRN) foram descritos anteriormente (Torsoni et al., 2003). Resumidamente, os corações foram retirados de ratos neonatos (1-2 dias), submetidos à digestão branda com colagenase/pancreatina e separados em gradiente de percoll por centrifugação. Após a separação, as células foram plaqueadas em placas com base de silicone recoberta com colágeno tipo I (Bioflex). No terceiro dia de cultura, as células foram privadas de soro e no quarto dia foram submetidas ao estiramento biaxial cíclico (10%, 60 ciclos/min) em Sistema Flexercell FX3000 (Flexercell International, USA) (Fig. 06).



Figura 06: Sistema de estiramento biaxial Flexercell FX3000.

2.9 Desenho dos siRNAs

Os siRNAs contra os RNAm dos genes alvos foram desenhados com o auxílio do software desenvolvido por Tiago Campos Pereira e Iscia Lopes Cendes (FCM, Unicamp). Para gerar as sequências *in silico*, o software utiliza parâmetros de estabilidade interna, descritos originalmente por Khvorova e colaboradores (Khvorova et al., 2003). Desta maneira, as sequências foram selecionadas de acordo com a tendência máxima de incorporação da fita antisenso no complexo RISC.

2.10 Síntese dos siRNAs

Os siRNAs específicos para os genes da FAK e da miosina sarcomérica foram sintetizados *in vitro* utilizando-se as sequências de DNA correspondentes às regiões de maior probabilidade de silenciamento dos genes alvos. A síntese foi realizada sob domínio do promotor da RNA polimerase III T7, utilizando o kit Ampliscribe T7 high yield transcription (Epicentre), de acordo com as instruções do fabricante.

A sequência alvo do siRNA no RNAm da *FAK - protein tyrosine kinase 2 (PTK2)* (NM_013081.1) posiciona-se entre os nucleotídeos 236 e 259 (ACGTGGCCT GCTATGGATTTC) do RNA mensageiro. A sequência alvo do siRNA no RNAm da *Myh6 - myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha* (NM_017239.1) posiciona-se entre os nucleotídeos 276 e 298 (ACCCTCCGAAATTCGACAAGATC) do RNA mensageiro. Como controle foi utilizado um siRNA irrelevante, no caso, para a proteína GFP.

Os moldes para a síntese *in vitro* contendo as sequências específicas e a sequência para anelamento do oligo T7 (sublinhado), além do próprio oligo T7, foram:

T7: 5' GGTAATACGACTCACTATAG 3'

FAK236_s: 5'GCGAAATCCATAGCAGGCCACTTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

FAK236_as: 5'ACGTGGCCTGCTATGGATTTCTTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Myh6_s: 5'GATCTTGTCGAATTTTCGGAGGTTATAGTGAGTCGTATTACC3'

Myh6_as: 5'ACCCTCCGAAATTCGACAAGATTATAGTGAG TCGTATTACC 3'

GFP_s: 5'GTGTCTTGTAGTTCCCGTCTTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

GFP_as :5'ATGACGGGAACACTACAAGACACCTTATAGTGAGTCGTATTACC3'

O siRNA para o silenciamento da FAK gerado após anelamento foi o seguinte:

RNA sense: 5'- CCUCCGAAAUUCGACAAGAUC - 3'

RNA antisense: 3' - UGGGAGGCUUUAAGCUGUUCU - 5'

O siRNA para o silenciamento da miosina gerado após anelamento foi o seguinte:

RNA sense: 5'- CCUCCGAAAUUCGACAAGAUC - 3'

RNA antisense: 3' - UGGGAGGCUUUAAGCUGUUCU - 5'

2.11 Transfecção de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura

Para a transfecção dos siRNAs e do plasmídeo contendo Myc-FAK (pRc/CMV-FAKwt) (Torsoni et al., 2003), os miócitos cardíacos de ratos neonatos foram cultivados por 72 horas (500 mil células/placa de 10cm de diâmetro), sendo as últimas 24 horas de cultivo na ausência de soros e antibióticos. Em seguida, as células foram tratadas por 24 horas com os siRNA específicos para FAK ou miosina ou ainda com o plasmídeo pRc/CMV-FAKwt complexados com lipofectamina. Como controles foram utilizados, no caso do silenciamento, siRNA para GFP, e no caso da hiperexpressão, apenas lipofectamina. Os complexos de siRNA-lipofectamina ou pRc/CMV-FAKwt-lipofectamina foram preparados adicionando-se a lipofectamina ao OPTI-MEM seguida por uma incubação de 45min à temperatura ambiente. Em paralelo, o siRNA (100ng/ml de DMEN para FAK e 200ng/ml de DMEN para miosina) e o pRc/CMV-FAKwt (2 µg DNA/placa) foram incubados com OPTI-MEM por 5min à temperatura ambiente. Em seguida, para a formação do complexo de transfecção, os siRNAs e o plasmídeo em OPTI-MEM foram incubados com a lipofectamina pré-incubada com OPTI-MEM por 25 min à temperatura ambiente. A seguir, as células foram transfectadas por 24 horas, no caso do silenciamento, ou por 48 horas no caso da hiperexpressão. Após a transfecção as células foram extraídas ou fixadas para imunofluorescência.

2.12 Tratamento dos miócitos cardíacos em cultura

Após isolamento, os MVRNs foram plaqueados em placas de petri de 10cm de diâmetro recobertas com colágeno tipo I (500 mil células/placa). No terceiro dia de cultura

as células foram privadas de soros e antibióticos e no quarto dia foram tratadas com fenilefrina (100 μ M), ou com os peptídeos FP-1 ou FP-2 (1 μ M) e/ou com o inibidor da mTOR- Rapamicina (20 μ M). Em seguida, nos devidos casos, procedeu-se os protocolos de silenciamento por siRNA, estiramento, extração das células, *western blotting* e/ou protocolo de extração de RNA e RT-PCR.

2.13 Análises por microscopia de fluorescência

As células foram fixadas em paraformolaldeído acrescido de 4% de sacarose. Em seguida foram bloqueadas e permeabilizadas com 3% de BSA em PBS acrescido de 0.6% Triton-X 100 à temperatura ambiente. Após lavagem, as células foram incubadas a 4°C por 16 horas com os anticorpos primários anti-FAK c-20 e anti-miosina de cadeia pesada (abcam). Subsequentemente, foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *Alexa488-conjugated goat anti-rabbit* e *Alexa568-conjugated goat anti-mouse* (Invitrogen) à temperatura ambiente. Para análise da área superficial das células, os MVRNS foram incubados com faloidina conjugada à rodamina (Molecular Probes) à temperatura ambiente por 2 horas. As lâminas foram montadas com Vectashield e as imagens obtidas através do microscópio confocal Zeiss LSM510 ou do microscópio de fluorescência LEICA A4000.

2.14 Isolamento de miócitos ventriculares de ratos adultos

Miócitos ventriculares de ratos adultos foram extraídos de acordo com Robia e colaboradores (Robia et al., 2005). Resumidamente, os corações de ratos foram perfundidos em sistema de Langendorff com collagenase D (0,3 mg/g, collagenase B 0,4 mg/g, Protease XIV 0,05mg/g em tampão de perfusão oxigenado (Tyrode Buffer + glicose +BDM +

Taurine). Em seguida os miócitos foram coletados, submetidos a um gradiente de Cálcio crescente (0,06mM, 0,24mM, 0,6mM,1,2mM) e induzidos a se aderirem a placas de cultura com cobertura de laminina, para serem utilizados em experimentos de microscopia de fluorescência.

2.15 Marcação do domínio FERM com FITC

His-FERM foi dialisado por 3 horas contra PBS, pH 8,1, para remover o Tris e DTT antes da marcação. *Lysine-reactive Fluorescein-5-isothiocyanate* (FITC) (Merck) foi dissolvida em DMSO (10 mM) e adicionada à His-FERM dialisado em uma proporção de peso corante-proteína de 1:2,5 (FITC: FERM). A reação de marcação se procedeu por 1 hora à 37°C. FERM marcado (FERM-FITC) foi então dialisado quatro vezes por 3 horas contra PBS, para retirar o excesso do reagente FITC não ligado ao domínio FERM.

2.16 Decoration

Miócitos ventriculares de ratos adultos foram extraídos, fixados com paraformolaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente e permeabilizados com 100 mg/ml de saponina. Após bloqueio com PBS contendo 3% BSA e 100 mg/ml de saponina, as células foram incubadas com PBS contendo 1% de BSA, 100 mg/ml de saponina, FERM-FITC e o anticorpo primário anti-miosina de cadeia pesada (Abcam) durante a noite a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com PBS contendo 1% de BSA, 100 mg/ml de saponina e o anticorpo secundário Alexa568 (Invitrogen) por 2 horas à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e as lâminas foram montadas com Vectashield.

2.17 Análise da área superficial dos miócitos cardíacos

Para a análise da área de superfície dos miócitos cardíacos, as células em culturas foram fixadas e coradas com faloidina conjugada à rodamina e os núcleos marcados com DAPI. A área superficial das células foi obtida pela análise individual dos miócitos cardíacos com o software Leica Q Vitória, como descrito anteriormente (Marin et al. 2008).

2.18 Desenho racional de peptídeos

Ligantes da porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica foram alinhados com o domínio FERM da FAK a fim de se obter potenciais sítios de interação do FERM com a miosina. Através desta análise foi detectada uma região de homologia entre o domínio FERM da FAK (GenBankTM: NP_032008.1) e o domínio de interação com a miosina, Ig7, da *myosin binding protein C* (MyBPC) (GenBankTM: NP_032679.2). Esta região candidata (EIADQVDQE - FAK₁₅₈₋₁₆₆), nomeada FP-1, foi avaliada quanto sua especificidade, conservação na escala evolutiva e exposição na superfície protéica. Um peptídeo controle, FP-2 (QTIQYSNSEDK; FAK₃₀₀₋₃₁₀), também específico, exposto na superfície protéica e conservado na escala evolutiva foi sintetizado. Para o tratamento dos miócitos cardíacos, os peptídeos FP-1 e FP-2 foram sintetizados e ligados por uma ponte dissulfeto N-terminal ao peptídeo translocador de membranas biológicas TAT₄₇₋₅₇ (YGRKKRRQRRR), o qual é conhecido por internalizar peptídeos e proteínas em células. Alternativamente, os peptídeos FP-1 e FP-2 foram ligados ao peptídeo TAT₄₇₋₅₇ por um linker constituído por glicina, serina e glicina (GSG).

FP-1: Nterminal-YGRKKRRQRRRC-SS-CEIADQVDQE-Cterminal

FP-2: Nterminal-YGRKKRRQRRRC-SS-CQTIQYSNSEDK-Cterminal

FP-1: Nterminal-YGRKKRRQRRRGSGEIADQVDQE-Cterminal

FP-2: Nterminal-YGRKKRRQRRRGSGQTIQYSNSEDK-Cterminal

2.19 Acoplamento de peptídeos a colunas HiTrap NHS-activated HP e identificação de ligantes

As colunas de afinidade foram obtidas pela ligação covalente do peptídeo FP-1, o peptídeo controle FP-2 e o domínio FERM da FAK pelo N-terminal ao gel de colunas do tipo HiTrap NHS-activated HP (1 ml) de acordo com o fabricante (GE).

Extratos originados de ventrículo esquerdo de ratos adultos foram incubados nas colunas (FP-1-Hitrap, FP-2-Hitrap e FERM-Hitrap) por 1.5 horas à 4 °C. Em seguida as colunas foram lavadas com solução salina (PBS) e posteriormente com 0.1 M glicina, pH 2.7. As proteínas que permaneceram ligadas às colunas foram eluídas com 9 ml de 0.1 M glicina, pH 2.7, concentradas em filtros Amicon Ultra (Millipore) e separadas por SDS-PAGE, utilizadas para análises por *western blotting* ou por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*; LC-MS/MS).

Para as análises por LC-MS/MS, as amostras previamente digeridas com tripsina foram injetadas utilizando um nanoAcquity UPLC e a separação cromatográfica foi efetuada utilizando-se uma coluna de C18 (100µm x 10 cm) com um fluxo de 1.0 µl/min. Os espectros de massas foram adquiridos em um instrumento Synapt HDMS (Waters Co.), sendo que os três picos mais intensos foram submetidos ao MS/MS. Os dados foram processados utilizando-se o Mascot Distiller (Matrix Science Ltd) e em seguida a busca foi realizada utilizando-se o servidor Mascot (Matrix Science Ltd).

2.20 Extração de peptídeos intracelulares e detecção de FP-1

A fração de peptídeos intracelulares foi obtida através do protocolo adaptado de Villen e colaboradores (Villen and Gygi, 2008). Brevemente, MVRNs foram extraídos em tampão de lise (8 M uréia, 75 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.2, um tablete de coquetel de inibidores de protease (Roche) por 10 ml de tampão de lise, 1 mM PMSF), sonificados 3 × 60 segundos à 4 °C , centrifugados à 2,500g por 10 min à 4 °C para eliminar restos celulares. O sobrenadante foi transferido para tubos novos para precipitação com acetona gelada (1:3). Após precipitação, o sobrenadante foi secado por centrifugação à vácuo e ressuspenso em 0.1% de ácido trifluoroacético. Os peptídeos foram desalinizados por fase reversa utilizando-se colunas de extração de fase sólida tC18 SepPaks de 50mg (Waters). As amostras (1 µM de FP-1, fração peptídica de MVRNs controles e tratados com FP-1) foram submetidos à análise por UPLC/MS/MS. Estas análises foram realizadas no equipamento Synapt HDMS (Waters Co.) utilizando-se uma coluna BEH de C18 (100µm x 10 cm) com um fluxo de 1.0 µl/min. As fases móveis A e B consistiram de 0.1% de ácido fórmico/água e 0.1% ácido fórmico/acetonitrila, respectivamente. As condições de

gradiente utilizadas foram às seguintes: 0 min com 3% de B, aumentando linearmente para 30% de B em 20 min, em seguida, aumentando para 70% de B em 40 min, permanecendo nesta condição por 50 minutos e no próximo minuto o gradiente foi reduzido à 3% de B. O método de MS utilizado foi aquisição dependente de dados, onde os três picos mais intensos foram submetidos ao experimento de MS/MS.

2.21 Detecção quantitativa de mRNAs

O RNA celular total foi extraído e a detecção e quantificação da expressão dos genes de interesse foram analisadas por Sybr Green qRT-PCR. As amostras de RNA total (2µg) passaram por experimentos de transcrição reversa (RT-PCRs) à 42°C por 1 hora com 1µg de oligo(dT) *primer* (Invitrogen) e transcriptase reversa Superscript II. Os *mixes* para as reações de PCR foram montados utilizando-se o Brilliant SYBR Green qPCR Master Mix (Stratagene). As reações foram realizadas utilizando-se o programa SYBR Green (with Dissociation Curve) no Mx3000TM *Comparative Quantitative* PCR System (Stratagene). Os parâmetros para os ciclos foram os seguintes: 95°C for 10min e em seguida 30 ciclos de 95°C (30s), 55°C ou 60°C (45s), e 72°C (30s) seguido por análise da curva de anelamento. Os oligos utilizados foram: FAK sense: 5'-GACAAAGACAGGAAAGGAATGC-3'; FAK antisense: 5'-GTCAGCCATGTTCTCTGCAA-3'; ANP sense: 5'-CTTCCTCTTCCTGGCCTTTT -3'; ANP antisense: 5'-TCCAGGTGGTCTAGCAGGTT-3'; GAPDH sense: 5'-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3' e GAPDH antisense: 5'-ATGTAGGCCATGAGGTCCAC-3'. Todas as reações foram normalizadas com o marcador de referência. Os valores do limiar médio do ciclo foram utilizados para as

análises, sendo que todos eles foram normalizados pelos níveis de expressão do mRNA do GAPDH.

2.22 *Cross linking* acoplado à espectrometria de massas

Os experimentos de *cross linking* acoplado à espectrometria de massas se baseiam na identificação de sequências peptídicas próximas na estrutura terciária ligadas através de um reagente (*cross linker*) que se liga covalentemente à aminas primárias presentes principalmente nas cadeias laterais de lisinas ou na porção N-terminal das cadeias protéicas. Nestes ensaios utilizou-se o reagente DiSuccinimidil Suberato (DSS) (Fig. 07A) que é um reagente homobifuncional que contém um grupamento NHS em cada extremidade de um braço espaçador de oito carbonos [11,4 Angstroms (Å)]. Ésteres de NHS são suscetíveis a ataque nucleofílico, levando a perda do anel succinimida e formação da ligação entre a cadeia espaçadora e o resíduo de aminoácido (Fig. 07B). Esse reagente pode se ligar, devido a sua flexibilidade, à aminas com distâncias entre ~ 5 a 11,4Å na estrutura protéica. Como o DSS é um reagente homobifuncional e os produtos da reação de *cross linking* podem ser do tipo intramolecular (resíduos conectados estão na mesma cadeia), intermolecular (resíduos conectados encontram-se em cadeias distintas) ou ainda *dead-end*, onde somente um dos grupos reativos se ligou a cadeia peptídica (Fig. 07C).

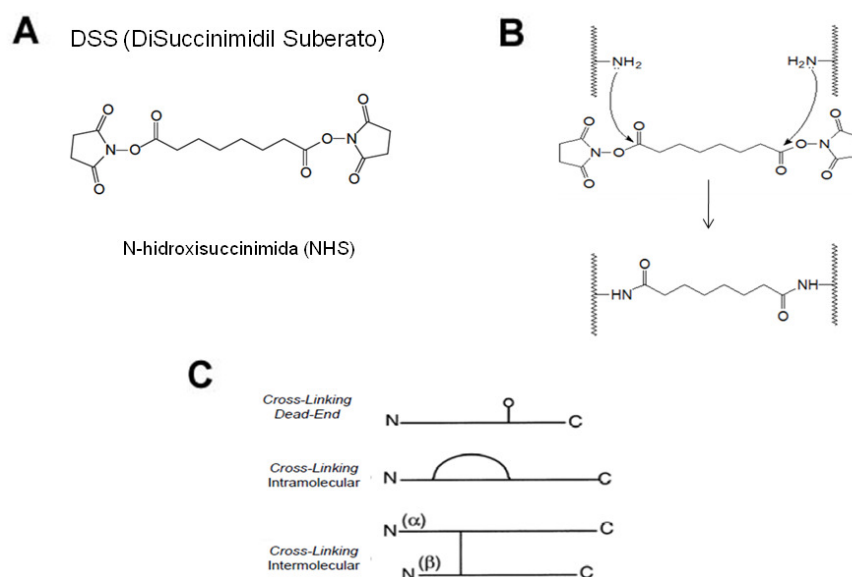


Figura 07. Reação de *cross linking* com o reagente DSS. **A.** Estrutura do DSS. **B.** Exemplo de reação do DSS com a cadeia lateral de duas lisinas. Para que esse produto seja formado, a distância entre esses resíduos deve ser compatível com o tamanho da cadeia espaçadora do DSS. **C.** Possíveis produtos de reação entre uma proteína e um *cross linker* bifuncional.

Para a realização deste ensaio, o domínio FERM da FAK e a porção C-terminal da miosina sarcomérica em fusão com caudas de histidina foram co-purificados por afinidade em colunas do tipo HisTrap® HP (5 mL) (GE) em tampão PBS acrescido de redutor (5mM de B-mercaptoetanol) e em seguida por cromatografia de exclusão de tamanho em coluna Superdex 200 26/60 (GE) acoplada ao sistema AKTA-FPLC (Amersham-Biosciences) em tampão PBS. Os eluatos contendo o complexo foram então incubados com o reagente de *cross linker* dissolvido em dimetilformamida (10 mg/mL) na proporção de 1:150 (proteína/DSS) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida as reações foram paralisadas com o uso de Tris•HCl (pH 7.5) 50mM final e resolvidas por SDS-PAGE ou digeridas com tripsina para análise por LC-MS/MS.

Os espectros de MS/MS dos peptídeos que continham o *cross linker* ligado foram identificados de acordo com o padrão de ionização do reagente DSS, ou seja, foram buscados íons com razão massa/carga de 222,1494 ou 239,1759 no espectro, caso estes íons fossem encontrados, procurou-se pelo íon com razão massa/carga 305,2229 e quando encontrado, procurou-se então pelos íons 147,1134 e 175,1195 que indicam a presença de reação intermolecular (Fig. 08), alvo deste estudo.

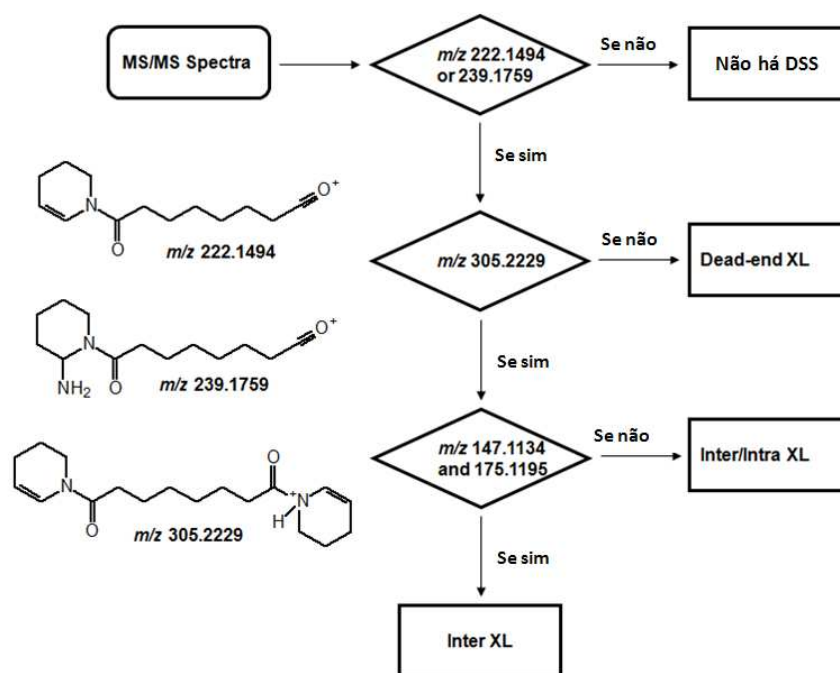


Figura 08. Íons característicos do padrão de ionização do reagente DSS. Modificado de Iglesias e colaboradores (Iglesias et al. 2010).

2.23 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

Os experimentos de espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS - small-angle X-ray scattering) foram realizados na linha D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando um porta amostra de um milímetro de espessura, vedada com janelas de mica por onde passa o feixe de raios-X monocromáticos (comprimento de onda de $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$). Os padrões de espalhamento de raios-X foram gravados usando um detector bidimensional do tipo CCD (MARCCDTM) sensível a posição. As experiências foram realizadas utilizando-se duas distâncias amostra-detector (1.661,38 mm e 446,53 mm), resultando em um amplo intervalo angular, $0,009 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,40 \text{ \AA}^{-1}$, onde q é a magnitude do vetor $\vec{q}$ definido por $q = (4\pi / \lambda) \sin\theta$, sendo 2θ definido como o ângulo de espalhamento).

Três coletas sucessivas de 300 segundos cada foram registradas para cada amostra. As medidas foram realizadas com as amostras em tampão fosfato (20 mM de Fosfato pH 7,4; 150 mM NaCl, 1mM DTT). O complexo FERM/c-terminal da miosina foi quantificado em espectrofotômetro à 280nm e 0,4mg/ml do complexo foi utilizado na experiência.

Os dados bidimensionais foram reduzidos a curvas unidimensionais através de integração da intensidade registrada no detector CCD usando o programa FIT2D. As intensidades das curvas foram corrigidas pela resposta do detector e normalizadas pela intensidade do feixe incidente e pela absorção da amostra. Posteriormente, o espalhamento do tampão foi subtraído do espalhamento de cada amostra. As curvas resultantes foram inspecionadas para verificar a existência de danos na amostra induzidos pela radiação, mas esse efeito não foi observado. Depois de normalizar as curvas pela concentração, nenhum efeito de concentração foi observado. A primeira análise realizada foi o cálculo do raio de giro (R_g) usando a aproximação de Guinier: válida na região em que $qR_g < 1$ (GUINIER, 1955). O R_g foi também calculado a partir da função de distribuição de pares de distâncias,

$p(r)$, que foi obtida por transformada de Fourier da curva de intensidade utilizando o programa GNOM (SVERGUN, 1992). A função $p(r)$ também fornece a dimensão máxima ($D_{\max}$) da molécula. Além disso, a representação de Kratky da curva de intensidade ($q^2 I(q)$) vs. (q) (FEIGIN, 1987) foi utilizada para analisar a compacidade da conformação das proteínas em solução.

2.24 Modelagem de corpo-rígido a partir dos dados de SAXS

Os modelos de baixa resolução do complexo FERM/miosina foram restaurados a partir da intensidade da curva de SAXS utilizando diferentes abordagens de modelagem de corpo rígido. Estas abordagens não fornecem uma solução única, e portanto, as informações de proximidade de sequências peptídicas obtidas pelas análises por *cross linking* acoplado à espectrometria de massas foram utilizadas para a obtenção de um modelo plausível. No caso das proteínas aqui estudadas, a estrutura cristalográfica de alta resolução do domínio FERM da FAK de *gallus gallus* já está resolvida (PDB:2AL6) e foi utilizada como modelo para a modelagem molecular do domínio FERM da FAK de *mus musculus* utilizando-se o programa *Modeller* (copyright © 1989-2010 Andrej Sali). O modelo da miosina foi obtido também através do uso do programa *Modeller* utilizando-se como molde a estrutura cristalográfica da porção C-terminal da tropomiosina (PDB: 2EFR).

