

MICHELLE BUENO DE MOURA PEREIRA ANTUNES

**Interação com α B-Cristalina Protege a FAK da
Degradação e Promove a Sobrevivência de Miócitos
Cardíacos durante Estresse Mecânico**

*Interaction with α B-Crystalline Protects FAK
Degradation and Promotes Survival of Cardiac
Myocytes in Mechanical Stress*

CAMPINAS - SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MICHELLE BUENO DE MOURA PEREIRA ANTUNES

**Interação com α B-Cristalina Protege a FAK da Degradação e
Promove a Sobrevivência de Miócitos Cardíacos durante
Estresse Mecânico**

*Interaction with α B-Crystalline Protects FAK Degradation and
Promotes Survival of Cardiac Myocytes in Mechanical Stress*

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Doctorate thesis presented to the Medical Sciences Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the State University of Campinas - UNICAMP to obtain the Ph.D. grade in Sciences.

ORIENTADOR: Dr. Kleber Gomes Franchini

TUTOR: Titular Professor Kleber Gomes Franchini

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO E ORIENTADA PELO PROFESSOR DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

Assinatura do Orientador

CAMPINAS – SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

An89i	Antunes, Michelle Bueno de Moura Pereira, 1980 - Interação com αB-cristalina protege a FAK da degradação e promove a sobrevivência de miócitos cardíacos durante estresse mecânico / Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012. Orientador : Kleber Gomes Franchini. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Quinase de adesão focal. 2. Chaperonas moleculares. 3. Interações proteína-proteína. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Interaction with α B-crystalline protects FAK degradation and promotes survival of cardiac myocytes in mechanical stress.

Palavras-chave em inglês:

Focal Adhesion kinase
Molecular chaperones
Protein-protein interaction

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Kleber Gomes Franchini [Orientador]
Ricardo Aparicio
Fernando de Queiroz Cunha
Ischia Teresinha Lopes Cendes
Sandra Martha Gomes Dias

Data da defesa: 04-05-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Iscia Teresinha Lopes Cendes	
Professor (a) Doutor (a) Ricardo Aparicio	
Professor (a) Doutor (a) Sandra Martha Gomes Dias	
Professor (a) Doutor (a) Fernando de Queiroz Cunha	
Professor (a) Doutor (a) Kleber Gomes Franchini	

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

Data: 04/05/2012

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao professor Kleber pela oportunidade, confiança e principalmente pelo exemplo de dedicação e amor à ciência;

Aos professores e pesquisadores Ana Zeri, Maurício Sforça, Fábio Gozzo, Paulo Oliveira, Carolina Clemente, Júlio César, Carlos Ramos, Hernandes F. Carvalho, Carlos Lenz Cesar pela ajuda no desenvolvimento deste estudo;

À querida amiga Dra. Aline Mara dos Santos pelo apoio inestimável durante todo o doutorado;

Aos colegas que contribuíram diretamente para a elaboração deste estudo, Alisson Campos Cardoso, Alana Figueiredo, João Eustáquio Antunes, Sílvio Consonni;

Aos grandes amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular e Laboratório Nacional de Biociências pela convivência sempre agradável, pela amizade e pelo aprendizado adquirido com cada um;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABiC) e a técnica Mariana Ozello Baratti por auxiliar e disponibilizar o microscópio confocal;

À FAPESP pelo apoio financeiro;

Ao meu querido esposo e colega de doutorado João Eustáquio Antunes pelo apoio incondicional, paciência e amor. Aos meus pais, Nilson de Moura Pereira e Sirene Bueno de Moura Pereira, meus exemplos de vida, e às minhas irmãs, Caroline e Priscila, por tornarem o caminho percorrido mais suave e alegre;

A Deus por sempre guiar minha vida.

"Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação"

(John Dewey)

	PÁG
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
 1. INTRODUÇÃO.....	 -29-
1.1. Hipertrofia Cardíaca - Aspectos fisiopatológicos e moleculares.....	-31-
1.2. Mecanotransdução em miócitos cardíacos.....	-33-
1.3. Quinase de Adesão Focal.....	-36-
1.4. Regulação da FAK.....	-39-
1.5. <i>Heat Shock Proteins</i>	-43-
1.6. <i>small Heat Shock Proteins</i>	-44-
1.7. Hipótese.....	-51-
1.8. Objetivos.....	-51-
 2. MATERIAL E MÉTODOS.....	 -53-
Materiais.....	-55-
Métodos.....	-56-
2.1. Cultura de Células – Miócitos Ventriculares de Ratos Neonatos (MVRNs).....	-56-
2.2. Estiramento Pulsátil Contínuo em MVRNs.....	-57-
2.3. Extrato Protéico de Células.....	-58-
2.4. <i>Western Blotting</i>	-58-
2.5. Imunoprecipitação.....	-59-
2.6. Desenho dos siRNAs.....	-60-
2.7. Síntese de siRNA ^{αB-Cristalina} e siRNA ^{GFP} <i>in vitro</i>	-60-
2.8. Transfecção de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura.....	-62-
2.9. Ensaio de co-transfecção.....	-63-

2.10. Tratamento farmacológico dos miócitos cardíacos em cultura.....	-63-
2.11. Cultura de células – C2C12.....	-63-
2.12. Transfecção das células C2C12.....	-64-
2.13. Microscopia de Imunofluorescência.....	-64-
2.14. Análise da área superficial dos miócitos cardíacos.....	-65-
2.15. Preparação de Miócitos Ventriculares de Ratos Adultos para Microscopia Eletrônica e <i>Immunogold</i>	-65-
2.16. Viabilidade Celular e Detecção de Apoptose.....	-67-
2.17. Proteínas Recombinantes.....	-68-
2.18. Expressão e purificação do domínio Quinase da Src.....	-70-
2.19. <i>Pull-Down</i>	-72-
2.20. Ensaio de Fosforilação da região C-terminal da FAK <i>in vitro</i>	-72-
2.21. <i>Cross-linking</i> acoplado à espectrometria de massas.....	-73-
2.22. Análise por espectrometria de massas.....	-75-
2.23. Mutagênese Sítio-Dirigida.....	-76-
2.24. Anisotropia de Fluorescência.....	-78-
2.25. Expressão do domínio His-FAT em Meio Mínimo (M9).....	-80-
2.26. Ressonância Magnética Nuclear.....	-80-
2.27. <i>Docking</i> molecular.....	-81-
2.28. Ensaio de Clivagem <i>in vitro</i> pela Calpaína.....	-82-
2.29. Análise estatística.....	-82-
3. RESULTADOS.....	-83-
3.1. FAK interage com α B-Cristalina em Miócitos Cardíacos.....	-85-
3.2. O estresse mecânico aumenta a marcação citoplasmática da α B-Cristalina e promove a translocação da FAK.....	-87-
3.3. O estresse mecânico aumenta a co-localização de FAK com α B- Cristalina.....	-89-
3.4. Localização Subcelular de FAK e α B-Cristalina em Miócitos Ventriculares de Ratos Adultos (MVRAs).....	-92-
3.5. α B-Cristalina interage diretamente com FAK.....	-93-

3.6. A região C-terminal da FAK medeia a interação FAK/ α B-Cristalina.....	-94-
3.7. A região C-terminal da FAK possui alta afinidade de ligação pela α B-Cristalina.....	-95-
3.8. Associação entre a região C-terminal da FAK e α B-Cristalina nativa.....	-96-
3.9. Associação entre α B-Cristalina recombinante e FAK nativa.....	-97-
3.10. Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK.....	-98-
3.11. A fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK aumenta a interação entre C-terminal/ α B-Cristalina.....	-101-
3.12. A tirosina 925 é importante para a associação entre α B-Cristalina e FAK em miócitos cardíacos.....	-103-
3.13. A mutação Y925L reduz a associação da FAK com α B-Cristalina em células C2C12.....	-105-
3.14. Ressonância Magnética Nuclear mostra mudança conformacional do domínio FAT fosforilado da FAK.....	-106-
3.15. Análise estrutural da interação entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina.....	-110-
3.16. Determinação dos resíduos importantes na interface entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina.....	-118-
3.17. Avaliação funcional da interação entre FAK e α B-Cristalina em MVRNs.....	-125-
3.18. Padronização do silenciamento da α B-Cristalina.....	-125-
3.18.1. Eficiência de transfecção em células C2C12.....	-125-
3.18.2. Padronização do silenciamento da α B-Cristalina em MVRNs.....	-126-
3.19. α B-Cristalina é importante na manutenção da integridade da FAK em MVRNs.....	-129-
3.20. Silenciamento da α B-Cristalina promove apoptose em MVRNs.....	-130-
3.21. Superexpressão da FAK reverte às alterações fenotípicas promovidas pelo silenciamento gênico da α B-Cristalina em MVRNs.....	-132-
3.22. α B-Cristalina protege a FAK da degradação pela calpaína 2.....	-135-

4. DISCUSSÃO.....	-137-
4.1. FAK, α B-Cristalina e o Estresse mecânico.....	-139-
4.2. Estresse mecânico aumenta a interação entre FAK/ α B-Cristalina.....	-140-
4.3. FAK interage diretamente com α B-Cristalina.....	-142-
4.4. A tirosina 925 e sua fosforilação são importantes para a interação FAK/ α B-Cristalina.....	-143-
4.5. Bases estruturais da interação FAK/ α B-Cristalina.....	-147-
4.6. A interação FAK/ α B-Cristalina é importante para a sobrevivência de miócitos cardíacos durante estresse mecânico.....	-150-
5. CONCLUSÃO.....	-153-
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	-157-
7. ANEXO.....	-179-

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	- Angstrom
ANP	- Peptídeo Natriurético Atrial
ATP	- Adenosina Tri-Fosfato
CryAB	- α B-Cristalina
CT	- Controle
DAPI	- 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole
DMEM	- Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbelcco
DMF	- Dimetilformamida
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>
Fas	- Receptor de Morte Celular
FAT	- <i>Focal Adhesion Targeting</i>
FERM	- 4.1, Ezrina, Radixina e Moesina
FGF-2	- <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FL-FAK	- <i>Full Length FAK</i>
FPLC	- Cromatografia Líquida de Rápida Performance
FNRK	- <i>FAK-related Non-Kinase</i>
GAPDH	- <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
Grb2	- <i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
GST	- Glutathione S-Transferase
Hz	- Hertz
HSP	- <i>Heat Shock Protein</i>
IPTG	- Isopropil-3-D-Tiogalactopiranosídeo
JNK	- Jun N-Terminal Kinase
K	- Kelvin

K92	- Lisina 92
KDa	- KiloDalton
Lipo	- Lipofectamina
m/z	- Massa/carga
MAP	- Proteína Ativada por Mitógeno
MAPKAPK2	- Proteína Quinase 2 Ativada por MAP Quinase
Mdm2	- <i>Mouse Double Minute 2</i>
MOPS	- <i>N-Morpholino Propanesulfonic Acid</i>
mRNA	- RNA mensagerio
MVRAs	- Miócitos Ventriculares de Ratos Adultos
MVRNs	- Miócitos Ventriculares de Ratos Neonatos
NGF	- <i>Nerve Growth Factor</i>
NPR	- Receptor de Peptídeo Natriurético
pb	- Pares de base
PBS	- Tampão Salina Fosfato
PCR	- Reação de Polimerização em Cadeia
PDB	- <i>Protein Bank Data</i>
PI3 quinase	- <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PMSF	- <i>Phenylmethylsulphonyl Fluoride</i>
PP2	- <i>4-Amino-5-(4-Chlorophenyl)-7-(Dimethylethyl)Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine</i>
RIP	- Proteína Ligante a Receptor de Morte Celular
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	- <i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	- Ácido Ribonucléico
Rpm	- Rotação por minuto
Saxs	- Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos
Ser	- Serina
SFB	- Soro Fetal Bovino
SHP2	- <i>Src homology 2-containing Tyrosine Phosphatase</i>
sHSP	- <i>small Heat Shock Protein</i>
siRNA	- <i>small Interference RNA</i>

SRPK1	- Proteína Quinase de Reguladores de <i>Splicing</i>
SRs	- Reguladores de <i>Splicing</i>
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
TNFR1	- Receptor do Fator de Necrose Tumoral
Tyr	- Tirosina
U.A.	- Unidades Arbitrárias
UPLC	- Cromatografia de Líquida de Ultra Performance
VEGF	- <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

LISTA DE FIGURAS

	PÁG
Figura 01- Ilustração esquemática da cardiomiopatia hipertrófica.....	-32-
Figura 02- Representação esquemática de um sarcômero, formado por filamentos espessos de miosina interconectados com filamentos finos de actina ancorados na linha Z.....	-35-
Figura 03- Estrutura da FAK e suas funções.....	-37-
Figura 04- Estrutura auto-inibitória da FAK.....	-40-
Figura 05- Representação esquemática dos domínios da α B-Cristalina.....	-45-
Figura 06- Unidade Hexamérica da α B-Cristalina.....	-47-
Figura 07- Formação multimérica da α B-Cristalina.....	-48-
Figura 08- Sistema de estiramento biaxial Flexercell FX3000.....	-57-
Figura 09- Tipos de produtos formados pela reação do agente de ligação cruzada (XL).....	-74-
Figura 10- Perfil de ativação da α B-Cristalina em miócitos cardíacos durante estresse mecânico.....	-85-
Figura 11- Perfil de ativação da FAK em miócitos cardíacos durante estresse mecânico.....	-86-
Figura 12- Estiramento cíclico aumenta a associação da α B-Cristalina com FAK.....	-87-
Figura 13- Aumento da marcação citosólica da α B-Cristalina após estiramento cíclico.....	-88-
Figura 14- FAK transloca para o núcleo após estiramento cíclico.....	-89-
Figura 15- Estiramento cíclico aumenta a co-localização entre FAK e α B-Cristalina.....	-90-
Figura 16- Perfil da co-localização da FAK e α B-Cristalina.....	-91-
Figura 17- Eletromicrografias de miócitos cardíacos obtidos de ratos adultos controle (A e B) e coarctados 7 dias (C e D).....	-93-
Figura 18- His- α B-Cristalina (His-CryAB) interage diretamente com FL-FAK.....	-94-

Figura 19-	GST-Cterminal precipita α B-Cristalina.....	-95-
Figura 20-	Curva de ligação da região C-terminal da FAK com CryAB.....	-96-
Figura 21-	GST-C-terminal interage com α B-Cristalina de extrato de miócitos cardíacos de ratos neonatos.....	-97-
Figura 22-	α B-Cristalina interage com FAK de extrato de miócitos cardíacos de ratos neonatos.....	-98-
Figura 23-	Padronização da expressão, purificação do domínio quinase da c-Src e fosforilação da região C-terminal da FAK.....	-99-
Figura 24-	Confirmação da fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK.....	-100-
Figura 25-	A fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK aumenta a associação com α B-Cristalina.....	-101-
Figura 26-	Mutação no resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK reduz marcadamente a interação C-terminal da FAK/ α B-Cristalina.....	-102-
Figura 27-	Curva de ligação do complexo C-terminal da FAK selvagem/ α B-Cristalina comparado ao C-terminal da FAK Y925L/ α B-Cristalina.....	-103-
Figura 28-	Tratamento com PP2 reduz associação FAK/ α B-Cristalina em miócitos cardíacos.....	-104-
Figura 29-	Superexpressão de FAK-Flag e FAKY925L-Flag em células C2C12.....	-105-
Figura 30-	Experimento bidimensional ^1H - ^{15}N HSQC.....	-107-
Figura 31-	Experimento tridimensional ^{13}C - ^1H - ^{15}N HSQC.....	-109-
Figura 32-	Representação do domínio FAT da FAK com os resíduos modificados após fosforilação.....	-110-
Figura 33-	Co-purificação do complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina..	-111-
Figura 34-	Ensaio de <i>cross-linking</i> com o reagente DSS.....	-112-
Figura 35-	Fracionamento dos complexos formados após a adição do reagente de <i>cross-linking</i> no complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina.....	-113-

Figura 36-	Identificação dos peptídeos ligados pelo reagente de <i>cross-linking</i>	-114-
Figura 37-	Mecanismo de formação do íon de <i>m/z</i> 222,1.....	-115-
Figura 38-	Identificação das lisinas envolvidas na reação de <i>cross-linking</i> ...	-116-
Figura 39-	Superfície do monômero da α B-Cristalina com destaque para a posição da lisina 103.....	-117-
Figura 40-	Representação esquemática das estruturas do domínio FAT da FAK e do domínio ACD da α B-Cristalina mostrando os resíduos mutados.....	-119-
Figura 41-	Mutagênese sítio-dirigida na interface do complexo C-terminal/ α B-Cristalina.....	-121-
Figura 42-	Superfície das proteínas α B-Cristalina (PDB: 2KLR) e domínio FAT da FAK (PDB: 1K40).....	-122-
Figura 43-	Modelo proposto do complexo C-terminal/ α B-Cristalina obtido por <i>Docking</i> e modelagem molecular, utilizando-se os dados de <i>cross-linking</i> e mutagênese sítio-dirigida.....	-124-
Figura 44-	Imagens de Imunofluorescência de células C2C12, transfectadas com diferentes concentrações de oligonucleotídeo fluorescente (100, 200 e 400ng/ml).....	-126-
Figura 45-	Ensaio de padronização do silenciamento da α B-Cristalina em MVRNs.....	-128-
Figura 46-	MVRNs tratados com siRNA ^{αB-Cristalina} mostraram diminuição da quantidade de FAK detectada em 125KDa em células submetidas ao estiramento cíclico.....	-129-
Figura 47-	Efeitos do tratamento com siCryAB ou siGFP na morfologia de MVRNs controle e submetidos ao estiramento (12 horas).....	-130-
Figura 48-	Efeitos do tratamento com siCryAB ou siGFP na viabilidade celular de MVRNs controle e submetidos ao estiramento.....	-132-
Figura 49-	Superexpressão da FAK reduz efeitos deletérios promovidos pelo silenciamento gênico da α B-Cristalina.....	-134-

Figura 50- α B-Cristalina protege a FAK da degradação pela calpaína 2..... -136-

Diversos tipos celulares respondem ao estresse mecânico ativando sinais que culminam com remodelamento e sobrevivência. O estresse mecânico pode atuar como agente modulador da homeostase celular e de numerosos processos patológicos. Evidências sugerem que a Quinase de Adesão Focal (FAK) medeia a resposta de miócitos cardíacos ao estresse mecânico. Contudo, os mecanismos moleculares que regulam a função da FAK ainda não são totalmente conhecidos. No presente trabalho foi demonstrado que a *small heat shock protein* α B-Cristalina interage de forma direta e protege a FAK da degradação pela calpaína 2. Ensaios de *pull down*, *cross-linking* acoplado a espectrometria de massas, mutagênese sítio dirigida, *docking* e modelagem molecular demonstraram que as α -hélices 1 e 4 do domínio FAT da FAK interage no sítio de ligação constituído pelas folhas β 4 e β 8 da α B-Cristalina. Os dados funcionais e estruturais obtidos indicaram que ocorre um aumento da associação da α B-Cristalina e o domínio FAT da FAK após mudanças conformacionais associadas com a fosforilação dependente de Src da tirosina 925. Experimentos de *pull down* demonstraram que a associação com a α B-Cristalina protege a FAK da proteólise mediada pela calpaína 2. Miócitos cardíacos submetidos ao silenciamento gênico da α B-Cristalina apresentaram uma menor quantidade de FAK detectada em 125 KDa, indicando que esta interação protege FAK da proteólise. A submissão dessas células ao estiramento cíclico revelou uma maior taxa de morte celular por apoptose, sendo que a superexpressão da FAK restaurou a viabilidade celular. Os achados deste trabalho indicam que o complexo formado entre FAK e α B-Cristalina apresenta papel fundamental na proteção da FAK da proteólise durante o estresse mecânico, sendo importante na manutenção da sobrevivência celular.

Palavras chave: Miócitos cardíacos, Mecanotransdução, FAK, α B-Cristalina.

ABSTRACT

Cell types of diverse function respond to mechanical stress by triggering downstream signals for remodelling and survival. As such, mechanical stress impacts organismal homeostasis and numerous pathologic processes. Evidence suggests that focal adhesion kinase (FAK) mediates the responses of myocytes to mechanical stress, yet the molecular mechanisms to regulate FAK function are unclear. We find that FAK is recognized and protected from calpain-induced degradation by the small heat shock protein α -B crystalline (CryAB). A model based in the pull down, crosslinking technology coupled with mass spectrometry, site-directed mutagenesis, molecular docking and molecular modeling indicated that a cleft formed by β 4 and β 8 sheets of α B-Crystalline is critical to the interaction with α -helix 1 and α -helix 4 of FAK. Functional and structural data indicated that CryAB binds directly the FAT domain of FAK upon changes in conformation associated with Src-dependent phosphorylation of tyrosine 925 induced by cell stretch. Pulldown assay indicated that α B-Crystalline interacts and protects from calpain-induced degradation FAK. Cardiomyocytes depleted of CryAB show reduced FAK quantity detected in 125KDa, indicating that this interaction protects degradation of FAK. The submission of such cells to stretch cyclic revealed a higher rate of cell death via apoptosis, whereas restoration of FAK expression restored cell viability. Our findings highlight a new role for CryAB in forming a complex with FAK that is essential for regulating cardiomyocyte survival in response to mechanical stress.

Keywords: Cardiac Myocytes, Mechanotransduction, FAK, α B-Crystalline

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertrofia Cardíaca - Aspectos fisiopatológicos e moleculares

O músculo cardíaco exibe marcante grau de plasticidade fenotípica em resposta ao aumento de sobrecarga. Essa plasticidade é refletida principalmente pelo aumento no tamanho (i.e. hipertrofia) dos miócitos existentes, a qual é regulada por múltiplas vias de sinalização que coordenam o acúmulo de proteínas, união de miofibrilas e organogênese de mitocôndrias e ribossomos. A resposta hipertrófica inicialmente é benéfica, uma vez que aumenta o número de unidades contráteis e restabelece a tensão na parede das câmaras sobrecarregadas (Grossman, W *et al.*, 1975; Sadoshima, J & Izumo, S 1997; Russell, B *et al.*, 2000; Ruwhof, C & van der Laarse, A 2000; Frey, N *et al.*, 2004). Esta adaptação funcional é explicada pela Lei de Laplace que estabelece que a tensão na parede das câmaras cardíacas é determinada pela pressão intra-luminal, tamanho da câmara e pela espessura da parede. Seguindo a relação:

$$T = pr/2h$$

Onde:

T - é a tensão na parede das câmaras cardíacas;

p - é a pressão intracavitária;

r - é o raio interno da câmara;

h - é a espessura da parede das câmaras

Na sobrecarga hemodinâmica, o aumento de pressão resulta em sobrecarga de tensão no coração, e o aumento reativo da espessura da parede normaliza a tensão e preserva a função sistólica (Grossman, W *et al.*, 1975) (Figura 01).

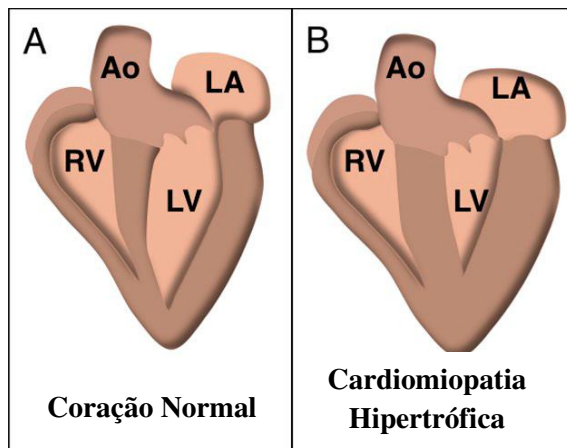


Figura 01. Ilustração esquemática da cardiomiopatia hipertrófica. **(a)** Coração saudável com volume das câmaras e espessura das paredes normais; **(b)** cardiomiopatia hipertrófica. Hipertrofia assimétrica do septo intraventricular e da parede posterior ventricular esquerda. Ao: aorta; LA: átrio esquerdo; LV: ventrículo esquerdo; RV: ventrículo direito. Figura adaptada de Harvey, PA & Leinwand, LA, 2011.

Contudo, a resposta hipertrófica prolongada pode promover alterações estruturais que levam a disfunção da contratilidade e do relaxamento do miocárdio que repercutem clinicamente como insuficiência cardíaca, condição grave, responsável por parte significativa das elevadas morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares.

No nível celular, o aumento do miócito cardíaco é determinado por um conjunto de respostas intracelulares, como: (1) indução de proto-oncogenes (como *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*) e genes de resposta-imediata (como as *Heat Shock Proteins*); (2) mudanças quantitativas e qualitativas na expressão gênica; (3) aumento na razão de síntese protéica (Ruwhof, C & van der Laarse, A 2000); (4) indução de genes normalmente expressos durante a embriogênese como ANP (Fator Natriurético Atrial), β -MHC, α -actina esquelética (Kuwahara, K *et al.*, 2003).

A ativação de vias de sinalização em decorrência do estímulo mecânico representa um evento primário na resposta hipertrófica e na sobrevivência celular (Sussman, MA *et al.*, 2002; Brancaccio, M *et al.*, 2006). O estresse mecânico promove profundas alterações na homeostase da célula, levando ao remodelamento dos miócitos cardíacos. Esse remodelamento combina mudanças no padrão de adesão celular com aumento de cálcio intracelular, que pode ativar o programa de morte celular por apoptose (Pacher, P *et al.*, 2001; Heidkamp, MC *et al.*, 2002). A ativação de vias de sobrevivência celular é importante para minimizar os estímulos pró-apoptóticos e diminuir a degeneração dos miócitos durante o remodelamento cardíaco (Sussman, MA *et al.*, 2002). Diferentes vias de sinalização hipertrófica e de sobrevivência parecem atuar em conjunto como as vias da calcineurina (De Windt, LJ *et al.*, 2000), IGF1 (Li, Q *et al.*, 1997), TNF- α (Kubota, Y *et al.*, 2001), cardiotropina 2 (Pennica, D *et al.*, 1995; Sheng, Z *et al.*, 1996) e MAPK (Foncea, R *et al.*, 2000; Bueno, OF *et al.*, 2000). No entanto, os mecanismos responsáveis pela transdução de forças mecânicas locais em sinalização bioquímica não estão ainda totalmente esclarecidos.

1.2. Mecanotransdução em miócitos cardíacos

A mecanotransdução no miócito cardíaco é um processo particularmente complexo que envolve a deformação de proteínas e a transmissão lateral de forças pelo citoesqueleto, que culmina na ativação de diversas vias de sinalização. A tensão aplicada na membrana celular é suficiente para alterar a atividade enzimática de uma extensa variedade de enzimas (Sheetz, MP & Dai, J 1996). Estas alterações podem ser decorrentes de mudanças conformacionais na estrutura destas proteínas, o que levaria à exposição de sequências

críticas de aminoácidos e possibilitaria a interação com o substrato (Vogel, T & Sheetz, M 2006).

Evidências obtidas em modelos experimentais e em formas específicas de miocardiopatia de origem genética indicam que o citoesqueleto dos miócitos cardíacos possui função importante na transdução de eventos mecânicos em sinais bioquímicos (Sussman, MA *et al.*, 2002; Epstein, ND & Davis, JS 2003). O citoesqueleto dos miócitos cardíacos inclui estruturas sarcoméricas e extra-sarcoméricas (Schaper, J *et al.*, 1991; Clark, KA *et al.*, 2002, Epstein, ND & Davis, JS 2003). Dentre as estruturas sarcoméricas citam-se as 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 os filamentos de actina e miosina (Scopacasa, BS *et al.*, 2003). O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui filamentos de actina e filamentos intermediários que conectam sarcômeros paralelos entre si, com o sarcolema e com membranas de organelas intracelulares. Também inclui os microtúbulos, que estabelecem conexões longitudinais entre as estruturas sub-celulares dos miócitos cardíacos (Scopacasa, BS *et al.*, 2003) (Figura 02).

Durante o estresse mecânico as proteínas do citoesqueleto sofrem tensão e se deformam podendo servir como transdutores de força nos miócitos cardíacos (Sussman, M *et al.*, 2002; Epstein, ND & Davis, JS 2003). Também importante, no contexto da mecanotransdução, é a capacidade do citoesqueleto de ancorar e controlar a atividade de moléculas sinalizadoras que, uma vez ativadas, podem coordenar a expressão gênica e as respostas fenotípicas a estímulos mecânicos (Burrige, K & Chrzanowaska-Wodnicka, M 1996; Janmey, PA 1998).

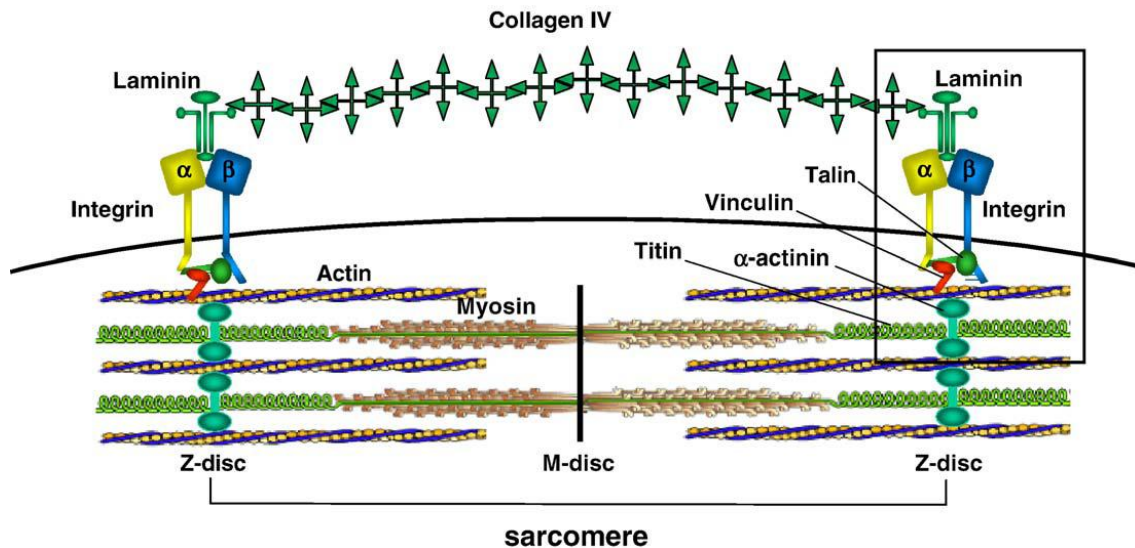


Figura 02. Representação esquemática de um sarcômero, formado por filamentos espessos de miosina interconectados com filamentos finos de actina ancorados na linha Z. Actina e miosina são mantidas longitudinalmente pela titina, que se estende da linha M a linha Z. O sarcômero é ancorado a integrinas via proteínas da linha Z. Todas as moléculas em destaque (caixa preta) formam o costâmero, região que une a maquinaria contrátil a matriz extracelular. Figura adaptada de Brancaccio, M *et al.*, 2006.

Apesar do vasto conhecimento sobre os componentes individuais da sinalização mecânica, ainda pouco se sabe sobre a integração desses componentes. Aparentemente a mecanotransdução envolve proteínas que promovem a ativação de vias de sinalização de sobrevivência, hipertrofia e também remodelamento (Sussman, MA *et al.*, 2002).

Dentre as proteínas que respondem ao estresse mecânico, a quinase de adesão focal (FAK) tem-se destacado com importante papel na regulação do crescimento hipertrófico e na sobrevivência do músculo cardíaco (Wang, HB *et al.*, 2001; Cox, BD *et al.*, 2006; Mitra, SK *et al.*, 2005).

1.3. Quinase de Adesão Focal

A quinase de adesão focal (FAK – *Focal Adhesion Kinase*) é uma proteína tirosina quinase não receptora, com papel essencial durante o desenvolvimento embrionário e na patogênese de doenças humanas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (Golubovskaya, VM *et al.*, 2009a; Vadali, K *et al.*, 2007). FAK é expressa em abundância no miocárdio, sendo rapidamente ativada por sobrecarga pressora e também por agonistas como endotelina e angiotensina II (Eble, DM *et al.*, 2000; Taylor, JM *et al.*, 2000). Esta proteína sinalizadora foi originalmente descrita na década de 90 (Wang, HB *et al.*, 2001) em células em cultura localizada nos sítios de adesão ao substrato, o que despertou o interesse de caracterizá-la como um sinalizador envolvido na mecanotransdução entre o ambiente e as células. Em adição ao seu papel na adesão célula-matriz extracelular, FAK regula muitos outros processos biológicos, como migração, proliferação e sobrevivência celular (Cox, BD *et al.*, 2006; Mitra, SK *et al.*, 2005).

A estrutura primária da proteína é definida por um domínio central catalítico flanqueado pelo domínio N-terminal, conhecido como FERM (band four.1–ezrin–radixin–moesin) e a região C-terminal que compreende duas regiões ricas em prolina e um domínio de direcionamento as adesões focais (*FAT- Focal Adhesion Targeting*). FAT é composto por 4 α -hélices (Arold, ST *et al.*, 2002; Hayashi, I *et al.*, 2002), e 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 (Parsons. JT 2003; Lietha, D *et al.*, 2007) (Figura 03).

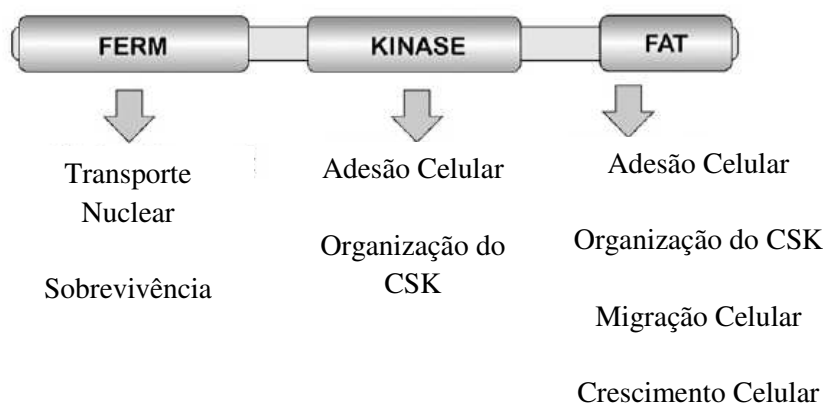


Figura 03. Estrutura da FAK e suas funções. FAK possui 3 domínios que consistem de um domínio quinase central intercalado pela região N-terminal e a região C-terminal. Múltiplas funções celulares mediadas pela sinalização relacionada a regiões específicas e domínios da FAK são indicadas no diagrama abaixo. Figura adaptada de Franchini, KG 2011.

