

**LUCIENE BORGES**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ARHGAP21  
EM CÉLULAS CARDÍACAS E SUA  
RELAÇÃO FUNCIONAL**



**UNICAMP  
CAMPINAS**

**2007**

**LUCIENE BORGES**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ARHGAP21  
EM CÉLULAS CARDÍACAS E SUA  
RELAÇÃO FUNCIONAL**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas para Obtenção do título de Doutor em  
Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Biologia  
Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.*

***Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad***

**CAMPINAS**

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA**

**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

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

B644a Borges, Luciene  
Avaliação da expressão da ARHGAP21 em células cardíacas e sua relação funcional / Luciene Borges. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Sara Terezinha Olalla Saad  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citoesqueleto. 2. Proteína Quinase C. 3. Aderências focais.  
I. Saad, Sara Terezinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Evaluation of the ARHGAP21 expression in cardiac cells and its function**

**Keywords:** • Cytoskeleton  
• Protein Kinase C  
• Focal Adhesions

**1.1 Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica**

**1.2 Área de concentração: Biologia Estrutural Celular Molecular e do desenvolvimento**

**1.3 Banca examinadora:**

**1.4 Profa. Dra Sara Terezinha Olalla Saad**

**1.5 Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo**

**Prof Dr Lício Augusto Velloso**  
**Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo**  
**Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**

**Data da defesa: 30 - 07- 2007**

# Banca examinadora da tese de Doutorado

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad**

## Membros:

Professora Doutora Sara Teresinha Olalla Saad

Professor Doutor Licio Augusto Velloso

Professor Doutor José Antonio Rocha Gontijo

Professor Doutor Francisco Rafael Martins Laurindo

Professor Doutor Sérgio Paulo Bydlowski

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

**Data: 30/07/2007**

200801393

## DEDICATÓRIA

---

*Dedico este trabalho aos meus queridos e estimados pais, Edson e Nilza, que são dádivas de Deus na minha vida, exemplos de luta, perseverança e força. Aos meus queridos irmãos, Pedro, que veio a este mundo me trazer muita felicidade, Chris e Felipe, que, de alguma maneira, em algum lugar, estão olhando por mim.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e pela bolsa de doutorado referente ao processo FAPESP-03/03077-2.

À minha orientadora Profa. Dra. Sara Saad, por sua orientação, confiança, incentivo e exemplo científico e pessoal. Agradeço também as muitas oportunidades oferecidas durante este período de aprendizagem que jamais esquecerei, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Kleber Franchini, pelos conselhos científicos e pela disponibilidade de seu laboratório, em especial a sua funcionária Thaís Theizen, pela coarctação dos animais.

Ao Prof. Dr. Mário Saad, pela disponibilidade de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Joazeiro, pela disponibilização de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Jörg Kobarg, pelos conselhos científicos e por disponibilizar alguns anticorpos.

À Arlete e Leonardo, pelo apoio didático.

Às secretárias Patrícia Juliani e Raquel Foglio, pela colaboração nos serviços burocráticos e pela amizade.

A todos os colegas e amigos do Hemocentro, em especial do Laboratório de Biologia Molecular e Celular, pelos momentos de descontração e convivência, entre eles os alunos da Profa. Sara: Fabíola, Paulo, Marcelo, Patrícia Favaro, Patrícia Rodrigues, Marianinha, Sheila, Adriana, Cláudia, Daniella, Paula, Samuel e Bruno.

À Tereza Salles, pelo meu crescimento e amadurecimento científico e pessoal, pelos seus conselhos sábios, atenção, carinho e amizade.

Às amigas queridas Carol Bigarella, Mariana Pupa e Maria Teresa Xará, pela amizade sincera, pela presença constante, pelo incentivo, “pelos quebra-galhos”, pelo carinho.

A meu querido namorado e amigo Raphael, pelo incentivo, apoio, companheirismo e amor a mim dedicados nesta etapa final do meu trabalho.

A toda minha família, por sempre torcer por mim e por compreender a importância do meu trabalho.

A todas as pessoas que, por ventura, aqui não se encontram citadas, que de alguma forma tenham feito parte da minha vida e colaborado para minhas experiências de vida.

A Deus, por me proporcionar mais uma conquista, por me dar saúde, por sempre olhar por mim, por colocar pessoas tão especiais e queridas em minha vida, por me permitir trilhar desafios, pois sem eles, jamais haveria aprendido...

**“Tempos difíceis tem um valor científico.  
São as oportunidades que um bom aprendiz jamais perde.”**

*Ralph Wald Emerson*

## SUMÁRIO

---

SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
INTRODUÇÃO.....	19
1 Citoesqueleto e suas funções.....	20
2 ARHGAP21.....	21
3 Família Rho e as Rho GAPs.....	23
4 Hipertrofia cardíaca.....	26
5 Focal Adhesion Kinase (FAK).....	29
6 Proteína Quinase C isotipo zeta (PKCζ).....	31
OBJETIVOS.....	35
MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
1 Reagentes e anticorpos.....	38
2 Modelos experimentais de indução hipertrófica cardíaca.....	38
2.1.1 <i>Estímulo hipertrófico induzido por sobrecarga de pressão</i> .....	39
2.1.2 <i>Preparação dos animais</i> .....	39
2.1.3 <i>Obtenção de extrato protéico total de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de ratos adultos</i> .....	39
2.1.4 <i>Fracionamento celular de ventrículo esquerdo de ratos adultos</i> .....	40
2.1.5 <i>Isolamento de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de ratos adultos</i> .....	41
2.1.6 <i>Imunomicroscopia eletrônica</i> .....	42
2.2 RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR).....	42
2.3 CULTURA PRIMÁRIA DE MIÓCITOS CARDÍACOS DE RATO NEONATAL.....	42

3	Microscopia confocal .....	43
4	Ensaio de Pull Down .....	44
4.1	CONSTRUÇÕES UTILIZADAS .....	44
4.2	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	44
4.3	ENSAIO DE INTERAÇÃO IN VITRO – PULL DOWN .....	45
5	Immunoblotting .....	45
5.1	IMUNOPRECIPITAÇÃO .....	45
5.2	WESTERN BLOT .....	46
	RESULTADOS .....	47
1	ARHGAP21 é modulada pela sobrecarga de pressão no miocárdio .....	48
2	Relocalização da ARHGAP21 para discos intercalares e costâmeros de corações submetidos à sobrecarga de pressão .....	49
3	Interação da ARHGAP21 com FAK e PKC $\zeta$ em cardiomiócitos de rato adulto .....	52
4	ARHGAP21 associa-se à porção C-terminal de FAK .....	55
5	Expressão de PKC $\zeta$ fosforilada aumentada nos extratos fracionados de cardiomiócitos submetidos à sobrecarga de pressão .....	56
6	Expressão de $\alpha$ -catenina, FAK e PKC $\zeta$ nos diferentes compartimentos subcelulares .....	57
7	Cultura primária de miócitos cardíacos de rato neonatal .....	58
	DISCUSSÃO .....	60
	CONCLUSÕES .....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
	ANEXOS .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**EST:** Expression Sequence Tags  
**TRITC:** Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate  
**GST:** Glutathione S-transferase  
**RNA:** Ribonucleic acid  
**VE:** ventrículo esquerdo  
**NWR:** ratos Wistar normais  
**SHR:** ratos espontaneamente hipertensos  
**ECM:** extra cellular matrix  
**PH:** pleckstrin homology  
**Rho GAP:** Rho GTPase activating protein  
**PKC $\zeta$ :** zeta isotype of protein kinase C  
**PS:** pseudo-substrato  
**FAK:** focal adhesion kinase  
**FAT:** focal adhesion targeting  
**FERM:** protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology  
**ERK:** extracellular signal regulated kinase  
**MAPK:** mitogen-activated protein kinase  
**PIP<sub>2</sub>:** phosphatidylinositol-4,5-biphosphate  
**PIP<sub>3</sub>:** phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate  
**PI3K:** phosphatidylinositol-3 kinase

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1:** Representação esquemática da localização gênica da ARHGAP21 no cromossomo 10, seu respectivo transcrito, com aproximadamente 7000pb e 26 éxons, e sua estrutura protéica primária, composta por três domínios principais indicados: PDZ, PH e Rho GAP. A proteína ARHGAP21 é constituída de 1957 aminoácidos e possui peso molecular  $\geq 250$ KDa. .... 22
- Figura 2:** Análise de Northern Blot, mostrando a expressão do RNAm da *ARHGAP21* em diversos tecidos humanos. Nota-se sua maior expressão em tecidos altamente diferenciados, como cérebro, músculos esquelético e cardíaco. .... 23
- Figura 3:** Esquema da ligação integrina-sarcômero nos costâmeros. Os sarcômeros consistem em feixes paralelos de miosina interdigitados com filamentos de actina, ancorados nas linhas Z. Os sarcômeros estão ancorados as integrinas presentes na membrana plasmática por meio de numerosas proteínas que compõem a linha Z, entre elas estão  $\alpha$ -actinina, vinculina e talina. Juntas, estas proteínas formam os costâmeros (*retângulo*), que são complexos juncionais responsáveis pela conexão da maquinaria contrátil à proteínas da matriz extracelular. .... 28
- Figura 4:** Representação esquemática da estrutura protéica primária da FAK, composta por três domínios principais: domínio N-terminal FERM, domínio quinase central e domínio C-terminal FAT. FAK possui múltiplos sítios de fosforilação em tirosina que, quando fosforilados, culminam na ativação de FAK. .... 29
- Figura 5:** Representação esquemática do processo de renovação dos sítios de adesão focal envolvendo FAK. .... 31
- Figura 6:** Representação esquemática da estrutura protéica primária de PKC $\zeta$ . O resíduo Thr410 é o principal sítio de fosforilação de PKC $\zeta$ , responsável pela ativação da proteína. .... 33

**Figura 7:** Representação esquemática simplificada da via de sinalização de PKC $\zeta$ , que quando ativada por PIP<sub>3</sub> (direta ou indiretamente, por meio de PDK1), resulta na ativação da cascata de MAPK e translocação de NF $\kappa$ B para o núcleo. .... 34

**Figura 8:** *Superior* – Esquema do modelo experimental adotado de estresse mecânico agudo em corações de ratos adultos induzido por sobrecarga de pressão. *Inferior esquerda* – exemplificação das mudanças morfológicas hipertróficas que ocorrem no coração de um animal submetido à coarctação da aorta; *Inferior direita* – figura ilustrativa das alterações na razão peso coração/peso corpóreo sofridas com o tempo de coarctação da aorta. Nota-se que já existe aumento significativo nesta razão a partir de 48h de bandagem da aorta. ([http://cardiogenomics.med.harvard.edu/groups/proj1/pages/band\\_hist.html](http://cardiogenomics.med.harvard.edu/groups/proj1/pages/band_hist.html))..... 40

**Figura 9:** Distribuição da ARHGAP21 em frações subcelulares de cardiomiócitos de ratos adultos submetidos à coarctação da aorta em diferentes tempos de monitoração (sham, 30', 1h e 2h). Lisados protéicos de cardiomiócitos de VE de ratos adultos, submetidos à coarctação ou não, foram fracionados em porção citoplasmática, membranas e nuclear. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 8% e analisadas por *immunoblotting* com anticorpo anti-ARHGAP21 ( $M_r \geq 250$ KDa). Nota-se que ARHGAP21 é fracamente expressa na porção citoplasmática. Observa-se também que ARHGAP21 localizou-se predominantemente na fração nuclear de cardiomiócitos de animal controle (sham), em contraste aos animais submetidos à coarctação, os quais demonstraram redução da expressão da ARHGAP21 nesta fração, de acordo com o tempo de bandagem da aorta. Em contrapartida, observou-se aumento da expressão da ARHGAP21 nas frações membranares dos animais submetidos à sobrecarga de pressão, quando comparado ao animal controle. .... 48

**Figura 10:** Distribuição da ARHGAP21 em cardiomiócitos de rato adulto controle (A e B) e coarctado por 2h (C e D). Células cardíacas de VE foram marcadas com faloidina-TRITC (*vermelho*) e anticorpo primário anti-ARHGAP21, reconhecido pelo anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (*verde*). B,D: Núcleos dos cardiomiócitos foram marcados com DAPI (*azul*). Observou-se que ARHGAP21 se localizou predominantemente no núcleo das células de

animais controle, enquanto que em cardiomiócitos de rato coarctado, quase não houve marcação nuclear. Nota-se também que a ARHGAP21 foi encontrada preferencialmente nos discos intercalados e pontos de adesão focal, região de membrana celular (*cabeças de seta, C*), e linha Z (*D*) após estresse mecânico agudo induzido por sobrecarga de pressão no miocárdio (*C*: corte mais superficial; *D*: corte mais central). Figura representativa de 3 experimentos independentes..... 50

**Figura 11:** Microscopia eletrônica de cardiomiócitos de ratos submetidos ou não à coarctação da aorta. **A:** marcação de cardiomiócitos de ratos controle com anticorpo primário anti-ARHGAP21, visualizada por imunopartículas de ouro; **B:** detalhe da figura, demonstrando que ARHGAP21 se localizou por entre os miofilamentos; **C:** imunomarcação da ARHGAP21 em cardiomiócitos de ratos submetidos à coarctação da aorta por 2h; **D** e **E:** detalhes da figura C, mostrando que ARHGAP21 se encontra localizada nos costâmeros (*D*) e linhas Z (*E*) após estresse mecânico em corações de ratos adultos. .... 51

**Figura 12:** Microscopia eletrônica de núcleo de cardiomiócitos de ratos submetidos ou não à coarctação da aorta. **Esquerda:** núcleo de miócito de animal controle; ARHGAP21 foi encontrada principalmente nas regiões mais eletro-densas de cromatina condensada. Nota-se que ARHGAP21 foi localizada em regiões de poros do envoltório nuclear (*seta*), sugerindo que ARHGAP21 possa desempenhar papel de proteína carreadora. **Direita:** núcleo de célula cardíaca de rato submetido à bandagem da aorta por 2h, mostrando que regiões de cromatina condensada foram menos marcadas por anticorpo anti-ARHGAP21, quando comparada ao animal normal. .... 52

**Figura 13:** Western Blot de imunoprecipitados (IP) de extrato protéico de VE proveniente de dois animais controle (sham), e dois animais submetidos à sobrecarga de pressão por 2h. Foram utilizados anticorpos primários anti-ARHGAP21, anti-FAK e anti-PKC $\zeta$ . Nota-se que ARHGAP21 se associa a ambos, FAK e PKC $\zeta$ . Figura representativa de 3 experimentos independentes..... 53

**Figura 14:** Western Blot representativo obtido de anticorpos anti-ARHGAP21, anti-FAK e anti-PKC $\zeta$  de imunoprecipitação com anti-ARHGAP21, anti-FAK e

anti-PKC $\zeta$ de extratos de cardiomiócitos de VE de ratos adultos Wistar normais e espontaneamente hipertensos (SHR). Nota-se que expressão de ARHGAP21 e FAK é maior em SHR que em ratos normais. Percebe-se também que há interação entre ARHGAP21 e FAK e também entre ARHGAP21 e PKC $\zeta$ . .....	54
<b>Figura 15:</b> Western blot de imunoprecipitados (IP) de extrato protéico de VE obtido de três ratos adultos Wistar normais (NWR), e três ratos espontaneamente hipertensos (SHR), utilizando-se anticorpos anti-ARHGAP21, anti-FAK, anti-fosfo FAK Tyr925, anti-PKC $\zeta$ e anti-fosfo PKC $\zeta$ Thr410. ARHGAP21 interage com PKC $\zeta$ fosforilada em Thr410 em ambos NWR e SHR, enquanto FAK fosforilada em Tyr925 se associa apenas com ARHGAP21 em cardiomiócitos de SHR. Figura representativa de três experimentos independentes. ....	55
<b>Figura 16:</b> Ensaio de interação <i>in vitro</i> ( <i>Pulldown assay</i> ) usando três diferentes construções de FAK fusionadas ao GST: domínio FERM N-terminal (FERM-GST), domínio catalítico (CAT-GST) e região C-terminal (C-term). ARHGAP21 se liga a porção C-terminal de FAK. Anticorpos monoclonais anti-Src e anti-GST foram usados como controle experimental. ....	56
<b>Figura 17:</b> Fosforilação de PKC $\zeta$ em fracionamento subcelular de VE de ratos adulto submetidos (30 min, 1 ou 2 horas) ou não à bandagem da aorta (sham). Fosforilação de PKC $\zeta$ em Thr410 foi aumentado nas frações membranas e citoplasmática de cardiomiócitos submetidos à sobrecarga de pressão. ....	57
<b>Figura 18:</b> Fracionamento subcelular de extrato protéico de VE de ratos controle (sham) e ratos submetidos à coarctação da aorta (30', 1h e 2h). Cdc42 aparece expressa nas frações citoplasmáticas e membranas, enquanto $\alpha$ -catenina foi mais expressa nas frações nucleares e membranas. ....	57
<b>Figura 19:</b> <i>Western Blot</i> de extrato protéico fracionado (citoplasmático e nuclear) de cardiomiócito de ratos neonatos controle (sem estiramento) e estirados por 2h. A expressão da ARHGAP21 aumenta no núcleo de células submetidas ao estiramento. Como controle, a membrana foi submetida à Western Blot utilizando anticorpo primário anti-histona H1, confirmando a pureza do fracionamento. <b>Cit:</b> fração citosólica, <b>Núcleo:</b> fração nuclear. ....	58

- Figura 20:** Localização por imunofluorescência da ARHGAP21 endógena em cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos. ARHGAP21 localizou-se no núcleo e citoplasma das células controle (*A e B*) e estiradas (*C e D*), sendo que nestas há maior quantidade da proteína na região perinuclear (*cabeça de seta*). **A,B:** cardiomiócitos controle, não submetidas a estiramento; **C,D:** cardiomiócitos submetidos a estiramento por 2 horas. Utilizou-se faloidina para marcação dos filamentos de actina (*vermelho*) e anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor 488 para marcação da ARHGAP21 (*verde*)..... 59
- Figura 21:** Esquema resumido do processo de renovação das adesões focais, envolvendo a participação de FAK. ARHGAP21 pode exercer uma importante função na regulação deste processo, uma vez que ARHGAP21 encontra-se localizada nos discos intercalares e costâmeros de cardiomiócitos de animais submetidos à sobrecarga de pressão. Além disso, ARHGAP21 se associa à porção C-terminal de FAK, que constitui a região responsável pela localização de FAK nos sítios de adesão focal. .... 64
- Figura 22:** Adaptado de HAMADA e colaboradores (Hamada et al., 2004). Estímulos mecânicos e de estresse oxidativo (ex: estiramento mecânico) provoca aumento da expressão gênica celular, o que aumenta a quantidade de proteínas mal traduzidas no citoplasma. Estas proteínas, por sua vez, são reconhecidas pelo receptor KDEL e são recicladas ou degradadas por meio de transportes entre os sistemas retículo endoplasmático (RE)-Golgi. O acúmulo destas proteínas pode formar agregados protéicos no interior do RE, levando a uma obstrução dos túbulos transversos e conseqüentemente, a uma alteração da homeostasia de  $Ca^{2+}$ . Este excesso de  $Ca^{2+}$  pode acarretar numa contratilidade cardíaca deficiente e, por conseguinte a uma sobrecarga de pressão, constituindo um ciclo vicioso. Quando há grande acúmulo de proteínas mal traduzidas no RE, pode ocorrer apoptose da célula. Portanto, vias de sinalização capazes de controlar este transporte são de grande importância para a fisiologia celular do cardiomiócito. Cdc42 ativa (ligada a GTP) se liga à membrana coberta por COPI, controlando a junção da actina ao Golgi através de vias envolvendo efetores abaixo da via de sinalização (N-WASP e complexo

Arp2/3), e participando do transporte retrógrado (Golgi para RE). ARHGAP21, por ser uma Rho GAP para Cdc42 e por estar localizada na região perinuclear, pode estar envolvida nesta importante via de regulação hipertrófica. .... 67

**Figura 23:** Esquema representativo da possível atuação de ARHGAP21 sobre as proteínas FAK e PKC $\zeta$ , regulando, dessa maneira, as vias de sinalização de MAPK e NF $\kappa$ B e, conseqüentemente a expressão gênica hipertrófica e sobrevivência de cardiomiócitos. .... 69

## RESUMO

---

Estímulo mecânico é um dos principais eventos envolvidos na hipertrofia cardíaca que afeta vários componentes de vias de sinalização do miocárdio. Recentemente, um novo transcrito altamente expresso em músculo cardíaco, denominado de *ARHGAP21*, foi descrito como um membro da família de proteínas Rho GAP, que demonstrou atividade catalítica sobre Cdc42 e interação com ARF1, ARF6 e  $\alpha$ -catenina, proteínas importantes do remodelamento do citoesqueleto e junções aderentes. No presente estudo, tivemos como objetivo analisar a expressão da *ARHGAP21* em resposta ao estresse mecânico agudo em corações de ratos adultos, e sua associação com FAK e PKC $\zeta$ . Utilizando-se fracionamento subcelular, microscopia confocal e eletrônica, demonstramos que *ARHGAP21* realocaliza-se das regiões nucleares e miofilamentos para linhas Z, discos intercalares e costâmeros de cardiomiócitos submetidos à sobrecarga de pressão, sugerindo que esta proteína pode desenvolver uma importante função no remodelamento cardíaco. Além do mais, ensaio de imunoprecipitação mostrou que *ARHGAP21* interage com PKC $\zeta$  e FAK em ratos controle, submetidos à coarctação da aorta e espontaneamente hipertensos (SHR). Três diferentes regiões de FAK, contendo cauda de GST acoplada, foram utilizadas em ensaio de ligação *in vitro*, demonstrando que *ARHGAP21* se liga à porção carboxi terminal de FAK. Além disso, *ARHGAP21* associa-se à PKC $\zeta$  fosforilada em Thr410 em co-imunoprecipitados de extratos protéicos de ratos controle e SHR. Entretanto, *ARHGAP21* associa-se apenas à FAK fosforilada em Tyr925 em SHR. Também foi verificado que PKC $\zeta$  é fosforilada por estímulo mecânico. Estes resultados sugerem que *ARHGAP21* pode atuar como uma molécula sinalizadora ou proteína adaptadora das vias de sinalização de FAK e PKC $\zeta$  em cardiomiócitos, provavelmente desempenhando importante função durante estresse cardíaco.