2.25 Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado utilizando-se o programa GRAMM-X web server (Tovchigrechko and Vakser, 2006) utilizando-se os modelos do FERM e da porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica obtidos pelo programa *Modeller*. O

docking foi efetuado de forma livre (sem condições de contato como entrada no programa) por três vezes e 300 soluções foram obtidas em cada corrida. A fim de se selecionar as soluções mais apropriadas entre as conformações obtidas, as condições de contato dadas pelo *cross linking* acoplado a espectrometria de massas foram utilizadas. As 10 melhores soluções de cada corrida foram testadas contra os dados de SAXS utilizando-se o programa CRY SOL (Svergun, 1995). O desvio entre os modelos selecionados em cada corrida foi avaliado através do RMSD (*Root mean square deviation*) utilizando-se o *MultiProt Server* ([http:// bioinfo3d.cs.tau.ac.il/ MultiProt/](http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MultiProt/)).

2.26 Análise estatística

As leituras densitométricas dos *immunoblots* foram expressas como o percentual de alteração (em relação aos controles) para um número de n experimentos independentes. Cada experimento foi realizado com distintas culturas primárias (~ 70 corações de ratos neonatos foram utilizados por cultura). A área superficial das células foi obtida pela análise individual dos miócitos cardíacos (pelo menos 250 células contadas) e apresentada como a média $\pm$ SEM. As comparações estatísticas das leituras densitométricas e das áreas da superfície celular foram feitas utilizando-se o ANOVA e o teste de escala múltipla de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.Resultados

3.1 FAK interage fisicamente com a porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica

Para verificar a existência de interação direta entre FAK e a porção C-terminal da cadeia pesada de miosina foram realizados ensaios de precipitação com as proteínas expressas em sistemas heterólogos e posteriormente purificadas. A porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica (C-terminal da miosina), expressa em fusão com uma cauda de GST (GST-Mio) (Fonseca et al., 2005) e a proteína recombinante FL-FAK (FL-FAK- *Full length* FAK), expressa com cauda de histidina, em sistema de baculovírus, foram utilizadas neste ensaio de precipitação do tipo *Pull-Down*. Como controle foi utilizado apenas GST. Como apresentado na Figura 09, apenas GST-Mio precipita FL-FAK, indicando a presença de interação direta entre FAK e a porção C-terminal de miosina sarcomérica.

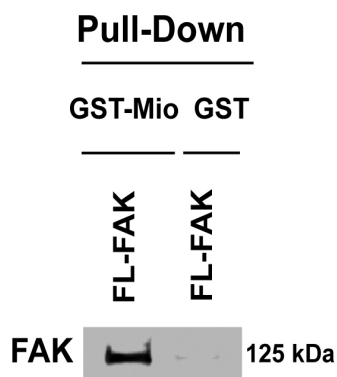


Figura 09: FL-FAK fisicamente interage com a porção C-terminal da cadeia pesada de miosina sarcomérica em fusão com GST. *Imunoblotting* com anti-FAK do precipitado com GST-Mio ou GST.

3.2 Ativação da FAK *in vitro* reduz sua ligação à miosina sarcomérica

Para testar a hipótese de que a ativação da FAK altera sua capacidade de ligação à miosina, foram realizados ensaios de precipitação com GST-Mio e FAK ativada por ensaio de fosforilação *in vitro*. Adição de ATP aumentou a quantidade de FAK ativa/fosforilada reconhecida pelo anticorpo específico anti-FAK fosforilada no resíduo tirosina 397 (anti-pFAK-Tyr397) (Fig. 10A). Após sua ativação foi observado uma diminuição de sua ligação à proteína recombinante GST-Mio (Fig. 10B). Além disso, experimentos de precipitação na presença do inibidor de tirosino-quinases (inibidor competitivo do ATP; PD153035) resultaram em redução da fosforilação da FAK (Fig. 10C), enquanto os níveis de FAK precipitados por GST-Mio permaneceram semelhantes aos do controle, na ausência do PD153035 (Fig. 10D).

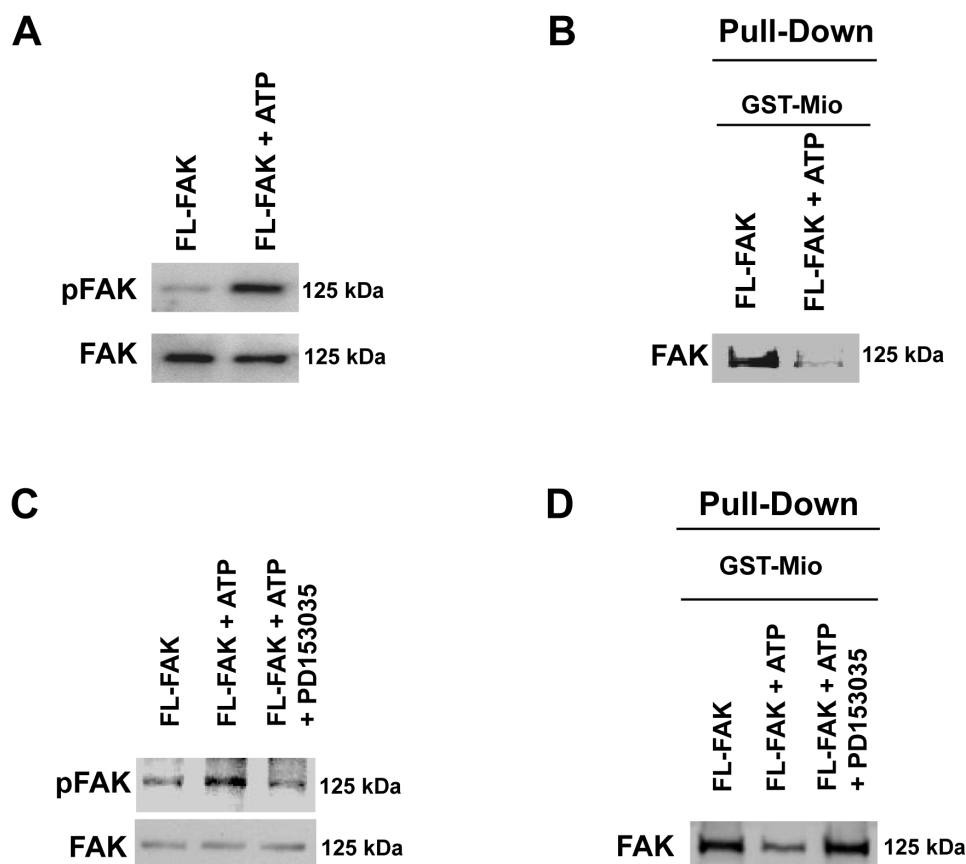


Figura 10: Ativação da FAK reduz sua ligação à porção C-terminal da miosina sarcomérica *in vitro*. **A.** Anti-FAK e anti-pFAK *immunoblots* das formas fosforiladas e não fosforiladas da FL-FAK. **B.** A interação FAK/miosina foi diminuída pela fosforilação/ativação da FAK. **C.** Anti-FAK e anti-pFAK *immunoblots* de FL-FAK, FL-FAK + ATP e FL-FAK + ATP + PD153035. **D.** Ensaio de *Pull-Down* realizado com as proteínas FL-FAK, FL-FAK+ ATP e FL-FAK + ATP + PD153035 com GST-Mio.

3.3 Miosina sarcomérica reduz atividade da FAK *in vitro*

Para testar a hipótese de que a miosina sarcomérica inibe a atividade basal da FAK, foram realizados ensaios de autofosforilação da FL-FAK em concentrações crescentes do fragmento recombinante da miosina sarcomérica. A adição de ATP ao tampão de diluição da FAK levou a autofosforilação no resíduo tirosina 397, o que determina sua ativação

(segundo *spot* na membrana) (Fig. 11). Após a adição de GST-Mio, houve uma atenuação da ativação da FAK enquanto que, a adição de GST não alterou a autofosforilação desta quinase (Fig. 11).

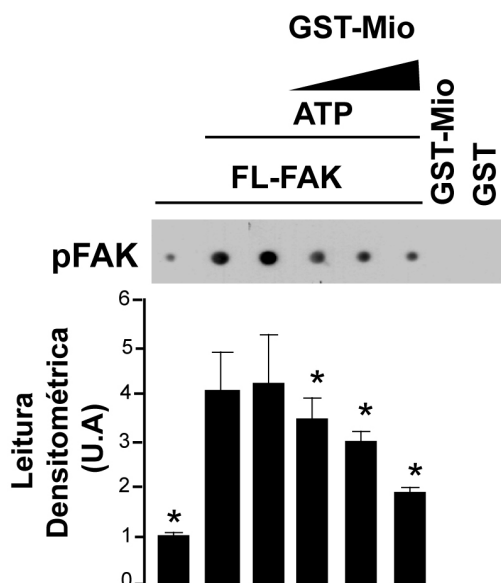


Figura 11. GST-Mio reduz ativação da FAK em ensaios de fosforilação *in vitro*. *Blotting* representativo demonstra a marcação pelo anticorpo anti-pFAK-Tyr397. O experimento foi realizado na ausência ou presença de ATP, GST ou GST-Mio [FL-FAK; FL-FAK + ATP; FL-FAK + GST 1:1 + ATP; FL-FAK + GST-Mio 1:0.25, 1:0.5 e 1:1 (Mol/Mol) + ATP; GST-Mio e GST]. * $p < 0.05$ vs a leitura densitométrica da FL-FAK + ATP.

Estes resultados demonstraram que a interação da FAK com a miosina tem efeito inibitório na ativação desta quinase e que a ativação prévia da FAK reduz sua interação com a porção C-terminal da miosina em fusão com GST.

3.4 Domínio FERM da FAK medeia a interação FAK/porção c-terminal da miosina de cadeia pesada

Uma etapa importante para o entendimento da funcionalidade da interação FAK/C-terminal da miosina é o esclarecimento da topologia da interação, através da identificação das estruturas sub-moleculares da FAK envolvidas na interação com a miosina. Para averiguar qual domínio da FAK interage com porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica, fragmentos recombinantes da FAK fundidos com GST, ou seja, o domínio FERM (GST-FERM), o domínio catalítico (GST-KINASE) e a porção C-terminal (GST-cTERM), foram utilizados em ensaios de precipitação com a porção C-terminal da miosina fundida com a cauda de histidina (His-Mio). GST foi utilizado como controle. Conforme observado na Figura 12, o domínio FERM foi o único domínio da FAK que precipitou a porção C-terminal da miosina sarcomérica. Este resultado indica que a interação entre estas duas proteínas ocorre através da ligação do domínio FERM à porção C-terminal da miosina sarcomérica.

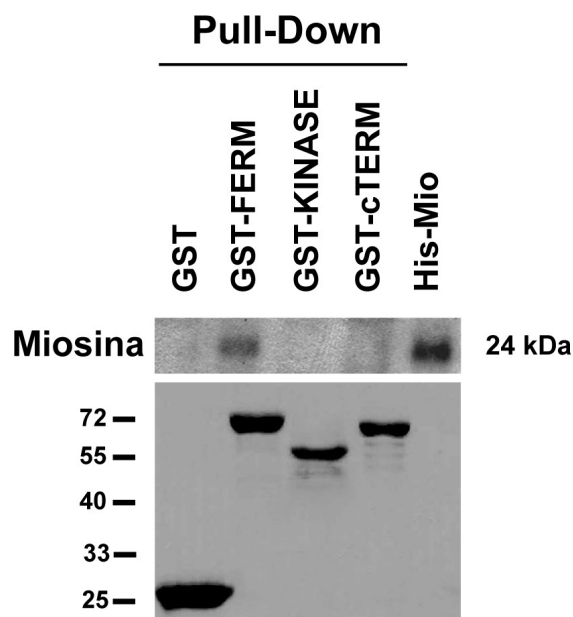


Figura 12. GST-FERM precipita a porção C-terminal da miosina (His-Mio). No painel superior encontra-se um *blotting* com anticorpo anti-miosina do precipitado de proteína pelo ensaio de *Pull-Down* realizado com os fragmentos recombinantes da FAK em fusão com GST e His-Mio. No painel inferior encontra-se um gel SDS-PAGE dos fragmentos recombinantes da proteína FAK corado com *coomassie blue*.

A interação do domínio FERM da FAK com a miosina sarcomérica também foi averiguada através de ensaios de *Pull-Down* com as proteínas recombinantes GST-Mio e o domínio FERM da FAK fundido a uma cauda de histidina (His-FERM). O resultado apresentado na Figura 13 confirma a interação entre estas duas proteínas recombinantes e reforça o dado de que o domínio FERM da FAK medeia sua interação com a miosina sarcomérica.

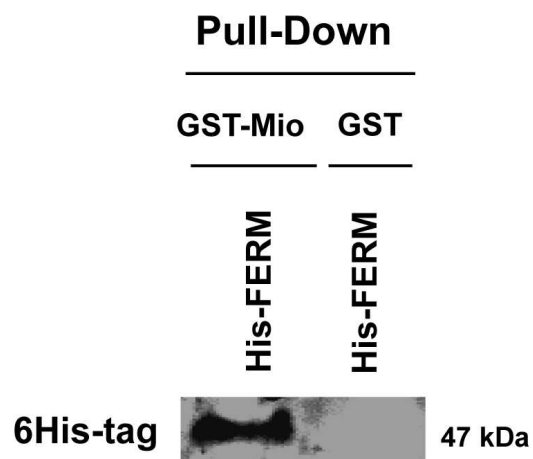


Figura 13. GST-Mio precipita His-FERM. Ensaio de *Pull-Down* realizado com as proteínas recombinantes His-FERM e GST-Mio e, como controle, His-FERM e GST.

3.5 Associação basal entre FAK e miosina nativa

Para verificar se FAK interage com a miosina endógena, os fragmentos recombinantes da FAK, fundidos à GST, foram incubados com extratos de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRNs). Como observado na Figura 14, o domínio FERM da FAK foi o único domínio a interagir com miosina cardíaca endógena.

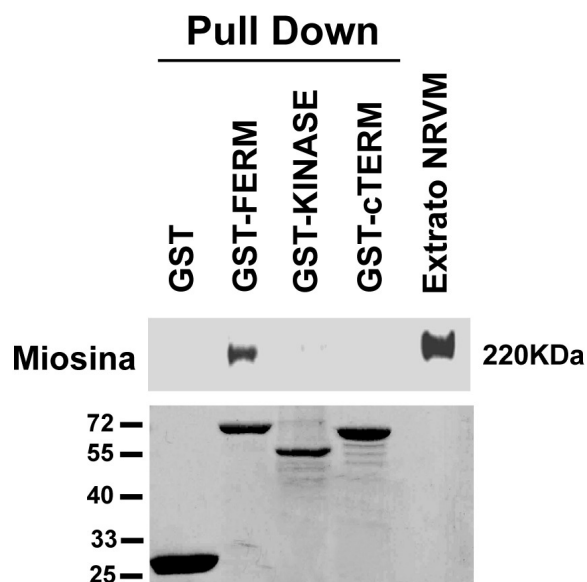


Figura 14. GST-FERM interage com miosina sarcomérica de extrato de miócitos de ratos neonatos. O painel superior apresenta um *blotting* com anticorpo anti-miosina das proteínas de extratos de MVRNs precipitadas pelos fragmentos recombinantes da FAK em fusão com GST. O painel inferior apresenta um gel corado por *coomassie blue* dos fragmentos recombinantes da FAK em fusão com GST utilizados no ensaio de *Pull-Down*.

Para confirmar se a interação FAK/miosina endógena se dá pelo domínio FERM da FAK, foram realizados ensaios de ligação com os fragmentos recombinantes da FAK e miosina sarcomérica purificada de ventrículo esquerdo de ratos neonatos. Concentrações crescentes de miosina purificada foram aplicadas em membranas de nitrocelulose e estas foram então incubadas com anticorpo anti-miosina, anti-FAK ou anti-GST. Somente o anticorpo anti-miosina reagiu com as regiões de miosina da membrana, o que infere para uma boa purificação da amostra de miosina sarcomérica (Fig. 15A). Em seguida, as membranas foram incubadas com os fragmentos recombinantes da FAK e os anticorpos descritos acima foram utilizados para detectar seus ligantes. Os resultados deste experimento demonstraram que o domínio FERM da FAK se ligou às regiões de miosina

purificada de forma dose dependente. Não houve ligação dos demais fragmentos da FAK às regiões de miosina aplicada na membrana (Fig. 15 B).

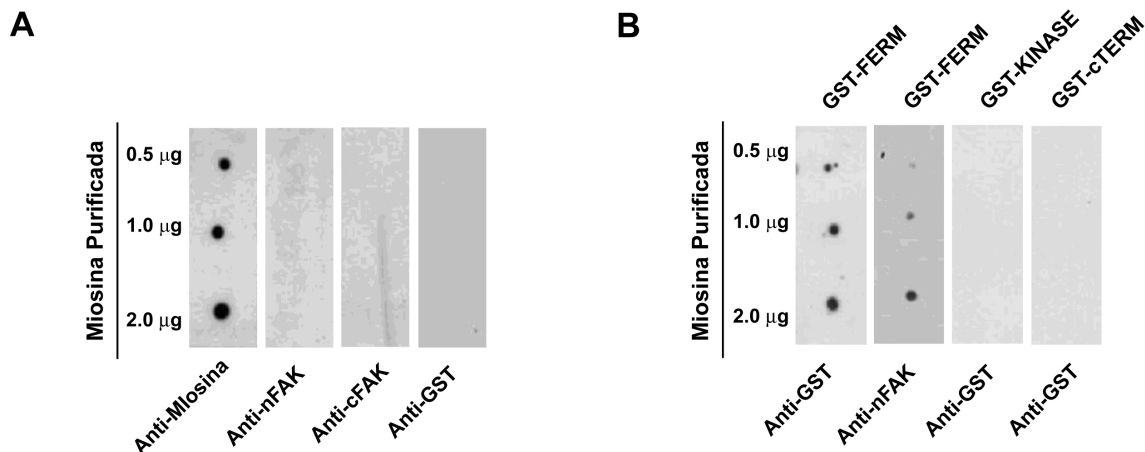


Figura 15. Miosina cardíaca purificada de ventrículo esquerdo de ratos neonatos interage com o domínio FERM da FAK. **A.** *Dot blot*, com os anticorpos indicados, da miosina purificada e aplicada nas membranas de nitrocelulose. **B.** *Dot blots* das membranas, contendo miosina purificada, após incubação com os domínios GST-FERM, GST-KINASE ou GST-cTERM, como indicado.

A interação FERM/miosina cardíaca foi também confirmada por ensaios de *far western blotting*. A Figura 16 A apresenta um gel SDS-PAGE corado por *coomassie blue* no qual a coluna I contém extrato total proveniente de MVRNs e a coluna II contém miosina sarcomérica purificada de ventrículo esquerdo de ratos neonatos. As Figuras 16B e 16C apresentam *Blottings*, do extrato total de MVRNs e da miosina purificada de ventrículos de MVRNs, com os anticorpos anti-miosina e anti-FAK, respectivamente. Como observado na Figura 16C, não ocorre marcação com o anticorpo anti-FAK na coluna de miosina purificada, apenas na do extrato total. Subsequentemente, após incubação das membranas com o domínio FERM (GST-FERM) ou com GST, foram realizados *blottings* com os anticorpos anti-FAK e anti-GST. Os resultados demonstraram que o domínio

FERM se liga a diferentes proteínas do extrato total de MVRNs e inclusive se liga à proteína de 220KDa que corresponde à miosina de cadeia pesada (Fig. 16D e 16E). A membrana incubada com GST não apresentou marcação com o anticorpo anti-GST (Fig. 16F), o que indica a especificidade da interação FERM/ miosina.

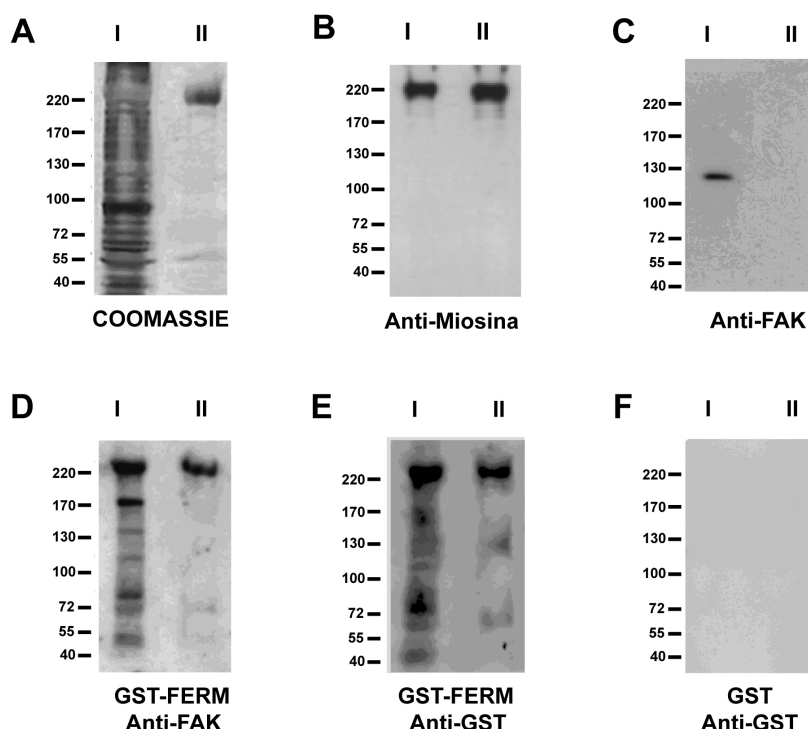


Figura 16. *Far western blotting* indica interação do domínio FERM da FAK com miosina de extrato celular de MVRNs e miosina purificada de ventrículo esquerdo de MVRNs. **A.** Gel SDS-PAGE corado com *coomassie blue* do extrato total de ratos neonatos (I) e miosina cardíaca de cadeia pesada purificada (II). **B e C.** Frações I e II marcadas com os anticorpos anti-miosina e anti-FAK, respectivamente. **D.** *Far western blot* da membrana com as frações I e II após incubação com a proteína recombinante GST-FERM e posterior marcação com anticorpo anti-FAK-N-terminal. **E.** Membrana com as frações protéicas I and II incubada com GST-FERM e subsequentemente marcada com o anticorpo anti-GST. **F.** Membrana com as frações protéicas I and II incubada com GST e subsequentemente marcada com o anticorpo anti-GST.

3.6 Co-localização e interação da FAK e miosina em miócitos cardíacos

A localização da FAK em relação à miosina cardíaca foi averiguada através de ensaios de imunofluorescência de miócitos ventriculares de ratos neonatos e subsequente análise por microscopia confocal. A marcação com anticorpo anti-FAK (verde) revela uma distribuição estriada desta proteína, a qual apresenta sobreposição com a marcação da miosina sarcomérica (vermelho), como pode ser observado pela coloração amarela nas imagens sobrepostas (Fig. 17).

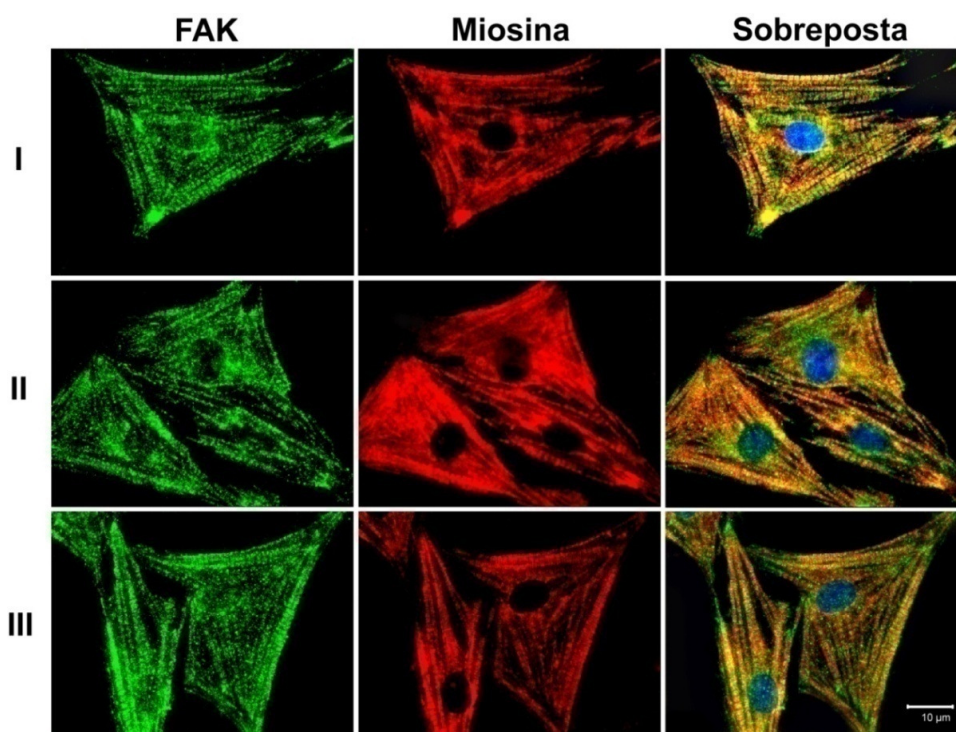


Figura 17. FAK se co-localiza com miosina cardíaca em MVRNs. **I, II e III.** Imagens de microscopia confocal de miócitos ventriculares de ratos neonatos duplamente marcados com anti-FAK (verde) e anti-miosina de cadeia pesada (vermelho). A coloração amarela das imagens sobrepostas indica co-localização destas proteínas em MVRNs.