Os três domínios são arranjados como uma estrutura globular tripartida com o domínio FERM organizado em uma compacta conformação em trevo com três subdomínios independentes (F1, F2 e F3). FERM conecta-se ao domínio catalítico por um *linker* desestruturado que contém o resíduo tirosina 397, importante na ativação enzimática. O domínio quinase é conectado ao domínio FAT pela região desnovelada rica em prolina (Lietha, D *et al.*, 2007; Ceccarelli, DF *et al.*, 2006; Nowakowski, J *et al.*, 2002).

A ativação da FAK depende da auto-fosforilação do resíduo de tirosina 397 (Tyr397) no *linker* entre FERM e quinase (Calalb, MB *et al.*, 1995; Polte, TR & Hanks, SK 1997, Franchini, KG *et al.*, 2000, Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003). A Tyr397

fosforilada recruta outra tirosina quinase conhecida como Src, que, uma vez ativada, fosforila os resíduos Tyr576-577 da FAK incrementando sua atividade. A ativação local da FAK também promove recrutamento e agregação (“clusters”) de outras moléculas de FAK, amplificando o sinal do complexo protéico. A Src ativada também promove a fosforilação de resíduos adicionais da FAK como a Tyr 925 no domínio FAT. A fosforilação desse resíduo de tirosina forma um sítio de alta afinidade para proteínas como Grb2, Cas e paxilina. Esta sequência de ativação da FAK, bem como a estreita cooperação entre FAK e Src para a ativação, inicialmente demonstradas em outros tipos celulares, foi confirmada em miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos (Franchini, KG *et al.*, 2000; Domingos, PP 2002; Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003). FAK é prontamente ativada pelo estresse mecânico que culmina com aumento da expressão de ANF e β -MHC, indicando o potencial desta enzima como elemento de controle das alterações fenotípicas dos miócitos cardíacos induzidas por estímulos mecânicos (Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003, Torsoni, AS *et al.*, 2005).

Neste contexto, estudos recentes em camundongos com deleção condicional da FAK no coração demonstraram que animais submetidos à sobrecarga hemodinâmica apresentaram hipertrofia cardíaca ecêntrica, fibrose intersticial multifocal, marcadores de hipertrofia aumentados quando comparados com animais controle, o que confirma a importância desta enzima para as alterações fenotípicas do ventrículo esquerdo em decorrência de estímulos mecânicos (Peng, X *et al.*, 2006).

Além disso, o silenciamento transiente da FAK mostrou prevenir as anormalidades estruturais e funcionais da hipertrofia do ventrículo esquerdo, assim como reverter a

hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica em camundongos (Clemente, CFMZ *et al.*, 2007).

A ativação da FAK também contribui para a sobrevivência celular. FAK fosforilada em Tyr397 pode ligar-se a subunidade p85 da quinase 3-fosfatidilinositol (PI3-quinase), levando a sua ativação (Chen, HC *et al.*, 1996). PI3-quinase ativa medeia a ativação de Akt que inibe a apoptose regulando vários componentes da maquinaria celular (Sonoda, Y *et al.*, 2000). Além disso, FAK promove a sobrevivência celular pela interação e degradação de p53, proteína supressora tumoral (Golubovskaya, VM *et al.*, 2005, 2007) e também por meio de outros mecanismos como interação e inibição da proteína ligante ao receptor de morte celular (RIP) (Kurenova, E *et al.*, 2004).

Apesar da importância funcional da FAK estar bem estabelecida, o preciso controle da atividade da FAK não está totalmente elucidado. Esse controle é complexo e tipicamente envolve a regulação dinâmica do estado inativo para o estado ativo, e também a localização subcelular desta enzima.

1.4. Regulação da FAK

O controle da atividade da FAK é determinado em parte, pela conformação auto-inibitória formada entre o domínio FERM com o domínio catalítico, inibindo a atividade quinase. Esta configuração é estabelecida pela interação do subdomínio F2 de FERM com o lóbulo C do domínio catalítico, bloqueando o acesso do ATP e proteínas ao sítio catalítico. A interação do *linker* que contém o resíduo Tyr 397 com o subdomínio F1 de FERM parece contribuir para o controle da atividade da FAK, mantendo esse resíduo em um estado não-fosforilado (Lietha, D *et al.*, 2007; Cooper, LA *et al.*, 2003; Dunty, JM *et al.*, 2004) (Figura

04). É provável que a ativação da FAK ocorra após a liberação da conformação auto-inibitória entre o domínio FERM e catalítico (Lietha, D *et al.*, 2007; Cooper, LA *et al.*, 2003). Neste sentido, tem sido sugerido a participação de proteínas de ativação na liberação da conformação auto-inibitória entre o domínio catalítico e o domínio FERM (Lietha, D *et al.*, 2007). Embora a natureza dessas proteínas precisem ser melhor identificadas, há evidências que demonstram a participação de integrinas neste processo (Cooper, LA *et al.*, 2003).

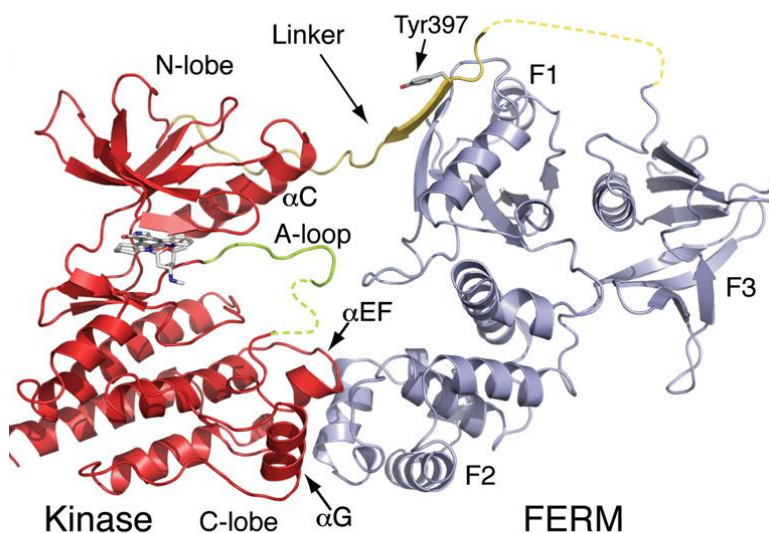


Figura 04. Estrutura auto-inibitória da FAK. O domínio FERM (representado em azul) liga-se ao domínio quinase (vermelho), por meio de uma interação entre o subdomínio F2 de FERM e o lóbulo C da quinase. A região de *linker* que contém o sítio de autofosforilação Tyr397 (amarelo) interage com o subdomínio F1 de FERM e o lóbulo N da quinase. O domínio FERM bloqueia o acesso ao sítio de ativação da quinase – loop A. Figura adaptada de Lietha, D *et al.*, 2007.

Em adição, outras proteínas que interagem com o domínio FERM podem regular a atividade de FAK interferindo diretamente na conformação auto-inibitória, como é o caso de tirosina quinases que medeiam à ativação de FAK por fatores de crescimento (Frame, MC *et al.*, 2010). Recentemente, foi demonstrado que a interação de FERM com a região C-terminal da miosina sarcomérica é crucial para a manutenção da FAK dentro do sarcômero em seu estado inativo (Santos, AM *et al.*, 2011).

Tirosinas fosfatases providenciam um nível adicional na regulação da fosforilação e atividade da FAK. Foi demonstrado que Shp2, uma tirosina fosfatase, exerce função crítica controlando a atividade da FAK em miócitos cardíacos (Marin, TM *et al.*, 2008). O silenciamento transiente da Shp2 ou a inibição de sua atividade resultam em um aumento na ativação da FAK induzida pelo estímulo mecânico, sugerindo a existência de uma regulação negativa da FAK por esta fosfatase (Marin, TM *et al.*, 2008).

FAK também é regulada negativamente pela expressão de FRNK (*FAK-related non-kinase*), uma isoforma truncada de FAK constituída pela região C-terminal (Schaller, MD *et al.*, 1993). A expressão de FNRK está sob o controle de um promotor alternativo dentro de um íntron da FAK (Nolan, K *et al.*, 1999). FNRK previne a localização de FAK nos sítios de adesão, inibindo as respostas celulares desta enzima funcionando como um dominante negativo (Richardson, A & Parsons, T 1996).

Ainda no contexto da regulação da FAK tem sido demonstrada a participação de proteases neste processo. Proteases das famílias da calpaína e caspases estão envolvidas na regulação proteolítica da FAK (Gervais, FG *et al.*, 1998; Chan, KT *et al.*, 2010). As caspases 3 e 6 clivam a FAK, gerando um fragmento semelhante a FNRK, que desempenha importante papel na apoptose, desabilitando a função anti-apoptótica de FAK

(Gervais, FG *et al.*, 1998). Também a clivagem da FAK pela calpaína 2, protease dependente de cálcio, produz um fragmento como FNRK. Em humanos, existem aproximadamente 14 isoformas gênicas de calpaína, as quais são definidas pela presença de um domínio protease. Embora muitas das funções fisiológicas e dos mecanismos de atividade proteolítica das isoformas de calpaína precisem ser melhor elucidados, vários estudos têm demonstrado a importância das calpaínas em diferentes processos celulares, como motilidade e apoptose (Storr, SJ *et al.*, 2011). A inibição da atividade de calpaína regula o *turnover* de adesão focal e migração celular. Estudos com calpaína 2 e um mutante de FAK (V744G) confirmaram o papel regulatório desta protease na clivagem da FAK, sendo importante na adesão focal e apoptose. Calpaína pode clivar outros substratos para promover a motilidade celular, como paxilina, fodrina, exrina, vinculina e α -actinina, o que mostra a importância desta regulação proteolítica na adesão e migração celular. Também é importante para ativar ou inibir vias apoptóticas, sendo o resultado da sua atividade proteolítica dependente do contexto celular (Storr, SJ *et al.*, 2011). Dados recentes mostraram a participação de caspase 8 em um complexo contendo FAK e calpaína 2, sendo importante para migração celular tumoral e metástase (Barbero, S *et al.*, 2009).

Apesar da participação de várias proteínas na manutenção do estado basal da FAK, ainda há uma clara falta de entendimento de proteínas envolvidas na regulação, proteção e manutenção da sua integridade e atividade basal ou após estímulos ativadores. Sob estímulo mecânico, FAK mantém-se ativa por longos períodos e transloca-se para compartimentos sub-celulares, como os costâmeros, os discos Z e o núcleo dos miócitos cardíacos (Fonseca, PM *et al.*, 2005).

Esta translocação pode contribuir para a regulação de vias de sinalização de miócitos cardíacos controladas pela FAK. No entanto, são desconhecidos os mecanismos moleculares envolvidos na proteção desta quinase durante a translocação intracelular. A manutenção da integridade e atividade da FAK é necessária para os efeitos hipertróficos e os eventos celulares de sobrevivência, migração e proliferação controlados por esta enzima. Neste contexto, é plausível a participação de proteínas que associem e protejam a FAK de efetores negativos sob diferentes estímulos. Um grupo particular de proteínas, conhecidas como chaperonas ou *Heat Shock Proteins* têm-se destacado na associação e proteção de distintos alvos em diferentes tipos celulares.

1.5. *Heat Shock Proteins*

A denominação *Heat Shock Proteins* (*HSPs*) ou chaperonas refere-se, primariamente, a proteínas que aumentam sua expressão após estresse térmico (Tissieres, A *et al.*, 1974). Também outros tipos de estresse, incluindo metais pesados, inflamação, estresse oxidativo/isquêmico, dentre outros, culminam com a expressão acentuada dessas proteínas (Hartl, F 1996). A função básica das *HSPs* inclui: (1) o dobramento correto de proteínas; (2) o reparo de proteínas desnaturadas; (3) a promoção da degradação das proteínas após choque térmico (Pelham, HR 1986; Hightower, LE 1991). Além dessa função ampla, tem sido demonstrado a participação de *HSPs* na regulação de fatores de transcrição (receptores nucleares), regulação de quinases e fosfatases durante a sinalização (Pratt, WB & Toft, DO 2003). Em vertebrados, essas proteínas estão envolvidas em vias de sinalização que controlam o balanço entre morte (Wickner, S *et al.*, 1999) ou sobrevivência celular (Mizushima, N *et al.*, 2008). As *HSPs* são classificadas em famílias de acordo com

seu peso molecular. Dentre as *HSPs* tem-se a família das *small Heat Shock Proteins* (*sHSPs*) que possuem peso molecular abaixo de 35 KDa, são independentes de ATP e possuem importantes funções em células eucarióticas (Derham, BK & Harding, JJ 1999).

1.6. *small Heat Shock Proteins*

Todos os organismos possuem uma ou mais *sHSP*, sendo encontradas mais abundantemente em plantas (Waters, ER *et al.*, 1996). Esta família de proteínas apresenta características comuns que incluem: (1) significativa homologia de sequência; (2) similaridade na predição de estrutura protéica; e (3) distribuição intracelular similar (Derham, BK & Harding, JJ 1999). Membros da família das *sHSPs* estão associados com processos relacionados a saúde humana como longevidade, divisão celular, sobrevivência, morte celular, e têm sido utilizados como alvos terapêuticos e biomarcadores para várias doenças (Arrigo, AP *et al.*, 2007).

Dentre as diferentes *sHSPs*, α B-Cristalina (CryAB) têm-se destacado como importante chaperona em diferentes doenças humanas que incluem miopatias cardíacas, neoplasmas malignos e doenças neurodegenerativas como doenças de Alzheimer e Alexander (Vicart, P *et al.*, 1998; Goldstein, LE *et al.*, 2003; Kato, K *et al.*, 2001; Watanabe, G *et al.*, 2009).

α B-Cristalina foi descrita na década de 80 como uma proteína abundante das lentes oculares. Neste tecido encontram-se duas formas de α -Cristalina - α A-Cristalina e α B-Cristalina, que apresentam aproximadamente 57% de homologia. Ambas as proteínas possuem papel crítico na manutenção da transparência lenticular. Contudo, diferentemente

de α A-Cristalina, α B-Cristalina encontra-se presente em tecidos não lenticulares, como nervoso, renal, fibras do músculo esquelético e coração (Horwitz, J 1992).

Estruturalmente, α B-Cristalina possui peso molecular em torno de 22 kDa, sendo composta por três domínios. Um domínio N-terminal de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, que contém 3 resíduos de serina (Ser19, Ser45 e Ser59) fosforilados por diferentes quinases. A via das MAPKAPK2 é responsável pela fosforilação da Serina 59, enquanto a fosforilação da Serina 45 é controlada pela via p42/p44MAP Quinase. A quinase responsável por fosforilar a serina 19 ainda não é conhecida. Apresenta uma região central, altamente conservada, conhecida como domínio α -Cristalina (ACD), responsável pela dimerização da proteína e uma região C-terminal de 25 resíduos de aminoácidos que contém o motivo I-X-I (Isoleucina-X-Isoleucina), altamente conservado nas *sHSPs* (Arrigo, AP *et al.*, 2007) (Figura 05).

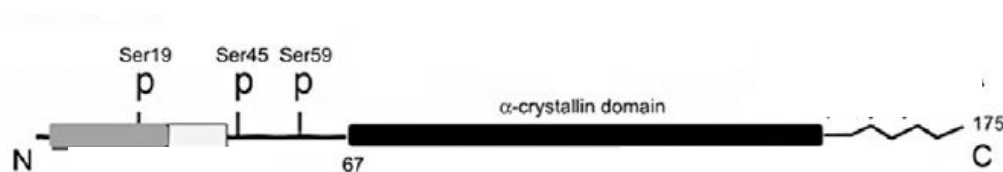


Figura 05. Representação esquemática dos domínios da α B-Cristalina. Figura adaptada de Arrigo, AP *et al.*, 2007.

α B-Cristalina compartilha com as demais *sHSPs* a propriedade de formar arranjos de polímeros multiméricos com pesos moleculares que variam de 300 a 1000 kDa (Horwitz, J 2003). A proteína reúne-se em homo-oligômeros polidispersos com um número variável de subunidades, geralmente 24 a 32 subunidades. Sua natureza polidispersa é

importante para a função chaperona (Haley, DA *et al.*, 1998; Horwitz, J 2003; Horwitz, J *et al.*, 2004; Aquilina, JA *et al.*, 2005; Peschek, J *et al.*, 2009), no entanto esta característica dificulta estudos estruturais de alta-resolução da α B-Cristalina (Aquilina, JA *et al.*, 2003, 2004; Benesch, JLP *et al.*, 2008). Vários trabalhos vêm demonstrando que a dificuldade em se conseguir estudar a estrutura de α B-Cristalina pode ser contornada utilizando construções truncadas da proteína (Bagneris, C *et al.*, 2009). Utilizando esta estratégia, recentemente foi resolvida a estrutura cristalográfica de α B-Cristalina humana truncada (resíduos 68-162). A estrutura revelou um dobramento como “beta sanduíche” semelhante à imunoglobulina formado por 7 folhas beta antiparalelas (β 2- β 9) (PDB: 3L1G) (Laganowsky, A *et al.*, 2010).

Estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) e Microscopia Eletrônica (ME) conseguiram definir a estrutura multimérica de α B-Cristalina, mostrando uma hierarquia de interações para a formação do multímero. De maneira ampla, há existência de uma interface (AP) entre dois monômeros constituída pelas folhas β 6 + β 7, formando um dímero antiparalelo. Cada dímero possui na interface AP uma fenda compartilhada. Três dímeros se conectam pela extensão C-terminal que contém o motivo I-X-I. Esse motivo passa pelo *pocket* formado pelas folhas β 4 e β 8 da monômero adjacente, formando uma unidade hexamérica. O dímero possui uma conformação torcida, que resulta em duas orientações das seis subunidades dentro de uma unidade hexamérica (Figura 06) (Jehle, S *et al.*, 2011).

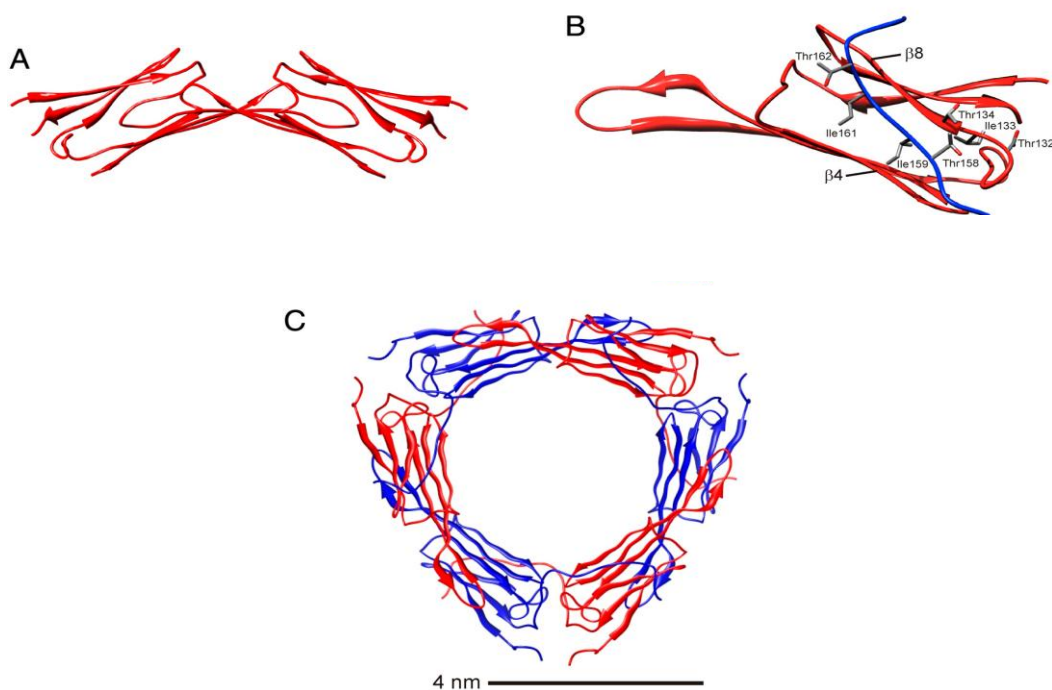


Figura 06. Unidade Hexamérica da α B-Cristalina. (a) Representação esquemática do dímero de α B-Cristalina mostrando sua conformação curva (PDB: 2KLR); (b) interações intermoleculares da região C-terminal (azul) incluindo o motivo I-X-I e sua ligação no *pocket* entre as folhas $\beta 4$ e $\beta 8$; (c) arranjo triangular dos três dímeros. Figura adaptada de Jehle, S *et al.*, 2011.

O *pocket* formado pelas folhas $\beta 4/\beta 8$ apresenta sequências hidrofóbicas que são importantes para a interação com proteínas alvo. Contudo, em condições normais esse *pocket* encontra-se obstruído pelo motivo I-X-I presente na extensão C-terminal. A dissociação do motivo I-X-I do *pocket* ocorre em resposta a ativação de α B-Cristalina (Jehle, S *et al.*, 2010). Provavelmente, ocorre a dissociação das subunidades voltadas para o exterior, mantendo metade das interações inalteradas que sustentam a unidade hexamérica (Jehle, S *et al.*, 2011) (Figura 07 A).

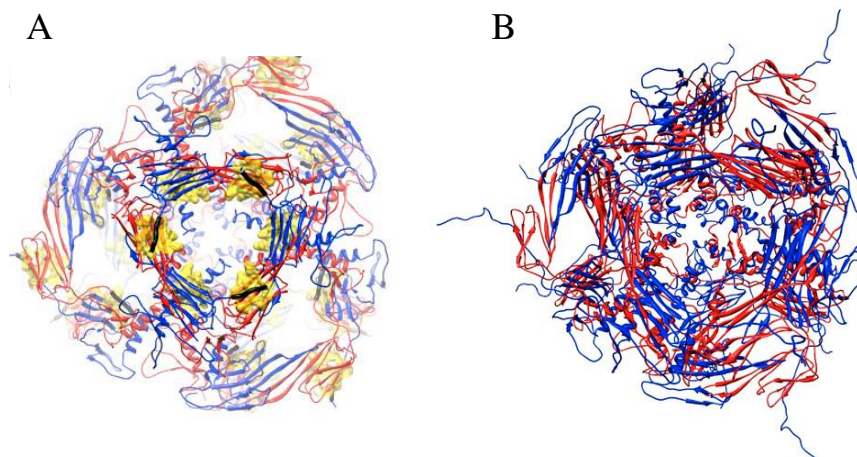


Figura 07. Formação multimérica da α B-Cristalina. **(a)** Prováveis sítios de ligação a proteínas alvo são mostrados em amarelo, obstruídos pelo motivo I-X-I C-terminal (preto); **(b)** representação de α B- Cristalina (*full lenght*) constituída por 24 subunidades monoméricas (residues 1–175). Figura adaptada de Jehle, S *et al.*, 2011.

Interações variadas envolvendo a região N-terminal define a organização multimérica. De maneira simplista, essa organização ocorre com a adição de 4 unidades hexaméricas formando um multímero de 24 subunidades (Jehle, S *et al.*, 2011) (Figura 07 B). A conformação tanto dimérica como multimérica pode ser variável, entre diferentes organismos, e também em distintas condições fisiológicas, o que ressalta a complexidade organizacional desta proteína (Bagneris, C *et al.*, 2009; Clark, AR *et al.*, 2011).

Além da função clássica chaperona, α B-Cristalina interage diretamente com proteínas envolvidas nos processos de morte celular programada impedindo a ativação desse processo. α B-Cristalina possui papel citoprotetor suprimindo a agregação de proteínas desnaturadas, mantendo a integridade e conformação de proteínas sob diferentes estímulos. Esta *sHSP* inibe a apoptose induzida por vários estímulos, interagindo com pró-caspase 3 e inativando sua proteólise em caspase 3. Também inibe a via apoptótica dependente de p53 e se associa com Bax, inibindo sua translocação para a mitocôndria

(Watanabe, G *et al.*, 2009). Este conjunto de dados ressalta a importância de α B-Cristalina na sobrevivência celular.

Além disso, α B-Cristalina interage com diversas proteínas importantes em diferentes vias de sinalização. Há evidências convincentes de que enzimas e moléculas de sinalização podem ser protegidas da inativação pela interação com α B-Cristalina (Derham, BK & Harding, JJ 1999; Hess, JF & Fitzgerald, PG 1998; Marini, I *et al.*, 2000; Santhoshkumar, P & Sharma, KK, 2002). Peptídeos específicos de α B-Cristalina interagem com filamentos de tubulina, actina e proteínas regulatórias, tais como FGF-2, NGF, VEGF, insulina, e β -catenina. Tem-se visto que a demonstração funcional de α B-Cristalina na interação com proteínas regulatórias, não é limitada a condições de estresse, tendo uma importante função na regulação normal do crescimento, desenvolvimento celular e manutenção da integridade e atividade de proteínas (Ghosh, JG *et al.*, 2005 e 2007). Também foi verificado que α B-Cristalina é importante na modulação da atividade de quinases e contribui para a manutenção da dinâmica de proteínas do citoesqueleto (Lavoie, J *et al.*, 1995; Guay, J *et al.*, 1997; Suzuki, A *et al.*, 1998).

Estima-se que o conteúdo de α B-Cristalina nos miócitos cardíacos seja de 3–5% do total de proteínas solúveis, sendo a *sHSP* mais abundante (Parcellier, A *et al.*, 2005). Nestas células, α B-Cristalina encontra-se primariamente associada à porção N2B da titina sarcomérica. Essa associação aumenta a estabilidade mecânica de titina, sendo importante na função normal cardíaca (Krüger, M & Linke, WA 2011). α B-Cristalina também se associa com o citoesqueleto e o aparato contrátil em miócitos cardíacos, modulando a resposta hipertrófica decorrente da sobrecarga hemodinâmica (Golenhofen, N *et al.*, 2002; Kumarapeli, ARK *et al.*, 2008).

Estudos realizados em corações de ratos após episódio de isquemia indicaram que α B-Cristalina transloca-se da fração citosólica para a fração de miofibrilas (Golenhofen, N *et al.*, 1998). Análises por imunohistoquímica demonstraram que a isquemia aumenta a presença de α B-Cristalina no complexo protéico do disco Z, indicando que esta proteína pode ser importante para a proteção da linha Z ou mesmo na sinalização celular em resposta à isquemia miocárdica. Mutações pontuais na α B-Cristalina resultam em deficiência da função de chaperona que leva, como consequência, a uma cardiomiopatia, o que demonstra a importância funcional dessa chaperona no contexto cardíaco (Sanbe, A *et al.*, 2004).

Sabendo-se que FAK responde a estímulos mecânicos mantendo-se ativa e íntegra por longo período, mesmo na presença de reguladores negativos como fosfatases, proteases, é plausível sugerir que a integridade da FAK após o estresse mecânico é dependente da sua interação com uma *sHSP*. Como α B-Cristalina possui papel marcante na manutenção da integridade de proteínas e na viabilidade dos miócitos cardíacos é provável que a α B-Cristalina interage e protege FAK de efetores negativos em miócitos cardíacos durante o estresse mecânico.

1.7. Hipótese

α B-Cristalina interage e protege a FAK da degradação em miócitos cardíacos submetidos a estímulo mecânico e essa interação é importante para a manutenção da sobrevivência celular.

1.8. Objetivos

Este trabalho possui o objetivo de caracterizar a interação entre a quinase de adesão focal e a α B-Cristalina, além de avaliar a importância dessa interação na proteção da FAK da degradação e na manutenção da sobrevivência de miócitos cardíacos durante estresse mecânico.

Objetivos Específicos:

- 1) Caracterizar a interação entre FAK e α B-Cristalina em miócitos cardíacos em resposta ao estresse mecânico;
- 2) Caracterizar estruturalmente a interação FAK/ α B-Cristalina;
- 3) Avaliar a importância funcional da interação FAK/ α B-Cristalina em miócitos cardíacos durante o estresse mecânico;
- 4) Avaliar a importância da associação entre FAK e α B-Cristalina para a sobrevivência de miócitos cardíacos em resposta ao estresse mecânico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Anticorpos: anti-FAK (c-20), anti-pFAK (Ty397), anti-pFAK (Ty925), anti- α B-Cristalina, anti-GAPDH (FL335) policlonais da Santa Cruz Biotechnology, anti-p α B-Cristalina (S59) policlonal da Abcam Inc., anticorpo secundário anti-*rabbit* biotinilado da Amersham, anticorpo secundário anti-*mouse* biotinilado da Amersham.

Reagentes: DMEM e estreptomicina-ampicilina foram adquiridos da Nutricell, soro fetal bovino, soro equino e OPTI-MEM® da Gibco BRL Co. Pancreatina foi adquirida da Sigma, collagenase tipo II da Worthington. Proteína A/G plus foram adquiridas da Santa Cruz Biotechnology (USA). Trizol, Superscript II e Lipofectamina™ 2000 foram adquiridos da Invitrogen, faloidina conjugada à rodamina da Molecular Probes. Ampliscribe™ T7 high yield transcription foi obtido da Epicentre Biotechnologies. O meio de montagem Vectashield contendo DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) foi adquirido da Vector Laboratories. Os moldes de nucleotídeos foram encomendados da IDT (Integrated DNA Technologies).

Animais: Neste trabalho foram utilizados ratos neonatos da linhagem *Wistar* provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP, com 1 a 3 dias de vida.

Métodos

2.1. Cultura de Células – Miócitos Ventriculares de Ratos Neonatos (MVRNs)

Detalhes da técnica de extração e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRNs) foram descritos anteriormente (Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003). Os neonatos tiveram seus corações extraídos do tórax e os ventrículos foram separados dos átrios, reduzidos a pequenos tamanhos com o auxílio de pinça e tesoura estéreis e transferidos para uma placa contendo solução tampão ADS 1X estéril diluído a partir de solução estoque ADS 10x (6,8 g NaCl, 4,76 g Hepes, 0,138 g NaH₄PO₄, 1,0 g D-glucose, 0,4 g KCl, 0,195 g MgSO₄ * 7 H₂O e água MilliQ para um volume final de 100 ml pH 7.35±0,2). O tecido foi então submetido a múltiplas digestões enzimáticas (5 a 6 digestões de 20 minutos cada) à 37 °C usando-se para isso uma mistura de collagenase tipo II (80 Mandl U/ml) e pancreatina (0,6 mg/ml) e tampão ADS 1X. A solução obtida em cada digestão foi transferida para um tubo contendo 1,0 ml de soro fetal bovino (SFB), centrifugada (3000 rpm, 5 minutos, 37° C) e os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 1,0 ml de SFB, colocados em placa de petri 35mm e mantidos em uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, à 37° C, até o final da digestão do restante do tecido. Após digestão completa, a ressuspensão de células pré-incubada nas placas de petri foi retirada com auxílio de pipeta Pasteur, transferida para um tubo e centrifugada (3000 rpm, 5 minutos, 37° C). O *pellet* foi ressuspenso em ADS 1x e os miócitos cardíacos foram purificados em um gradiente descontínuo de Percoll. Após centrifugação (3000 rpm, 40 minutos, 37° C), os miócitos cardíacos isolados foram ressuspensos em meio de plaqueamento contendo DMEM, 10% de soro de cavalo, 5% de soro fetal bovino, bromodeoxiuridina 0,01% e 0,5%

de antibiótico (penicilina/estreptomicina - 100 U/ml). As células foram quantificadas em câmara de Newbauer e plaqueadas em placas com base de silicone recoberta com colágeno tipo I (Bioflex_Flexcell International Corp.). Após 48 horas, o meio foi substituído pelo meio de manutenção contendo DMEM, 0,5% antibiótico (penicilina/estreptomicina - 100 U/ml), bromodeoxiuridina 0,01% e os miócitos foram incubados por 24 horas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂).

2.2. Estiramento Pulsátil Contínuo em MVRNs

MVRNs cultivados em placas Bioflex foram submetidos ao estiramento em aparelho Flexercell FX-3000 em 60 ciclos/min, 10% de alongamento, frequência de 1Hz (0,5-s estiramento/0,5-s relaxamento) por períodos variáveis (Figura 08). MVRNs controle (não estirados) foram também cultivados em placas Bioflex e incubados em meio livre de soro (meio de manutenção). Para os experimentos, as células cultivadas foram extraídas das placas de Bioflex e lisadas para análises por *Imunoblotting* ou fixadas para análises por microscopia de Imunofluorescência ou Confocal.



Figura 08. Sistema de estiramento biaxial Flexercell FX3000.

2.3. Extrato Protéico de Células

Para a extração das proteínas, as células foram rapidamente removidas, homogeneizadas em tampão de extração-RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP40; 0,25% Deoxicolato de Sódio; 5mM Fluoreto de Sódio; 2mM Ortovanadato de Sódio; 100µg/ml PMSF; 0,1 mg/ml aprotinina). Os homogenatos foram sonificados (3 pulsos de 5 segundos, nível 2).

Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry (Lowry, OH *et al.*, 1951).

Após quantificação das proteínas, 400µL de amostra acrescida de 100µL de tampão da amostra 5x (0,0625M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e 0,015g de DTT, foram aquecidos a 95° C por 5 minutos e armazenados em biofreezer -80° C para posterior análise das proteínas por *western blotting*.

2.4. Western Blotting

As amostras das proteínas normalizadas foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

A membrana foi incubada por 45 minutos, a temperatura ambiente, em solução de bloqueio para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos (5% BSA; 25mM Tris-HCl; 125mM NaCl; 0,02% Tween 20, pH8,0) e depois lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada sob agitação à temperatura ambiente em solução TBS-T (25mM Tris-HCl; 125mM NaCl; 0,05% Tween 20, pH8,0).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti- α B-Cristalina (diluição 1:50), anti-p α B-Cristalina (S59) (diluição 1:200), anti-FAKc20 (diluição 1:100), anti-pFAK (397) (diluição 1:200), anti-pFAK (925) (diluição 1:100), anti-GAPDH (diluição 1:100) em solução de anticorpo (3% BSA; 25mM Tris; 125mM NaCl; 0,05% Tween 20 pH8,0) durante 16 horas a 4° C.

Após serem lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada em solução TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 120 minutos a temperatura ambiente, sob agitação a temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram novamente lavadas por 3 vezes de 10 minutos em solução TBS-T. As membranas foram expostas a um agente quimioluminescente, e a reação produziu fluorescência proporcionalmente à quantidade de proteína. As imagens foram adquiridas no Image QuantTM 300 da GE Healthcare.

As bandas das imagens foram quantificadas por densitometria óptica utilizando o *software* Imaje J.

2.5. Imunoprecipitação

Os extratos protéicos (aproximadamente 700 μ g de proteína total) foram incubados com 10 μ l de anticorpo específico. As amostras foram mantidas sob agitação leve durante

16 horas, a 4° C. 50µl de Proteína A-Sepharose 6MB foram adicionadas a cada amostra, mantendo-as sob agitação leve a 4° C, por mais 2 horas. Após centrifugação por 1 minuto a 800 rpm a 4° C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à 3 lavagens com tampão de lavagem para imunoprecipitado (100mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 2mM Ortovanadato de Sódio). Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi adicionado aproximadamente 40 µl de tampão da amostra 1x, e o precipitado foi submetido a eletroforese em gel de acrilamida- SDS-PAGE e o *western blotting* realizado com anticorpos específicos.