## ABSTRACT

---

Mechanical stimulus is one of the major events involved in cardiac hypertrophy, and affects components of essential myocardium signaling pathways. Recently, we described a highly expressed mRNA in the cardiac muscle as a member of the RhoGAP family of proteins, ARHGAP21, which demonstrated GAP activity over Cdc42 and interacted with ARF1, ARF6 and  $\alpha$ -catenin important proteins of the cytoskeleton assembly and adherent junctions. In the present work, we aimed to analyze the expression of ARHGAP21 in response to acute mechanical stress in the adult rat heart and its association with FAK and PKC $\zeta$  proteins. By subcellular fractionation, confocal and immunoelectron microscopy, we demonstrated that ARHGAP21 is relocated from the nucleus to the plasma membrane, Z-lines and costameres of cardiomyocytes submitted to pressure overload conditions, suggesting that this protein may develop a role in cardiac remodeling. Furthermore, immunoprecipitation assay showed that ARHGAP21 interacted with PKC $\zeta$  and FAK in control rats, rats submitted to aortic clamping and spontaneously hypertensive rats (SHR). Using three different GST-tagged regions of FAK, we found that ARHGAP21 binds to the carboxyl terminal portion of FAK. Moreover, ARHGAP21 binds to PKC $\zeta$  phosphorylated on Thr410 in co-immunoprecipitates of protein extracts from sham control rats and SHR. However, ARHGAP21 only binds to FAK phosphorylated on Tyr925 of SHR. We have also shown that PKC $\zeta$  is phosphorylated by mechanical stimuli. Altogether, these results suggest that ARHGAP21 may act as a signaling molecule or scaffold protein of FAK and PKC $\zeta$  signaling pathways in cardiomyocytes, probably developing an important function during cardiac stress.



# INTRODUÇÃO

## 1 Citoesqueleto e suas funções

O citoesqueleto consiste em uma extensiva rede de filamentos que interliga o núcleo da célula ao meio extracelular, além de participar dos processos de adesão célula-célula e célula-matriz por meio de junções celulares especializadas presentes na membrana plasmática. Em células eucariotas, o citoesqueleto é formado por três famílias protéicas principais, compostas por filamentos de actina (F-actina), filamentos intermediários e microtúbulos, que conjuntamente formam estruturas filamentosas. Além do mais, diversas proteínas associadas ao citoesqueleto cooperam para a complexa organização da maquinaria celular. Estes componentes fornecem suporte mecânico à membrana plasmática, além de desempenhar importante papel na regulação de muitas atividades biológicas, como movimento da célula, controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular, tráfego protéico, adesão e sinalização, bem como polimerização da actina (Fuchs e Cleveland, 1998). Muitas dessas funções são dependentes da reorganização do citoesqueleto de actina, que está estruturalmente ligado aos locais de adesão célula-célula e célula-matriz (Hall, 1998).

Como o citoesqueleto está envolvido em quase todas as funções celulares, anormalidades em qualquer uma das proteínas que compõem esta complexa estrutura celular freqüentemente resultam em condições patológicas. De fato, muitas doenças vêm sendo associadas às anormalidades de proteínas de citoesqueleto e nucleoesqueleto, incluindo várias síndromes de doenças cardiovasculares, neurodegeneração, invasão tumoral, cirrose hepática, fibrose pulmonar, bem como doenças de pele (Ramaekers e Bosman, 2004).

Dessa maneira, a identificação e caracterização de novos genes que pudessem codificar proteínas de citoesqueleto relacionados à neoplasias constituiu motivo de grande interesse na comunidade científica e também para o Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP. Sendo assim, foram realizadas pesquisas no banco de dados de seqüências gênicas expressas em neoplasias, o qual foi gerado pelo Projeto Genoma Humano do Câncer, desenvolvido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Instituto Ludwig. Este projeto realizou o seqüenciamento de *Expression Sequence Tags* (ESTs) de tecidos humanos neoplásicos através de uma estratégia denominada de *Open Reading Frame* ESTs (ORESTES). Dentre as diversas ESTs

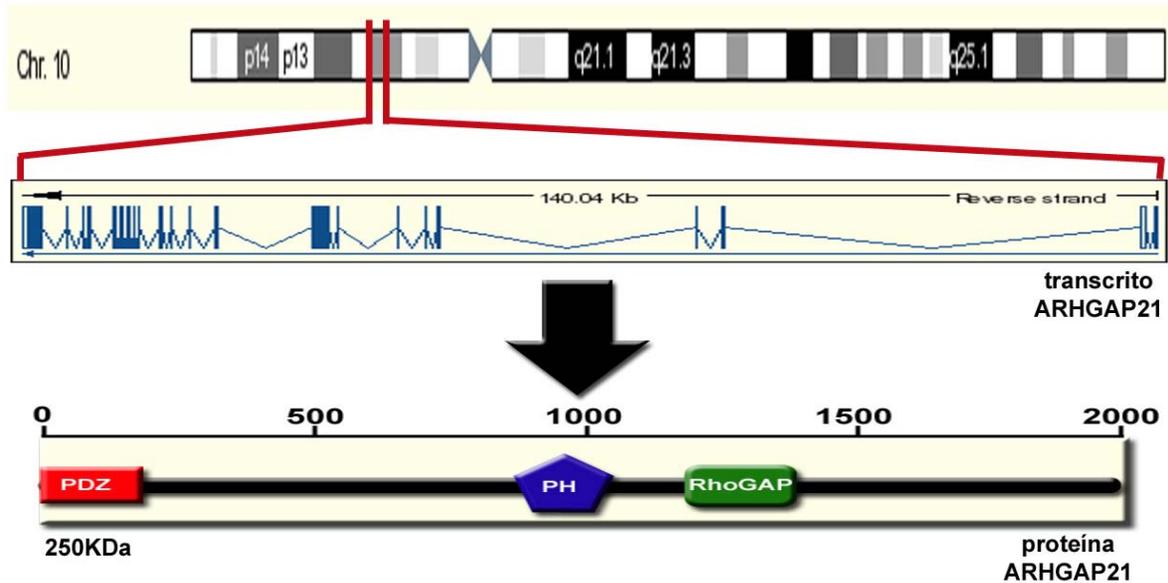
encontradas durante a pesquisa, uma foi de especial interesse, EST PM3-LT0032-231299-001-h11 (número de acesso AW836480), por possuir alta similaridade com o domínio PH da  $\beta$ -espectrina humana, importante proteína de citoesqueleto. Esta EST, identificada em biblioteca de cDNA de leiomiomas, foi alinhada com seqüências do Genoma Humano através de análise computacional, utilizando-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponibilizado na página de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Foram encontradas duas seqüências gênicas, uma no cromossomo 6, que foi classificada como um retropseudogene, e outra no cromossomo 10, identificada como um gene humano denominado de *ARHGAP21*, inicialmente nomeado de *ARHGAP10* (nomenclatura revisada pelo HGNC - *HUGO Gene Nomenclature Committee*).

## 2 ARHGAP21

O gene da *ARHGAP21*, descrito recentemente no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP (Basseres et al., 2002), está localizado no braço curto do cromossomo 10, banda 10p12.1, e codifica um transcrito de 7107pb e quadro aberto de leitura de 5874pb, sendo composto por 26 éxons (Figura 1). A proteína codificada pelo RNAm da *ARHGAP21* possui 1957 aminoácidos, peso molecular de aproximadamente 250kDa, e três domínios principais: PDZ, PH e Rho GAP, sendo este último o responsável pela classificação da *ARHGAP21* como uma proteína ativadora de Rho GTPase (Rho GAP).

O domínio PH está envolvido em mecanismos de transmissão de sinais e encontra-se presente em algumas proteínas de citoesqueleto. Interage com fosfolipídeos da membrana plasmática, e também com F-actina, induzindo a formação de feixes filamentosos da actina. Em muitas proteínas, o domínio PDZ medeia interações proteína-proteína, geralmente conectando componentes envolvidos na sinalização celular (Saras e Heldin, 1996). Estes complexos protéicos auxiliam nas propriedades adesivas de alguns tipos celulares, além de desempenharem função importante na formação de barreira paracelular, transporte iônico, e transmissão de sinais entre células adjacentes que regulam o crescimento, diferenciação e homeostasia (Fanning e Anderson, 1999). Adicionalmente, o

domínio PDZ pode interagir com proteínas MERM, que são proteínas do citoesqueleto capazes de se ligar à actina (Murthy et al., 1998).

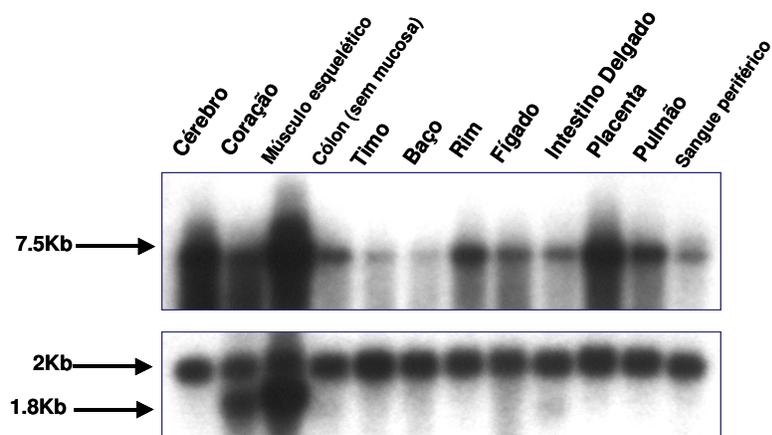


**Figura 1:** Representação esquemática da localização gênica da ARHGAP21 no cromossomo 10, seu respectivo transcrito, com aproximadamente 7000pb e 26 éxons, e sua estrutura proteica primária, composta por três domínios principais indicados: PDZ, PH e Rho GAP. A proteína ARHGAP21 é constituída de 1957 aminoácidos e possui peso molecular  $\geq 250$ KDa.

Em células humanas, foi demonstrado que o RNAm da ARHGAP21 é mais expresso em cérebro e músculos esqueléticos e cardíacos (Figura 2) (Basseres et al., 2002). Estudos mais recentes mostraram que o domínio Rho GAP da ARHGAP21 possui atividade catalítica sobre a clivagem de GTP de Cdc42 e RhoA (Dubois et al., 2005; Sousa et al., 2005). Além do mais, estudo utilizando metodologia de Duplo-Híbrido e imunoprecipitação demonstrou que ARHGAP21 associa-se à importante proteína de adesão,  $\alpha$ -catenina (Sousa et al., 2005). No entanto, ainda há controvérsias sobre a localização subcelular da ARHGAP21. Em um trabalho, ARHGAP21 foi encontrada colocalizada com o aparato do Golgi e em região juxtenuclear (Dubois et al., 2005),

enquanto que outro estudo demonstrou a presença da ARHGAP21 no núcleo, região perinuclear e nas junções célula-célula (Sousa et al., 2005).

Evidências indicam que as proteínas Rho GAPs desempenham importante função na inibição de Rho GTPases, regulando, desse modo, o crescimento e diferenciação celulares. Em situações anormais, as GTPases encontram-se hiperativadas, tornando-se insensíveis aos sinais reguladores, o que leva ao crescimento celular descontrolado, inibição da apoptose e instabilidade genética, resultando em desenvolvimento tumoral (Aznar e Lacal, 2001). Adicionalmente, uma regulação imprópria da migração e adesão celulares pode possibilitar invasividade das células tumorais e desenvolvimento de metástases (Price e Collard, 2001; Wittmann e Waterman-Storer, 2001).



**Figura 2:** Análise de Northern Blot, mostrando a expressão do RNAm da *ARHGAP21* em diversos tecidos humanos. Nota-se sua maior expressão em tecidos altamente diferenciados, como cérebro, músculos esquelético e cardíaco.

### 3 Família Rho e as Rho GAPs

A família de proteínas Rho é formada por alguns membros da superfamília Ras de pequenas moléculas de trifosfatases de guanosina (GTPases), presentes em células eucariotas. Essas proteínas estão envolvidas em muitos eventos biológicos, atuando no controle da transdução de sinal, que ligam receptores de membrana ao citoesqueleto de actina (Hall, 1998; Symons, 1996). Alguns membros da família Rho estão envolvidos na

progressão da fase G1 do ciclo celular, desempenhando importante função na transformação oncogênica (Roux et al., 1997). Além disso, as GTPases são necessárias para que as transformações mediadas por Ras induzam mudanças na morfologia celular. A capacidade das Rho GTPases em regular esses eventos é dependente da interação dessas moléculas com proteínas efetoras do citoplasma. As proteínas Rho podem ser encontradas associadas tanto a moléculas de GDP quanto de GTP. No entanto, apenas a proteína ligada ao GTP é ativa, ou seja, é capaz de interagir com proteínas efetoras.

Existem pelo menos 21 membros da família Rho, sendo três as mais extensivamente estudadas: RhoA, Rac1 e Cdc42, todas localizadas na superfície interna da membrana plasmática (Peck et al., 2002). A proteína RhoA interage com várias proteínas efetoras, coordenando a reorganização da actina e formação de fibras de estresse. A formação de protusões da membrana plasmática, observada em alguns tipos celulares, é induzida pelas proteínas Rac e Cdc42. A formação de lamelipódios e desorganização da membrana plasmática são dependentes da polimerização da actina, processo esse estimulado pela proteína Rac1, enquanto que a formação de filopódios depende da ligação cruzada entre proteínas ligantes da actina e feixes da própria actina, induzida pela proteína Cdc42 (Tapon e Hall, 1997).

Rac1 e Cdc42 também estão envolvidas na diferenciação de células musculares esqueléticas, cuja perda de função acarreta em perda de inibição por contato, crescimento independente de ancoragem, e conseqüentemente promove o desenvolvimento tumoral de músculo esquelético (Meriane et al., 2002). Além disso, modelos de sinalização das Rho regulam a expressão gênica hipertrófica cardíaca, agindo na morfologia da fibra muscular de cardiomiócitos, e podem estar envolvidos na patogênese de disfunções cardíacas e remodelamento cardiovascular (Kobayashi et al., 2002; Thorburn et al., 1997).

As GTPases são controladas por uma atividade GTPase intrínseca e também por várias proteínas regulatórias (Aznar e Lacal, 2001). Dentre elas encontram-se as proteínas inibitórias de dissociação da guanina (*Rho guanosine nucleotide dissociation inhibitors* – Rho GDIs), que inibem a atividade de troca GDP-GTP, e os fatores de troca de guanina (*guanine nucleotide exchange factors* – Rho GEFs), que facilitam a troca de GDP para GTP e ativam as proteínas Rho GTPases. As proteínas ativadoras de Rho GTPase (*GTPase activating proteins* – Rho GAPs) são proteínas importantes que promovem a hidrólise do

GTP, atuando como reguladores negativos das Rho GTPases, essenciais na organização do citoesqueleto, crescimento e diferenciação celulares, desenvolvimento neuronal e sinapses (Aznar e Lacal, 2001; Bishop e Hall, 2000). Estudos moleculares e bioquímicos revelaram uma região responsável pela atividade hidrolítica das Rho GAPs de aproximadamente 170 aminoácidos, denominada de domínio Rho GAP (ou domínio BH) (Moon e Zheng, 2003).

Vários tipos tumorais já foram associados ao aumento da expressão de Rho GTPases, indicando uma possível participação das Rho GAPs na patogênese tumoral. Por exemplo, o gene DLC1 (*deleted in liver cancer*), membro da família Rho GAP, encontra-se deletado em 44% dos carcinomas hepatocelulares primários. Dessa maneira, alguns genes codificadores de proteínas Rho GAPs são candidatos a tornarem-se genes supressores tumorais.

Estudos de expressão da ARHGAP9, uma proteína com domínios Rho GAP, PH e WW, mostraram que a proteína encontrava-se altamente expressa em tecidos hematopoiéticos, incluindo linhagens celulares de leucemias de células B e T, linhagens mielóides ou linfomas de Hodgkin. Além disso, análises de transfecção sugerem que a ARHGAP9 pode regular a adesão de células hematopoiéticas à moléculas da matrix extracelular (Furukawa et al., 2001). A ARHGAP12, que possui domínios similares à ARHGAP9, é fortemente expressa em carcinomas mamários, diferentemente do que se observa em tecidos normais e de linhagens de células tumorais (Zhang et al., 2002).

Prakash e colaboradores descreveram deleção do gene da ARHGAP6 na Síndrome da pele defeituosa, sugerindo que este gene poderia estar associado à má formação dos olhos, pele e sistema nervoso central, embora estudos adicionais em ratos transgênicos não confirmassem esta hipótese (Prakash et al., 2000). Estudos em camundongos *knockout* indicaram que a outra proteína Rho GAP, p190-B, está associada à diferenciação celular do timo e cérebro, e também ao crescimento celular (Sordella et al., 2002). Também foi verificada a participação da p190-B na regulação da atividade das Rho GTPases durante a miogênese (Sordella et al., 2003).

Recentemente, foi descrito por CHIKUMI e colaboradores uma nova rota bioquímica na qual tirosinas quinase podem regular a atividade das Rho GTPases por meio da fosforilação de Rho GEFs (Chikumi et al., 2002). Nessa nova via, a trombina pode induzir ativação da quinase de adesão focal (*focal adhesion kinase* – FAK), que por sua vez

provoca acúmulo de Rho GTPase em sua forma ativa, provavelmente participando de mecanismo de prolongação da ação das Rho GTPases. Por outro lado, a FAK também é capaz de suprimir a função das Rho, indicando uma possível interação direta ou indireta entre FAK e Rho GAPs. Esta evidência é confirmada pela interação existente entre FAK e o domínio SH3 (*Src homology 3*) da proteína GRAF (*GAP for Rho associated with FAK*), encontrada expressa constitutivamente em células cerebrais e cardíacas (Taylor et al., 1998).