Após as análises de localização destas proteínas, a proporção relativa de FAK associada à miosina foi estimada através da comparação da quantidade de FAK imunoprecipitada pelo anticorpo anti-miosina de cadeia pesada com a quantidade imunoprecipitada pelo anticorpo anti-FAK (anti-FAK c-20). A fração de FAK precipitada por anti-miosina foi de aproximadamente 40% do total de FAK imunoprecipitada pelo anticorpo anti-FAK (Fig. 18).

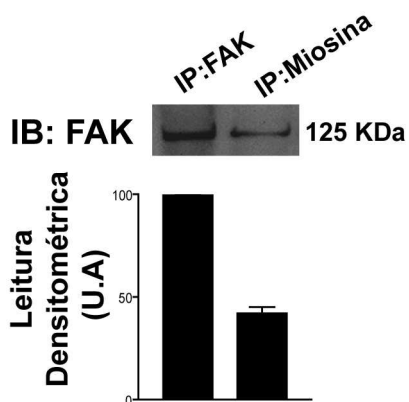


Figura 18. Imunoprecipitação de FAK e miosina em extratos de MVRNs. *Blotting* representativo e gráfico de barras demonstram a fração de FAK precipitada pelo anticorpo anti-miosina de cadeia pesada em relação à fração precipitada pelo anticorpo anti-FAK c-20.

Em seguida, foram realizados experimentos com miócitos cardíacos extraídos de ratos adultos para verificar se o domínio FERM da FAK se co-localiza com a miosina sarcomérica nas células adultas. Miócitos adultos permeabilizados com saponina passaram pelo procedimento de *decoration* com o domínio FERM da FAK covalentemente ligado ao reagente FITC (FERM-FITC) e em seguida pela imunomarcação com anti-miosina. Como observado na Figura 19, o domínio FERM modificado (verde) ligou-se às regiões de miosina sarcomérica (vermelho), o que indica que o domínio FERM da FAK é responsável

pela co-localização destas proteínas em miócitos adultos (coloração amarela na imagem sobreposta).

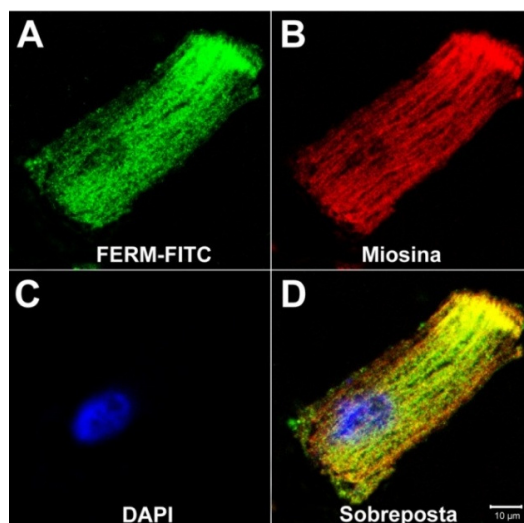


Figura 19. *Decoration* indica que o domínio FERM da FAK é responsável por sua co-localização com a miosina sarcomérica em miócitos adultos. **A-D.** Imagem de microscopia confocal de miócito ventricular de rato adulto após *decoration* com o domínio FERM da FAK covalentemente ligado ao reagente FITC e subsequente marcação com anti-miosina.

A interação do domínio FERM da FAK com a miosina sarcomérica de ratos adultos foi também verificada através de ensaios de imunoprecipitação em extratos de ventrículo esquerdo de ratos adultos e ensaios de ligação em coluna (*HP HiTrap™ NHS-activated*) com o domínio FERM recombinante covalentemente ligado. A Figura 20A demonstra que a miosina sarcomérica é encontrada no imunoprecipitado com anticorpo anti-FAK c-20 de extratos ventriculares de ratos adultos. A Figura 20B apresenta um gel de SDS-PAGE, corado por *comassie blue*, das proteínas do extrato de ventrículo esquerdo de ratos adultos que permaneceram ligadas à coluna com FERM acoplado (FERM-HiTrap). Estas proteínas foram identificadas por espectrometria de massas (*Liquid Chromatography Tandem Mass*

Spectrometry - LC-MS/MS) e dentre estas, miosina sarcomérica foi identificada com um *score* de 427 (Fig. 20B).

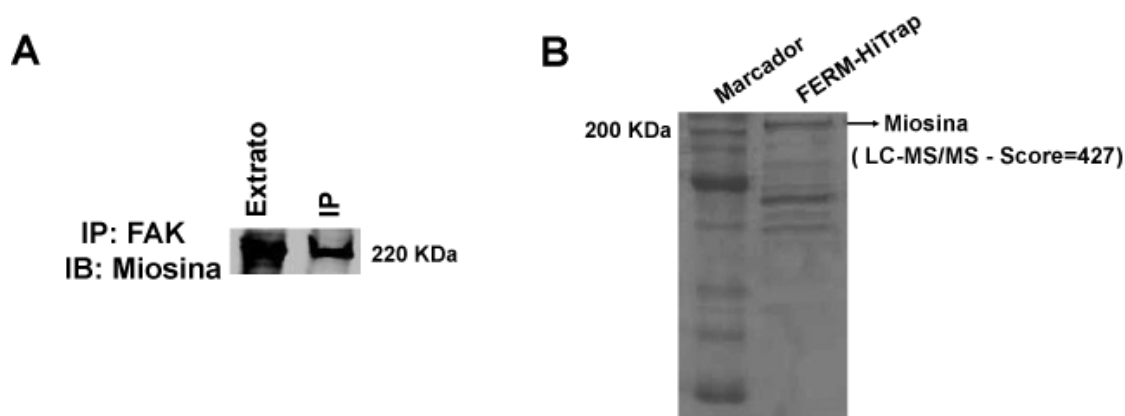


Figura 20. Miosina interage com FAK em ensaios de imunoprecipitação em extratos ventriculares de ratos adultos e de ligação em coluna com FERM covalentemente ligado. **A.** Miosina sarcomérica é encontrada no imunoprecipitado com Anti-FAK c-20. **B.** Gel de SDS-PAGE corado por *coomassie blue* das proteínas que interagiram com o domínio FERM ligado à coluna *HiTrapTM NHS-activated* (FERM-HiTrap). Miosina sarcomérica foi uma das proteínas identificadas por MS/MS.

3.7 Estiramento cíclico reduz a interação FAK/miosina cardíaca

Os experimentos realizados *in vitro* indicaram que a interação FAK/miosina tem efeito inibitório na ativação desta quinase e que a ativação da FAK leva a uma redução em sua interação com a miosina. Além disso, os ensaios realizados *in vivo* demonstraram que estas proteínas se co-localizam (~40%) e interagem em miócitos cardíacos, o que sugere a hipótese de que a interação FAK/miosina pode ser regulada por eventos celulares que culminam com a ativação desta quinase como, por exemplo, o estresse mecânico (Fonseca et al., 2005; Franchini et al., 2000).

Para testar a hipótese de que a interação FAK/miosina é sensível ao estresse mecânico, MVRNs foram submetidos ao estiramento cíclico (até 110%; 1 Hz) por 10, 30 e 60 minutos. Este estiramento induziu uma rápida (10 min) e sustentada (até 60 min) ativação da FAK, o que foi verificado pela fosforilação no resíduo tirosina 397 através da utilização do anticorpo fosfo-específico (anti-pFAK-Tyr397)(Fig.21). Quantidades semelhantes de FAK foram encontradas nos extratos celulares totais, indicando que não houve alteração na expressão gênica desta proteína decorrente do processo de estiramento. A normalização da fosforilação da FAK encontra-se sumarizada no gráfico apresentado no painel inferior da Figura 21.

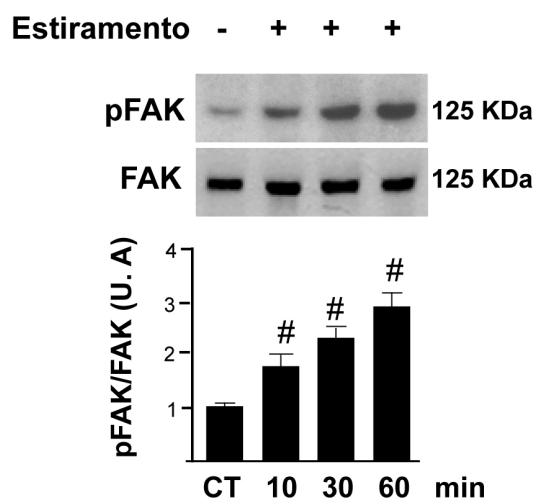


Figura 21. Estiramento cíclico leva a ativação da FAK. *Blotting* do extrato total de MVRNs controles (CT) e estirados por 10, 30 e 60 minutos. O gráfico apresenta os valores médios (n=5) da razão dos anticorpos pFAK/FAK. # $p < 0.05$ vs Controle (CT).

Em seguida, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação (IP) com os extratos das células controles e daquelas submetidas ao estiramento, para verificar se a interação FAK/miosina é regulada pelo estresse mecânico e consequente ativação da FAK. Os ensaios foram realizados com os anticorpos anti-FAK c-20 e anti-miosina de cadeia pesada.

Como observado na Figura 22, a quantidade de miosina precipitada no imunocomplexo com o uso do anticorpo anti-FAK reduziu com o aumento do tempo de estiramento. Este dado corrobora com a hipótese de que a interação FAK/miosina é regulada por estímulos mecânicos.

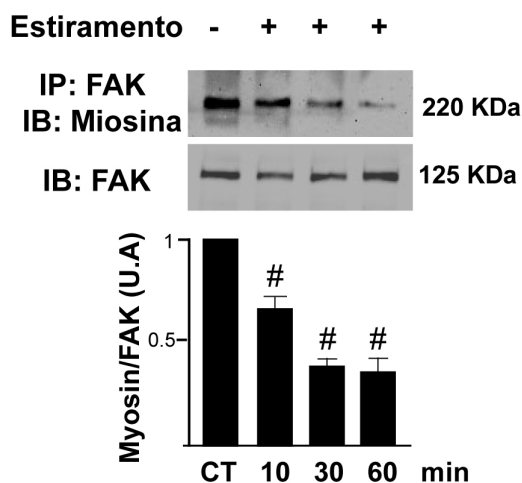


Figura 22. Estresse mecânico modula a interação FAK/miosina cardíaca. *Blotting* realizado com anticorpo anti-miosina do imunocomplexo formado pela precipitação com anticorpo anti-FAK em extrato de MVRNs controles e estirados. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n= 6) do *immunoblotting* com anti-miosina normalizado pela quantidade de FAK precipitada (*immunoblotting* com anti-FAK). # p< 0.05 vs Controle (CT).

3.8 Tratamento com agonista farmacológico que ativa FAK não interfere na interação FAK/miosina cardíaca

A fim de se verificar se a ativação da FAK por agonista farmacológico poderia interferir na interação FAK/miosina, MVRNs foram submetidos à tratamento por 30 e 60 minutos com 100 μ M de fenilefrina (Php- agonista alfa-adrenérgico) que sabidamente leva a ativação da FAK. O tratamento com fenilefrina resultou em um aumento na fosforilação do resíduo tirosina 397 da FAK (Fig. 23A), no entanto não houve alteração na quantidade

de miosina associada à FAK no imunocomplexo com o anticorpo anti-FAK (Fig. 23B). Este resultado sugere que fenilefrina ativa um *pool* de FAK distinto daquele que interage com a miosina e é ativado pelo estresse mecânico.

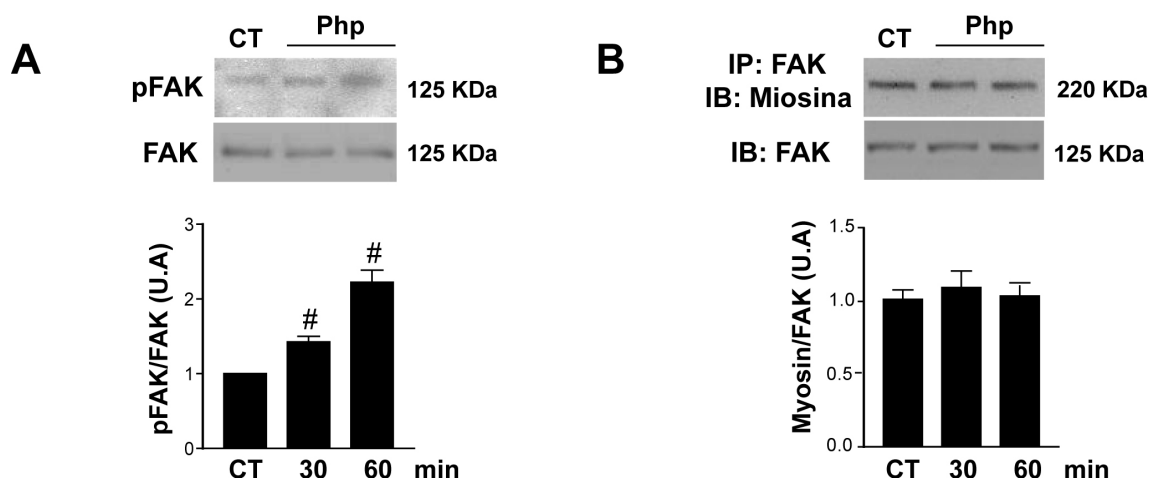


Figura 23. Ativação da FAK por agonista farmacológico não interfere na interação FAK/miosina. **A.** *Blotting* dos extratos de MVRNs controles ou tratados com fenilefrina (Php) por 30 e 60 minutos. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n= 4) do *immunoblotting* com anti-FAK fosforilada no resíduo tirosina 397 normalizado pelo *immunoblotting* com anti-FAK. **B.** *Immunoblotings* realizados com anti-miosina do imunocomplexo formado pela precipitação com anticorpo anti-FAK em extrato de MVRNs controles e tratados com fenilefrina. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n= 4) do *Immunoblotting* com anti-miosina normalizado pela quantidade de FAK precipitada (*Immunoblotting* com anti-FAK). # p< 0.05 vs Controle (CT). Php = fenilifrina.

3.9 Silenciamento da miosina sarcomérica resulta em aumento da fosforilação da FAK

Para confirmar a importância da interação FAK/miosina para a manutenção da quiescência basal da FAK *in vivo*, foram realizados experimentos com MVRNs silenciados para miosina sarcomérica pela técnica de interferência por siRNA. O silenciamento foi efetivo com a utilização de siRNA específico para miosina sarcomérica cardíaca na

proporção de 200ng/ml de meio, o que reduziu a expressão desta proteína em ~ 60% (Fig. 24A). Os dados foram normalizados pelo tratamento com siRNA de sequência irrelevante, no caso, específico para a proteína GFP. As imagens de imunofluorescência das Figuras 24B e C demonstram que as células que receberam o siRNA para miosina sarcomérica apresentaram uma redução em suas estriações em relação as que receberam siRNA para GFP.

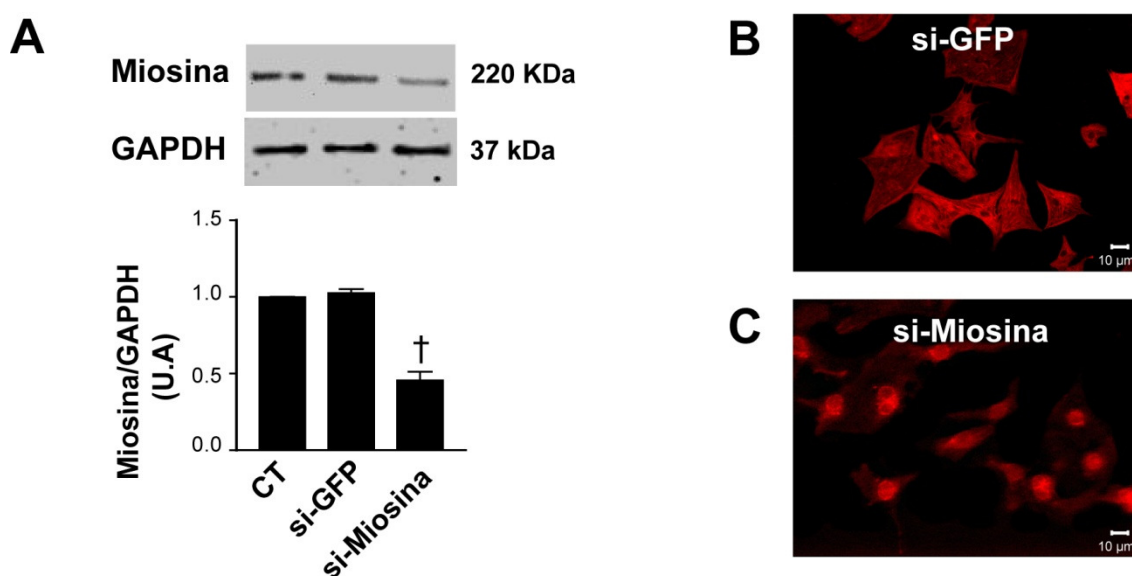


Figura 24. Silenciamento da miosina sarcomérica em MVRNs. **A.** *Immunoblotting* e gráfico de barras demonstram a quantidade de miosina em MVRNs controles e tratados com siRNA para os alvos indicados. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n= 3) do *Immunoblotting* com anti-miosina normalizado pelo anti-GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). **B.** Imunofluorescência de MVRNs tratados com siRNA para GFP. **C.** Imunofluorescência de MVRNs tratados com siRNA para miosina. A reação de imunofluorescência foi realizada com o anticorpo primário *anti-myosin heavy chain* e o secundário *Alexa568-conjugated goat anti-mouse* (n=6 culturas). † < 0.05 vs siGFP.

Confirmado o silenciamento da miosina sarcomérica, foram realizados ensaios de *western blotting* com os anticorpos anti-FAK e anti-FAK fosforilada no resíduo tirosina

397 para verificar se a depleção de miosina interfere na expressão ou fosforilação da FAK. Os resultados demonstraram que o silenciamento da miosina não alterou os níveis de expressão de FAK, no entanto, observou-se um aumento substancial na ativação/fosforilação da mesma (Fig. 25), o que indica a importância da interação FAK/miosina na manutenção da quiescência basal da FAK.

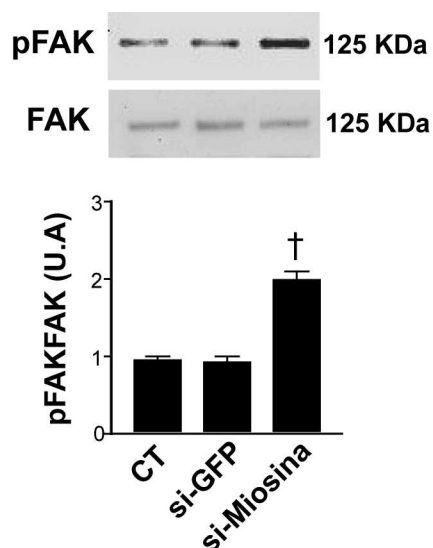


Figura 25. Silenciamento da miosina sarcomérica ocasiona aumento na fosforilação da FAK. *Western blotting* dos extratos de MVRNs controles ou tratados com siRNA para GFP ou miosina. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n= 4) do *immunoblotting* com anti-FAK fosforilada no resíduo tirosina 397 normalizado pelo *immunoblotting* com anti-FAK. [†] < 0.05 vs siGFP.

3.10 Identificação de um possível sítio de interação entre FAK/miosina através do desenho racional de peptídeos

O mapeamento de sítios de ligação entre proteínas pode ser feito através da análise de sequência homólogas entre grupos de proteínas não relacionadas mas que apresentam um ligante em comum. Se duas proteínas A e B se ligam a uma proteína C, sequências

homólogas entre as proteínas A e B podem conter o sítio de ligação para a proteína C. Para esta análise, ligantes da região C-terminal da cadeia pesada de miosina sarcomérica tiveram suas sequências protéicas alinhadas com o domínio FERM da FAK através da ferramenta *Sim-Prot* encontrada no endereço: <http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>. Através destes alinhamentos, foi identificada uma região de homologia entre um ligante clássico da miosina, a proteína *Myosin Binding Protein C* (MyBPc), e o subdomínio F2 do domínio FERM da FAK (Fig. 26A). Em seguida, a fim de se encontrar uma sequência de aminoácidos dentro do subdomínio F2 que seja específica da FAK, o subdomínio F2 da FAK foi alinhado ao da proteína relacionada PYK2 (proteína tirosina quinase 2) através do programa *Multalin* (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>). Através desta análise encontrou-se, dentro da região de homologia com a proteína MyBPc, uma sequência específica da proteína FAK (FAK₁₅₈₋₁₆₆ composta pelos resíduos EIADQVDQE) que apresenta-se sublinhada na Figura 26B. Em seguida esta sequência ainda foi avaliada quanto a sua especificidade através de seu alinhamento com as sequências equivalentes de outras proteínas que possuem o domínio FERM. Conforme observado na Figura 26C, a sequência candidata é específica para o domínio FERM da FAK. Finalmente, o peptídeo identificado foi avaliado quanto a sua conservação na escala evolutiva, já que sequências com funções relevantes tendem a ser mantidas durante a evolução. A sequência apresentou-se conservada até *Xenopus laevis* (Fig. 26D). Esta região candidata a sítio de interação com a miosina sarcomérica recebeu a nomeação de FP-1.

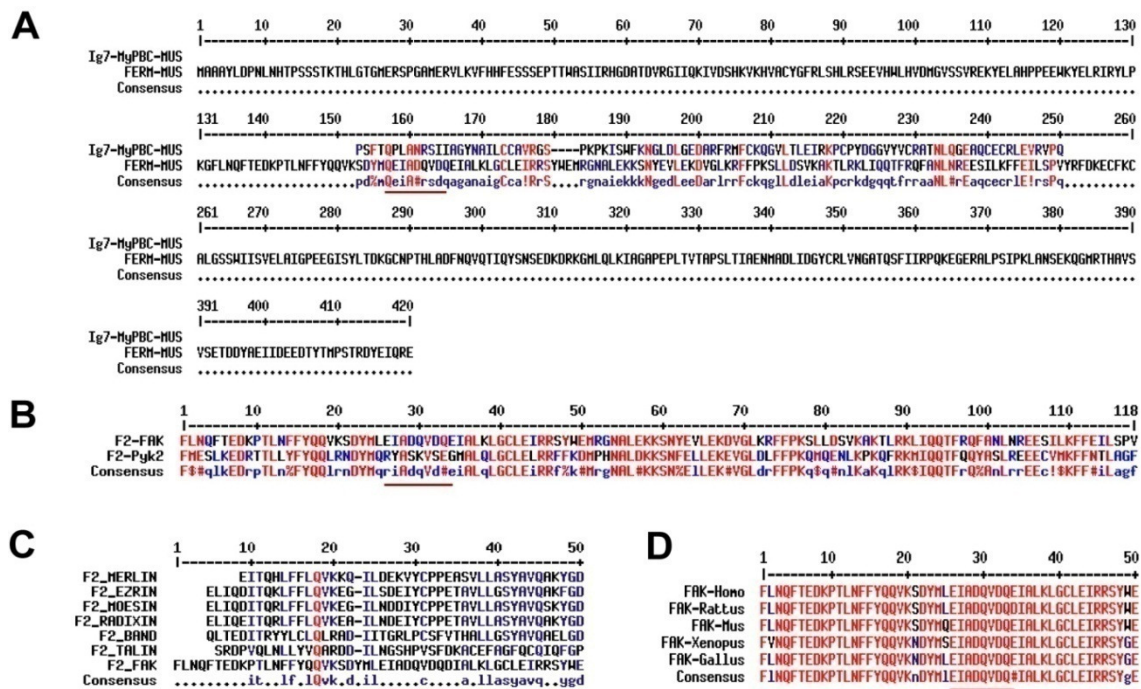


Figura 26. Desenho racional de peptídeos. **A.** Alinhamento entre o domínio FERM da FAK (GenBankTM: NP_032008.1) e o domínio Ig7 da *Myosin-Binding Protein C* (GenBankTM: NP_032679.2). **B.** Alinhamento entre o subdomínio F2 do domínio FERM da FAK e o da proteína tirosina quinase 2 (Pyk2) (GenBankTM: NP_001155838.1). O peptídeo candidato (FP-1) está sublinhado em vermelho. **C.** Alinhamento das sequências do subdomínio F2 do domínio FERM da FAK e de diferentes proteínas que possuem FERM. **D.** Alinhamento do subdomínio F2 do domínio FERM da FAK de diferentes espécies.

FP-1 localiza-se na superfície do subdomínio F2 do domínio FERM, na interface oposta àquela onde este subdomínio interage com o domínio catalítico e próxima às sequências básicas, compostas por argininas e lisinas, que vêm sendo descritas como necessárias para o importação nuclear da FAK (Lim et al., 2008) (Fig. 27). Outro peptídeo derivado do domínio FERM da FAK (FP-2; QTIQYSNSEDK; FAK₃₀₀₋₃₁₀), também conservado e específico, foi utilizado como controle (Fig. 27).