2.6. Desenho dos siRNAs

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

2.7. Síntese de siRNA ^{α B-Cristalina} e siRNA^{GFP} *in vitro*

O siRNA específico para o gene da α B-Cristalina foi sintetizado *in vitro* utilizando-se as sequências de DNA correspondentes às regiões de maior probabilidade de silenciamento do gene alvo. 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 α B-Cristalina (CRYAB_NM_009964.2) posiciona-se entre os nucleotídeos 1033 e 1073 representado abaixo (5'GGGGATCTACTTCTTAGGGGCTATAGTGAGTCGTATTACC3') do RNA mensageiro.

Como controle foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma sequência irrelevante (*Green Fluorescent Protein* - GFP), sem homologia com genes de ratos.

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

T7: 5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'

Cryab1033_s: 5'GGGGATCTACTTCTTAGGGGCTTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Cryab1033_as:5'CAGCCCCTAAGAAGTAGATCCTTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

GFP_s: 5' GTGTCTTGTAGTTCCCGTCTTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

GFP_as: 5' ATGACGGGAACCTACAAGACACCTTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Para a quantificação dos siRNAs sintetizados, foi utilizado aproximadamente 1 μ g e 3 μ g de T7, como padrão. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo, em tampão TAE 1X (40mM Tris-Acetato pH 8,5, 2mM EDTA), e visualizados com luz UV. As bandas dos géis foram quantificadas por densitometria óptica por meio do *software Image J* e a concentração dos RNAs foi determinada com base no padrão de bandas do T7.

2.8. Transfecção de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura

Para a transfecção dos siRNAs e do plasmídeo contendo o gene da FAK - Myc-FAK (pRc/CMV FAK-WT), os miócitos cardíacos foram cultivados por 72 horas (2×10^5 células/well) sendo as últimas 24 horas de cultivo na ausência de soros e antibióticos para os ensaios de silenciamento gênico e superexpressão. Após 48 horas, os miócitos cardíacos foram tratados por 24 horas com *RNA interference* (siRNA ^{α B-Cristalina} ou siRNA^{GFP} - 200 ng/ml de DMEM) ou 48 horas com Myc-FAK (28 μ g/placa) complexados com lipofectamina. Como controle da reação, miócitos cardíacos foram tratados somente com o reagente Lipofectamina 2000 (2 μ l/ml de DMEM).

Os complexos siRNA ou pRc/CMV FAK- WT foram preparados adicionando-se a lipofectamina ao OPTI-MEM seguida por uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. Em paralelo, o siRNA (200ng/ml de DMEM) e o plasmídeo (28 μ g DNA/placa) foram incubados com OPTI-MEM por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, para a formação do complexo de transfecção, os siRNAs e o plasmídeo com OPTI-MEM foram incubados com a lipofectamina pré-incubada com OPTI-MEM por 45 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as células foram transfectadas por 24 horas, no caso do silenciamento, ou por 48 horas no caso da superexpressão. Após a transfecção os miócitos cardíacos foram submetidos ou não ao estiramento cíclico e extraídos para posterior análise.

2.9. Ensaio de co-transfecção

Para o ensaio de co-transfecção foi utilizado às instruções do fabricante (Invitrogen - lipofectamina 2000 Referência: Cotransfecting Plasmid DNA and RNAi into Mammalian Cells Using Lipofectamine™ 2000).

2.10. Tratamento farmacológico dos miócitos cardíacos em cultura

Após isolamento, os MVRNs foram plaqueados em placas de cultivo Bioflex recobertas com colágeno tipo I (2×10^5 células/well). No terceiro dia de cultura, as células foram privadas de soros e antibióticos e no quarto dia foram tratadas por 1 hora com 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl) pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine (PP2-10 μ M), inibitor seletivo para a Src. Em seguida, nos devidos casos, procedeu-se os protocolos de estiramento cíclico, extração das células, imunoprecipitação e *western blotting*.

2.11. Cultura de células – C2C12

Foi utilizada a linhagem celular C2C12 (ATCC#CRL-1772) proveniente de músculo esquelético de camundongo C3H. As células C2C12 foram cultivadas em meio de cultura composto por DMEM (Nutricell) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Nutricell), em garrafas de cultura mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37° C.

Ao atingirem 70% de confluência, para não perder a população mioblástica pela confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O *pellet* foi homogenizado em meio de

cultura, as células foram contadas, com o corante de exclusão azul de tripan, em câmara de Newbauer e plaqueadas na densidade de 10^4 células/placa.

2.12. Transfecção das células C2C12

As células C2C12 foram plaqueadas em placas de cultivo Bioflex, na densidade de 10^4 céls/ml. Após 24 horas de plaqueamento, os mioblastos foram transfectados. Para cada *well*, foram incubados diferentes concentrações de oligonucleotídeo fluorescente (BlockIT) (100, 200, 400ng/ml de DMEM). O reagente Lipofectamina 2000 (2 µl/ml de DMEM) foi utilizado como veículo de transfecção. Após 24 horas de tratamento, as células C2C12 foram fixadas em paraformaldeído 4%, para posteriores análises.

Para a transfecção dos plasmídeos contendo o gene para a FAK selvagem (pcDNA/FAK-Flag) e FAK mutada em tirosina 925 (Y925L) (pcDNA/ FAKY925L-Flag) e apenas o plasmídeo fechado (pcDNA/Flag) previamente clonados pelos alunos de doutorado Alisson Campos Cardoso e Isabelle Bezerra Cordeiro foi utilizada a mesma metodologia de transfecção feita em miócitos cardíacos previamente descrita no item 2.8.

2.13. Microscopia de Imunofluorescência

Células em cultura foram lavadas 3 vezes em tampão PBS 1x pH7,4 (137mM NaCl, 27mM KCl, 43mM Na₂HPO₄, 14mM KH₂PO₄). Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (p/v) mais sacarose 4%, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Este material foi submetido à reação de imunofluorescência.

MVRNs ou células C2C12 foram incubadas com solução bloqueadora (0,8% Triton X-100, 3% BSA, diluído em PBS 1x, pH 7,4) por 1 hora à temperatura ambiente. Os

anticorpos primários (anti-FAK - diluição 1:100 e anti- α BCristalina - diluição 1:50) foram incubados em solução de anticorpo (1% BSA diluída em PBS 1x, pH 7,4) durante 16 horas à 4°C. A seguir, foram lavados e foi incubado faloidina conjugada à rodamina e/ou anticorpos secundários *Alexa488-conjugated goat anti-rabbit* e *Alexa568-conjugated goat antimouse* (Invitrogen) por 2 horas à temperatura ambiente em grupos experimentais distintos. As lâminas foram montadas em Vectashield com DAPI e examinadas pelo microscópio confocal LSM710_780 Zen ou microscópio de fluorescência (LEICA A4000).

2.14. Análise da área superficial dos miócitos cardíacos

Para a análise da área de superfície dos miócitos cardíacos, as células em cultura 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 Win Vitória. Cerca de 250 células foram analisadas para cada tratamento. Para avaliar o efeito do estiramento prolongado na morfologia dos miócitos cardíacos, células foram submetidas ao estiramento cíclico contínuo (10%) por 12 horas.

2.15. Preparação de Miócitos Ventrículos de Ratos Adultos para Microscopia Eletrônica e *Immunogold*

Os ventrículos esquerdos dos corações de ratos Wistar com 8 semanas de vida controle e submetidos a coarctação da aorta por 7 dias foram extraídos, fixados em paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4, desidratados em concentrações crescentes de metanol e embebidos em Resina LR White (Fluka) a -20°C. A

polimerização ocorreu em 72 horas com auxílio de luz UV (356nm) a -20°C. Em seguida, regiões com cortes longitudinais dos sarcômeros foram selecionadas e destas, cortes ultrafinos de 70nm foram coletados em grids de níquel com película filme de formvar.

Para a imunocitoquímica foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 em todas as lavagens. As soluções-tampões foram filtradas com filtro Millipore de malha 0,22 µm. Antes de manusear os grids, todas as pinças foram previamente limpas com acetona. No suporte, previamente preparado com os grids foram adicionadas gotas das diferentes soluções (~30µl/grid) com o auxílio de parafilme. Abaixo seguem as etapas do processamento das amostras:

- 1) Lavagem em água ultra-pura (~30µl/grid) durante 10 minutos à temperatura ambiente;
- 2) Pré-incubação com Tris-HCl 0,05M pH 7,4 contendo Glicina 0,05% e BSA 1,0% durante 10 minutos à temperatura ambiente;
- 3) Lavagem (2x) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 4) Bloqueio dos sítios-inespecíficos com tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4, contendo BSA 1% e Tween 20 0,05% durante 30 minutos à temperatura ambiente;
- 5) Incubação com os anticorpos primários anti-FAK *rabbit* (1:100) e anti- α B-Cristalina *mouse* (1:100), previamente diluídos em Tris-HCl 0,05M pH 7,4, BSA 1% *overnight* a 4° C, em câmara úmida;

- 6) Lavagem (3x) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 contendo BSA 0,5% , durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 7) O anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado à partícula de ouro (10nm) e o anticorpo anti-*mouse* biotinilado foram diluídos (1:40 e 1:200, respectivamente) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 BSA1%, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Uma etapa adicional foi necessária para o acoplamento da partícula de ouro (6nm) ao anticorpo secundário anti-*mouse*. Para isso, estreptoavidina (1:40) conjugada à partícula de ouro (6nm) foi adicionada à amostra com anti-*mouse* biotinilado, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente;
- 8) Lavagem (3x) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 contendo BSA 0,5% , durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 9) Lavagem (3x) em água ultra-pura durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 10) Para a contrastação: Foi adicionado Acetato de uranila 1% diluído em álcool etílico 50% durante 2 minutos, seguido de secagem do material por 30 minutos. Foi adicionado citrato de chumbo/Reynolds (1,33 g de nitrato de *chumbo*. 1,76 g de *citrato* de sódio) com água Milli-Q qsp 50ml durante 20 segundos. Após lavagem, o material ficou secando durante 30 minutos antes de ser coberto com carbono.

2.16. Viabilidade Celular e Detecção de Apoptose

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de Exclusão de Azul de Tripan. Este reagente é um corante vital de exclusão de células viáveis com membranas intactas.

Miócitos cardíacos controle e submetidos ao estiramento (grupos tratados com siRNA^{GFP} ou siRNA ^{α B-Cristalina}) foram ressuspensos e quantificados imediatamente após adição do corante Azul de Tripán em câmara de Neubauer. Uma célula foi considerada Azul de Tripán positiva se o citoplasma estivesse difusamente corado. Foram quantificadas 500 células por experimento. A presença de células apoptóticas foi quantificada usando kit comercial TUNEL Assay Kit (Fluorescent-Biocompare), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram apresentados como a porcentagem de células positivas para Azul de Tripán ou TUNEL positivas.

2.17. Proteínas Recombinantes

Os plasmídeos pGEX2T contendo as sequências codificadoras dos domínios FERM, Quinase e C-terminal da FAK em fusão com glutathione S-transferase (GST) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jun-Lin Guan (Department of Molecular Medicine, Cornell University College of Veterinary Medicine). O plasmídeo pET28a contendo a sequência codificadora do domínio Quinase da Src e o plasmídeo pCDFDuet-1:YopH contendo a sequência codificadora para a fosfatase YopH foram gentilmente cedidos pelo Dr. John Kuriyan [Departments of Molecular and Cell Biology (MCB) and Chemistry University of California Berkeley].

As sequências gênicas codificadoras da região C-terminal da FAK inserida no vetor pET15b e do domínio FAT da FAK inserida no vetor pET28a-TEV foram clonadas pelo aluno de doutorado Alisson Campos Cardoso e a sequência gênica codificadora de α B-Cristalina inserida no vetor pET15b foi clonada pelo aluno Wilson Malagó Junior. A

proteína de fusão GST- α B-Cristalina foi clonada no vetor pET28a/GST-TEV com os seguintes primers:

CryAB_S: 5'CGCAGATCTATGGACATCGCCATCCACC 3'

CryAB_AS: 5'CGCAGATCTCTACTTCTTAGGGGCTGCG 3'

As construções da região C-terminal, domínio FAT e FL- α B-Cristalina (*Full-length* α B-Cristalina) foram expressas em *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21DE3 C41 e a construção do domínio quinase da Src foi expressa em BL21(DE3)*slyD*⁻. A indução da expressão dos domínios His-C-terminal da FAK, His-FAT, GST-FERM, GST-Quinase e GST-Cterminal foi efetuada em uma OD₆₀₀ 0.8 com 0,2mM de Isopropil β -D tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 16 horas a 18° C sob agitação 200 rpm. A indução da expressão de His- α B-Cristalina e GST- α B-Cristalina foi efetuada em uma OD₆₀₀ 0.6 com 0,4mM de IPTG a 22° C por 16 horas sob agitação 200rpm. Em seguida, as bactérias foram submetidas à centrifugação (6000 rpm – 12minutos a 4° C), obtendo o *pellet* para a etapa seguinte. Os *pellets* foram lisados em tampão de lise (TrisHCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, Imidazol 20mM, DNase (1U/ μ l), Lizosima (50mg/ml), 10mM Na₃PO₄, 10mM Na₃VO₄, 0,01mg/ml aprotinina, 2mM PMSF, 10% glicerol). Para os ensaios de *cross-linking* e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizado tampão fosfato para lise (NaH₂PO₄ 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, Imidazol 20mM, DNase (1U/ μ l), Lizosima (50mg/ml), 10mM Na₃PO₄, 10mM Na₃VO₄, 0,01mg/ml aprotinina, 2mM PMSF).

Subsequentemente, os lisados foram sonicados com 3 pulsos de 10 segundos com intervalos de 20 segundos entre eles. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a

18000rpm por 40 minutos a 4° C. Os sobrenadantes com as proteínas recombinantes fusionadas a cauda de histidina foram injetados em coluna do tipo His Trap® HP (5ml; GE) e as proteínas ligadas por afinidade foram eluídas com um gradiente de Imidazol (0-100% de 500mM) utilizando a Cromatografia Líquida de Rápida Performance (FPLC). Em seguida, as proteínas foram purificadas por exclusão de tamanho em coluna Superdex 200 16/60 (GE) acoplada ao sistema AKTA-FPLC (Amersham-Biosciences) em tampão TrisHCl 50mM pH 7,4 , NaCl 50mM ou tampão NaH₂PO₄ 50mM pH7,4, 50mM NaCl. Os sobrenadantes com as proteínas recombinantes fusionadas a GST foram purificadas com o uso de pérolas de glutathione sepharose (Amersham). As pérolas foram previamente lavadas 3x com tampão PBS 1x pH 7,4 com 1% de Triton X-100 e 1x em tampão sem Triton X-100. Após incubação por 1 hora com o sobrenadante, as pérolas foram lavadas 3x com PBS 1x pH 7,4 acrescido de inibidores de proteases. As proteínas ligadas foram, quando necessário, eluídas com glutathione reduzida (GE) em PBS 1x pH 7,4.

Para concentração das proteínas foi utilizado o concentrador Centriprep® Millipore, submetido à centrifugação a 1500 g, 4 °C. Para a quantificação das proteínas purificadas foi utilizado o espectrofotômetro DU640 (Beckman Coulter) a 280 nm. Os coeficientes de extinção molar (ϵ) foram calculados utilizando-se o programa ProtParam Tool (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>) (Gill, SC & Von Hippel, PH 1989).

Foi utilizada a equação de Beer-Lambert ($A = \epsilon \times \lambda \times C$), onde A é a absorbância a 280 nm, λ é o comprimento do caminho óptico em cm e C a concentração molar (mol/L). As proteínas recombinantes foram então mantidas a 4° C por um prazo máximo de 15 dias.

2.18. Expressão e purificação do domínio Quinase da Src

A co-expressão e co-purificação do domínio quinase da proteína c-Src e da fosfatase YopH foi realizada em colaboração com a assistente de pesquisa Beatriz Santos Capela Alves. De maneira geral, células BL21(DE3)*slyD*⁻ co-transformadas com os plasmídeos pET28a:c-Src₍₂₅₁₋₅₃₃₎ e pCDFDuet-1:YopH Fosfatase foram utilizadas para expressar a proteína Src. Para a indução, as células BL21(DE3)*slyD*⁻ co-transformadas foram inoculadas em meio TB contendo canamicina e estreptomicina (50 µg/ml). A indução da expressão do domínio quinase da Src foi efetuada em uma OD₆₀₀ 1,2 com 0,2mM IPTG a 18°C por 16 horas sob agitação 200rpm. As células foram coletadas e ressuspensas em tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 25 mM imidazol e 1 mM PMSF), tratadas com lisozima (50 µg/ml) e sonicadas. O extrato foi separado da fração insolúvel por centrifugação a 18000 rpm por 30 min a 4°C. A proteína c-Src foi purificada por cromatografia de afinidade a Ni²⁺ (HisTrap FF crude, GE Healthcare). O extrato protéico foi aplicado a uma coluna de 5 ml usando-se um ÄKTA FPLC (GE Healthcare) em um fluxo de 1 ml/min. A coluna foi lavada com 5 VC (volume de coluna) de tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 25 mM imidazol) e eluído com um gradiente de 0-100% B em 15 VC (tampão B igual a A contendo 500mM imidazol). As frações com maior concentração de c-Src em relação aos contaminantes foram reunidas e foi adicionado 1 mg protease TEV a cada 25 mg c-Src. O volume da reação foi aumentado para 25 ml usando tampão C (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM DTT) e em seguida foi dialisada por 16 horas contra tampão C em membrana de 12-14 KDa. A amostra foi diluída 1:2 com tampão QA (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5% glicerol e 1 mM DTT) e centrifugada a 18000 rpm por 40 min a 4°C. A amostra foi

aplicada em coluna de 1 ml HiTrap Q HP, GE Healthcare), lavada com 10 VC de tampão C e eluída com um gradiente como segue: 0-35% QB em 5 VC, 35-100% QB em 5 VC e 100% B por 5 VC (QB igual a QA contendo 1 M NaCl). As frações que continham maior concentração de c-Src foram reunidas e dialisadas contra tampão D (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5% glicerol e 1 mM DTT). A proteína foi quantificada e congelada em pequenas alíquotas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

2.19. Pull-Down

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as proteínas recombinantes GST-FERM (~76KDa), GST-Quinase (~55KDa), GST-Cterminal (~72KDa) e GST- α B-Cristalina (~45KDa), ligadas a pérolas de glutathione sefarose incubadas com os respectivos alvos. GST (~26KDa) foi utilizado como controle para ligação não-específica. Para o ensaio de *pull-down* com extrato protéico total foi utilizado, aproximadamente, 50 μ g das proteínas purificadas (GST-FERM, GST-Quinase, GST-C-terminal, GST) foram incubadas com aproximadamente 200 μ g de proteínas obtidas do extrato protéico total de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRNs). Para o ensaio de *pull-down* com as proteínas purificadas foi utilizado, aproximadamente, 10 μ g de cada construção purificada. As amostras foram incubadas por 16 horas a 4° C, sob agitação constante. Em seguida, foram submetidas a centrifugação e o precipitado lavado 3 vezes, 3000 rpm por 1 minuto a 4° C com tampão de lavagem (100mM Tris-HCl pH7,4; 1mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio). Por fim, foi adicionado 40 μ l de tampão da amostra 1x ao precipitado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.20. Ensaio de Fosforilação da região C-terminal da FAK *in vitro*

A região C-terminal da FAK purificada a uma concentração 0.3mM foi dialisada em tampão de fosforilação (50mM MOPs pH 7,0, 30mM MgCl₂, 1mM DTT, 10% Glicerol, 6mM EGTA, 10mM Ortovanadato de sódio e 10mM de tartarato de sódio). Após diálise, a região C-terminal da FAK foi incubada por 90 minutos à 30° C com Src (0.003mM) e 1mM ATP acrescido de 10% ATP^{γ32} radioativo. A fosforilação foi confirmada e quantificada usando ensaio radioativo, analisado por espectrometria de massas e *Western Blotting*.

2.21. *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 a aminas primárias presentes principalmente nas cadeias laterais de lisinas ou na porção N-terminal da proteína.

Os agentes de ligação cruzada mais utilizados consistem em compostos contendo dois grupos N-hidroxisuccinimida (NHS) nas extremidades da cadeia, os quais reagem com os grupos aminas de proteínas por meio de uma substituição nucleofílica. Em nossos experimentos foi utilizado o reagente de ligação cruzada DSS (Bisuccinimidil Suberato), 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. Esse reagente pode se ligar, devido a sua flexibilidade, a aminas com distâncias entre ~ 5 a 11,4 Å na estrutura protéica. 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 (Figura 09).

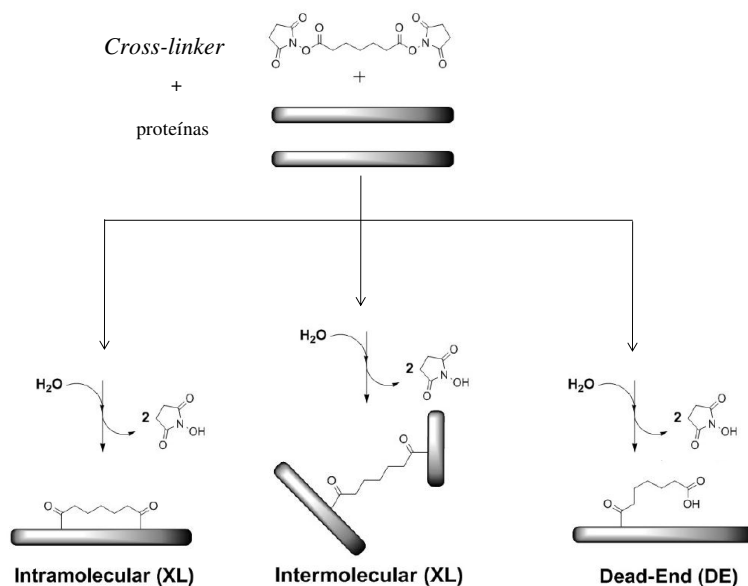


Figura 09. Tipos de produtos formados pela reação do agente de ligação cruzada (XL).
Figura adaptada de Gomes, AF.

Para os nossos ensaios, as proteínas α B-Cristalina e a região C-terminal da FAK fusionadas a cauda de histidina foram purificadas, separadamente, por afinidade em coluna HisTrap® HP (5ml) (GE). Em seguida, o complexo foi co-purificado por cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 200 16/60 (GE) acoplada ao sistema AKTA-FPLC. Nos eluatos obtidos foram adicionados o reagente de *cross-linking* previamente preparado em dimetilformamida (DMF) (10mg/ml) na proporção de 1:100 (proteína/DSS) mantendo-se a concentração de DMF menor que 10% do volume final. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 2 horas, e ao final foi adicionado tampão Tris-HCl (pH 7,6) para consumo do excesso de DSS. A análise da formação de *cross-linking* foi feita por meio de

gel SDS-PAGE. Após confirmação da formação de *cross-linking* nas amostras estudadas, elas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 200 16/60 (GE) acoplada ao sistema AKTA-FPLC, visando minimizar a complexidade dos produtos gerados. Em seguida, foi realizado digestão enzimática utilizando tripsina (Promega), na razão de 1:50 (m/m) tripsina:proteína, durante 24 horas a 37°C. Subsequentemente, essas amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos a 4° C, diluídas e submetidas à análise por Espectrometria de Massas (MS) e MS/MS acoplada a Cromatografia de Líquida de Ultra Performance (UPLC).

2.22. Análise por espectrometria de massas

As análises foram feitas por UPLC-ESI-MS e MS/MS no equipamento Waters Synapt HDMS (Waters Corp., Manchester, UK). Os peptídeos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100 µm x 100 mm) (Waters) em nano Acquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado a uma interface de ESI nanospray em um espectrômetro de massa do tipo Q-ToF Ultima (MicroMass/Waters). Os peptídeos obtidos foram fracionados nas seguintes frações: 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 e 50:50% de H₂O:ACN (Água:Acetonitrila) contendo ácido fórmico a 0,1% durante 20 min sob fluxo de 0,6 µl/min. Tal medida visou reduzir a complexidade da amostra, aumentando a detectabilidade dos peptídeos nas análises subseqüentes por LC-MS/MS.

Na análise dos peptídeos, a aquisição dos espectros de MS/MS foi feita por um experimento do tipo DDA (análise dependente dos dados), onde a cada segundo o equipamento adquire um espectro de massa. No caso da presença de espécies multicarregadas, as 3 mais intensas foram selecionadas e então fragmentadas na câmara de

colisão, contendo gás argônio [energia de colisão definida pela massa/carga (m/z) e carga do precursor]. A interpretação desses espectros foi feita com base na nomenclatura e fragmentação de peptídeos contendo modificações pós-traducionais, cujo comportamento assemelha-se aos peptídeos gerados pela ligação cruzada.

O programa CRUZ foi utilizado para a análise das frações por MS e processamento dos dados (Park, CY *et al.*, 2008). Essa análise revelou que os peptídeos contendo as espécies modificadas pelo agente de ligação cruzada encontravam-se predominantemente na fração 50:50% de H₂O:ACN. A presença desses peptídeos nessa fração pode ser explicada pelo seu tamanho, que é significativamente maior, que os peptídeos típicos digeridos por tripsina. Os peptídeos contendo modificações dos tipos *dead end* e intramolecular foram desconsiderados neste estudo, já que não fornecem informações revelantes para a caracterização do complexo. Já os peptídeos híbridos contendo modificações do tipo intermolecular foram analisados.

2.23. Mutagênese Sítio-Dirigida

Mutações na região C-terminal da FAK e na α B-Cristalina foram feitas usando o Kit de Mutagênese Sítio Dirigida Stratagene QuickChange II XL combinando com primers mutagênicos listados abaixo. Sequências sublinhadas destacam o códon modificado.

CryAB_L89N_S:	5' CTTCTCTCCGGAGGAA <u>AA</u> CAAAGTCAAGGTTCTG3'
CryAB_L89N_AS:	5' CAGAACCTTGACTTTG <u>TTT</u> TCCTCCGGAGAGAAG3'
CryAB_V91N_S:	5' CCGGAGGAACTCAAAA <u>ACA</u> AAGGTTCTGGGGGACG3'
CryAB_V91N_AS:	5' CGTCCCCCAGAACCTT <u>GTT</u> TTTGAGTTCCTCCGG3'
CryAB_V93N_S:	5' GGA ACTCAAAGTCAAGA <u>AAT</u> CTGGGGGACGTGATTG 3'
CryAB_V93N_AS:	5'CAATCACGTCCCCCAG <u>ATT</u> CTTGACTTTGAGTTCC3'

CryAB_L137N_S: 5' CTCACCATCACTTCATCCAAATTTCATCTGATGGAGTCCTC3'
 CryAB_L137N_AS: 5'GAGGACTCCATCAGATGAATTGGATGAAGTGATGGTGAG3'
 CryAB_V91/93N_S: 5' GGAACTCAAAAACAAGAAATCTGGGGGACGTGATTG3'
 CryAB_V91/93N_AS: 5' CAATCACGTCCCCCAGATTCTTGTTTTTGGAGTTCC 3'
 Cterm_Y925L_S: 5'CGGTCCAATGACAAGGTATTGGAAAATGTGACAGGCC3'
 Cterm_Y925L_AS: 5'GGCCTGTCACATTTTCCAATACCTTGTCATTGGACCG3'
 Cterm_V932N_S: 5' GAGAATGTGACAGGCCTAACAAAGGCTGTCATCGAGATG3'
 Cterm_V932N_AS: 5' CATCTCGATGACAGCCTTGTTTAGGCCTGTCACATTCTC3'
 Cterm_I936N_S: 5' CCTAGTGAAGGCTGTCAACGAGATGTCCAGCAAAATC3'
 Cterm_I936N_AS: 5' GATTTTGCTGGACATCTCGTTGACAGCCTTCACTAGG3'
 Cterm_L1021N_S: 5' GTATAAGAAGCAGATGAACACAGCTGCTCACGCCCTG3'
 Cterm_L1021N_AS: 5'CAGGGCGTGAGCAGCTGTGTTCATCTGCTTCTTATAC3'
 Cterm_H1025N_S: 5'GATGCTGACAGCTGCTAACGCCCTGGCTGTGGATG3'
 Cterm_H1025N_AS: 5'CATCCACAGCCAGGGCGTTAGCAGCTGTCAGCATC3'
 Cterm_V1029N_S: 5'GCTCACGCCCTGGCTAACGATGCCAAGAACCTAC3'
 Cterm_V1029N_AS: 5'GTAGGTTCTTGGCATCGTTAGCCAGGGCGTGAGC3'
 Cterm_L1035N_S: 5'GTGGATGCCAAGAACCTAAATGATGTTATTGATCAAGCAAG3'
 Cterm_L1035N_AS: 5'CTTGCTTGATCAATAACATCATTTAGGTTCTTGGCATCCAC3'

O DNA dos plasmídeos pET15b- α B-Cristalina, pET15b-Cterminal, pcDNA/FAK-Flag foram usados como moldes. As mutações foram confirmadas pelo sequenciamento de DNA. Para a expressão e purificação das proteínas recombinantes mutantes C-terminal e α B-Cristalina foi utilizada a mesma metodologia para a expressão e purificação das proteínas recombinantes selvagens previamente descrita no item 2.17.

2.24. Anisotropia de Fluorescência

A anisotropia foi utilizada na investigação da interação entre α B-Cristalina e a região C-terminal da FAK. As análises foram feitas utilizando-se α B-Cristalina fusionada a cauda de Histidina marcada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) por 16 horas a 4° C, sendo utilizada como sonda. Em seguida, foram realizados ensaios de titulação com concentrações crescentes da região C-terminal da FAK incubados com a sonda por 16 horas à 4° C. Ensaios de ligação α B-Cristalina-C-terminal foram analisados considerando o equilíbrio reversível dos dois estados (ligado e não ligado) entre as proteínas estudadas. As medidas foram realizadas em fluorímetro ISS-PCI (ISS), montado em geometria L, a 10°C. O comprimento de onda de emissão utilizado foi de 495nm, utilizando-se um filtro de *cutoff* de 520 nm para coletar a luz emitida. Valores de polarização (P) foram calculados de acordo com a equação:

$$P = 1000 * (I_s - G * I_p) / (I_s + G * I_p) \quad (1)$$

Onde:

I - refere-se à intensidade de fluorescência detectada;

s e p - são as posições dos polarizadores com excitação diferentes;

G - é o fator de correção, o qual considera as diferenças na sensibilidade das duas direções de I_s e I_p , de acordo com a equação:

$$G = I_s / I_p$$

Cada curva obtida é resultado de pelo menos três experimentos independentes. Em todos os casos, a diluição máxima da amostra não ultrapassou 20% e as mudanças na

intensidade da anisotropia foram corrigidas pela diluição. Para cada amostra, a polarização foi medida até erros absolutos menores que 0.002.

A constante de dissociação da reação acima pode ser descrita de acordo com a equação:

$$K_d = (D \cdot M) / MD$$

Onde:

D - é a concentração molar de α B-Cristalina;

M - é a concentração molar do domínio C-terminal livre;

MD - é a concentração molar do complexo formado entre α B-Cristalina e C-terminal.

O complexo é relacionado à medida de polarização pela equação:

$$MD = D \cdot \alpha$$

e

$$\alpha = (P_{obs} - P_i) / (P_f - P_i)$$

Onde:

α - é a fração do C-terminal ligado;

P_{obs} - é a anisotropia observada;

P_i e P_f - são, respectivamente, os valores mínimos e máximos assintóticos do gráfico.

Assim, segue-se que:

$$P_{obs} = P_i + (P_f - P_i) * \{ [(M + n)/(k_n)] / [1 + (M_n/k_n)] \}$$

Onde:

n - é o coeficiente de Hill, que mede cooperatividade na ligação, sendo que se não houver cooperatividade n=1;

K - é a constante de dissociação aparente.

Os valores de anisotropia foram calculados utilizando-se o programa Vinci-ISS e graficados utilizando o programa Sigma Plot (Sigma).

2.25. Expressão do domínio His-FAT em Meio Mínimo (M9)

Para os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o domínio FAT da FAK fusionado a uma cauda de histidina foi expresso em meio mínimo (M9), contendo como única fonte de nitrogênio, cloreto de amônia marcado com ^{15}N (NH_4Cl) e/ou como única fonte de carbono glicose com ^{13}C . Para o procedimento de indução e purificação do domínio FAT foi utilizado a mesma metodologia utilizado para indução e purificação do domínio C-terminal da FAK descrita no item 2.17.

2.26. Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram realizados utilizando o espectrômetro Agilent/Varian Inova de 600-MHz do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), equipado com uma sonda de ressonância tripla criogênica. Os espectros foram adquiridos a 293K. As amostras marcadas com ^{15}N ou ^{15}N - ^{13}C foram dissolvidas em 300µl de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 5% de água deuterada (D_2O), atingindo concentração final de

0,4mM. Os experimentos ^1H - ^{15}N HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) foram adquiridos com 2048 pontos no domínio da aquisição e 256 incrementos no domínio do tempo. Os experimentos utilizados para o assinalamento dos resíduos, ou seja, a atribuição dos sinais aos aminoácidos da proteína, incluindo HNCACB e CBCACONH (Sattler, M *et al.*, 1999) foram adquiridos com resolução de 2048x80x80 pontos para ^1H , ^{13}C e ^{15}N , respectivamente. Todos os espectros foram processados utilizando *software* NMRPipe e NMRView (Delaglio, F *et al.*, 1995; Johnson, BA & Blevins, RA 1994).

2.27. Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado utilizando-se o programa GRAMM-X web server (Tovchigrechko, A & Vakser, IA 2006) utilizando-se os modelos da αB -Cristalina e da região C-terminal da FAK 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 selecionar as soluções mais apropriadas entre as conformações obtidas, as condições de contato dadas pelo *cross-linking* acoplado a espectrometria de massas e mutagênese sítio-dirigida foram utilizadas. As 10 melhores soluções de cada corrida foram testadas utilizando-se o programa CRY SOL (Svergun, DI *et al.*, 1995). O desvio entre os modelos selecionados em cada corrida foi avaliado por meio do RMSD (*Root mean square deviation*) utilizando-se o *MultiProt Server* (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MultiProt/>).