Diante de todas essas evidências, o estudo de novas proteínas citoesqueléticas torna-se fundamental para o entendimento dos processos de organização do citoesqueleto, diferenciação celular e desenvolvimento tumoral. Considerando-se a ARHGAP21 uma proteína Rho GAP, muitos eventos fisiológicos e patológicos podem ser associados à expressão desta proteína.

#### **4 Hipertrofia cardíaca**

A hipertrofia cardíaca é considerada um evento negativo, uma vez que pacientes afetados por patologias cardiovasculares estão frequentemente associados à perda de função cardíaca e hipertrofia mal adaptativa. No entanto, atletas submetidos a exercício físico intenso são capazes de desenvolverem a chamada hipertrofia fisiológica ou compensatória, caracterizada pelo aumento do volume dos cardiomiócitos e angiogênese adequada na ausência de fibrose ou apoptose, o que aumenta em muito a função contrátil do miocárdio. Por outro lado, estresses gerados por hipertensão, sobrecarga de volume, desordens endócrinas, infarto do miocárdio e disfunção contrátil por mutações herdadas em proteínas sarcoméricas ou do citoesqueleto são responsáveis pela hipertrofia mal adaptativa. Durante este processo, ocorre aumento da deposição de tecido estromal e morte celular por apoptose com conseqüente disfunção contrátil (Olson e Schneider, 2003).

Em resposta à sobrecarga crônica de pressão ou volume, o coração adulto sofre crescimento hipertrófico patológico. Esta resposta é caracterizada pelo aumento no tamanho do cardiomiócito e conteúdo miofibrilar, bem como um padrão alterado da expressão gênica cardíaca, incluindo indução imediata de alguns genes e reexpressão de vários transcritos gênicos fetais. Inicialmente, estas mudanças são compensatórias, mas

quando os estímulos tornam-se persistentes, pode ocorrer decréscimo do desempenho cardíaco.

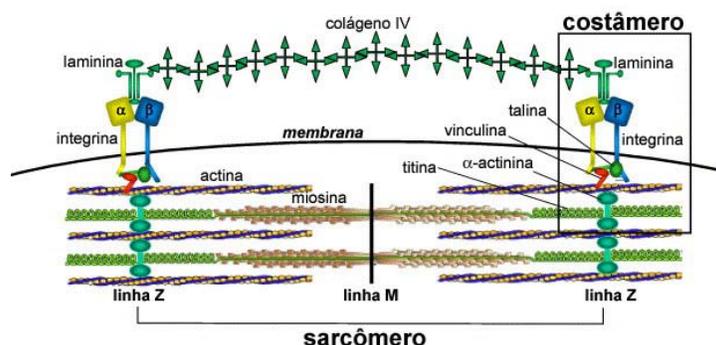
A hipertrofia cardíaca é um processo complexo que envolve numerosos estímulos diferentes, tais como estresse mecânico, ativação neurohumoral, fatores de crescimento e citocinas (Tarone e Lembo, 2003). O estresse mecânico imposto sobre as paredes do coração pela sobrecarga hemodinâmica representa evento primário da resposta hipertrófica cardíaca e constitui um dos fatores mais importantes do processo de remodelamento adaptativo do miocárdio e crescimento anormal de miócitos cardíacos, dentre os quais se destaca a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão. A tradução mecânica afeta vias de sinalização essenciais, como proliferação, diferenciação, crescimento e sobrevivência celular do miocárdio.

Os estímulos mecânicos geralmente têm início nos receptores de membrana que, juntamente com grupos de proteínas a eles associadas, ativam vias de sinalização envolvidas na regulação de moléculas responsáveis pela execução do programa hipertrófico. A complexidade do processo é enorme devido à participação de numerosas proteínas na retroalimentação positiva e/ou negativa entre vias distintas, e conseqüente geração de uma ampla rede de sinalização de execução precisa e cinética.

Um dos principais complexos responsáveis pela tradução de forças mecânicas são as integrinas, uma classe de proteínas receptoras transmembranas e que conectam fisicamente a maquinaria contrátil sarcomérica às proteínas da matriz extracelular (Brancaccio et al., 2006). Estes receptores encontram-se concentrados em áreas específicas da membrana plasmática, conhecidas como costâmeros e discos intercalares (Figura 3). Os costâmeros são descritos originalmente como placas eletro-densas localizadas na intersecção das linhas Z com a membrana plasmática, compostas por uma rede protéica de adesão focal e que permitem a conexão lateral das miofibrilas com a membrana celular (Samarel, 2005). Já os discos intercalados são estruturas juncionais que conectam os filamentos de actina à membrana da célula, fornecendo suporte mecânico entre cardiomiócitos vizinhos durante os batimentos cardíacos.

A porção citoplasmática das integrinas interage indiretamente com os filamentos de actina via proteínas que fazem parte da maquinaria molecular e que iniciam a resposta sinalizadora. Estas proteínas incluem enzimas e proteínas adaptadoras, tais como talina,

vinculina,  $\alpha$ -actinina, ILK, paxilina, filamina, zixina, p130Cas, Src e FAK (Figura 3) (Brancaccio et al., 2006). Uma vez ativadas, estas proteínas iniciam uma cascata de eventos bioquímicos que culminam na ativação de moléculas efetoras como AKT, RAS e ERK1/2 que executam o programa hipertrófico (Sugden, 2003).



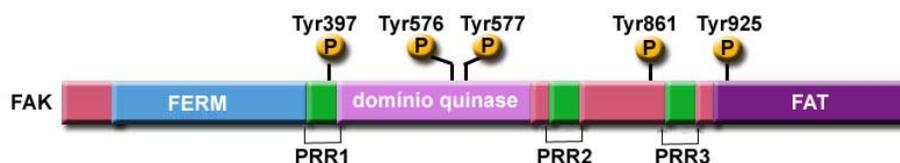
**Figura 3:** Esquema da ligação integrina-sarcômero nos costâmeros. Os sarcômeros consistem em feixes paralelos de miosina interdigitados com filamentos de actina, ancorados nas linhas Z. Os sarcômeros estão ancorados as integrinas presentes na membrana plasmática por meio de numerosas proteínas que compõem a linha Z, entre elas estão  $\alpha$ -actinina, vinculina e talina. Juntas, estas proteínas formam os costâmeros (*retângulo*), que são complexos juncionais responsáveis pela conexão da maquinaria contrátil à proteínas da matriz extracelular.

Dentre as muitas vias de sinalização participantes destes eventos estão os membros das Rho GTPases, que participam ativamente do desenvolvimento hipertrófico cardíaco (Sato et al., 2003). Além disso, muitos estudos vêm demonstrando a participação de FAK no controle da expressão gênica hipertrófica cardíaca, sendo que seu estado de fosforilação e atividade está diretamente ligados ao estresse cardíaco após sobrecarga de pressão (Fonseca et al., 2005; Yi et al., 2003). Mais que isso, FAK desempenha importante função no crescimento hipertrófico e sobrevivência de células cardíacas, protegendo cardiomiócitos cultivados da apoptose *in vitro* (Heidkamp et al., 2002). Outra importante proteína é a Proteína Quinase C isotipo zeta (PKC $\zeta$ ), membro da subfamília atípica das

PKCs e que é considerada um regulador-chave de vias de sinalização intracelulares, induzida por estímulos externos.

## 5 Focal Adhesion Kinase (FAK)

FAK é uma proteína tirosina quinase citoplasmática que é rapidamente ativada por vários fatores de crescimento e por ligantes a todos complexos contendo  $\beta_1$ -,  $\beta_3$ - ou  $\beta_5$ -integrinas (Parsons, 2003). FAK é composta por um domínio amino-terminal FERM (*protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology*), um domínio quinase central (CAT), regiões ricas em prolina (PRR), e um domínio carboxi-terminal FAT (*Focal Adhesion Targeting*) (Figura 4).



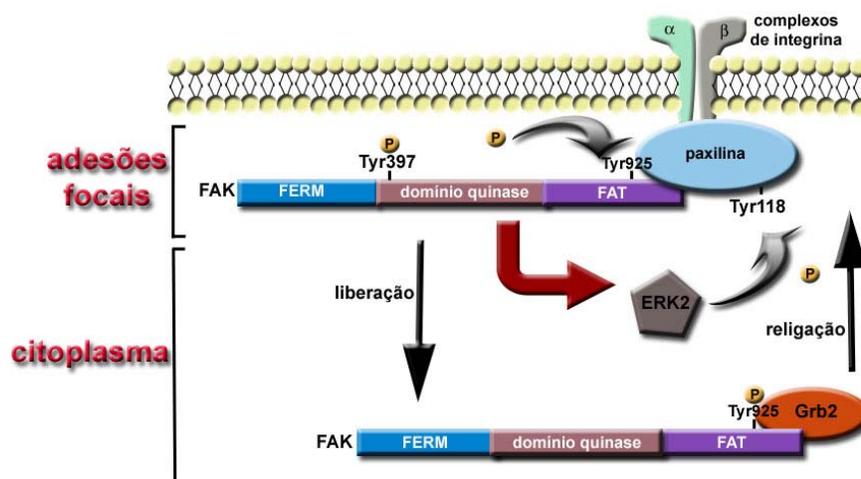
**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura protéica primária da FAK, composta por três domínios principais: domínio N-terminal FERM, domínio quinase central e domínio C-terminal FAT. FAK possui múltiplos sítios de fosforilação em tirosina que, quando fosforilados, culminam na ativação de FAK.

O domínio FERM é responsável pela ligação de FAK à integrina e promoção da ativação de outras proteínas tirosina quinases não-receptoras (Chen et al., 2001). As duas regiões ricas em prolina da porção C-terminal de FAK possuem sítios de ligação para proteínas que contêm domínio SH3, tais como p130Cas, GRAF (*GTPase Regulator Associated with FAK*) e ASAP1 (*Arf GTPase-activating protein – Arf GAP*) (Chodniewicz e Klemke, 2004; Parsons, 2003). A localização de FAK nas regiões de complexo de integrinas dos sítios de adesão focal é promovida pelo domínio FAT de FAK, também localizado na porção C-terminal. Muitas evidências indicam que esta localização é mediada por associação indireta através de sua ligação com paxilina e talina (Schlaepfer et al., 2004). O domínio FAT também é capaz de se ligar diretamente ao ativador de proteínas

Rho GTPases, conhecida como p190Rho GEF, fosforilando-a e assim, promovendo a ativação de RhoA (Zhai et al., 2003).

FAK possui múltiplos sítios de fosforilação de resíduos de tirosina e serina. Em termos gerais, a fosforilação em tirosina promove a ativação de FAK, enquanto que a fosforilação em serina deprime a atividade de FAK. Existem cinco resíduos principais de fosforilação em tirosina: Tyr397, Tyr576, Tyr577, Tyr861 e Tyr925. A ativação de FAK requer a autofosforilação do resíduo Tyr397, que cria uma conformação molecular reconhecida pela proteína Src. Esta proteína, então, fosforila os resíduos Tyr576/Tyr577 do domínio quinase de FAK, e o sítio Tyr861 (Schaller et al., 1994). A cascata de fosforilação de FAK culmina na fosforilação do resíduo Tyr925 por Src ativada, criando um sítio ligante de SH2 para proteína adaptadora GRB2. Através de múltiplas interações proteína-proteína, a ativação de FAK resulta na subsequente ativação de algumas importantes proteínas, como quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase N-terminal c-Jun (JNK), quinase ativada por mitógeno (MAPK) e as GTPases Rac1 e RhoA, moléculas implicadas na hipertrofia cardíaca (Dorn e Force, 2005).

O sítio de ligação de GRB2 a Tyr925 de FAK sobrepõe-se parcialmente à região em que paxilina se liga à FAK (Liu, G. et al., 2002). Dessa forma, a fosforilação de FAK em Tyr925, e subsequente ligação de GRB2, promovem deslocamento de paxilina, e consequente dissociação de FAK dos sítios de adesão focal (Katz et al., 2003). Por outro lado, o complexo FAK-Src leva a fosforilação de paxilina em Tyr118, evento que propicia a ligação de ERK2 à paxilina, e a fosforilação de paxilina mediada por ERK2 facilita o religamento de FAK a paxilina (Liu, Z.X. et al., 2002). Sendo assim, a presença de FAK nos sítios de adesão focal é regulada por um ciclo de retroalimentação, no qual ativação de FAK-Src e sinalização de ERK2 primeiramente liberam FAK dos contatos de adesão e então, a fosforilação de paxilina por ERK2 leva a religação de FAK aos sítios de adesão focal (Figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática do processo de renovação dos sítios de adesão focal envolvendo FAK.

Muitos estudos já demonstraram que FAK é ativada nos cardiomiócitos em cultura por variados estímulos hipertróficos, entre eles fenilefrina (PE) e endotelina-1 (Pham et al., 2000; Taylor et al., 2000; Torsoni et al., 2003a), além de ter sua atividade aumentada em animais submetidos à sobrecarga de pressão (Franchini et al., 2000; Laser et al., 2000; Melendez et al., 2002; Yi et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que a inativação de FAK em miocárdio adulto não afeta a função cardíaca basal, mas promove hipertrofia cardíaca excêntrica e fibrose após indução de estresse mecânico por constrição da aorta (Peng et al., 2006). Outro estudo recente mostrou que a depleção de FAK restrita aos miócitos diminui o crescimento do coração e marcadamente reduz a resposta hipertrófica à constrição transversal da aorta, indicando que a inibição da sinalização de FAK sozinha é suficiente para suprimir as diversas sinalizações dentro do microambiente cardíaco *in vivo* (DiMichele et al., 2006).

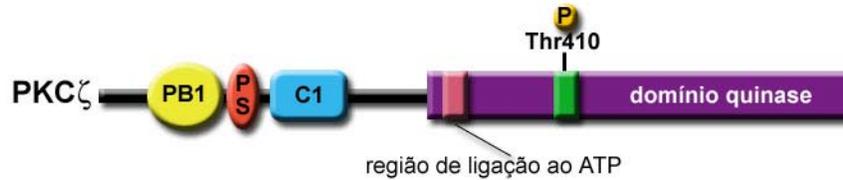
## 6 Proteína Quinase C isotipo zeta (PKCζ)

A família de proteínas quinase C de isozimas pertence a um grupo extenso de proteínas quinases Ser/Thr, e é formada por numerosos membros, que são agrupados em três subfamílias, dependendo da sua estrutura e mecanismo de regulação. A primeira

subfamília de PKCs são as isoformas clássicas ou convencionais (cPKC)  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ , que possuem região ligadora de fosfolípidos e  $\text{Ca}^{2+}$ , e dois domínios *zinc-finger* (Mellor e Parker, 1998). A segunda subfamília de PKCs é constituída pelas isoformas novas (nPKC)  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ , que, ao contrário das cPKCs, são insensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo ambas subfamílias serem ativadas por forbol ésteres, como diacilglicerol. Já a terceira subfamília de PKCs, formada pelas isoformas atípicas (aPKC)  $\zeta$  e  $\lambda/\iota$ , constitui um subgrupo de PKCs insensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e diacilglicerol, por não possuir a região ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  e ter apenas um domínio *zinc-finger* (Hirai e Chida, 2003).

PKC $\zeta$ , bem como PKC $\lambda/\iota$ , é composta por quatro domínios funcionais: um domínio PB1 na região amino-terminal, uma seqüência de pseudosubstrato (PS), um domínio C1, um domínio quinase na porção carboxi-terminal, e um único domínio *zinc-finger* (Figura 6). PS é uma seqüência de aminoácidos presente na região N-terminal de PKC $\zeta$ , que bloqueia a cavidade de ligação ao substrato do domínio quinase de PKC $\zeta$ , funcionando como um mecanismo autoinibitório. O domínio PB reconhece regiões OPCA (OPR/PC/AID) de outras proteínas, como PAR-6 e MEK5 (Ponting et al., 2002). PAR-6, juntamente com PAR-3, forma um complexo ternário com PKC $\zeta$ , no qual PAR-6 suprime a atividade de PKC $\zeta$ , que é então liberada para se associar à Rho GTPase ativa Cdc42. Este processo está relacionado aos processos de formação de protusões na membrana plasmática, migração e adesão celular (Joberty et al., 2000; Yamanaka et al., 2001).

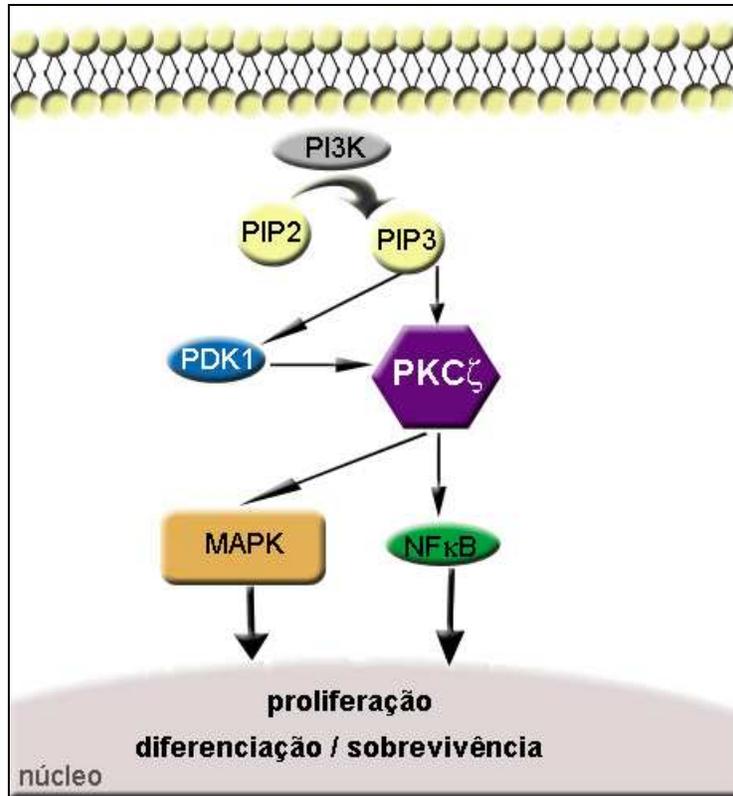
O mecanismo de ativação de PKC $\zeta$  consiste basicamente de dois eventos principais. Estímulos provocam liberação do PS da cavidade de ligação ao substrato de PKC $\zeta$ , expondo o principal resíduo de fosforilação e ativação de PKC $\zeta$  localizado no domínio quinase, Thr410. de resíduos no domínio quinase (Newton, 2001). PKC $\zeta$  é ativada por componentes lipídicos, tais como fosfatidilinosítois (Nakanishi et al., 1993), ácido fosfatídico (Limatola et al., 1994), ácido aracdônico e ceramidas (Muller et al., 1995).



**Figura 6:** Representação esquemática da estrutura proteica primária de PKC $\zeta$ . O resíduo Thr410 é o principal sítio de fosforilação de PKC $\zeta$ , responsável pela ativação da proteína.

Dentre estes lipídios, destaca-se fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que é produzido a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) por meio de fosfatidilinositol-3 kinase (PI3K) em resposta a vários fatores de crescimento (Nakanishi et al., 1993). PIP<sub>3</sub> atua sobre PKC $\zeta$  de duas maneiras: diretamente, modulando a autoinibição exercida pelo PS, e indiretamente, pela fosforilação do domínio quinase através de PDK1. Ambas as reações catalisadas pela PI3K são necessárias para ativação completa e estável de PKC $\zeta$  (Hirai e Chida, 2003). A fosforilação de PKC $\zeta$  leva à ativação da cascata das MAPK, bem como à translocação de NF $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo da célula (Berra et al., 1995; Leitges et al., 2001). Dessa maneira, PKC $\zeta$  está diretamente envolvida na sobrevivência, proliferação e mecanismos de transcrição gênica (Figura 7).