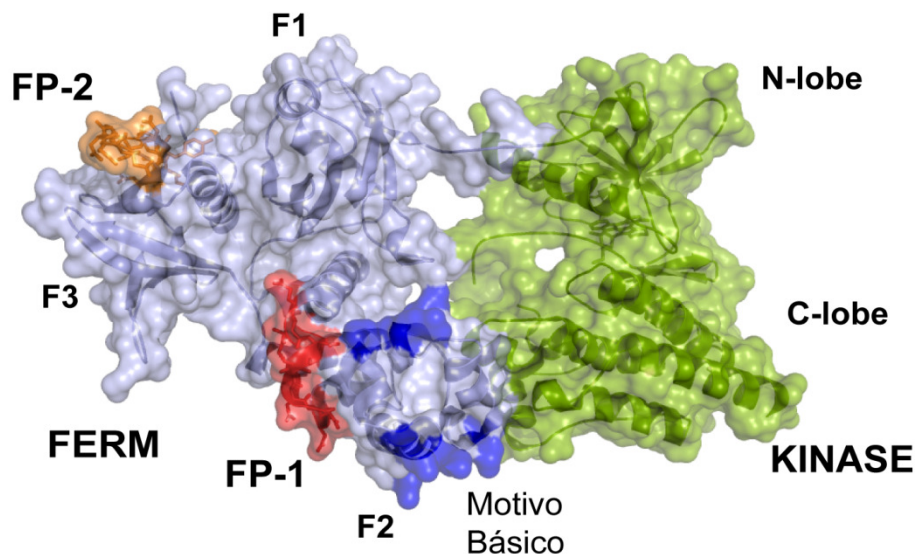


Figura 27. Posição dos peptídeos FP-1 e FP-2 na estrutura cristalográfica do domínio FERM da FAK. Estrutura cristalográfica dos domínios FERM e quinásico da FAK em sua conformação auto-inibitória. No estado auto-inibitório, o domínio FERM (azul claro) se liga ao domínio quinásico (verde) através de uma interação intramolecular entre o subdomínio F2 do domínio FERM e o lobo C do domínio quinásico. O peptídeo FP-1 está destacado em vermelho, o peptídeo FP-2 em alaranjado e as regiões básicas relacionadas à importação nuclear da FAK em azul escuro.

Para averiguar se o peptídeo candidato, FP-1, interage com a miosina sarcomérica, FP-1 e FP-2 foram sintetizados e covalentemente ligados a colunas do tipo *HiTrapTM NHS-activated HP*. Estas colunas (FP-1-HiTrap e FP-2-HiTrap) foram utilizadas para ensaios de interação com extratos totais provenientes de ventrículo esquerdo de ratos adultos. Como apresentado na Figura 28, miosina sarcomérica foi identificada por *western blotting* como um ligante de FP-1 acoplado à coluna, indicando que este peptídeo pode ser parte do sítio de ligação de FERM à miosina sarcomérica. Não houve ligação significativa de miosina à FP-2 acoplado à coluna.

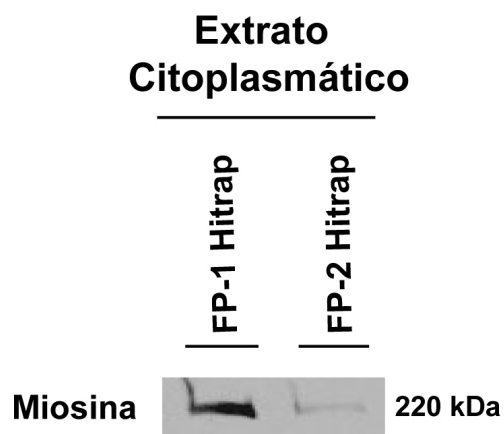


Figura 28. FP-1 interage com miosina de extrato citoplasmático de ventrículo esquerdo de ratos adultos. *Blotting* realizado com anti-miosina dos eluatos das colunas *HiTrapTM NHS* com FP-1 ou FP-2 acoplados.

Os peptídeos foram também utilizados diretamente em ensaios de *Pull-Down* com a porção C-terminal da miosina sarcomérica ligada à GST e FL-FAK, para verificar se a interação FAK/miosina poderia ser deslocada pela presença do peptídeo. A adição de FP-1 reduziu a quantidade de FL-FAK precipitada por GST-Mio, enquanto que não houve alteração na interação FAK/miosina pela presença de FP-2 (Fig. 29).

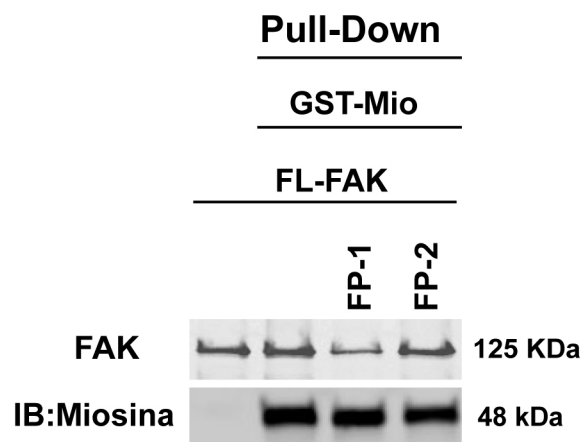


Figura 29. FP-1 diminui a interação entre FL-FAK e GST-Mio *in vitro*. O peptídeo FP-1 regula negativamente o ensaio de *Pull-Down* da FL-FAK utilizando-se a miosina recombinante GST-Mio.

3.11 FP-1 reduz a interação FAK/miosina e leva à ativação e redistribuição subcelular da FAK em MVRNs

Considerando o efeito de FP-1 na interação entre FAK e miosina *in vitro*, foi plausível hipotetizar que o peptídeo poderia deslocar a interação intramolecular entre FAK/miosina, o que possibilitaria a ativação da FAK. Para testar esta hipótese, FP-1 e o peptídeo controle, FP-2, foram sintetizados e ligados por uma ponte dissulfeto N-terminal ao peptídeo translocador de membranas biológicas TAT₄₇₋₅₇ (YGRKKRRQRRR), o qual é conhecido por internalizar peptídeos e proteínas em células. Alternativamente, os peptídeos FP-1 e FP-2 foram ligados ao peptídeo TAT₄₇₋₅₇ por um linker constituído por glicina, serina e glicina (GSG).

A internalização do peptídeo FP-1 em miócitos cardíacos foi confirmada por sua detecção por LC-MS/MS em extratos de MVRNs tratados com FP-1 (Fig. 30).

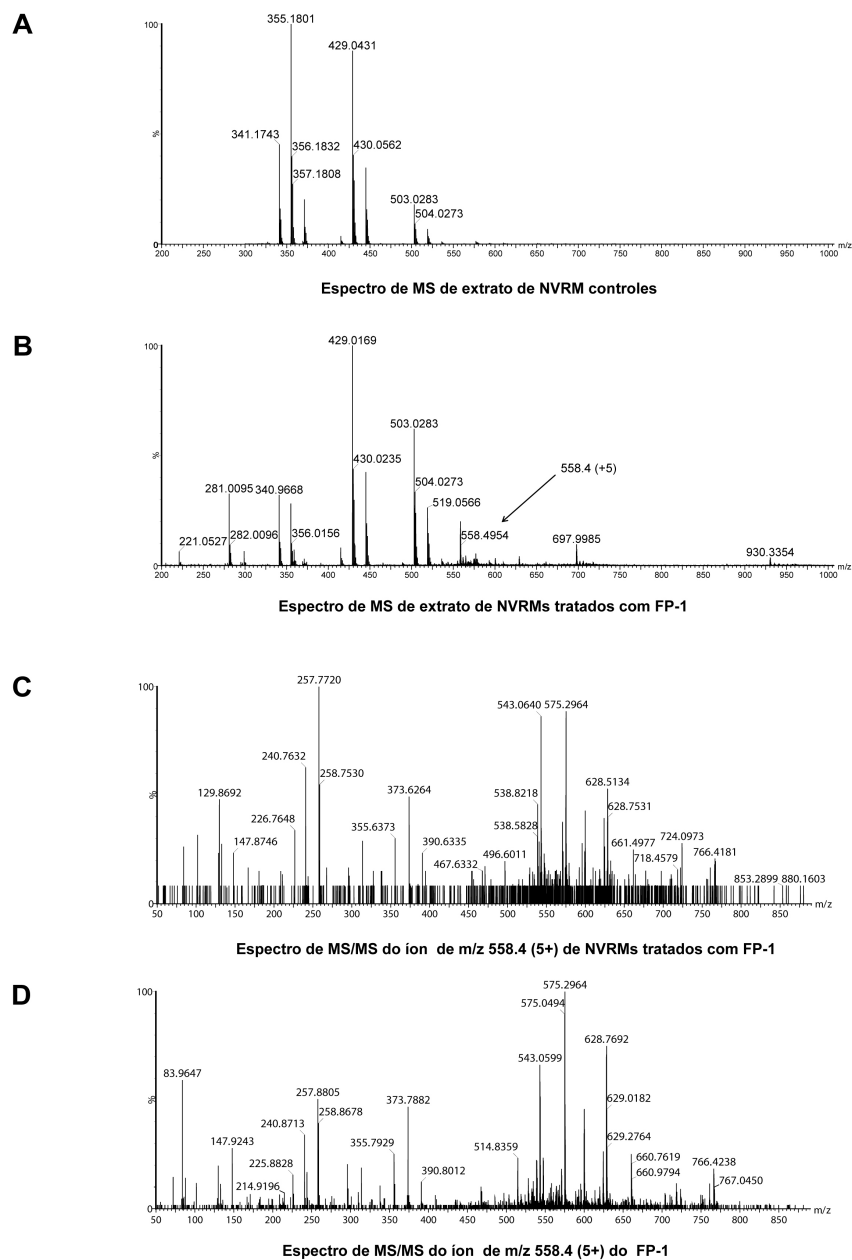


Figura 30. Detecção do peptídeo FP-1 em extratos de MVRNs por LC-MS/MS. **A.** Espectro de MS da fração de peptídeos purificados de extratos de MVRNs controles. **B.** Espectro de MS da fração de peptídeos purificados de extratos de MVRNs tratados com FP-1. A seta indica o íon marcador do peptídeo FP-1 de $m/z = 558.4 (5+)$. **C.** Espectro de MS/MS do íon de $m/z = 558.4 (5+)$ da fração de peptídeos purificados de extratos de MVRNs tratados com FP-1 ($10\mu\text{M}$). **D.** Espectro de MS/MS do íon marcador de $m/z = 558.4 (5+)$ de FP-1, utilizado como padrão.

Após a confirmação da internalização dos peptídeos, MVRNs foram tratados com 1 μ M dos peptídeos FP-1 ou FP-2 acoplados ao TAT₄₇₋₅₇ por 1 hora. Após o tratamento, os extratos celulares foram preparados na presença de inibidores de proteases e fosfatases e utilizados para análises por imunoprecipitação e *western blotting*.

A princípio, investigou-se se o tratamento com FP-1 poderia induzir uma diminuição da interação FAK/miosina *in vivo*. A Figura 31 demonstra que o tratamento com FP-1 ocasionou uma substancial diminuição na interação FAK/miosina, ou seja, a quantidade de miosina imunoprecipitada no complexo formado com o anticorpo anti-FAK c-20 foi menor em relação ao controle e ao tratamento com FP-2 (Fig. 31). Estes dados, juntamente com os dados do *Pull-Down*, indicam que FP-1 age como um inibidor competitivo da FAK pela interação com a miosina.

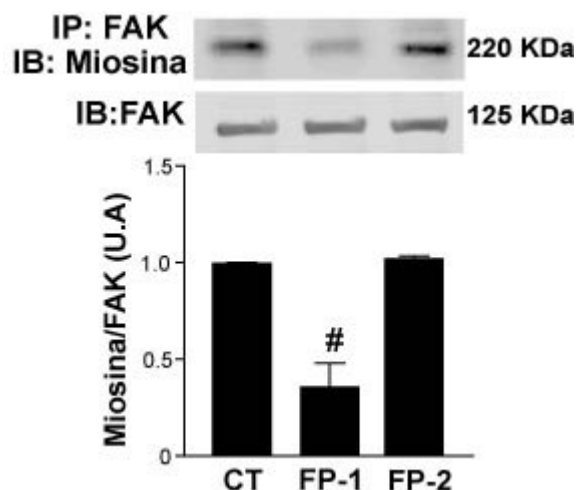


Figura 31. Tratamento com FP-1 reduz a interação FAK/miosina. Anti-miosina e anti-FAK *immunoblottings* dos precipitados de MVRNs tratados com FP-1 ou FP-2 obtidos com o anticorpo anti-FAK. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n= 6) do *immunoblotting* realizado com anti-pFAK normalizado pelo *immunoblotting* realizado com anti-FAK. # $p < 0.05$ vs Controle (CT).

Demonstrado que FP-1 reduz a interação entre FAK/miosina e que FAK interage com miosina em seu estado inativo *in vitro*, verificou-se se o tratamento de MVRNs com este peptídeo levaria a um aumento na fosforilação/ativação da FAK. O tratamento com FP-1 induziu um aumento de ~ 4 vezes na fosforilação do resíduo tirosina 397 da FAK, ao passo que FP-2 não induziu alterações na fosforilação deste resíduo (Fig. 32A). Em seguida, MVRNs foram tratados com doses crescentes de FP-1 para verificar se o tratamento levaria a um efeito dose resposta na fosforilação da FAK. Conforme observado na Figura 32B, doses crescentes de FP-1 levaram a aumentos crescentes na fosforilação da FAK, quando comparados aos controles. Estes dados indicaram que o deslocamento da interação FAK/miosina pelo peptídeo FP-1 possibilita a ativação da FAK.

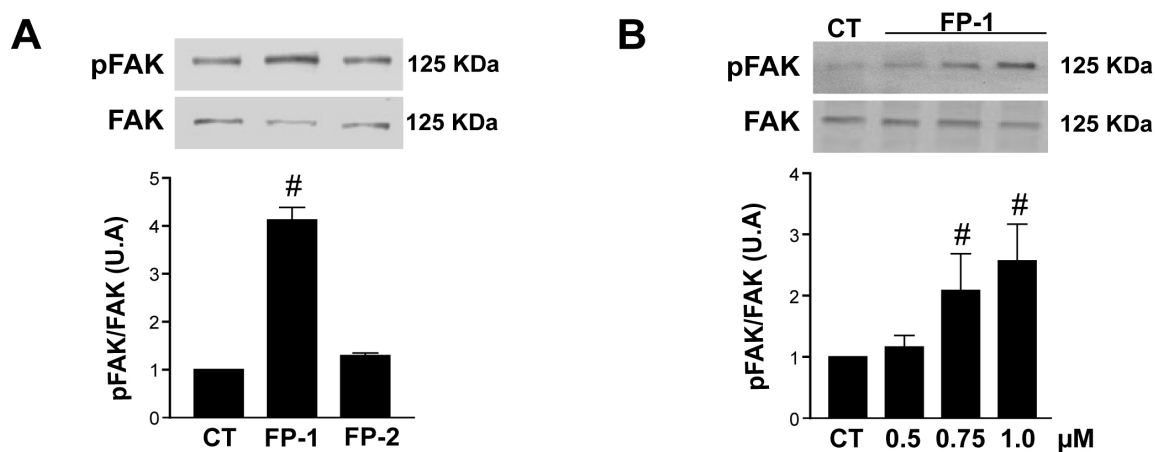


Figura 32. Tratamento com FP-1 induz fosforilação da FAK de forma dose dependente. **A.** FP-1, mas não FP-2, induziu aumento da fosforilação da FAK no resíduo Tyr-397. **B.** FP-1 induziu fosforilação da FAK de forma dose dependente. Os gráficos apresentam a leitura densitométrica (n= 10) do *immunoblotting* realizado com anti-pFAK normalizado pelo *immunoblotting* realizado com anti-FAK. # p< 0.05 vs Controle (CT).

O aumento da ativação da FAK em miócitos cardíacos tem sido relacionado com sua redistribuição celular para regiões como costâmeros, disco-Z e núcleo. Como o tratamento com FP-1 ocasiona uma diminuição da interação FAK/miosina e um aumento na ativação da FAK, foi analisado se estes eventos levariam a uma redistribuição subcelular da FAK. Notavelmente, o tratamento com FP-1 levou a redistribuição da FAK dos sarcômeros para o núcleo celular, como demonstrado pelas imagens de microscopia confocal apresentadas na Figura 33.

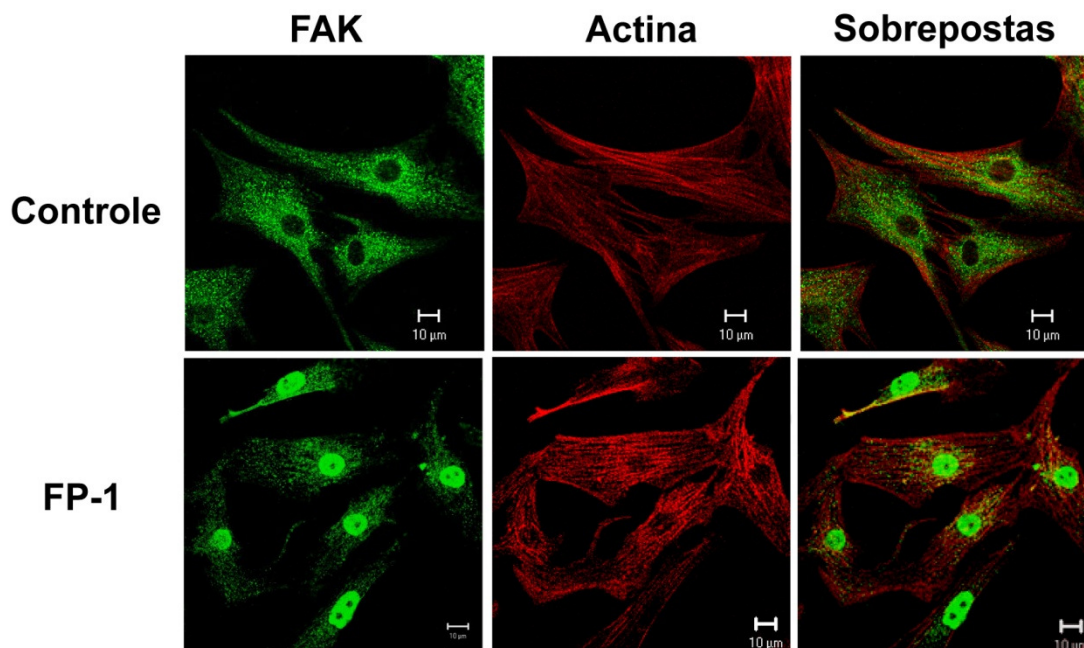


Figura 33. Tratamento com FP-1 ocasiona redistribuição da FAK para o núcleo celular. Imagens de microscopia confocal de MVRNs controles e tratados com FP-1 marcados com anti-FAK (verde) e com faloidina conjugada à rodamina (vermelho).

3.12 Superexpressão da FAK leva à hipertrofia de miócitos cardíacos

Estudos anteriores demonstraram que ativação da FAK por estresse mecânico culmina com hipertrofia de miócitos cardíacos em cultura (Marin et al., 2008; Torsoni et

al., 2003). A fim de se avaliar a função da FAK no processo de hipertrofia de miócitos cardíacos, foi realizada a superexpressão desta proteína em fusão com uma cauda de Myc (Myc-FAK) em miócitos cardíacos em cultura. O tratamento deste tipo celular com 2 μ g de pRc/CMV-FAKwt aumentou a expressão da FAK em aproximadamente 4 vezes, conforme demonstrado pelo *western blotting* do imunoprecipitado realizado com anti-FAK) (Fig. 34A). Além do aumento nos níveis de expressão, foi verificado se houve um aumento na ativação desta quinase, evento importante para suas funções celulares. Conforme observado na Figura 34B, a superexpressão da FAK foi acompanhada por um aumento absoluto de aproximadamente 2 vezes em sua fosforilação/ativação.

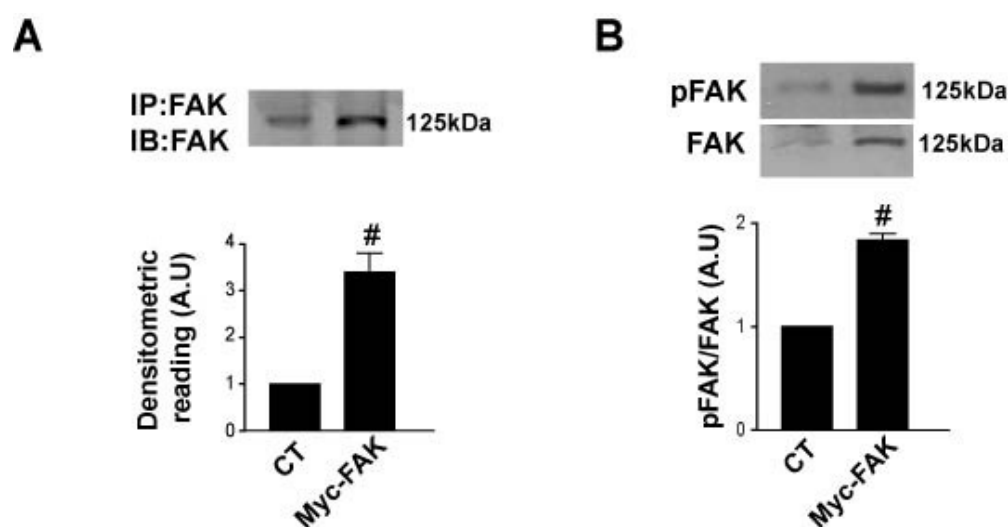


Figura 34. Superexpressão de Myc-FAK em miócitos cardíacos ventriculares de ratos neonatos em cultura. **A.** Imunoprecipitação e *Blotting* com anti-FAK de extrato de MVRNs controles, ou seja, tratados com lipofectamina, e transfectados com pRc/CMV-FAKwt. O gráfico em barras representa a leitura densitométrica do imunoprecipitado de FAK em extratos controles e transfectados. **B.** *Blottings* realizados com anti-FAK e anti-pFAK-Tyr397 dos extratos de MVRNs controle e transfectados com Myc-FAK. O gráfico em barras representa a leitura densitométrica do *immunoblotting* realizado com anti-pFAK normalizado pelo *immunoblotting* realizado com anti-FAK. # $p < 0.05$ vs Controle (CT).

Após a padronização da superexpressão da FAK, as células foram mantidas por 48 horas para verificar a ocorrência de alterações no fenótipo celular decorrente da superexpressão da FAK. Verificou-se que após 48 horas de superexpressão ocorreu um aumento de ~ 2 vezes na área superficial dos miócitos cardíacos (Fig. 35 A-C), o que confirma os dados da literatura que indicam que a quinase FAK esta envolvida no processo de hipertrofia. Além da área superficial, foi verificado, através da técnica de PCR em tempo real, se a superexpressão da FAK altera os níveis de expressão do marcador de hipertrofia peptídeo natriurético atrial (ANP). Conforme observado na Figura 25D, a superexpressão da FAK foi acompanhada por um aumento nos níveis de ANP.

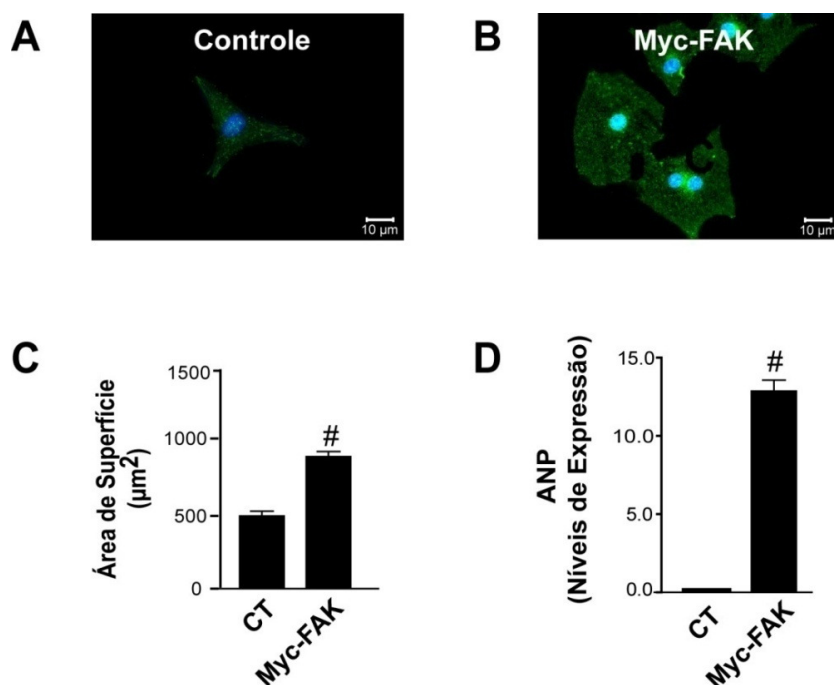


Figura 35. Superexpressão de Myc-FAK leva à hipertrofia de MVRNs em cultura. **A.** NRVM tratado com lipofectamina. **B.** MVRNs transfectados com Myc-FAK por 48 horas. **C.** O gráfico em barras representa a medida da área superficial dos MRVMs controles e transfectados com lipofectamina. **D.** O gráfico em barras representa os níveis de expressão de ANP das células controles e transfectadas com Myc-FAK. # $p < 0.05$ vs Controle (CT).