2.28. Ensaio de Clivagem *in vitro* pela Calpaína

Experimentos foram realizados com as proteínas recombinantes FL-FAK humana (*fulllength* FAK) expressa em sistema de baculovírus, calpaína 2, His- α B-Cristalina. Aproximadamente 1 μ g de FAK recombinante foi incubada em tampão de clivagem (50mM TrisHCl pH 7,4, 137mM KCl e 1mM MgCl₂) durante 1 hora a 37° C em diferentes condições: (a) FAK em tampão; (b) FAK em tampão; (c) FAK em tampão acrescida de 10 μ g de α B-Cristalina recombinante purificada; (d) FAK em tampão acrescida de 50 μ g de α B-Cristalina recombinante purificada. Em seguida, foi adicionado as amostras, exceto primeira condição, 1mM CaCl₂ com concentrações indicadas de calpaína 2 recombinante purificada (10nM ou 50nM) durante 30 minutos a 30° C. Por fim, foi adicionado tampão da amostra 5x às amostras que foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior análise por *Western blotting*

2.29. Análise estatística

As leituras densitométricas dos *immunoblots* foram representadas como o percentual de alteração (em relação aos controles ou ao grupo submetido ao estiramento) 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 400 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 ANOVA e o teste de escala múltipla de Bonferroni. Valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS

3.1. FAK interage com α B-Cristalina em Miócitos Cardíacos

Diante de evidências que mostram a atividade chaperona da α B-Cristalina relacionada à ligação com proteínas alvos após estresse celular (Ghosh, JG *et al.*, 2007), foi avaliado se o estresse mecânico ativa α B-Cristalina em miócitos cardíacos submetidos ao estiramento cíclico. Lisados protéicos dos miócitos cardíacos controle e submetidos a diferentes tempos de estiramento (1, 2, 6 e 12 horas) foram utilizados em ensaios de *western blotting* nos quais foi observado um aumento na quantidade de proteína como nos níveis de fosforilação em Serina59 de α B-Cristalina, um marcador de sua atividade chaperona. *Imunoblottings* de GAPDH foram usados como controles internos (Figura 10).

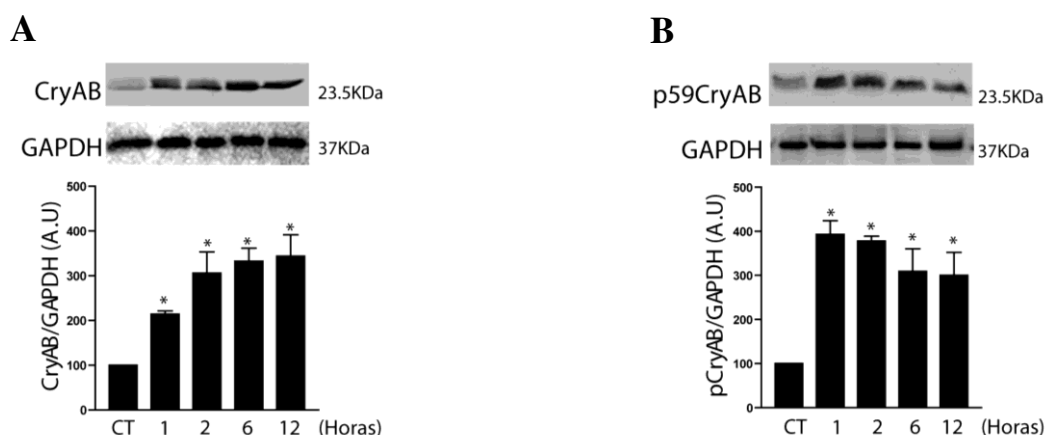


Figura 10. Perfil de ativação da α B-Cristalina em miócitos cardíacos durante estresse mecânico. Estiramento cíclico (10%) aumenta a quantidade de proteína e fosforilação no resíduo Ser-59 da α B-Cristalina em MVRNs submetidos ao estiramento cíclico (1, 2, 6 e 12 horas) quando comparados com os MVRNs não estirados – controle (CT). *Imunoblottings* anti-GAPDH foram usados como controle interno. * $p < 0,05$ vs Controle (CT) ($n=6$ culturas).

Após avaliar os efeitos do estiramento cíclico na expressão e fosforilação da α B-Cristalina, os mesmos parâmetros foram avaliados na proteína FAK. Consistente com dados anteriores (Franchini, KG *et al.*, 2000; Domingos, PP 2002; Torsoni AS, Constancio, SS *et al.*, 2003), o estiramento cíclico aumenta o nível de fosforilação de FAK nos resíduos Tyr 397 e Tyr 925. Nenhuma mudança na expressão da FAK foi observada (Figura 11).

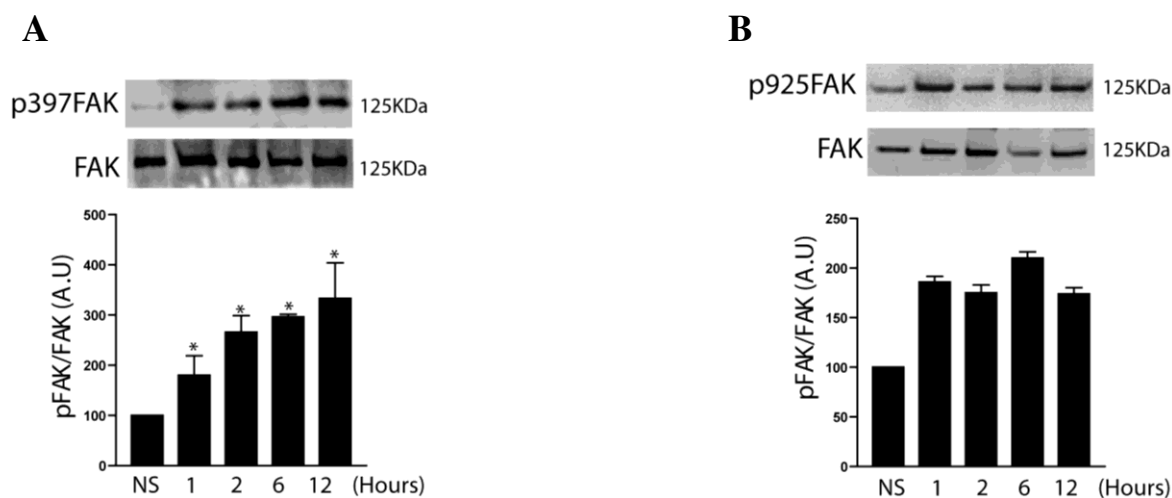


Figura 11. Perfil de ativação da FAK em miócitos cardíacos durante estresse mecânico. Estiramento cíclico (10%) aumenta a fosforilação nos resíduos Tyr-397 e Tyr925 da FAK em MVRNs submetidos ao estiramento cíclico (1, 2, 6 e 12 horas) quando comparados com os MVRNs não estirados – controle (CT). Não houve aumento na expressão da FAK em MVRNs estirados. * $p < 0,05$ VS controle (CT) (n=6 culturas).

Para avaliar a ocorrência de associação entre FAK e α B-Cristalina após o estresse mecânico, imunocomplexos foram preparados utilizando anticorpo específico para α B-Cristalina e lisados de miócitos cardíacos controle e estirados. Como apresentado na Figura 12A foi observado uma associação basal entre α B-Cristalina e FAK nos imunocomplexos de miócitos controle, sendo que essa associação aumenta após o estiramento celular. Como

ocorre um aumento na fosforilação de FAK após o estiramento celular, foi também avaliado se este estímulo mecânico aumentaria a associação da α B-Cristalina com FAK em seu estado ativo, fosforilado. A Figura 12B demonstra que o estiramento cíclico aumenta marcadamente a associação entre α B-Cristalina e FAK fosforilada no resíduo tirosina 397 (p397FAK).

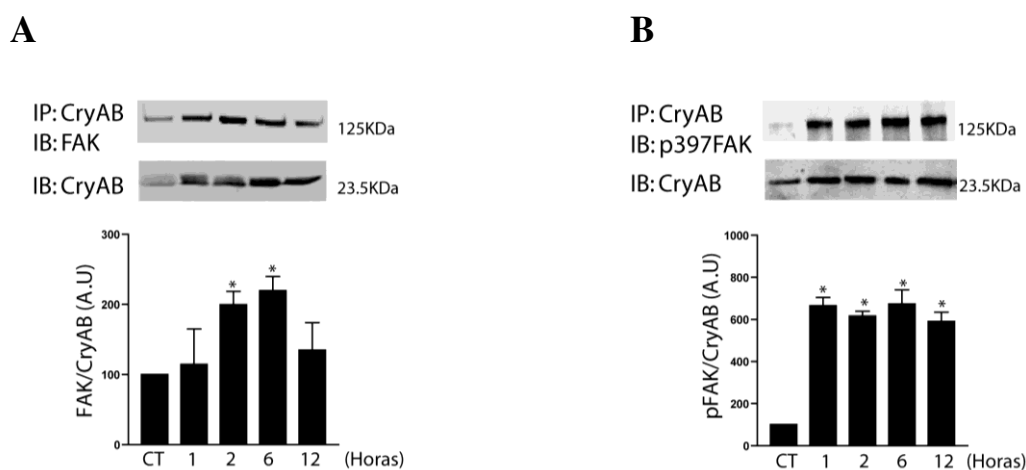


Figura 12. Estiramento cíclico aumenta a associação da α B-Cristalina com FAK. **(a)** Blot representativo e gráfico de barras mostrando a fração de FAK precipitada pelo anticorpo anti- α B-Cristalina comparado com a quantidade de α B-Cristalina precipitada com anticorpo anti- α B-Cristalina; **(b)** blot representativo e gráfico de barras mostrando a fração de p397FAK precipitada pelo anticorpo anti- α B-Cristalina comparado com a quantidade de α B-Cristalina precipitada com anticorpo anti- α B-Cristalina * $p < 0.05$ vs Controle (CT) (n=6 culturas).

3.2. O estresse mecânico aumenta a marcação citoplasmática e perinuclear da α B-Cristalina e promove a translocação da FAK

Para avaliar a localização celular da α B-Cristalina e FAK em miócitos cardíacos de ratos neonatos controle e submetidos ao estiramento cíclico, experimentos com a técnica de

imunofluorescência foram realizados, com subsequente análise por microscopia confocal. Em MVRNs controle, α B-Cristalina (CryAB) apresentou distribuição citosólica (Figura 13, painéis B-C), e em miócitos cardíacos submetidos ao estiramento cíclico foi observada marcação citosólica e perinuclear mais intensa da α B-Cristalina quando comparada aos miócitos controle (Figura 13, painéis E-F).

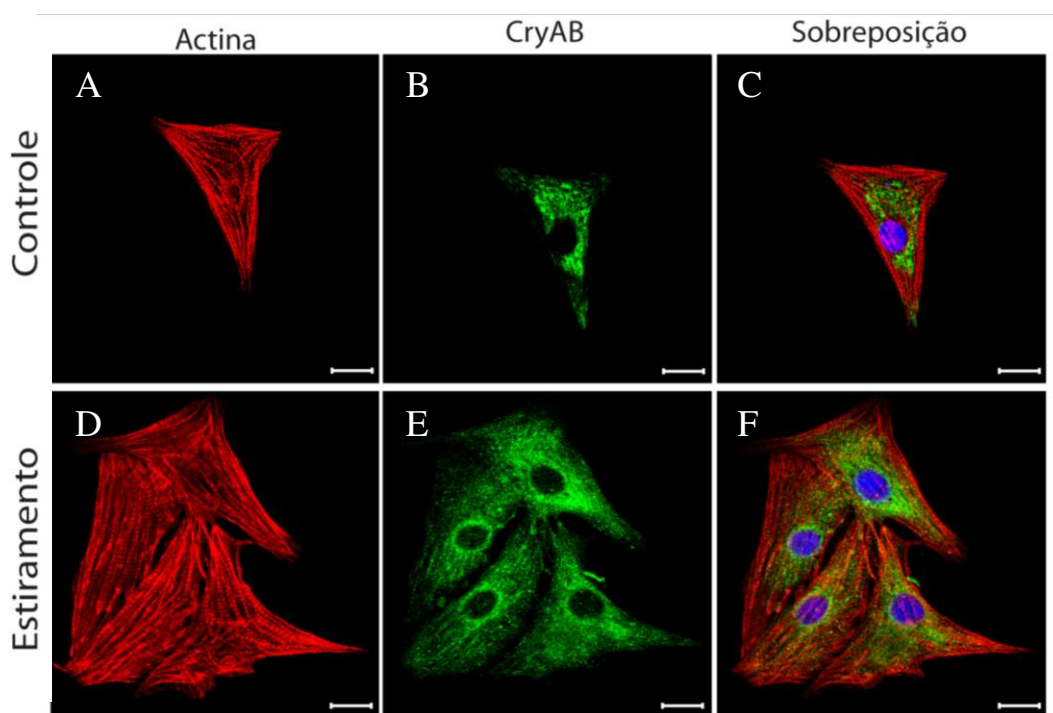


Figura 13. Aumento da marcação citosólica e perinuclear da α B-Cristalina após estiramento cíclico. Microscopia confocal de MVRNs controle e submetidos ao estiramento (2 horas). (a, d) Observe MVRNs controle e estirados marcados com faloidina (vermelho); (b, e) MVRNs controle e estirados marcados com anticorpo anti- α B-Cristalina (verde); (c, f) compare a sobreposição da marcação de α B-Cristalina e actina. Barras = 20 μ m.

Em paralelo, também foi averiguada a localização e distribuição da FAK em MVRNs controle e submetidos ao estiramento cíclico. A marcação da FAK mostrou um

padrão sarcomérico estriado alternado com a marcação da actina, sugerindo sua localização na banda A em MVRNs (Figura 14, painéis B e C). Em células submetidas ao estiramento cíclico, FAK mostrou marcação perinuclear e nuclear distinta (Figura 14, painéis E e F).

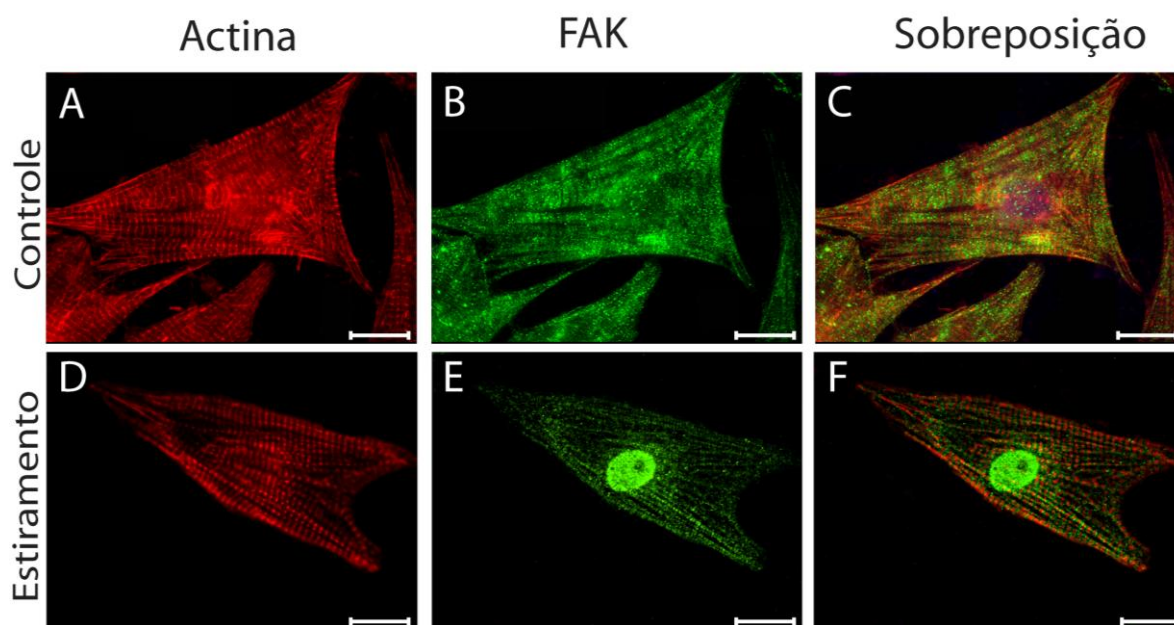


Figura 14. FAK transloca para o núcleo após estiramento cíclico. Imagens de Microscopia Confocal de MVRNs controle e submetidos ao estiramento (2 horas). (a, d) Observe MVRNs controle e estirados marcados com faloidina (vermelho); (b, e) MVRNs controle e estirados marcados com anticorpo anti-FAK (verde); (c, f) compare a sobreposição da marcação FAK com actina. Barras = 20 μ m.

3.3. O estresse mecânico aumenta a co-localização de FAK com α B-Cristalina

A localização da FAK em relação à α B-Cristalina foi averiguada por ensaios de imunofluorescência de miócitos ventriculares de ratos neonatos controle e submetidos ao estiramento cíclico (2 horas), com subsequente análise por microscopia confocal. A marcação com anticorpo anti- α B-Cristalina (vermelho) revelou uma ampla distribuição

citossólica desta proteína, a qual apresenta sobreposição com a imuno-marcação da FAK (verde), após estiramento cíclico. Onde há emissão dos fluoróforos verde e vermelho em conjunto, é observado em amarelo nos painéis C e F da Figura 15, permitindo a análise da co-localização dessas proteínas.

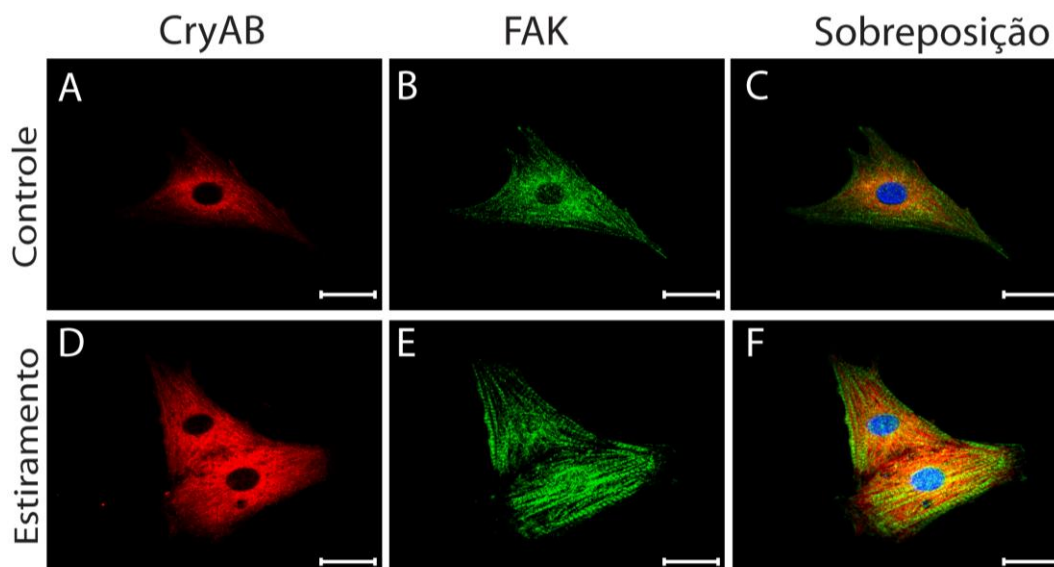
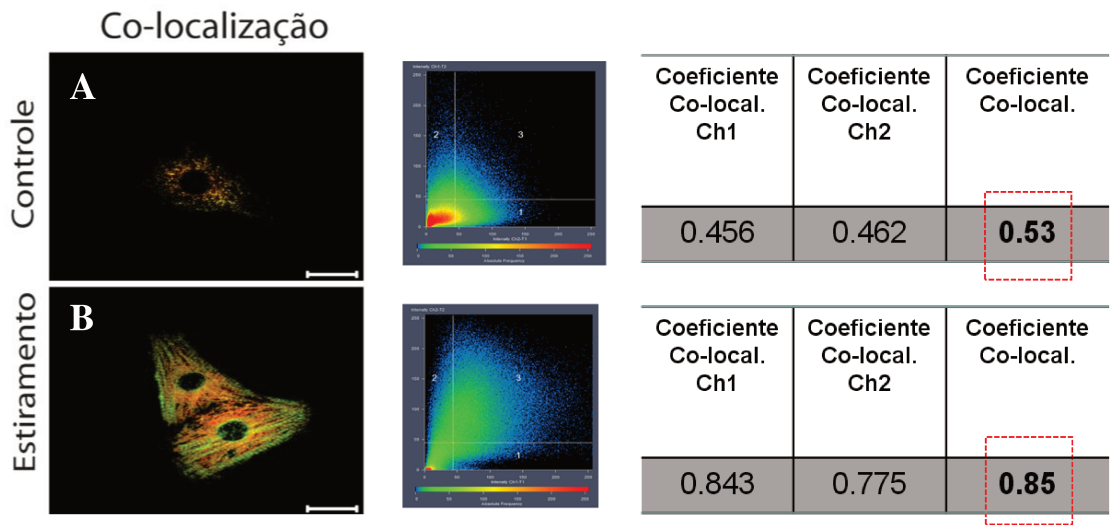


Figura 15. Estiramento cíclico aumenta a co-localização entre FAK e α B-Cristalina. Fotomicrografias de cultura de miócitos cardíacos ventriculares de ratos neonatos controle (A-C) e estirados por 2 horas (D-F). (a, d) Marcação com anti- α B-Cristalina dos miócitos cardíacos controle e estirados; (b, e) compare a imunolocalização da FAK ; (c, f) imagens de microscopia confocal de miócitos ventriculares de ratos neonatos com anti-FAK (verde) e anti- α B-Cristalina (vermelho). Barras = 20 μ m.

A maior intensidade de sobreposição das proteínas FAK e α B-Cristalina em MVRNs submetidos ao estiramento cíclico foi detectada pelas imagens de co-localização (Figura 16, painéis A e B). A função de co-localização permite a análise dos canais de cores relativos à FAK (apresentado na Figura 15, painéis B e E) e α B-Cristalina (Figura 15, painéis A

e D), os quais são emitidos pelas moléculas fluorescentes detectados pelo mesmo pixel na imagem. O gráfico plotado das imagens de co-localização demonstrou maior intensidade de sobreposição dos pixels detectados no quadrante 3 de MVRNs submetidos ao estiramento cíclico. O valor do coeficiente de co-localização é maior na condição estirada (0,85) que na condição controle (0,53), o que confirma maior associação de FAK/ α B-Cristalina após o estresse mecânico. Este valor é dado pela relação entre o número de pixels total com o número relativo de pixels colocalizados no canal 1 (verde) e canal 2 (vermelho).



3.4. Localização Subcelular de FAK e α B-Cristalina em Miócitos Ventriculares de Ratos Adultos (MVRAs)

Para avaliar a localização subcelular de FAK e α B-Cristalina em miócitos ventriculares de ratos adultos (MVRAs) foram realizados ensaios de imunomarcacão de MVRAs controle e submetidos à coarctação da aorta (7 dias), com subsequente análise por microscopia eletrônica. A localização subcelular da FAK em MVRAs controle mostrou distribuição preferencial na região sarcomérica, próxima a miosina, enquanto que pouca marcação foi observada na região nuclear (Figura 17, painéis A e B). Em MVRAs submetidos à coarctação da aorta por 7 dias, FAK encontra-se localizada mais abundantemente no núcleo, e também próxima a linha Z da região sarcomérica (Figura 17, painéis C e D). Na condição controle, α B-Cristalina apresentou pouca marcação tanto na região sarcomérica como na região nuclear e em MVRAs coarctados por 7 dias, essa marcação foi detectada próxima a linha Z e aos filamentos do sarcômero (Figura 17, painéis A e D). Em algumas áreas, pode-se observar imunomarcacão próxima entre FAK e α B-Cristalina (detalhe Figura 17, painel C). Os resultados obtidos corroboram a localização citoplasmática e nuclear observada pela microscopia confocal em MVRNs controle e submetidos ao estiramento cíclico de ambas as proteínas, e demonstram que FAK e α B-Cristalina compartilham a mesma localização subcelular também em MVRAs.

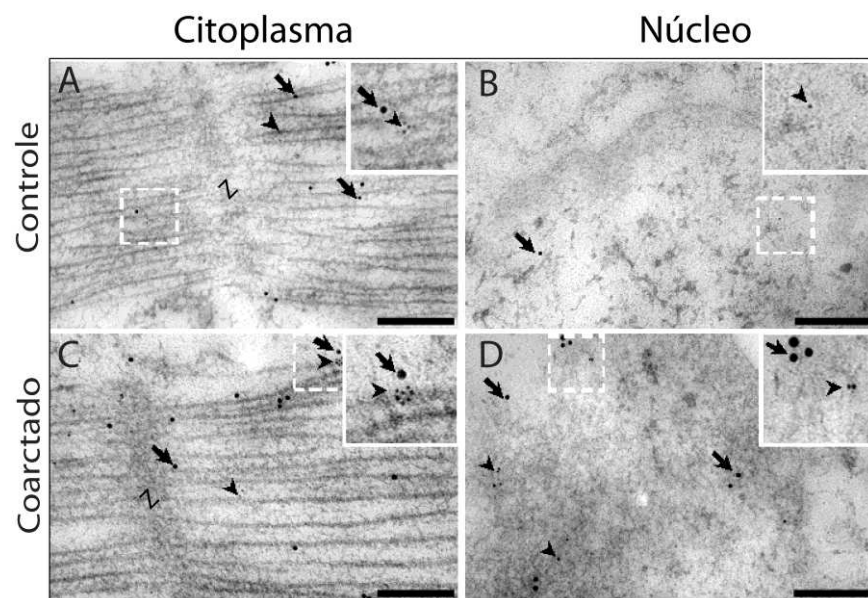


Figura 17. Eletromicrografias de miócitos cardíacos obtidos de ratos adultos controle (A e B) e coarctados 7 dias (C e D) submetidas à técnica de imunocitoquímica com uso de anticorpo secundário acoplado ao ouro coloidal para FAK (10nm) e α B-Cristalina (6nm). Observe na ultra-estrutura, a imunolocalização da FAK (seta) e α B-Cristalina (cabeça de seta) no sarcômero (A e C) e no núcleo (B e D). Barras = 200nm.

3.5. α B-Cristalina interage diretamente com FAK

Para testar a hipótese que α B-Cristalina interage diretamente com a FAK, foram realizados ensaios de precipitação com proteínas expressas em sistemas heterólogos e posteriormente purificadas. α B-Cristalina expressa em fusão com uma cauda de histidina e a proteína recombinante FL-FAK (*Full lenght FAK*) expressa com cauda de GST em sistema de baculovírus foram utilizadas no ensaio de *pull-down*. Como controle foi utilizado apenas GST. Como apresentado na Figura 18, His- α B-Cristalina precipita apenas GST-FAK, indicando que a interação entre a FAK e a α B-Cristalina ocorre de maneira direta.

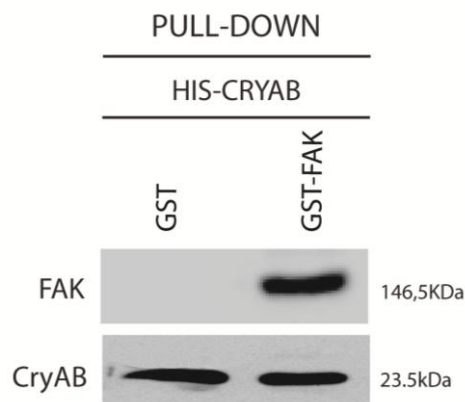


Figura 18. His- α B-Cristalina (His-CryAB) interage diretamente com FL-FAK. *Imunoblotting* com anti-FAK do precipitado com His- α B-Cristalina. *Loading* mostrando a quantidade de His-CryAB no ensaio. Representativo de 3 experimentos.

3.6. A região C-terminal da FAK medeia a interação FAK/ α B-Cristalina

Para determinar a topologia da interação FAK/ α B-Cristalina, foram realizados ensaios com os diferentes domínios da FAK fusionados a GST, ou seja, o domínio GST-Ferm (35-410), o domínio GST-Quinase (411-689), o domínio GST-Cterminal (765-1052) e a proteína recombinante His- α B-Cristalina (1-175). GST foi utilizado como controle. Como resultado, apenas a região C-terminal da FAK foi capaz de precipitar His- α B-Cristalina, mostrando que a região C-terminal da FAK medeia a interação com α B-Cristalina (Figura 19).

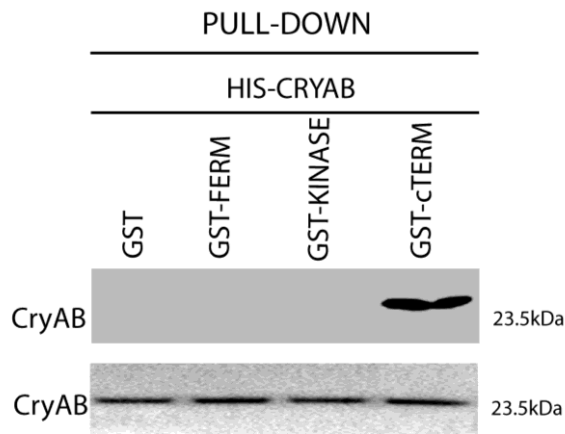


Figura 19. GST-Cterminal precipita α B-Cristalina. *Imunoblotting* com anticorpo anti- α B-Cristalina do precipitado realizado com os domínios recombinantes da FAK fusionados a GST. *Imunoblotting* com anticorpo anti- α B-Cristalina mostrando a quantidade de His- α B-Cristalina nas amostras. Representativo de 6 experimentos.

3.7. A região C-terminal da FAK possui alta afinidade de ligação pela α B-Cristalina

Para avaliar a afinidade de ligação do complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina foi realizado experimento de anisotropia de fluorescência. A Figura 20 mostra a curva de ligação e a constante de dissociação (K_d) deste complexo protéico. α B-Cristalina foi marcada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e utilizada como sonda. A afinidade desta interação foi avaliada de acordo com o aumento da anisotropia que ocorreu à medida que a região C-terminal da FAK foi titulada à reação. Sendo o fundamento da anisotropia medir o desvio da luz polarizada em função do grau de rotação do complexo, quanto maior o volume final do complexo formado menor será sua velocidade de rotação no meio e, por consequência, menor será o desvio da luz polarizada incidida, ocasionando valores crescentes de anisotropia. O valor de K_d é inversamente proporcional a afinidade de duas

moléculas, ou seja, valores baixos de K_d indicam alta afinidade de ligação. O valor observado ($\sim 17\text{nM}$) aponta uma alta afinidade de ligação entre a região C-terminal da FAK e αB -Cristalina.

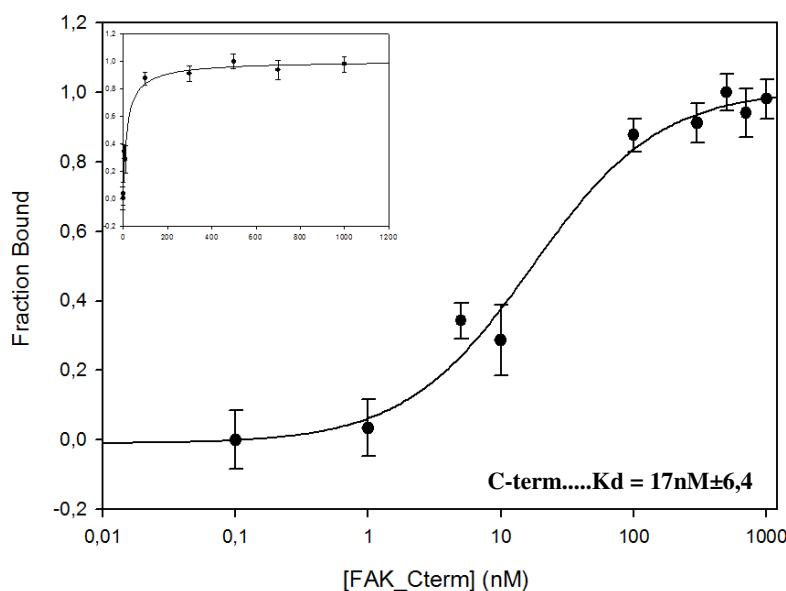


Figura 20. Curva de ligação da região C-terminal da FAK com αB -Cristalina (n=3).

3.8. Associação entre a região C-terminal da FAK e αB -Cristalina nativa

Para verificar se a região C-terminal da FAK interage com αB -Cristalina endógena, ou seja, a partir de lisados de miócitos cardíacos, foram realizados ensaios de *pull-down* com esses lisados. Os domínios da FAK fusionados a GST (Ferm-GST, Quinase-GST e Cterminal-GST) foram utilizados para precipitar extratos protéicos controle e extratos submetidos ao estiramento. GST foi utilizado como controle. Consistente com os dados já obtidos, apenas a região C-terminal da FAK precipitou αB -Cristalina endógena. Em miócitos cardíacos submetidos ao estiramento cíclico observou-se uma maior expressão e

também uma maior quantidade de α B-Cristalina precipitada. Este resultado está de acordo com os dados previamente obtidos nos ensaios de co-imunoprecipitação (Figura 21).

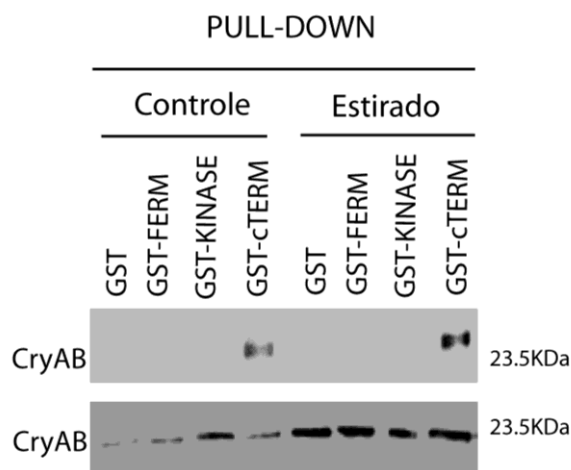


Figura 21. GST-C-terminal interage com α B-Cristalina de extrato de miócitos cardíacos de ratos neonatos. Painel superior: *Imunoblotting* com anticorpo anti- α B-Cristalina das proteínas de extratos de MVRNs controle e submetidos ao estiramento cíclico (2 horas) precipitadas pelos fragmentos recombinantes da FAK em fusão com GST. Painel inferior: *Imunoblotting* com anticorpo anti- α B-Cristalina mostrando maior quantidade desta proteína após estiramento cíclico (n=6).

3.9. Associação entre α B-Cristalina recombinante e FAK nativa

Para confirmar se α B-Cristalina recombinante é capaz de interagir com FAK endógena foram realizados ensaios de *pull-down*. Neste ensaio a proteína recombinante His- α B-Cristalina foi utilizada para precipitar extratos protéicos controle e extratos submetidos ao estiramento cíclico. O resultado apresentado na Figura 22 demonstra que α B-Cristalina precipita FAK endógena em miócitos cardíacos controle, e que nas células submetidas ao estiramento cíclico maior quantidade de FAK é precipitada. Este resultado

indica que α B-Cristalina interage com FAK e que esta associação é acentuada após estiramento cíclico.