Ainda há controvérsias sobre a participação de PKC $\zeta$  durante o processo de remodelamento cardíaco. Estudo recente mostrou que o conteúdo total de PKC $\zeta$  aumenta com a sobrecarga de volume induzida em ratos, sugerindo uma possível participação de PKC $\zeta$  em processos hipertróficos (Sentex et al., 2006). No entanto, outros trabalhos demonstraram que não há mudanças significativas na expressão proteica de PKC $\zeta$  total em cardiomiócitos de animais submetidos à bandagem da aorta, sugerindo que PKC $\zeta$  não é modulada pela sobrecarga de pressão (Braun et al., 2002; Gu e Bishop, 1994). Entretanto, o estado de ativação de PKC $\zeta$  durante este processo ainda não está esclarecido.



**Figura 7:** Representação esquemática simplificada da via de sinalização de PKC $\zeta$ , que quando ativada por PIP $_3$  (direta ou indiretamente, por meio de PDK1), resulta na ativação da cascata de MAPK e translocação de NF $\kappa$ B para o núcleo.

O envolvimento de PKC $\zeta$  na ativação das vias de MAPK e NF $\kappa$ B, duas proteínas cuja participação em mecanismos de estresse mecânico e hipertrofia cardíaca já está bem descrita, sugere que PKC $\zeta$  pode desempenhar importante função durante processo hipertrófico cardíaco.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivos gerais**

1. Avaliar a expressão e distribuição da ARHGAP21 durante estresse mecânico agudo induzido em coração de ratos adultos.
2. Verificar possíveis interações e mecanismos de atuação da ARHGAP21 em tecido cardíaco de ratos adultos submetidos à sobrecarga de pressão.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar a localização da ARHGAP21 em cardiomiócitos de ratos submetidos à coarctação da aorta.
2. Identificar possíveis proteínas associadas a ARHGAP21 em cardiomiócitos de ratos submetidos à sobrecarga de pressão e espontaneamente hipertensos.
3. Avaliar se ocorrem as associações protéicas com proteínas fosforiladas.
4. Identificar se ARHGAP21 associa-se à FAK e por meio de qual porção desta proteína a associação se dá.
5. Avaliar a expressão das proteínas associadas a ARHGAP21 em extrato fracionado de cardiomiócitos submetidos à bandagem da aorta.
6. Avaliar a localização da ARHGAP21 em cardiomiócitos de ratos neonatos normais e submetidos a estiramento mecânico.



# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **1 Reagentes e anticorpos**

Faloidina-TRITC foi adquirida da Sigma (St Louis, MO). Anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra conjugado com AlexaFluor<sup>®</sup> 488 e reagente de montagem com DAPI ProLong<sup>®</sup> Gold foram adquiridos da Molecular Probes (Eugene, OR). Anticorpo policlonal anti-ARHGAP21 foi obtido pela inoculação em coelhos de peptídeo sintético (KSDSGSLGDAKNEKE) correspondendo aos resíduos 1856-1870 da proteína ARHGAP21 humana pela Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, Texas). Anticorpo anti-ARHGAP21 gerado do soro destes coelhos foram então purificados. Anticorpos primários policlonais gerados em coelhos contra FAK, PKC $\zeta$ , c-Src, P-PKC $\zeta$  Thr410 e Cdc42, e anticorpo primário policlonal gerado em cabra contra P-FAK Tyr925 foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticorpo monoclonal anti-GST foi gentilmente cedido por Jörg Kobarg (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron). Anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -catenina foi adquirido da BD Transduction Laboratories. Reagente de detecção de quimioluminescência (ECL) foi obtido da Amersham (Buckinghamshire, UK). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma.

## **2 Modelos experimentais de indução hipertrófica cardíaca**

Modelo experimental de indução hipertrófica cardíaca foi adotado com a finalidade de avaliar o papel da proteína ARHGAP21 em células cardíacas, tecido em que esta proteína foi bastante expressa. Ensaio funcional foi realizado em miocárdio de ratos, cujas fibras foram submetidas à sobrecarga de pressão, induzida por bandagem da aorta ascendente. Além disso, ratos espontaneamente hipertensos, que desenvolvem hipertrofia ao longo da vida, foram utilizados. Estudos prévios já demonstraram que o aumento da pressão sanguínea a partir da 7 semana de vida destes animais é capaz de induzir mudanças na expressão de diversos genes relacionados à hipertrofia entre 8-12 semanas, seguida por uma fase ativa de crescimento hipertrófico entre 16-20 semanas (Bell et al., 2004). Sendo assim, utilizamos apenas a fase aguda de mudanças de expressão gênica relacionada à hipertrofia cardíaca (ratos com 8 semanas).

Também foi utilizada cultura primária de cardiomiócitos de ratos neonatos, a qual foi submetida a estiramento mecânico. Extrato fracionado de miócitos cardíacos de ventrículo esquerdo (VE) de rato adulto, submetido ou não à constrição da aorta, foi obtido

para análise da expressão da ARHGAP21 nos diferentes compartimentos celulares. Análise de possíveis interações da ARHGAP21 com outras proteínas também foi viabilizada pela extração protéica total de cardiomiócitos de rato adulto normal e espontaneamente hipertenso, e submetidos à coarctação da aorta ascendente. Isolamento de cardiomiócitos ventriculares de rato adulto normal e induzido à sobrecarga de pressão foi realizado e analisado por microscopia eletrônica e confocal. Procedimentos:

### **2.1.1 Estímulo hipertrófico induzido por sobrecarga de pressão**

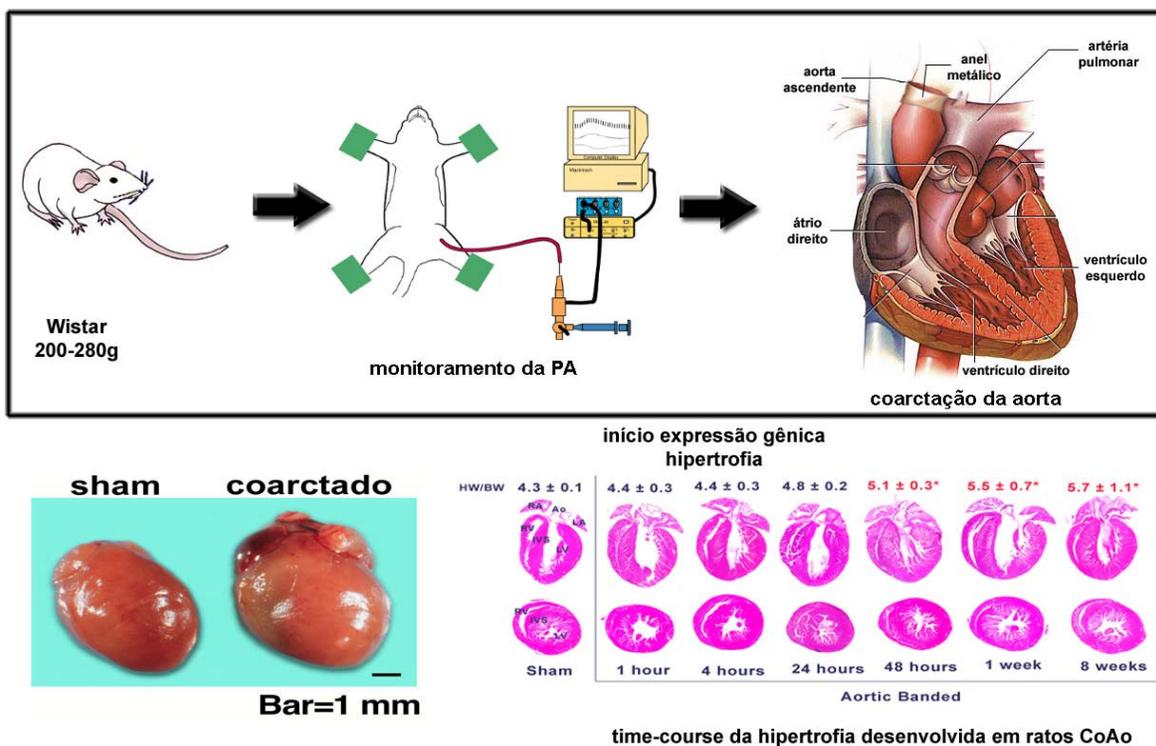
### **2.1.2 Preparação dos animais**

Foram utilizados ratos Wistar, machos, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), com pesos entre 200 e 300g e em torno de 7-8 semanas de idade. Após a anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kgi.p.), os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C, entubados por via orotraqueal com tubo plástico de Gelco<sup>®</sup> submetidos à ventilação controlada com ventilador Harvard para animais de pequeno porte. A temperatura corpórea e a ventilação permaneceram controladas por todo o período experimental. As artérias carótida comum direita e femoral direita foram então cateterizadas para registro contínuo da pressão arterial. O tórax do animal foi aberto através de incisão no 5º espaço intercostal esquerdo, expondo a aorta ascedente. A bandagem da aorta foi realizada por constricção da aorta com anel metálico de prata ajustável, produzindo aumentos controlados de resistência ao fluxo sanguíneo e assim causando sobrecarga de pressão no coração (Figura 8). Estes procedimentos foram adotados por diferentes períodos de tempo (30', 1h e 2h). Como controle, ratos Wistar machos, também com pesos entre 200 e 300g foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto pela colocação do anel metálico na aorta.

### **2.1.3 Obtenção de extrato protéico total de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de ratos adultos**

VE de ratos Wistar adultos entre 7-8 semanas foi coletado e homogeneizado em tampão de solubilização (10mM EDTA, 100mM Tris-Cl pH 7,5, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100mM NaF, 10mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2mM PMSF, 0,1mg/mL de aprotinina, 1% Triton-X 100) a 4°C em *Polytron PTA 20S* (modelo PT 10/35; Brinkman Instruments, Westbury, NY), seguindo-se

centrifugação a 12000Xg por 20 minutos. O sobrenadante foi quantificado pelo método de Bradford e imunoprecipitados com anticorpos primários específicos, ou armazenados em freezer -80°C.



**Figura 8:** *Superior* – Esquema do modelo experimental adotado de estresse mecânico agudo em corações de ratos adultos induzido por sobrecarga de pressão. *Inferior esquerda* – exemplificação das mudanças morfológicas hipertróficas que ocorrem no coração de um animal submetido à coarctação da aorta; *Inferior direita* – figura ilustrativa das alterações na razão peso coração/peso corpóreo sofridas com o tempo de coarctação da aorta. Nota-se que já existe aumento significativo nesta razão a partir de 48h de bandagem da aorta. ([http://cardiogenomics.med.harvard.edu/groups/proj1/pages/band\\_hist.html](http://cardiogenomics.med.harvard.edu/groups/proj1/pages/band_hist.html)).

#### 2.1.4 Fracionamento celular de ventrículo esquerdo de ratos adultos

O fracionamento subcelular seguiu metodologia descrita por MIZUKAMI et al (Mizukami et al., 1997), com pequenas modificações. Ao final de cada período de coarctação da aorta, a cavidade torácica foi aberta e o VE extraído foi homogeneizado em 5 volumes de tampão de solubilização (0,32M sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM

EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM PMSF e 0.1 mg of aprotinina/mL) a 4°C com o uso de *Polytron PTA 20S generator* (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments; Westbury, NY), utilizado em velocidade máxima por 30s. Seguiu-se então centrifugação (1000Xg, 10 min, 4°C) para obtenção de precipitado contendo fração nuclear. O sobrenadante foi centrifugado (100000Xg, 60 min, 4°C) para separação da porção citosólica. Precipitado resultado desta centrifugação corresponde à fração membranar. A fração nuclear foi solubilizada em tampão contendo Triton (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 50 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM PMSF, 0.1 mg of aprotinina/mL) por 30 min a 4° sob agitação e centrifugada a 15000Xg por 30 min a 4°C. O extrato nuclear foi obtido do sobrenadante. Todas frações obtidas foram armazenadas a – 80°C, com posterior quantificação protéica.

### **2.1.5 Isolamento de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de ratos adultos**

Cardiomiócitos de VE de ratos Wistar adultos e submetidos à coarctação da aorta por 2h foram isolados por digestão com colagenase tipo IA (Sigma) utilizando-se perfusão de Langendorff modificada, como descrito previamente (Torsoni et al., 2003b). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kgi.p.) e os corações retirados, tomando-se cuidado para remoção do pericárdio. A aorta foi acoplada a uma cânula do sistema de perfusão, permitindo que o órgão fosse perfundido com solução tampão HEPES saturada com O<sub>2</sub> (10mM HEPES, 118mM NaCl, 5mM KCl, 1,2mM MgSO<sub>4</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6mM glicose, heparina, xilocaína, pH7,4). Após 2 min, a solução foi trocada por solução tampão HEPES acrescida de EGTA (4mM) por 10 min, seguindo-se digestão com solução enximática por 20 min (tampão HEPES com 0,1% BSA e 300µg/mL colagenase). Ao final da digestão, os corações foram retirados da cânula e os átrios e aorta foram dissecados. Em uma placa de petri estéril, o tecido ventricular foi cortado em pequenos pedaços e a suspensão foi filtrada em gaze. Os miócitos foram colocados a 37°C em 40mL de tampão HEPES saturado de O<sub>2</sub> acrescido de 0,1% BSA, adicionando-se crescente concentração de solução de Ca<sup>2+</sup> até concentração final de 1,2mM. Os miócitos foram centrifugados por 10 min a 12Xg (2 vezes) e transferidos para lâminas cobertas com poli-L-lisina. A viabilidade dos miócitos cardíacos foi de 40%,

determinada por análise morfológica. Aproximadamente 60 células viáveis foram analisadas por lâmina.

### **2.1.6 Imunomicroscopia eletrônica**

VE de ratos controle e ratos submetidos à sobrecarga de pressão por 2h foram fixados em paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,1% e tampão cacodilato 0,1M (pH7,4) por 1h a TA, e cortados em pequenos pedaços (<1mm). Os tecidos foram desidratados gradualmente em séries de etanol crescente e embebidos em resina (LR White) a -20°C. Finas secções de tecido foram cortadas com navalha de diamante e montadas em pequenas telas de níquel, que foram lavadas em água ultra-pura (3 vezes) e incubadas por 10 min em tampão Tris 0,05M acrescido de 0,05% de lisina e 1% de BSA. A seguir, as telas foram lavadas em tampão Tris 0,05M (3 vezes) e bloqueadas com Tris 0,05M-1% BSA acrescido de 0,05% de Tween 20 por 30 min a TA. Os cortes foram então incubados com anticorpo anti-ARHGAP21 (1:100) a 4°C por 12h. Após lavagem em tampão Tris 0,05M-1% BSA (3 vezes), os cortes foram incubados por 1h com anticorpo secundário biotilado (1:100) e a reação visualizada com estreptoavidina conjugada com ouro (SAV-G/10nm Sigma, USA) diluída em BSA 1% na proporção de 1:25. As telas foram lavadas em tampão Tris 0,05M (3 vezes) e em água ultra-pura (3 vezes). Como controle negativo, cortes foram submetidos às mesmas condições, exceto pela omissão do anticorpo primário. Todos os cortes foram contrastados com acetato de uranila por 5 min e tampão citrato por 30s. A reação foi visualizada com microscópio eletrônico LEO 906 em uma voltagem de 60kV.

## **2.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**

Ventrículo esquerdo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 8 semanas foram submetidos aos mesmos procedimentos de extração protéica total adotados para animais submetidos à coarctação da aorta.

## **2.3 Cultura primária de miócitos cardíacos de rato neonatal**

Cultura primária de miócitos cardíacos de rato neonato (NRVMs) foi cultivada e submetida a estiramento visando observar-se a atividade da ARHGAP21 por *Western Blot* e também a sua distribuição nos NRVMs por microscopia confocal. Assim, NRVMs foram

retirados de ventrículos de ratos Wistar neonatos (1-3 dias de vida), purificados em gradiente Percoll descontínuo, suspensos em meio DMEM (Invitrogen) contendo 10% de soro de cavalo, 5% de soro fetal e 0,5% de penicilina/estreptomicina, e plaqueados em placas Bioflex de colágeno tipo I (Flexcell International Corp, McKeesport, PA). Após 48 horas, o meio foi trocado por DMEM livre de soro e incubado em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas antes de ser utilizado. A cultura de NRVMs plaqueada foi estirada em uma unidade de distensão de 115% do comprimento de relaxamento em Flexcell FX-3000, numa frequência de 1 Hz (0,5s de estiramento/0,5s de relaxamento) por 2 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C. Controles de células NRVMs não submetidas à distensão foram usados. As células então seguiram para análise de *immunoblotting*. Para isso, as células foram ressuspensas em tampão RIPA (50 mM, pH 7.4 Tris-HCl, 1% NP-40, 0,25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1µg/mL aprotinina, leupeptina, pepstatina) 200µl/10<sup>7</sup> células, incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugados a 12000Xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então acondicionado em novo tubo e a concentração protéica realizada pelo método de Bradford, se armazenado as amostras em freezer -80°C. Para realização de microscopia confocal, os poços compostos por silicone que serviram de base para o cultivo dos cardiomiócitos neonatos foram cortados e submetidos à reação de imunofluorescência.

### 3 Microscopia confocal

Lamínulas contendo cardiomiócitos isolados de VE de ratos adultos isolados ou NRVMs foram fixadas com PBS paraformaldeído 4% por 15 minutos, bloqueadas com PBS acrescido de leite em pó magro 3% por 20 minutos e incubadas com anticorpo primário anti-ARHGAP21 (1:150) overnight a 4°C. Após incubação com anticorpo primário, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes) por 1 hora a TA no escuro (1:500), seguindo-se incubação com faloidina marcada com TRITC (1:500) por 45 minutos a TA no escuro. As lâminas foram então lavadas e montadas com reagente de montagem com DAPI ProLong<sup>®</sup> Gold (Molecular Probes). As imagens foram captadas pelo microscópio confocal laser (Zeiss LSM510) com objetiva de imersão em óleo de 63X. Na ausência de anticorpos

primários, a utilização dos anticorpos secundários (controle negativo) não produziu nenhuma marcação significativa.

## **4 Ensaio de Pull Down**

### **4.1 Construções utilizadas**

Foram utilizados os vetores de expressão pGEX2T contendo a seqüência do domínio amino-terminal de FAK (FERM-GST; resíduos 1 a 400 aa), pGEX2TK codificando a proteína de fusão C-terminal de FAK (C-term-GST; resíduos 765 a 1052 aa), e pGEX-KG contendo a seqüência de cDNA do domínio catalítico de FAK (CAT-GST; resíduos 390 a 696 aa). Estas construções foram gentilmente cedidas por Jun-Lin Guan do Departamento de Medicina Molecular da *Cornell University, Ithaca, NY* (domínio FERM), e Michael Schaller do Departamento de Microbiologia e Centro do Câncer da *University of Virginia School of Medicine* (domínios CAT e C-terminal). Todas as construções foram inseridas em *Escherichia coli* BL21 (RIL) Codon Plus e submetidas aos procedimentos adotados previamente (Cooper et al., 2003; Dunty et al., 2004; Schaller et al., 1995).