3.13 Tratamento com FP-1 induz o crescimento hipertrófico de miócitos cardíacos

Baseado nos dados que demonstraram que a superexpressão da FAK acompanhada pelo aumento de sua ativação leva ao fenótipo de hipertrofia e nos dados que demonstraram que o peptídeo FP-1 leva a ativação desta quinase, foi investigado se o tratamento prolongado com FP-1 poderia levar ao fenótipo de hipertrofia de MVRNs em cultura. Células tratadas com FP-1 por 12 e 24 horas apresentaram aumento em sua área superficial de ~1.5 e 2 vezes, respectivamente (Fig. 36A-D). Este aumento foi acompanhado por um aumento nos níveis de expressão de ANP (Fig. 36E), o que indica a importância da FAK no desenvolvimento do processo de hipertrofia cardíaca. Tratamento com FP-2 não alterou a morfologia geral dos MVRNs quando comparados com as células não tratadas (dados não apresentados).

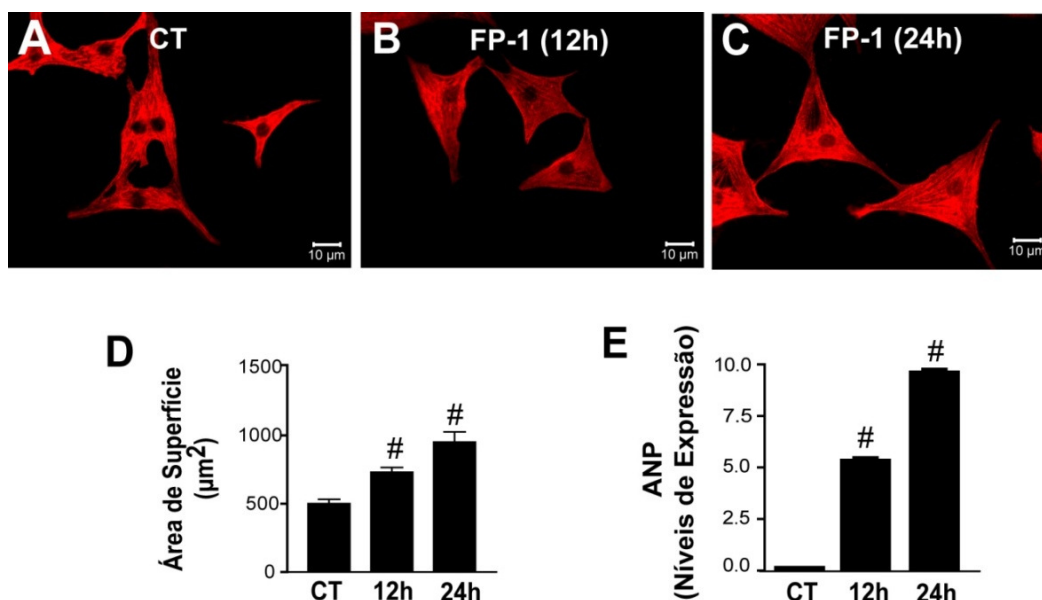


Figura 36. Tratamento com FP-1 leva à hipertrofia de MVRNs em cultura. **A.** MVRNs controles (CT). **B e C.** MVRNs tratados com FP-1 por 12 e 24 horas respectivamente. **D e E.** Os gráficos em barras representam a medida da área superficial e dos níveis de expressão de ANP dos MRVMs controles e tratados com FP-1, respectivamente.

A fim de se confirmar que o efeito pró-hipertrófico do peptídeo FP-1 é mediado pela ativação da FAK, foi realizado o silenciamento gênico desta proteína seguido pelo tratamento com o peptídeo. O silenciamento gênico da FAK foi efetivo com o uso de 100ng de siRNA/ml de meio quando comparado com a mesma quantidade de siRNA para GFP. O gráfico apresentado na Figura 37 demonstra a amplificação do transcrito da FAK de células transfectadas com siRNA para FAK comparada com o siRNA para GFP, indicando uma redução de aproximadamente 65% nos transcritos da FAK.

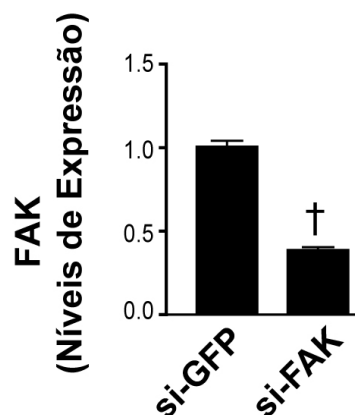


Figura 37. Silenciamento gênico da FAK em MVRNs em cultura demonstrado por PCR quantitativo. O gráfico em barras representa a amplificação do transcrito da FAK por PCR em tempo real das amostras de cDNA provenientes do RNA total das células transfectados com siRNA para FAK e GFP.

Após a verificação da redução da transcrição gênica, foi averiguado se ocorre uma concomitante redução dos níveis da proteína FAK nos extratos das células que receberam siRNA para FAK ou GFP por *western blotting*. A Figura 38 demonstra que ocorreu uma redução de ~ 75% nos níveis de FAK nas células transfectadas com siRNA para FAK e naquelas que, além do siRNA para FAK, também foram tratadas com o peptídeo FP-1, quando comparadas aos respectivos controles.

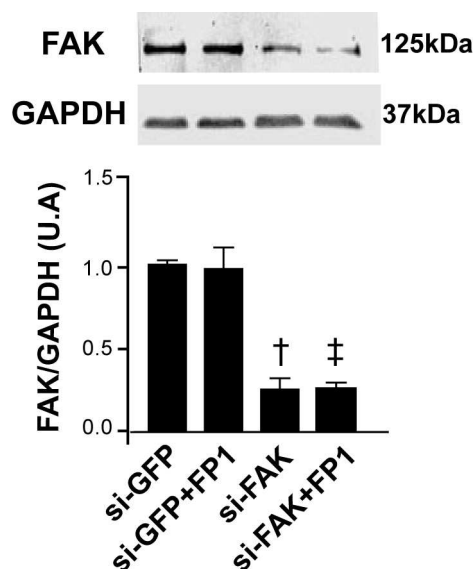


Figura 38. Diminuição dos níveis de expressão da FAK em MVRNs em cultura tratados com siRNA. O gráfico em barras representa a leitura densitométrica do *immunoblotting* realizado com anti-FAK normalizado pelo *immunoblotting* realizado com anti-GAPDH dos extratos de células transfectados com siRNA para GFP, SiRNA para GFP e tratadas com FP-1, siRNA para FAK e si-RNA para FAK e tratadas com FP-1. [†] < 0.05 vs siGFP; [‡] p< 0.05 vs siGFP+FP-1.

Após a padronização do silenciamento da FAK com o concomitante tratamento com FP-1, verificou-se se o silenciamento da FAK seria capaz de impedir o efeito pró-hipertrófico decorrente do tratamento com FP-1. Conforme observado na Figura 39A-E, a transfecção com si-RNA para GFP (24 horas) seguida pelo tratamento com FP-1 por 24 horas levou ao fenótipo hipertrófico enquanto que, as células silenciadas para FAK e tratadas com FP-1 não apresentaram alteração em sua área de superfície. Este dado indica que o efeito hipertrófico de FP-1 é específico e dependente da sinalização pela FAK.

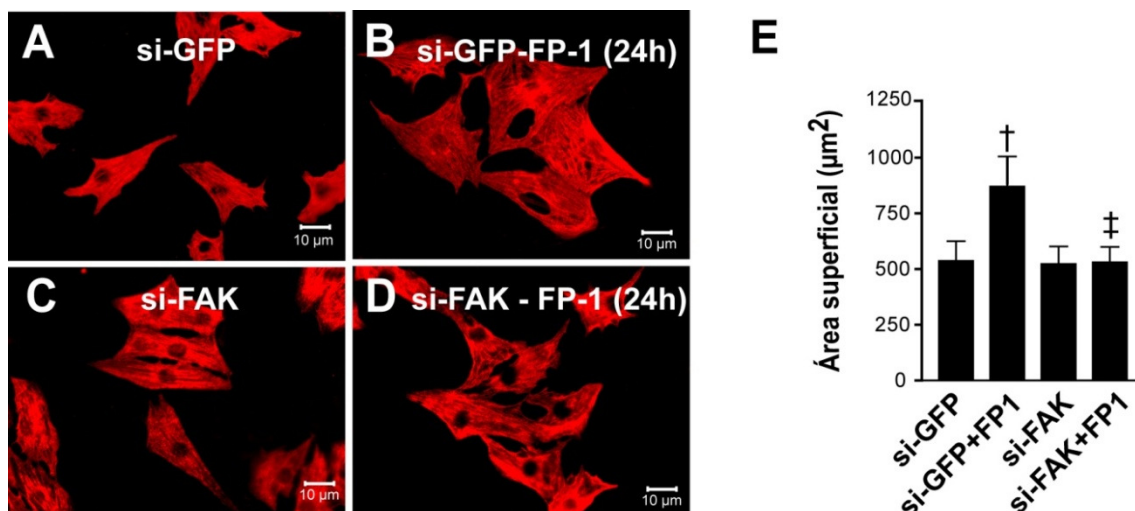


Figura 39. Silenciamento gênico da FAK impede o efeito pró-hipertrófico de FP-1 em MVRNs em cultura. **A.** MVRNs tranfectados com siRNA para GFP. **B.** MVRNs tranfectados com siRNA para GFP e tratados com FP-1 por 24 horas. **C.** MVRNs tranfectados com siRNA para FAK. **D.** MVRNs tranfectados com siRNA para FAK e tratados com FP-1 por 24 horas. O gráfico em barras representa a medida da área superficial dos MRVMs tranfectados com siRNA para GFP, SiRNA para GFP e tratadas com FP-1, siRNA para FAK e siRNA para FAK e tratadas com FP-1. † < 0.05 vs siGFP; ‡ p< 0.05 vs siGFP+FP-1.

3.14 Efeito pró-hipertrófico de FP-1 é mediado pela ativação da via mTOR

Estudos prévios demonstraram que a via mTOR está envolvida na gênese do fenótipo hipertrófico posterior à ativação da FAK (Marin et al., 2008). Baseado nos resultados que demonstram que FP-1 ocasiona crescimento hipertrófico em miócitos cardíacos, foi investigado se ocorre ativação da via mTOR posteriormente ao tratamento com FP-1. Como observado na Figura 40, o tratamento de MVRNs com FP-1 induziu o aumento da fosforilação no resíduo serina 473 da serina/treonina quinase AKT, aumento da

fosforilação inibitória no resíduo treonina 1462 da tuberina (TSC2) e o aumento da fosforilação do resíduo treonina 389 da S6 kinase (S6K).

A fim de se confirmar o envolvimento da via mTOR na hipertrofia induzida pelo tratamento com FP-1, MVRNs foram tratados concomitantemente com rapamicina, um inibidor farmacológico da via mTOR. O tratamento com rapamicina não afetou a fosforilação da FAK em tirosina 397, AKT em serina 473 ou TSC em treonina 1462 (Fig. 40A - C), mas reduziu a fosforilação de S6K em treonina 389 (Fig. 40D) induzidas pelo tratamento com FP-1.

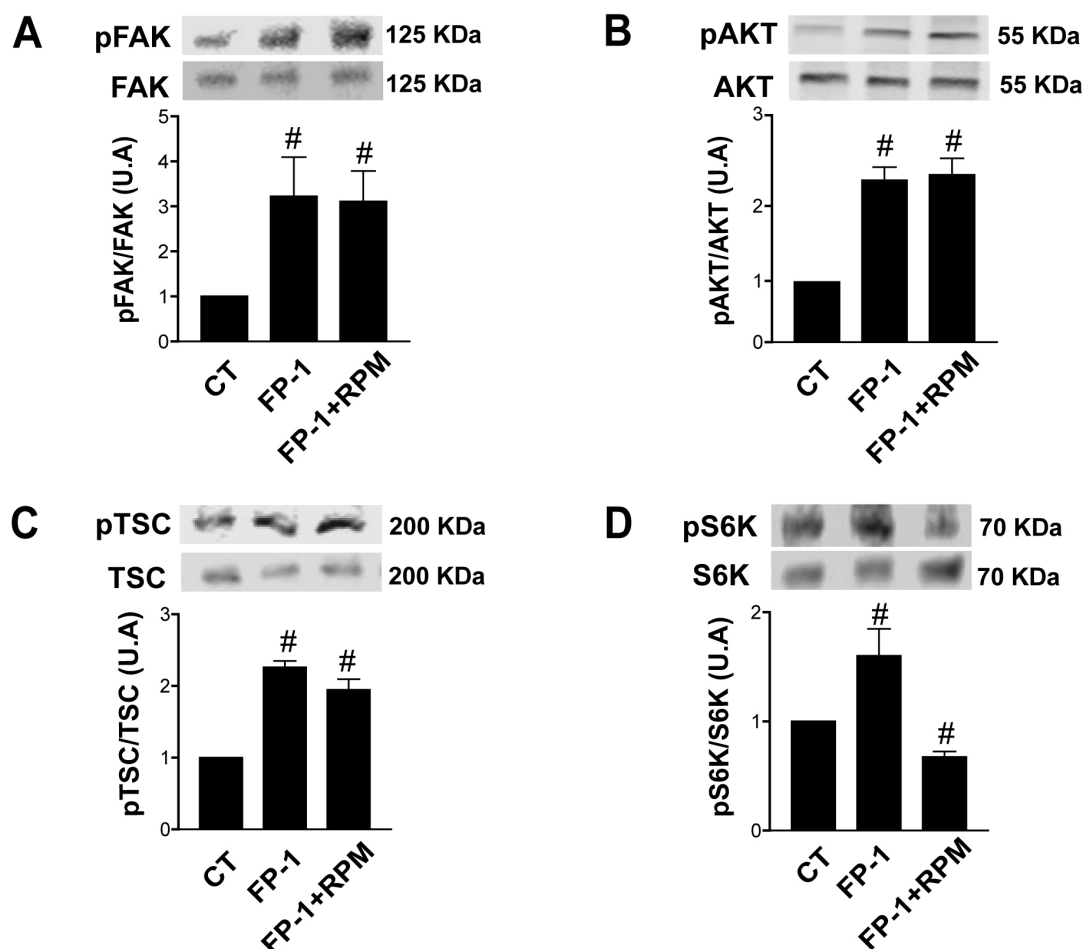


Figura 40. Tratamento com FP-1 estimula a ativação da via mTOR em MVRNs em cultura. **A-D.** *Blottings* realizados com anti-FAK e anti-pFAK-Tyr397, anti-AKT e anti-pAKT-Ser473, anti-TSC e anti-pTSC-Thr1462, anti-S6K e anti-pS6K-Thr389 dos extratos de MVRNs controles, tratados com FP-1 e com FP-1 mais rapamicina. Os gráficos em barras representam a leitura densitométrica dos *immunoblottings* das respectivas proteínas fosforiladas normalizadas pelos *immunoblottings* das proteínas totais. # $p < 0.05$ vs Controle (CT).

Após a demonstração que a via mTOR foi ativada pelo tratamento com FP-1 e que o tratamento com rapamicina levou à regulação negativa desta via através da inibição da fosforilação de S6K, foram realizados experimentos de microscopia de fluorescência para verificar o fenótipo celular após os tratamentos. As células tratados com FP-1 e

concomitantemente com rapamicina não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas às controles, diferente daquelas que receberam FP-1 e apresentaram aumento em sua área superficial (Fig. 41A-D), o que indica o envolvimento da via mTOR na sinalização pela FAK no desenvolvimento do processo de hipertrofia.

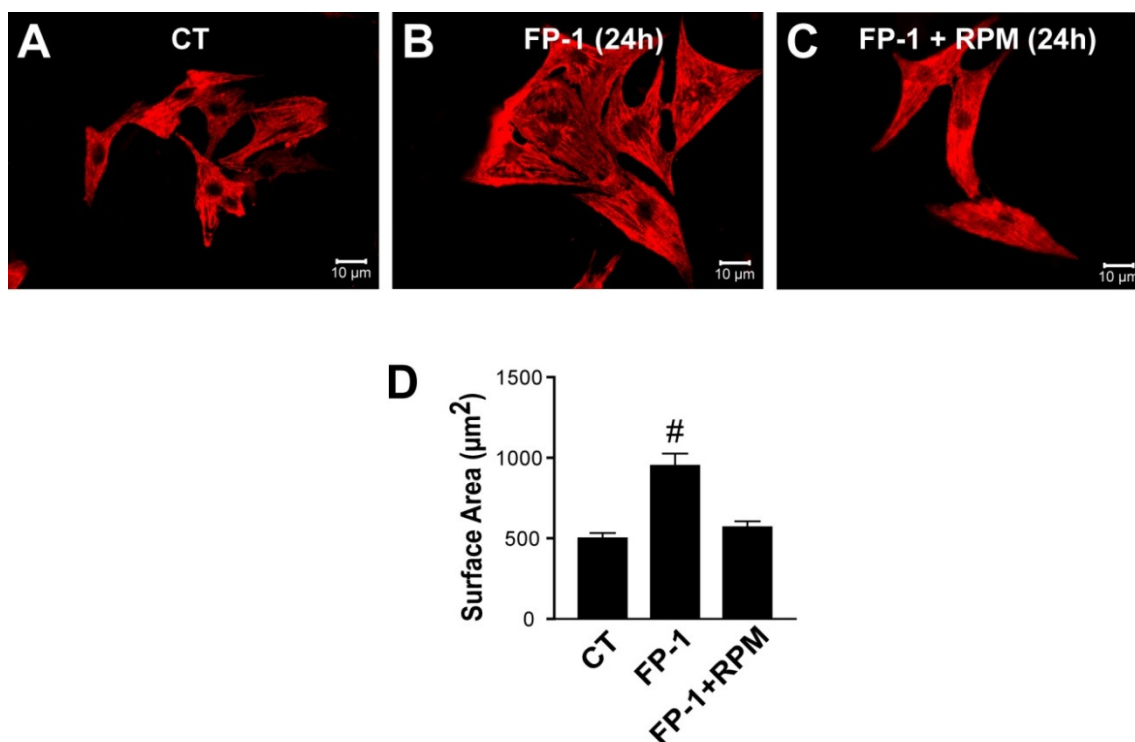


Figura 41. Tratamento com rapamicina impede o efeito pró-hipertrófico de FP-1 em MVRNs em cultura. **A.** MVRNs controles (CT). **B.** MVRNs tratados com FP-1 por 24 horas. **C.** MVRNs tratados com FP-1 e rapamicina por 24 horas. **D.** O gráfico em barras representa a medida da área superficial dos MRVMs controles, tratados com FP-1 e FP-1 mais rapamicina por 24 horas. # $p < 0.05$ vs Controle (CT).

3.15. Análise estrutural da interação entre o domínio FERM da FAK e a porção C-terminal da cadeia pesada da miosina sarcomérica

Após os estudos que abordaram a funcionalidade da interação FAK/miosina, foram realizados ensaios que possibilitassem a formulação de um modelo que descrevesse a

interação entre o domínio FERM da FAK e a miosina sarcomérica. Com este intuito foram utilizadas as abordagens de *cross linking* acoplado à espectrometria de massas, *docking* molecular e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Para os ensaios experimentais foi padronizada a co-purificação do domínio FERM da FAK e do fragmento C-terminal da miosina, ambos expressos em fusão a uma cauda de histidina. Ambas as proteínas foram expressas (Fig. 42A) separadamente e, em seguida, os *pelets* foram unidos para a lise bacteriana. As porções protéicas foram então co-purificadas por afinidade (Fig. 42B) e em seguida por cromatografia de exclusão de tamanho (Fig. 42C).

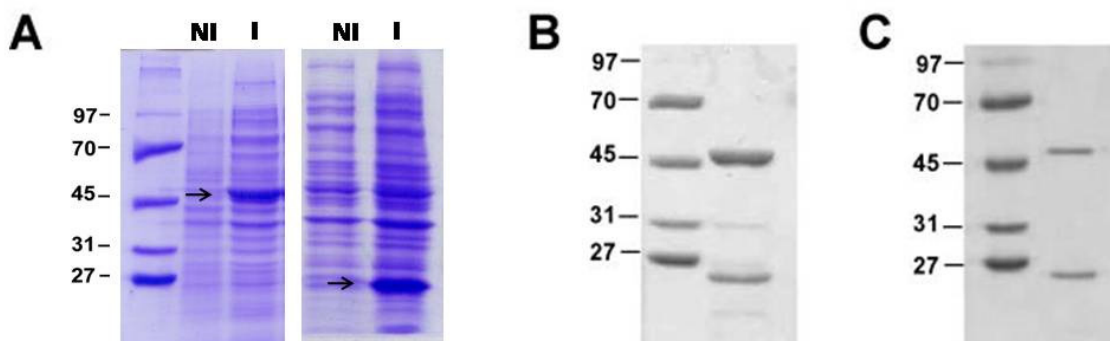


Figura 42. Co-purificação do complexo FERM/C-terminal da miosina sarcomérica. **A.** Géis SDS-PAGE das amostras bacterianas antes (NI – não induzido) e após indução (I - induzido) corados por *coomassie blue*. O domínio FERM apresenta um peso molecular de 46 KDa e a porção C-terminal da miosina um peso de 24KDa. **B e C.** SDS-PAGE das fração de purificação por afinidade e por gel filtração do complexo FERM/C-terminal da miosina corados por *coomassie blue*, respectivamente.

Após a purificação por exclusão de tamanho, as frações correspondentes a eluição do complexo foram concentradas e utilizadas para os experimentos de *cross linking* acoplado à espectrometria de massas e SAXS.

Nos ensaios de *cross linking*, a adição do reagente DiSuccinimidil suberato (DSS) à amostra, contendo o complexo FERM/C-terminal da miosina, ocasionou uma alteração no padrão de migração das bandas no gel SDS-PAGE, efeito característico da reação de *cross-linking* (Fig.43).

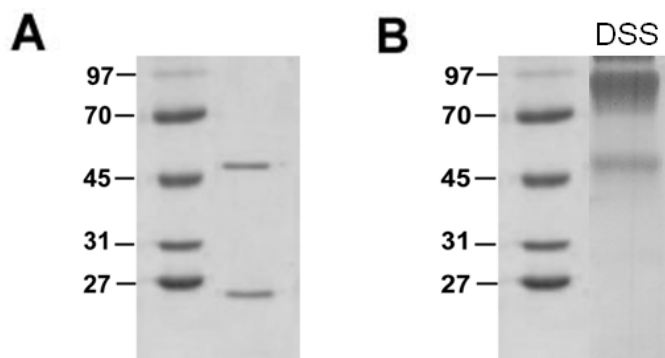


Figura 43. Ensaio de *cross linking* com o reagente DSS. **A.** Gel SDS-PAGE do complexo FERM/C-terminal da miosina antes da adição do DSS. **B.** Gel SDS-PAGE do complexo FERM/C-terminal da miosina após a incubação com o reagente DSS.

Após digestão das amostras em solução, foi realizada uma separação cromatográfica dos peptídeos em uma coluna C18, os espectros de massas foram adquiridos no instrumento Synapt HDMS e os três picos mais intensos foram submetidos à técnica de MS/MS (Fig. 44).