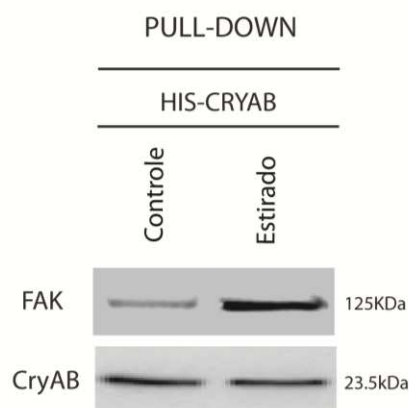


Figura 22. α B-Cristalina interage com FAK de extrato de miócitos cardíacos de ratos neonatos. Painel superior: *Imunoblotting* com anticorpo anti-FAK das proteínas de extratos de MVRNs controle e submetidos ao estiramento cíclico (2 horas) precipitadas pela proteína recombinante His- α B-Cristalina. Painel inferior: *Loading* com anticorpo anti- α B-Cristalina mostrando a quantidade de His- α B-Cristalina em todas as amostras (n=3).

3.10. Ensaio de fosforilação *in vitro* do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK

Diante dos resultados obtidos que demonstram um aumento na associação entre FAK/ α B-Cristalina em resposta ao estresse mecânico e que a região C-terminal da FAK, a qual medeia esta interação, pode ser fosforilada no resíduo Tyr925 após o estiramento, foi avaliado se esse resíduo e sua fosforilação são importantes na interação C-terminal da FAK/ α B-Cristalina.

Para averiguar a importância da fosforilação do resíduo Tyr925 da FAK na interação com α B-Cristalina foi utilizado um sistema para produzir a região C-terminal da FAK fosforilada *in vitro* pela c-Src. Uma vez que, tirosino-kinases podem ser tóxicas para

bactérias, foi produzido o domínio quinase da Src₍₂₅₁₋₅₃₃₎ em *E. coli* pela co-expressão com a fosfatase YopH (tirosino-fosfatase *Yersinia*), como previamente descrito por Seeliger, MA *et al.*, 2005. Após incubação da região C-terminal em presença da Src e γ -[³²P] ATP, a incorporação de ³²P foi monitorada por gel SDS-PAGE (Figuras 23 A e B).

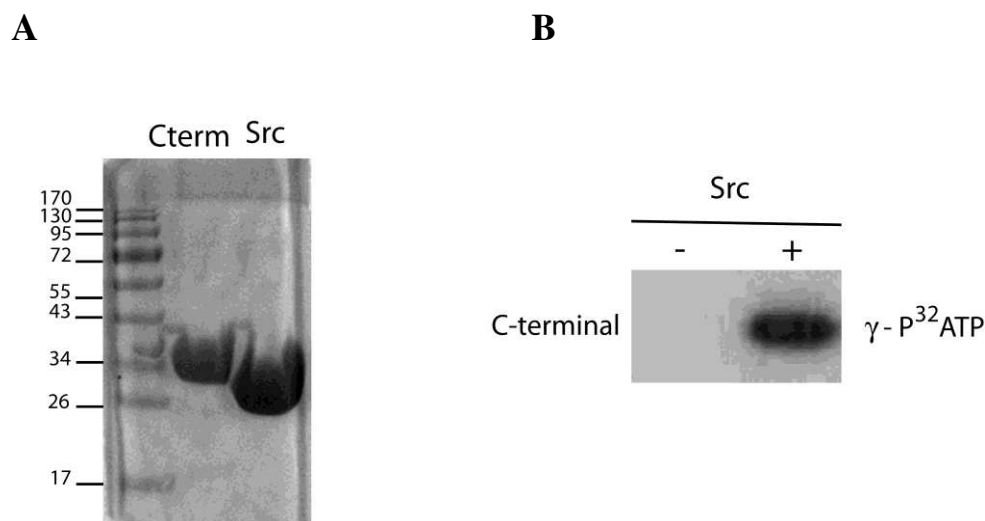
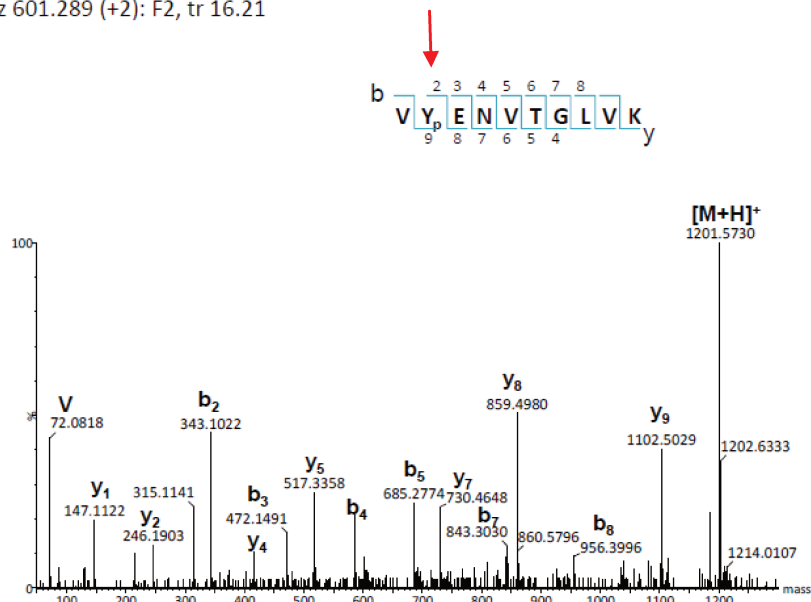


Figura 23. Padronização da expressão, purificação do domínio quinase da c-Src e fosforilação da região C-terminal da FAK. **(a)** Gel SDS-PAGE mostrando a região C-terminal da FAK₇₆₅₋₁₀₅₂ e o domínio quinase da c-Src₂₅₁₋₅₃₃ purificados; **(b)** ensaio de fosforilação *in vitro* com ATP radioativo, na presença e ausência de Src.

A fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK pela Src foi confirmada por espectrometria de massas e *western blotting* com anticorpo específico anti-p925FAK (Figuras 24 A e B).

A

m/z 601.289 (+2): F2, tr 16.21



B

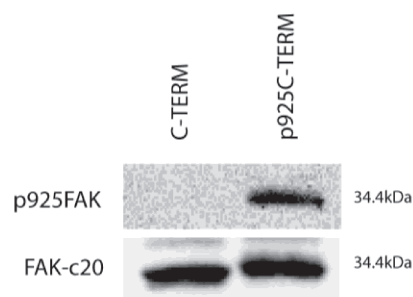


Figura 24. Confirmação da fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK. (a) Espectro de ESI-MS/MS do íon de m/z 601.289, mostrando a fosforilação do resíduo Tyr925 (seta em vermelho); (b) *imunoblotting* representativo com anticorpo anti-p925FAK mostrando fosforilação da proteína no resíduo Tyr925 (n=4).

3.11. A fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK aumenta a interação entre C-terminal/ α B-Cristalina

Confirmada a fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK, ensaios de *pull-down* foram realizados com a região C-terminal fosforilada e não fosforilada e His- α B-Cristalina. Como demonstrado na Figura 25, a proteína recombinante His- α B-Cristalina precipitou maior quantidade da região C-terminal fosforilada comparado a C-terminal não fosforilada. Este resultado indica que a fosforilação no resíduo Tyr925 é importante para aumentar a associação FAK/ α B-Cristalina.

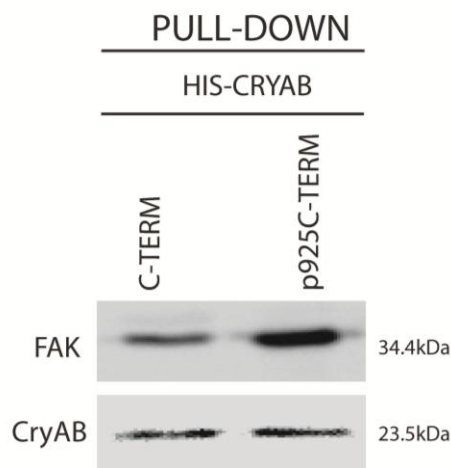


Figura 25. A fosforilação do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK aumenta a associação com α B-Cristalina. *Imunoblottings* com anticorpo anti-FAK e anti- α B-Cristalina do precipitado realizado com His- α B-Cristalina acoplado a resina e as construções da região C-terminal fosforilada e não fosforilada. *Loading* com anticorpo anti- α B-Cristalina mostrando a quantidade de His-CryAB em todas as amostras (n=4).

Para determinar a importância do resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK na interação com α B-Cristalina, ensaios de mutação sítio-dirigida para esse resíduo (Y925L),

seguido de experimentos de *pull-down* foram realizados. A Figura 26 mostra que a interação entre C-terminal da FAK/ α B-Cristalina foi marcadamente reduzida no mutante C-terminal Y925L, o que indica que o resíduo Tyr925 é essencial para a interação FAK/ α B-Cristalina.

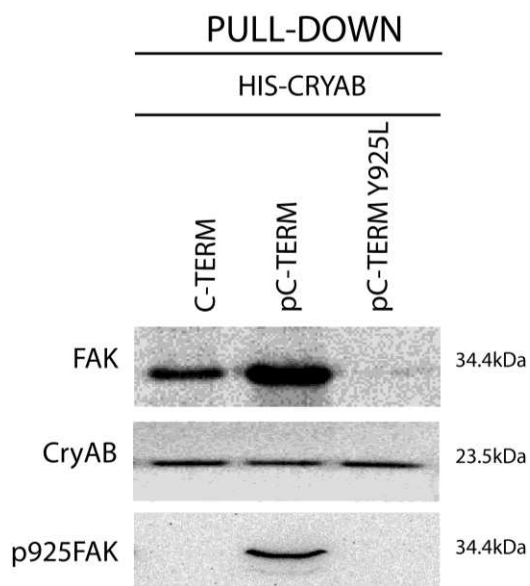


Figura 26. Mutação no resíduo Tyr925 da região C-terminal da FAK reduz marcadamente a interação C-terminal da FAK/ α B-Cristalina. *Imunoblottings* com anticorpo específico anti-FAK, anti- α B-Cristalina, anti-p925FAK a partir do ensaio de *pull-down* realizado com His- α B-Cristalina (n=4).

A fim de verificar se a mutação do resíduo Y925L altera a afinidade de ligação do complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina, experimentos de anisotropia de fluorescência foram realizados. A Figura 27 apresenta a curva de ligação do complexo C-terminal selvagem/ α B-Cristalina, sobreposta à curva de ligação do complexo C-terminal Y925L/ α B-Cristalina. Como indicado, houve deslocamento à direita da curva de anisotropia

quando o mutante foi titulado. Isso indica menor afinidade de ligação do complexo formado com C-terminal mutante comparado ao formado pela região C-terminal selvagem. Os valores de K_d mostram redução de afinidade na ordem de 7x.

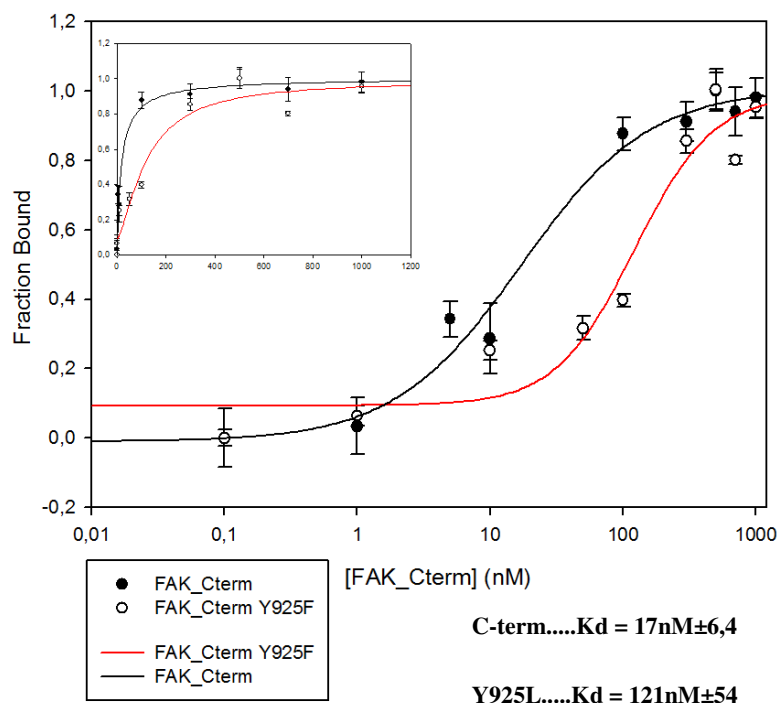


Figura 27. Curva de ligação do complexo C-terminal da FAK selvagem/ α B-Cristalina comparado ao C-terminal da FAK Y925L/ α B-Cristalina (n=3).

3.12. A tirosina 925 é importante para a associação entre α B-Cristalina e FAK em miócitos cardíacos

Ensaio de co-imunoprecipitação foram realizados para avaliar o efeito da inibição da fosforilação da Tyr925 da FAK na associação com α B-Cristalina em miócitos cardíacos. O tratamento prévio de miócitos cardíacos submetidos ao estiramento cíclico com o

inibidor seletivo para Src - PP2 (concentração final 10 μ M) atenuou a interação FAK/ α B-Cristalina (Figura 28). Este resultado está em concordância com a hipótese de que a fosforilação do resíduo Tyr925 da FAK é importante para aumentar a associação FAK/ α B-Cristalina em miócitos cardíacos submetidos ao estiramento cíclico.

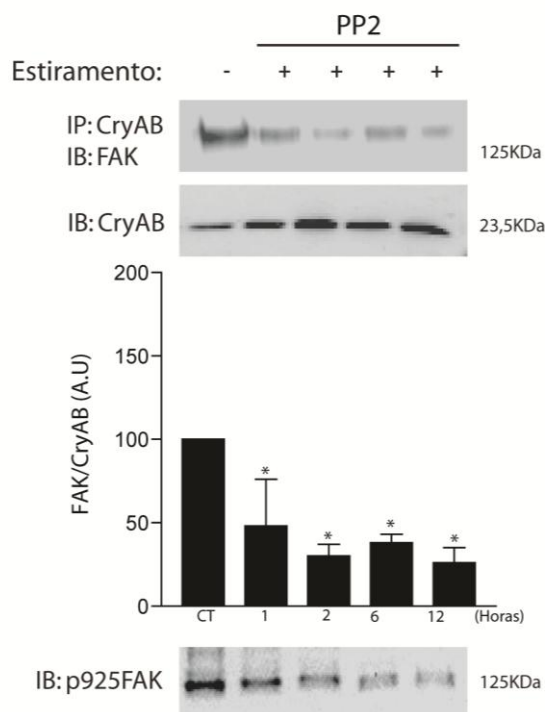


Figura 28. Tratamento com PP2 reduz associação FAK/ α B-Cristalina em miócitos cardíacos. Blot representativo e gráfico de barras mostrando a fração de FAK precipitada pelo anticorpo anti- α B-Cristalina, normalizada pela quantidade de α B-Cristalina precipitada com anticorpo anti- α B-Cristalina. Blot representativo com anticorpo específico anti-p925FAK mostrando inibição da fosforilação em miócitos cardíacos tratados previamente com PP2. * $p < 0.05$ vs Controle (CT) (n=3 culturas).

3.13. A mutação Y925L reduz a associação da FAK com α B-Cristalina em células C2C12

Para averiguar se a mutação Y925L da FAK interfere na associação com α B-Cristalina foram realizados ensaios de transfecção em células C2C12 com os plasmídeos pcDNA/Flag (controle), pcDNA/FAK-Flag (FAK selvagem) e pcDNA/FAKY925L-Flag (FAK mutante), seguidos de co-imunoprecipitação. Como observado na Figura 29, células transfectadas com FAK mutante apresentaram menor quantidade de α B-Cristalina nos imunocomplexos de FAK, corroborando com os dados anteriores que mostram a importância do resíduo Tyr925 da FAK na associação FAK/ α B-Cristalina.

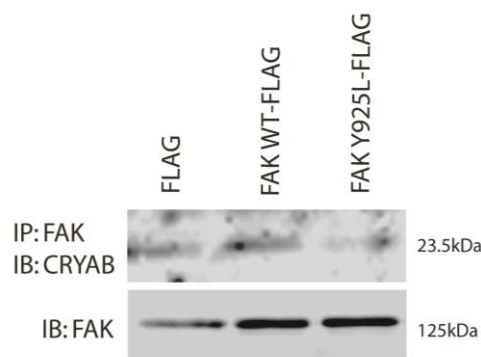


Figura 29. Superexpressão de FAK-Flag e FAKY925L-Flag em células C2C12. Imunoprecipitação e *blotting* com anti- α B-Cristalina de extrato de células controle, ou seja, transfectados com pcDNA/Flag e extratos de células transfectados com pcDNA/FAK-Flag e pcDNA/FAK-Y925L-Flag. *Imunoblotting* realizado com anti-FAK, mostrando aumento de expressão nas células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene para a FAK (n=3).

3.14. Ressonância Magnética Nuclear mostra mudança conformacional do domínio FAT fosforilado da FAK

Diante de dados prévios que demonstraram modificações estruturais no domínio FAT após a fosforilação, e determinaram que a interação com proteínas é acentuada após estas mudanças (Arold, ST *et al.*, 2002; Liu, G *et al.*, 2002; Prutzman, KC *et al.*, 2004), ensaios de RMN-HSQC foram realizados para avaliar estruturalmente o domínio FAT não fosforilado e após fosforilação. Para o ensaio foi utilizado o domínio FAT (que contém a Tyr925) em detrimento da região C-terminal da FAK, devido a limitação técnica de resolução da RMN para proteínas acima de 30 KDa. A região C-terminal da FAK possui 34,4 KDa, o domínio FAT possui 18 KDa e a tirosina 925 encontra-se na hélice 1 do domínio FAT. As Figuras 30 A e B mostram os sinais dos espectros de RMN ^1H - ^{15}N obtidos do domínio FAT não submetido à fosforilação e o domínio FAT fosforilado. A Figura 30 C mostra a sobreposição desses espectros. Os resultados indicam perturbações nos sinais do espectro da amostra fosforilada, sugerindo mudança conformacional após a fosforilação.

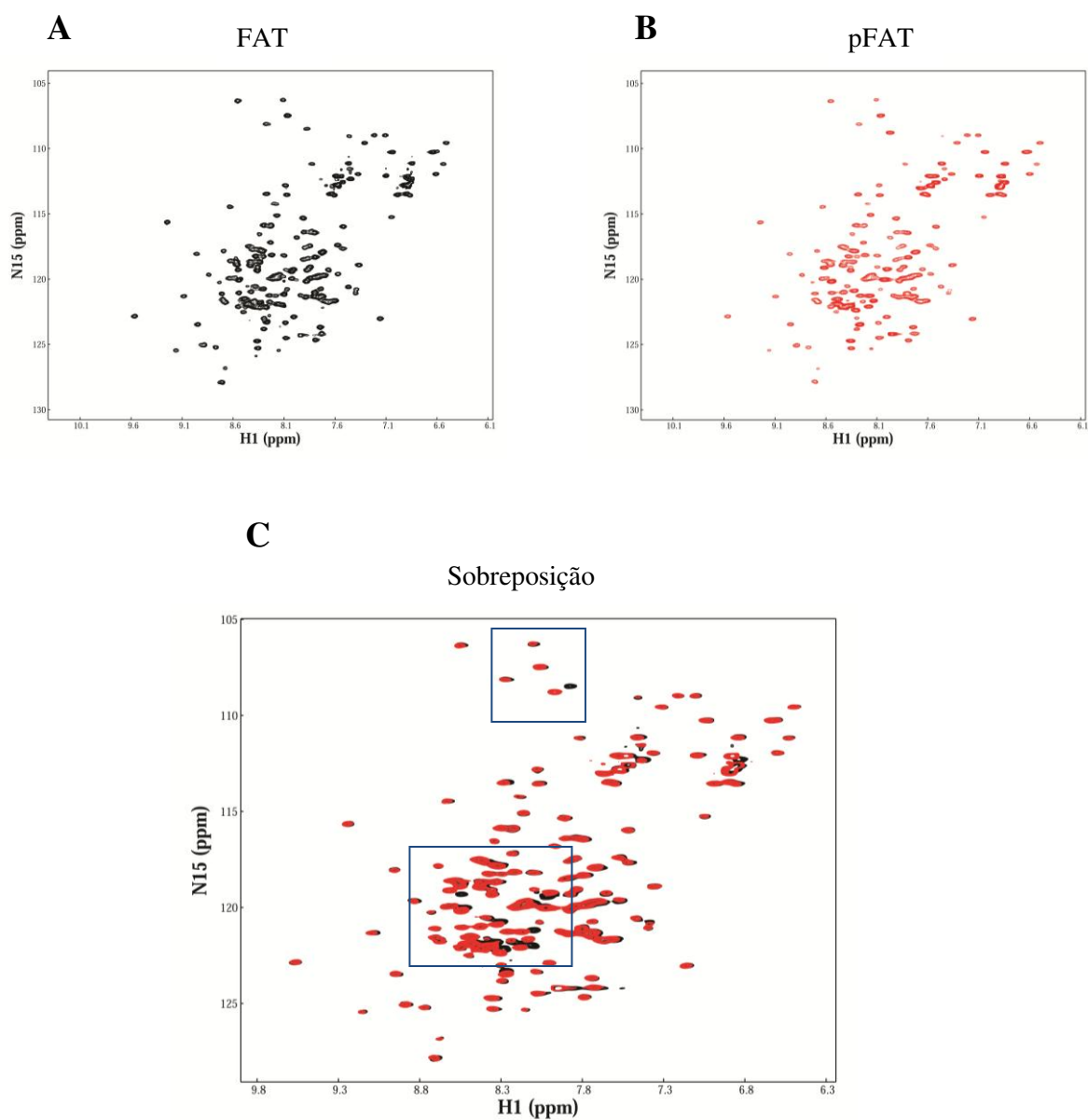


Figura 30. Experimento bidimensional ^1H - ^{15}N HSQC. **(a, b)** Espectros obtidos de amostras de FAT não fosforilada e fosforilada; **(c)** sobreposição dos espectros FAT/pFAT mostrando perturbações no espectro (destaque), mudanças químicas após a fosforilação.

Para identificar a região de alteração após a fosforilação do domínio FAT e assinalar os resíduos de aminoácidos modificados, ensaios de ressonância tripla (^{13}C - ^1H - ^{15}N) foram realizados. Como a estrutura do FAT é definida por um motivo de 4 α -hélices fechado, muitos resíduos de aminoácidos encontram-se em arranjos simétricos e devido a uma superposição de picos nem todos os sinais esperados foram identificados. Em breve as amostras serão analisadas em um equipamento de 900 MHz, o que permitirá um aumento na resolução dos espectros, possibilitando o assinalamento de mais resíduos. Perturbações nos resíduos da região N-terminal do domínio FAT foram identificadas. O espectro de HSQC está representado na Figura 31. Os sinais assinalados em preto correspondem à amostra não fosforilada, e os sinais assinalados em azul referem-se à amostra fosforilada. Os resíduos de aminoácidos identificados destacados na estrutura do domínio FAT (PDB1k05) podem ser visualizados na Figura 32. Alterações químicas foram identificadas nos resíduos 907 a 910 e 916 (destacados em vermelho), enquanto outros resíduos assinalados como 958 a 960, 965 e 966 não apresentaram modificação (destacado em azul). A tirosina 925 está demonstrada em cinza. Apesar de muitos sinais não terem sido identificados, os resultados obtidos estão de acordo com uma modificação após a fosforilação da Tyr925 do ambiente químico dos resíduos na região N-terminal do domínio FAT.

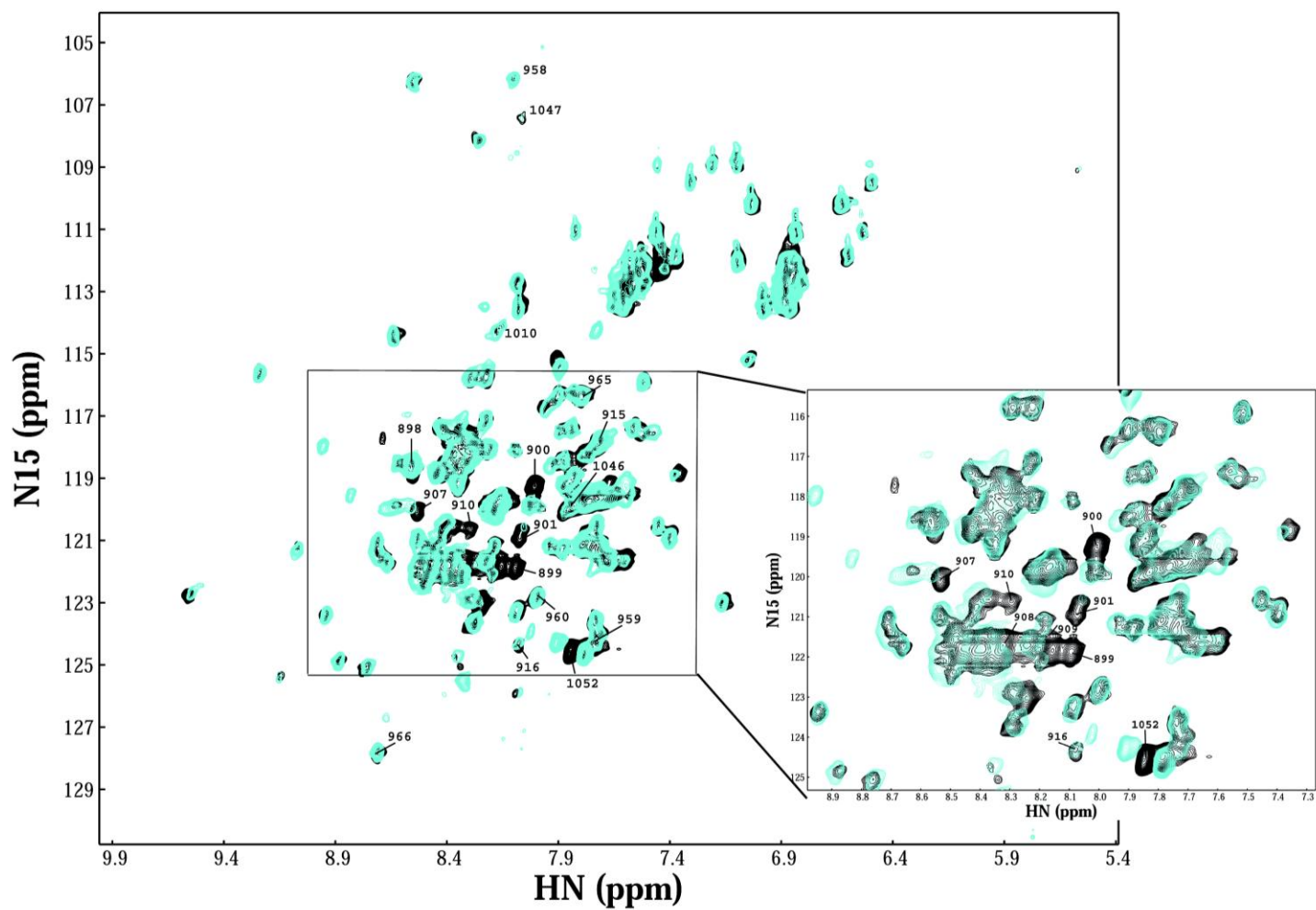


Figura 31. Experimento tridimensional ^{13}C - ^1H - ^{15}N HSQC. Espectro e assinalamento dos resíduos de aminoácidos obtidos de amostras de FAT não fosforilada (preto) e fosforilada (azul).

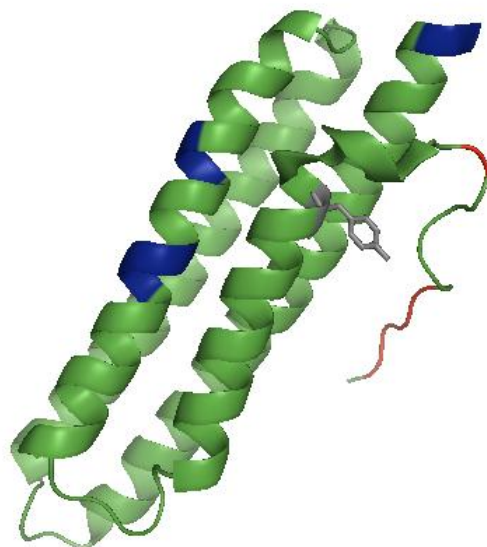


Figura 32. Representação do domínio FAT da FAK (PDB: 1K05) com os resíduos modificados após fosforilação (destaque em vermelho). Resíduos assinalados não modificados (demonstrados em azul). Tirosina 925 mostrando a cadeia lateral em destaque (cinza).

3.15. Análise estrutural da interação entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina

Diante do conjunto de resultados obtidos que demonstraram a existência de uma interação direta entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina, experimentos adicionais foram realizados na tentativa de elucidar um modelo que descreva a superfície de contato desse complexo protéico. Com este intuito foram utilizados ensaios de *Cross-linking* acoplado à Espectrometria de Massas, mutagênese sítio-dirigida, *docking* e modelagem molecular. Para esses ensaios foi padronizada a co-purificação da região C-terminal da FAK e da α B-Cristalina, ambos expressos em fusão a uma cauda de histidina.

As proteínas foram expressas e purificadas por afinidade separadamente e, em seguida, foram co-purificadas por cromatografia de exclusão molecular (Figura 33).

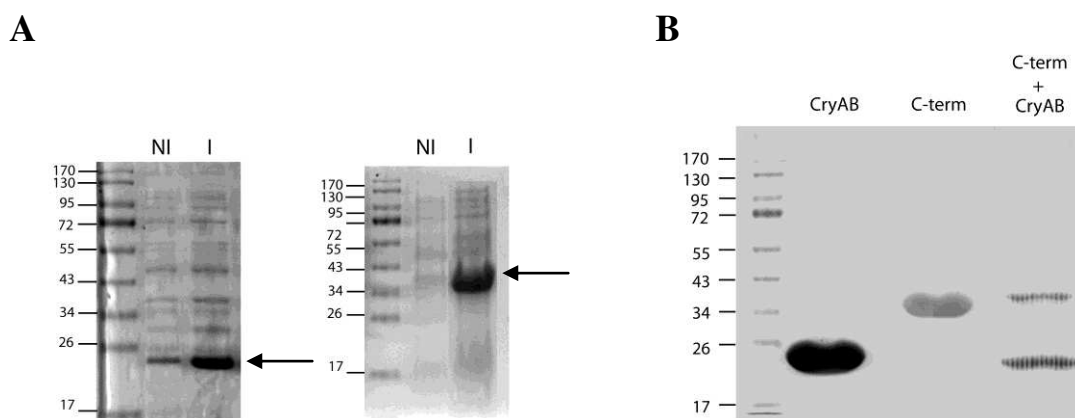


Figura 33. Co-purificação do complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina. **(a)** Géis SDS-PAGE das amostras bacterianas antes (NI – não induzido) e após indução (I - induzido) corados por *coomassie blue*. α B-Cristalina apresenta peso molecular de 23,5 KDa e a região C-terminal da FAK peso de 34,4KDa; **(b)** SDS-PAGE da fração de purificação por afinidade e por cromatografia de exclusão molecular do complexo α B-Cristalina/Cterminal da FAK.

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.

Nos ensaios de *cross-linking* acoplado a espectrometria de massas, o reagente de ligação cruzada utilizado (DSS-Disuccinimidil Suberato) adicionado ao complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina promoveu uma alteração no padrão de migração das bandas em gel SDS-PAGE, efeito característico da reação de *cross-linking* (Figura 34).

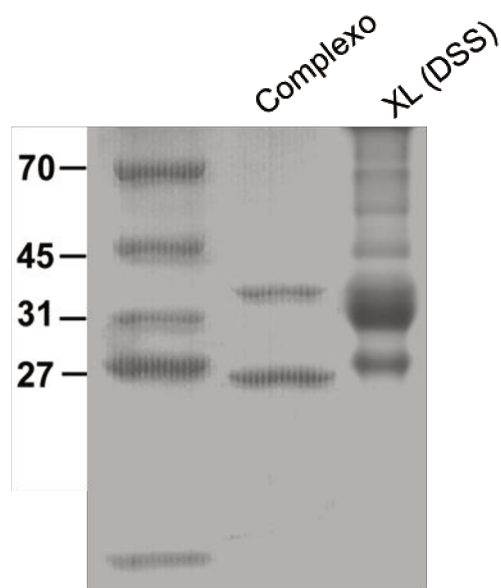


Figura 34. Ensaio de *cross-linking* com o reagente DSS. Gel SDS-PAGE do complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina após a incubação com o reagente DSS (XL).

Dentre as bandas visualizadas, verificou-se a presença de uma banda na região de massa molecular correspondente à do complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina (1:1) (34 kDa + 23 kDa = ~60 kDa). Sabendo-se que a digestão de todo material torna difícil a identificação do *cross-linking* de interesse, e que a digestão após extração das proteínas da banda de interesse do gel apresenta uma perda significativa de amostra, foi realizado uma cromatografia de exclusão molecular do complexo após adição do reagente DSS. Os picos eluídos foram concentrados e uma parte deles foi aplicada em gel SDS-PAGE. O pico 2 contém a fração isolada que contém o complexo de interesse (Figuras 35 A e B).

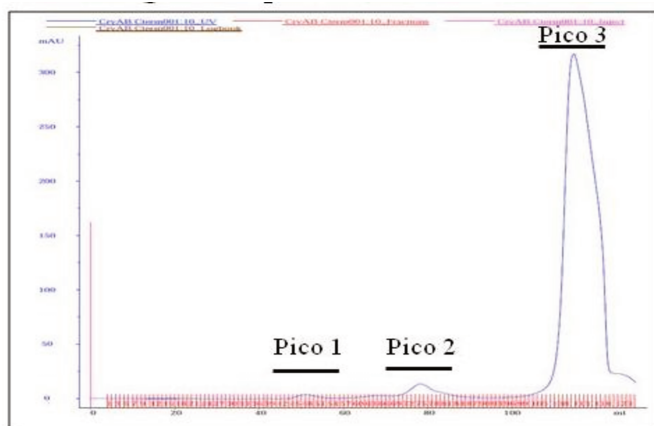
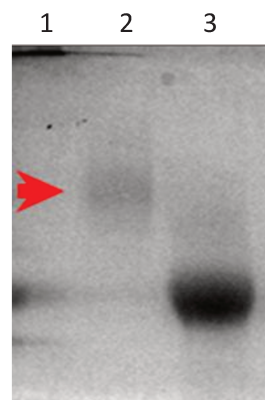
A**B**

Figura 35. Fracionamento dos complexos formados após a adição do reagente de *cross-linking* no complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina. **(a)** Cromatograma de exclusão molecular indicando os picos eluídos; **(b)** gel SDS-PAGE mostrando a banda isolada contendo o complexo de interesse (seta vermelha).