### **4.2 Expressão das proteínas recombinantes**

Inoculou-se a colônia de *E.coli* transformada com o pGEX recombinante em falcon contendo 100mL de meio YTA e incubou-se *overnight* sob agitação vigorosa a 37°C. A 1litro de meio YTA foi adicionado 50mL da pré-cultura e crescido até que a  $A_{600}$  atingisse aproximadamente 0,8. A expressão da proteína de fusão foi induzida pela adição 10mL de IPTG 100mM (concentração final de 1mM), seguida de um período de incubação adicional de 5h. Centrifugou-se a 6000Xg por 15 minutos a 4°C e o precipitado bacteriano foi suspenso em 50mL de tampão de lise (50mM Tris-Cl pH7,5, 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 10µg/mL leupeptina, 10µg/mL pepstatina, 1mM PMSF). As células foram lisadas usando-se um sonicador ultrassônico por 10 segundos (4X), seguida de centrifugação a 12000Xg por 10 minutos a 4°C para remover o material insolúvel. O lisado foi armazenado a -80°C.

### 4.3 Ensaio de interação in vitro – Pull Down

Adicionou-se 1mL de pérolas de Glutathione Sepharose 4B 50% (Amersham) aos lisados bacterianos contendo as respectivas proteínas de fusão, e incubou-se a mistura por 1 hora a 4°C sob agitação, seguida de centrifugação a 500Xg por 5 minutos a 4°C. Lavou-se as pérolas com 5mL de tampão de lise e centrifugou-se a 500Xg por 5 minutos a 4°C. O procedimento foi repetido por mais duas vezes para um total de 3 lavagens. Análise das proteínas de fusão foi realizada em gel SDS-PAGE, coradas com azul de Coomassie. 50µl de pérolas de Glutathione, conjugadas com as três diferentes porções de FAK acopladas ao GST, foram incubadas com 500µg de extrato protéico total de VE de ratos Wistar normais e SHR por 2h a 4°C sob agitação. Lavaram-se as pérolas com 5mL de tampão de solubilização (10mM EDTA, 100mM Tris-Cl pH 7,5, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100mM NaF, 10mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2mM PMSF, 0,1mg/mL de aprotinina, 1% Triton-X 100) e centrifugou-se a 500Xg por 5 minutos a 4°C. O procedimento foi repetido por mais duas vezes para um total de 3 lavagens. 20µl de tampão de carregamento (0,35M Tris-Cl pH6,8, 10,28% lauril sulfato de sódio, 36% glicerol, 0,6M ditiotreitol, 0,012% azul de bromofenol) foram adicionados as pérolas, seguindo-se desnaturação a 70°C por 10 min. As proteínas foram corridas em gel SDS-PAGE 8% e as membranas submetidas a Western Blot com anticorpo primário anti-ARHGAP21.

## 5 Immunoblotting

### 5.1 Imunoprecipitação

1mg de extrato protéico foram incubadas com anticorpo primário anti-ARHGAP21 (1:100) a 4°C *overnight* sob agitação. 100µl de pérolas de proteína A Sepharose (Amersham) foram adicionados e incubados por mais 2 horas a 4°C sob agitação. Em seguida, centrifugaram-se as amostras a 12000Xg por 30 segundos sob refrigeração, lavando-as em seguida com tampão de solubilização (10mM EDTA, 100mM Tris-Cl pH 7,5, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100mM NaF, 10mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2mM PMSF, 0,1mg/mL de aprotinina, 1% Triton-X 100) por 3 vezes. As pérolas foram ressuspensas em 20µl de tampão de carregamento, desnaturadas a 70°C por 10 min, corridas em gel SDS-PAGE, seguindo-se análise por Western Blot.

## 5.2 Western Blot

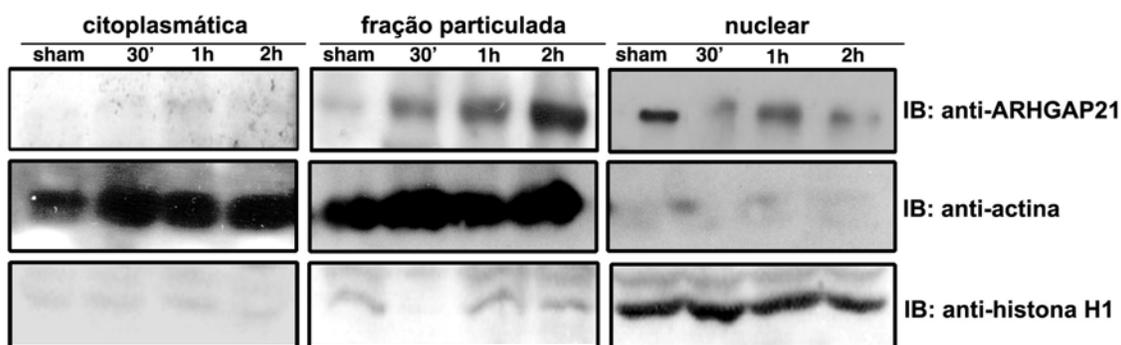
100µg de cada extrato protéico (ou conteúdo resultante de incubação com pérolas de sefarose) foram desnaturadas a 70°C por 10 min com tampão de carregamento e corridas em gel SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 8 ou 12%) em aparelho de eletroforese *Bio-Rad miniature lab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 min a 120 V (constante). O bloqueio de sítios de ligação não-específicos foi realizado incubando-se as membranas por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 50mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) a TA. A membrana foi então incubada com anticorpos primários específicos diluídos em tampão de incubação (3% leite em pó magro, 50mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 12h a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (50mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20). Seguiu-se incubação com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à HRP (*Horseradish peroxidase*; 1:4000). A membrana foi revelada por quimioluminescência, de acordo com as instruções do kit *ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System*, detectado por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY) e *Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL High performance chemiluminescence film* (Amersham).



# **RESULTADOS**

## 1 ARHGAP21 é modulada pela sobrecarga de pressão no miocárdio

Cardiomiócitos de VE de ratos adultos, submetidos ou não à sobrecarga de pressão, sofreram fracionamento subcelular para análise da expressão da proteína ARHGAP21 nos diferentes compartimentos durante processo de estresse agudo cardíaco. ARHGAP21 foi fracamente expressa na fração citoplasmática de ratos controle (sham) e ratos submetidos à coarctação da aorta (Figura 9). Também se observou que ARHGAP21 localiza-se predominantemente no núcleo de cardiomiócitos de animais controle. Em contrapartida, animais submetidos à coarctação da aorta tiveram significativa redução da expressão da ARHGAP21 na fração nuclear, e progressivo aumento na porção membranar, de acordo com o tempo de bandagem da aorta.



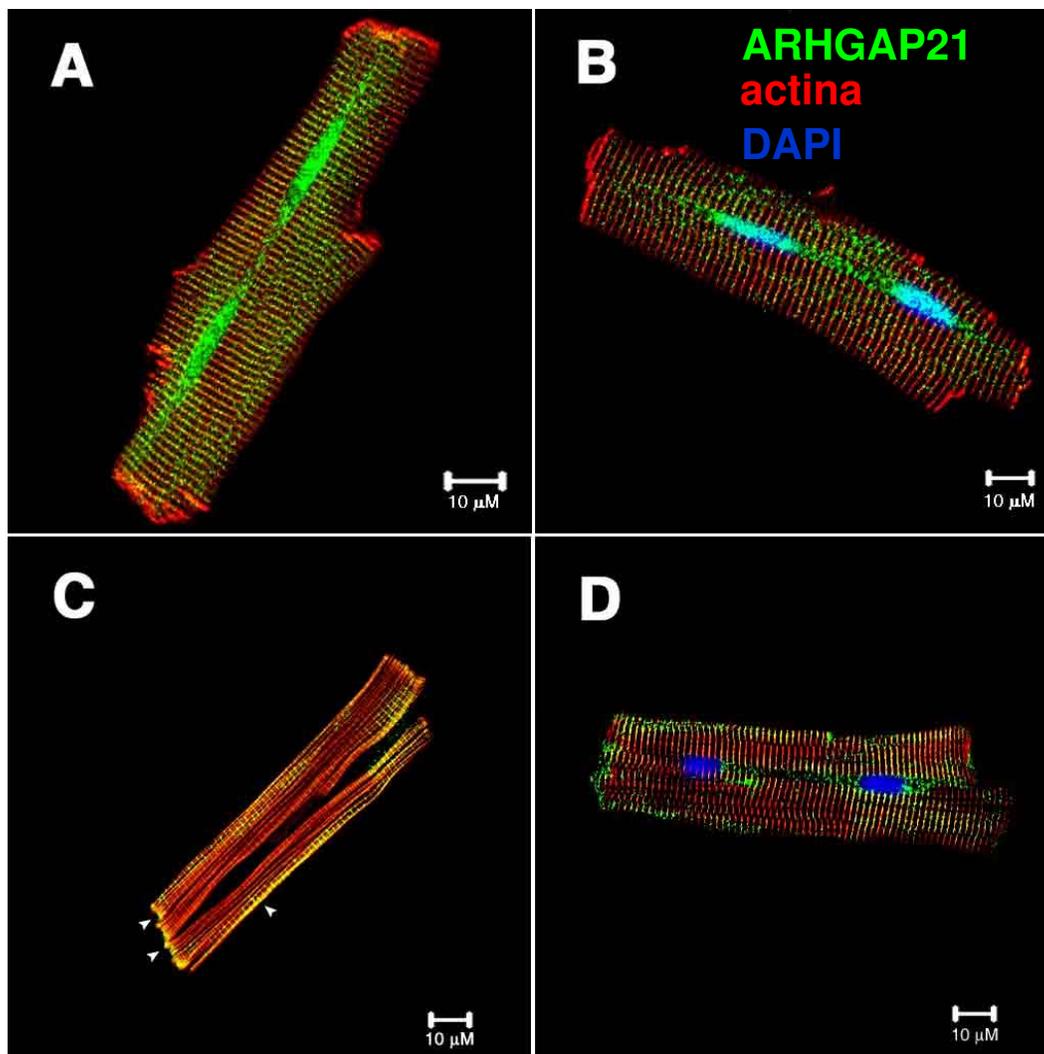
**Figura 9:** Distribuição da ARHGAP21 em frações subcelulares de cardiomiócitos de ratos adultos submetidos à coarctação da aorta em diferentes tempos de monitoração (sham, 30', 1h e 2h). Lisados protéicos de cardiomiócitos de VE de ratos adultos, submetidos à coarctação ou não, foram fracionados em porção citoplasmática, membranar e nuclear. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 8% e analisadas por *immunoblotting* com anticorpo anti-ARHGAP21 ( $M_r \geq 250\text{KDa}$ ). Nota-se que ARHGAP21 é fracamente expressa na porção citoplasmática. Observa-se também que ARHGAP21 localizou-se predominantemente na fração nuclear de cardiomiócitos de animal controle (sham), em contraste aos animais submetidos à coarctação, os quais demonstraram redução da expressão da ARHGAP21 nesta fração, de acordo com o tempo de bandagem da aorta. Em contrapartida, observou-se aumento da expressão da ARHGAP21 nas frações membranares dos animais submetidos à sobrecarga de pressão, quando comparado ao animal controle.

## **2 Relocalização da ARHGAP21 para discos intercalares e costâmeros de corações submetidos à sobrecarga de pressão**

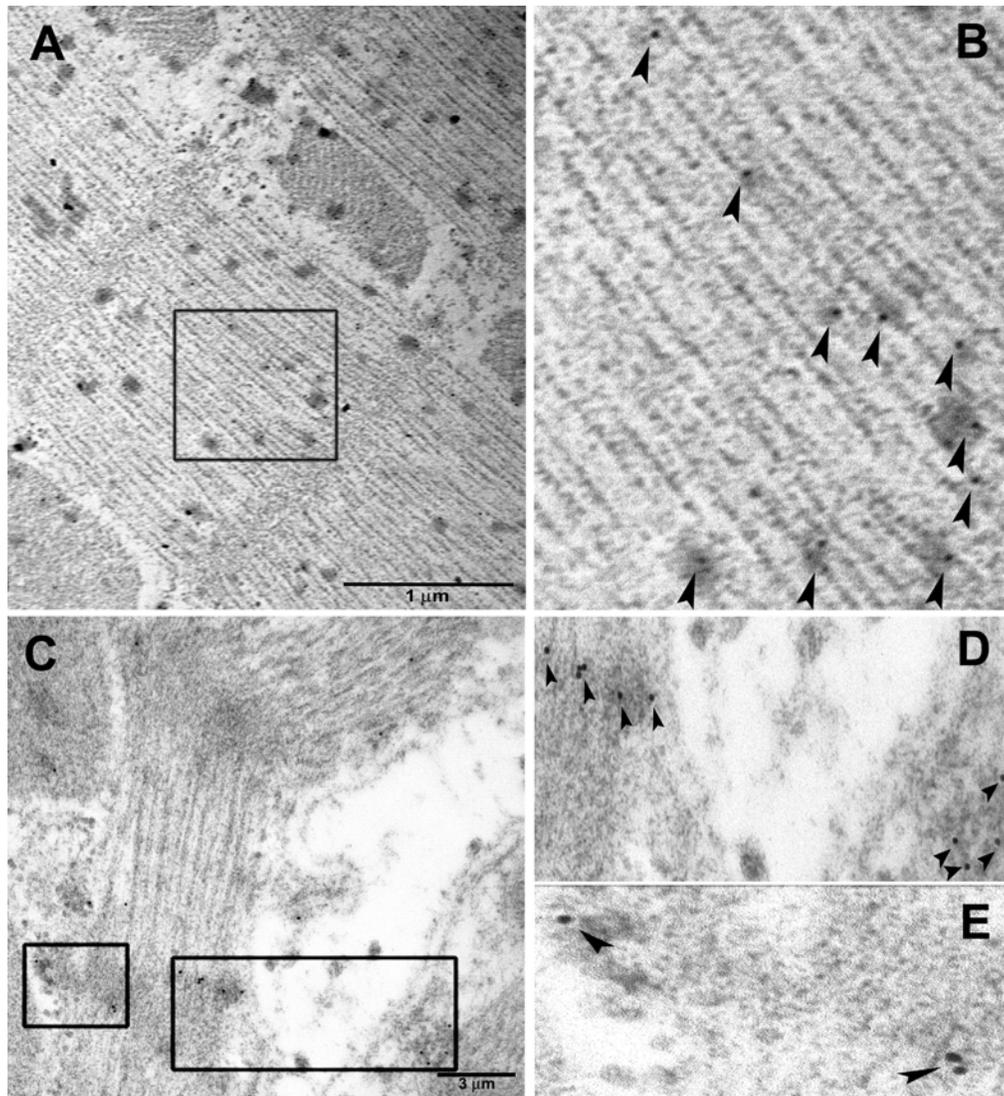
A localização subcelular da ARHGAP21 foi examinada por microscopia confocal de miócitos cardíacos isolados e submetidos à dupla marcação com faloidina-TRITC (*vermelho*), que reconhece miofilamentos de actina, e anti-ARHGAP21 (*verde*). Foi observada forte marcação para ARHGAP21 nos discos intercalares e contatos de adesão focal de cardiomiócitos de ratos submetidos à coarctação da aorta (Figura 10 C,D), padrão não observado em células cardíacas de animais controle (Figura 10 A,B). Imunomarcação da ARHGAP21 também demonstrou que núcleos de cardiomiócitos de ratos submetidos à bandagem da aorta apresentaram quase que nenhuma marcação para ARHGAP21 (Figura 10 C,D), enquanto que núcleos de cardiomiócitos de ratos controle foram completamente marcados (Figura 10 A,B). O mesmo padrão de imunomarcação para ARHGAP21 foi visualizado em cardiomiócitos de animais submetidos a 30 minutos e 1 hora de coarctação da aorta (dados não mostrados). Estes resultados confirmam a relocalização da ARHGAP21 após estresse cardíaco induzido por sobrecarga de pressão observada também pelo fracionamento subcelular, demonstrado anteriormente.

Com o objetivo de determinar a localização intracelular exata da ARHGAP21, foi utilizada imunomicroscopia eletrônica, a qual demonstrou que ARHGAP21 se localiza nos costâmeros e linhas Z de cardiomiócitos de ratos submetidos à sobrecarga de pressão (Figura 11 C-E). Entretanto, ARHGAP21 foi encontrada apenas por entre os miofilamentos de células cardíacas de animais controle (Figura 11 A,B).

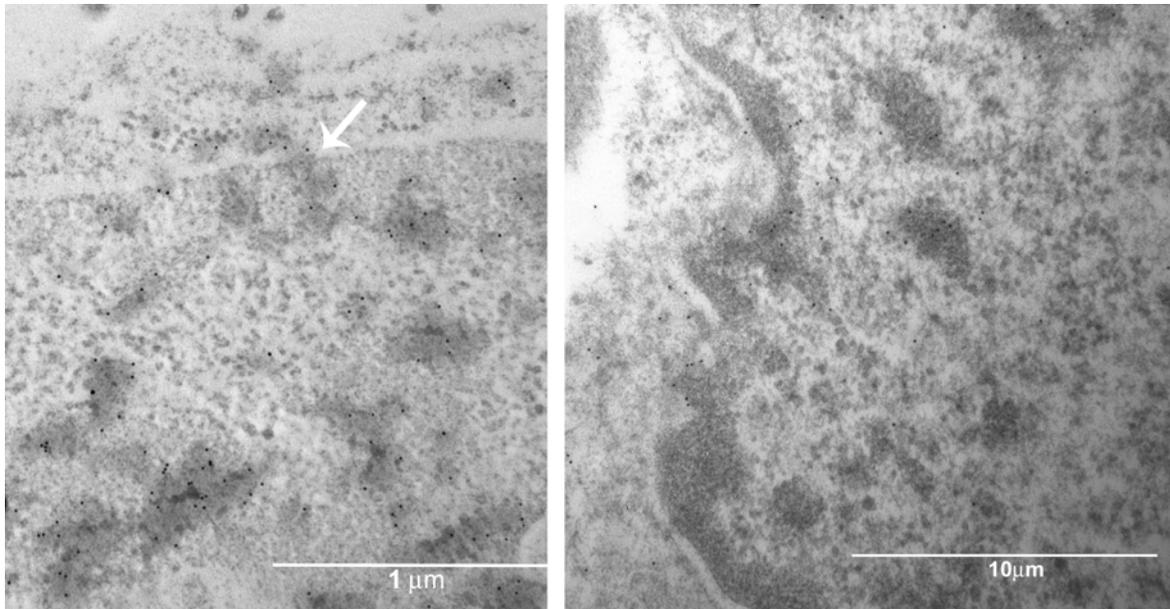
Além disso, imunomicroscopia eletrônica mostrou que ARHGAP21 está localizada em regiões de cromatina condensada de cardiomiócitos de ratos controle (Figura 12, Esquerda). Interessantemente, ARHGAP21 também foi encontrada em regiões próximas a poros do envoltório nuclear, sugerindo uma possível função de proteína carreadora (Figura 12, seta). No entanto, houve uma menor marcação de ARHGAP21 em regiões de cromatina condensada de miócitos cardíacos de animais submetidos à coarctação da aorta por 2 horas (Figura 12, Direita).



**Figura 10:** Distribuição da ARHGAP21 em cardiomiócitos de rato adulto controle (A e B) e coarctado por 2h (C e D). Células cardíacas de VE foram marcadas com faloidina-TRITC (*vermelho*) e anticorpo primário anti-ARHGAP21, reconhecido pelo anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (*verde*). B,D: Núcleos dos cardiomiócitos foram marcados com DAPI (*azul*). Observou-se que ARHGAP21 se localizou predominantemente no núcleo das células de animais controle, enquanto que em cardiomiócitos de rato coarctado, quase não houve marcação nuclear. Nota-se também que a ARHGAP21 foi encontrada preferencialmente nos discos intercalados e pontos de adesão focal, região de membrana celular (*cabeças de seta*, C), e linha Z (D) após estresse mecânico agudo induzido por sobrecarga de pressão no miocárdio (C: corte mais superficial; D: corte mais central). Figura representativa de 3 experimentos independentes.