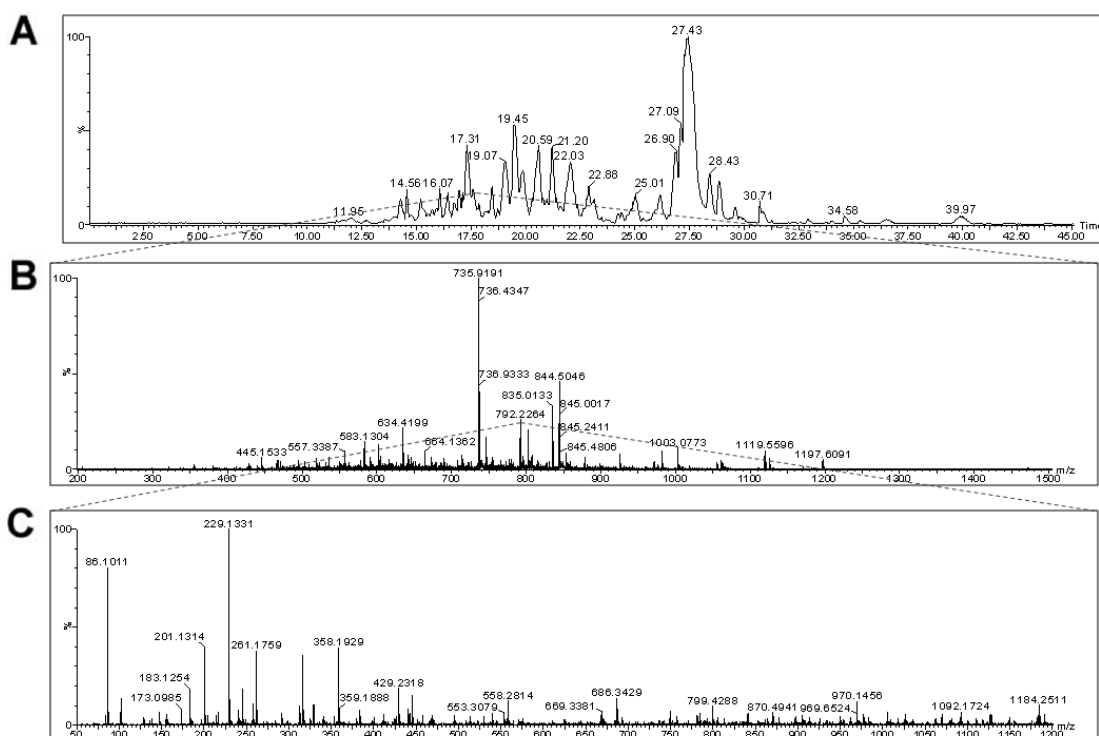
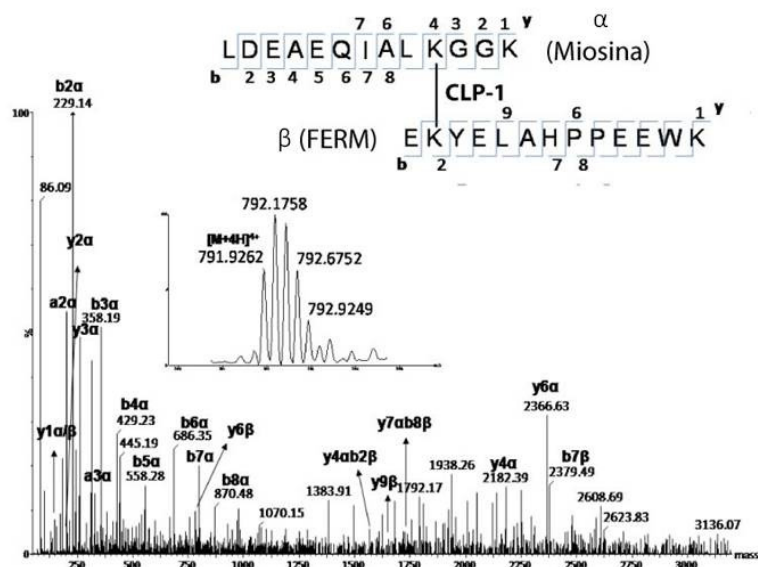


Figura 44. A-C. Corrida cromatográfica, espectros de MS e MS/MS dos peptídeos originados do complexo FERM/miosina após a incubação com o DSS, respectivamente.

Após aquisição dos espectros de MS/MS, dois pares de peptídeos ligados pelo reagente de *cross linking* DSS foram identificados. As lisinas 1808 e 1833 dos peptídeos LDEAEQIALKGGK (aa1799 ao aa1811) e VRELENELEAEQKR (aa1821 ao aa1834) da miosina se ligaram às lisinas 110 e 255 dos peptídeos EKYELAHPPEEK (aa109 ao aa121) e FDKECFK (aa253 ao aa259) do domínio FERM da FAK, respectivamente (Fig. 45). A ligação entre lisinas pelo reagente DSS é um indicativo de que estes peptídeos estão localizados na superfície de interação entre FERM e miosina a uma distância entre 5 e 12Å.

A



B

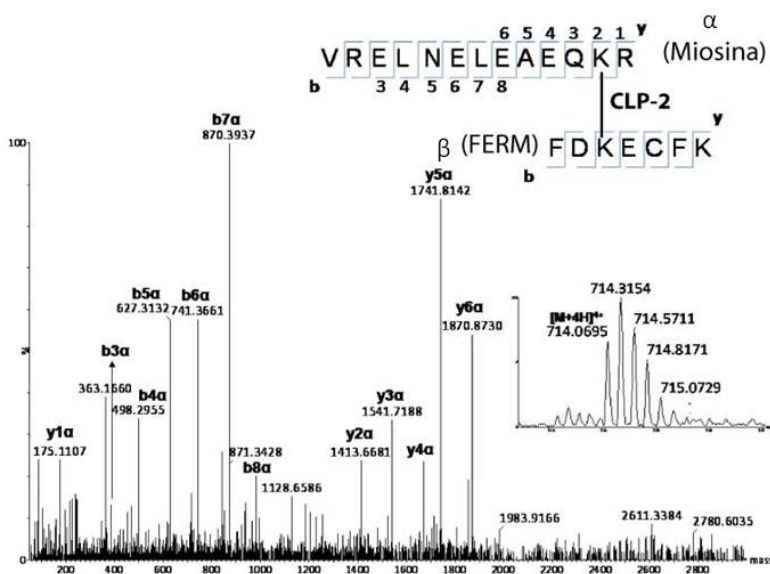


Figura 45. Identificação dos peptídeos ligados pelo reagente de *cross-linking*. **A.** Espectro da sequência peptídica “LDEAEQIALKGGK” da miosina ligada covalentemente pelo DSS à sequência “EKYELAHPPEEK” do domínio FERM. Este par de peptídeos foi nomeado CLP-1 (representado no detalhe). **B.** Espectro da sequência peptídica “VRELENELEAEQKR” da miosina ligada covalentemente pelo DSS à sequência “FDKECFK” do domínio FERM. Este par de peptídeos foi nomeado CLP-2 (representado no detalhe).

Após a obtenção dos peptídeos ligados entre lisinas foi realizada uma busca por possíveis sítios de interação na superfície do domínio FERM da FAK. A Figura 46A apresenta a superfície eletrostática do domínio FERM da FAK. A região ocupada pelo peptídeo FP-1 destaca-se pelo seu elevado potencial eletronegativo (vermelho). Observa-se que as lisinas 110 e 255, juntamente com o peptídeo FP-1, compõem as paredes de uma cavidade (fenda) formada entre os subdomínios da FAK (Fig. 46A e B).

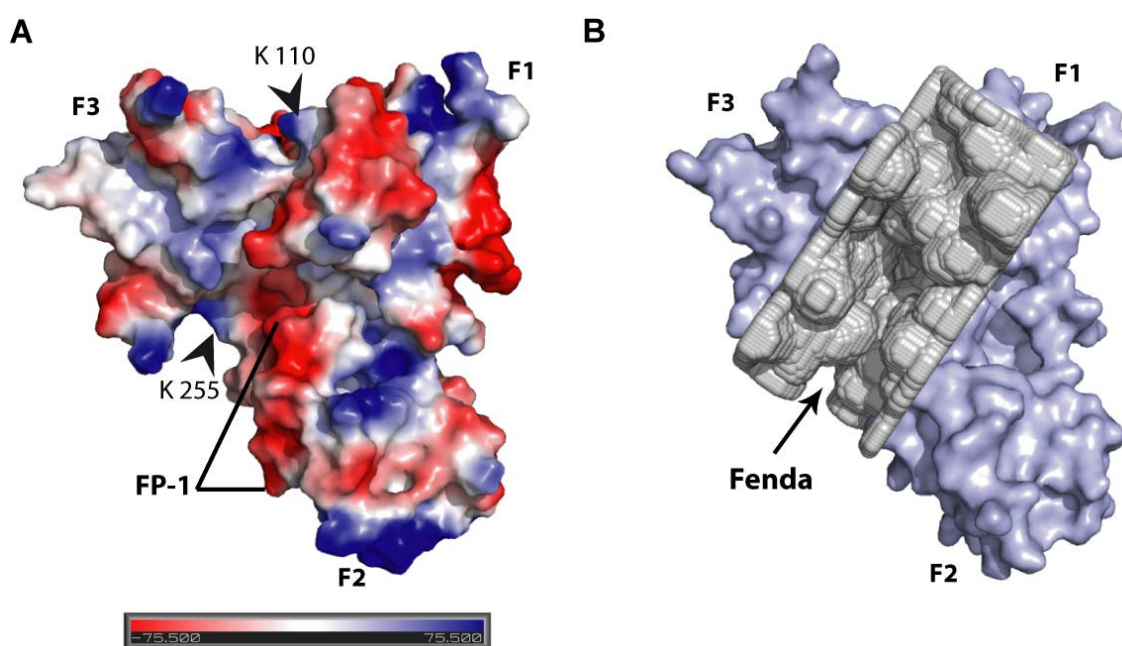


Figura 46. Superfície do domínio FERM da FAK com destaque para a posição das lisinas 110 e 255 e para a fenda formada entre os subdomínios no domínio FERM. **A.** Superfície eletrostática do domínio FERM da FAK. As lisinas 110 e 255 e o peptídeo FP-1 estão indicados. **B.** Representação da fenda existente entre os subdomínios do domínio FERM da FAK.

A avaliação do potencial desta fenda como sítio de interação e a descrição dos aminoácidos que a compõe foram obtidos pelo programa SHARP². Este programa avalia possíveis sítios de interação na superfície protéica, através do cálculo de seis parâmetros, que são eles: potencial de solvatação (S), hidrofobicidade (H), área superficial acessível (A), propensão dos resíduos para interface (R), planaridade (P) e protusão (P). O domínio FERM representado na Figura 47 apresenta a predição obtida pelo programa SHARP². Este programa avaliou a fenda observada acima como o mais provável sítio de interação na superfície do domínio FERM da FAK. As sub-estruturas que compõem as paredes desta fenda estão destacadas em amarelo e os aminoácidos mais expostos estão representados em *sticks*.

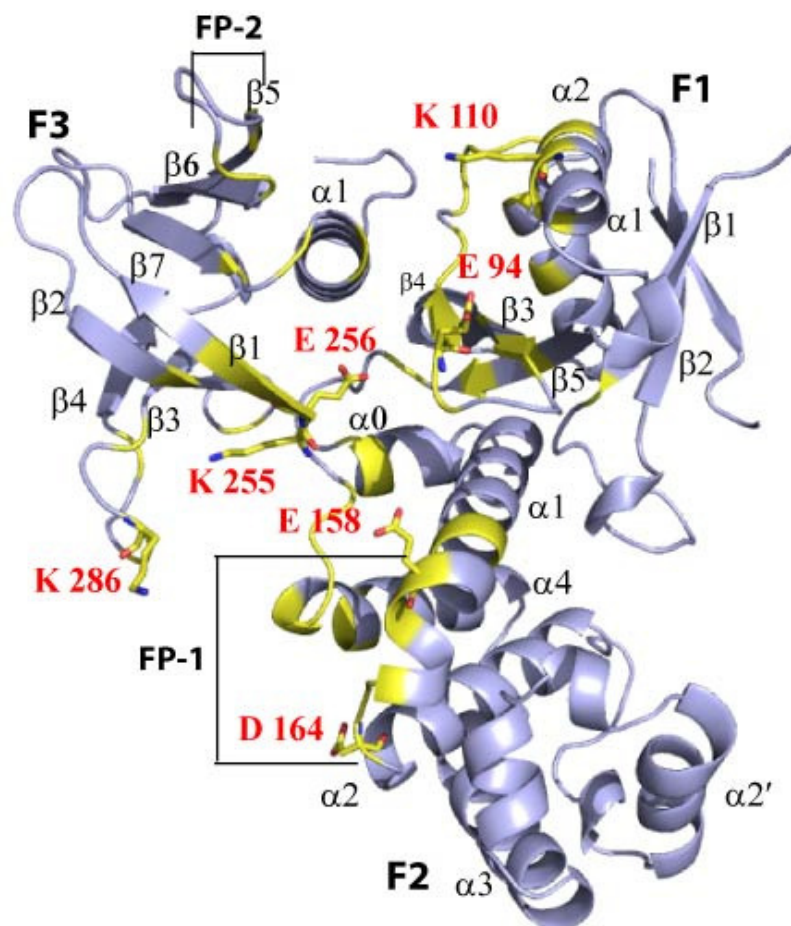


Figura 47. Representação em fitas do domínio FERM da FAK. As subestruturas que compõem a fenda presente entre os subdomínios do domínio FERM estão destacadas em amarelo e os aminoácidos mais expostos estão representados em *sticks*. Os peptídeos FP-1 e FP-2 estão indicados.

Após a obtenção das condições de contato, dadas pelo ensaio de *cross linking*, e a predição da superfície de interação no domínio FERM da FAK, a elaboração de um modelo de interação entre FERM e a miosina foi realizada combinando-se a técnica experimental de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) com técnicas *in silico* de modelagem de corpo rígido e *docking* molecular.

O espalhamento de raios X a baixos ângulos é uma técnica que possibilita a obtenção de informações a respeito da forma e parâmetros estruturais de proteínas em solução (Koch et al., 2003). Um importante parâmetro que a técnica de SAXS fornece é o raio de giro do complexo, um parâmetro de tamanho independente da forma. Além disso, é possível calcular, através da transformada de Fourier da curva de espalhamento, a função de distribuição dos pares de distância ($p(r)$), o que nos permite obter informações a respeito do envelope molecular do complexo de uma maneira mais intuitiva. Para a realização desta técnica, as amostras em condições próximas às fisiológicas foram expostas ao feixe de raios X, ocorrendo então o fenômeno de espalhamento de luz pelos elétrons do complexo protéico. Dado que o espalhamento a baixo ângulo de uma amostra de proteínas em solução é isotrópico, os dados bidimensionais foram integrados para a obtenção de uma curva de intensidade unidimensional em função do módulo do vetor de espalhamento. (Fig. 48A). O ajuste teórico da curva experimental de espalhamento usado para o cálculo da função $p(r)$ está mostrado na Figura 48A e a função $p(r)$ correspondente na Figura 48B. Através dessa função observa-se que o complexo apresenta uma estrutura alongada e contém uma região mais globular. O raio de giro do complexo obtido destas funções foi de $31,7 \pm 0,6$ e a dimensão máxima foi de $\sim 175\text{\AA}$.

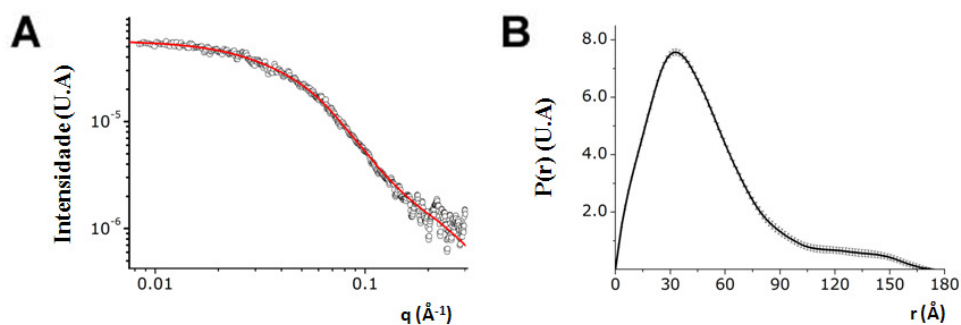


Figura 48. Dados de SAXS do complexo FERM/C-terminal da miosina. **A.** Curva de intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor de espalhamento ($q = (4\pi \sin \Theta)/\lambda$). Os círculos abertos representam os dados experimentais do espalhamento e a linha sólida, em vermelho, o ajuste teórico calculado para a obtenção da função $p(r)$. **B.** Função de distribuição dos pares de distância ($p(r)$).

A partir dos dados de SAXS um modelo de baixa resolução (resolução efetiva de ~ 15 Å) do complexo formado entre FERM e a porção C-terminal da miosina sarcomérica foi obtido através da técnica de modelagem de corpo rígido (20 cálculos independentes). Os pares de lisinas identificados pela técnica de *cross linking* foram utilizados como condições de contato na modelagem. A estabilidade dos cálculos foi analisada através da Discrepância Espacial Normalizada (NSD). Os valores de NSD dos vinte modelos obtidos variaram de 0,53 a 0,90 (média de 0,65), indicando estabilidade dos cálculos e que os modelos apresentaram-se semelhantes. O modelo com o menor valor de NSD, o qual representa a solução mais típica, está apresentado na Figura 49A. O gráfico da Figura 49B apresenta o ajuste do cálculo teórico do espalhamento desse modelo aos dados experimentais de SAXS.

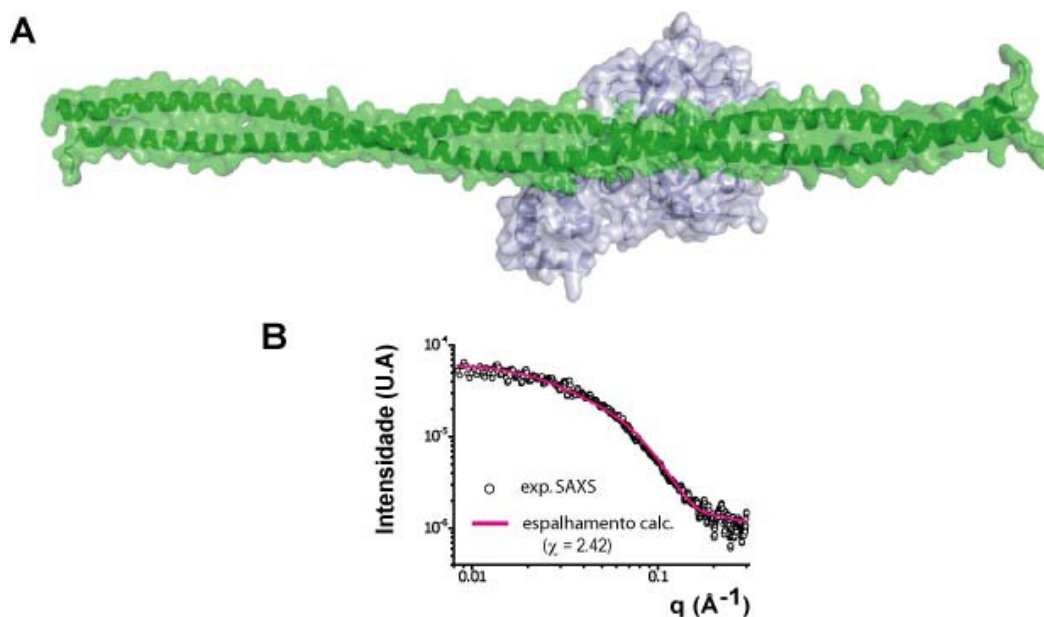


Figura 49. Modelo do complexo FERM/C-terminal da miosina obtido por modelagem de corpo rígido baseado nos dados de SAXS. **A.** Modelo de corpo rígido do complexo FERM/C-terminal da miosina. A estrutura em verde representa a porção C-terminal da miosina e a azul o domínio FERM da FAK. **B.** Curva de intensidade de espalhamento pelo ângulo. Os círculos abertos representam os dados experimentais de espalhamento e a linha sólida, em coloração magenta, o ajuste calculado a partir do modelo de corpo rígido apresentado em A.

Após a obtenção dos dados de SAXS foi efetuado o *docking* molecular a fim de se obter modelos alternativos que também fossem validados pelos dados de SAXS. Os cálculos de *docking* foram repetidos três vezes utilizando-se o programa GRAMM-X (Tovchigrechko and Vakser, 2006). O modelo do domínio FERM da FAK e o da miosina sarcomérica foram utilizados como entradas no programa. O *docking* foi efetuado de forma livre e as dez melhores saídas, condizentes com as condições de contato dadas pelos experimentos de *cross linking*, foram comparadas e apresentaram um RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 0,5. Esse valor indica que os modelos são muito similares com uma

pequena variação de posição entre os átomos. Os modelos selecionados nas três diferentes saídas do programa foram idênticos (RMSD = 0).

A validação dos modelos de *docking* foi realizada através da comparação do espalhamento teórico calculado a partir destes modelos com os dados experimentais de SAXS utilizando-se o programa CRY SOL (Svergun, 1995). Os três melhores modelos com os respectivos cálculos dos espalhamentos teóricos ajustados na curva experimental de SAXS estão ilustrados na Figura 50. Estes modelos se mostraram bastante semelhantes aqueles obtidos pela modelagem de corpo rígido, apesar da pequena variação que ocorre na curvatura da miosina em relação à superfície de interação no domínio FERM.

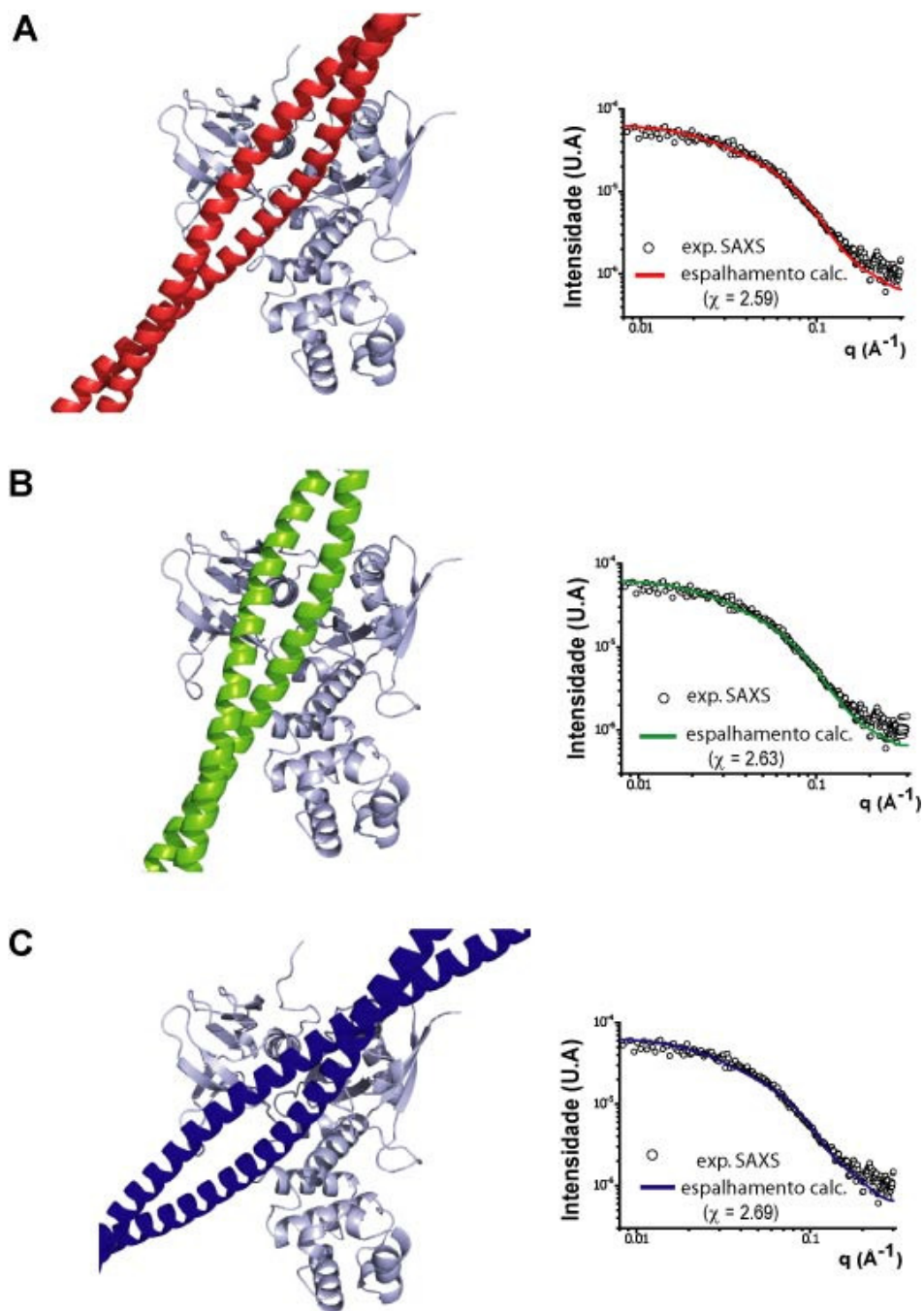


Figura 50. Modelos do complexo FERM/C-terminal da miosina obtidos por *docking* molecular. A-C. Representação em modelos de fitas da região de interação entre o domínio FERM e a miosina de cadeia pesada. Os espalhamentos teóricos calculados dos respectivos modelos estão indicados em linhas sólidas nos gráficos de intensidade de espalhamento pelo ângulo. Os dados experimentais estão representados por círculos abertos.

A distância entre as lisinas dos modelos de *docking* apresentados na Figura 50 foram averiguadas através do uso do programa *Pymol*. A Figura 51 demonstra em amarelo as lisinas que se ligaram pelo DSS no modelo da Figura 50A. Observou-se que a distância entre a lisina 1808 da miosina e a lisina 110 da FAK foi de ~ 6 Å e a das lisinas 1833 da miosina com a 255 da FAK foi de ~ 12 Å. Este modelo de *docking* foi o que apresentou a menor distância entre as lisinas que se ligaram pelo DSS, além de ter apresentado o melhor ajuste na curva de espalhamento pelo ângulo.

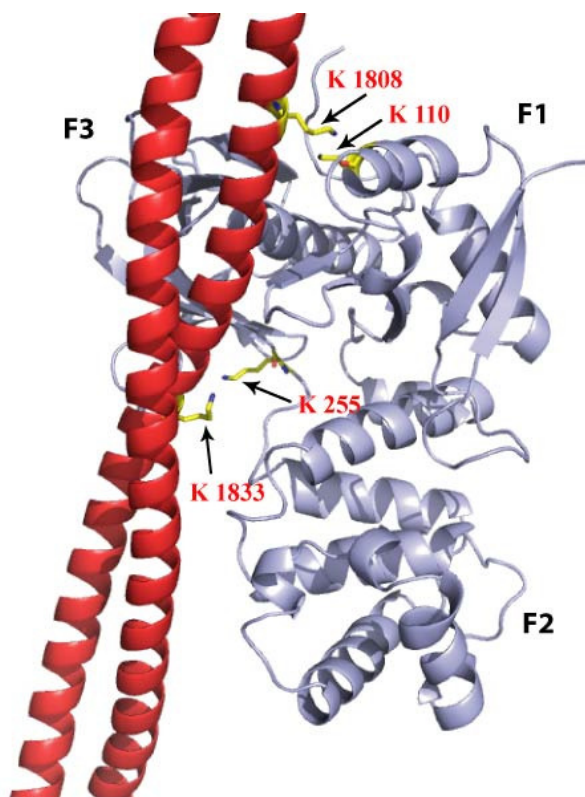


Figura 51. Posições das lisinas identificadas pela técnica de *cross linking* acoplada à espectrometria de massas no modelo do complexo FERM/miosina. As lisinas que reagiram com o reagente DSS estão indicadas por setas.

Os modelos apresentados anteriormente possibilitaram a formulação de um modelo baseado na estrutura cristalográfica dos domínios FERM e quinásico (PDB: 2J0J). Este modelo permitiu a visualização da interação FERM/miosina em relação ao domínio

quinásico (Fig. 52). Observa-se que a miosina ocupa uma superfície no domínio FERM que não faz contatos diretos nas interações auto-inibitórias que o domínio FERM exerce sobre o domínio quinásico, ou seja, a interação do resíduo tirosina 397 com o subdomínio F1, a interação da alça de ativação com os subdomínios F1 e F2 e a interação do lobo C do domínio quinásico com o subdomínio F2. No entanto, quando interagindo com o domínio FERM, a miosina pode interagir diretamente na região N-terminal do *linker* entre F3 e o domínio quinásico (região não estruturada), que contém um sítio de reconhecimento para domínios SH3 de proteínas como a Src.

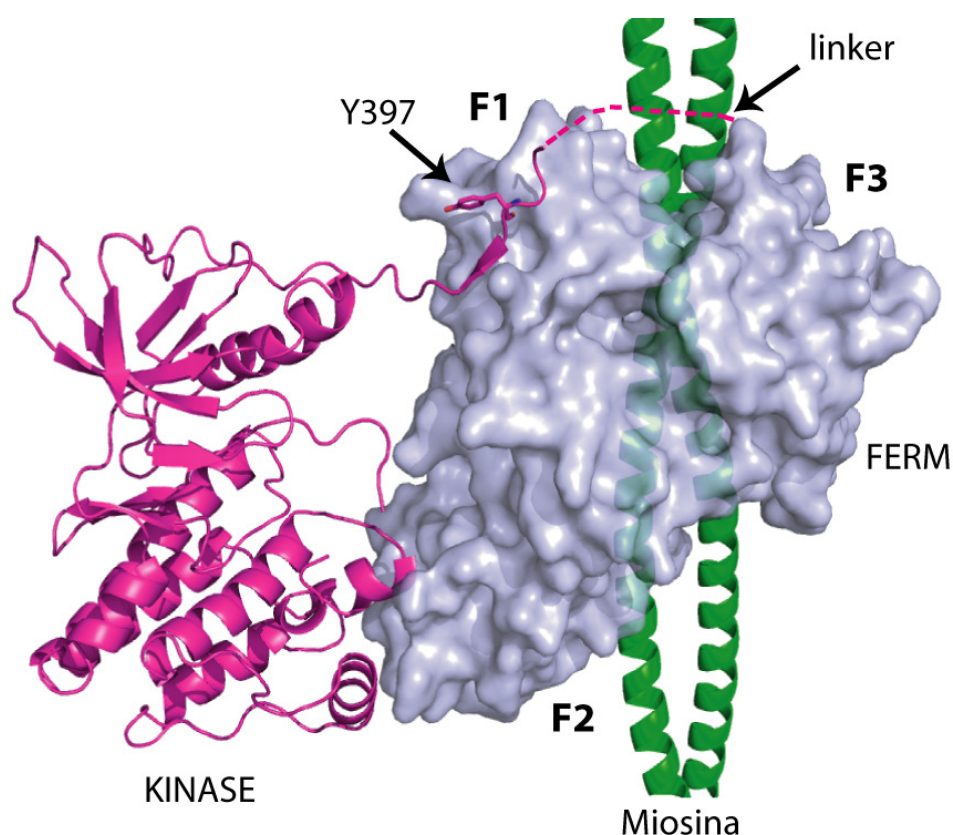


Figura 52. Modelo de interação entre os domínios FERM e quinásico e a miosina sarcomérica. Miosina ocupa uma fenda entre os subdomínios do domínio FERM e não faz contatos diretos nas regiões de interações auto-inibitórias que o domínio FERM exerce sobre o domínio quinásico, mas pode mascarar o sítio de reconhecimento SH3 que se encontra no *linker* entre F3 e o domínio quinásico.

4.Discussão

4.1 A interação FAK/miosina e a mecanotransdução em miócitos cardíacos

Nos últimos anos, vários estudos têm destacado a importância da sinalização pela FAK nos mecanismos de mecanotransdução em miócitos cardíacos. Em essência, a FAK mantém níveis basais de atividade e em resposta ao estresse mecânico ela rapidamente se ativa através da autofosforilação do resíduo tirosina 397 (Fonseca et al., 2005; Torsoni et al., 2003) e contribui para as alterações estruturais e funcionais instaladas durante o processo de hipertrofia cardíaca (Clemente et al., 2007; DiMichele et al., 2006). Assim, uma compreensão detalhada dos mecanismos responsáveis pela manutenção dos níveis basais de atividade desta quinase e também dos mecanismos responsáveis por sua ativação após estímulos mecânicos podem ser úteis para se obter um melhor entendimento dos mecanismos moleculares de mecanotransdução em miócitos cardíacos.

Através de ensaios de precipitação do tipo *Pull-Down* utilizando-se uma construção da porção C-terminal da miosina sarcomérica em fusão com uma cauda de GST e extratos celulares provenientes de ventrículo esquerdo de corações de ratos, foi previamente demonstrada a existência da interação entre FAK e a porção C-terminal da miosina sarcomérica (Fonseca et al., 2005). No entanto, não foi demonstrado se ocorre interação direta entre estas proteínas, não foi detalhada a topologia e também a importância fisiológica desta interação.

No presente trabalho foi demonstrado que FAK interage diretamente com a porção C-terminal da miosina sarcomérica *in vitro*, que em miócitos cardíacos, não submetidos ao estiramento, aproximadamente 40% da FAK está associada à miosina sarcomérica e que

uma fenda localizada entre os subdomínios do domínio FERM da FAK constitui o sítio de interação com a miosina. Além disso, foi demonstrado que o silenciamento da miosina sarcomérica por RNA de interferência resulta em um aumento na ativação da FAK em miócitos cardíacos. Por outro lado, o estresse mecânico leva a uma diminuição da interação FAK/miosina em paralelo ao aumento da ativação da FAK. Estes dados sugerem que a interação com a miosina é determinante na manutenção dos níveis basais de atividade da FAK e que alterações estruturais decorrentes do estresse mecânico liberam a interação FAK/miosina possibilitando a abertura do domínio FERM em relação ao quinásico permitindo, assim, a autofosforilação da FAK.

4.2 Bases estruturais da regulação da FAK pela interação de seu domínio FERM com a porção C-terminal da miosina sarcomérica

Estudos estruturais e funcionais têm demonstrado que o domínio FERM da FAK interage de forma auto-inibitória com o domínio quinásico, impedindo o acesso ao sítio catalítico, a fosforilação da alça de ativação e prevenindo a auto-fosforilação no resíduo tirosina 397 da FAK (Cohen and Guan, 2005b; Lietha et al., 2007). Esta interação auto-inibitória que o domínio FERM exerce sobre o domínio quinásico indica a importância deste domínio e de seus ligantes na ativação ou manutenção da quiescência basal da FAK.

No presente estudo, utilizando-se uma série de ensaios bioquímicos, foi demonstrada a existência de uma interação física entre o domínio FERM da FAK e porção C-terminal da miosina sarcomérica. As bases estruturais desta interação foram investigadas através de uma combinação de abordagens que possibilitaram a descrição da superfície de

interação entre FERM e a porção C-terminal da miosina. A técnica de *cross linking* acoplada à espectrometria de massas permitiu a obtenção das condições de contato deste complexo e possibilitou a elaboração de modelos de interação que foram validados pelos dados do espalhamento de raios-X a baixos ângulos do complexo FERM/miosina em solução. Nestes modelos, FERM interage com a miosina através de uma fenda formada entre os subdomínios (F1, F2 e F3) do domínio FERM (Fig. 46). Notavelmente, existem diferenças substanciais nas regiões correspondentes dos domínios FERMs de outras proteínas como a ezrina, radaxina e a moesina (*ERM proteins*), o que indica que esta região pode estar envolvida na interação com proteínas que regulem especificamente a função da FAK. Cecarelli e colaboradores (Ceccarelli et al., 2006) demonstraram que existem diferenças marcantes na região entre os subdomínios F2 e F3 do domínio FERM da FAK em relação aos demais domínios FERMs que possuem estrutura resolvida. Inclusive a região básica de ligação aos fosfoinosítois fosfatos presentes nos domínios FERMs das proteínas ERMs não está presente no domínio FERM da FAK (Ceccarelli et al., 2006), apesar de ser descrito que estes fosfolípidos são capazes de ativar a FAK através da ligação desses ao domínio FERM da FAK (Cai et al., 2008). Também no estudo de Cecarelli e colaboradores, foi observado que a região entre os subdomínios F2 e F3 do domínio FERM da FAK é mais eletronegativa que os demais domínios FERMs, outra diferença que pode ser importante na regulação específica da FAK. Interessante que esta região mais eletronegativa é a região correspondente ao peptídeo FP-1, que além de se ligar a miosina sarcomérica, foi eficiente para deslocar a interação entre FAK e miosina, confirmando que esta região participa do sítio de interação da FAK com a miosina. Apesar de demonstrações prévias da interação do domínio FERM da FAK com outras proteínas

(Chen et al., 2001; Pouillet et al., 2001; Schaller et al., 1995), esta é a primeira demonstração de uma interação física entre um domínio FERM e uma proteína da superfamília das miosinas.

Além das demonstrações bioquímicas de que o domínio FERM da FAK é responsável por sua ligação a porção C-terminal da miosina e da descrição da superfície de interação entre FERM/miosina, os experimentos realizados com FAK expressa em sistema de baculovírus permitiram o estudo da influência desta interação na autofosforilação da FAK *in vitro*. Foi constatado que após a autofosforilação da FAK, pela adição de ATP, ocorre uma diminuição de sua ligação à miosina e que a inibição da ativação da FAK, pela adição de PD153035, restaura a interação FAK/miosina a níveis semelhantes aos observados na ausência de ATP. Estes dados indicam que alterações conformacionais decorrentes da ativação da FAK podem levar a uma redução da sua capacidade de ligação à miosina. Além disso, foi observado que a FAK apresenta uma redução em sua capacidade de ativação *in vitro* após interagir com a porção C-terminal da miosina. Este dado implica que a interação com a miosina pode impedir a ativação da FAK, talvez por estabilizar sua conformação auto-inibitória e, além disso, que outros fatores como ligantes ou alterações conformacionais sejam necessários para desestabilizar o complexo FAK/miosina e possibilitar a ativação da FAK. Assim, os dados bioquímicos e funcionais apresentados indicam que a interação FAK/miosina apresenta caráter regulatório sobre a atividade de quinase da FAK *in vitro*.

4.3 Interação FERM/miosina regula a quiescência basal da FAK em miócitos cardíacos

Estudos em corações de ratos e em miócitos em cultura têm apontado a FAK como importante alvo nos processos de mecanotransdução e hipertrofia celular (Clemente et al., 2007; Marin et al., 2008). Assim, o entendimento dos processos celulares envolvidos na manutenção da quiescência basal desta proteína é relevante e foi um dos alvos deste estudo.

Ensaio de *Pull-Down* realizados no presente estudo demonstraram a existência de interação basal entre o domínio FERM da FAK e a miosina sarcomérica de extratos de MVRNs. Esta interação foi confirmada em ensaios de ligação e *far western blotting* realizados com miosina purificada de ventrículo esquerdo de ratos neonatos. Também foi demonstrado que estas proteínas estão co-localizadas em MVRNs através de experimentos de imunomicroscopia confocal. Através da técnica de *decoration*, na qual foram utilizados miócitos ventriculares de ratos adultos permeabilizados com saponina e o domínio FERM marcado com FITC, foi demonstrado que o domínio FERM é suficiente e capaz de se co-localizar com a miosina presente nos sarcômeros de ratos adultos. Como o domínio FERM é importante para a localização de proteínas em sítios subcelulares específicos (Lietha et al., 2007) e FAK se localiza na banda A de sarcômeros de miócitos de ratos não submetidos à coarctação da aorta (Fonseca et al., 2005) ou estiramento celular, como demonstrado pelo presente estudo, a interação FAK/miosina pode ser crítica para a localização da FAK na banda A dos sarcômeros em miócitos cardíacos.

Além disso, a significância de um domínio FERM interagir com a miosina sarcomérica consiste no fato de que este domínio é importante para a manutenção da quiescência basal da FAK (Cohen and Guan, 2005b; Cooper et al., 2003; Dunty et al., 2004; Toutant et al., 2002). Dados obtidos pela resolução da estrutura cristalográfica do domínio FERM e quinásico (PDB: 2J0J) demonstraram que na conformação inativa, FERM interage com o domínio quinásico através de uma ligação do subdomínio F2 do domínio FERM com o lobo C do domínio quinásico (Cai et al., 2008; Dunty et al., 2004; Lietha et al., 2007; Papusheva et al., 2009). Esta estrutura cristalográfica juntamente com os dados de SAXS e *cross linking* acoplado a espectrometria de massas forneceram as bases para a elaboração de um modelo de interação entre FERM-kinase e a miosina sarcomérica. Nesse modelo FERM interage com a miosina através de uma fenda localizada entre os subdomínios do domínio FERM e não faz contatos diretos com as interações auto-inibitórias entre os domínios FERM e quinásico (Fig. 52). No entanto, a localização estratégica do sítio de interação entre FERM e miosina pode estabilizar os contatos entre os domínios FERM e quinásico e contribuir para a manutenção da conformação auto-inibitória da FAK. Além disso, a porção C-terminal da miosina sarcomérica pode interagir com a porção N-terminal do linker entre o subdomínio F3 e o domínio quinásico. Esta região contém um sítio de reconhecimento para domínios SH3 (PxxP), que juntamente com a tirosina 397 fosforilada, formam os sítios de interação para a proteína Src. Src se liga a estes sítios através de seus domínios SH2 e SH3 e promove a trans-fosforilação de outros resíduos da FAK, como as tirosinas 576 e 577 relacionadas à sua ativação total (Calalb et al., 1995; Lietha et al., 2007). Sendo assim, a proximidade deste sítio de reconhecimento

SH3 com a miosina pode ajudar na prevenção da interação da FAK com a Src, contribuindo para a manutenção do estado auto-inibitório da FAK.

Para confirmar a importância da interação FERM/miosina na manutenção da quiescência basal da FAK, utilizou-se a estratégia do desenho racional de peptídeos. Esta é uma técnica relativamente nova que permite, através de análises de bioinformática, a identificação de possíveis sítios de interação entre ligantes. Esta estratégia se baseia na conservação de sítios de interação entre ligantes em comum, ou seja, se duas proteínas A e B interagem com a mesma região de uma proteína C, sequências semelhantes entre A e B podem conter o sítio de interação com a proteína C. No presente estudo foi detectada uma região de homologia entre um ligante clássico da porção C-terminal da miosina sarcomérica de cadeia pesada, a MyBPC (*Myosin binding protein C*), e o domínio FERM da FAK. Dentro desta sequência foi selecionado o peptídeo FP-1, uma sequência peptídica bem exposta na superfície da FAK, conservada na escala evolutiva e específica do domínio FERM da FAK.

FP-1 constitui-se de uma sequência de aminoácidos predominantemente ácidos, localizados na fenda de interação entre FERM e miosina. Estudos de ligação *in vitro* demonstraram que a miosina de extratos ventriculares de ratos adultos é capaz de se ligar ao peptídeo FP-1 acoplado à coluna HiTrap NHS, e não ao peptídeo controle, confirmando que FP-1 faz parte do sítio de interação com a miosina sarcomérica. Além disso, foi demonstrado que FP-1 regula negativamente o *Pull-Down* da FAK com GST-miosina e que o tratamento de miócitos cardíacos com FP-1, acoplado ao translocador de membranas biológicas TAT₄₇₋₅₇, culmina com a diminuição da interação FAK/miosina. A redução

dessa interação com a concomitante ativação da FAK é um forte indício de que miosina regula negativamente a ativação da FAK em miócitos cardíacos.

Para confirmar os dados que sugeriam a importância da interação com a miosina na regulação e manutenção da atividade basal da FAK, efetuou-se o silenciamento gênico da miosina sarcomérica pela técnica de interferência por siRNA. Apesar do silenciamento da miosina, uma proteína estrutural, as células apresentaram-se viáveis, mas com redução das estriações dadas pela organização dos sarcômeros (Fig. 24B e 24C). O silenciamento de aproximadamente 60% da miosina sarcomérica foi acompanhado por um aumento dos níveis de fosforilação da FAK em torno de 2 vezes, confirmando a importância da interação com a miosina para a manutenção dos níveis basais de ativação da FAK em miócitos cardíacos.

Assim como a miosina, outros reguladores da ativação da FAK vêm sendo descritos. Por exemplo, a interação com FIP200, que é mediada pelos domínios FERM e quinásico, regula a atividade da FAK de forma negativa tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Abbi et al., 2002). Outros estudos realizados por Marin e colaboradores (Marin et al., 2008), demonstraram que a quiescência basal da FAK também é influenciada pela atividade da tirosino-fosfatase Shp2 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*). Os dados desses estudos indicam que a regulação da atividade da FAK possa depender de um controle local de sinalização e que mais de um sistema possa atuar na regulação da atividade desta quinase. No presente trabalho foi demonstrado que aproximadamente 40% da FAK total interage com a miosina, assim esta interação deve ser importante na regulação desse *pool* específico de FAK. Outros reguladores, como a FIP200 e a Shp2, podem atuar

no controle da ativação da FAK em outros sítios subcelulares ou ainda em tipos celulares específicos.

Os dados obtidos pela interferência na interação FAK/miosina pelo peptídeo FP-1 juntamente com os dados do silenciamento da miosina confirmaram a hipótese de que a miosina sarcomérica funciona como um regulador negativo da ativação da FAK, sendo este um dos mecanismos responsáveis pela quiescência basal da FAK em miócitos cardíacos não submetidos ao estresse mecânico.

4.4 Interação FAK/miosina é sensível ao estresse mecânico

Em miócitos cardíacos, FAK apresenta baixa ativação em condições basais e após o estresse mecânico ou tratamento com agonistas farmacológicos, ela se ativa e passa a exercer seus efeitos celulares (Taylor et al., 2000; Torsoni et al., 2003). Experimentos realizados no presente estudo demonstraram que após o estiramento cíclico de miócitos cardíacos ocorre uma rápida (a partir de 10 min) e sustentada (até 60 min) ativação da FAK com uma concomitante diminuição de sua interação com a miosina sarcomérica. Como a dissociação do domínio FERM do domínio catalítico é necessária para a ativação da FAK, a qual interage com a miosina preferencialmente em sua forma inativa, sugere-se que mudanças conformacionais decorrentes do estresse mecânico possam dissociar FERM da sua interação com a miosina, o que possibilitaria a abertura do domínio FERM em relação ao quinásico e consequentemente a ativação da FAK.

Interessante que, de forma distinta da ativação pelo estresse mecânico, a ativação da FAK em miócitos cardíacos por tratamento com o agonista farmacológico fenilefrina,

conhecido por ativar a FAK e desencadear a hipertrofia cardíaca (Menashi and Loftus, 2009; Taylor et al., 2000), não foi acompanhada por uma redução na quantidade de FAK no imunoprecipitado obtido com o anticorpo anti-miosina. Este efeito pode estar relacionado à ativação de um *pool* de FAK não localizado com a miosina na banda A dos sarcômeros. Foi estimado que aproximadamente 40% da FAK de miócitos cardíacos está co-localizada com miosina, portanto é possível que a associação com a miosina mantenha este *pool* de FAK insensível à ativação por fenilefrina. Isso explicaria a falta de redução da interação FAK/miosina, apesar do notável aumento na ativação da FAK pelo tratamento com fenilefrina. Esta observação está consistente com estudos que demonstraram que fatores solúveis podem ser incapazes de ativar a FAK associada à miofilamentos em miócitos cardíacos (Heidkamp et al., 2002; Torsoni et al., 2003).

O fato do estiramento celular regular a ativação da FAK e sua interação com a miosina enquanto que a ativação da FAK por agonista farmacológico não resulta em efeitos diretos nesta interação, indica que a interação FAK/miosina é sensível primariamente às alterações decorrentes do próprio estresse mecânico. Portanto, o complexo FAK/miosina, constituído por uma quinase e uma proteína estrutural, pode funcionar como um sensor da atividade biomecânica em miócitos cardíacos. Além disso, a porção C-terminal da miosina pode ser um inibidor da atividade quinásica da FAK em miócitos cardíacos não submetidos ao estresse mecânico, contribuindo para a manutenção da conformação auto-inibitória da FAK e atuando no controle de suas funções celulares.

4.5 FAK e a interação FAK/miosina no crescimento celular em miócitos cardíacos

O estiramento celular tem sido utilizado para o estudo de vias de sinalização ativadas pela mecanotransdução e suas atuações no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Dentre estas vias, estudos têm destacado o papel da FAK no desenvolvimento do fenótipo hipertrófico (Marin et al., 2008; Taylor et al., 2000; Torsoni et al., 2003). Após o estiramento celular, FAK se autofosforila no resíduo tirosina 397 onde se cria um sítio de reconhecimento SH2 para a proteína Src, o que possibilita a formação do complexo FAK/Src que passa então a exercer seus efeitos pró-hipertróficos (Marin et al., 2008; Torsoni et al., 2003; Torsoni et al., 2005). De fato, o presente estudo demonstrou que o estresse mecânico leva a ativação da FAK em paralelo a sua dissociação com a miosina sarcomérica (Fig. 21 e Fig. 22), indicando que o estiramento celular regula negativamente a interação FAK/miosina e permite a autofosforilação e a sinalização pela FAK em miócitos cardíacos.

Apesar do ser bem conhecido os efeitos do estiramento celular na ativação da FAK e no processo de desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Domingos et al., 2002; Marin et al., 2008; Nadruz et al., 2005; Torsoni et al., 2003), o estresse mecânico leva a ativação de vários sistemas de segundo mensageiros, o que dificulta o estudo específico do papel da FAK no desenvolvimento da hipertrofia celular.

Para o estudo da significância da FAK e de sua interação com a miosina no processo de hipertrofia de MVRNs, duas abordagens foram realizadas no presente estudo: a

superexpressão da FAK e a interferência na interação FAK/miosina, através do tratamento com o peptídeo FP-1.

A superexpressão da FAK (~5 vezes), acompanhada por um aumento relativo de 2 vezes na sua fosforilação, culminou com o desenvolvimento de um quadro de hipertrofia celular, averiguada pelo aumento na área superficial dos miócitos cardíacos após 48 horas de transfecção. Estes dados vão de acordo com dados da literatura que apontam para a importância desta quinase no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. (Clemente et al., 2007; DiMichele et al., 2006; Marin et al., 2008; Nadruz et al., 2005; Taylor et al., 2000).

Clemente e colaboradores demonstraram que o silenciamento da FAK previne a hipertrofia em ratos submetidos à coarctação da aorta e, além disso, que o silenciamento da FAK foi suficiente para reverter o quadro hipertrófico (Clemente et al., 2007). Estudos realizados por Marin e colaboradores também demonstraram a importância do aumento da fosforilação e ativação da FAK para o desenvolvimento da hipertrofia de miócitos cardíacos em cultura (Marin et al., 2008). Nesse estudo foi demonstrado que o silenciamento da tirosina-fosfatase Shp2, que atua defosforilando e inativando a FAK, seguido pelo estiramento celular levou ao desenvolvimento de hipertrofia de MVRNs. Estes dados vão de acordo com os dados do presente estudo, no entanto, estudos de superexpressão da FAK, realizados por Eble e colaboradores em 2000, não demonstraram aumento detectável no tamanho celular após superexpressão da FAK (~30 vezes) (Eble et al., 2000). O motivo dos resultados divergentes ainda não está totalmente claro, no entanto, uma superexpressão de 30 vezes se distancia muito do sistema fisiológico e, além disso, Eble e colaboradores realizaram a superexpressão da FAK por apenas 24 horas. No

presente estudo e em estudos anteriores (Nadrusz et al., 2005) os efeitos da superexpressão se deram após 48 horas de transfecção.

O presente estudo também demonstrou bioquimicamente, através do aumento nos níveis de expressão de ANP, que a superexpressão da FAK é suficiente para regular a re-expressão de genes fetais. Estes dados confirmam estudos anteriores os quais demonstraram que a ativação da FAK tem papel crítico na regulação da re-expressão de genes do programa fetal induzida por estímulo mecânico, como os genes do ANP e da isoforma beta da miosina de cadeia pesada (Eble et al., 2000; Pham et al., 2000; Taylor et al., 2000; Torsoni et al., 2003). Existe ampla constatação experimental (Hoshijima and Chien, 2002) de que a re-expressão do programa gênico fetal é parte essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos.