O eluato contendo o complexo de interesse (pico 2) foi digerido com tripsina e uma separação cromatográfica dos peptídeos em coluna C18 foi realizada. Em seguida, os peptídeos foram submetidos à espectrometria de massas. O espectro de MS/MS do peptídeo híbrido (C-terminal da FAK- α B-Cristalina) foi manualmente interpretado para confirmação da ligação do DSS às lisinas. A Figura 36 mostra o espectro obtido por MS/MS correspondente ao peptídeo híbrido identificado.

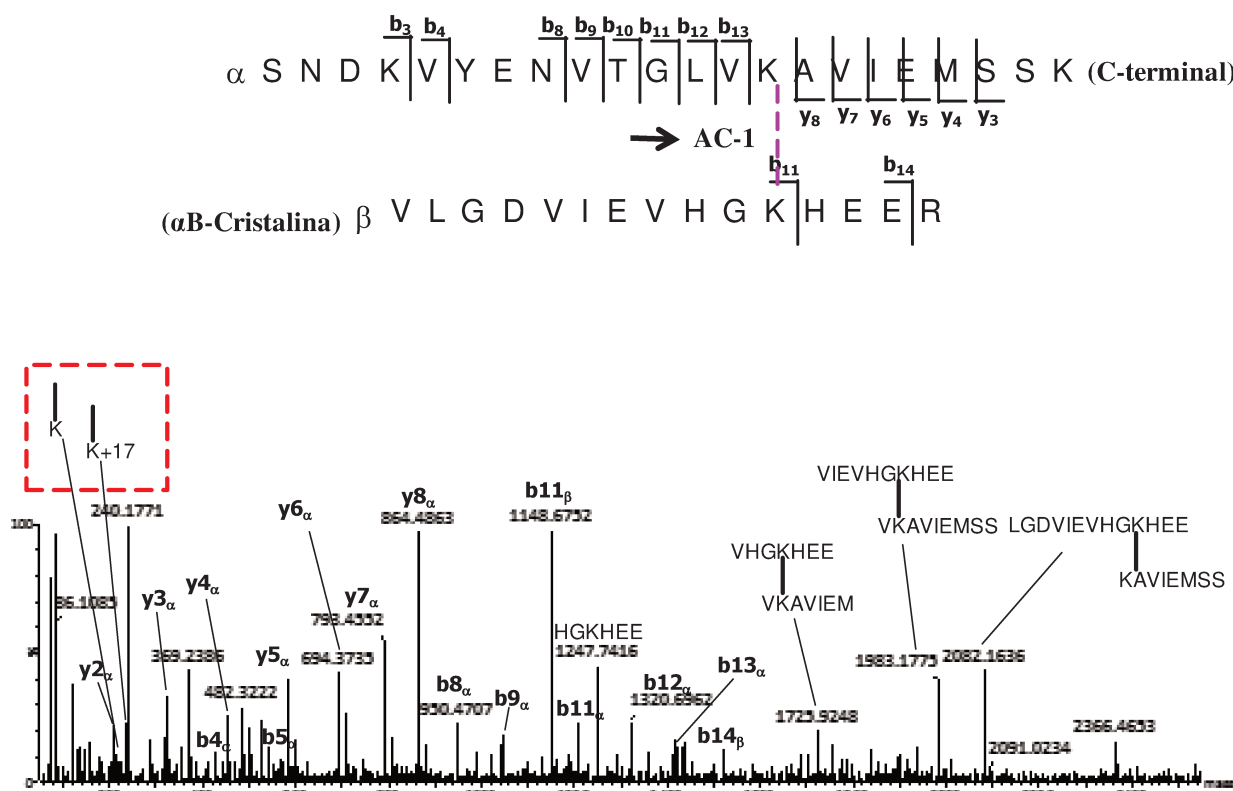


Figura 36. Identificação dos peptídeos ligados pelo reagente de *cross-linking*. Espectro de ESI-MS/MS com m/z 853.69 (+5). As seqüências foram determinadas de acordo com íons gerados pela fragmentação tipo-y (clivagem a partir da região C-terminal do complexo) e também tipo b (clivagem a partir da região N-terminal do complexo). Em destaque a seqüência peptídica “ $_{93}$ VLGDVIEVHKGHEE $_{106}$ ” da α B-Cristalina ligada covalentemente pelo DSS à seqüência “ $_{920}$ SNDKVYENVTGLVKAVIEMSS $_{940}$ ” da região C-terminal da FAK. Este par de peptídeos foi nomeado AC-1 (representado no detalhe - seta).

A interpretação do espectro de MS/MS revelou a ocorrência de íons diagnósticos m/z 222,1 (K) e 239,19 (K+17) (Figura 36 – caixa vermelha em destaque). Esses íons são formados pela fragmentação do DSS ligado pelas extremidades a dois resíduos de lisina. A formação de íons diagnósticos no espectro de análise confirmou a ligação de dois peptídeos

por um agente de ligação cruzada, já que peptídeos com essa razão massa/carga (221,1 e 239,19) não se formariam pela digestão típica por tripsina. A Figura 37 mostra o mecanismo de formação do íon m/z 222,1.

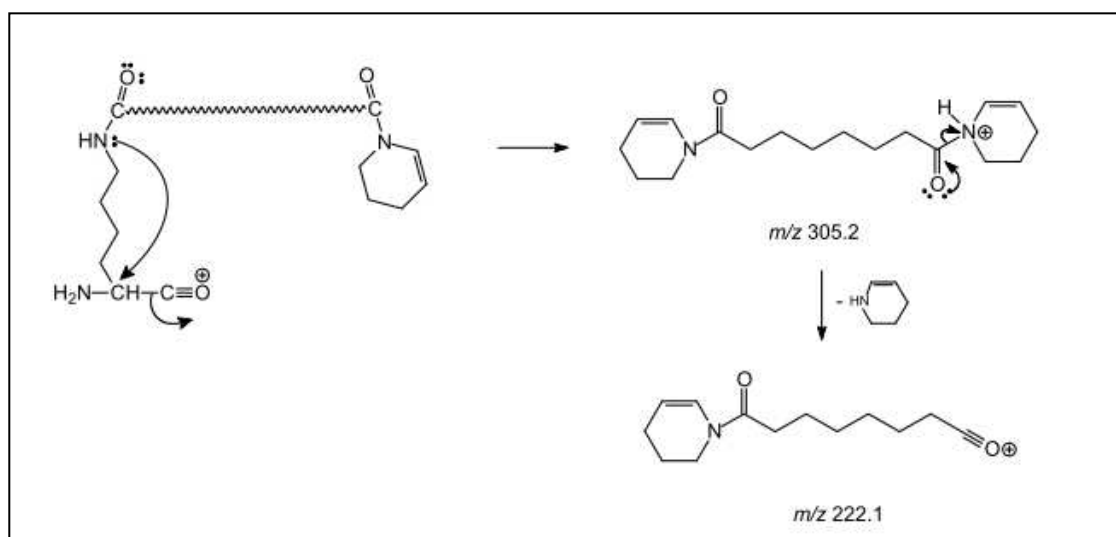


Figura 37. Mecanismo de formação do íon de m/z 222,1 (Hoshi, AI *et al.*, 2010).

Análises do espectro de MS/MS obtido do complexo C-terminal da FAK/ α B-Cristalina ligados pelo agente de *cross-linking* (DSS) indicaram que a lisina 933 do peptídeo tríptico $_{920}\text{SNDKVYENV TGLV}\mathbf{K}\text{AVIEMSSK}_{941}$ da região C-terminal da FAK encontra-se ligada à lisina 103 do peptídeo tríptico $_{93}\text{VLGDVIEVHG}\mathbf{K}\text{HEER}_{107}$ da α B-Cristalina.

Utilizando estruturas já depositadas no PDB (FAT: 1K40 e α B-Cristalina: 2KLR), a Figura 38 mostra a topologia do complexo e as lisinas envolvidas na ligação. A restrição de distância determinada pelo reagente DSS indica que os peptídeos estão localizados na

superfície de interação entre C-terminal da FAK e α B-Cristalina a uma distância aproximada entre 5 e 12 Å.

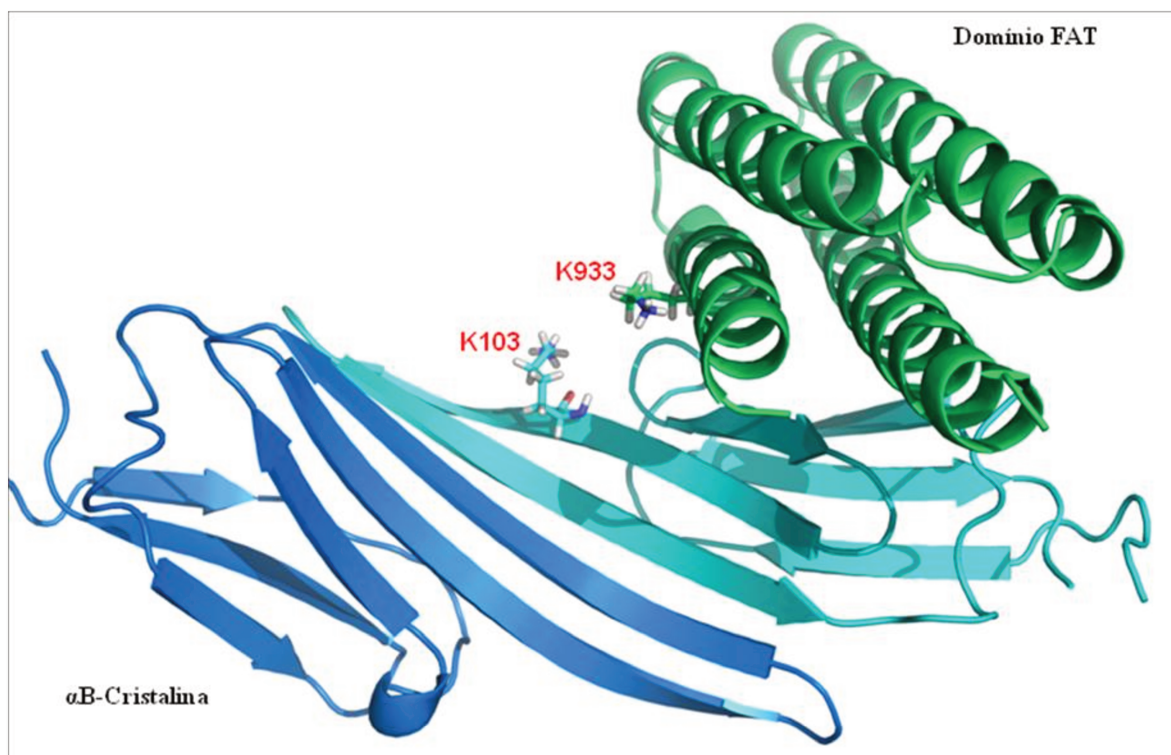


Figura 38. Identificação das lisinas envolvidas na reação de *cross-linking*. As lisinas 933 (C-terminal da FAK) e 103 (α B-Cristalina) que fizeram ligações intermoleculares estão indicadas.

Após a obtenção dos peptídeos ligados entre lisinas foi realizada uma busca por possíveis sítios de interação na superfície de α B-Cristalina. Com este objetivo, análise do potencial eletrostático *in silico* derivado da estrutura de RMN de α B-Cristalina (PDB: 2KLR) foi efetuada. O PDB 2KLR refere-se à conformação dimérica da α B-Cristalina, para facilitar a visualização foi utilizado apenas um monômero da proteína. A Figura 39 A apresenta a superfície eletrostática da α B-Cristalina. A lisina 103 está destacada. Observa-

se que o peptídeo AC-1 encontra-se adjacente a uma cavidade (*pocket*) com elevado potencial hidrofóbico (branco) formada pelas folhas $\beta 4$ e $\beta 8$ do monômero de αB -Cristalina (Figura 39B).

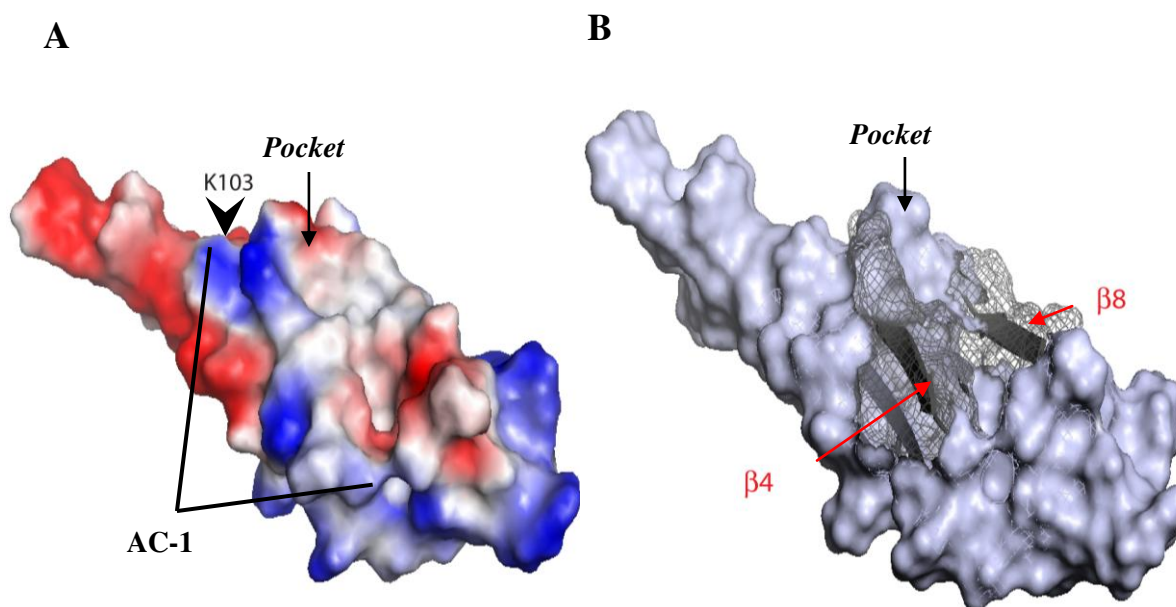


Figura 39. Superfície do monômero da αB -Cristalina com destaque para a posição da lisina 103. **(a)** Superfície eletrostática do monômero de αB -Cristalina. A lisina 103, o *pocket* hidrofóbico e o peptídeo AC-1 estão indicados; **(b)** representação do *pocket* existente entre as folhas $\beta 4$ e $\beta 8$ de αB -Cristalina.

Após a obtenção das condições de contato, dadas pelo ensaio de *cross-linking* e a predição da superfície de interação de αB -Cristalina, ensaios de mutagênese sítio-dirigidas foram realizados.

3.16. Determinação dos resíduos importantes na interface entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina

Estudos computacionais foram realizados para identificar resíduos da região C-terminal da FAK e da α B-Cristalina que poderiam contribuir para a interface de interação. Nestas análises a restrição de distância imposta pelo experimento de *cross-linking* foi utilizada como critério de exclusão. A interação de proteínas de choque térmico com proteínas alvo ocorre, primariamente, entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Derham, BK & Harding, JJ 1999). α B-Cristalina contém resíduos de aminoácidos como Leucina 89, Valina 91, Valina 93, dentre outros, presentes no *pocket* formado pelas folhas β 4 e β 8 que são importantes para acomodar cadeias laterais alifáticas de outras proteínas (Jehle, S *et al.*, 2010). Baseando-se nestas características e nas análises computacionais, foram escolhidos resíduos na predita interface entre a região C-terminal da FAK e α B-Cristalina. Como visualizado na Figura 40, mutações em resíduos das hélices 1 e 4 do domínio FAT e mutações em resíduos hidrofóbicos das folhas β 4 e β 8 de α B-Cristalina foram efetuadas.

Todas as mutações foram realizadas trocando os resíduos para Asparagina. A escolha desse resíduo foi feita com o intuito de modificar as características físico-químicas do resíduo mutado, ou seja, substituição de resíduos apolares para polar (Asparagina). Também foi considerado o tamanho da cadeia lateral do resíduo modificado. Análises computacionais mostraram estrutura inalterada das α -hélices e folhas β após substituição para o resíduo Asparagina. Em seguida, os mutantes foram expressos e purificados e então utilizados em ensaios de *pull-down*.

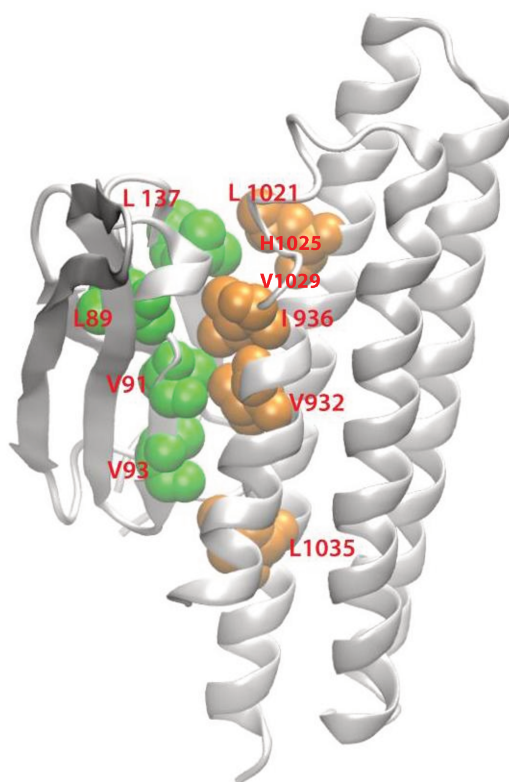


Figura 40. Representação esquemática das estruturas do domínio FAT da FAK e do domínio ACD da α B-Cristalina mostrando os resíduos mutados.

Como apresentado na Figura 41 A, as mutações pontuais de α B-Cristalina L89N e L137N reduziram a interação com a região C-terminal da FAK. O duplo mutante V91N/V93N reduziu marcadamente essa interação e o triplo mutante V91N/V93N/L137N praticamente aboliu a interação C-Terminal da FAK/ α B-Cristalina (Figuras 41 A e B), confirmando os dados anteriormente preditos nos quais as folhas β 4 e β 8 fazem parte da interface de interação com a região C-terminal da FAK. Já as mutações H1025N, V1029N, L1035N ancoradas na hélice 4 no C-terminal da FAK reduziram a associação com α B-Cristalina, indicando que a hélice 4 do domínio FAT medeia a interface de interação com α B-Cristalina. As mutações pontuais V932N, I936N e L1021N na hélice 1 do domínio FAT da FAK não foram suficientes para interferir na interação com a α B-Cristalina. É

importante ressaltar que ensaios anteriores (Figura 26) mostraram que a mutação Y925L presente na hélice 1 do domínio FAT reduziu acentuadamente a interação com α B-Cristalina. Isso indica que α B-Cristalina interage tanto na hélice 1, pelo resíduo Tyr925, como nos resíduos da hélice 4.

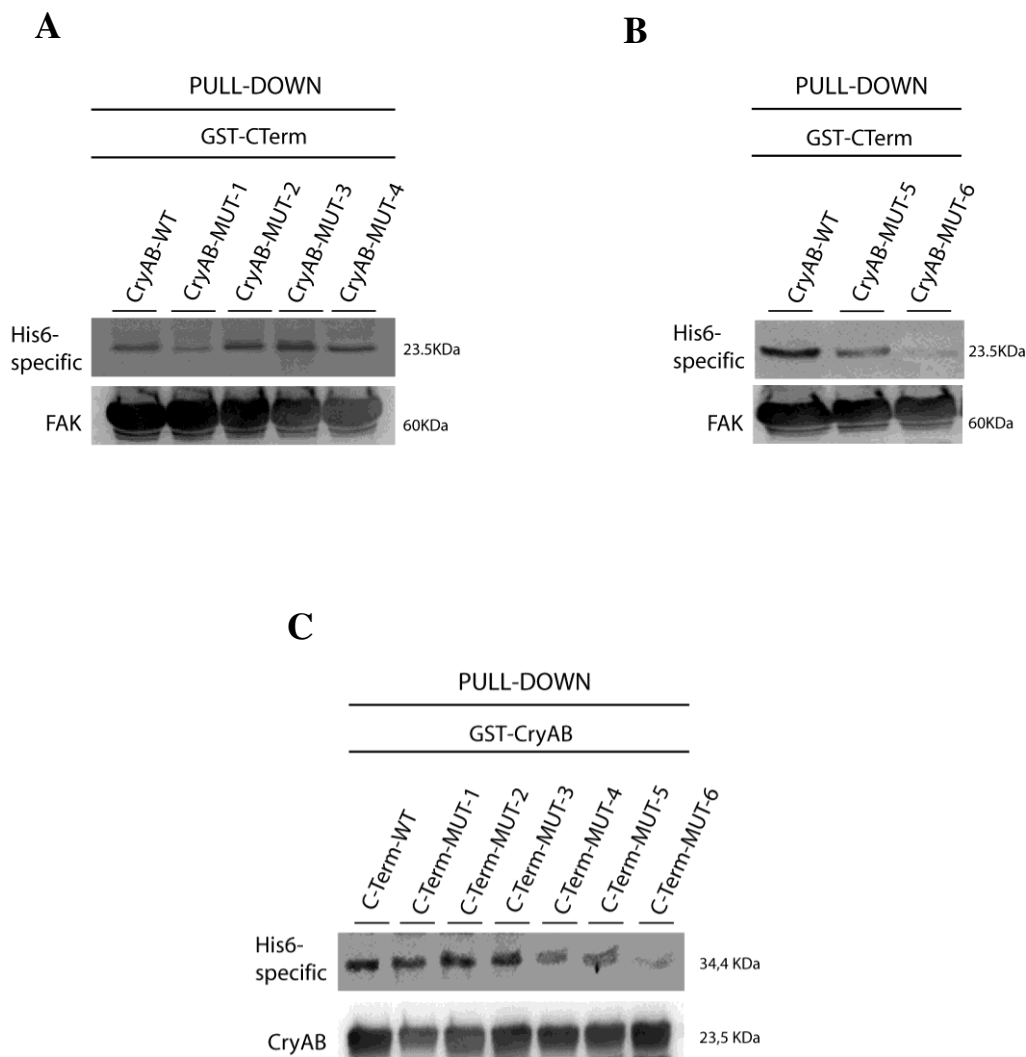


Figura 41. Mutagênese sítio-dirigida na interface do complexo C-terminal/ α B-Cristalina. (a) Ensaios de *pull down* de His-CryAB-WT, His-CryAB-MUT1: L89N, His-CryAB-MUT2: V91N, His-CryAB-MUT3: V93N, His-CryAB-MUT4: L137N com GST-Cterminal; (b) ensaios de *pull down* de His-CryAB-WT, His-CryAB-MUT5: V91N V93N; His-CryAB-MUT6: V91N V93N L137N com GST-Cterminal; (c) ensaios de *pull down* de His-Cterm-WT, His-Cterm-MUT1: V932N, His-Cterm-MUT2: I936N, His-Cterm-MUT3: L1021N, His-Cterm-MUT4: K1025N; His-Cterm-MUT5: V1029N; His-Cterm-MUT6: L1035N com GST-CryAB.

A Figura 42 destaca os resíduos de aminoácidos que se mostraram importantes para a interação entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina.

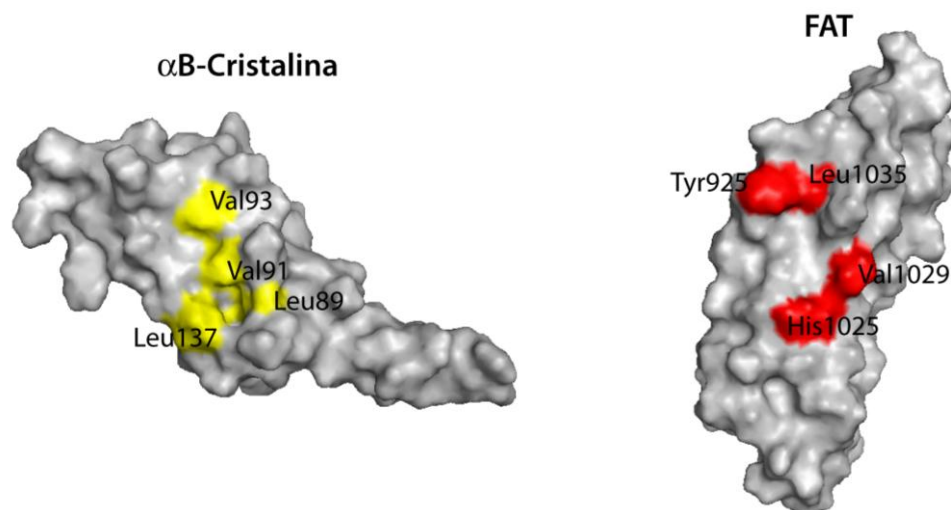


Figura 42. Superfície das proteínas α B-Cristalina (PDB: 2KLR) e domínio FAT da FAK (PDB:1K40) destacando os resíduos de aminoácidos que são importantes na interação entre essas duas proteínas.

A partir dos dados obtidos de *cross-linking* associado à mutagênese sítio dirigida, análises de *docking* molecular (GRAMM-X Protein-Protein Docking) (Tovchigrechko, A & Vakser, IA 2006) e modelagem molecular foram realizadas para confirmar a superfície de contato entre o domínio FAT da FAK e a α B-Cristalina. O *docking* foi efetuado de forma livre, sem restrição nos possíveis modelos e os cálculos de *docking* foram repetidos três vezes. A estrutura cristalográfica do domínio FAT da FAK (PDB: 1K40) e a estrutura obtida por RMN da α B-Cristalina (PDB: 2KLR) foram utilizados como entradas no programa. As dez melhores saídas, condizentes com as condições de contato dadas pelos experimentos de *cross-linking* e mutações sítio-dirigidas foram comparadas e apresentaram

um RMSD do carbono α (*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. Com base nos modelos de *docking* e modelagem molecular foi confirmada a superfície de interação das hélices 1 e 4 do domínio FAT e as folhas $\beta 4$ e $\beta 8$ da superfície de αB -Cristalina. O melhor modelo está apresentado na Figura 43A. A Figura 43B mostra em rotação de 180° C o modelo visualizado na Figura 43A. A Figura 43C indica as lisinas que participam na reação de *cross-linking*. A Figura 43 D, destaca a tirosina 925 (vermelho) em um “bolsão” formado pela lisina 92 (azul) presente na folha $\beta 4$ da αB -Cristalina. Experimentos adicionais estão sendo realizados para avaliar a importância da proximidade dos resíduos Tyr925 e Lys92 na conformação estrutural proposta neste modelo.

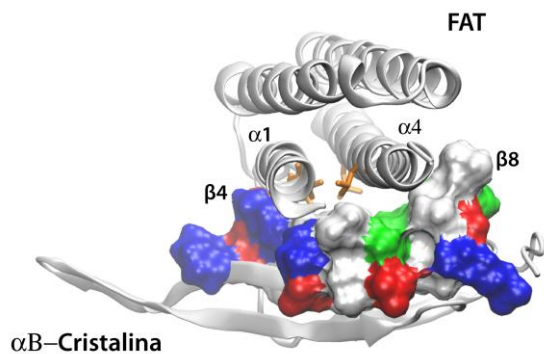
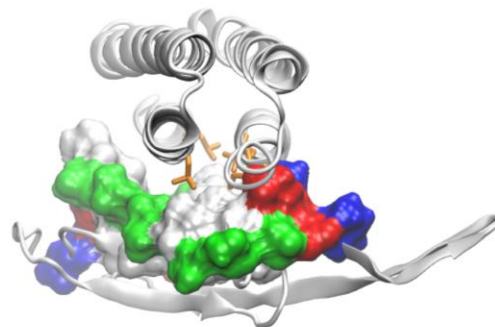
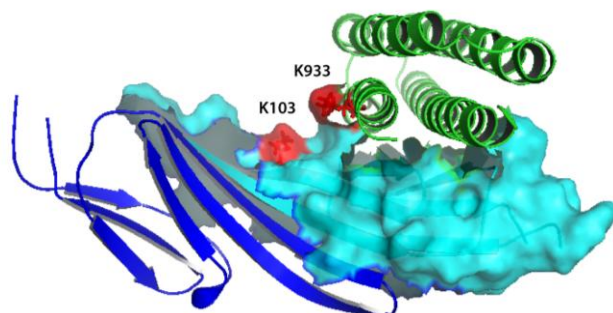
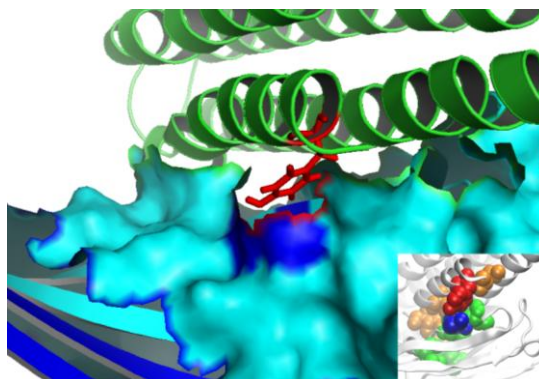
A**B****C****D**

Figura 43. Modelo proposto do complexo C-terminal/ α B-Cristalina obtido por *Docking* e modelagem molecular, utilizando-se os dados de *cross-linking* e mutagênese sítio dirigida. (a) Imagem frontal do modelo com as indicações da interface de interação envolvida; (b) rotação a 180° C do modelo, ressaltando o *pocket* hidrofóbico (branco) formado pelas folhas $\beta 4$ e $\beta 8$ da α B-Cristalina; (c) posicionamento dentro do modelo das lisinas envolvidas na reação de *cross-linking*; (d) tirosina 925 em destaque (cadeia lateral em vermelho) posicionada dentro de um bolsão formado pela Lys 92 de α B-Cristalina (azul escuro). Caixa na porção inferior direita da figura destaca a proximidade entre os resíduos Tyr925 (vermelho) e Lys 92 (azul).

3.17. Avaliação funcional da interação entre FAK e α B-Cristalina em MVRNs

Após a caracterização estrutural da interação entre a FAK e α B-Cristalina, ensaios de silenciamento gênico da α B-Cristalina foram realizados com o intuito de verificar a importância funcional da interação entre esta *small Heat Shock Protein* e a proteína FAK. Para a realização desses ensaios foi efetuada a padronização do silenciamento gênico da α B-Cristalina.

3.18. Padronização do silenciamento da α B-Cristalina

Antes de iniciar os experimentos de silenciamento por RNA *interference*, foi avaliado a eficácia de transfecção, utilizando o oligonucleotídeo fluorescente (BlockIT) em cultura de células C2C12.

3.18.1. Eficiência de transfecção em células C2C12

Para os experimentos de transfecção diferentes concentrações do oligonucleotídeo fluorescente (100, 200 e 400ng/ml) foram utilizadas. Experimentos com a técnica de imunofluorescência mostraram eficácia de transfecção semelhante para as diferentes concentrações utilizadas (Figura 44).

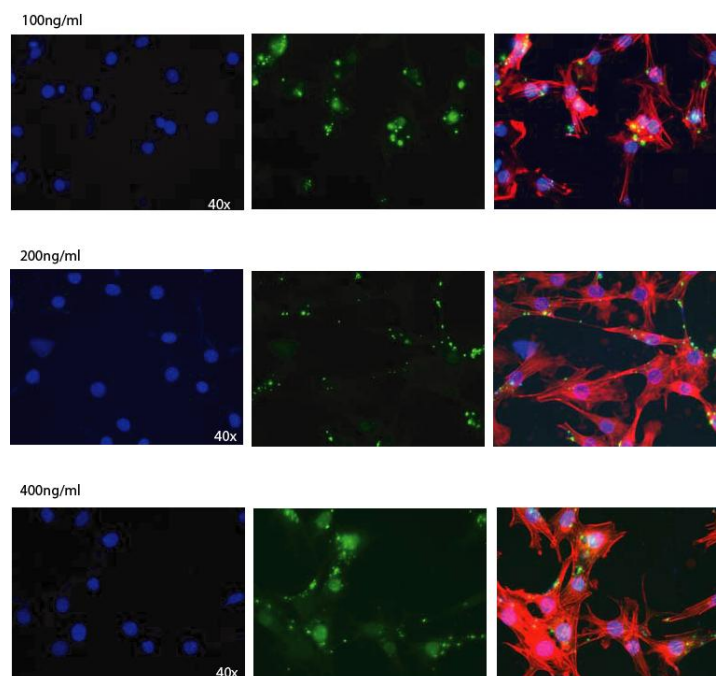


Figura 44. Imagens de Imunofluorescência de células C2C12, transfectadas com diferentes concentrações do oligonucleotídeo fluorescente (100, 200 e 400ng/ml). Em azul observa-se a marcação do núcleo (DAPI); em verde o oligonucleotídeo fluorescente (BlockIT); e em vermelho a marcação de actina (rodamina-faloidina).

3.18.2. Padronização do silenciamento da α B-Cristalina em MVRNs

Para a padronização da técnica de interferência por RNA, MVRNs foram transfectados com diferentes concentração de siRNA específico para o gene da α B-Cristalina. A Figura 45 A demonstra que a transfecção com 100 η g de siRNA α B-Cristalina / ml de meio resultou em aproximadamente 50% de redução na expressão de α B-Cristalina, enquanto que uma concentração de 200 η g de siRNA α B-Cristalina / ml de meio resultou em uma diminuição de aproximadamente 70%, sendo essa a concentração utilizada nos demais experimentos. Para o controle da especificidade, os resultados do silenciamento foram comparados com aqueles obtidos de amostras de MVRNs transfectados com siRNA

específico para a proteína GFP (siRNA com sequência irrelevante). O silenciamento da α B-Cristalina também mostrou-se efetivo em MVRNs controle ou submetidos ao estiramento cíclico (Figura 45B). Ensaio de imunofluorescência mostraram redução na marcação de α B-Cristalina, indicando a eficácia do silenciamento gênico dessa proteína em MVRNs (Figura 45C).