**Figura 11:** Microscopia eletrônica de cardiomiócitos de ratos submetidos ou não à coarctação da aorta. **A:** marcação de cardiomiócitos de ratos controle com anticorpo primário anti-ARHGAP21, visualizada por imunopartículas de ouro; **B:** detalhe da figura, demonstrando que ARHGAP21 se localizou por entre os miofilamentos; **C:** imunomarcação da ARHGAP21 em cardiomiócitos de ratos submetidos à coarctação da aorta por 2h; **D** e **E:** detalhes da figura C, mostrando que ARHGAP21 se encontra localizada nos costâmeros (*D*) e linhas Z (*E*) após estresse mecânico em corações de ratos adultos.



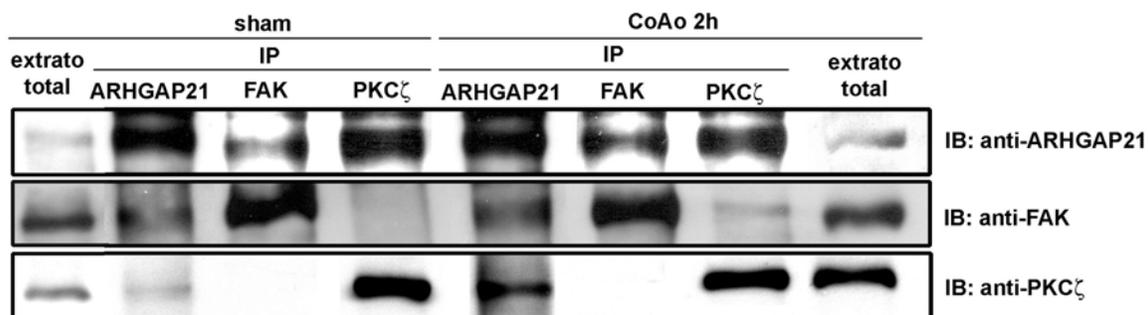
**Figura 12:** Microscopia eletrônica de núcleo de cardiomiócitos de ratos submetidos ou não à coarctação da aorta. **Esquerda:** núcleo de miócito de animal controle; ARHGAP21 foi encontrada principalmente nas regiões mais eletro-densas de cromatina condensada. Nota-se que ARHGAP21 foi localizada em regiões de poros do envoltório nuclear (*seta*), sugerindo que ARHGAP21 possa desempenhar papel de proteína carreadora. **Direita:** núcleo de célula cardíaca de rato submetido à bandagem da aorta por 2h, mostrando que regiões de cromatina condensada foram menos marcadas por anticorpo anti-ARHGAP21, quando comparada ao animal normal.

### 3 Interação da ARHGAP21 com FAK e PKC $\zeta$ em cardiomiócitos de rato adulto

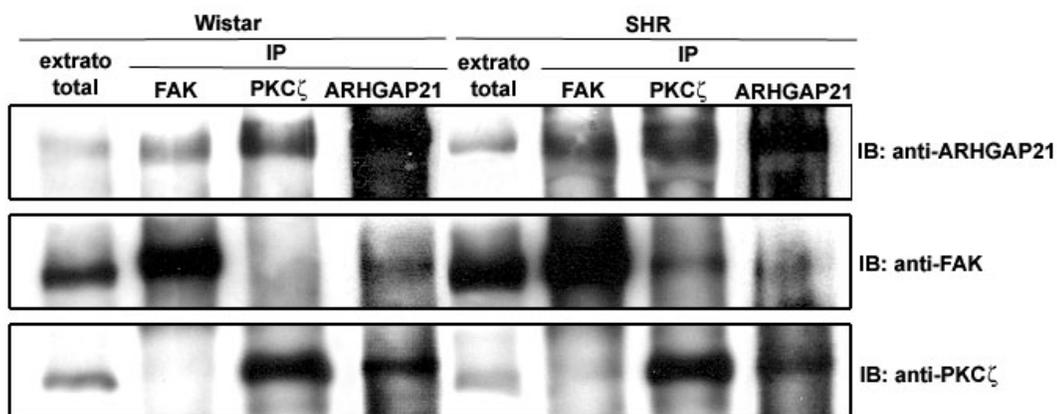
Extrato protéico de cardiomiócitos de VE de ratos adultos Wistar (NWR), espontaneamente hipertensos (SHR) e submetidos à coarctação da aorta por 2 horas foram obtidos e submetidos à co-immunoprecipitação com anticorpos primários anti-ARHGAP21, FAK e PKC $\zeta$ . Ratos SHR foram utilizados devido ao aumento de peso do VE observado nestes animais a partir do segundo mês de vida, processo este que os caracteriza como modelo de hipertrofia precoce (Boluyt e Bing, 2000).

Imunoprecipitação com anticorpo anti-ARHGAP21 revelou que ARHGAP21 se associa com FAK e PKC $\zeta$  (Figura 13 e Figura 14). Além disso, anticorpo primário anti-

FAK foi capaz de imunoprecipitar ARHGAP21, mas não PKC $\zeta$ . Além do mais, apenas ARHGAP21 foi precipitada com anticorpo contra PKC $\zeta$ . Todas as interações foram observadas tanto em ratos Wistar normais, quanto em animais submetidos à coarctação da aorta e SHR. ARHGAP21 e FAK foram mais expressas em ratos SHR que em NWR (Figura 14).

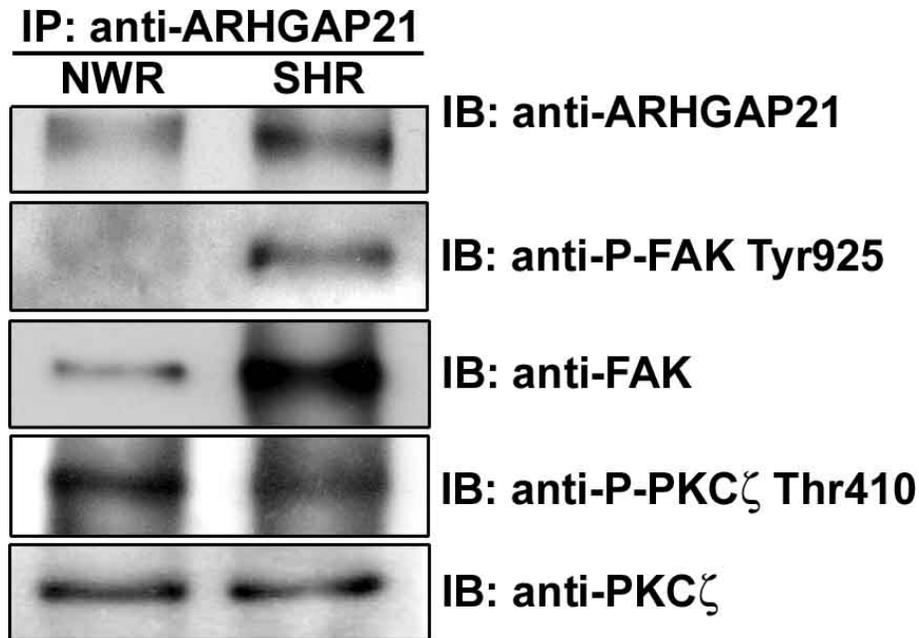


**Figura 13:** Western Blot de imunoprecipitados (IP) de extrato protéico de VE proveniente de dois animais controle (sham), e dois animais submetidos à sobrecarga de pressão por 2h. Foram utilizados anticorpos primários anti-ARHGAP21, anti-FAK e anti-PKC $\zeta$ . Nota-se que ARHGAP21 se associa a ambos, FAK e PKC $\zeta$ . Figura representativa de 3 experimentos independentes.



**Figura 14:** Western Blot representativo obtido de anticorpos anti-ARHGAP21, anti-FAK e anti-PKC $\zeta$  de imunoprecipitação com anti-ARHGAP21, anti-FAK e anti-PKC $\zeta$  de extratos de cardiomiócitos de VE de ratos adultos Wistar normais e espontaneamente hipertensos (SHR). Nota-se que expressão de ARHGAP21 e FAK é maior em SHR que em ratos normais. Percebe-se também que há interação entre ARHGAP21 e FAK e também entre ARHGAP21 e PKC $\zeta$ .

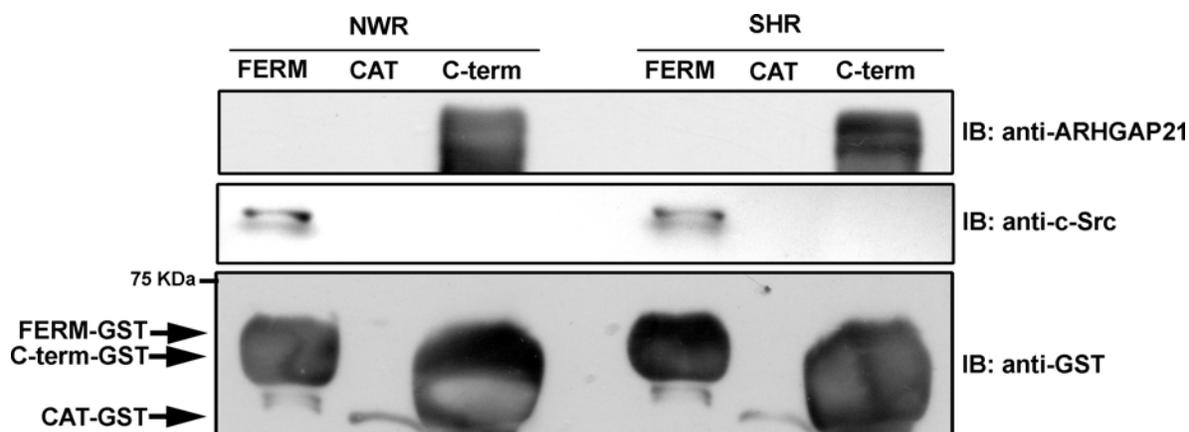
A capacidade da ARHGAP21 se associar às formas ativas de FAK e PKC $\zeta$  também foi averiguada (Figura 15). Para tanto, extrato protéico de cardiomiócitos de VE de ratos adultos Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR) foram obtidos e submetidos à co-imunoprecipitação com anticorpos primários anti-ARHGAP21, anti-fosfo FAK Tyr925 e anti-fosfo PKC $\zeta$  Thr410. Foi demonstrado que ARHGAP21 se associa à PKC $\zeta$  fosforilada em Thr410, importante resíduo fosforilado durante ativação de PKC $\zeta$ , em ambos NWR e SHR. Além disso, ensaio de co-imunoprecipitação revelou que ARHGAP21 se associa à FAK fosforilada em Tyr925 apenas em SHR. A fosforilação deste resíduo de FAK é essencial para ligação de Grb2 à FAK e, conseqüentemente ativação da sinalização de AKT.



**Figura 15:** Western blot de imunoprecipitados (IP) de extrato protéico de VE obtido de três ratos adultos Wistar normais (NWR), e três ratos espontaneamente hipertensos (SHR), utilizando-se anticorpos anti-ARHGAP21, anti-FAK, anti-fosfo FAK Tyr925, anti-PKC $\zeta$  e anti-fosfo PKC $\zeta$  Thr410. ARHGAP21 interage com PKC $\zeta$  fosforilada em Thr410 em ambos NWR e SHR, enquanto FAK fosforilada em Tyr925 se associa apenas com ARHGAP21 em cardiomiócitos de SHR. Figura representativa de três experimentos independentes.

#### **4 ARHGAP21 associa-se à porção C-terminal de FAK**

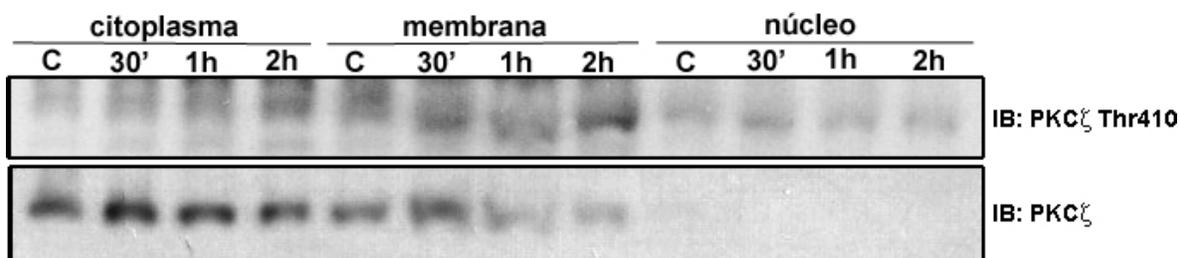
Extratos protéicos de cardiomiócitos de VE de ratos Wistar adultos e espontaneamente hipertensos foram coletados e submetidos a ensaio de interação *in vitro* (*Pulldown assay*). Observou-se que ARHGAP21 é capaz de interagir com a porção C-terminal de FAK em ambos, rato Wistar normal (NWR) e espontaneamente hipertenso (SHR), comprovando os achados dos ensaios de imunoprecipitação (Figura 16).



**Figura 16:** Ensaio de interação *in vitro* (*Pulldown assay*) usando três diferentes construções de FAK fusionadas ao GST: domínio FERM N-terminal (FERM-GST), domínio catalítico (CAT-GST) e região C-terminal (C-term). ARHGAP21 se liga a porção C-terminal de FAK. Anticorpos monoclonais anti-Src e anti-GST foram usados como controle experimental.

## 5 Expressão de PKC $\zeta$ fosforilada aumentada nos extratos fracionados de cardiomiócitos submetidos à sobrecarga de pressão

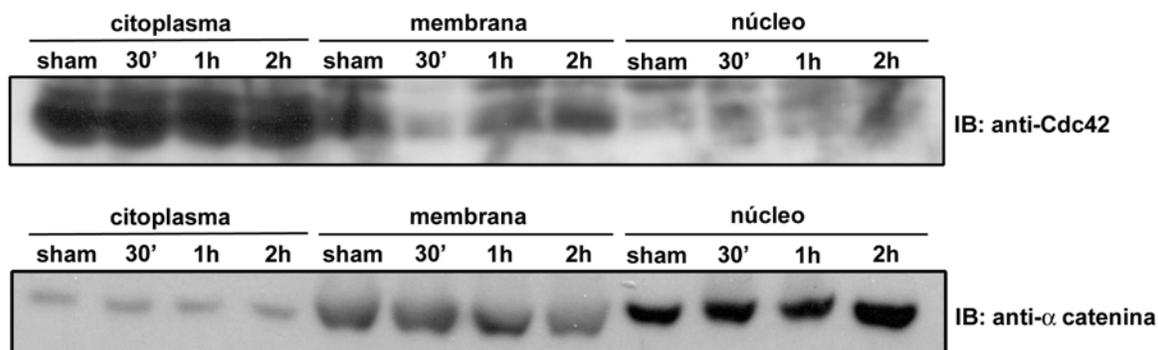
Extrato protéico de cardiomiócitos de VE de ratos adultos, submetidos ou não à coarctação da aorta, sofreram fracionamento subcelular para análise da expressão da proteína PKC $\zeta$  nos diferentes compartimentos durante o processo de estresse cardíaco agudo induzido por sobrecarga de pressão. Observou-se que ocorre um aumento gradativo da fosforilação do resíduo Thr410 de PKC $\zeta$  nas frações citoplasmáticas e membranares de ratos submetidos à sobrecarga de pressão, quando comparado com o conteúdo total de PKC $\zeta$  (Figura 17). O aumento da expressão de P-FAK Tyr925 também foi verificado (dado não mostrado), de acordo com estudo prévio (Fonseca et al., 2005).



**Figura 17:** Fosforilação de PKC $\zeta$  em fracionamento subcelular de VE de ratos adulto submetidos (30 min, 1 ou 2 horas) ou não à bandagem da aorta (sham). Fosforilação de PKC $\zeta$  em Thr410 foi aumentado nas frações membranas e citoplasmática de cardiomiócitos submetidos à sobrecarga de pressão.

## 6 Expressão de $\alpha$ -catenina, FAK e PKC $\zeta$ nos diferentes compartimentos subcelulares

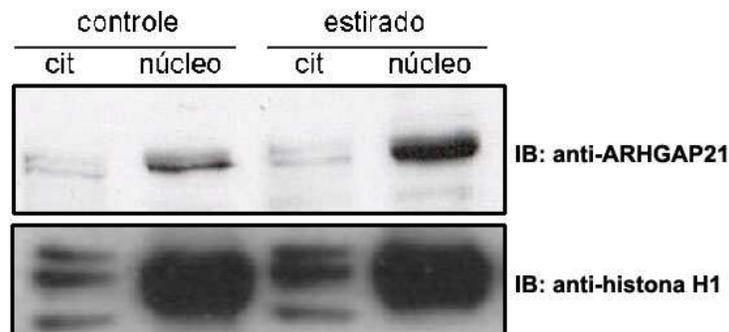
Avaliou-se a distribuição subcelular de duas proteínas, Cdc42 e  $\alpha$ -catenina, que foram descritas associarem-se à ARHGAP21, cujas funções estão relacionadas à regulação de vias de sinalização hipertrófica. Ensaio de Western Blot utilizando anticorpos contra  $\alpha$ -catenina e Cdc42 mostrou que a expressão de ambas proteínas não é modulada pela coarctação da aorta (Figura 18).



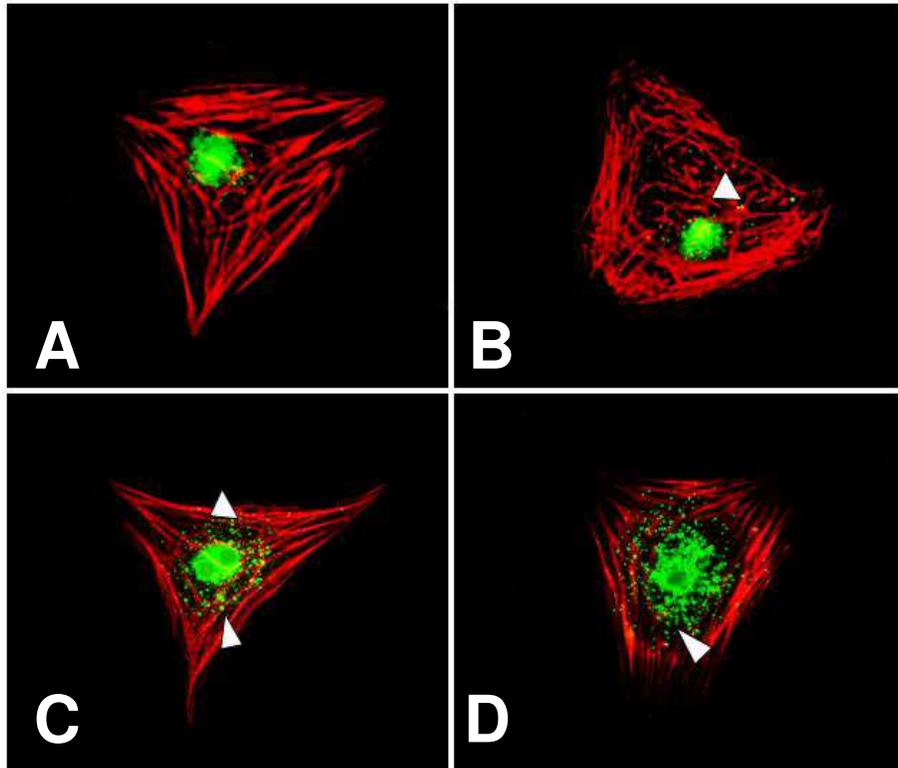
**Figura 18:** Fracionamento subcelular de extrato protéico de VE de ratos controle (sham) e ratos submetidos à coarctação da aorta (30', 1h e 2h). Cdc42 aparece expressa nas frações citoplasmáticas e membranares, enquanto  $\alpha$ -catenina foi mais expressa nas frações nucleares e membranares.

## 7 Cultura primária de miócitos cardíacos de rato neonatal

Foi observado que ARHGAP21 não sofre alteração de sua localização após 2 horas de estiramento, encontrando-se tanto no citoplasma quanto no núcleo dos cardiomiócitos (Figura 20 e Figura 19). Também se verifica maior concentração da proteína em regiões específicas do núcleo, possivelmente nos nucléolos, o que pode indicar possível papel da ARHGAP21 na síntese protéica hipertrófica. Entretanto, observa-se que há maior quantidade de ARHGAP21 perinuclear em células submetidas a estiramento, possivelmente em regiões do complexo de Golgi (cabeça de seta, Figura 20).