Além da demonstração da importância da FAK no desenvolvimento da hipertrofia em miócitos cardíacos, o presente estudo demonstrou que a interferência na interação FAK/miosina, através do tratamento com o peptídeo FP-1, é essencial para o controle da atividade da FAK e, conseqüentemente, das suas funções celulares.

O tratamento de miócitos cardíacos com peptídeo FP-1, ligado ao transportador de membranas biológicas TAT₄₇₋₅₇, levou a uma diminuição da interação entre FAK/miosina e concomitante ativação da FAK. Miócitos cardíacos submetidos a tratamento prolongado com FP-1 desenvolveram o fenótipo de hipertrofia. A confirmação da importância da sinalização pela FAK nos mecanismos de desenvolvimento da hipertrofia foi demonstrada

através do concomitante tratamento com o peptídeo FP-1 e transfecção com o siRNA para a FAK. O silenciamento da FAK impediu o desenvolvimento da hipertrofia celular nas células tratadas com FP-1. Este fato confirma a necessidade da ativação da FAK pelo tratamento com FP-1 para o desenvolvimento do fenótipo hipertrófico. Apesar de ser bem estabelecido o fato de FAK participar no desenvolvimento do processo hipertrófico, as demonstrações de que a ativação desta quinase é essencial e suficiente para o estabelecimento das modificações fenotípicas dos miócitos cardíacos ainda não haviam sido reportadas.

Além da ativação da FAK, o tratamento com FP-1 foi acompanhado por uma redistribuição subcelular da FAK para o núcleo dos miócitos cardíacos. Em miócitos cardíacos em condições basais, FAK é encontrada predominantemente no citoplasma, nas regiões de banda A e após sua ativação ela migra para regiões subcelulares como os discos Z, costâmeros e núcleo celular (Fonseca et al., 2005; Senyo et al., 2007; Yi et al., 2006). Estudos que utilizaram proteínas em fusão com GFP demonstraram que a translocação da FAK para o núcleo é mediada pelo domínio FERM (Golubovskaya et al., 2005; Lim et al., 2008) e que esta translocação é também observada em outras proteínas que contêm FERM (Kressel et al., 2002; Batchelor et al., 2004). Sequências de aminoácidos envolvidas na translocação nuclear (Lim et al., 2008) estão localizadas no subdomínio F2, próximas a fenda onde se localiza FP-1 (Fig. 27), ou seja, sítio onde a miosina sarcomérica se liga. Fato também importante para a translocação nuclear e aumento da ativação da FAK é a modificação do subdomínio F2 através da sumoilação (Kadare et al., 2003; Martin et al., 2008). FAK é sumoilada no resíduo lisina 152, sítio também próximo à sequência correspondente ao peptídeo FP-1, e sua sumoilação é acompanhada por um aumento nos

seus níveis de ativação e na taxa de translocação nuclear (Kadare et al., 2003; Martin et al., 2008). A proximidade dos sítios relacionados à translocação nuclear e sumoilação do sítio de interação com a miosina sugere que a ligação à miosina, além de ajudar na manutenção da FAK em seu estado inativo, contribui para a prevenção dos eventos de sumoilação e de importação nuclear da FAK em miócitos cardíacos. Esta regulação pode ocorrer através do bloqueio físico destes sítios, entretanto estudos adicionais precisam ser realizados para confirmar estas hipóteses.

As demonstrações do presente estudo implicam que a quiescência basal da FAK provida por sua interação com a miosina sarcomérica regula negativamente vias envolvidas no controle do tamanho celular. É bem provável que o peptídeo FP-1 atue competindo com a FAK pelo seu sítio de ligação na miosina sarcomérica e permitindo, desta forma, a autofosforilação e ativação da FAK.

4.6 Ativação da FAK regula a via AKT/ mTOR

Além da função de tirosino-quinase, FAK apresenta sítios de ligação para domínios protéicos SH2 e SH3 funcionando também como uma proteína de adaptação importante para a ativação e regulação de MAP quinases, tirosino-quinases e da PI3 kinase (Parsons, 2003). Após ativação endógena da FAK, ocorre um aumento de sua associação com a subunidade regulatória p85 da PI3 quinase, a qual leva a ativação da AKT (Del Re et al., 2008). Essa é uma serina/treonina quinase que ativa vias anti-apoptóticas e atua no controle do crescimento celular. Tanto a superexpressão da PI3 kinase quanto a de uma forma ativa da AKT levam ao aumento da fosforilação dos efetores da mTOR, S6 kinase e 4EBP-1. A

regulação da mTOR pela PI3 kinase/AKT ocorre primariamente através da fosforilação de TSC2, que culmina com o aumento da atividade da mTOR (Lee et al., 2007). Outros estudos também demonstraram que FAK interage e inativa TSC2, o que leva ao aumento da fosforilação da S6 kinase (Gan et al., 2006).

Recentemente foi demonstrado que a sinalização pela FAK, via regulação da tirosino fosfatase Shp2, apresenta convergência com a via de crescimento celular AKT/mTOR no processo de desenvolvimento da hipertrofia em MVRNs (Marin et al., 2008). Em consonância com estes estudos, o presente estudo investigou se a hipertrofia ocasionada pelo tratamento com FP-1 e consequente ativação da FAK, culminava com a ativação desta via de crescimento celular. Foi demonstrado que miócitos cardíacos tratados com FP-1 apresentaram além de um aumento substancial na ativação da FAK, um aumento na fosforilação no resíduo serina 473 da serina/treonina quinase AKT, um aumento na fosforilação inibitória no resíduo treonina 1462 da TSC2 e da fosforilação do resíduo treonina 389 da S6 kinase. Estes dados sugerem que a ativação da FAK mediada pelo tratamento com FP-1 leva a ativação da AKT, possivelmente via associação com a PI3 kinase, e posterior ativação da via TSC-2/mTOR/S6K. Além disso, FAK ativa pode estar interagindo diretamente com TSC2, levando a sua inibição e consequente ativação da S6 kinase.

A importância da via mTOR no desenvolvimento da hipertrofia decorrente do tratamento com FP-1 foi confirmada pelo tratamento com o inibidor da mTOR, rapamicina. O pré-tratamento com rapamicina impediu o aumento na fosforilação de S6K e aboliu a hipertrofia celular induzida pelo tratamento com o peptídeo FP-1. Estes dados

demonstraram que a ativação da FAK possui papel fundamental na ativação das vias da AKT e mTOR e, conseqüentemente, nos mecanismos de hipertrofia em miócitos cardíacos.

5. Conclusão

A tirosino quinase de adesão focal (FAK) interage diretamente com a porção C-terminal da miosina sarcomérica através de seu domínio FERM. A interação FAK/miosina é sensível ao estresse mecânico e mostrou-se importante na regulação da quiescência basal da FAK e do crescimento hipertrófico em miócitos cardíacos. Assim, a modulação dessa interação pode ser um mecanismo importante para a transdução de forças mecânicas em eventos bioquímicos nesse tipo celular.

6. Referências

- Abbi, S., Ueda, H., Zheng, C., Cooper, L.A., Zhao, J., Christopher, R., and Guan, J.L. (2002). Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol Biol Cell* 13, 3178-3191.
- Arold, S.T., Hoellerer, M.K., and Noble, M.E. (2002). The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure* 10, 319-327.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82, 291-329.
- BurrIDGE, K., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 463-518.
- Cai, X., Lietha, D., Ceccarelli, D.F., Karginov, A.V., Rajfur, Z., Jacobson, K., Hahn, K.M., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2008). Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol Cell Biol* 28, 201-214.
- Calalb, M.B., Polte, T.R., and Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15, 954-963.
- Calalb, M.B., Zhang, X., Polte, T.R., and Hanks, S.K. (1996). Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 662-668.
- Cary, L.A., Chang, J.F., and Guan, J.L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci* 109 (Pt 7), 1787-1794.
- Ceccarelli, D.F., Song, H.K., Poy, F., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2006). Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 281, 252-259.
- Chen, H.C., Appeddu, P.A., Isoda, H., and Guan, J.L. (1996). Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 271, 26329-26334.
- Chen, R., Kim, O., Li, M., Xiong, X., Guan, J.L., Kung, H.J., Chen, H., Shimizu, Y., and Qiu, Y. (2001). Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain. *Nat Cell Biol* 3, 439-444.
- Clark, K., Langeslag, M., Figdor, C.G., and van Leeuwen, F.N. (2007). Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol* 17, 178-186.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., and Gregorio, C.C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 637-706.

- Clemente, C.F., Corat, M.A., Saad, S.T., and Franchini, K.G. (2005). Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R862-870.
- Clemente, C.F., Tornatore, T.F., Theizen, T.H., Deckmann, A.C., Pereira, T.C., Lopes-Cendes, I., Souza, J.R., and Franchini, K.G. (2007). Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res* 101, 1339-1348.
- Cobb, B.S., Schaller, M.D., Leu, T.H., and Parsons, J.T. (1994). Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol* 14, 147-155.
- Cohen, L.A., and Guan, J.L. (2005a). Mechanisms of focal adhesion kinase regulation. *Curr Cancer Drug Targets* 5, 629-643.
- Cohen, L.A., and Guan, J.L. (2005b). Residues within the first subdomain of the FERM-like domain in focal adhesion kinase are important in its regulation. *J Biol Chem* 280, 8197-8207.
- Cooper, G.t. (1987). Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annu Rev Physiol* 49, 501-518.
- Cooper, L.A., Shen, T.L., and Guan, J.L. (2003). Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 23, 8030-8041.
- de Rooij, J., Kerstens, A., Danuser, G., Schwartz, M.A., and Waterman-Storer, C.M. (2005). Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. *J Cell Biol* 171, 153-164.
- Del Re, D.P., Miyamoto, S., and Brown, J.H. (2008). Focal adhesion kinase as a RhoA-activable signaling scaffold mediating Akt activation and cardiomyocyte protection. *J Biol Chem* 283, 35622-35629.
- DiMichele, L.A., Doherty, J.T., Rojas, M., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., Mack, C.P., and Taylor, J.M. (2006). Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ Res* 99, 636-645.
- Domingos, P.P., Fonseca, P.M., Nadruz, W., Jr., and Franchini, K.G. (2002). Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H556-564.
- Dunty, J.M., Gabarra-Niecko, V., King, M.L., Ceccarelli, D.F., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2004). FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Mol Cell Biol* 24, 5353-5368.
- Eble, D.M., Strait, J.B., Govindarajan, G., Lou, J., Byron, K.L., and Samarel, A.M. (2000). Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1695-1707.

- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.
- Epstein, N.D., and Davis, J.S. (2003). Sensing stretch is fundamental. *Cell* 112, 147-150.
- Ervasti, J.M. (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem* 278, 13591-13594.
- Feigin, L.A., Svergun, D.I. (1987). *Structure analysis by small angle X-ray and neutron scattering* (New York, Plenum Press).
- Fonseca, P.M., Inoue, R.Y., Kobarg, C.B., Crosara-Alberto, D.P., Kobarg, J., and Franchini, K.G. (2005). Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ Res* 96, 73-81.
- Frame, M.C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D., and Eck, M.J. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 802-814.
- Franchini, K.G., Torsoni, A.S., Soares, P.H., and Saad, M.J. (2000). 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.
- Frey, M.T., Tsai, I.Y., Russell, T.P., Hanks, S.K., and Wang, Y.L. (2006). Cellular responses to substrate topography: role of myosin II and focal adhesion kinase. *Biophys J* 90, 3774-3782.
- Gan, B., Yoo, Y., and Guan, J.L. (2006). Association of focal adhesion kinase with tuberous sclerosis complex 2 in the regulation of s6 kinase activation and cell growth. *J Biol Chem* 281, 37321-37329.
- Guan, J.L., and Shalloway, D. (1992). Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 358, 690-692.
- Guinier, A., Fournet, G. (1955). *Small angle scattering of X-rays* (New York, John Wiley and Sons, Inc.).
- Gupton, S.L., and Waterman-Storer, C.M. (2006). Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell* 125, 1361-1374.
- Hauck, C.R., Sieg, D.J., Hsia, D.A., Loftus, J.C., Gaarde, W.A., Monia, B.P., and Schlaepfer, D.D. (2001). Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res* 61, 7079-7090.

- Hayashi, I., Vuori, K., and Liddington, R.C. (2002). The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol* 9, 101-106.
- Hongo, K., White, E., Le Guennec, J.Y., and Orchard, C.H. (1996). Changes in $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ and Ca^{2+} current in isolated rat ventricular myocytes following an increase in cell length. *J Physiol* 491 (Pt 3), 609-619.
- Hoshijima, M. (2006). Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1313-1325.
- Hoshijima, M., and Chien, K.R. (2002). Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* 109, 849-855.
- Hostetter, D., Rice, S., Dean, S., Altman, D., McMahon, P.M., Sutton, S., Tripathy, A., and Spudich, J.A. (2004). Dictyostelium myosin bipolar thick filament formation: importance of charge and specific domains of the myosin rod. *PLoS Biol* 2, e356.
- Huxley, A.F., and Simmons, R.M. (1971). Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233, 533-538.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Hynes, R.O., Lively, J.C., McCarty, J.H., Taverna, D., Francis, S.E., Hodivala-Dilke, K., and Xiao, Q. (2002). The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 143-153.
- Iglesias, A.H., Santos, L.F., and Gozzo, F.C. Identification of cross-linked peptides by high-resolution precursor ion scan. *Anal Chem* 82, 909-916.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.
- Ingber, D.E. (2005). Mechanical control of tissue growth: function follows form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11571-11572.
- Ingber, D.E., Dike, L., Hansen, L., Karp, S., Liley, H., Maniotis, A., McNamee, H., Mooney, D., Plopper, G., Sims, J., *et al.* (1994). Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int Rev Cytol* 150, 173-224.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1988). Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 339-343.
- Janmey, P.A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78, 763-781.

- Kadare, G., Toutant, M., Formstecher, E., Corvol, J.C., Carnaud, M., Bouterin, M.C., and Girault, J.A. (2003). PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J Biol Chem* 278, 47434-47440.
- Kariya, K., Karns, L.R., and Simpson, P.C. (1991). Expression of a constitutively activated mutant of the beta-isozyme of protein kinase C in cardiac myocytes stimulates the promoter of the beta-myosin heavy chain isogene. *J Biol Chem* 266, 10023-10026.
- Katsumi, A., Orr, A.W., Tzima, E., and Schwartz, M.A. (2004). Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* 279, 12001-12004.
- Kobarg, C.B., Kobarg, J., Crosara-Alberto, D.P., Theizen, T.H., and Franchini, K.G. (2005). MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57. *FEBS Lett* 579, 2615-2622.
- Koch, M.H., Vachette, P., and Svergun, D.I. (2003). Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* 36, 147-227.
- Komuro, I., Katoh, Y., Kaida, T., Shibasaki, Y., Kurabayashi, M., Hoh, E., Takaku, F., and Yazaki, Y. (1991). Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J Biol Chem* 266, 1265-1268.
- Komuro, I., Kurabayashi, M., Takaku, F., and Yazaki, Y. (1988). Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. *Circ Res* 62, 1075-1079.
- Krendel, M., and Mooseker, M.S. (2005). Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 20, 239-251.
- Kudoh, S., Akazawa, H., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Nagai, T., and Komuro, I. (2003). Stretch-modulation of second messengers: effects on cardiomyocyte ion transport. *Prog Biophys Mol Biol* 82, 57-66.
- Kuppuswamy, D. (2002). Importance of integrin signaling in myocyte growth and survival. *Circ Res* 90, 1240-1242.
- Lammerding, J., Kamm, R.D., and Lee, R.T. (2004). Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1015, 53-70.
- Lapidos, K.A., Kakkar, R., and McNally, E.M. (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94, 1023-1031.
- Lee, C.H., Inoki, K., and Guan, K.L. (2007). mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 443-467.

- Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B., and Castelli, W.P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322, 1561-1566.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F., Li, Y., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 129, 1177-1187.
- Lim, S.T., Chen, X.L., Lim, Y., Hanson, D.A., Vo, T.T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S.J., Schlaepfer, D.D., and Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 29, 9-22.
- Lorell, B.H., and Carabello, B.A. (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102, 470-479.
- Mansour, H., de Tombe, P.P., Samarel, A.M., and Russell, B. (2004). Restoration of resting sarcomere length after uniaxial static strain is regulated by protein kinase Cepsilon and focal adhesion kinase. *Circ Res* 94, 642-649.
- Marin, T.M., Clemente, C.F., Santos, A.M., Picardi, P.K., Pascoal, V.D., Lopes-Cendes, I., Saad, M.J., and Franchini, K.G. (2008). Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res* 103, 813-824.
- Martin, N., Schwamborn, K., Urlaub, H., Gan, B., Guan, J.L., and Dejean, A. (2008). Spatial interplay between PIASy and FIP200 in the regulation of signal transduction and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 28, 2771-2781.
- Menashi, E.B., and Loftus, J.C. (2009). Differential effects of Pyk2 and FAK on the hypertrophic response of cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* 337, 243-255.
- Mercadier, J.J., Samuel, J.L., Michel, J.B., Zongazo, M.A., de la Bastie, D., Lompre, A.M., Wisnewsky, C., Rappaport, L., Levy, B., and Schwartz, K. (1989). Atrial natriuretic factor gene expression in rat ventricle during experimental hypertension. *Am J Physiol* 257, H979-987.
- Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4, E83-90.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., and Olson, E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
- Mulvagh, S.L., Michael, L.H., Perryman, M.B., Roberts, R., and Schneider, M.D. (1987). A hemodynamic load in vivo induces cardiac expression of the cellular oncogene, c-myc. *Biochem Biophys Res Commun* 147, 627-636.

- Nadruz, W., Jr., Corat, M.A., Marin, T.M., Guimaraes Pereira, G.A., and Franchini, K.G. (2005). Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. *Cardiovasc Res* 68, 87-97.
- Owens, L.V., Xu, L., Craven, R.J., Dent, G.A., Weiner, T.M., Kornberg, L., Liu, E.T., and Cance, W.G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res* 55, 2752-2755.
- Papusheva, E., Mello de Queiroz, F., Dalous, J., Han, Y., Esposito, A., Jares-Erijmanxa, E.A., Jovin, T.M., and Bunt, G. (2009). Dynamic conformational changes in the FERM domain of FAK are involved in focal-adhesion behavior during cell spreading and motility. *J Cell Sci* 122, 656-666.
- Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409-1416.
- Pasapera, A.M., Schneider, I.C., Rericha, E., Schlaepfer, D.D., and Waterman, C.M. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J Cell Biol* 188, 877-890.
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., *et al.* (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254.
- Peng, X., Kraus, M.S., Wei, H., Shen, T.L., Pariaut, R., Alcaraz, A., Ji, G., Cheng, L., Yang, Q., Kotlikoff, M.I., *et al.* (2006). Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 116, 217-227.
- Pfeffer, M.A., and Braunwald, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81, 1161-1172.
- Pham, C.G., Harpf, A.E., Keller, R.S., Vu, H.T., Shai, S.Y., Loftus, J.C., and Ross, R.S. (2000). Striated muscle-specific beta(1D)-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2916-2926.
- Pouillet, P., Gautreau, A., Kadare, G., Girault, J.A., Louvard, D., and Arpin, M. (2001). Ezrin interacts with focal adhesion kinase and induces its activation independently of cell-matrix adhesion. *J Biol Chem* 276, 37686-37691.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Rosen, L.B., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1995). Calcium regulation of gene expression. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30, 225-253.
- Ross, R.S. (2004). Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res* 63, 381-390.

- Ruknudin, A., Sachs, F., and Bustamante, J.O. (1993). Stretch-activated ion channels in tissue-cultured chick heart. *Am J Physiol* 264, H960-972.
- Rybakova, I.N., Patel, J.R., and Ervasti, J.M. (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* 150, 1209-1214.
- Sadoshima, J., and Izumo, S. (1993). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J* 12, 1681-1692.
- Sadoshima, J., and Izumo, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59, 551-571.
- Sadoshima, J., Takahashi, T., Jahn, L., and Izumo, S. (1992). Roles 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 U S A* 89, 9905-9909.
- Samarel, A.M. (2005). Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2291-2301.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., and Parsons, J.T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5192-5196.
- Schaller, M.D., Otey, C.A., Hildebrand, J.D., and Parsons, J.T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 130, 1181-1187.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372, 786-791.
- Schwartz, K., de la Bastie, D., Bouveret, P., Oliviero, P., Alonso, S., and Buckingham, M. (1986). Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res* 59, 551-555.
- Scopacasa, B.S., Teixeira, V.P., and Franchini, K.G. (2003). Colchicine attenuates left ventricular hypertrophy but preserves cardiac function of aortic-constricted rats. *J Appl Physiol* 94, 1627-1633.
- Seko, Y., Takahashi, N., Tobe, K., Kadowaki, T., and Yazaki, Y. (1999). 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.

- Shai, S.Y., Harpf, A.E., Babbitt, C.J., Jordan, M.C., Fishbein, M.C., Chen, J., Omura, M., Leil, T.A., Becker, K.D., Jiang, M., *et al.* (2002). Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res* 90, 458-464.
- Sheetz, M.P., and Dai, J. (1996). Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends Cell Biol* 6, 85-89.
- Shubeita, H.E., Martinson, E.A., Van Bilsen, M., Chien, K.R., and Brown, J.H. (1992). Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1305-1309.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., and Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2, 249-256.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., and Schlaepfer, D.D. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 112 (Pt 16), 2677-2691.
- Sonoda, Y., Matsumoto, Y., Funakoshi, M., Yamamoto, D., Hanks, S.K., and Kasahara, T. (2000). Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem* 275, 16309-16315.
- Steinmetz, M.O., Stoffler, D., Hoenger, A., Bremer, A., and Aepli, U. (1997). Actin: from cell biology to atomic detail. *J Struct Biol* 119, 295-320.
- Straub, V., Bittner, R.E., Leger, J.J., and Voit, T. (1992). Direct visualization of the dystrophin network on skeletal muscle fiber membrane. *J Cell Biol* 119, 1183-1191.
- Sussman, M.A., McCulloch, A., and Borg, T.K. (2002). Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91, 888-898.
- Sutton, J.M., Ellis, S.G., Roubin, G.S., Pinkerton, C.A., King, S.B., 3rd, Raizner, A.E., Holmes, D.R., Kereiakes, D.J., and Topol, E.J. (1994). Major clinical events after coronary stenting. The multicenter registry of acute and elective Gianturco-Roubin stent placement. The Gianturco-Roubin Intracoronary Stent Investigator Group. *Circulation* 89, 1126-1137.
- Svergun, D.I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Crystallogr* 25, 495-503.
- Svergun, D.I., Barberato, C., Koch, M.H.J. (1995). CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecule from Atomic Coordinate. *J Appl Cryst* 28, 768-773.
- Taylor, J.M., Mack, C.P., Nolan, K., Regan, C.P., Owens, G.K., and Parsons, J.T. (2001). Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 21, 1565-1572.

- Taylor, J.M., Rovin, J.D., and Parsons, J.T. (2000). A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275, 19250-19257.
- Torsoni, A.S., Constancio, S.S., Nadruz, W., Jr., Hanks, S.K., and Franchini, K.G. (2003). Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res* 93, 140-147.
- Torsoni, A.S., Marin, T.M., Velloso, L.A., and Franchini, K.G. (2005). RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1488-1496.
- Toutant, M., Costa, A., Studler, J.M., Kadare, G., Carnaud, M., and Girault, J.A. (2002). Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 22, 7731-7743.
- Tovchigrechko, A., and Vakser, I.A. (2006). GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res* 34, W310-314.
- Tyska, M.J., Hayes, E., Giewat, M., Seidman, C.E., Seidman, J.G., and Warshaw, D.M. (2000). Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 86, 737-744.
- Vandeburgh, H., and Kaufman, S. (1979). In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science* 203, 265-268.
- Vasan, R.S., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Evans, J.C., and Levy, D. (1997). Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. *N Engl J Med* 336, 1350-1355.
- Villen, J., and Gygi, S.P. (2008). The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 3, 1630-1638.
- Vogel, V., and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 265-275.
- Wang, H.B., Dembo, M., Hanks, S.K., and Wang, Y. (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11295-11300.
- Wang, N., and Suo, Z. (2005). Long-distance propagation of forces in a cell. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 1133-1138.
- Wozniak, M.A., Desai, R., Solski, P.A., Der, C.J., and Keely, P.J. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol* 163, 583-595.

- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Mizuno, T., Takano, H., Hiroi, Y., Ueki, K., Tobe, K., *et al.* (1995). Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96, 438-446.
- Yamazaki, T., Tobe, K., Hoh, E., Maemura, K., Kaida, T., Komuro, I., Tamemoto, H., Kadowaki, T., Nagai, R., and Yazaki, Y. (1993). Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268, 12069-12076.
- Yohannan, J., Wienands, J., Coggeshall, K.M., and Justement, L.B. (1999). Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent interactions between stimulatory effector proteins and the B cell co-receptor CD22. *J Biol Chem* 274, 18769-18776.
- Zemljic-Harpf, A.E., Ponrartana, S., Avalos, R.T., Jordan, M.C., Roos, K.P., Dalton, N.D., Phan, V.Q., Adamson, E.D., and Ross, R.S. (2004). Heterozygous inactivation of the vinculin gene predisposes to stress-induced cardiomyopathy. *Am J Pathol* 165, 1033-1044.