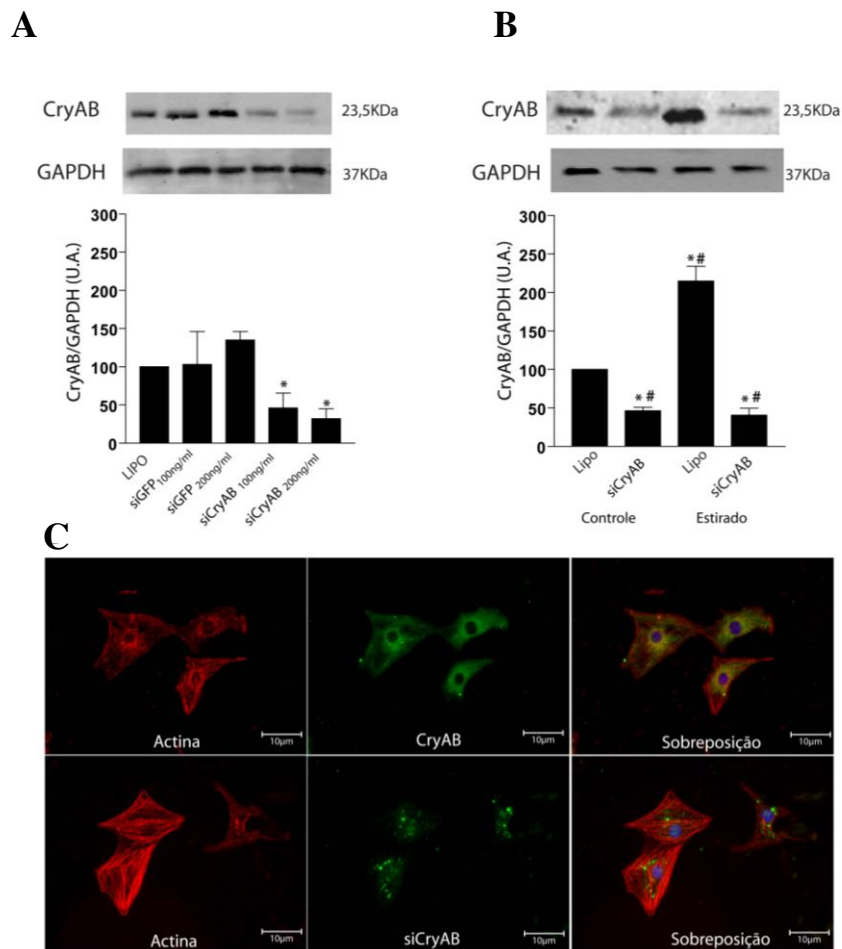


Figura 45. Ensaio de padronização do silenciamento da α B-Cristalina em MVRNs. (a) Blot representativo e gráfico de barras mostrando silenciamento gênico da α B-Cristalina em diferentes concentrações (100, 200ng/ml); (b) blot representativo e gráfico de barras mostrando silenciamento da α B-Cristalina efetivo em MVRNs controle e submetidos ao estiramento; (c) imunofluorescência mostrando diminuição da marcação com anticorpo anti- α B-Cristalina em MVRNs transfectados com siRNA α B-Cristalina. Como controle foi realizado a transfecção com siRNA^{GFP} (nas mesmas concentrações), * $p < 0.05$ vs Controle (CT) (n=6 culturas).

3.19. α B-Cristalina é importante na manutenção da integridade da FAK em MVRNs

Para avaliar se o silenciamento gênico da α B-Cristalina modifica o *turnover* protéico da FAK, ensaios com MVRNs tratados com siRNA específico para α B-Cristalina foram realizados. Como indicado na Figura 46, após o silenciamento gênico da α B-Cristalina houve uma redução na quantidade de FAK detectada em 125 KDa nas amostras de MVRNs submetidos ao estiramento cíclico. Como controle da especificidade, os resultados foram comparados com amostras de MVRNs tratados com siRNA GFP e lipofectamina (lipo). Esses resultados indicam que a α B-Cristalina é importante na manutenção da integridade estrutural da FAK em MVRNs submetidos ao estresse mecânico.

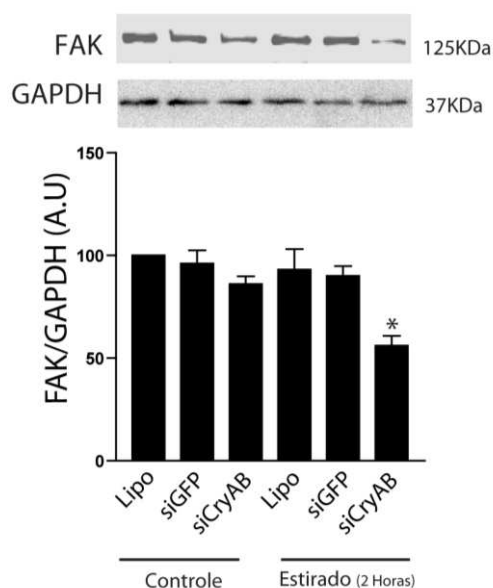


Figura 46. MVRNs tratados com siRNA α B-Cristalina mostraram diminuição na quantidade de FAK detectada em 125 KDa em células submetidas ao estiramento cíclico (10% - 2 horas). Como controle interno foi utilizado siRNA^{GFP} (n=6 culturas).

3.20. Silenciamento da α B-Cristalina promove apoptose em MVRNs

Sabendo-se do importante papel da α B-Cristalina e da FAK na manutenção da viabilidade celular, ensaios de microscopia de fluorescência foram realizados com o intuito de avaliar o fenótipo das células silenciadas e submetidas ao estiramento cíclico por 12 horas. Como demonstrado na Figura 47, a depleção da α B-Cristalina resultou em alterações morfológicas em MVRNs submetidos ou não ao estresse mecânico. As células submetidas ao silenciamento da α B-Cristalina, independente de serem estiradas ou não, apresentaram-se mais afiladas e alongadas em relação às células não silenciadas. Os MVRNs normalmente respondem ao estiramento cíclico prolongado (acima de 12 horas) promovendo um fenótipo de hipertrofia, como observado nas células transfectadas com o siRNA para GFP.

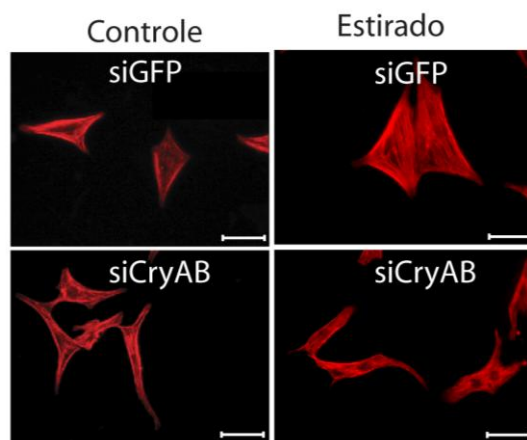


Figura 47. Efeitos do tratamento com siCryAB ou siGFP na morfologia de MVRNs controle e submetidos ao estiramento (12 horas). O silenciamento gênico da α B-Cristalina altera a morfologia dos miócitos cardíacos (n=3culturas).

Dado o papel fundamental da FAK e da α B-Cristalina na sinalização anti-apoptótica (Chen, HC *et al.*, 1996; Sonoda, Y *et al.*, 2000; Golubovskaya, VM *et al.*, 2005, 2007; Kurenova, E *et al.*, 2004; Ray, PS *et al.*, 2001; Morrison, LE *et al.*, 2003) juntamente com os dados que indicaram que o silenciamento da α B-Cristalina, com concomitante diminuição da FAK íntegra em 125KDa, é acompanhado por alterações na morfologia dos miócitos cardíacos, foi quantificado a porcentagem de apoptose em MVRNs tratados com siRNA ^{α B-Cristalina}. A Figura 48 A demonstra que o silenciamento da α B-Cristalina aumentou o número de células em apoptose tanto em miócitos cardíacos controle (~%10) como naqueles submetidos ao estresse mecânico (~55%). Também foi analisada a viabilidade celular total dos miócitos cardíacos, por meio de ensaios de exclusão por Azul de Tripan. Os resultados apresentados indicam que o estiramento cíclico não modificou significativamente a viabilidade celular. No entanto, a depleção da α B-Cristalina promoveu diminuição na viabilidade celular, o que mostra o papel crítico desta proteína na viabilidade de miócitos cardíacos submetidos ao estiramento cíclico (Figura 48B).

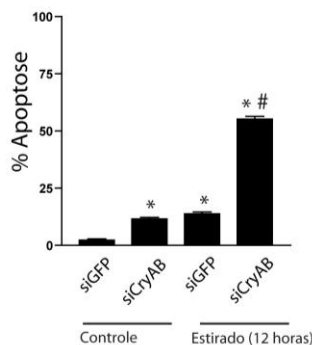
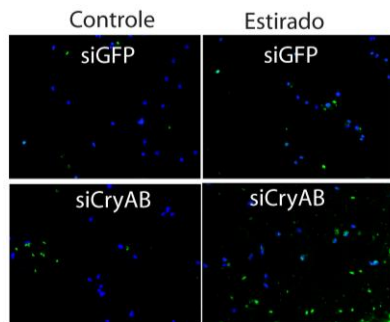
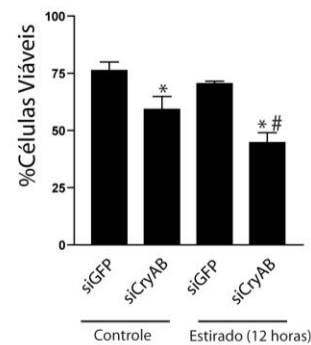
A**B**

Figura 48. Efeitos do tratamento com siCryAB ou siGFP na viabilidade celular de MVRNs controle e submetidos ao estiramento por 12 horas. **(a)** Marcação de células apoptóticas por TUNEL. Gráfico de barras mostrando os valores médios da quantificação de células apoptóticas (TUNEL); **(b)** gráfico de barras mostrando os valores médios da quantificação de células viáveis (Exclusão por Azul de Tripan). * $p < 0.05$ vs. Controle (CT); # $p < 0.05$ vs. Estiramento (siGFP) (n=3 culturas).

3.21. Superexpressão da FAK reverte às alterações fenotípicas promovidas pelo silenciamento gênico da α B-Cristalina em MVRNs

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a chaperona α B-Cristalina interage com a região C-terminal da FAK sendo importante para a manutenção da integridade da FAK durante o estresse mecânico. Dado que tanto a integridade e ativação da FAK como a α B-Cristalina possuem papel crítico na resposta anti-apoptótica em miócitos cardíacos, os resultados apontam para a possibilidade de que a atenuação da quantidade de FAK após o silenciamento da α B-Cristalina seja o mecanismo responsável pela morte celular de miócitos cardíacos em resposta ao estresse mecânico.

Para averiguar esta hipótese, ensaios de co-transfecção com o plasmídeo pRc/CMV Myc-FAK que contém o gene da FAK fusionado a uma cauda Myc, seguido de silenciamento gênico da α B-Cristalina foram realizados. As Figuras 49 A e B mostram a padronização da superexpressão da FAK. As Figuras 49C e 49D demonstram que miócitos cardíacos transfectados com o plasmídeo pRc/CMV Myc-FAK apresentaram aumento da área celular (~35%) e apoptose reduzida em relação ao controle. Células transfectadas com siRNA ^{α B-Cristalina} apresentaram redução da área celular (~30%) e apoptose aumentada em relação ao controle. Já as células co-transfectadas com o plasmídeo da FAK e o siRNA ^{α B-Cristalina} apresentaram área celular e apoptose semelhantes ao controle, mostrando que a super-expressão da FAK foi capaz de reverter o fenótipo observado em miócitos cardíacos submetidos ao silenciamento gênico da α B-Cristalina.

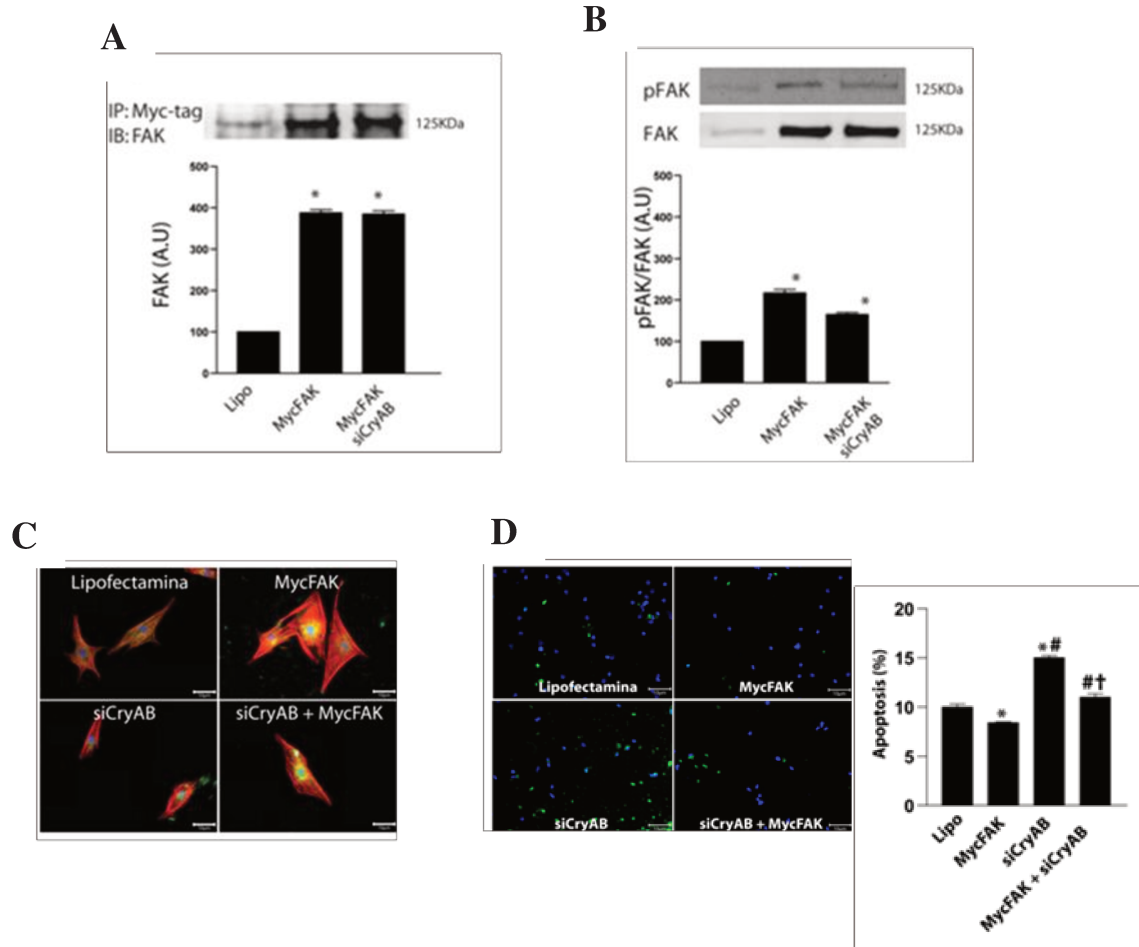


Figura 49. Superexpressão da FAK reduz efeitos deletérios promovidos pelo silenciamento gênico da α B-Cristalina. **(a)** Imunoprecipitação com anti-Myc e *Blotting* com anti-FAK de MVRNs controle, transfectados com pRc/CMVFAKwt e co-transfectados com pRc/CMVFAKwt e siRNA α B-Cristalina; **(b)** *blotting* e gráficos de barras mostrando aumento da fosforilação e expressão de FAK em células transfectadas com pRc/CMVFAKwt; **(c)** marcação de fluorescência com faloidina e anti-FAK mostrando a morfologia dos MVRNs; **(d)** marcação de células apoptóticas por TUNEL. Gráfico de barras mostrando os valores médios da quantificação de células apoptóticas (TUNEL). * 0.05 vs. Controle (Lipofectamina); # p < 0.05 vs. Myc-FAK; † p < 0.05 vs siCryAB. As marcações em verde e vermelho correspondem a FAK e actina, respectivamente. (n=3 culturas).

3.22. α B-Cristalina protege a FAK da degradação pela calpaína 2

Diante do conjunto de resultados que demonstra a importância funcional da interação FAK/ α B-Cristalina na integridade protéica da FAK e na sobrevivência de miócitos cardíacos, e sabendo-se que a regulação proteolítica da FAK está relacionada à manutenção da sobrevivência celular (Gervais, FG *et al.*, 1998; Chan, KT *et al.*, 2010), foram realizados ensaios de clivagem *in vitro* da FL-FAK pela calpaína 2 na ausência e presença de α B-Cristalina, para averiguar se esta chaperona protege a FAK da degradação pela calpaína 2.

A calpaína 2 é uma protease dependente de cálcio que cliva a FAK em um sítio (Valina 744) localizado na região C-terminal desta proteína, produzindo um produto de aproximadamente 35KDa (Chan, KT *et al.*, 2010). Como esperado a adição de calpaína 2 (10nM ou 50nM) acrescido de 1mM de CaCl_2 , levou a diminuição da banda de 146KDa, referente a FAK inteira fusionada a GST. Essa diminuição foi acompanhada por um aumento na banda de aproximadamente 35 KDa, indicando que a calpaína 2 atuou em seu sítio de clivagem na região C-terminal da FAK. Amostras pré-incubadas com concentrações crescentes de α B-Cristalina apresentaram uma maior quantidade de FAK inteira, com concomitante diminuição do produto de clivagem produzido na presença da calpaína (Figura 50).

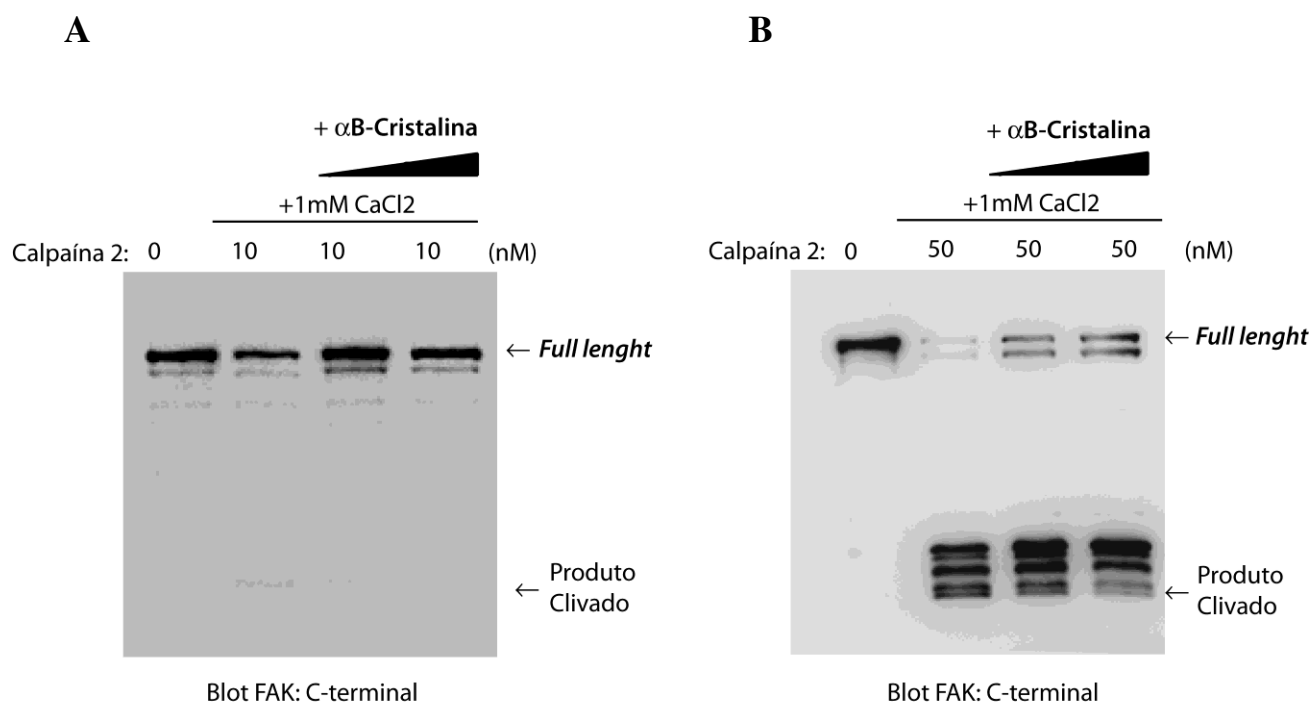


Figura 50. αB-Cristalina protege a FAK da degradação pela calpaína 2. **(a, b)** As amostras aplicadas no gel apresentam a seguinte ordem: 1. FAK sozinha; 2. FAK+calpaína 2 (10nM ou 50nM) + 1mM CaCl₂; 3. FAK+ CryAB + calpaína (10nM ou 50nM) + 1mM CaCl₂; 4. FAK + CryAB + calpaína (10nM ou 50nM) + 1mM CaCl₂. As reações de clivagem foram analisadas por *imunoblotting* com anticorpo específico anti-FAK c20.

Este resultado indica que αB-Cristalina protege a FAK da degradação pela calpaína 2 *in vitro*, podendo justificar os dados encontrados em células nos quais observou-se que o silenciamento gênico da αB-Cristalina culminou em uma redução de FAK detectada em 125 KDa e um aumento da taxa de apoptose celular. Assim, αB-Cristalina pode estar atuando, por meio de sua interação com a região C-terminal da FAK, na proteção desta enzima da degradação mediada pela calpaína 2 em miócitos cardíacos durante o estresse mecânico.

4. DISCUSSÃO

4.1. FAK, α B-Cristalina e o Estresse mecânico

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 por meio da autofosforilação do resíduo tirosina 397 (Fonseca, PM *et al.*, 2005; Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003) e contribui para as alterações estruturais e funcionais instaladas durante o processo de hipertrofia cardíaca (Clemente, CFMZ *et al.*, 2007; DiMichele, LA *et al.*, 2006). Assim, uma compreensão detalhada dos mecanismos responsáveis pela manutenção da integridade e dos níveis de atividade desta quinase após estímulos mecânicos podem ser úteis para obter melhor entendimento dos mecanismos moleculares de sinalização desta quinase em miócitos cardíacos.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a expressão de α B-Cristalina é induzida por vários estímulos, principalmente aqueles com potencial de produzir estresse celular (Parcellier, A *et al.*, 2005). Recentemente, foi verificado que a expressão de α B-Cristalina pode ser induzida pela sobrecarga pressórica (Kumarapeli, ARK *et al.*, 2008). Em adição, tem sido relatado que as propriedades de chaperona molecular de α B-Cristalina são moduladas pela fosforilação diferencial em Ser-19, 45, 59 (Ito, H *et al.*, 1997). Especificamente, o estresse parece aumentar a ativação de MAPKAPK-2 mediada por p38, culminando com a fosforilação da α B-Cristalina em Ser-59 (Hoover, HE *et al.*, 2000).

No presente trabalho foi demonstrado que, em miócitos cardíacos submetidos ao estresse mecânico, ocorre aumento da expressão e fosforilação em Serina 59 de α B-Cristalina, aumento das fosforilações em Tyr397 e Tyr925 da FAK e também aumento da associação entre FAK e α B-Cristalina. Foi estabelecido que essa associação ocorre de

maneira direta e é mediada pela região C-terminal da FAK. Também foi evidenciado que a fosforilação do resíduo Tyr925 da FAK é importante para a interação entre α B-Cristalina/FAK e que um *pocket* localizado nas folhas β 4 e β 8 de α B-Cristalina constitui o sítio de interação com as hélices 1 e 4 da região C-terminal da FAK. Além disso, foi demonstrado que o silenciamento da α B-Cristalina por RNA de interferência resulta em diminuição da quantidade de FAK detectada em 125KDa em extratos de miócitos cardíacos submetidos ao estiramento cíclico. Esse efeito foi concomitante a um aumento na apoptose e diminuição da viabilidade celular. Em seguida, foi demonstrado que a superexpressão de FAK foi capaz de reverter o fenótipo estabelecido pelo silenciamento de α B-Cristalina, ou seja, as células apresentaram uma taxa de apoptose semelhante à observada nas células controle. Como FAK é um alvo de proteases intracelulares, e sua degradação apresentou-se aumentada com a diminuição da expressão de α B-Cristalina, foi testado se α B-Cristalina poderia proteger FAK da degradação pela Calpaina 2, a qual cliva a FAK na região C-terminal. A pré-incubação da FAK com α B-Cristalina mostrou-se eficaz na proteção da FAK pela degradação efetuada pela calpaína 2. Estes dados sugerem que α B-Cristalina interage e protege a FAK da degradação pela calpaína 2 e que a associação da α B-Cristalina com a FAK é importante para a sobrevivência de miócitos cardíacos durante estresse mecânico.

4.2. Estresse mecânico aumenta a interação entre FAK/ α B-Cristalina

Em miócitos cardíacos, FAK apresenta baixa ativação em condições basais e após o estresse mecânico ela se ativa e passa a exercer seus efeitos celulares (Taylor, JM *et al.*, 2000; Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003).

Experimentos realizados no presente estudo confirmaram que após o estiramento cíclico de miócitos cardíacos ocorre uma rápida (a partir de 1 hora) e sustentada (até 12 horas) ativação da FAK, detectada pelas fosforilações nos resíduos Tyr397 e Tyr925. Foi também demonstrado que o estiramento dos miócitos cardíacos leva a um aumento na expressão e fosforilação em Ser-59 da α B-Cristalina, o que indica a importância desta chaperona na proteção de miócitos cardíacos após esse estresse celular.

Devido à importância da FAK nos eventos de mecanotransdução e sobrevivência celular e uma provável necessidade de proteção intracelular foi avaliado se FAK interage com α B-Cristalina em miócitos cardíacos submetidos ao estresse mecânico. Experimentos de co-imunoprecipitação demonstraram que ocorre associação basal entre FAK e α B-Cristalina e que essa associação aumenta após o estresse mecânico. Além disso, foi demonstrado que o aumento desta interação ocorre com FAK em seu estado ativo, fosforilado.

Diferentes trabalhos vêm ressaltando a interação de α B-Cristalina com diversas proteínas regulatórias, estruturais e enzimas (Ghosh, JG *et al.*, 2005, 2006(a), 2006(b), 2007). Contudo muito pouco se sabe sobre a importância funcional dessas interações em um contexto biológico específico.

Recentemente, Zong, X-Y e colaboradores (2009) demonstraram a interação de chaperonas específicas (HSP70/HSP90) com a proteína quinase de reguladores de *splicing* (SRPK1). Essa interação parece modular o *splicing* alternativo, por meio da fosforilação diferencial de Reguladores de *Splicing* (SRs) via complexo SRPK1/HSP70_HSP90, indicando uma importância funcional da interação de chaperonas com moléculas de sinalização.

No presente estudo foi demonstrado que, após o estresse mecânico, o qual ativa vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e hipertrofia em miócitos cardíacos, ocorre aumento na associação entre FAK e α B-Cristalina, o que sugere uma importância funcional desta interação na sinalização pela FAK em miócitos cardíacos submetidos ao estresse.

4.3. FAK interage diretamente com α B-Cristalina

Ensaio de *pull down* com as proteínas recombinantes FL- α B-Cristalina (*Full lenght* α B-Cristalina) e FL-FAK (*Full lenght* FAK) demonstraram que FAK interage diretamente com α B-Cristalina. Após a demonstração da interação direta entre essas proteínas, ensaios de *pull down* com os domínios recombinantes da FAK revelaram que a região C-terminal da FAK é responsável pela interação com α B-Cristalina *in vitro*. Além disso, experimentos de anisotropia de fluorescência mostraram que a região C-terminal da FAK se liga com alta afinidade a α B-Cristalina.

Após os experimentos realizados com as proteínas expressas em sistemas heterólogos, experimentos com extratos celulares de miócitos cardíacos controle ou submetidos ao estiramento cíclico demonstraram que a região C-terminal da FAK é a única que precipita α B-Cristalina endógena. Nesses ensaios de *pull-down* com o extrato celular foi observado uma maior interação entre a região C-terminal da FAK com α B-Cristalina proveniente de extratos de miócitos cardíacos submetidos ao estiramento. Este dado é condizente com os dados que demonstraram um aumento da expressão dessa proteína após o estresse mecânico.

A interação entre a proteína purificada α B-Cristalina e FAK endógena também foi confirmada em extratos de miócitos cardíacos controle ou submetidos ao estiramento. Neste

ensaio também houve uma maior precipitação de FAK nas amostras provenientes do estiramento, o que condiz com o fato do estresse mecânico ativar FAK, e que em seu estado ativo aumenta sua associação com α B-Cristalina.

A interação dos domínios de FAK com distintas proteínas é essencial para a regulação e sinalização de diferentes vias (Franchini, KG *et al.*, 2011). Apesar de demonstrações prévias da interação da região C-terminal da FAK com outras proteínas (Hildebrand, JD *et al.*, 1993; Hildebrand, JD *et al.*, 1996; Schlaepfer, DD *et al.*, 1996; Grigera, PR *et al.*, 2005; Liu, Y *et al.*, 2002), o presente trabalho demonstra pela primeira vez uma interação física entre a região C-terminal da FAK e uma proteína da família das *small Heat Shock Proteins*.

4.4. A tirosina 925 e sua fosforilação são importantes para a interação FAK/ α B-Cristalina

Uma etapa importante para o entendimento da funcionalidade da interação FAK/ α B-Cristalina é o esclarecimento da importância da Tyr 925 da região C-terminal da FAK nessa interação. Para avaliar a importância da Tyr925 na associação entre FAK e α B-Cristalina foram realizados ensaios de *pull-down* com a região C-terminal da FAK selvagem e mutata no resíduo Tyr925, submetidas à fosforilação pela c-Src, e α B-Cristalina purificada e ligada à resina de níquel. Com estes ensaios foi confirmado que a fosforilação no resíduo Tyr925 é responsável por um aumento na associação entre essas duas proteínas e que a falta desse resíduo, dada por sua substituição por uma leucina, reduz drasticamente essa interação. Estes dados mostram que tanto a fosforilação do resíduo Tyr925 quanto a sua presença são fundamentais na associação entre FAK e α B-Cristalina *in vitro*.

Para demonstrar a importância da fosforilação do resíduo Tyr925 na associação entre essas duas proteínas em células, miócitos cardíacos em cultura foram tratados previamente com o inibidor seletivo para a Src, PP2, antes de serem submetidos ao estiramento cíclico. Com o estresse mecânico, FAK se autofosforila no resíduo tirosina 397 onde expõe um sítio de reconhecimento SH2 para a proteína Src, o que possibilita a formação do complexo FAK/Src e a fosforilação pela Src de outros resíduos de tirosinas ao longo da FAK, como a Tyr925 (Marin, TM *et al.*, 2008; Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003; Torsoni, AS *et al.*, 2005). Com o tratamento prévio com PP2, houve uma diminuição dos níveis de fosforilação no resíduo Tyr925 nas células submetidas ao estiramento cíclico, o que demonstra a eficiência do PP2 em inibir a Src e consequentemente a fosforilação da Tyr925 da FAK. Os experimentos de co-imunoprecipitação entre FAK e α B-Cristalina demonstraram que a diminuição da fosforilação do resíduo Tyr925 é acompanhada por uma redução na associação entre essas duas proteínas após o estresse mecânico, indicando a importância da fosforilação desse resíduo para a interação entre FAK e α B-Cristalina.

Em seguida, para averiguar a importância do resíduo Tyr925 na associação entre FAK e α B-Cristalina, foram realizados ensaios de superexpressão da FAK selvagem e mutada nesse resíduo em células C2C12. Após a superexpressão e imunoprecipitação da FAK, observou-se uma redução na associação entre α B-Cristalina e FAK mutada no resíduo Tyr925 em relação à FAK selvagem.

Diferentes trabalhos (Schlaepfer, DD *et al.*, 1994; Franchini, KG *et al.*, 2000; Domingos, PP *et al.*, 2002; Torsoni, AS, Constancio, SS *et al.*, 2003) descreveram a associação de proteínas sinalizadoras na região C-terminal da FAK, como a interação da Grb2 e SOS que ocorre na hélice 1 do domínio FAT, na qual a fosforilação do resíduo

Tyr925 é essencial. Estes dados indicam que a fosforilação no resíduo Tyr 925 pode ser acompanhada por mudanças conformacionais que possibilitariam a associação com proteínas que se ligam a FAK preferencialmente em seu estado fosforilado. Para elucidar possíveis diferenças conformacionais entre o domínio FAT não fosforilado e seu correspondente fosforilado, que justifique a modificação observada no perfil de interação FAK/ α B-Cristalina, ensaios de RMN bi-tridimensional foram realizados. Os resultados de RMN mostraram que a fosforilação do resíduo Tyr 925 leva a uma modificação estrutural na região N-terminal do domínio FAT da FAK. Esse resultado está em conformidade com estudos prévios que resolveram a estrutura cristalográfica do domínio FAT (Arold, ST *et al.*, 2002). Predominantemente, esse domínio apresenta-se como um motivo compacto fechado de 4 hélices antiparalelas (*four-helix bundle*) (Arold, ST *et al.*, 2002; Hayashi, I *et al.*, 2002). Contudo, uma segunda estrutura foi descrita com uma conformação aberta, parcialmente desestruturada da hélice 1. Essa conformação forma *in vitro* uma estrutura dimérica (Arold, ST *et al.*, 2002). Como o cristal foi obtido a partir de altas concentrações de proteína, é possível que essa conformação dimérica seja consequência de uma dinâmica estrutural da hélice 1, não sendo ainda claro a relevância funcional dessa conformação. De fato, estudos posteriores utilizando RMN mostraram que o domínio FAT é predominantemente um monômero em solução, porém resíduos da hélice 1 apresentam alterações conformacionais, o que indica que essa hélice apresenta dinâmica estrutural inerente (Prutzman, KC *et al.*, 2004). Dada a predisposição da hélice 1 a mudanças conformacionais, é possível que a a fosforilação da Tyr 925 leve a exposição de resíduos hidrofóbicos nesta região, justificando assim o aumento observado na associação da α B-Cristalina com a região C-terminal fosforilada. Já está bem estabelecido que, sob condições

de estresse, chaperonas moleculares aumentam sua síntese, e interagem com superfícies hidrofóbicas expostas em proteínas parcialmente desnaturadas (Derham, BK & Harding, JJ 1999). As alterações conformacionais observadas pela fosforilação da Tyr 925 parecem ser igualmente importantes para a ligação de Grb2 à FAK (Arold, ST *et al.*, 2002; Liu, G *et al.*, 2002; Prutzman, KC *et al.*, 2004).

Além da exposição de resíduos hidrofóbicos das hélices 1 e 4, o aumento da interação também pode ser justificado pela proximidade física entre o resíduo Tyr925 do domínio FAT e o resíduo Lys92 da α B-Cristalina. Estudos computacionais de modelagem molecular foram realizados e mostraram que o resíduo Tyr925 do domínio FAT encontra-se espacialmente próximo a Lys 92 de α B-Cristalina (em torno de 3.26 Å). A Lys92 forma a parede de uma cavidade na superfície da hélice 1 do domínio FAT, que acomoda a cadeia lateral volumosa da Tyr925 (Figura 43D). A energia de ligação calculada para o complexo com Tyr 925 não fosforilada é em torno de 395Kcal/mol. Já quando Tyr 925 está fosforilada, sua carga negativa pode interagir fortemente com a carga positiva de Lys92 formando uma ponte salina, com uma energia de ligação calculada na presença de fosforilação no resíduo 925 em torno de 522Kcal/mol. Esse aumento de energia é decorrente da formação da ligação iônica entre a Lys92 e o grupo fosfato da Tyr925, o que poderia contribuir para o aumento da estabilidade do complexo. He, X e colaboradores em 2006, mostraram que os resíduos Fenilalina e Arginina do Receptor de Peptídeo Natriurético (NPR), localizados em um *pocket*, servem como suporte e funcionam como requerimento primário para a ligação entre NPR e Peptídeo Natriurético (NP). Esses resíduos parecem estar relacionados com a afinidade e estabilidade de ligação. Outros resíduos periféricos, geralmente hidrofóbicos, presentes em região diferente do receptor

definem a seletividade ligante-receptor. Extrapolando para os resultados apresentados no presente trabalho é possível que a Tyr925 presente na hélice 1 do domínio FAT defina a afinidade e estabilidade de ligação entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina e o conjunto de resíduos de aminoácidos presentes na hélice 4 estejam relacionados a especificidade dessa ligação. Experimentos adicionais de mutagênese sítio dirigida estão sendo realizados para confirmar esta hipótese.