**Figura 19:** *Western Blot* de extrato protéico fracionado (citoplasmático e nuclear) de cardiomiócito de ratos neonatos controle (sem estiramento) e estirados por 2h. A expressão da ARHGAP21 aumenta no núcleo de células submetidas ao estiramento. Como controle, a membrana foi submetida à *Western Blot* utilizando anticorpo primário anti-histona H1, confirmando a pureza do fracionamento. **Cit:** fração citosólica, **Núcleo:** fração nuclear.



**Figura 20:** Localização por imunofluorescência da ARHGAP21 endógena em cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos. ARHGAP21 localizou-se no núcleo e citoplasma das células controle (*A* e *B*) e estiradas (*C* e *D*), sendo que nestas há maior quantidade da proteína na região perinuclear (*cabeça de seta*). **A,B:** cardiomiócitos controle, não submetidas a estiramento; **C,D:** cardiomiócitos submetidos a estiramento por 2 horas. Utilizou-se faloidina para marcação dos filamentos de actina (*vermelho*) e anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor 488 para marcação da ARHGAP21 (*verde*).



# DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que ARHGAP21 é recrutada do núcleo e miofilamentos para costâmeros, linhas Z e discos intercalados de cardiomiócitos após sobrecarga de pressão ventricular. Estes dados sugerem que ARHGAP21 é modulada por estímulo mecânico e pode desempenhar importante função durante estresse cardíaco e processo hipertrófico inicial.

Além do mais, foi verificada a associação de ARHGAP21 com PKC $\zeta$  em células cardíacas de ratos normais e espontaneamente hipertensos (SHR), além de ratos submetidos à sobrecarga de pressão no miocárdio. Também foi demonstrado que ARHGAP21 é capaz de interagir com PKC $\zeta$  fosforilada em Thr410, um resíduo chave para a ativação de PKC $\zeta$  (Chou et al., 1998). O aumento do nível de fosforilação foi observado tanto em frações citoplasmáticas quanto em membranas de células cardíacas durante processo de estresse cardíaco. Há controvérsias quanto à função de PKC $\zeta$  durante processo hipertrófico cardíaco. Estudos prévios demonstraram que não há mudanças significativas na expressão de PKC $\zeta$  total em ventrículo esquerdo de ratos submetidos à bandagem da aorta, sugerindo que a expressão de PKC $\zeta$  não é modulada pela sobrecarga de pressão (Braun et al., 2002; Gu e Bishop, 1994). Por outro lado, estudo recente demonstrou que o conteúdo total de PKC $\zeta$  aumenta em cardiomiócitos submetidos à hipertrofia induzida por sobrecarga de volume, sugerindo que a modulação de PKC $\zeta$  desempenha importante papel durante processos hipertróficos iniciais (Sentex et al., 2006).

Como demonstrado neste trabalho, PKC $\zeta$  foi fosforilada em Thr410 em frações citoplasmáticas e membranares pela coarctação da aorta. Sobrecarga de pressão resulta em aumento da espessura das paredes ventriculares e adição paralela de sarcômeros, enquanto que a sobrecarga de volume é caracterizada por um modesto aumento da espessura ventricular e adição seriada de sarcômeros, e estes dois tipos de estímulos hemodinâmicos provocam a ativação de vias distintas de transdução de sinais (Brancaccio et al., 2006). Esses fatos poderiam explicar a discrepância encontrada na expressão de PKC $\zeta$  nos dois modelos de hipertrofia cardíaca previamente estudados (Brancaccio et al., 2006; Braun et al., 2002; Gu e Bishop, 1994). No entanto, nenhum desses estudos demonstrou o estado de fosforilação de PKC $\zeta$ , e este é o primeiro estudo a verificar a ativação de PKC $\zeta$  durante estresse cardíaco induzido por sobrecarga de pressão.

PKC $\zeta$  é ativada por PI-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) ou ligantes extracelulares, por exemplo, TNF $\alpha$ , interleucina-1 (IL-1) ou fator de crescimento do nervo (NGF) (Hirai e Chida, 2003). Muitos estudos demonstraram o envolvimento da forma ativa de PKC $\zeta$  na fosforilação da proteína quinase S6 ribossomal e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), além da sua participação na ativação do fator transcricional NF $\kappa$ B, que são proteínas importantes em vias de proliferação e sobrevivência, e na expressão gênica de processos hipertróficos cardíacos (Ha et al., 2005; Sopontammarak et al., 2005). Nossos resultados sugerem que PKC $\zeta$  é fosforilada por estímulo mecânico, e possivelmente pode executar sua função acima das vias de sinalização de MAPK e NF $\kappa$ B. Dessa maneira, a função de ARHGAP21 poderia estar relacionada ao controle da sobrevivência e expressão gênica de cardiomiócitos, uma vez que ARHGAP21 se associa com PKC $\zeta$ , provavelmente regulando a atividade desta proteína. Além do mais, a presença da ARHGAP21 no núcleo de cardiomiócitos normais sugere que esta proteína poderia estar envolvida na regulação da expressão gênica destas células, possivelmente executando uma função inibitória sob condições normais. Esta hipótese é baseada no fato de ARHGAP21 ser muito pouco encontrada no núcleo de cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico agudo, células estas que iniciam a expressão de muitos genes relacionados à hipertrofia cardíaca em resposta à sobrecarga de pressão. Dessa maneira, ARHGAP21 poderia possuir a função de repressão da expressão de determinados genes sob condições normais.

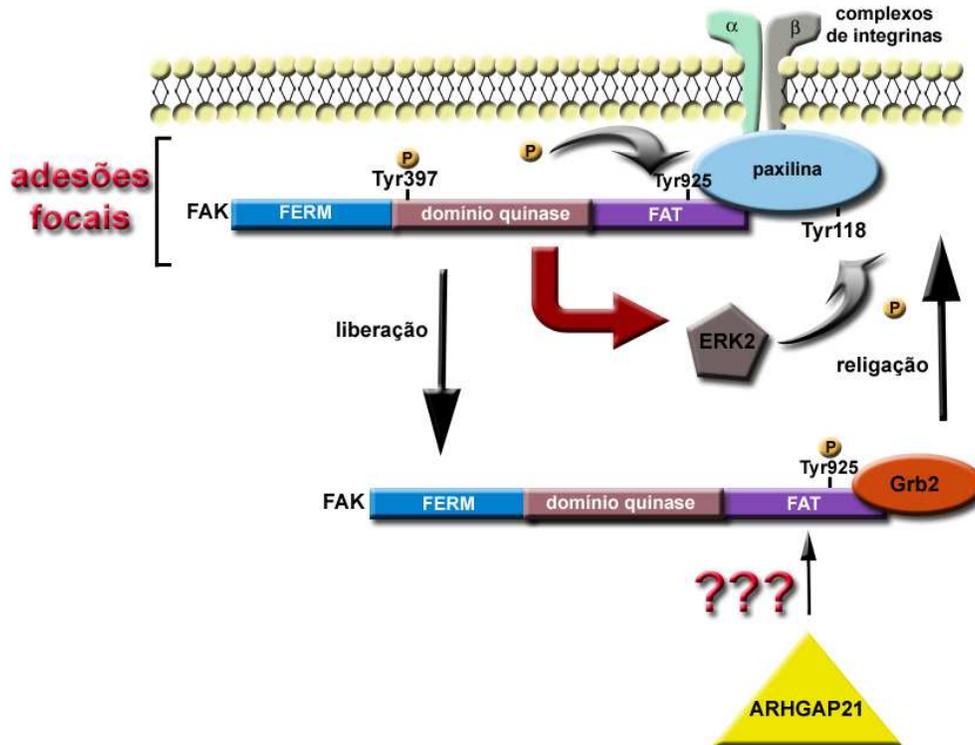
Também foi demonstrado que ARHGAP21 se associa com a porção C-terminal de FAK em células cardíacas de ratos normais e espontaneamente hipertensos. A função fundamental de FAK durante estresse mecânico cardíaco induzido por sobrecarga de pressão já está bem estabelecida na literatura (Fonseca et al., 2005; Franchini et al., 2000; Yi et al., 2003). FAK é descrita como uma importante proteína presente principalmente nas adesões focais e costâmeros de miócitos cardíacos, sendo responsável pela transmissão de sinais entre a matriz extra-celular e meio intracelular (Schlaepfer et al., 2004). FAK é uma proteína tirosina quinase citoplasmática que desempenha função crucial em uma variedade de sinalizações intracelulares, tais como migração, proliferação, diferenciação e adesão (Cox et al., 2006). É composta por um domínio FERM N-terminal, um domínio quinase central, três regiões ricas em prolina (PR), e um domínio alvo de adesão focal (FAT) C-terminal. O domínio FAT carboxi-terminal contém sítios de ligação para paxilina e talina,

que auxiliam no recrutamento de FAK para os complexos de adesão focal. Um dos mecanismos de ativação de FAK é a ligação das integrinas, presentes nas adesões focais, a componentes da matriz extra-celular, processo este que promove a autofosforilação de FAK em Tyr397, criando um sítio para quinases da família Src e outras proteínas (Schlaepfer et al., 2004). Src fosforila FAK em vários sítios de tirosina, aumentando a atividade catalítica de FAK (Calalb et al., 1995), que então inicia a ativação de cascatas de sinalização intracelular, como MAPK, e participa do remodelamento do citoesqueleto (Mitra et al., 2005).

Estudo recente demonstrou que FAK é essencial na miofibrilogênese e costamerogênese de músculo esquelético *in vitro*, e que a expressão do domínio FAT é capaz de deslocar FAK endógena das adesões focais, as quais servem como sítio de nucleação para organização dos sarcômeros e sua alongação (Quach e Rando, 2006). Como FAK recruta outras moléculas sinalizadoras para região sub-membranar da célula, e como ambas proteínas, FAK (Fonseca et al., 2005) e ARHGAP21, estão localizadas nos costâmeros e linhas Z após sobrecarga de pressão, é possível que esta realocação de ARHGAP21 do núcleo e miofilamentos para essas regiões seja mediada pela sua interação com a região C-terminal de FAK contendo o domínio FAT. Além do mais, ARHGAP21 pode participar do processo de renovação das adesões focais e organização do citoesqueleto, regulando a atividade de FAK e sua cascata de sinalização (Figura 21). Esta evidência é reforçada pela associação entre ARHGAP21 e FAK fosforilada em Tyr925 encontrada em animais SHR.

Acredita-se que a fosforilação de FAK em Tyr925 mediada por Src, e sua ligação subsequente a Grb2, pode deslocar paxilina, promovendo dissociação de FAK das adesões focais (Mitra et al., 2005). Este evento é essencial para a renovação das adesões focais, processo este intensificado por estímulos mecânicos (Hsia et al., 2003; Moissoglu e Gelman, 2003). Estudos recentes vêm demonstrando que a fosforilação dos diferentes resíduos de FAK implica na compartimentalização distinta desta proteína (Yi et al., 2006). FAK fosforilada em Tyr397 encontrou-se acumulada na membrana plasmática e discos intercalados de cardiomiócitos, enquanto que FAK fosforilada em Ser722 foi encontrada no núcleo interagindo com Sam68 nos corpos nucleares, provavelmente formando complexos com RNA e outras proteínas e atuando na sinalização nuclear. Além do mais, FAK

fosforilada em Tyr397, altamente expressa na membrana, pode ativar PI3K (Xia et al., 2004), promovendo recrutamento local de PIP<sub>3</sub>, proteína que atua acima da cascata de sinalização de PKC $\zeta$ , responsável por sua ativação direta e indireta.



**Figura 21:** Esquema resumido do processo de renovação das adesões focais, envolvendo a participação de FAK. ARHGAP21 pode exercer uma importante função na regulação deste processo, uma vez que ARHGAP21 encontra-se localizada nos discos intercalares e costâmeros de cardiomiócitos de animais submetidos à sobrecarga de pressão. Além disso, ARHGAP21 se associa à porção C-terminal de FAK, que constitui a região responsável pela localização de FAK nos sítios de adesão focal.

Dessa maneira, ARHGAP21 pode regular a atividade de FAK durante estresse cardíaco agudo nos discos intercalados e costâmeros de cardiomiócitos, que são regiões ricas em junções comunicantes e aderentes. Estas regiões são compostas por proteínas transmembranas, integrinas e caderinas, e também por proteínas a elas associadas, tais como  $\beta$ -catenina, placoglobina ( $\gamma$ -catenina) e  $\alpha$ -catenina, que desenvolvem função regulatória na comunicação entre células vizinhas (Wu et al., 2003). De fato, um estudo

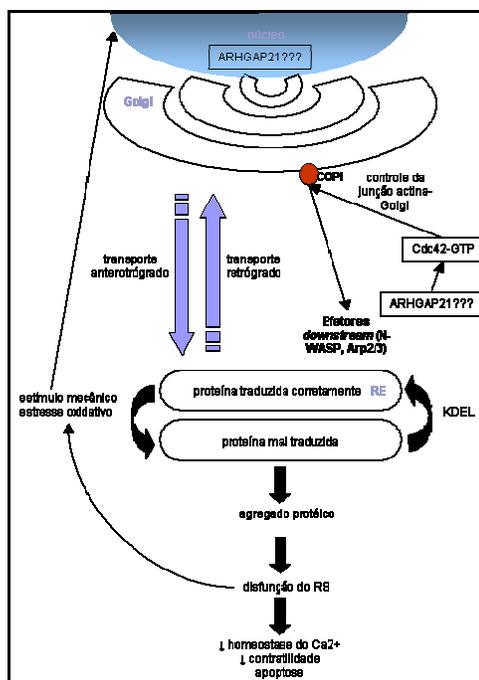
demonstrou que a presença de  $\alpha$ -catenina é essencial para formação de discos intercalados e recrutamento de vinculina, indicando que o complexo caderina/catenina/vinculina desempenha papel crítico na estrutura e integridade dos discos intercalados após estresse cardíaco *in vivo* (Sheikh et al., 2006). Tendo em vista que ARHGAP21 associa-se a  $\alpha$ -catenina, é possível que ARHGAP21 atue como uma molécula sinalizadora ou proteína adaptadora, orquestrando a via de sinalização composta por catenina/FAK/PKC $\zeta$ .

Ao contrário dos achados observados em cardiomiócitos de ratos adultos, análise da expressão da ARHGAP21 em cardiomiócitos de ratos neonatos demonstrou que ARHGAP21 localiza-se em regiões perinucleares e nucleares destas células, e que sua localização não é alterada pelo estresse mecânico *in vitro*. Diversos estudos já demonstraram que a expressão de várias proteínas em cardiomiócitos neonatos é diferente do padrão de expressão protéica encontrada em miócitos cardíacos adultos. Isso porque os discos intercalados e sarcômeros ainda se encontram desorganizados, não havendo total diferenciação nos cardiomiócitos neonatos. Além do mais, o modelo animal de coarctação da aorta conta ainda com fatores humorais além da sobrecarga mecânica. Sendo assim, os dois modelos animais aqui adotados são complementares e não comparáveis. Apesar da ARHGAP21 permanecer inalterada com o estímulo *in vitro*, observou-se pequeno aumento da expressão de ARHGAP21 em regiões perinucleares de cardiomiócitos neonatos submetidos a estiramento mecânico.

Em estudo realizado por LUNA e colaboradores, Cdc42 também se localizou no complexo de Golgi, possivelmente devido a sua associação com membranas do Golgi de maneira dependente de ARF1 (Luna et al., 2002). O mecanismo de ligação de Cdc42 às membranas recobertas por COPI pode controlar a junção de actina local com o Golgi através de mecanismo envolvendo efetor N-WASP e o complexo Arp2/3, estando envolvido no transporte retrógrado (Golgi para retículo endoplasmático) do receptor KDEL. Como ARHGAP21 está abaixo da cascata de sinalização de ARF1 e exerce atividade catalítica sobre Cdc42, este pode ser um novo mecanismo de controle do dinamismo do citoesqueleto de actina com o complexo de Golgi (Dubois et al., 2005).

O transporte de moléculas existente entre o retículo endoplasmático (RE) e o Golgi parece desempenhar uma função crítica durante o processo hipertrófico, pois proteínas mal traduzidas durante o processo de hipertrofia induzida por estresse oxidativo ou estiramento

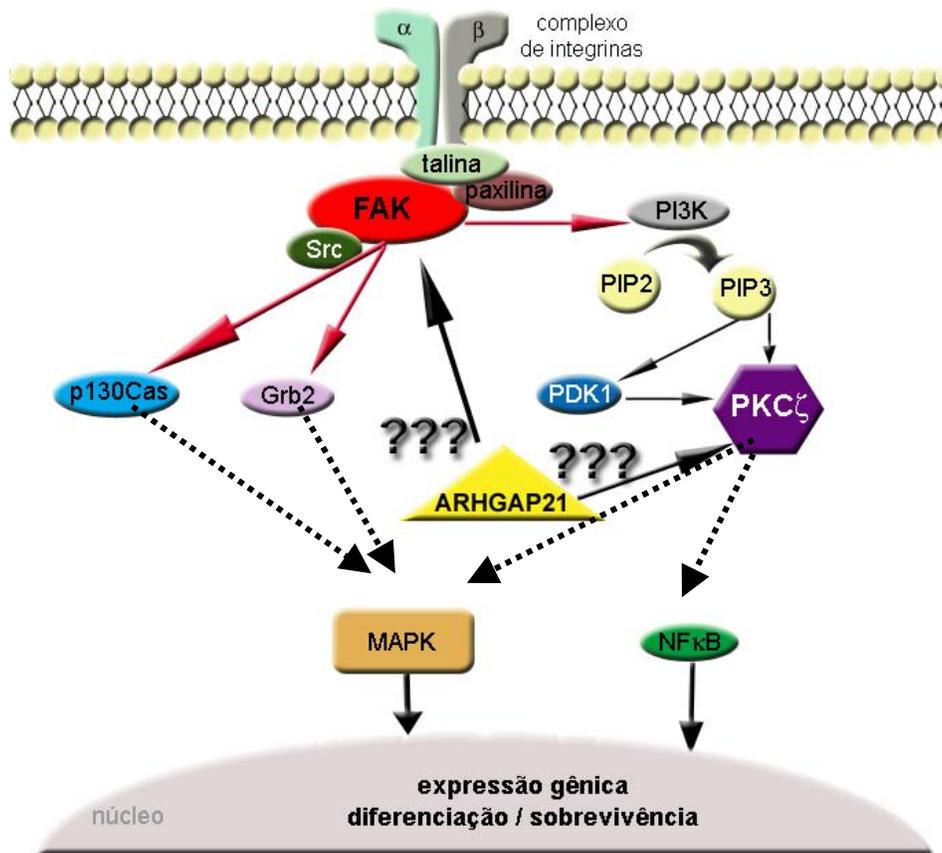
mecânico migram para estes compartimentos para serem degradadas ou recicladas (Hamada et al., 2004). Uma vez que ocorra alguma disfunção neste transporte, proteínas mal traduzidas podem se acumular no retículo sarcoplasmático, causando extensão e obstrução dos túbulos transversos. A homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  pode sofrer alteração, levando a uma contratilidade cardíaca deficiente. Portanto, mecanismos que controlem o transporte entre ER e Golgi são de vital importância para a manutenção do funcionamento adequado do cardiomiócito (Figura 22).