4.5. Bases estruturais da interação FAK/ α B-Cristalina

No presente estudo, utilizando-se uma série de ensaios bioquímicos, foi demonstrada a existência de uma interação física entre a região C-terminal da FAK e a chaperona α B-Cristalina. As bases estruturais dessa interação foram investigadas por meio de uma combinação de abordagens moleculares e estruturais. A técnica de *cross-linking* acoplada à espectrometria de massas, juntamente com mutações pontuais sítio dirigidas permitiram a obtenção das condições de contato deste complexo e possibilitou a elaboração e validação de modelos de interação por meio de *docking* e modelagem molecular.

Ensaio de *cross-linking* acoplado à espectrometria de massas vêm sendo utilizados com sucesso na obtenção de informações da estrutura tridimensional de proteínas, uma vez que fornece restrições de contato que podem ser empregadas na elaboração de modelos estruturais de interação entre duas proteínas (Alley, SC *et al.*, 2001; Chu, F *et al.*, 2004; Trakselis, MA *et al.*, 2005). Utilizando-se esta técnica definiu-se que a lisina 103 da α B-Cristalina encontra-se próxima, numa distância entre 5 a 12 Å, da lisina 933 da hélice 1 do domínio FAT da FAK. Este foi um importante dado utilizado como restrição na elaboração do modelo de interação entre a região C-terminal da FAK e a α B-Cristalina.

Ensaio de mutagênese sítio dirigida identificaram resíduos importantes na associação entre FAK e α B-Cristalina. A mutação na Tyr925, presente no domínio FAT da FAK, reduziu drasticamente a interação entre essas proteínas tanto *in vitro* quanto em ensaios de superexpressão em células. Interessante, que no modelo proposto, a Tyr925 encontra-se próxima a Lys92 da α B-Cristalina, que está circundada por resíduos hidrofóbicos, presentes na folha β 4. Esses resíduos (L89, V91, V93) mostraram ser importantes na associação com a região C-terminal da FAK. Outro resíduo hidrofóbico da α B-Cristalina L137 assim como os resíduos H1025, V1029, L1035 da hélice 4 do domínio FAT da FAK também mostraram ser importantes nesta interação, uma vez que, quando mutados, promoveram uma redução na associação entre FAK e α B-Cristalina. Além disso, observou-se que esses resíduos são altamente conservados, indicando sua importância na estrutura e funcionamento destas proteínas.

Após a obtenção das condições de contato dadas pelas técnicas de *cross-linking* acoplada à espectrometria de massas juntamente com as mutações pontuais foi possível a elaboração de um modelo de interação entre o domínio FAT da FAK e o domínio ACD da α B-Cristalina, ambas com estrutura depositada no PDB (1K40 e 2KLR, respectivamente). No modelo obtido, a interface de interação é constituída pelas folhas β 4 e β 8 da α B-Cristalina e as α -hélices 1 e 4 do domínio FAT da FAK. Conforme estudos prévios (Sharma, KK *et al.*, 1997; Ghosh, JG *et al.*, 2006c), as folhas β 4 e β 8 de α B-Cristalina formam um *pocket* hidrofóbico importante para a ligação de proteínas específicas, principalmente àquelas envolvidas em vias anti-apoptóticas. Interessantemente, FAK possui importante papel na sobrevivência celular, ativando vias anti-apoptóticas e

principalmente, inibindo sinalização pró-apoptótica (Xu, L-H *et al.*, 2000; Cance, WG & Golubovskaya, VM 2008).

Vários trabalhos vêm ressaltando a importância de grupos específicos de resíduos de aminoácidos dentro de uma interface de interação protéica. Estas regiões são conhecidas como “*hot spots*” (Ma, B *et al.*, 2003). São esses locais que determinam a energia de ligação da interação protéica. Particularmente, *hot spots* parecem ser enriquecidos com resíduos de Triptofano, Tirosina e Arginina que ficam circundados por anéis hidrofóbicos, importantes para obstruir grandes quantidades de solvente (Bogan, AA & Thorn, KS 1998). Geralmente, essas regiões são formadas por resíduos de aminoácidos conservados, que apesar de estarem presentes em proteínas distintas, comportam-se de maneira diferente em interações específicas, distinguindo os sítios de ligação em uma interface de interação (Ma, B *et al.*, 2003).

O conjunto de resultados obtidos indica a existência de *hot spots* ao longo da interface de interação FAK/ α B-Cristalina. Ma, B e colaboradores em 2003 destacaram o desenvolvimento de drogas direcionado a ligação não apenas na interface de uma importante interação protéica, mas drogas que se associam especificamente a *hot spots* previamente identificados. Essa possibilidade aumenta a especificidade da droga a um alvo biológico. A descrição dos *hot spots* apresentados no presente trabalho possibilita no futuro o emprego de desenho racional de drogas para modular a interação FAK/ α B-Cristalina em diferentes contextos fisiopatológicos.

4.6. A interação FAK/ α B-Cristalina é importante para a sobrevivência de miócitos cardíacos durante estresse mecânico

No contexto celular diferentes proteínas são importantes para modular a atividade e preservar a integridade da FAK. O presente trabalho demonstrou por meio de ensaios de silenciamento gênico que a redução da expressão da α B-Cristalina resulta em diminuição da quantidade de FAK detectada em 125KDa (Figura 46). Estes dados indicam que a chaperona α B-Cristalina, que se associa diretamente a FAK, é importante na manutenção da integridade estrutural desta enzima. Estudos anteriores demonstraram que uma das funções de α B-Cristalina é a manutenção da estabilidade estrutural de proteínas (Watanabe, G *et al.*, 2009), o que condiz com os achados do presente estudo.

Com o silenciamento da α B-Cristalina, além de se observar uma menor quantidade de FAK estruturalmente preservada nos extratos celulares, observou-se um fenótipo deletério, com um aumento na taxa de apoptose e uma redução da viabilidade celular, tanto em miócitos cardíacos controle como em MVRNs submetidos ao estiramento cíclico. A inviabilidade celular decorrente da redução da expressão da α B-Cristalina e da menor quantidade de FAK preservada é condizente com o vasto papel da FAK na sobrevivência celular e também da α B-Cristalina na citoproteção de distintos tipos celulares.

A expressão ectópica de α B-Cristalina em células NIH3T3 promove termoresistência (Aoyama, A *et al.*, 1993) e estabiliza estruturas citoesqueléticas em células de glioma (Iwaki, A *et al.*, 1994). Em ratos, α B-Cristalina liga-se a miofibrilas, mostrando cardioproteção (Barbato, R *et al.*, 1996). Também foi encontrada associada com estruturas sarcoméricas apresentando papel protetor do citoesqueleto (van de Klundert, FA *et al.*, 1998). Além da função cardioprotetora, α B-Cristalina possui marcante papel anti-

apoptótico. Diferentes vias apoptóticas são moduladas por α B-Cristalina. Esta proteína pode ligar-se as proteínas pró-apoptóticas Bax, Bcl-x_s e p53 levando-as a inativação. Também interage com pró-caspase 3 e neutraliza a ativação da caspase-3 (Arrigo, AP *et al.*, 2007).

FAK também apresenta marcante papel anti-apoptótico. Um dos mecanismos de sobrevivência celular promovido pela FAK é por meio de sua interação com p53. Sob diferentes estímulos FAK é encontrada no núcleo, onde interage e leva a degradação de p53 via Mdm2 (Lim, ST *et al.*, 2008). Mecanismos mais simples também são importantes para a sobrevivência celular regulada pela FAK (Golubovskaya, VM *et al.*, 2007). Um desses mecanismos propostos é a interação de FAK com a proteína RIP (Kurenova, E *et al.*, 2004). Essa proteína promove sinais pró-apoptóticos, pela sua interação com o receptor de morte (Fas) e o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR1) (Stanger, BZ *et al.*, 1995) e também sinais anti-apoptóticos pela indução do fator nuclear de transcrição κ B, que está associado a proteção da morte celular induzida pelo Fator de necrose tumoral (Kelliher, MA *et al.*, 1998). FAK promove sinais anti-apoptóticos, ou seja, de sobrevivência celular, ligando-se a RIP e prevenindo-a de realizar suas funções pró-apoptóticas (Cance, WG & Golubovskaya, VM 2008). Outras proteínas que também se ligam a FAK podem contribuir para a sobrevivência celular. Essas interações parecem ser importantes para estabilizar a localização citoplasmática da FAK e cooperar com outras vias de sobrevivência (Stanger, BZ *et al.*, 1995). Dado o resultado que demonstrou que a superexpressão de FAK foi capaz de reverter o fenótipo deletério promovido pelo silenciamento de α B-Cristalina, o presente trabalho sugere que a interação entre FAK e α B-Cristalina é importante na integridade da FAK e sobrevivência em miócitos cardíacos. Diante dos resultados obtidos *in vitro*, a

manutenção da integridade da FAK parece estar relacionada à proteção dada pela α B-Cristalina ao se associar com FAK e impedir a proteólise desta enzima mediada pela calpaína 2. Interessantemente, Ruan e colaboradores (2011) mostraram a participação de α B-Cristalina na proteção de VEGF da degradação proteolítica em células endoteliais tumorais, o que permite extrapolar para um provável mecanismo de proteção de proteínas de sinalização promovida pela interação com α B-Cristalina. Ensaios adicionais em células estão sendo realizados. Um dos mecanismos propostos no presente trabalho é que α B-Cristalina interage e protege FAK da degradação promovida pela calpaína 2, mantendo sua integridade estrutural e possibilitando a ativação de vias anti-apoptóticas reguladas por esta enzima em miócitos cardíacos durante o estresse mecânico. É evidente que o papel anti-apoptótico de FAK e α B-Cristalina não está restrito a interação dessas proteínas entre si. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a associação entre a região C-terminal da FAK e α B-Cristalina pode modular uma das vias de sobrevivência celular em miócitos cardíacos submetidos ao estresse mecânico.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve uma nova interação entre a *small Heat Shock Protein*, α B-Cristalina, e a Quinase de Adesão Focal. Essa associação mostrou-se importante para proteger FAK da proteólise mediada pela calpaína 2 e é necessária para a manutenção da sobrevivência celular em miócitos cardíacos durante o estresse mecânico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alley, S.C., Trakselis, M.A., Mayer, M.U., Ishmael, F.T., Jones, A.D., Benkovic, S.J. (2001). Building a Replisome Solution Structure by Elucidation of Protein-Protein Interactions in the Bacteriophage T4 DNA Polymerase Holoenzyme. *J Biol Chem* 276: 39340-39349.
- Aoyama, A., Frohli, E., Schafer, R., Klemenz, R. (1993). α Bcrystallin expression in mouse NIH 3T3 fibroblasts: glucocorticoid responsiveness and involvement in thermal protection. *Mol Cell Biol* 13: 1824-1835.
- Arold, S.T., Hoellerer, M.K., Noble, M.E. (2002). The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure* 10: 319-327.
- Arrigo, A.P., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Dominique, G., Moulin, M., Diaz-Latoud, C., Vicart, P. (2007). Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Letters* 581: 3665-3674.
- Aquilina, J.A., Benesch, J.L.P., Bateman, O.A., Slingsby, C., Robinson, C.V. (2003). Polydispersity of a mammalian chaperone: Mass spectrometry reveals the population of oligomers in α B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10611-10616.
- Aquilina, J.A., Benesch, J.L., Ding, L.L., Yaron, O., Horwitz, J., Robinson, C.V. (2004). Phosphorylation of α B-crystallin alters chaperone function through loss of dimeric substructure. *J Biol Chem* 279: 28675-28680.
- Aquilina, J.A., Benesch, J.L., Ding, L.L., Yaron, O., Horwitz, J., Robinson, C.V. (2005). Subunit exchange of polydisperse proteins: mass spectrometry reveals consequences of α A-crystallin truncation. *J Biol Chem* 280: 14485-14491.
- Bagneris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., Slingsby, C. (2009). Crystal structures of α -crystallin domain dimers of α B-crystallin and Hsp20. *J Mol Biol* 392:1242-1252.

- Barbato, R., Menabo, R., Dainese, P., Carafoli, E., Schiaffino, S., Di Lisa, F. (1996). Binding of cytosolic proteins to myofibrils in ischemic rat hearts. *Circ Res* 78: 821–828.
- Barbero, S., Mielgo, A., Torres, V., Teitz, T., Shields, D. J., Mikolon, D., Bogyo, M., Barila, D., Lahti, J. M., Schlaepfer, D., Stupack, D. G. (2009). Caspase-8 Association with the Focal Adhesion Complex Promotes Tumor Cell Migration and Metastasis. *Cancer Res.* 69: 3755–3763.
- Benesch, J.L.P., Ayoub, M., Robinson, C.V., Aquilina, J.A. (2008). Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric structure. *J Biol Chem* 283: 28513–28517.
- Bogan, A.A., Thorn, K.S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* 280: 1–9.
- Brancaccio, M., Hirsch, E., Notte, A., Selvetella, G., Lembo, G., Tarone, G. (2006). Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res* 70: 422-33.
- Bueno, O.F., De Windt, L.J., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Jones, S.P., Lefer, D.J., Peng, C.F., Kitsis, R.N., Molkentin, J.D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19:6341–6350.
- Burridge, K., Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:463–519.
- Calalb, M.B., Polte, T.R., 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.

- Cance, W.G., Golubovskaya, V.M. (2008). Focal Adhesion Kinase Versus p53: Apoptosis or Survival? *Sci Signal* 1(20): 22-26.
- Ceccarelli, D.F., Song, H.K., Poy, F., Schaller, M.D., Eck, M.J. (2006). Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 281: 252-259.
- Chan, K.T., Bennin, D.A., Huttenlocher, A. (2010). Regulation of Adhesion Dynamics by Calpain-mediated Proteolysis of Focal Adhesion Kinase (FAK). *J Biol Biochem* 285: 11418–11426.
- Chen, H.C., Appeddu, P.A., Isoda, H., 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.
- Chu, F., Shan, S., Moustakas, D.T., Alber, F., Egea, P.F., Stroud, R.M., Water, P., Burlingame, A.L. (2004). Unraveling the interface of signal recognition particle and its receptor by using chemical cross-linking and tandem mass-spectrometry *Proc. Natl Acad Sci USA* 101: 16454-16459.
- Clark, K.A., Mcelhinny, A.S., Beckerle, M.C., Gregorio, C.C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function”. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18: 637–706.
- Clark, A.R., Naylor, C.E., Bagn  ris, C., Keep, N.H., Slingsby, C. (2011). Crystal structure of R120G disease mutant of human alphaB-crystallin domain dimer shows closure of a groove. *J Mol Biol* 408: 118–134.
- Clemente, C.F.M.Z., Tornatore, T.F., Theizen, T.H., Deckmann, A.C., Pereira, T.C., Lopes-Cendes, I., Souza, J.R., 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.

- Cooper, L.A., Shen, T.L., Guan, J.L. (2003). Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 23: 8030-8041.
- Cox, B.D., Natarajan, M., Stettner, M.R., Gladson, C.L. (2006). New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem* 99:35–52.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6: 277–293.
- Derham, B.K., Harding, J.J. (1999). α -Crystallin as a Molecular Chaperone. *Progress in Retinal and Eye Research* 18: 463-509.
- De Windt, L.J., Lim, H.W., Taigen, T., Wencker, D., Condorelli, G., Dorn, G.W. 2nd, Kitsis, R.N., Molkentin, J.D. (2000). Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: an apoptosis independent-independent model of dilated heart failure. *Circ Res* 86:255–263.
- DiMichele, L.A., Doherty, J.T., Rojas, M., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., Mack, C.P., 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 Jr., W., 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., 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., Samarel, A.M. (2000). Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278 (5):1695-1707.

Epstein, N.D., Davis, J.S. (2003). Sensing stretch is fundamental. *Cell* 112: 147-150.

Esquema desenvolvido por Alexandre Ferreira Gomes.

Foncea, R., Galvez, A., Perez, V., Morales, M.P., Calixto, A., Melendez, J., Gonzalez-Jara, F., Diaz-Araya, G., Sapag-Hagar, M., Sugden, P.H., LeRoith, D., Lavandero, S. (2000). Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 736–744.

Fonseca, P.M., Inoue, R.Y., Kobarg, C.B., Crosara-Alberto, D.P., Kobarg, J., 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., Eck, M.J. (2010). 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., 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.

Franchini, K.G. (2011). Focal adhesion kinase - The basis of local hypertrophic signaling domain. *J Mol Cell Cardiol* 52(2):485-492.

Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., Hill, J.A. (2004). Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? *Circulation* 109: 1580 - 1589.

- Gervais, F.G., Thornberry, N.A., Ruffolo, S.C., Nicholson, D.W., Roy, S. (1998). Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *J Biol Chem* 273: 17102–17108.
- Ghosh, J.G., Estrada, M.R., Clark, J.I. (2005). Interactive Domains for Chaperone Activity in the Small Heat Shock Protein, Human α B-Crystallin. *Biochemistry* 44: 14854-14869.
- Ghosh, J.G., Estrada, M.S., Clark, J.I. (2006a). The function of the β 3 interactive domain in the small heat shock protein and molecular chaperone, human α B-crystalline. *Cell Stress Chaperones* 11: 187-197.
- Ghosh, J.G., Estrada, M.R., Clark, J.I. (2006b). Structure based analysis of the β 8 interactive sequence of human α B-crystallin. *Biochemistry* 45: 9878-9886.
- Ghosh, J.G., Houck, S.A., Doneanu, C.E., Clark, J.I. (2006c). The beta4-beta8 groove is an ATP-interactive site in the alpha crystallin core domain of the small heat shock protein, human alphaB crystallin. *J Mol Biol* 364(3):364-75.
- Ghosh, J.G., Shenoy, Jr., A.K., Clark, J.I. (2007). Interactions between important regulatory proteins and human α B-Crystallin. *Biochemistry* 46: 6308-6317.
- Gill, S.C., Von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182(2):319-26.
- Goldstein, L.E., Muffat, J.A., Cherny, R.A., Moir, R.D., Ericsson, M.H., Huang, X., Mavros, C., Coccia, J.A., Faget, K.Y., Fitch, K.A., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Chylack, L.T. Jr., Bush, A.I. (2003). Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet* 361:1258–1265.

- Golenhofen, N., Ness, W., Koob, R., Htun, P., Schaper, W., Drenckhahn, D. (1998). Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein alpha B-crystallin to Z lines of myocardium. *Am J Physiol* 274: 1457–1464.
- Golenhofen, N., Arbeiter, A., Koob, R., Drenckhahn, D. (2002). Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin. *J Mol Cell Cardiol* 34: 309–319.
- Golubovskaya, V.M., Finch, R., Cance, W.G. (2005). Direct interaction of the Nterminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *J Biol Chem* 280: 25008-25021.
- Golubovskaya, V.M., Cance, W.G. (2007). Focal adhesion kinase and p53 signaling in cancer cells. *Int Rev Cytol* 26: 103–153.
- Golubovskaya, V.M., Kweh, F.A. Cance, W.G. (2009a). Focal adhesion kinase and cancer. *Histol Histopathol* 24: 503-510.
- Grigera, P.R., Jeffery, E.D., Martin, K.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Parsons, J.T. (2005). FAK phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *J Cell Sci* 118:4931–4935.
- Grossman, W., Jones, D., McLaurin, L.P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56–64.
- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J., Huot, J., Landry, J. (1997). Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* 110: 357-368.
- Haley, D.A., Horwitz, J., Stewart, P.L. (1998). The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure. *J Mol Biol* 277: 27–35.

- Hartl, F. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–579.
- Harvey, P.A., Leinwand, L.A. (2011). Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol* 194:355-365.
- Hayashi, I., Vuori, K., 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.
- He, X-L., Dukkupati, A., Garcia, K.C. (2006). Structural Determinants of Natriuretic Peptide Receptor Specificity and Degeneracy. *J Mol Biol* 361: 698–714.
- Heidkamp, M.C., Bayer, A.L., Kalina, J.A., Eble, D.M., Samarel, A.M. (2002). GFP-FRNK disrupts focal adhesions and induces anoikis in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 90:1282–1289.
- Hess, J.F., Fitzgerald, P.G. (1998). Protection of a restriction enzyme from heat inactivation by AlphaB crystallin. *Mol Vis.* 4: 29-36.
- Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., Parsons, J.T. (1993). Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp 125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* 123:993–1005.
- Hildebrand, J.D., Taylor, J.M., Parsons, J.T. (1996). An SH3 domain-containing GTPase activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 16:3169–78.
- Hightower, L.E. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66:191–197.

- Hoover, H.E., Thuerauf, D.J., Martindale, J.J., Glembotski, C.C. (2000). AlphaB-Crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. *J Biol Chem* 275: 23825–23833.
- Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10449–10453.
- Horwitz, J. (2003). Alpha-crystallin. *Exp Eye Res* 76(2):145-153.
- Horwitz, J., Huang, Q., Ding, L. (2004). The native oligomeric organization of alpha-crystallin, is it necessary for its chaperone function? *Exp Eye Res* 79:817–821.
- Hoshi, A.I., Santos, L.F.A., Gozzo, F.C. (2010). *Anal Chem* 82: 909-916.
- Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T., Kato, K. (1997). Phosphorylation of α B-Crystallin in Response to Various Types of Stress. *J Biol Chem* 272: 29934–29941.
- Iwaki, A., Iwaki, T., Tateishi, J., Goldman, J.E. (1994). Sense and antisense modification of glial alpha B crystallin production results in alterations of stress fiber formation and thermoresistance. *J Cell Biol* 125:1385–1393.
- Janmey, P.A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78: 763–81.
- Jehle, S., Rajagopal, P., Bardiaux, B., Markovic, S., Kühne, R., Stout, J.R., Higman, V.A., Klevit, R.E., van Rossum, B.J., Oschkinat, H. (2010) Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 17:1037–1042.

- Jehle, S., Vollmar, B.S., Bardiaux, B., Dove, K.K., Rajagopal, P., Gonen, T., Oschkinat, H., Klevit, R.E. (2011). N-terminal domain of α B-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *PNAS* 108 (16): 6409–6414.
- Johnson, B.A., Blevins, R.A. (1994). NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR* 4: 603–614.
- Kato, K., Inaguma, Y., Ito, H., Iida, K., Iwamoto, I., Kamei, K., Ochi, N., Ohta, H., Kishikawa, M. (2001). Ser-59 is the major phosphorylation site in alphaB-crystallin accumulated in the brains of patients with Alexander's disease. *J Neurochem* 76: 730–736.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* 8: 297–303.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115 (2): 209-216.
- Krüger, M., Linke, W.A. (2011). The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem* 286 (12): 9905-9912.
- Kubota, Y., Miyagishima, M., Frye, C.S., Alber, S.M., Bounoutas, G.S., Kadokami, T., Watkins, S.C., McTiernan, C.F., Feldman, A.M. (2001). Overexpression of tumor necrosis factor α activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33:1331–1344.
- Kumarapeli A.R.K., Su, H., Huang, W., Tang, M., Zheng, H., Horak, K.M., Li, M., Wang, X. (2008). α B-Crystallin Suppresses Pressure Overload Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* 103 (12): 1473-1482.

- Kurenova, E., Xu, L.H., Yang, X., Baldwin Jr, A.S., Craven, R.J., Hanks, S.K., Liu, Z-G., Cance, W. G. (2004). Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein. *Mol Cell Biol* 24: 4361–4371.
- Kuwahara, K., Saito, Y., Takano, M., Arai, Y., Yasuno, S., Nakagawa, Y., Takahashi, N., Adachi, Y., Takemura, G., Horie, M. (2003). NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J* 22: 6310–6321.
- Laganowsky, A., Benesch, J.L.P., Landau, M., Ding, L., Sawaya, M.R., Cascio, D., Huang, Q., Robinson, C.V., Horwitz, J., Eisenberg, D. (2010). Crystal structures of truncated alpha and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein Science* 19:1031-1043.
- Lavoie, J.N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L.A., Landry, J. (1995). Modulation of Cellular Thermoresistance and Actin Filament Stability Accompanies phosphorylation-Induced Changes in the Oligomeric Structure of Heat Shock Protein 27. *Mol Cell Biol* 15:505-516.
- Li, Q., Li, B., Wang, X., Leri, A., Jana, K.P., Liu, Y., Kajstura, J., Baserga, R., Anversa, P. (1997). Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 100: 1991–1999.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F., Li, Y., Schaller, M.D., 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., Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 29: 9–22.

- Liu, G., Guibao, C.D., Zheng, J. (2002). Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 22: 2751–2760.
- Liu, Y., Loijens, J.C., Martin, K.H., Karginov, A.V., Parsons, J.T. (2002). The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell* 13: 2147–2156.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H., Nussinov, R. (2003). Protein–protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *PNAS* 100 (10): 5772–5777.
- Marin, T.M., Clemente, C.F.M.Z., Santos, A.M., Picardi, P.K., Pascoal, V.D.B.; Lopes-Cendes, I., Saad, M.J.A., Franchini, K.G. (2008). Shp2 Negatively Regulates Growth in Cardiomyocytes by Controlling Focal Adhesion Kinase/Src and mTOR Pathways. *Circ Res* 103: 813-824.
- Marini, I., Moschini, R., Del Corso, A. , Mura, U. (2000). Complete Protection by a-Crystallin of Lens Sorbitol Dehydrogenase Undergoing Thermal Stress. *J Biol Chem* 275 (42): 32559–32565.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:56–68.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069–1075.

- Morrison, L.E., Hoover, H.E., Thuerauf, D.J., Glembotski, C.C. (2003). Mimicking phosphorylation of α B-Crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circ Res* 92: 203–211.
- Nolan, K., Lacoste, J., Parsons, J.T. (1999). Regulated Expression of Focal Adhesion Kinase-Related Nonkinase, the Autonomously Expressed C-terminal Domain of Focal Adhesion Kinase. *Mol Cell Biol* 19: 6120–6129.
- Nowakowski, J., Cronin, C.N., McRee, D.E., Knuth, M.W., Nelson, C.G., Pavletich, N.P. (2002). Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure* 10:1659–1667.
- Parcellier, A., Schmitt, E., Brunet, M., Hammann, A., Solary, E., Garrido, C. (2005). Small heat shock proteins HSP27 and α B-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. *Antioxid Redox Signal* 7: 404–413.
- Park, C.Y., Klammer, A.A., Kall, L., Maccoss, M.J., Noble, W.S. (2008). Rapid and accurate peptide identification from tandem mass spectra. *Proteome Res* 7(7): 3022–3027.
- Pacher, P., Csordas, G., Hajnoczky, G. (2001). Mitochondrial Ca^{2+} signaling and cardiac apoptosis. *Biol Signals Recept* 10:200–223.
- Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116:1409–1416.
- Pelham, H.R. (1986). Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins. *Cell* 46: 959–961.
- Peng, X, Kraus, M.S., Wei, H., Shen, T.L., Pariaut, R., Alcaraz, A., Ji, G., Cheng, L., Yang, Q., Kotlikoff, M.I., Chen, J., Chien, K., Gu, H., Guan, J.L. (2006). Inactivation of focal

adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 116: 217–227.

Pennica, D., King, K.L., Shaw, K.J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S.M., Darbonne, W.C., Knutzon, D.S., Yen, R., Chien, K.R. (1995). Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1142–1146.

Peschek, J., Braun, N., Franzmann, T.M., Georgalis, Y., Haslbeck, M., Weinkauff, S., Buchner, J. (2009). The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13272–13277.

Polte, T.R., Hanks S.K. (1997). Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19(2):137-145.

Pratt, W.B., Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 111–133.

Prutzman, K.C., Gao, G., King, M.L., Iyer, V.V., Mueller, G.A., Schaller, M.D., Campbell, S.L. (2004). The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation. *Structure* 12: 881–891.

Ray, P.S., Martin, J.L., Swanson, E.A., Otani, H., Dillmann, W.H., Das, D.K. (2001). Transgene overexpression of alphaB crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *FASEB J* 15: 393–402.

Richardson, A., Parsons, T. (1996). A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125^{FAK}. *Nature* 380: 538–540.

Ruan, Q., Han, S., Jiang, W.G., Boulton, M.E., Chen, Z.J., Law, B.K., Cai, J. (2011). α B-Crystallin, an Effector of Unfolded Protein Response, Confers Anti-VEGF Resistance to

- Breast Cancer via Maintenance of Intracrine VEGF in Endothelial Cells. *Mol Cancer Res* 9(12):1632-1643.
- Russell, B., Monthagh, D., Ashley, W.W. (2000). Form Follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol* 65: 45-79.
- Ruwhof, C., van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular Research* 47: 23–37.
- Sadoshima, J., Izumo, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59:551-571.
- Sanbe, A., Osinska, H., Saffitz, J.E., Glabe, C.G., Kayed, R., Maloyan, A., Robbins, J. (2004). Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci* 101: 10132-10136.
- Santhoshkumar, P., Sharma, K.K. (2002). Identification of a region in alcohol dehydrogenase that binds to α -crystallin during chaperone action. *Biochim. Biophys. Acta*. 1598: 115–121.
- Santos, A.M., Schechtman, D., Cardoso A.C., Clemente, C.F.M.Z., Silva, J.C., Fioramonte, M., Pereira, M.B.M., Marin, T.M., Oliveira, P.S.L., Figueira, A-C. M., Oliveira, S.H.P., Torriani, I.L., Gozzo, F.C., Neto, J.X., Franchini, K.G. (2011). FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. *Nat Chem Biol* 8(1):102-110.
- Sattler, M., Schleucher, J., Griesinger, C. (1999). Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog Nucl Mag Res Sp* 34: 93-158.

- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Parsons, J.T. (1993). Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol Cell Biol* 13: 786–791.
- Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizume, H., Speiser, B., Friedl, A., Bleese, N. (1991). Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 83: 504–14.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786–791.
- Schlaepfer, D.D., Hunter, T. (1996). Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 16:5623-5633.
- Scopacasa, B.S., Teixeira, V.P., Franchini, K.G. (2003). Colchicine attenuates left ventricular hypertrophy but preserves cardiac function of aortic-constricted rats. *J Appl Physiol* 94: 1627-1633.
- Seeliger, M.A., Young, M., Henderson, M.N., Pellicena, P., King, D.S., Falick, A.M., Kuriyan, J. (2005). High yield bacterial expression of active c-Abl and c-Src tyrosine kinases *Protein Science* 14: 3135-3139.
- Sharma, K.K., Kaur, H., Kester, K. (1997). Functional elements in molecular chaperone alpha-crystallin: identification of binding sites in alpha B-crystallin. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 217-222.
- Sheetz, M.P., Dai, J. (1996). Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends Cell Biol* 6: 85-89.

- Sheng, Z., Pennica, D., Wood, W.I., Chien, K.R. (1996). Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiomyocyte survival. *Development* 122: 419-428.
- Sonoda, Y., Matsumoto, Y., Funakoshi, M., Yamamoto, D., Hanks, S.K., 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.
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E., Seed, B. (1995). RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81: 513-523.
- Storr, S.J., Carragher, N.O., Frame, M.C., Parr, T., Martin, S.G. (2011). The calpain system and cancer. *Nature Reviews Cancer* 11: 364-374.
- Sussman, M.A., McCulloch, A., Borg, T.K. (2002). Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91: 888-898.
- Suzuki, A., Sugiyama, Y., Hayashi, Y., Nyu-I, N., Yoshida, M., Nonaka, I., Ishiura, S., Arahata, K., Ohno, S. (1998). MKBP, a Novel Member of the Small Heat Shock Protein Family, Binds and Activates the Myotonic Dystrophy Protein Kinase. *J Cell Biol* 140: 1113-1124.
- 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., Rovin, J.D., Parsons, J.T. (2000). A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275(25):19250-19257.

- Tissieres, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398.
- Torsoni, A.S., Constancio, S.S., Nadruz Jr., W., Hanks, S.K., 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., 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.
- Tovchigrechko, A., Vakser, I.A. (2006). GRAMM-X public web server for protein protein docking. *Nucleic Acids Res* 34: W310-314.
- Trakselis, M.A., Alley, S.C., Ishmael, F.T. (2005). Identification of Protein-Protein Interactions Using Novel Crosslinking Reagents. *Bioconjugate Techniques* 16: 741-750.
- Vadali, K., Cai, X., Schaller, D. (2007). Focal adhesion kinase: an essential kinase in the regulation of cardiovascular functions. *IUBMB Life*, 59(11): 709-16.
- van de Klundert, F.A., Gijsen, M.L., van den Ijssel, P.R., Snoeckx, L.H., de Jong, W. W. (1998). α B crystallin and HSP 25 in neonatal cardiac cells differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol* 75: 38-45.
- Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prévost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tomé, F., Dupret, J.M., Paulin, D., Fardeau, M. (1998). A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 20: 92-95.

- Vogel, V., Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 265-275.
- Xu, L-H., Yang, X., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Baldwin, A.S., Craven, R.J., Cance, W.G. (2000). The focal adhesion kinase suppresses transformation associated, anchorage-independent apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 275:30597-30604.
- Zhong, X-H., Ding, J-H., Adams, J.A. (2009). Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes Dev* 23: 482-495.
- Wang, H.B., Dembo, M., Hanks, S.K., Wang, Y. (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11295-11300.
- Watanabe, G., Kato, S., Nakata, H., Ishida, T., Ohuchi, N., Ishioka, C. (2009). α B-crystallin: a novel p53-target gene required for p53-dependent apoptosis. *Cancer Sci* 100(12): 2368-75.
- Waters, E.R., Lee, G.J., Vierling, E. (1996). Evolution, Structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* 47: 325-338.
- Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science* 286: 1888-1893.



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

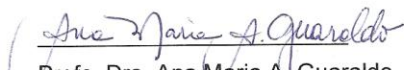
CERTIFICADO

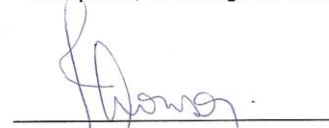
Certificamos que o Protocolo nº **1907-1**, sobre "**Regulação da fosforilação e atividade da quinase de adesão focal (FAK) pela α B-cristalina**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini / Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **03 de agosto de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1907-1**, entitled "**Regulation of phosphorylation and activity kinase adhesion focal (FAK) in the α B-crystallin**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 3, 2009**.

Campinas, 03 de agosto de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>