**Figura 22:** Adaptado de HAMADA e colaboradores (Hamada et al., 2004). Estímulos mecânicos e de estresse oxidativo (ex: estiramento mecânico) provoca aumento da expressão gênica celular, o que aumenta a quantidade de proteínas mal traduzidas no citoplasma. Estas proteínas, por sua vez, são reconhecidas pelo receptor KDEL e são recicladas ou degradadas por meio de transportes entre os sistemas retículo endoplasmático (RE)-Golgi. O acúmulo destas proteínas pode formar agregados protéicos no interior do RE, levando a uma obstrução dos túbulos transversos e conseqüentemente, a uma alteração da homeostasia de Ca<sup>2+</sup>. Este excesso de Ca<sup>2+</sup> pode acarretar numa contratibilidade cardíaca deficiente e, por conseguinte a uma sobrecarga de pressão, constituindo um ciclo vicioso. Quando há grande acúmulo de proteínas mal traduzidas no RE, pode ocorrer apoptose da célula. Portanto, vias de sinalização capazes de controlar este transporte são de grande importância para a fisiologia celular do cardiomiócito. Cdc42 ativa (ligada a GTP) se liga à membrana coberta por COPI, controlando a junção da actina ao Golgi através de vias envolvendo efetores abaixo da via de sinalização (N-WASP e complexo Arp2/3), e participando do transporte retrógrado (Golgi para RE). ARHGAP21, por ser uma Rho GAP para Cdc42 e por estar localizada na região perinuclear, pode estar envolvida nesta importante via de regulação hipertrófica.

Sendo assim, a ARHGAP21 pode atuar nesta importante via de controle do dinamismo entre actina e complexo de Golgi. A ativação de Cdc42 ocorre rapidamente (cerca de 1 minuto após o estímulo), decaindo para um nível basal após 30 minutos do estímulo inicial. Acredita-se que a ativação de Cdc42 é rápida e localmente produzida, sendo imediatamente depois inativada por Rho GAPs (Luna et al., 2002). Tendo em vista que a ARHGAP21 é uma Rho GAP para Cdc42 e que se localiza em regiões perinucleares, essa proteína pode desempenhar uma função importante no remodelamento cardíaco de cardiomiócitos neonatos.

Dessa maneira, os resultados encontrados sugerem que ARHGAP21 pode possivelmente participar da organização do citoesqueleto na membrana plasmática e controlar as atividades de FAK e PKC $\zeta$ , orquestrando estas duas importantes vias de sinalização, além de provavelmente desempenhar função crucial durante estresse mecânico agudo em corações de ratos adultos (Figura 23). Além disso, ARHGAP21 também pode possuir função na regulação da expressão gênica hipertrófica precoce. No entanto, outros estudos serão necessários para esclarecer o significado funcional e molecular da realocização da ARHGAP21 após estresse mecânico agudo do miocárdio de ratos adultos.



**Figura 23:** Esquema representativo da possível atuação de ARHGAP21 sobre as proteínas FAK e PKC $\zeta$ , regulando, dessa maneira, as vias de sinalização de MAPK e NF $\kappa$ B e, conseqüentemente a expressão gênica hipertrófica e sobrevivência de cardiomiócitos.



## **CONCLUSÕES**

1. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e por entre os miofilamentos de cardiomiócitos de ratos adultos normais.
2. ARHGAP21 localiza-se nos costâmeros, linha Z e discos intercalares de cardiomiócitos de ratos adultos submetidos à sobrecarga aguda de pressão.
3. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e regiões perinucleares de cardiomiócitos de ratos neonatos.
4. O estiramento mecânico de cardiomiócitos de ratos neonatos não altera a localização de ARHGAP21.
5. ARHGAP21 interage com PKC $\zeta$  e FAK em ratos adultos controle, submetidos à coarctação da aorta, e espontaneamente hipertensos.
6. ARHGAP21 associa-se com PKC $\zeta$  fosforilada em Thr410 tanto em ratos adultos controle quanto em SHR.
7. ARHGAP21 associa-se com FAK fosforilada em Tyr925 apenas em animais espontaneamente hipertensos.
8. ARHGAP21 associa-se à região C-terminal de FAK.
9. Há aumento da fosforilação de FAK Tyr925 e PKC $\zeta$  Thr410 em animais submetidos à coarctação da aorta.
10. ARHGAP21 pode desempenhar importante papel durante processos de remodelamento cardíaco induzido por sobrecarga de pressão sanguínea.



**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

- Aznar S, Lacal JC. Rho signals to cell growth and apoptosis. **Cancer Lett** 165(1): 1-10, 2001.
- Basseres DS, Tizzei EV, Duarte AA, Costa FF, Saad ST. ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein. **Biochem Biophys Res Commun** 294(3): 579-85, 2002.
- Bell D, Kelso EJ, Argent CC, Lee GR, Allen AR, McDermott BJ. Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. **Cardiovasc Pathol** 13(2): 71-8, 2004.
- Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, et al. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. **Embo J** 14(24): 6157-63, 1995.
- Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochem J** 348 Pt 2(241-55, 2000.
- Boluyt MO, Bing OH. Matrix gene expression and decompensated heart failure: the aged SHR model. **Cardiovasc Res** 46(2): 239-49, 2000.
- Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. **Cardiovasc Res** 70(3): 422-33, 2006.
- Braun MU, LaRosee P, Schon S, Borst MM, Strasser RH. Differential regulation of cardiac protein kinase C isozyme expression after aortic banding in rat. **Cardiovasc Res** 56(1): 52-63, 2002.
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. **Mol Cell Biol** 15(2): 954-63, 1995.
- Chen R, Kim O, Li M, Xiong X, Guan JL, Kung HJ, et al. Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain. **Nat Cell Biol** 3(5): 439-44, 2001.
- Chikumi H, Fukuhara S, Gutkind JS. Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. **J Biol Chem** 277(14): 12463-73, 2002.
- Chodniewicz D, Klemke RL. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. **Biochim Biophys Acta** 1692(2-3): 63-76, 2004.

- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, et al. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. **Curr Biol** 8(19): 1069-77, 1998.
- Cooper LA, Shen TL, Guan JL. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. **Mol Cell Biol** 23(22): 8030-41, 2003.
- Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. **J Cell Biochem** 99(1): 35-52, 2006.
- DiMichele LA, Doherty JT, Rojas M, Beggs HE, Reichardt LF, Mack CP, et al. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. **Circ Res** 99(6): 636-45, 2006.
- Dorn GW, 2nd, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. **J Clin Invest** 115(3): 527-37, 2005.
- Dubois T, Paleotti O, Mironov AA, Fraissier V, Stradal TE, De Matteis MA, et al. Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. **Nat Cell Biol** 7(4): 353-64, 2005.
- Dunty JM, Gabarra-Niecko V, King ML, Ceccarelli DF, Eck MJ, Schaller MD. FERM domain interaction promotes FAK signaling. **Mol Cell Biol** 24(12): 5353-68, 2004.
- Fanning AS, Anderson JM. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. **J Clin Invest** 103(6): 767-72, 1999.
- Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J, Franchini KG. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. **Circ Res** 96(1): 73-81, 2005.
- Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, Saad MJ. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ Res** 87(7): 558-65, 2000.
- Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science** 279(5350): 514-9, 1998.
- Furukawa Y, Kawasoe T, Daigo Y, Nishiwaki T, Ishiguro H, Takahashi M, et al. Isolation of a novel human gene, ARHGAP9, encoding a rho-GTPase activating protein. **Biochem Biophys Res Commun** 284(3): 643-9, 2001.

- Gu X, Bishop SP. Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. **Circ Res** 75(5): 926-31, 1994.
- Ha T, Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. **Free Radic Biol Med** 39(12): 1570-80, 2005.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science** 279(5350): 509-14, 1998.
- Hamada H, Suzuki M, Yuasa S, Mimura N, Shinozuka N, Takada Y, et al. Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. **Mol Cell Biol** 24(18): 8007-17, 2004.
- Heidkamp MC, Bayer AL, Kalina JA, Eble DM, Samarel AM. GFP-FRNK disrupts focal adhesions and induces anoikis in neonatal rat ventricular myocytes. **Circ Res** 90(12): 1282-9, 2002.
- Hirai T, Chida K. Protein kinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ): activation mechanisms and cellular functions. **J Biochem (Tokyo)** 133(1): 1-7, 2003.
- Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblov DN, Nelson JA, Ilic D, et al. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. **J Cell Biol** 160(5): 753-67, 2003.
- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. **Nat Cell Biol** 2(8): 531-9, 2000.
- Katz BZ, Romer L, Miyamoto S, Volberg T, Matsumoto K, Cukierman E, et al. Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. **J Biol Chem** 278(31): 29115-20, 2003.
- Kobayashi N, Horinaka S, Mita S, Nakano S, Honda T, Yoshida K, et al. Critical role of Rho-kinase pathway for cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. **Cardiovasc Res** 55(4): 757-67, 2002.
- Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper Gt, Menick DR, Zile MR, et al. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. **J Biol Chem** 275(45): 35624-30, 2000.
- Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, et al. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. **Mol Cell** 8(4): 771-80, 2001.

- Limatola C, Schaap D, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. **Biochem J** 304 ( Pt 3)(1001-8, 1994.
- Liu G, Guibao CD, Zheng J. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. **Mol Cell Biol** 22(8): 2751-60, 2002.
- Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. **J Biol Chem** 277(12): 10452-8, 2002.
- Luna A, Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Mato E, Duran JM, Ballesta J, et al. Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. **Mol Biol Cell** 13(3): 866-79, 2002.
- Melendez J, Welch S, Schaefer E, Moravec CS, Avraham S, Avraham H, et al. Activation of pyk2/related focal adhesion tyrosine kinase and focal adhesion kinase in cardiac remodeling. **J Biol Chem** 277(47): 45203-10, 2002.
- Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. **Biochem J** 332 ( Pt 2)(281-92, 1998.
- Meriane M, Charrasse S, Comunale F, Mery A, Fort P, Roux P, et al. Participation of small GTPases Rac1 and Cdc42Hs in myoblast transformation. **Oncogene** 21(18): 2901-7, 2002.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6(1): 56-68, 2005.
- Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. **J Biol Chem** 272(26): 16657-62, 1997.
- Moissoglu K, Gelman IH. v-Src rescues actin-based cytoskeletal architecture and cell motility and induces enhanced anchorage independence during oncogenic transformation of focal adhesion kinase-null fibroblasts. **J Biol Chem** 278(48): 47946-59, 2003.
- Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. **Trends Cell Biol** 13(1): 13-22, 2003.

- Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. **Embo J** 14(9): 1961-9, 1995.
- Murthy A, Gonzalez-Agosti C, Cordero E, Pinney D, Candia C, Solomon F, et al. NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. **J Biol Chem** 273(3): 1273-6, 1998.
- Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem** 268(1): 13-6, 1993.
- Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chem Rev** 101(8): 2353-64, 2001.
- Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. **Genes Dev** 17(16): 1937-56, 2003.
- Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. **J Cell Sci** 116(Pt 8): 1409-16, 2003.
- Peck J, Douglas Gt, Wu CH, Burbelo PD. Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. **FEBS Lett** 528(1-3): 27-34, 2002.
- Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A, et al. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. **J Clin Invest** 116(1): 217-27, 2006.
- Pham CG, Harpf AE, Keller RS, Vu HT, Shai SY, Loftus JC, et al. Striated muscle-specific beta(1D)-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 279(6): H2916-26, 2000.
- Ponting CP, Ito T, Moscat J, Diaz-Meco MT, Inagaki F, Sumimoto H. OPR, PC and AID: all in the PB1 family. **Trends Biochem Sci** 27(1): 10, 2002.
- Prakash SK, Paylor R, Jenna S, Lamarche-Vane N, Armstrong DL, Xu B, et al. Functional analysis of ARHGAP6, a novel GTPase-activating protein for RhoA. **Hum Mol Genet** 9(4): 477-88, 2000.
- Price LS, Collard JG. Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. **Semin Cancer Biol** 11(2): 167-73, 2001.
- Quach NL, Rando TA. Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. **Dev Biol** 293(1): 38-52, 2006.
- Ramaekers FC, Bosman FT. The cytoskeleton and disease. **J Pathol** 204(4): 351-4, 2004.

- Roux P, Gauthier-Rouviere C, Doucet-Brutin S, Fort P. The small GTPases Cdc42Hs, Rac1 and RhoG delineate Raf-independent pathways that cooperate to transform NIH3T3 cells. **Curr Biol** 7(9): 629-37, 1997.
- Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 289(6): H2291-301, 2005.
- Saras J, Heldin CH. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. **Trends Biochem Sci** 21(12): 455-8, 1996.
- Satoh S, Ueda Y, Koyanagi M, Kadokami T, Sugano M, Yoshikawa Y, et al. Chronic inhibition of Rho kinase blunts the process of left ventricular hypertrophy leading to cardiac contractile dysfunction in hypertension-induced heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 35(1): 59-70, 2003.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. **Mol Cell Biol** 14(3): 1680-8, 1994.
- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. **J Cell Biol** 130(5): 1181-7, 1995.
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. **Biochim Biophys Acta** 1692(2-3): 77-102, 2004.
- Sentex E, Wang X, Liu X, Lukas A, Dhalla NS. Expression of protein kinase C isoforms in cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload. **Can J Physiol Pharmacol** 84(2): 227-38, 2006.
- Sheikh F, Chen Y, Liang X, Hirschy A, Stenbit AE, Gu Y, et al. alpha-E-catenin inactivation disrupts the cardiomyocyte adherens junction, resulting in cardiomyopathy and susceptibility to wall rupture. **Circulation** 114(10): 1046-55, 2006.
- Sopontammarak S, Aliharoob A, Ocampo C, Arcilla RA, Gupta MP, Gupta M. Mitogen-activated protein kinases (p38 and c-Jun NH2-terminal kinase) are differentially regulated during cardiac volume and pressure overload hypertrophy. **Cell Biochem Biophys** 43(1): 61-76, 2005.

- Sordella R, Classon M, Hu KQ, Matheson SF, Brouns MR, Fine B, et al. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. **Dev Cell** 2(5): 553-65, 2002.
- Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. **Cell** 113(2): 147-58, 2003.
- Sousa S, Cabanes D, Archambaud C, Colland F, Lemichez E, Popoff M, et al. ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for Listeria invasion. **Nat Cell Biol** 7(10): 954-60, 2005.
- Sugden PH. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. **Circ Res** 93(12): 1179-92, 2003.
- Symons M. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. **Trends Biochem Sci** 21(5): 178-81, 1996.
- Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Curr Opin Cell Biol** 9(1): 86-92, 1997.
- Tarone G, Lembo G. Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy. **Trends Mol Med** 9(9): 376-82, 2003.
- Taylor JM, Hildebrand JD, Mack CP, Cox ME, Parsons JT. Characterization of p115, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase. Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem** 273(14): 8063-70, 1998.
- Taylor JM, Rovin JD, Parsons JT. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. **J Biol Chem** 275(25): 19250-7, 2000.
- Thorburn J, Xu S, Thorburn A. MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. **Embo J** 16(8): 1888-900, 1997.
- Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W, Jr., Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. **Circ Res** 93(2): 140-7, 2003a.

- Torsoni AS, Fonseca PM, Crosara-Alberto DP, Franchini KG. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. **Am J Physiol Cell Physiol** 284(6): C1411-9, 2003b.
- Wittmann T, Waterman-Storer CM. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? **J Cell Sci** 114(Pt 21): 3795-803, 2001.
- Wu JC, Tsai RY, Chung TH. Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. **J Cell Biochem** 88(4): 823-35, 2003.
- Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. **J Biol Chem** 279(31): 33024-34, 2004.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, Maniwa R, et al. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. **Genes Cells** 6(8): 721-31, 2001.
- Yi XP, Wang X, Gerdes AM, Li F. Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium. **Hypertension** 41(6): 1317-23, 2003.
- Yi XP, Zhou J, Huber L, Qu J, Wang X, Gerdes AM, et al. Nuclear compartmentalization of FAK and FRNK in cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 290(6): H2509-15, 2006.
- Zhai J, Lin H, Nie Z, Wu J, Canete-Soler R, Schlaepfer WW, et al. Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. **J Biol Chem** 278(27): 24865-73, 2003.
- Zhang Z, Wu C, Wang S, Huang W, Zhou Z, Ying K, et al. Cloning and characterization of ARHGAP12, a novel human rhoGAP gene. **Int J Biochem Cell Biol** 34(4): 325-31, 2002.



# **ANEXOS**



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_\_19) 3788-8936  
fax (0\_\_19) 3788-8925  
✉ [cep@heam.fcm.unicamp.br](mailto:cep@heam.fcm.unicamp.br)

CEP, 19/11/02  
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 458/2002

### I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES HUMANOS RELACIONADOS AOS GENES DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO DE ESPECTRINA"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 21/10/2002

### II - OBJETIVOS

A pesquisa visa verificar a função de novas proteínas em diferentes tipos de células. Trata-se de um estudo comparativo para: a) determinar os diferentes tecidos humanos em que os genes codificam as ESTs homólogas às proteínas citoesqueléticas são expressos através da utilização da técnica de Northern Blotting multi-tecidual; b) obter a seqüência completa do cDNA correspondente a cada uma das diferentes ESTs estudadas a partir de ESTs depositadas em banco de dados, através de bio-informática e/ou através do método de RACE ou PVR de bibliotecas de cDNA com o objetivo de se ter acesso à estrutura primária da proteína codificada por estes genes; c) produzir "macroarrays" de ESTs homólogas a genes do citoesqueleto para verificar a expressão diferencial destes genes em tecidos normais e tumores; d) identificar proteínas de ligação do domínio SH3 da alfa-espectrina em células hematopoéticas usando um ensaio "in vivo" baseado em levedura; e) identificar proteínas de ligação do domínio de cauda e do domínio rico em serina e treonina das anquirinas gigantes m tecido cerebral, usando um ensaio "in vivo" baseado em levedura; f) após a caracterização da seqüência de aminoácidos dos novos genes clonados, determinar a localização celular destas proteínas, através da técnica de imunolocalização fluorescente; g) em camundongos, obter a seqüência do cDNA das proteínas de maior interesse com o objetivo de se realizar estudos funcionais; h) dependendo da localização das proteínas, realizar estudos funcionais para avaliar o papel destas proteínas nos tecidos encontrados e i) avaliar a expressão do mRNA e da proteína em células de pacientes portadores de neoplasias, cardiopatias, doenças neurológicas e renais e comparar com células normais.

### III - SUMÁRIO

Serão estudados cerca de 50 pacientes adultos, maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, atendidos no complexo hospitalar da UNICAMP, com doenças neoplásicas, como por exemplo leucemias agudas e crônicas, linfomas e mieloma múltiplo, assim como pacientes portadores de cardiopatia, doenças neurológicas, doenças renais. Dependendo da função e localização das proteínas identificadas, será verificado se estas apresentam alteração da expressão em tecido normais e anormais. Para tanto serão analisados 20 ml de sangue periférico, ou 2 ml de medula óssea ou fragmentos de tecido submetidos à biópsia a serem analisados por imunohistoquímica, imunocitoquímica, western blotting ou quantificação mRNA. Exceto sangue periférico e medula óssea não será coletado material especificamente para este projeto, mas serão utilizados material de arquivo ou fragmento de material coletado para biópsia com fins diagnósticos. O estudo não explicita critérios de exclusão. Os resultados obtidos serão comparados com o de controles não portadores das doenças em questão. Como controle periférico serão utilizados glóbulos brancos obtidos em bolsas de sangue de doadores voluntários e normais, deleucocitadas pelo sistema top-bottom no Hemocentro da UNICAMP. Como controle de medula óssea será utilizado material de medula óssea obtido de pacientes portadores de púrpura trombocitopênica idiopática. A coleta de material de medula é rotina nestes casos. A metodologia a ser seguida é compatível com as questões que o estudo formula e as condições para sua realização, adequadas.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Não há riscos envolvidos no estudo, o termo de consentimento está formulado de maneira clara e objetiva, tematizando os principais pontos sob exame: anonimato garantido, liberdade para retirada do estudo independente do manutenção do atendimento, sigilo.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

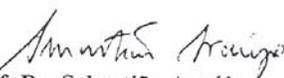
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

**Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.**

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de novembro de 2002.

  
**Prof. Dr. Sebastião Araújo**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP