

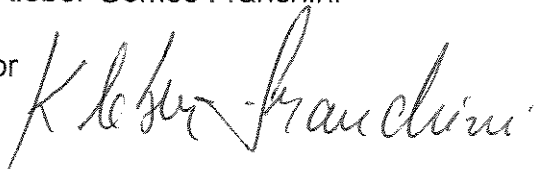
CLAUDIA BANDEIRA KOBARG

**EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DOS FATORES DE
TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA MEF2 EM MIÓCITOS
CARDÍACOS SUBMETIDOS A ESTÍMULO MECÂNICO**

Este exemplar corresponde à versão final
da Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação Fisiopatologia
Médica da Faculdade de Ciências Médicas
da UNICAMP, para obtenção do título de
Doutor em Fisiopatologia Médica, Área
Medicina Experimental
Campinas, 15 de março de 2005.

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Orientador



CAMPINAS

2005

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

CLAUDIA BANDEIRA KOBARG

**EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DOS FATORES DE
TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA MEF2 EM MIÓCITOS
CARDÍACOS SUBMETIDOS A ESTÍMULO MECÂNICO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, na área de concentração em
Biologia Estrutural, Celular e Molecular.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2005

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/Unicamp
	K792e
V	EX
TOMBO BC	64182
PROC.	16-P-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	99,00
DATA	10/06/05
Nº CPD	

librid: 352039

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

K792e

Kobarg, Claudia Bandeira

Expressão e regulação dos fatores de transcrição da família MEF2 em miócitos cardíacos submetidos a estímulo mecânico / Claudia Bandeira Kobarg. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Kleber Gomes Franchini

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Miócitos cardíacos. 2. Hipertrofia. 3. Fator de transcrição. 4. Regulação da expressão gênica. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

MEMBROS DA BANCA:

Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot _____

Prof. Dr. José Xavier Netto _____

Prof.^a. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad _____

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira _____

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini _____

Campinas, 15 de março de 2005.

**Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica, área de concentração
Biologia Estrutural, Celular e Molecular, da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas,**

200511100

Para meu pai, Laudelino Bandeira, que já se foi.

Para meu filho, Johann Kobarg, que está por vir.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela orientação, pela confiança, pelo exemplo científico e pela contribuição para minha formação profissional, muito obrigada.

A Prof.^a Dra. Íscia Cendes, coordenadora do Departamento de Fisiopatologia Médica pelo seu apoio. À Teresa, secretária do departamento, pelas inúmeras vezes que me ajudou com a parte administrativa.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot, Prof. Dr. José Xavier Netto, Prof.^a Dra. Sara Teresinha Olalla Saad e Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

Ao Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad, por disponibilizar seu laboratório.

A todos os colegas e queridos amigos do laboratório de fisiopatologia cardiovascular pela agradável convivência: em especial à Thaís Theizen pela coarctação dos animais, à Daniela Crosara pela ajuda com a microscopia confocal, à Rosana Inoue pelo trabalho conjunto com leveduras, a Carolina Clemente pelas células, aos técnicos Antônio Calixto e Jaqueline Lima pela ajuda nos experimentos e por sempre manterem o laboratório organizado. Ao Wilson Nadruz e Priscila Fonseca por terem me dado a oportunidade de trabalharmos juntos nos seus respectivos projetos, que resultou nas publicações anexadas.

Aos colegas e amigos do BMO/LNLS que tanto me ajudaram, especialmente, Patrícia Moura, Edmilson Rui e Dario Passos.

Ao meu querido marido, Dr. Jörg Kobarg, por sempre disponibilizar espaço e reagentes no laboratório de Biologia Molecular do LNLS, além do apoio em todos os momentos. *Für unsere Zweisamkeit, für unsere zukünftige Dreisamkeit... Vielen Dank.*

À minha família por ter compreendido a importância deste trabalho para mim e me apoiado, mesmo quando minha presença era necessária, nos dois últimos anos de meu pai.

À FAPESP, pelo suporte financeiro com a bolsa de doutorado.

"É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar,
é melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

	<i>PÁG.</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xix</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>xxi</i>
RESUMO	<i>xxi</i>
ABSTRACT	<i>xxv</i>
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Hipertrofia Cardíaca	31
1.2. Regulação Gênica no Processo Hipertrófico	33
1.3. Os Fatores de Transcrição MEF2	37
1.4. A Regulação de MEF2	38
2. OBJETIVO	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Coarctação da aorta	47
3.2. Monitorização das pressões arteriais	48
3.3. Preparação de extrato total de proteínas do ventrículo esquerdo de rato	49
3.4. Análise do extrato protéico em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	51
3.5. Western Blot	51
3.6. Imunoprecipitação	52
3.7. Linhagens de bactéria e levedura utilizadas	53
3.8. Alinhamento das seqüências	53
3.9. Síntese de oligonucleotídeos	53
3.10. Vetores utilizados	56
3.11. Extração de RNA	58

3.12. Eletroforese de RNA em condições desnaturantes	58
3.13. Descontaminação do RNA	59
3.14. Síntese de cDNA para reação de transcrição reversa (RT-PCR)	59
3.15. Amplificação do cDNA (PCR)	60
3.16. Eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos de amplificação	60
3.17. Reações de ligação para clonagem de fragmentos de cDNA em vetor	61
3.18. Transformação de bactérias e mini-preparação de DNA de plasmídeos	61
3.19. Identificação de clones recombinantes por PCR de colônia e digestão de DNA	62
3.20. Seqüenciamento de DNA	63
3.21. Análise das seqüências	63
3.22. Sistema de duplo-híbrido em levedura	64
3.23. Construção da biblioteca de cDNA de coração de rato por recombinação em levedura	66
3.24. Preparação de células competentes e transformação de leveduras	69
3.25. Triagem de duplo-híbrido	70
3.26. Ensaio de β -galactosidase	71
3.27. Mini-preparação de DNA de levedura	71
3.28. Construções de cDNA para expressão de proteínas recombinantes	72
3.29. Indução da expressão de proteínas recombinantes	77
3.30. Análise do extrato bacteriano em gel de poliacrilamida	74
3.31. Purificação das proteínas recombinantes	74
3.32. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA ou “Gel shift”)	76
3.32.1. Preparação do extrato nuclear	76
3.32.2. Marcação da sonda de DNA	77
3.32.3. Reação de ligação e eletroforese do complexo DNA/Proteína	77
3.33. Ensaio de Co-precipitação (“Pull down”)	79
3.34. Isolamento de cardiomiócitos de ratos adultos	79
3.35. Imunohistoquímica com Microscopia Confocal a Laser	81

3.36. Fracionamento subcelular	82
4. RESULTADOS	83
4.1. Aumento de pressão causado pela coarctação da aorta	85
4.2. Análise da expressão da proteína MEF2 por Western blot em ventrículo esquerdo de ratos submetidos a constricção da aorta	85
4.3. As isoformas A, C e D de MEF2 mantém sua expressão inalterada nas primeiras horas de sobrecarga mecânica no coração de ratos adultos	87
4.4. O fator de transcrição MEF2 é ativado por sobrecarga mecânica	89
4.5. Escolha do fator MEF2 e das regiões para a construção dos mutantes de deleção	96
4.6. Isolamento e clonagem do cDNA de MEF2C de rato	91
4.7. Sequenciamento e análise das construções de MEF2C	95
4.8. Ensaio de duplo-híbrido em levedura	96
4.8.1. Escolha do mutante de deleção MEF2C para isca do duplo-híbrido e análise de auto-transativação	96
4.8.2. Construção da biblioteca de cDNA	98
4.8.3. Triagem da biblioteca de cDNA	99
4.8.4. Sequenciamento e análise do cDNA	101
4.9. Estudo de interação: associação de MEF2 com miosina em coração de rato	105
4.10. Expressão e purificação das proteínas recombinantes	106
4.11. Estudo de interação: ensaio de co-precipitação <i>in vitro</i>	109
4.12. Estudo funcional da interação de MEF2 com Ki-1/57 por ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)	109
4.13. Expressão de Ki-1/57 em coração de rato	114
4.14. Associação de MEF2 e Ki-1/57 em coração de rato	114
4.15. Microscopia confocal: MEF2 e Ki-1/57 se encontram co-localizados em miócito cardíaco	114
4.16. Microscopia confocal: a sobrecarga mecânica reduz significativamente a co-localização de MEF2 e Ki-1/57 em miócito cardíaco	116
4.17. Fracionamento subcelular	116
5. DISCUSSÃO	126
5.1. Expressão e ativação dos fatores MEF2 em miocárdio de ratos por	128

sobrecarga mecânica	
5.2. Escolha do mutante de deleção de MEF2C para ensaio de duplo-híbrido	129
5.3. Interação de MEF2C com Miosina	131
5.4. Interação de MEF2C com Ki-1/57	133
6. CONCLUSÃO	140
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
8. ANEXOS	158

LISTA DE ABREVIATURAS

ERK5 ou BMK1	Quinase Responsiva a estímulos extracelulares-5 (subfamília das MAPKs)
HDACs	Deacetilases de Histona Classe II
MADS	Domínio presente em alguns fatores de transcrição originalmente descrito em: <i>MCMI</i> , <i>Agamous</i> , <i>Deficiens</i> e <i>Serum response factor</i>
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEF2	Fator Ativador de Miócito-2 (Fator de transcrição)
p38	p38-MAPK (subfamília das MAPKs)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Tris-HCl	Tampão Tris-hidroximetilaminometano e ácido clorídrico
Trisma	Tris-hidroximetilaminometano
EMSA	<i>Electrophoresis Mobility Shift Assay</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
DTT	Ditiotreitol
IPTG	Isopropil tio- β -galactosídeo
MOPS	3(N-Morfolino)ácido propanosulfônico
SSC	Cloreto de sódio/ Citrato trissódico
HEPES	Ácido (hidroxi-piperazina)etanosulfônico
X-Gal	5-bromo-4-cloro- β -D-galatopiranosídeo

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
Figura 1 Crescimento hipertrófico do coração	33
Figura 2 Representação do efeito de regulação provocado por estímulos hipertróficos	36
Figura 3 Representação dos fatores da família MEF2	39
Figura 4 Representação da coarctação da aorta	48
Figura 5 Esquema de registro hemodinâmico	50
Figura 6 Mapa dos vetores	57
Figura 7 Sistema de duplo-híbrido em levedura	65
Figura 8 Representação da produção da biblioteca de cDNA	67
Figura 9 Recombinação homóloga	68
Figura 10 Esquema do ensaio de co-precipitação	80
Figura 11 Pressão arterial sistólica de ratos na aorta abdominal e no ventrículo esquerdo	86
Figura 12 Análise da expressão de MEF2 por Western blot	87
Figura 13 Análise da expressão de MEF2 por RT-PCR	88
Figura 14 EMSA de MEF2 com extrato de ventrículo esquerdo de rato	90
Figura 15 Representação esquemática dos domínios da proteína MEF2C e dos mutantes de deleção MEF2C	92
Figura 16 Alinhamento das seqüências de proteína da família MEF2	93
Figura 17 Teste de β -galactosidase em papel dos mutantes de deleção	97
Figura 18 Triagem de duplo-híbrido em levedura	100

Figura 19	Digestão de DNA de clones isolados da biblioteca	102
Figura 20	Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos clones encontrados na triagem de duplo-híbrido com a seqüência de Ki-1/57 humano	104
Figura 21	Co-imunoprecipitação de miosina com MEF2	106
Figura 22	Expressão de GST-MEF2C(1-169)	108
Figura 23	Identificação de proteínas recombinantes	110
Figura 24	Ensaio de co-precipitação: Ki-1/57 interage com MEF2C <i>in vitro</i>	111
Figura 25	EMSA de MEF2C recombinante	113
Figura 26	Análise da expressão de Ki-1/57 por Western blot em VE de ratos	115
Figura 27	Ensaio de co-imunoprecipitação: a associação de MEF2 com Ki-1/57 diminui com o estímulo mecânico	115
Figura 28	Imunolocalização de MEF2 (verde) e Ki-1/57 (vermelho) em cardiomiócitos de ratos adultos isolados avaliada por Microscopia Confocal a Laser	117
Figura 29	Fracionamento subcelular: Ki-1/57 diminui no núcleo de miócitos de ratos submetidos à coarctação da aorta.	118
Figura 30	Modelo esquemático de mecanismo proposto de inibição de Ki-1/57 sobre MEF2 em coração de rato.	137
Tabela I	Oligonucleotídeos sintéticos	54
Tabela II	Clones obtidos na triagem de duplo-híbrido	103

RESUMO

As proteínas da família MEF2 são fatores de transcrição do tipo MADS-box que desempenham papéis importantes na regulação da miogênese e da morfogênese do miocárdio. Trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório anteriormente, demonstraram que a rápida ativação de MEF2 por estímulo hipertrófico exerce um papel principal na ativação de *c-jun*, sugerindo sua importância na regulação da expressão de genes de resposta imediata por estímulo hipertrófico.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a expressão e regulação dos fatores MEF2 frente à sobrecarga mecânica. Foi demonstrado que os fatores MEF2 são ativados em resposta à sobrecarga mecânica em coração de rato. Essa ativação não ocorreu por um aumento na expressão de MEF2, mas provavelmente, por alguma modificação pós-transcricional na proteína, aumentando assim a afinidade ao seu DNA consenso em ensaio de EMSA.

O método de duplo-híbrido em levedura foi utilizado para encontrar proteínas que interajam com MEF2 e atuem na sua regulação em resposta ao estímulo mecânico. Numa triagem de biblioteca de coração de rato previamente submetido à coarctação da aorta com uma “isca” de MEF2C, foram encontrados 4 clones de cDNA contendo a região C-terminal de miosina de cadeia pesada e 4 clones contendo a região N-terminal da proteína regulatória Ki-1/57. A interação entre MEF2C e miosina foi confirmada por imunoprecipitação em coração de rato e a interação entre MEF2C e Ki-1/57 foi confirmada por imunoprecipitação, ensaio de co-precipitação e análise microscópica de imunolocalização.

A interação entre MEF2 e Ki-1/57 é dependente de estímulo mecânico no coração. Um ensaio de imunoprecipitação com anticorpo anti-MEF2 demonstrou uma associação basal entre essas duas proteínas no ventrículo esquerdo de ratos controle. No entanto, o

estímulo mecânico causou uma redução significativa nesta associação. Ki-1/57 se apresentou co-localizado com MEF2 no núcleo de miócitos de ratos controle. Porém, ao submeter ratos a coarctação da aorta, essa co-localização não foi mais observada no núcleo dos miócitos. Ki-1/57 também exerce um efeito inibitório sobre a ligação de MEF2 a sua região consenso de DNA em ensaio de EMSA.

Esses resultados sugerem que a interação de Ki-1/57 com MEF2 é inibitória e que esteja envolvida com a regulação de MEF2 em resposta ao estímulo mecânico no coração.

ABSTRACT

The MEF2 proteins family is composed of MADS box transcription factors that plays important roles in the regulation of myogenesis and morphogenesis of myocardium. Previous work developed in our laboratory showed that the early activation of MEF2 proteins by mechanical overload plays a main role in the activation of *c-jun*, suggesting its importance in the regulation of immediate early genes response to mechanical overload.

The present work objective was to study the expression and regulation of MEF2 factors in face of mechanical overload. It was demonstrated that the MEF2 factors are activated in response to mechanical overload in rat heart. This activation did not occur by an increase in MEF2 expression, but probably by some kind of post-transcriptional modification in the protein, raising the affinity of MEF2 to its DNA in EMSA experiments.

The yeast two-hybrid system was used to find proteins that interact with MEF2 and act in its regulation in response to mechanical overload. In a rat heart library screening with MEF2C as bait, four cDNA clones encoding a C-terminal region of Myosin Heavy Chain were isolated, as well as four clones encoding the N-terminal region of the regulatory protein Ki-1/57. The interaction between MEF2C and myosin was confirmed by immunoprecipitation in rat heart and the interaction between MEF2C and Ki-1/57 was confirmed by immunoprecipitation, pull down assay and immunolocalization by laser confocal microscopic analysis.

The interaction of MEF2 with Ki-1/57 is dependent on mechanical overload in the heart. An immunoprecipitation assay using anti-MEF2 antibody showed a basal association between these two proteins in left ventricle of control rats. However, the mechanical overload caused a significant reduction in this association. Ki-1/57 co-localizes with MEF2 in the nucleus of myocytes of control rats. On the other hand, after submitting the animals to transverse aortic constriction, this co-localization in the nucleus was no longer observed.

Ki-1/57 also exerts an inhibitory effect upon MEF2C's DNA binding activity.

These results suggest that the interaction between MEF2 and Ki-1/57 is inhibitory and that it may be involved in the regulation of MEF2 in response to mechanical stimulus in the heart.

1. INTRODUÇÃO

1. 1. HIPERTROFIA CARDÍACA

O crescimento do coração durante a embriogênese ocorre através da proliferação dos miócitos cardíacos. No entanto, logo após o nascimento, os miócitos abandonam irreversivelmente o ciclo celular. O crescimento subsequente do coração ocorre preferivelmente por hipertrofia do que por hiperplasia do miócito. O termo hipertrofia é definido como um crescimento no tamanho celular de maneira que o miócito hipertrofiado seja igual a uma célula normal, só que maior. Isto implica que durante o evento de indução hipertrófica, deva ocorrer uma regulação quantitativa da maioria dos genes que codificam as proteínas dos cardiomiócitos (COOPER, 1997). Numa tentativa de explicar uma regulação tão vasta, uma hipótese seria que o programa transcricional para a cardiogênese seria simplesmente re-iniciado no começo da hipertrofia (OLSON & SRIVASTAVA, 1996). Os mecanismos de controle transcricional para o desenvolvimento cardíaco têm, por definição, o potencial para iniciar ou aumentar o programa transcricional responsável pelo fenótipo diferencial dos miócitos (COOPER, 1997).

Em termos amplos, há dois tipos de hipertrofia, a fisiológica, que ocorre em resposta ao exercício, e a patológica, que ocorre em resposta ao estresse. Os sinais de estresse que induzem a hipertrofia são: a hipertensão, a sobrecarga de volume, desordens endócrinas, infarto do miocárdio e disfunção contrátil por mutações herdadas em proteínas sarcoméricas ou do citoesqueleto (OLSON & SCHNEIDER, 2003).

O coração se adapta a sobrecargas hemodinâmicas através de:

- a) mecanismo de Frank-Starling, que aumenta a formação de sítios de interação entre a actina e a miosina;
- b) aumento da massa muscular que suporta a carga hemodinâmica extra;
- c) recrutamento de mecanismos neuro-humorais que aumentam a contratilidade.

O primeiro mecanismo é limitado em seu escopo e o terceiro é deletério como ajuste crônico. Assim, o aumento da massa muscular assume um papel central na compensação hemodinâmica à sobrecarga.

O aumento na espessura da parede ventricular ocorre pela adição em paralelo de unidades sarcoméricas dos miócitos individuais. Essa remodelagem resulta em hipertrofia concêntrica (i.e aumento na relação espessura parede/dimensões da câmara) do ventrículo esquerdo (Figura 1).

De acordo com a lei de Laplace, a carga (T) em qualquer região do miocárdio é dada como se segue:

$$T = \frac{Pr}{2e}$$

(onde P=pressão intraventricular, r=raio da câmara e e=espessura da parede); portanto, um aumento na tensão provocado por aumento de pressão pode ser compensado por um aumento na espessura da parede.

Por ser a tensão sistólica a principal determinante da performance de ejeção, sua normalização contribui para a manutenção de fração de ejeção, mesmo com a necessidade de gerar níveis elevados de pressão sistólica (GROSSMAN, 1980). Por outro lado, por determinar a deformação mecânica dos cardiomiócitos, esta variável é tida como o principal estímulo para o crescimento hipertrófico do miocárdio (COOPER, 1997; OMENS, 1998).

Apesar de ser uma resposta compensatória ao aumento da tensão da parede ventricular, a hipertrofia ventricular esquerda é também fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular, presumivelmente por predispor a eventos isquêmicos miocárdicos, arritmias cardíacas e desenvolvimento de insuficiência cardíaca (LORREL e CARABELLO, 2000).

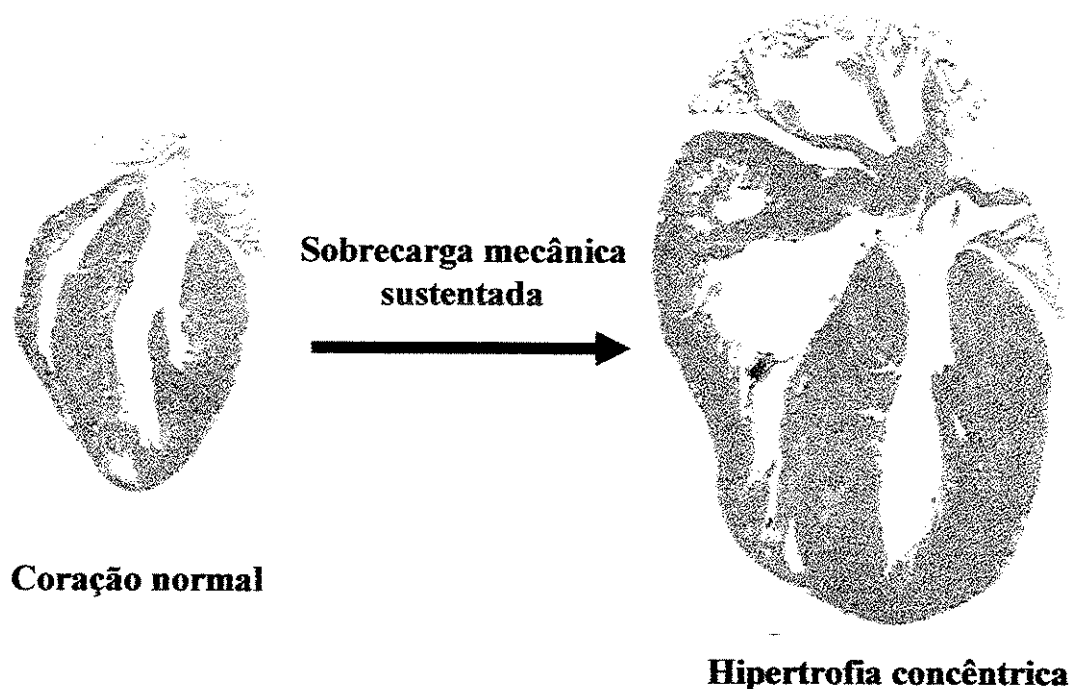


Figura 1. Crescimento do miocárdio adulto por sobrecarga mecânica promovendo o aparecimento de hipertrofia concêntrica (figura modificada de OLSON e SCHNEIDER, 2003).

1.2. REGULAÇÃO GÊNICA NO PROCESSO HIPERTRÓFICO

O crescimento hipertrófico envolve o controle molecular em vários níveis: iniciação da transcrição, alongação do transcrito e tradução da proteína (HUNTER & CHIEN 1999; MOLKENTIN & DORN 2001). Esses caminhos de sinalização culminam no núcleo, onde ativam um conjunto de fatores de transcrição. Esses fatores são responsáveis pela re-expressão do programa gênico fetal dos miócitos (Figura 2).

A hipertrofia cardíaca resulta da reprogramação complexa da regulação gênica que inclui a re-expressão de genes cardíacos fetais, genes que modificam a composição e a regulação das unidades motoras, genes que modificam o metabolismo energético e genes

que codificam componentes de vias hormonais (ex: ANP, ECA) (HUNTER et al, 1999).

O primeiro grupo de genes ativados por sobrecarga mecânica é o grupo dos genes de resposta imediata como *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* e *c-myc* (KOMURO et al, 1990; SADOSHIMA et al, 1992). Após 6h de sobrecarga mecânica intermitente no miocárdio, os genes fetais como *β-miosina de cadeia pesada*, *fator natriurético atrial* e *alfa-actina esquelética* passam a ser expressos. Somente após 12 a 24 h que os genes de expressão constitutiva como *Miosina de cadeia leve-2v* e *α-miosina de cadeia pesada* passam a ser expressos. Este padrão de expressão gênica é observado tanto em modelos de sobrecarga hemodinâmica em animais, como em miócitos cardíacos isolados tratados cronicamente com agonistas ou submetidos a estiramento mecânico sustentado (SADOSHIMA & IZUMO, 1997; YAMAZAKI et al, 1998). Estes dados indicam que, embora diferentes vias de sinalização celular sejam ativadas por estímulos hipertróficos distintos, o programa gênico relacionado às alterações fenotípicas da hipertrofia cardíaca encontra-se conservado.

Além disso, ocorre uma depressão variável e tardia da expressão de outros genes que modificam a homeostase iônica intracelular. Por exemplo, pode-se citar a depressão da expressão da cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (*SERCA-2*), com aumento variável na expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ e receptores das vias parassimpática e simpática que são também atenuados (ex: receptor β_1 -adrenérgico, receptores muscarínicos e aumento na razão dos receptores de Angitensina II AT_2/AT_1) (HUNTER et al, 1999). Assim, acredita-se que o controle transcricional da expressão gênica tem função central na determinação das características fenotípicas da hipertrofia cardíaca. Portanto, o entendimento do crescimento e da hipertrofia no músculo cardíaco requer informação detalhada da regulação da expressão dos genes do coração.

A regulação transcricional dos vários processos da hipertrofia do miócito cardíaco envolve a interação de sinais de crescimento traduzidos da membrana e citosol para o núcleo. Vários processos podem ser distinguidos na regulação da expressão gênica:

- 1) aumento geral da capacidade de síntese protéica;
- 2) aumento no nível e/ou atividade de fatores de transcrição específicos, relacionados a fenótipos particulares de hipertrofia cardíaca e
- 3) aumento da atividade de fatores de transcrição envolvidos no controle de proteínas genéricas dos miócitos.

Alguns fatores de transcrição que regulam a expressão gênica no coração foram inicialmente descritos em células de músculo esquelético indicando que o músculo cardíaco e o esquelético compartilham fatores reguladores (MAR et al, 1990; GUPTA et al, 1991; MOLKENTIN et al, 1993). Os fatores de transcrição cardíacos são definidos, neste contexto, como ativadores transcricionais expressos predominantemente no miocárdio e que regulam a expressão de genes cardíacos que codificam proteínas estruturais ou proteínas regulatórias características dos cardiomiócitos. Estudos recentes estabeleceram a noção que os fatores de transcrição cardíacos governam o processo de cardiogênese através da regulação da expressão gênica cardíaca-específica. Os fatores de transcrição cardíacos são representados principalmente por 4 famílias: HAND, GATA4, MEF2 e Csx/Nkx2-5 (Revisado por AKASAWA E KOMURO, 2003).

Destes fatores, o fator ativador de miócitos (MEF2 – myocyte specific enhancer factor 2) é de vital importância. Sítios potenciais de ligação para o MEF-2 foram identificados em regiões reguladoras de vários genes que se expressam no coração, incluindo a *creatina-quinase*, *miosina de cadeia leve* e *fator natriurético atrial*, sugerindo que o MEF-2 poderia influenciar a expressão gênica no coração (STERNBERG et al, 1988;

NAVANKASATTUSAS et al, 1992; SEIDMAN et al, 1988).

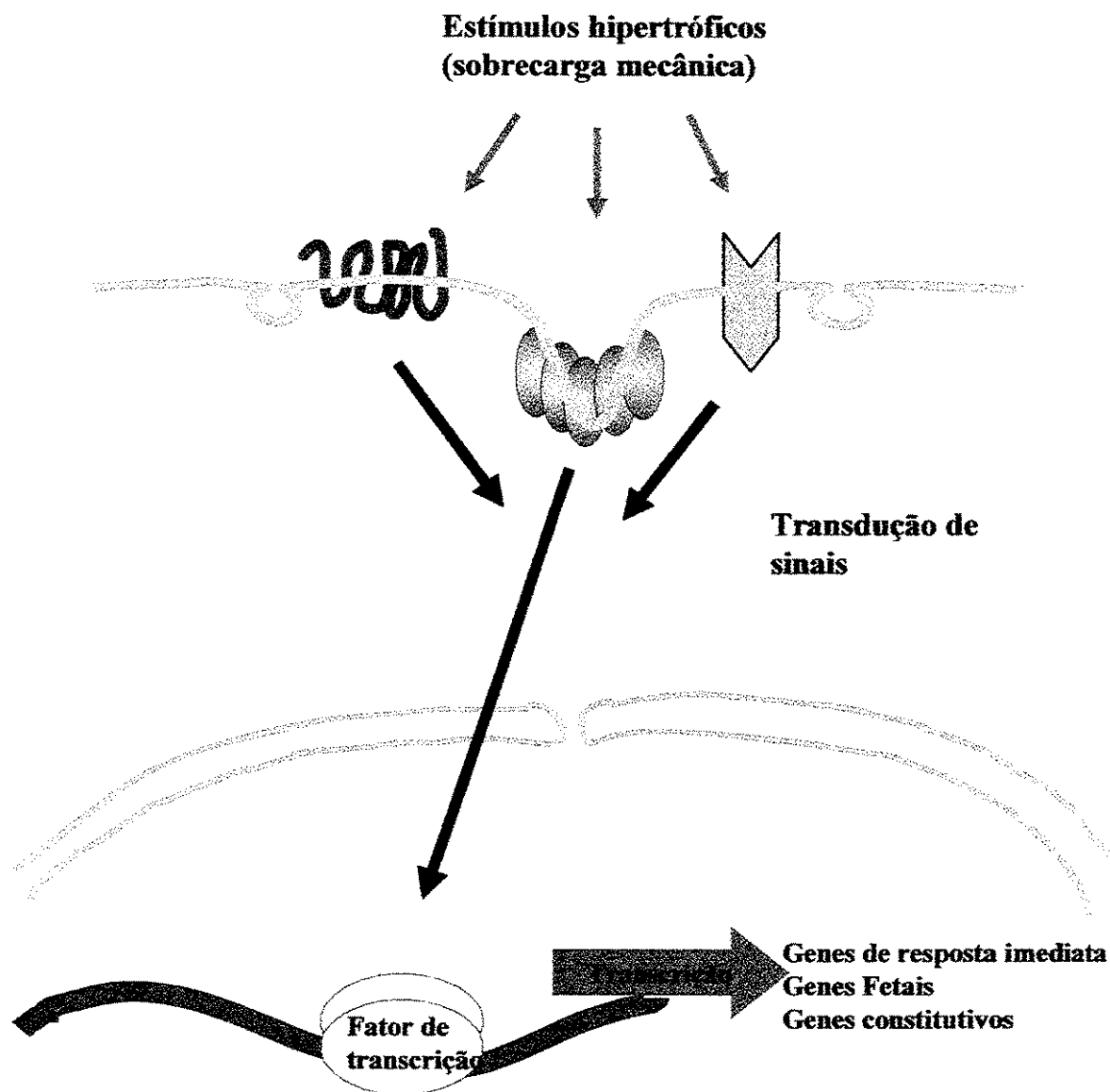


Figura 2. Representação esquemática do efeito de regulação gênica provocada por estímulos hipertróficos na célula.

1.3. OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO MEF2

Os fatores MEF2 pertencem à família MADS box (*MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor*) e foram descritos pela primeira vez como fatores de transcrição que se ligam a seqüências de DNA enriquecidas em A/T nos promotores de vários genes músculos-específicos como o da *creatinina quinase muscular* (MCK) (GOSSET et al, 1989). Além deste, seqüências alvo de MEF2 já foram identificadas nos promotores dos seguintes genes: *MHC*, *MLC1/3*, *MLC2v*, *actina esquelética*, *SERCA*, *troponina T*, *troponina C*, *troponina I*, *desmina*, e *distrofina*. Outros estudos demonstraram que as proteínas MEF2 também eram altamente expressas em neurônios e em níveis menores, em outros tipos celulares (BLACK & OLSON, 1998).

Existem 4 genes da Família MEF2 que foram identificados em vertebrados: *mef2a*, *b*, *-c* e *-d*. que são expressos de forma distinta, mas em padrões de sobreposição durante a embriogênese e nos tecidos adultos (BLACK & OLSON, 1998). Eles possuem domínios de ligação ao DNA quase idênticos na extremidade N-terminal com alta homologia no domínio MADS box (aminoácidos 1-57). Este domínio é responsável pela ligação ao DNA e dimerização das proteínas, permitindo que os fatores MEF2 se liguem como homo ou heterodímeros a um elemento *cis* com a seqüência (C/T)TA(A/T)₄TA(G/A). Um domínio adjacente ao MADS box chamado domínio MEF2 (aminoácidos 58-86) que é característico da família influencia a afinidade de ligação ao DNA assim como a interação com co-fatores. A região C-terminal dos fatores MEF2 é menos conservada, embora MEF2A, MEF2C e MEF2D apresentem considerável homologia C-terminal indicando a evolução de um gene ancestral comum (JANSON et al, 2001). A região C-terminal apresenta o domínio de transativação. Nessa região, também ocorrem processos complexos de *splicing* alternativo (Figura 3), com certos exons presentes em todos os tipos celulares, enquanto

outros são limitados a tipos celulares específicos. Em MEF2A, um exon com a sequência SEEEELEL é específica para células musculares e neuronais (YU et al, 1992). MEF2D contem um exon (TEDHLDL) que se encontra somente presente em células de músculo esquelético, coração e cérebro e está correlacionado com a atividade de ligação de MEF2D (BREITBART et al, 1993; MARTIN et al 1994). O domínio correspondente em MEF2C (SEDVDLLL) se encontra presente somente em transcritos de músculo esquelético (McDERMOTT et al, 1993).

Desde que a expressão das proteínas contráteis do coração aumenta durante a hipertrofia cardíaca, infere-se que os fatores que regulam estes genes também devem aumentar, tornando-se mais ativos, e/ou que os genes devem se tornar mais acessíveis aos fatores reguladores. Fatores MEF2 se associam com uma variedade de co-fatores de transcrição para controlar determinados grupos de genes-alvo. Portanto, os fatores MEF-2 são prováveis candidatos como alvo final de vias sinalizadoras intracelulares envolvidas na resposta hipertrófica.

1.4. A REGULAÇÃO DE MEF2

A regulação dos fatores MEF2 tem sido amplamente explorada nos últimos anos. Os fatores de transcrição MEF2 estão envolvidos na regulação da expressão gênica induzida pela hipertrofia em cardiomiócitos. Estudos recentes elucidaram complexos caminhos de sinalização que ligam a estimulação hipertrófica à ativação de MEF2 (HAN E MOKKENTIN, 2000; NADRUZ et al, 2003).

As MAPK quinases p38 e ERK5 estimulam a atividade de MEF2. Há quatro isoformas de p38 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) e cada uma fosforila resíduos no domínio de ativação

transcricional de MEF2, resultando num aumento da atividade de MEF2 (HAN E MOKKENTIN, 2000). A fosforilação de MEF2 por p38 foi vinculada à ativação do programa hipertrófico em cardiomiócitos (KOLODZIEJCZYK et al, 1999). A atividade de MEF2 também é regulada por ERK5, que se associa a MEF2 pelo domínio MADS Box (YANG et al, 1998) fosforilando o domínio de transativação de MEF2A, -C and -D, resultando numa atividade transcricional aumentada (YANG et al, 1998; KATO et al, 2000).

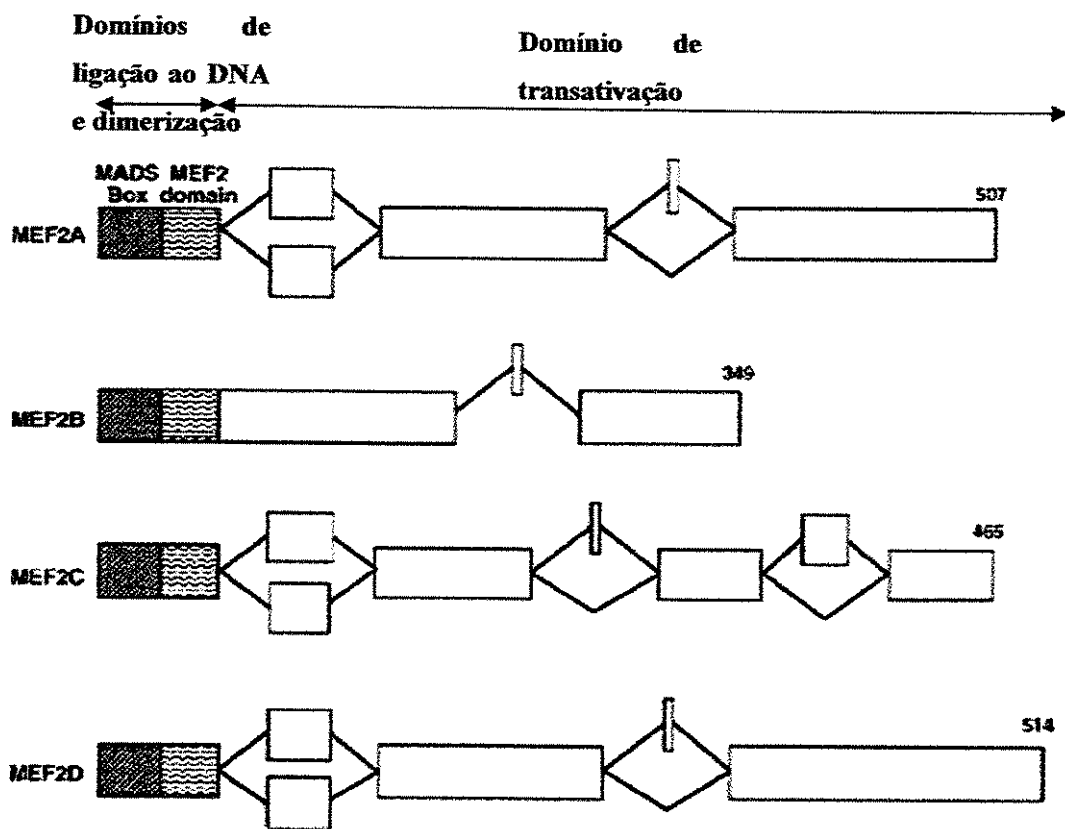


Figura 3. Representação esquemática dos fatores da família MEF2.

Estruturas dos 4 produtos de expressão dos genes MEF2 de vertebrados. Exons alternativos na região C-terminal estão indicados, assim como o número de aminoácidos da forma mais longa conhecida de cada proteína. (Figura modificada de BLACK & OLSON, 1998)

Os fatores MEF2 também são regulados por uma família de repressores transcricionais que incluem Cabin1 (também conhecida como Cain) (LAI et al, 1998), MEF2 interacting transcriptional repressor (MITR) (SPARROW et al, 1999; ZHANG et al, 2001) e HDAC4, -5 (McKINSEY et al, 2000).

Cabin1 foi recentemente identificada como uma proteína repressora transcricional de MEF2 que pode ser liberada de MEF2 de acordo com o influxo de cálcio na célula (LAI et al, 1998; HAN et al, 2003).

A ativação de genes músculo-específicos por fatores MEF2 está acoplada a acetilação de histonas no núcleo da célula. Essa ativação é inibida pelas Histonas Deacetilases de classe II, HDACs 4 e 5 que interagem com MEF2. A inibição causada pela HDAC4 e -5 em MEF2 só é neutralizada quando essas HDACs são fosforiladas pela Calmodulina quinase (CaMK), que então saem do núcleo, liberando MEF2 para ativar a expressão de genes músculo-específicos (CHAN et al, 2003; McKINSEY et al, 2000). Apesar da ausência da atividade de histona deacetilase, a proteína MITR apresenta homologia com esta família de proteínas e atua como um potente inibidor dos fatores MEF2 (SPARROW et al, 1999; ZHANG et al, 2001).

A atividade de ligação ao DNA de MEF2 aumenta em corações de ratos submetidos a sobrecarga mecânica. A rápida ativação de MEF2 por estímulo hipertrófico exerce um papel principal na ativação de *c-jun*, sugerindo sua importância na regulação da expressão de genes de resposta imediata por estímulo hipertrófico (NADRUZ et al, 2003).

2. OBJETIVO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2. OBJETIVO

Estudar a função e regulação de proteínas da família MEF2 em miócitos cardíacos durante o processo de desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por sobrecarga mecânica.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar os produtos dos genes *mef2 A-D* em miocárdio de ratos adultos.
2. Estudar a expressão e regulação dos membros da família MEF2 em miocárdio durante a sobrecarga mecânica.
3. Estudar as possíveis proteínas que interagem com o MEF2 e sua importância funcional.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COARCTAÇÃO DA AORTA

Foram utilizados ratos Wistar, machos, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), com pesos entre 140 e 200g e em torno de 6 semanas de idade.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg), colocados em mesa cirúrgica com temperatura controlada, submetido a intubação oro-traqueal e mantidos com ventilação espontânea em ar ambiente enriquecido com oxigênio. A artéria carótida comum direita foi cateterizada para monitorização da pressão da aorta ascendente e a artéria femoral direita cateterizada para monitorização da pressão arterial na aorta abdominal. A sobrecarga pressora foi induzida pela colocação de um clip de prata (50 μ m diâmetro interno) na crossa da aorta, após a saída do tronco braquiocefálico e antes da saída da carótida comum esquerda (Figura 4). A sobrecarga de pressão foi considerada satisfatória quando o “clamp” produziu um aumento de 40 a 50mmHg na pressão sistólica da aorta ascendente (mensurada através da artéria carótida direita) sem induzir a uma queda significativa nos níveis pressóricos da aorta abdominal (mensurada através da artéria femoral). Os animais que não atingiram esses parâmetros de pressão, foram descartados dos grupos.

Os procedimentos cirúrgicos nos animais submetidos à cirurgia fictícia, animais controle ou Sham, foram idênticos àqueles dos animais coarctados, exceto pela não colocação do clip de prata na crossa da aorta.

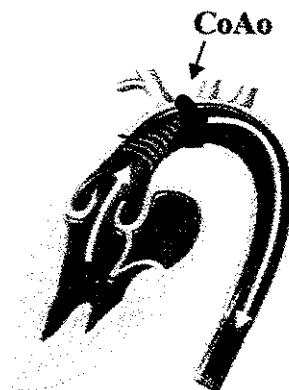


Figura 4. Esquema representativo da coarctação da aorta (CoAo) por implante de clip de prata

3.2. MONITORIZAÇÃO DAS PRESSÕES ARTERIAIS

Para os registros das pressões do ventrículo esquerdo e da aorta abdominal, os catéteres foram conectados a transdutores de pressão tipo *strain-gauge* (BLPR – *World Precision Instruments, Inc.*, USA), através de conectores construídos com tubo *Tygon* (*Norton Performance Plastics CO*, EUA.) preenchidos com salina e com comprimentos adequados para que os artefatos de transmissão da onda de pressão fossem eliminados ou minimizados. Os transdutores foram conectados a um amplificador de sinais (GP4A-*General Purpose Amplifier*, USA), que por sua vez, era conectado a um sistema de registro computadorizado de sinais biológicos *Windaq* (*Dataq Instruments Inc.*, Akron, OH, EUA) constituído de um conversor analógico-digital e uma placa processadora de sinais instalada em computador tipo PC (figura 5). Neste sistema, os sinais analógicos de pressão provenientes do amplificador foram digitalizados e reconvertidos em sinais analógicos em tempo real, o que permitiu a monitorização de pressão ventricular e da aorta abdominal. Simultaneamente, os dados digitalizados dos registros contínuos de pressão foram armazenados para análise quantitativa posterior das pressões. Em cada canal, o sinal

analógico de pressão proveniente do amplificador foi digitalizado com frequência de amostragem de 300Hz. A análise das ondas de pressão foi realizada com programa Windaq-Pro, determinando-se as pressões sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo e da aorta abdominal e frequência cardíaca. Estas variáveis foram determinadas através da detecção automática e correções manuais foram feitas sempre que artefatos das ondas de pressão determinavam a detecção automática espúria. Os valores destas variáveis utilizados para análises estatísticas foram os valores médios obtidos de todos os batimentos de períodos que variaram de acordo com a fase do experimento. O gradiente de pressão sistólica entre o ventrículo esquerdo e a aorta abdominal foi calculado dos valores médios de pressão sistólica do ventrículo esquerdo e da aorta abdominal de cada rato.

Após a determinação dos gradientes de pressão, os ratos foram sacrificados em diversos tempos após a constrição da aorta (1 a 6h) com injeção de solução de KCl 1M, via cânula introduzida na jugular e os ventrículos esquerdos foram retirados para processamento.

3.3. PREPARAÇÃO DE EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DO VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATO

Os ventrículos esquerdos foram coletados, cortados em fragmentos menores e homogenizados rapidamente em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização (1% Triton-X 100, 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2 mM PMSF, e 0.1 mg de aprotinina/ml) a 4 °C em homogenizador tipo Polytron PTA 20S (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos.

Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4 °C em centrífuga refrigerada por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi então utilizado para diferentes ensaios. A determinação da concentração proteína total foi realizada pela técnica do biureto, utilizando-se reagentes BIO-RAD e solução de albumina bovina como padrão.

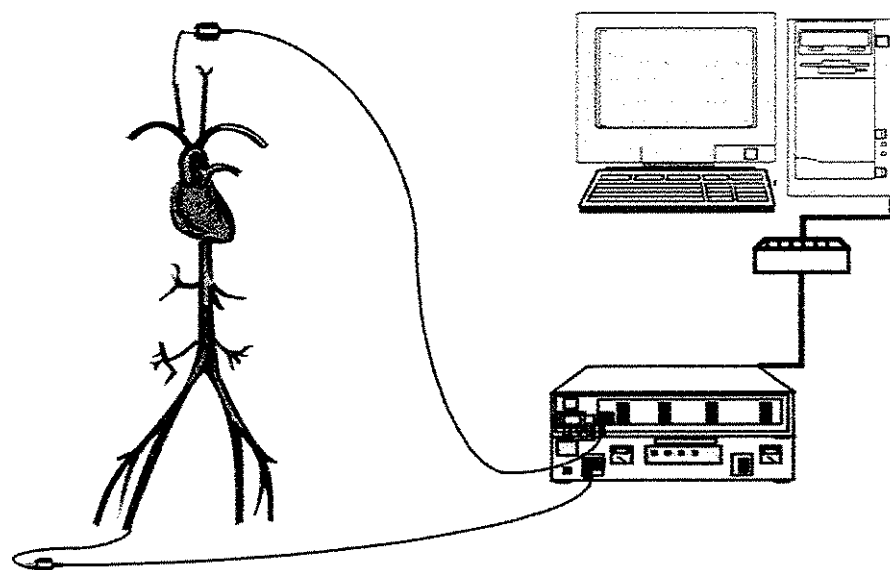


Figura 5. Esquema representativo do sistema de registro hemodinâmico.

3.4. ANÁLISE DO EXTRATO PROTÉICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Amostras de extratos protéicos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. A quantidades definidas de extrato protéico, metade do volume foi adicionado de tampão de amostra 2x (0,28 M Tris-HCl pH 6,8, 30 % Glicerol, 2,5% SDS, 5% Beta-mercaptoetanol e 0,002% azul de bromofenol). As amostras foram incubadas a 95° C por 5 min e centrifugadas por 3 min a 12000 x g antes de serem carregadas no gel. A eletroforese foi executada à temperatura ambiente, a 100 V e a uma amperagem máxima de 100 mA em tampão de eletroforese (25 mM Tris Base, 192 mM Glicina e 1% SDS).

3.5. WESTERN BLOT

As proteínas provenientes de lisados bacterianos, extratos totais, suspensões de pérolas de sefarose ou de imunoprecipitados foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 5% de β -mercaptoetanol e aquecidas a 94°C por 5 minutos.

Após este procedimento, as proteínas foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese Bio-Rad miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para as membranas de nitrocelulose foi realizada em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad em condições de 120 V, a 4°C em tampão de transferência (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina e 20% metanol por 90 min ou em *Semi-Dry Blotting System* (The W.E.P. Company) por 30 min, com corrente de 3mA/cm² de membrana. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20), por 1 hora a temperatura

ambiente e incubadas com os anticorpos específicos, diluídos em tampão de bloqueio (3% de leite em pó magro ao invés de 5%) por mais 12 horas à 4°C. Após a lavagem por 15 minutos em tampão de bloqueio sem leite em pó, as membranas foram incubadas, quando necessário, com anticorpo Bridge 1:5000 e depois com 2 µCi de [¹²⁵I]proteína A (30 µCi/µg) em 10 ml de tampão de bloqueio por 4 horas a temperatura ambiente e então lavadas novamente como descrito anteriormente. A [¹²⁵I]Proteína A ligada aos anticorpos específicos foi detectada por auto-radiografia em filme Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Os sinais também foram visualizados com o uso do *Western Blotting Luminol Regent* (Santa Cruz Biotechnology). Neste caso, foi utilizado um anticorpo secundário conjugado com peroxidase numa concentração de 1:3000 a 1:5000 e os procedimentos para a etapa final foram feitos de acordo com as especificações do fabricante. As membranas foram expostas em Hyperfilm-MP (Amersham) por diferentes intervalos de tempo (30s-10min) e estes foram então revelados.

3.6. IMUNOPRECIPITAÇÃO

A imunoprecipitação foi realizada pela adição de 20µl do anticorpo anti-MEF2 rabbit (Santa Cruz) a quantidades normalizadas de extrato proteico total de ventrículo esquerdo (VE) de rato controle e submetido a 6h de coarctação da aorta seguindo uma incubação de 12 h, a 4° C com agitação. Após o término do período de incubação, foram adicionados 40µl de Protein A Sepharose 6 MB (Amersham), seguido de mais 2 horas de incubação a 4° C. Os tubos contendo os extratos foram então centrifugados a 4000 rpm, por 5 minutos e as pérolas de Proteína A sefarose foram lavadas 3x com HNE + inibidores de proteases + 1% de Triton X (25mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM fluoreto de sódio,

10mM pirofosfato de sódio, 10 mM ortovanadato de sódio, 00.1 mg/ml aprotinina e 2 mM PMSF). Após a última lavagem, 40 µl de solução de Laemmli foi adicionada a cada amostra e estas foram aquecidas a 94° C por 5 min. As amostras foram então centrifugadas brevemente e aplicadas num gel de poliacrilamida 10% e as proteínas foram analisadas por Western blot.

3.7. LINHAGENS DE BACTÉRIA E LEVEDURA UTILIZADAS

E. coli DH5a

E. coli BL-21 (RIL) Códon Plus

S. cerevisiae L40

3.8. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

As seqüências polipeptídicas de MEF2 humano e murino foram escolhidas nos bancos de dados Genbank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e TRANSFAC (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/>). O alinhamento das seqüências foi feito com os programas CLUSTAL W (<ftp://ftp.eb.ac.uk/pub/software/unix.clustalw/>) e Dialign 2 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#dialign2>). A montagem do alinhamento das seqüências foi feita com o programa BOXSHADE (<http://www.ch.embnet.org/software/boxform.html>).

3.9. SÍNTESE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Oligonucleotídeos foram desenhados a partir da análise das seqüências das regiões 5' e 3' de cDNA de Mef2 de camundongo (NCBI Nr. Ac.: NM_025282) e das seqüências

das regiões de policlonagem dos vetores utilizados. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Gibco-BRL e as características básicas de cada um desses oligonucleotídeos se encontram resumidas na Tabela I.

Nome do oligonucleotídeo	seqüência	Tm (°C)	Uso
SP2CD	5'CCGAAGCTTGCCAGCACCGA CATGGAC3'	61 °C	Amplificação de cDNA Mef2c e Mef2d
AP2C	5'CGGGATCCTCAGTTACCAGG TGAGAC3'	58°C	Amplificação de cDNA Mef2c
MEFCS1	5'CAGGATCCGTATGGGGAGAA AAAAGATT3'	53°C	Amplificação de cDNA Mef2c
MEFCS2	5'ACGGATCCGTCTCACCCAC GCACTGAA3'	61°C	Amplificação de cDNA Mef2c
MEFCAS2	5'GTGGATCCTCATGTTGCCCAT CCTTCAGA3'	61°C	Amplificação de cDNA Mef2c
MEFCAS1	5'TCGGATCCTCATCCCAACTGA CTGAGGGC3'	58°C	Amplificação de cDNA Mef2c
AW2A	5'- GCGAATTCTTAGGTCACCCATG TGTC-3'	56°C	RT-PCR de MEF2A
SP2A	5'- CCGCTCGAGGCCAGCACCGAC ATGGAC-3'	57°C	RT-PCR de MEF2A
MEFDAS2	5' GCGAATTCTCACTTTAATGTCC A-3'	54°C	RT-PCR de MEF2D
SWXO	5'- CCGCTCGAGATGGGGAGGAAA AAGATT-3'	56°C	Amplificação região N-terminal fatores MEF2
SWHI	5'- CCGAAGCTTATGGGGAGGAAA AAGATT-3'	53°C	Amplificação região N-terminal fatores MEF2
AP2B	5'- CGGGATCCTCACAGGCCACCA GGCAG-3'	62°C	Amplificação de cDNA Mef2b
SMART II	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGC GTGGCCATTATGGCCGGG3'	66°C	Construção da biblioteca de cDNA
MATCH- MAKER 3' AMPLIMER	5' GTATCGATGCCACCCTCTAGA GGCCGAGGCGGCCGACA 3'	70°C	Construção da biblioteca de cDNA
MATCH-	5'	62°C	Construção da

MAKER 5' AMPLIMER	TTCCACCCAAGCAGTGGTATCA ACGCAGAGTGG3'		biblioteca de cDNA
LEXASEQ	5'CTTCGTCAGCAGAGC3'	48°C	Sequenciamento de pBTM116, PCR de colônia.
MEFDAS2	5' GCGAATTCTCACTTTAATGTCC A-3'	54°C	RT-PCR de MEF2D
S-B-actina	5'GCTTCTCCTTAATGTCACGCA CGA3'	52°C	Controle RT-PCR
As-B-actina	5'TTCTACAATGAGCTGCGTGTG GCT3'	52°C	Controle RT-PCR
LEXASEQ	5'CTTCGTCAGCAGAGC3'	48°C	Sequenciamento de pBTM116, PCR de colônia.
T7	5'GTAATACGACTCACTATAGG GC-3'	48°C	Sequenciamento pGADT7rec
Oligo dT30	5'ATTCTAGAGGCCGAGGCGGC CGACATGTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTVN 3'	61°C	Síntese de cDNA (fita simples)
PGADT7SEQA SII	5'AGATGGTGCACGATGCACAG 3'	49°C	Sequenciamento pGADT7rec
PGADT7SEQA SI	5'CTGCAGCTCGAGGTCGAT3'	47°C	Sequenciamento pGADT7rec
PolidT	5'TTTTTTTTTTTTAA3' 5'TTTTTTTTTTTTAC3' 5'TTTTTTTTTTTTAG3' 5'TTTTTTTTTTTTCA3' 5'TTTTTTTTTTTTCC3' 5'TTTTTTTTTTTTCG3' 5'TTTTTTTTTTTTGA3' 5'TTTTTTTTTTTTGC3' 5'TTTTTTTTTTTTGG3'	42°C	Síntese de cDNA (fita simples)

Tabela I. Sequência dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados no RT-PCR, PCR de colônia e construções do cDNA. Tm representa a temperatura de anelamento utilizada.

3.10.VETORES UTILIZADOS

Plasmídeos específicos foram utilizados nas clonagens realizadas (Figura 6):

A) O vetor pGEM™ -t-easy (Promega) foi utilizado para facilitar as primeiras clonagens dos produtos de PCR de Mef2c. Este vetor tem 2900 bp e confere resistência à ampicilina.

B) O vetor de expressão de levedura pBTM116 (FIELDS e BARTELI) de 5514 bp, contém a sequência codificante do domínio de ligação ao DNA (BD) da proteína Lex A, sob o controle do promotor ADHI. Este vetor confere resistência à kanamicina e prototrofia ao triptofano

C) O vetor de expressão em levedura pGADT7rec (Clontech) de 6600 bp contém a sequência codificante do domínio de ativação GAL4 sob o controle do promotor ADHI. Este vetor confere resistência à ampicilina e prototrofia à Leucina.

D) O vetor pGEX™5X-2 (Pharmacia) é um vetor de expressão de *E. coli* com 4900 bp. Seu promotor é o lac I, induzível por IPTG. Possui a sequência codificante da Glutathione-S-Transferase (GST) confere resistência à ampicilina.

E) O vetor de expressão em *E. coli* pET28a (Novagen) possui uma sequência que adiciona 6 histidinas (6xHIS) na região C-terminal da proteína de fusão. Possui 5369 pb e seu promotor T7 é induzível por IPTG. Confere resistência à Kanamicina.

3.11. EXTRAÇÃO DE RNA

Para extração de RNA dos tecidos, o reagente Trizol® (Life Technologies) foi utilizado numa proporção de 1 ml de Trizol® para cada 100 mg de tecido. O tecido foi homogeneizado com Trizol® com auxílio de Politron e incubado a temperatura ambiente, por 5 min, para permitir a dissociação total dos complexos nucleoprotéicos. (Nos seguintes passos, todos os volumes utilizados são referentes a 1 ml de Trizol® inicial). Um volume de 0,2 ml de clorofórmio foi adicionado à mistura e agitado vigorosamente em um tubo, seguindo uma incubação de 3 min à temperatura ambiente e centrifugação a 12000 x g por 15 min a 4°C para separação de fases. O RNA presente na fase aquosa foi precipitado pelo acréscimo de 0,5 ml de isopropanol e incubação à temperatura ambiente por 15 min. A suspensão foi então centrifugada a 12000 x g por 10 min à 4°C, formando um precipitado de RNA gelatinoso no fundo do tubo. O precipitado de RNA foi lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e dissolvido em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA foi quantificado por espectrofotometria ($\lambda=260$ nm) e submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, em condições desnaturantes, para avaliação qualitativa das amostras.

3.12. ELETROFORESE DE RNA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

A qualidade do RNA extraído foi analisada por eletroforese de 5 a 20mg de RNA total dissolvidos em 11 µl de água, adicionados de 5 µl de tampão de corrida MOPS 10x (Ácido 3-N-morfolino-propanosulfônico 0,4 M pH 7; Acetato de sódio 0,1 M e EDTA 0,01 M), 9 µl de formaldeído 12,3 M, 25 µl de formamida deionizada e 10µl de tampão de aplicação (EDTA 1mM, Azul de bromophenol 0,25%, Xilenocianol 0,25%, Glicerol 50% e Brometo de etídeo 0,2mg/ml). A solução foi misturada com auxílio de vortex e incubada a

60° C por 20 min. Após breve centrifugação, as amostras de RNA foram aplicadas em um gel de agarose em condições desnaturantes (Agarose 1%, Tampão de corrida MOPS 1x, Formaldeído 2,2 M) e submetidas a eletroforese a 80 V por aproximadamente 3 h (AUSUBEL, 1997).

3.13. DESCONTAMINAÇÃO DO RNA

Para excluir a presença de DNA genômico da amostra de RNA, após a extração, o RNA foi tratado com 0,5 U/ μ g de DNase I (Life Technologies), em presença de 8 mM de $MgCl_2$, 20 U de RNasin (Promega), 500 mg/ml de BSA (Albumina Sérica Bovina), 20 mM Tris-Cl pH 8,4 e 50 mM KCl por 30 min a 37° C. Para inativar a DNase, foi adicionado EDTA a uma concentração final de 2mM e a solução foi incubada a 65° C por 10 min.

3.14. SÍNTESE DE cDNA PARA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

Nesta etapa, uma fita simples de cDNA foi sintetizada pela reação de transcrição reversa catalisada pela enzima Transcriptase Reversa. Nessa reação, 1 μ g de RNA foi misturado com 5 pmol da mistura de oligonucleotídeos sintéticos PolidT(12-18) (tabela I) num volume final de 15, 5 μ l. A mistura foi incubada por 10 min a 70 °C para desnaturar o RNA. Ao término da incubação, foram adicionados os seguintes reagentes: 20 mM Tris-CL (pH 8.4), 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs e 400 U de Transcriptase Reversa Superscript TM II (Life Technologies), a mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada a 42°C por 60 min. A reação foi então bloqueada por desnaturação da enzima a 70° C por 15 min. Após a síntese da fita simples de cDNA, o

RNA inicial foi degradado pelo acréscimo de uma mistura 1: 1 de RNase H e RNase A, seguindo incubação a 37°C por 30 min. O cDNA sintetizado foi purificado com auxílio do “kit Quiaquick Nucleotides Removal” (Quiagen), segundo instruções do fabricante.

3.15. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA (PCR)

Nesta etapa, foi feita a amplificação do cDNA com os oligonucleotídeos gene específicos sense e antisense, a partir do cDNA de fita simples obtido na etapa anterior. A composição final da reação foi: 20 mM Tris-HCL (pH8.4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 pmol primer sense, 20 pmol primer antisense, 200 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 µl do produto de reação final de amplificação da etapa anterior e 2 U de Taq DNA polimerase. A técnica de “hot start” (todos os reagentes são equilibrados a 94°C antes do início da reação) foi utilizada e as reações foram submetidas ao seguinte ciclo: uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de uma etapa de desnaturação por 1 min a 94°C, uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos por 2 min a uma temperatura avaliada para cada par de oligonucleotídeos, e uma etapa de alongamento por 2 min a 72°C.

3.16. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

Os produtos de amplificação por PCR e os DNAs digeridos com enzima de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a concentrações entre 0.8% e 1.2% para avaliação de tamanho, quantidade e qualidade das amostras. As eletroforeses foram corridas a 80 V (volts) em tampão TAE (40 mM tris-HCl, pH 8.0 e 1 mM EDTA, pH 8.0). Os géis

foram corados em solução contendo brometo de etídio a concentração final de 1 µg/ml e fotografados. Os fragmentos de interesse contidos nos géis foram purificados com o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

3.17. REAÇÕES DE LIGAÇÃO PARA CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE cDNA EM VETOR

Após a purificação, os produtos de PCR digeridos foram ligados no vetor utilizando a enzima T4 Ligase de acordo com as instruções do fabricante. As reações de ligação pela subclonagem de insertos de DNA foram realizadas de acordo com a metodologia descrita em AUSUBEL et al, (1995).

3.18. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS E MINI-PREPARAÇÃO DE DNA DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos contendo insertos de cDNA foram introduzidos na cepa competente de *E. coli DH5a* pela técnica de choque térmico segundo SAMBROOK et al, (1989).

Também foi utilizada a técnica de eletroporação. Nesta técnica, as bactérias competentes são preparadas por inúmeras lavagens com uma solução 10% de glicerol estéril e gelada. Para a transformação, foram misturados numa cubeta de eletroporação, o DNA e a bactéria competente, sendo as condições do choque acertadas em 2,5 kV, 25 µF e 700 Ohms. Um choque foi dado por cubeta e 800 µl de meio de cultura SOC foi adicionado ao tubo. As bactérias eletroporadas foram então incubadas à 37°C por 40 min com agitação constante e plaqueadas em meio seletivo após o término da incubação.

Os DNAs provenientes de plasmídeos foram preparados através da técnica de mini-preparação de DNA de que utiliza a lise alcalina de bactérias descrita por AUSUBEL et al, (1995) e SAMBROOK et al, (1989).

3.19. IDENTIFICAÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES POR PCR DE COLÔNIA E DIGESTÃO DE DNA

Após a construção da fase codificante dos diferentes cDNAs de Mef2c no vetor pBTM116, a cepa *DH5a* de *E. coli* foi transformada com estas diferentes construções. Para testar as colônias transformadas que cresceram no meio, foi utilizado o método de PCR de colônia. Esse método utiliza um oligonucleotídeo sense do plasmídeo e um oligonucleotídeo antisense gene específico (vide Tabela I).

Cada colônia foi tocada com uma ponteira estéril e ressuspendida em 20 µl de água destilada num tubo de 0,5 ml. Cada tubo foi então aquecido a 95°C por 10 min para lisar as células e inativar a DNase intrínseca. Após essa incubação, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 1 min. A 15 µl do sobrenadante foram adicionados 35 µl de mistura pré-PCR, a uma concentração final de: 10pmol do oligonucleotídeo sense, 10 pmol do oligonucleotídeo antisense, 1,5 mM MgCl₂, 5 µl de tampão de PCR (Gibco), 0,2 mM de cada dNTP e 1 U de Taq polimerase (Gibco). A reação de PCR começou com uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a presença do vetor recombinante na bactéria hospedeira.

Após a seleção por PCR de colônia, foi necessário testar o DNA recombinante com enzimas de restrição, pois sendo PCR uma técnica muito sensível, pode haver contaminação

de DNA não ligado nas placas, levando a resultados falsos positivos. Assim, os clones positivos foram inoculados em meio de cultura LB líquido (10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura e 10 g/l de NaCl, pH 7,5) com 50 mg/ml de Kanamicina e incubados a 37°C por 12 horas. O DNA dos plasmídeos foi extraído e digerido com enzimas de restrição que liberassem fragmentos de tamanho conhecido, que foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

3.20. SEQUENCIAMENTO DE DNA

A seqüências das construções de pBTM116 e pGADT7-rec foram obtidas por seqüenciamento baseado na técnica de Sanger (SANGER et al, 1977), utilizando-se um seqüenciador de DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Reações de amplificação em cadeia (PCR) foram feitas utilizando-se 200 a 800ng dos DNAs plasmídeos. Em cada uma das reações o oligonucleotídeo LexASeq (Tabela I) foi utilizado na concentração final de 5.0 pmol. As reações foram preparadas de acordo com a metodologia contida no manual de instruções do fabricante do DNA Sequencing kit *Big Dye* (*Terminator Cycle Sequencing Read Reaction* - PE, Applied Biosystem).

3.21. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As seqüências obtidas foram submetidas ao banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e analisadas através dos programas gratuitos encontrados no mesmo site da rede: ORF Finder, BLAST e Clustal W.

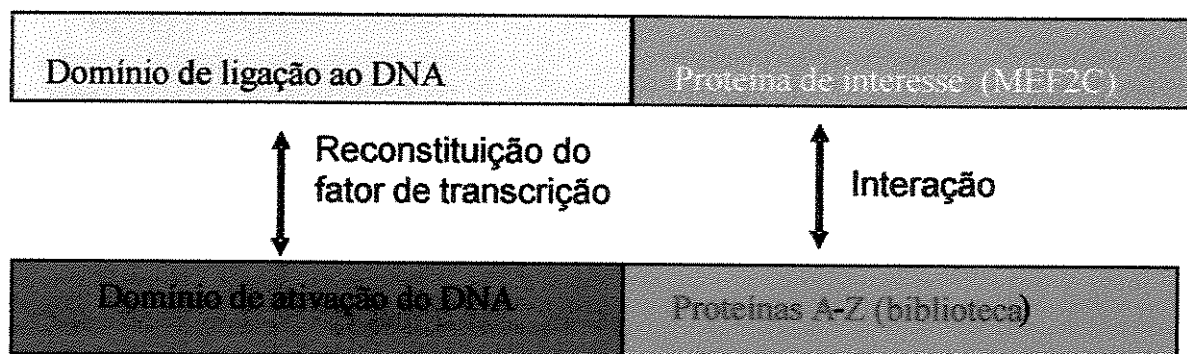
3.22. SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURA

O sistema de duplo-híbrido em levedura é uma poderosa metodologia que foi desenvolvida para identificar genes que codificam proteínas que estão associadas uma proteína alvo *in vivo*. As interações proteína-proteína formam a base da ampla variedade de reações bioquímicas e a identificação de proteínas que interagem com a proteína de interesse, é um aspecto essencial para a elucidação do funcionamento e da regulação da mesma. Além de identificar as interações protéicas, este sistema pode também ser usado para definir domínios ou resíduos de aminoácido que estão envolvidos ou são necessários para a interação. A base para o sistema de duplo-híbrido em levedura está na estrutura de um fator de transcrição particular que tem dois domínios fisicamente separados: o domínio de ligação de DNA e o domínio de ativação da transcrição (KEEGAN et al, 1986; MA e PTASHNE, 1987). O domínio da ligação de DNA se liga a uma sequência promotora específica de um gene repórter enquanto que o domínio de ativação atrai os componentes críticos do complexo de iniciação da transcrição. No sistema de duplo-híbrido em levedura, a proteína de interesse é fusionada ao domínio de ligação de DNA, enquanto uma biblioteca de cDNAs – codificando as proteínas potencialmente interativas a serem identificadas – é fundido ao domínio de ativação de transcrição (Figura 7). Se ocorrer uma interação entre a proteína de interesse e uma proteína interativa da biblioteca um fator de transcrição funcional completo é reconstituído e o "gene repórter", que esta sob seu controle, será ativado para expressar um marcador identificável, como a enzima β -galactosidase, por exemplo (MA e PTASCHNE, 1988). Nos clones onde ocorreu esta interação, há a formação de um corante azul através da reação enzimática da β -galactosidase. Assim, os clones que crescerem e se tornarem azuis serão considerados como clones potenciais que

possuem o plasmídeo da biblioteca de cDNA que codifica uma proteína que interage com MEF-2. Muitos destes clones serão escolhidos, seus plasmídeos serão isolados e transformados em *E. coli* DH5 α . O plasmídeo recombinante isolado de *E. coli* será então seqüenciado.

As seqüências de DNA obtidas identificarão, por comparação em bancos de dados, as prováveis proteínas que interagem com MEF2.

A)



B)

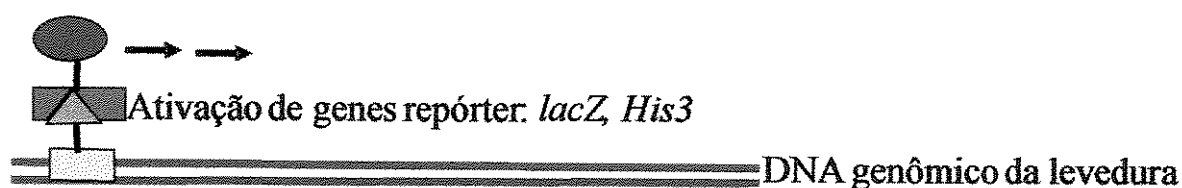


Figura 7. Representação esquemática do princípio do sistema de duplo híbrido em levedura.

A) Reconstituição do fator de transcrição da levedura B) Ativação de genes repórter quando houver interação de proteínas.

3.23. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DE CORAÇÃO DE RATO POR RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURA

Uma biblioteca de cDNA de coração de rato coarctado por 6h foi produzida por recombinação em levedura. Para isso, foi extraído RNA de um "pool" de ventrículo esquerdo de três animais coarctados. A partir deste RNA total, cDNA de fita simples foi sintetizado utilizando os oligonucleotídeos Oligo d(T) e Random segundo método já descrito. Para a síntese de cDNA da biblioteca, foi utilizada a tecnologia SMART (*Switching Mechanism at 5'end of RNA Transcript*) da empresa Clontech. As diferenças da síntese de cDNA fita simples para geração da biblioteca são basicamente duas: a primeira é a utilização da enzima Transcriptase Reversa de Vírus de Leucemia Murina Moloney (MMLV-RT). Esta enzima possui atividade de terminal transferase e adiciona algumas deoxicitidinas à extremidade 3' do cDNA fita simples. A segunda diferença foi o acréscimo do oligonucleotídeo SMART III™ à reação de síntese. Este oligonucleotídeo apresenta uma sequência rica em G na sua extremidade 3', pareando com a extremidade rica em C. Assim o cDNA fita simples sintetizado teve sua sequência flanqueada por dois oligonucleotídeos com regiões específicas para ancoramento de outros primers e clonagem. Na figura 8, se encontra demonstrado um esquema do método.

O cDNA fita simples foi amplificado por Long Distance PCR com a utilização do kit Advatage®2 PCR (Clontech) seguindo as instruções do kit Matchmaker Library Construction and Screening. Os oligos utilizados, 5'PCR primer e 3'PCR primer se anelaram nas extremidades 5'e 3' do cDNA fita simples. O ciclo programado no termociclador foi o seguinte: 95°C por 30 s, mais 20 ciclos de 95°C 10 s e 68°C por 6 min (+ 5 s por ciclo) e um período de elongação de 5 min a 68°C.

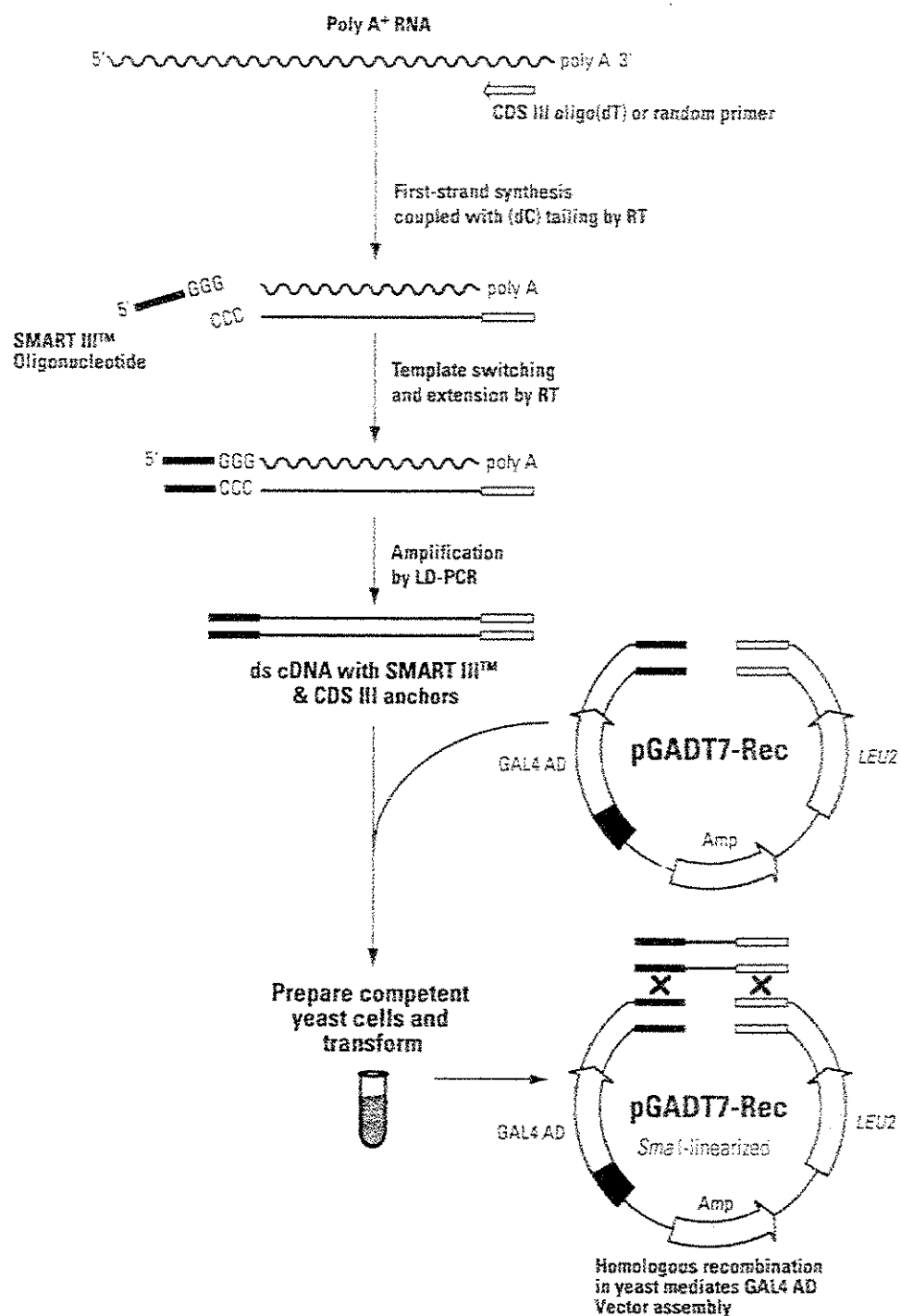


Figura 8. Representação esquemática da síntese de cDNA e clonagem da biblioteca no vetor pGADT7rec por recombinação *in vivo*. (Manual Clontech modificado).

Terminada a reação de amplificação, o cDNA dupla fita foi então purificado em uma coluna ChromaSpin TE-400 (Clontech) seguindo instruções do fabricante. Este passo é importante para selecionar moléculas de cDNA maiores que 200 pares de bases.

O cDNA de VE de coração de rato amplificado e purificado em coluna foi clonado, por recombinação *in vivo*, no vetor pGADT7rec. Para isso, a cepa *L40* de *Sacharomyces cerevisiae* foi co-transformada com os cDNAs dupla-fita purificados provenientes do coração de rato mais o vetor de expressão pGADT7-rec linearizado com a enzima *Sma* I. A seleção dos clones foi nutricional e após a transformação, as células de levedura foram plaqueadas em meio SD-L. As enzimas reparadoras da levedura restabeleceram a forma circular do plasmídeo por recombinação de seqüências nas extremidades do cDNA com seqüências homólogas localizadas nas extremidades do vetor pGADT7rec linearizado (Figura 9). O resultado é o vetor de expressão pGADT7-rec funcional com o domínio de ativação GAL4 fundido, individualmente a cada cDNA da biblioteca.

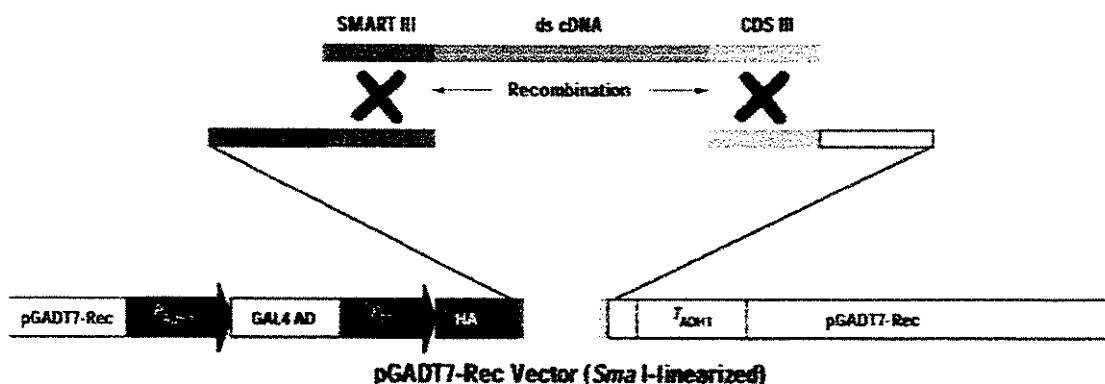


Figura 9. Representação esquemática da recombinação das seqüências homólogas do cDNA dupla-fita com o vetor pGADT7-rec (Clontech).

3.24. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS

Para a produção das células competentes frescas, 1ml de meio YPD (20 g/l Peptona, 10 g/l extrato de levedura) foi inoculado com algumas colônias, homogeneizado e diluído em um volume de 50 ml de meio YPD. Esta cultura foi incubada por toda noite a 30°C e 250 rpm até atingir a fase estacionária. A cultura foi vertida em um frasco Erlenmeyer contendo 300 ml de meio YPD novo a 30°C e incubada, com agitação, até atingir a fase logarítmica ($OD^{600} = 0,5 \pm 0,1$). As células foram então centrifugadas a 1000g por 5 minutos, lavadas em TE 1X (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 7.5) e centrifugadas novamente a 1000g por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram re-suspendidas em 1X TE/LiAc (0.1M acetato de lítio pH 7.5/10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 7.5) e mantidas a temperatura ambiente até seu uso.

Para a transformação da biblioteca de cDNA em leveduras, foi utilizado o equivalente a 200 µl em volume dos produtos PCR de cDNA de VE de rato purificado (DNA-BD - isca), 40 µg do vetor pGADT7rec (AD- presa) e 100 µg do DNA carregador de esperma de salmão. 600 µl de células competentes frescas foram adicionadas e homogeneizadas com o DNA. A solução de transformação PEG/LiAc (0.1M LiAc pH 7.5; PEG 3350 50%) também foi adicionada e homogeneizada às células competentes, seguindo de incubação a 30°C, a 200 rpm por 30 minutos. As células foram então expostas ao choque térmico por 15 min a 42°C após a adição de DMSO. Depois foram centrifugadas por 5 minutos a 1000g, e ressuspendidas em 10 ml de solução TE (10 mM Tris pH 7,5 e 5 mM EDTA), plaqueadas em meio SD-L (6,7 g/l de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 20g/l de agar bacteriológico, 2% de glicose, 20 mg/l de hemissulfato de L-

Adenina, 20 mg/l de monohidrato de L-Histidina, 20 mg/l de L-Metionina, 20 mg/l de L-Triptofano e 20 mg/l de L-Uracil) e incubadas a 30°C por 72h. A partir de 72h, as colônias foram contadas em placas onde foram aplicadas diluições da transformação original. Depois, as placas foram resfriadas a 4°C e 5 ml de SD-L líquido + 10% glicerol foi adicionado a cada placa que teve suas colônias imediatamente raspadas e homogeneizadas neste meio. Os meios de todas as placas mantidos a 4°C foram misturados e aliquoteados. As alíquotas foram congeladas a -80°C.

3.25. TRIAGEM DE DUPLO-HÍBRIDO

Para a triagem ou “screening” de duplo-híbrido, as leveduras *L40* pré-transformadas com o cDNA do vetor pGADT7rec (Biblioteca de cDNA), mantidas congeladas em meio SD-L com 10% de glicerol foram novamente transformadas com a construção pBTMEF2C(1-169). Para isso, uma alíquota de 1 ml da biblioteca de cDNA foi inoculada em 50 ml de meio SD-L e incubada a 30°C com agitação constante por 16 horas. Após a incubação, 10 ml dessa alíquota foi inoculada em 300 ml de meio SD-L para a produção de células competentes da biblioteca, conforme já foi descrito anteriormente. 50 µg do plasmídeo pBTMEF2C(1-169) foi adicionado à transformação e as células foram plaqueadas em 40 placas de SD-L-W-H (6,7 g/l de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 20g/l de agar bacteriológico, 2% de glicose, 20 mg/l de hemissulfato de L-Adenina, 20 mg/l de L-Metionina e 20 mg/l de L-Uracil) + 10 mM 3-AT (3-Aminotriazol – substância inibidora da síntese de histidina utilizada para diminuir a incidência de colônias falsas positivas). Após 3 a 5 dias de incubação a 30°C, as colônias que apresentaram

crescimento superior às colônias de "background" foram isoladas para o teste de β -galactosidase.

3.26. ENSAIO DE β -GALACTOSIDASE

Após a seleção em meio sem histidina, os clones de levedura co-transformados foram crescidos em placas de meio SD-L-W (6,7 g/l de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 20g/l de agar bacteriológico, 2% de glicose, 20 mg/l de hemissulfato de L-Adenina, 20 mg/l de monohidrato de L-Histidina, 20 mg/l de L-Metionina e 20 mg/l de L-Uracil) e transferidos para uma membrana de nylon ou papel de filtro whatmann nr.1 por contato. A membrana foi congelada em nitrogênio líquido para lisar as células. Em seguida, a membrana foi incubada a 37°C por 90 min, sobre um outro papel de filtro previamente umedecido com 3 ml de tampão Z (87 mM Na_2HPO_4 , 47 mM NaH_2PO_4 , 19 mM KCl, 1.38 mM MgSO_4) contendo 100 μl de solução de X-gal 20 mg/ml e 16 μl de uma solução de β -mercaptoetanol 1 M. Ao término do período de incubação, a membrana foi seca e o resultado visualizado. O resultado foi considerado positivo quando houve aparecimento da cor azul referente às colônias lisadas positivas.

3.27. MINI-PREPARAÇÃO DE DNA DE LEVEDURA

Colônias de levedura que cresceram em meio SD-L-W-H (6,7 g/l de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 20g/l de agar bacteriológico, 2% de glicose, 20 mg/l de hemissulfato de L-Adenina, 20 mg/l de L-Metionina e 20 mg/l de L-Uracil) e se apresentaram positivas para teste de β -galactosidase em papel foram inoculadas em meio SD-L e incubadas a 30°C por 48-72 h com agitação constante. 1 ml dessa cultura foi

centrifugada num tubo eppendorf a 14000 rpm por 1 min numa microcentrífuga. O precipitado de leveduras foi ressuspendido em 50 µl de meio e adicionado de 50 a 100 U da enzima liticase para lisar a parede celular. As leveduras foram então incubadas a 37°C por 1h sob agitação constante. Ao término da incubação, 10 µl de uma solução SDS 20% foi adicionada ao tubo e as células de levedura foram vortexadas por 1 min. Para ajudar a romper a parede celular das leveduras, 4 ciclos de congelamento/descongelamento foram feitos. O volume do lisado celular foi então elevado a 200 µl com TE e o DNA foi extraído com 200 µl de mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) após intensa agitação no vortex e centrifugação a 14000 rpm por 10 min. Cada sobrenadante foi transferido para um tubo novo contendo 600 µl de etanol absoluto e 10 µl de solução 8 M de cloreto de lítio. Para precipitar melhor o DNA, os tubos foram previamente incubados a -80°C por 30 min e centrifugados a 14000 rpm por 10 min. O sobrenante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e seco. O precipitado de DNA foi então ressuspendido em 10µl de água. 2µl desse DNA ressuspendido foi utilizado para transformar *E. coli* por eletroporação.

3.28. CONSTRUÇÕES DE cDNA PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

O cDNA de Ki-1/57 humano foi amplificado em reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos pGEXKiBam (5'- CGCGGATCCATGAAGGGCGCTCTGGGAGTC – 3') e KiEcoAS (5'-GCGAATTCTCAAGACAGCGCAGGGAAATC-3'. O produto de PCR foi digerido com as enzimas *Eco RI* e *Bam HI* e clonado no vetor de expressão pGEX2T (Amersham) gerando a construção denominada pGEX2TKi-1/57 (esta construção foi cedida pelo Dr. Jörg Kobarg).

O cDNA mef2c(1-169) da construção pBTMEF2C(1-169) foi digerido com *Bam* HI e subclonado no vetor pGEX5x-2 previamente digerido com *Bam* HI, defosforilado e purificado gerando a construção denominada pGEXMEF2C(1-169). Após a transformação da ligação em *E. coli* DH5 α , os clones positivos foram selecionados por digestão e a determinação da orientação do cDNA na construção foi feita por PCR de colônia.

3.29. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Construções de cDNA em vetores de expressão pGEX5X-2 e pGEX2T foram transformadas por choque térmico na cepa *BL-21 (RIL) Códon Plus* de *E. coli*. Três colônias positivas de cada construção foram inoculadas em 50 ml de meio 2YT (16g/l de extrato de peptona, 10 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de NaCl) com 25 μ g/ml de cloranfenicol e 50 μ g/ml de ampicilina. O pré-inóculo foi incubado a 37°C, a 200 rpm durante à noite. No dia seguinte, 40 ml do pré-inóculo foi diluído em 1l de meio de cultura novo e incubado à 37°C, a 200 rpm de agitação até a Densidade óptica a 600 nm atingir 0,65 (fase logarítmica). A indução da expressão foi feita pelo acréscimo de 0,5 a 2 mM de IPTG (IsoPropil tio- β -galactosídeo) à cultura. A expressão de bactérias transformadas com as construção pBTMEF2C(1-169) foi induzida por 4 h à 30°C. Já bactérias transformadas com as construções pGEX2TKi-1/57 e o vetor pGEX5X-2 foram induzidas, com agitação constante, por 4 h a 37°C após a adição de 1 mM IPTG .

3.30. ANÁLISE DO EXTRATO BACTERIANO EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Amostras do extrato bacteriano induzido ou não foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Ao precipitado bacteriano, equivalente a 1 ml de cultura, foi adicionado 100 µl de tampão de amostra (0,28 M Tris-HCl pH 6,8, 30 % glicerol, 2,5% SDS, 100mM ditiotreitol e 0,002% azul de bromofenol). As amostras foram incubadas a 95°C por 5 min, submetidas a 3 pulsos de 15s de sonicação e centrifugadas por 1 min a 12000 x g antes de serem carregadas no gel. A eletroforese foi executada à temperatura ambiente, 100 V e a uma amperagem máxima de 100 mA em tampão de eletroforese (25 mM Tris Base, 192 mM Glicina e 1% SDS). Ao término da eletroforese, os géis foram corados com solução corante de proteínas (54% álcool etílico, 13,5% ácido acético glacial e 0,27% azul de Coomassie) por aproximadamente 30 min e foram descorados em solução descorante (10% álcool etílico e 5% de ácido acético glacial) até a visualização satisfatória das bandas protéicas.

3.31. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As bactérias foram precipitadas por centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C e o precipitado foi ressuscitado em 10ml de tampão HNE + inibidores de protease (25mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Fluoreto de sódio, 10mM Pirofosfato de sódio, 10 mM Ortovanadato de sódio, 00.1 mg/ml Aprotinina e 2 mM fenilmetilssulfonil fluorido). A cada 10 ml de suspensão de células em tampão HNE foram adicionados 500 µl de lisozima (10 mg/ml). Após incubação por um período de 20 minutos em gelo, as bactérias foram submetidas a 6 ciclos consecutivos de lise por congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho a 37°C. Após o último

descongelamento foram adicionados 10 µl de DNase I (1 mg/ ml) às amostras e estas foram incubadas por 20 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (em centrífuga de bancada Eppendorf) por 15 minutos a 4°C para separação das frações solúveis e insolúveis do lisado.

A purificação das proteínas recombinantes fundidas a GST foi feita por conjugação das mesmas em pérolas de glutathiona-sefarose. Para isso, 2,5 ml de pérolas de sefarose em HNE + inibidores de proteases foram adicionadas a 10 ml das frações solúveis dos lisados bacterianos contidas em tubos falcon de 15 ml. Os tubos foram incubados por 2h a 4°C sob agitação constante. As pérolas foram então centrifugadas e lavadas 3x com 5 ml de HNE + inibidores de proteases + 1% Triton 100. Uma quarta lavagem foi feita sem Triton. As pérolas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. A cada precipitado de pérolas de sefarose foi adicionado 2,5 ml de HNE + inibidores de proteases + 50% de glicerol. Cada suspensão das pérolas de sefarose conjugada com a proteína recombinante foi aliquoteada e congelada a -20°C. Uma amostra de cada suspensão foi fervida com tampão de Laemmli e aplicada em gel de poliacrilamida para eletroforese de proteínas. Ao término da eletroforese, os géis foram corados com solução corante de proteínas (54% álcool etílico, 13,5% ácido acético glacial e 0,27% azul de Coomassie) por aproximadamente 30 min e foram descorados em solução descorante (10% álcool etílico e 5% de ácido acético glacial) até a visualização satisfatória das bandas protéicas.

Esse gel serviu para quantificar visualmente o conteúdo de proteína recombinante presente em cada suspensão de pérolas de Glutathiona-sefarose.

3.32. ENSAIO DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA OU GEL SHIFT)

3.32.1. Preparação do extrato nuclear

Os ventrículos esquerdos foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Um “pool” de 3 corações foi utilizado para cada tempo experimental. Os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido com ajuda de cadinho e pistilo e homogeneizados em 10 volumes de tampão A (250mM sacarose, 10 mM HEPES pH 7,6, 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0,1mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina e 10 mM ortovanadato de sódio) utilizando um *potter* ou *Dounce pestle* modelo BB065 (*Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA*). O homogenato foi derramado sobre metade do volume de tampão B (1 M sacarose, 10 mM HEPES pH 7,6, 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0,1mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina e 10 mM ortovanadato de sódio) e centrifugado a 3900 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi re-suspendido em tampão A/glicerol (9:1) e derramado sobre um terço do volume de tampão B/glicerol (9:1). O gradiente foi centrifugado a 48000xg por 30 minutos a 4 °C. O extrato nuclear semi-purificado foi re-suspendido em 1 volume de tampão de extrato nuclear (10 mM HEPES pH 7,6, 400 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM ditioneitol, 0,1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina e 10 mM ortovanadato de sódio). As proteínas nucleares foram então extraídas em gelo por 30 minutos, e o material particulado foi removido por centrifugação a 13000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi dialisado contra o tampão C (HEPES 25mM, pH 7,6, cloreto de potássio 100mM, EDTA 0,1mM, glicerol 10%, ditioneitol 1mM, PMSF 0,1mM, 2 µg/ml aprotinina e ortovanadato de sódio 10mM) por 3 a 4 horas a 4 °C. O extrato nuclear dialisado foi coletado e a concentração protéica do mesmo foi medida pelo

método de Bradford (BRADFORD, 1976) com reagentes BIO-RAD segundo o protocolo do fabricante.

No caso de utilização de proteínas recombinantes nos ensaios de EMSA, estas foram liberadas dos beads pelo acréscimo de uma solução HNE + inibidores + GSH, de maneira que a concentração final de Glutathione-sefarose reduzida (GSH) na suspensão chegasse a 10 mM. Amostras de cada proteína foram quantificadas em gel de poliacrilamida visualmente contra padrões de albumina.

3.32.2. Marcação da sonda de DNA

Os seguintes oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados e encomendados numa escala de 50 nmol: MEF2S: 5'-GTGTTGATCGCTCTAAAAATAACCCTGTCG-3'
MEF2AS: 5'-GTTGGCGACAGGGTTATTTTATAGAGCGATC-3' (realçada em amarelo encontra-se a sequência consenso do fator MEF2).

Os oligonucleotídeos foram anelados a 94°C com resfriamento gradual. 200 pmol da sonda de DNA MEF2 foram marcados radioativamente pela reação de preenchimento com a enzima Klenow Polimerase (Promega) e $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP. A sonda marcada foi purificada em coluna de Sephadex® G-25 (NAP™-5 Pharmacia Biotech) segundo instruções do fabricante. A concentração da sonda utilizada nos ensaios foi calculada considerando 90% de rendimento de DNA após a purificação.

3.32.3. Reação de ligação e eletroforese do complexo DNA/Proteína

A formação dos complexos DNA-Proteína foi analisada através da mistura de 20µg de extrato nuclear ou 1 µg de proteína recombinante GST-MEF2C(1-169) com a sonda

MEF2 marcada mais as diferentes proteínas testadas em tampão de ligação (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 2% glicerol, 2% Ficoll , 1µg BSA e 1µg de Poli[DI-DC]) à temperatura ambiente por 5 min. Cada reação foi adicionada de 10-20 fmol de sonda marcada radioativamente (5000 – 10000 cpm) num volume total de 20 µl e incubada por 20 min a temperatura ambiente.

Após o término do tempo de incubação da proteína com o DNA para a formação do complexo, foram adicionadas às reações 5 µl de tampão de amostra (0,25 M Tris-Cl pH 7,5, 40 % glicerol , 0,2% azul de bromofenol, 0,2% Xileno cianol). As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 5% contendo 5% de glicerol e 0,25 x TBE (50 mM Trizma base, 42 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA). O gel foi pré-corrido em tampão TBE 0,25 x por 30 min a $\sim 20 \text{ V.cm}^{-1}$ e a 4°C. A eletroforese foi realizada a 400 V e a 4°C por aproximadamente 90 min. O gel foi então seco a vácuo e exposto a um filme de raio-X por 12 a 48 h à -70°C.

Nos ensaios de competição, 100 x da concentração molar do DNA competidor, em relação à sonda marcada, foi incubado por 20 min, à temperatura ambiente, com 1 µg de proteína recombinante. Terminado o tempo de incubação do DNA competidor com a proteína, uma concentração fixa da sonda marcada radioativamente foi adicionada a cada reação de ligação. No ensaio de supershift, 1 µg da proteína foi previamente incubada com o anticorpo anti-MEF2 (Santa Cruz) por 30 min a 4°C e para depois ser adicionada sonda marcada de DNA. As reações foram novamente incubadas por 20 min à temperatura ambiente e adicionadas de 5 µl de tampão de amostra e carregadas no gel de poliacrilamida como já descrito no parágrafo anterior.

3.33. ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO (“PULL DOWN”)

Para a confirmação da interação encontrada no ensaio de duplo-híbrido, foi utilizado o ensaio de co-precipitação ou “pulldown”. Este ensaio testa a capacidade de proteínas recombinantes expressas e purificadas se associarem *in vitro*. O experimento consistiu basicamente em expressar uma proteína em fusão com GST e fixá-la a pérolas de sefarose acopladas a Glutathione. A proteína que interage com a proteína fixada nas pérolas foi incubada em forma de sobrenadante com as pérolas que foram posteriormente lavadas. As proteínas ainda ligadas nas pérolas foram então eluídas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Posteriormente, um Western blot foi feito para a detecção das proteínas ligadas, utilizando anticorpos específicos para cada proteína (Figura 10).

Assim, as proteínas recombinantes GST, GST-MEF2C(1-169) foram conjugadas em pérolas de Glutathione-sefarose e 6xHis-Ki-1/57 foi purificada em coluna de níquel (proteína cedida por Dr. Jörg Kobarg). Todas as proteínas foram quantificadas em gel de poliacrilamida visualmente após as bandas serem coradas com azul de Coomassie.

3.34. ISOLAMENTO DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS ADULTOS

Foram utilizados ratos adultos entre 160-180g. Estes animais foram anestesiados com pentobarbital e a cavidade torácica aberta. O coração foi excisado o mais rápido possível e a aorta canulada em sistema de perfusão de Langendorf, estabelecendo, portanto, perfusão retrograda com tampão Hanseleit modificado, por aproximadamente 5 minutos (10 mM HEPES, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 25 mM $NaHCO_3$, 1,2 mM KH_2PO_4 , 6 mM glicose, 1 ml heparina, 1 ml xilocaína, pH 7,4). Após este período, foi adicionado 4 mM EGTA ao tampão Henseleit por um período de 15 minutos. Iniciou-se então a perfusão com tampão de digestão (tampão Henseleit, 0,1% BSA e 300µg/ml de

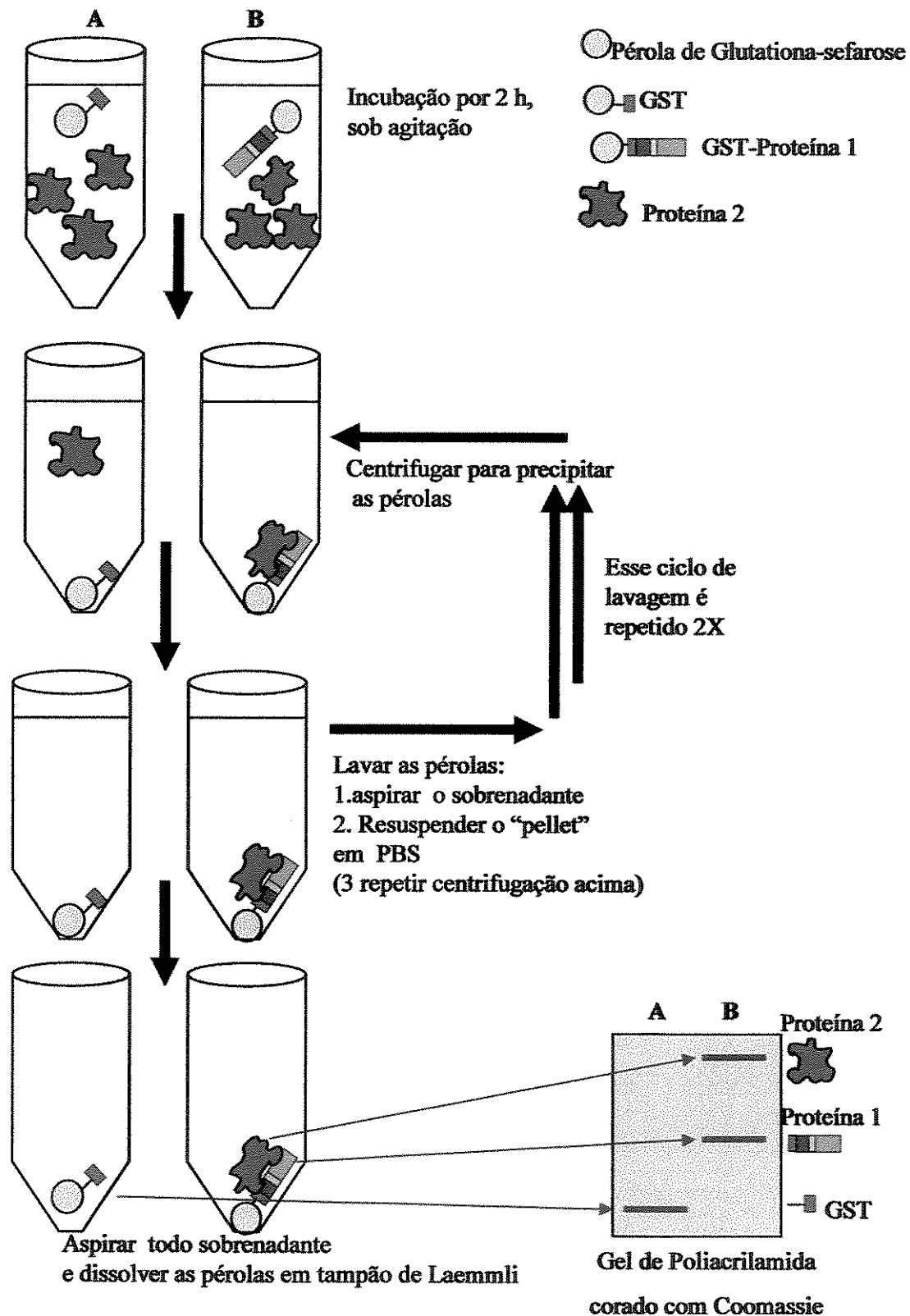


Figura 10. Representação esquemática do ensaio de co-precipitação

colagenase tipo IA –Sigma) por 30 minutos. Completada a perfusão, os átrios foram retirados e os ventrículos colocados em placa de Petri com tampão Henseleit adicionado de BSA 0.1% e cortados em pedaços pequenos. A suspensão celular foi filtrada em gaze e o cálcio repostado na solução em concentração final de 1,2 mM. Todo o processo foi realizado em condições estéreis e o tampão sob constante oxigenação.

A suspensão celular foi centrifugada, colocada em meio de cultura DMEM e os cardiomiócitos foram deixados aderir por 30 minutos sobre lamínulas de vidro tratadas previamente com Poli-L-lisina. A viabilidade das células foi avaliada com azul de Tripan e células arredondadas não foram consideradas viáveis.

3.35. IMUNOHISTOQUÍMICA COM MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER

Os cardiomiócitos de ratos adultos foram então fixados com paraformaldeído 4% e sacarose 4% em 0,1 M PBS, pH 7,4 por 15 minutos em temperatura ambiente. As células fixadas foram pré-incubadas em tampão de bloqueio de ligações inespecíficas com leite desnatado 1% em 0,1 M PBS pH 7,4, durante 1 hora. Seguido por incubação com anticorpos primários (1:75 em 0,1 M PBS) anti-MEF2 e anti-Ki-1/57 durante a noite a 4°C. O material foi lavado com 0,1 M PBS e incubado com anticorpos secundários, anti-rabbit 488® Alexa (verde) e anti-mouse 568® Alexa (vermelho) 1:250 em 0,1 M PBS. Após nova lavagem, as lâminas foram montadas utilizando-se Vectashield e acondicionadas a 4°C, no escuro. As lâminas foram então analisadas microscopicamente. Os sinais positivos foram visualizados por microscopia confocal a *laser* (Zeiss LM510). Na ausência de anticorpos primários, o uso de anticorpos secundários (controle negativo) não produziu marcação significativa.

3.36. FRACIONAMENTO SUBCELULAR

O fracionamento subcelular seguiu a metodologia descrita por MIZUKAMI et al, (1997) com pequenas modificações. Os corações congelados foram pulverizados em cadinho e homogenizados em 2 volumes de tampão STE (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM NaN₃, 10 mM β-mercaptoethanol, 0,2 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate) com auxílio de um homogenizador Polytron . Os homogenatos foram então misturados com mais 2 volumes de tampão STE e centrifugados a 1000 x g por 10 min a 4°C. O precipitado foi lavado uma vez com tampão STE (fração nuclear), enquanto que o sobrenadante foi centrifugado por 100.000 x g por 60 min a 4°C para obtenção da fração citosólica. O precipitado resultante desta última centrifugação continha a fração de membrana.

A fração nuclear foi solubilizada em tampão com Triton (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.2 mM ortovanadato de sódio, 0.2 mM PMSF, 50 mM NaF) por 30 min a 4°C com agitação e centrifugada a 15.000 x g por 30 a 4°C e o sobrenadante (extrato nuclear) foi aliqotado e armazenado a -80°C. Todas as frações tiveram seu conteúdo protéico quantificado posteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. AUMENTO DE PRESSÃO CAUSADO PELA CONSTRIÇÃO DA AORTA.

Após a constrição da aorta ascendente, por meio da colocação de um clamp de prata, os animais tiveram suas pressões arteriais monitoradas por meio de catéteres inseridos nas artérias carótida e femoral direitas. Dados contínuos da onda de pulso da pressão arterial foram coletados e analisados com o programa *Windaq*. Uma vez registradas as pressões arteriais, os animais foram sacrificados em diversos tempos pós-coarctação da aorta (1 a 6 horas) com injeção de solução de KCl 1M, via cânula introduzida na veia jugular. Animais controles, sem a coarctação da aorta, foram anestesiados, monitorados e sacrificados tal como os animais submetidos à cirurgia. O gradiente de pressão sistólica entre o ventrículo esquerdo e a aorta abdominal foi calculado dos valores médios de pressão sistólica do ventrículo esquerdo e da aorta abdominal de cada rato (Figura 11).

Como animais controles próprios ao estudo, foram considerados aqueles cujas pressões arteriais sistólica e diastólica apresentavam valores próximos a 130 e 90 mmHg, respectivamente. Animais submetidos a coarctação da aorta considerados adequados ao estudo apresentavam uma pressão sistólica na aorta ascendente superior a 160mmHg e um gradiente sistólico de, no mínimo, 40mmHg.

4.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MEF2 POR *WESTERN BLOT* EM VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS SUBMETIDOS A CONSTRIÇÃO DA AORTA.

Extratos totais obtidos de animais controles e animais submetidos a coarctação da aorta por períodos entre 1 e 6 horas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram então

incubadas com anticorpo policlonal anti-MEF2 (Santa Cruz) que reconhece a porção C-terminal de MEF2A. No entanto, já foi relatado pelo fabricante que este anticorpo apresenta reação cruzada com MEF2C e MEF2D. O resultado da figura 12 demonstrou que não houve um aumento da expressão das proteínas da família MEF2 no período de 1 e 6 h horas de estímulo mecânico no miocárdio, em relação ao controle não estimulado.

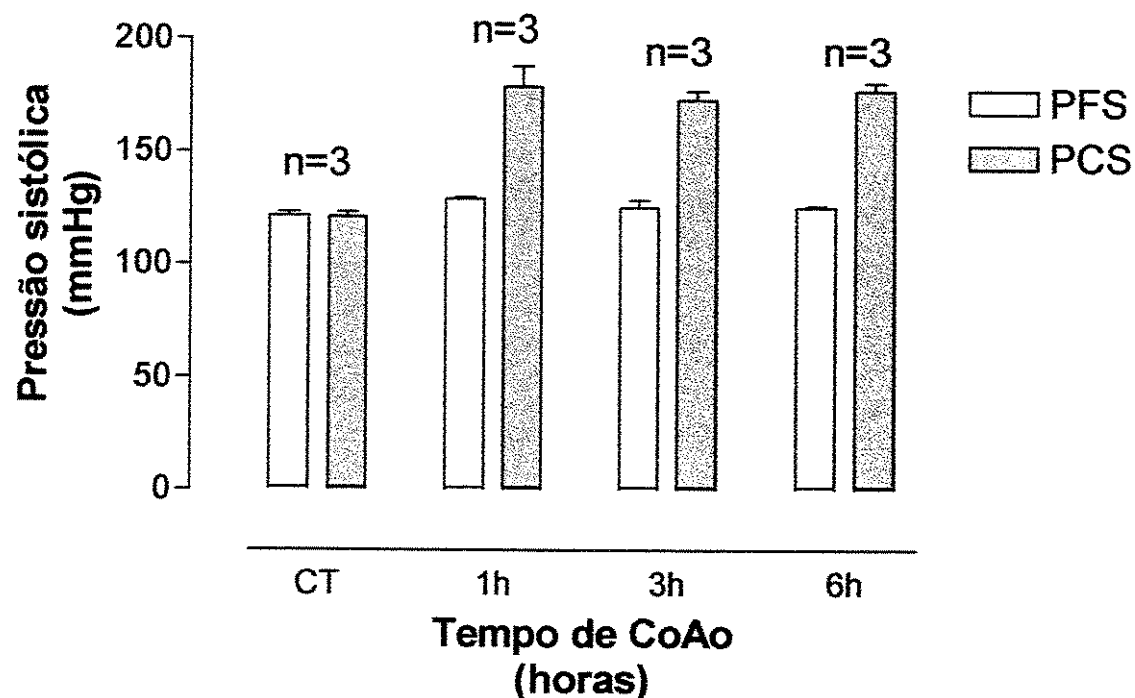


Figura 11. Pressão arterial sistólica de ratos (n=12) controle (C) e submetidos a coarctação da aorta (1-6h). PCS: Pressão da Carótida Sistólica, PFS: Pressão da Femoral Sistólica.

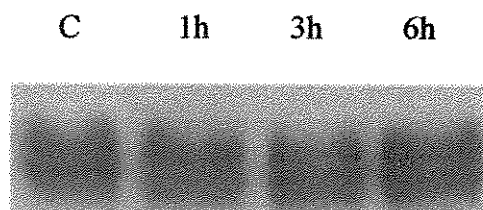


Figura 12. Análise da expressão de MEF2 por *Western blot* após a coarctação da aorta de ratos. C: Controle, 1-6h: tempo de coarctação da aorta.

4.3. AS ISOFORMAS A, C e D de MEF2 MANTÊM SUA EXPRESSÃO INALTERADA NAS PRIMEIRAS HORAS DE SOBRECARGA MECÂNICA NO CORAÇÃO DE RATOS ADULTOS

A expressão de MEF2 nos extratos protéicos de coração de rato não apresentou diferença entre animais controle e coarctado. Assim, decidimos avaliar a expressão de cada gene da família *mef2* isoladamente. Para isso, foi utilizada a técnica de RT-PCR a partir de RNA extraído de coração de ratos controle e coarctados.

Os resultados demonstram que não houve aumento na expressão de MEF2A, MEF2C e MEF2D com tempos de até 4h de coarctação da aorta (Figura 13). No entanto, após 24h, notamos um decréscimo na expressão de MEF2A e um aumento na expressão de MEF2D. A expressão de MEF2C se manteve praticamente inalterada durante o tempo do experimento. Não obtivemos expressão de MEF2B em animais controle, nem coarctados por diferentes intervalos de tempo.

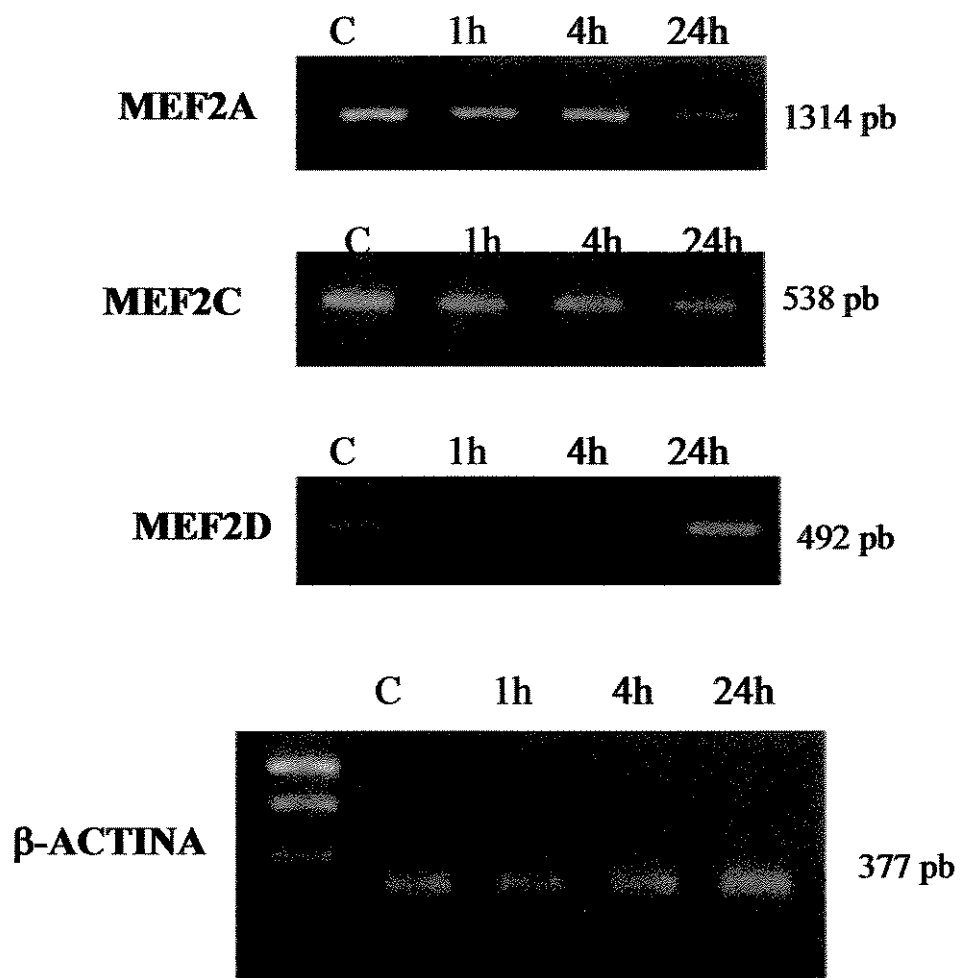


Figura 13. Expressão gênica dos fatores MEF2 após diferentes intervalos de tempo de coarctação da aorta em ratos adultos por RT-PCR.

4.4. O FATOR DE TRANSCRIÇÃO MEF2 É ATIVADO POR SOBRECARGA MECÂNICA

Experimentos de EMSA (*Eletrophoretic Mobility Shift Assay*) foram realizados com extratos nucleares de coração de animais submetidos à coarctação da aorta por diferentes tempos para determinar se somente a sobrecarga mecânica seria um estímulo suficiente para ativação do fator de transcrição MEF2. Para isso, utilizamos como sonda um oligonucleotídeo de DNA de dupla-fita contendo a sequência consenso de MEF2: GATCGCTCTAAAAATAACCCTGTCG marcado radioativamente.

Os resultados da figura 14 demonstram que extratos nucleares de coração que sofreram coarctação a partir de 10 min já apresentaram um aumento da ligação entre a proteína MEF2 com sua sequência consenso de DNA em relação ao controle. A formação do complexo DNA/proteína ficou ainda mais pronunciada com extratos de coração submetidos a uma hora ou mais de coarctação. Ensaio de supershift e competição comprovaram a identidade de uma proteína da família MEF2, no entanto, não foi possível identificar qual das proteínas da família se trata, pois a região de DNA consenso utilizada é reconhecida pelas quatro proteínas e o anticorpo utilizado para MEF2A pode reagir inespecificamente com todas as isoformas de MEF2.

4.5. ESCOLHA DO FATOR MEF2 E DAS REGIÕES PARA A CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES DE DELEÇÃO

Atualmente, dos quatro genes *mef2* (A, B, C e D) conhecidos em vertebrados, somente a sequência do gene *mef2d* foi caracterizada em ratos.

O fator MEF2C, em contraste com os outros membros da família, cuja expressão é generalizada, tem sua expressão restrita a músculo esquelético, coração, baço e cérebro em

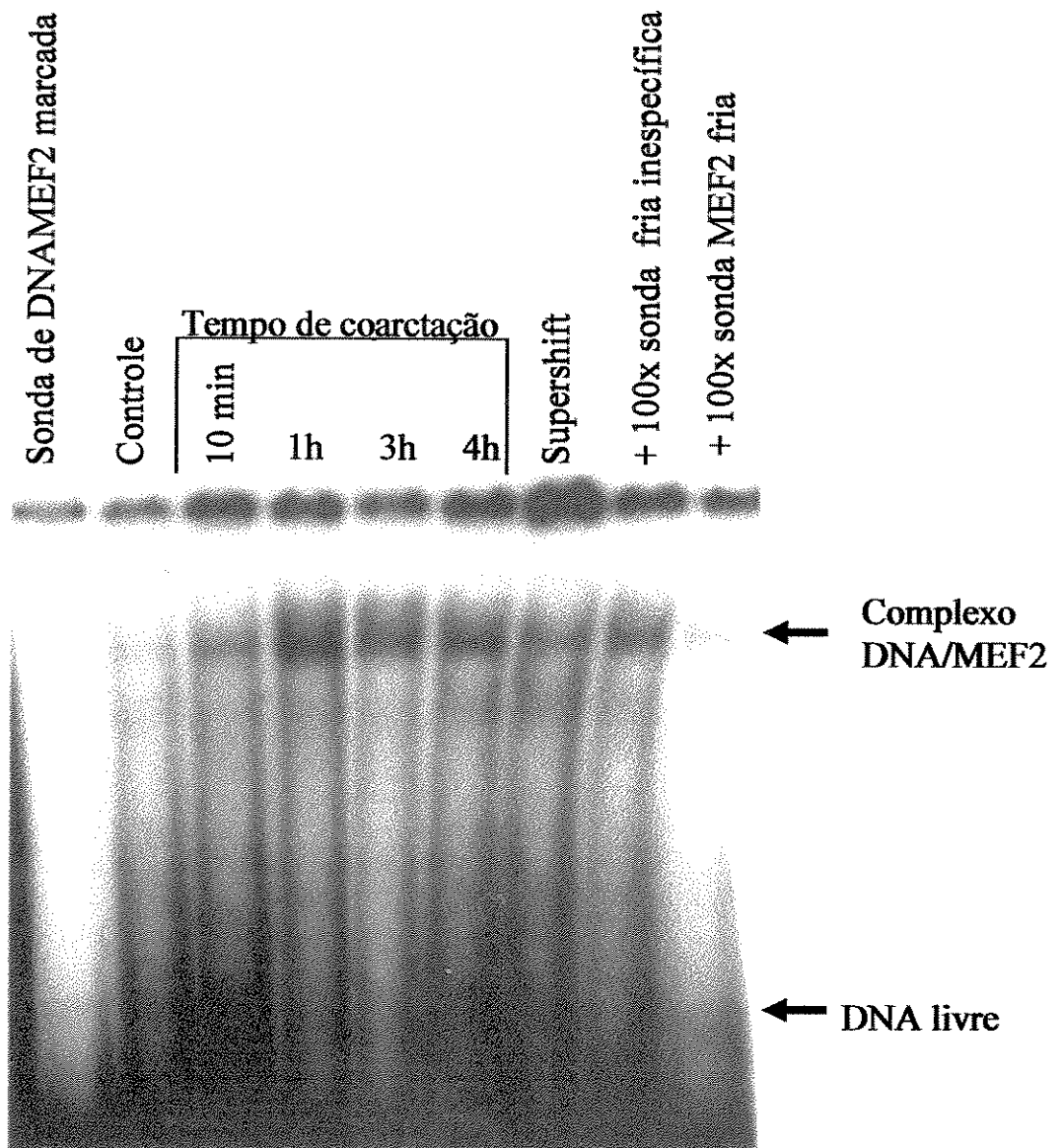


Figura 14. MEF2 é ativado por sobrecarga mecânica.

EMSA de extratos nucleares de ventrículo esquerdo de ratos submetidos a diferentes tempos de coarctação da aorta. Para comprovar a especificidade da ligação, anticorpo anti-MEF2 foi incubado junto aos extratos nucleares levando ao aparecimento do supershift. Testes de competição inespecífica (oligonucleotídeo de DNA frio não relacionado com MEF2) e específica (oligonucleotídeo de DNA mef2 frio) também comprovam a especificidade da formação dos complexos DNA/proteína.

camundongo adulto (MARTIN et al, 1993). Experimentos de deleção gênica de MEF2C em camundongo, causaram alteração da expressão gênica cardíaca e morte dos animais, por má formação do tubo cardíaco, no oitavo dia do período embrionário (LIN et al, 1997).

Baseados na sua importância para a formação e desenvolvimento do coração, além do seu padrão de expressão e da abundância de seus transcritos no miocárdio de rato adulto, o fator MEF2C foi escolhido para ser clonado e usado como “isca” nos experimentos de duplo-híbrido em levedura. Essa “isca” de MEF2C não deve apresentar atividade transcricional *per se*, assim, uma série de deleções N- e C-terminal fundidas ao domínio de ligação LexA foram feitas, na tentativa de mapear o domínio de ativação transcricional dessa proteína (Figura 15). As deleções de MEF2C foram baseadas no trabalho de SPARROW et al, (1999), que mapeou os domínios de ativação de MEF2A e MEF2D de *Xenopus* para utilização dos mutantes de deleção no sistema de duplo-híbrido. Essa medida foi necessária, para encontrar um fragmento de cDNA do fator de transcrição MEF2C que não transativasse o sistema de duplo-híbrido inespecificamente, pois a região C-terminal de MEF2C apresenta o domínio transativador.

4.6. ISOLAMENTO E CLONAGEM DO cDNA DE MEF2C DE RATO

Inicialmente, a sequência de MEF2C de rato ainda não estava disponível nos bancos de dados. Assim, os produtos de PCR contendo o cDNA de Mef2C foram amplificados por RT-PCR a partir do RNA obtido do ventrículo esquerdo de ratos controle. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base no alinhamento da figura 16, no qual foram utilizadas sequências das proteínas MEF2 de humano, camundongo e rato.

Para as construções de cDNA de Mef2C no vetor de expressão pBTM116, oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados para adicionar o sítio de restrição *Bam* HI

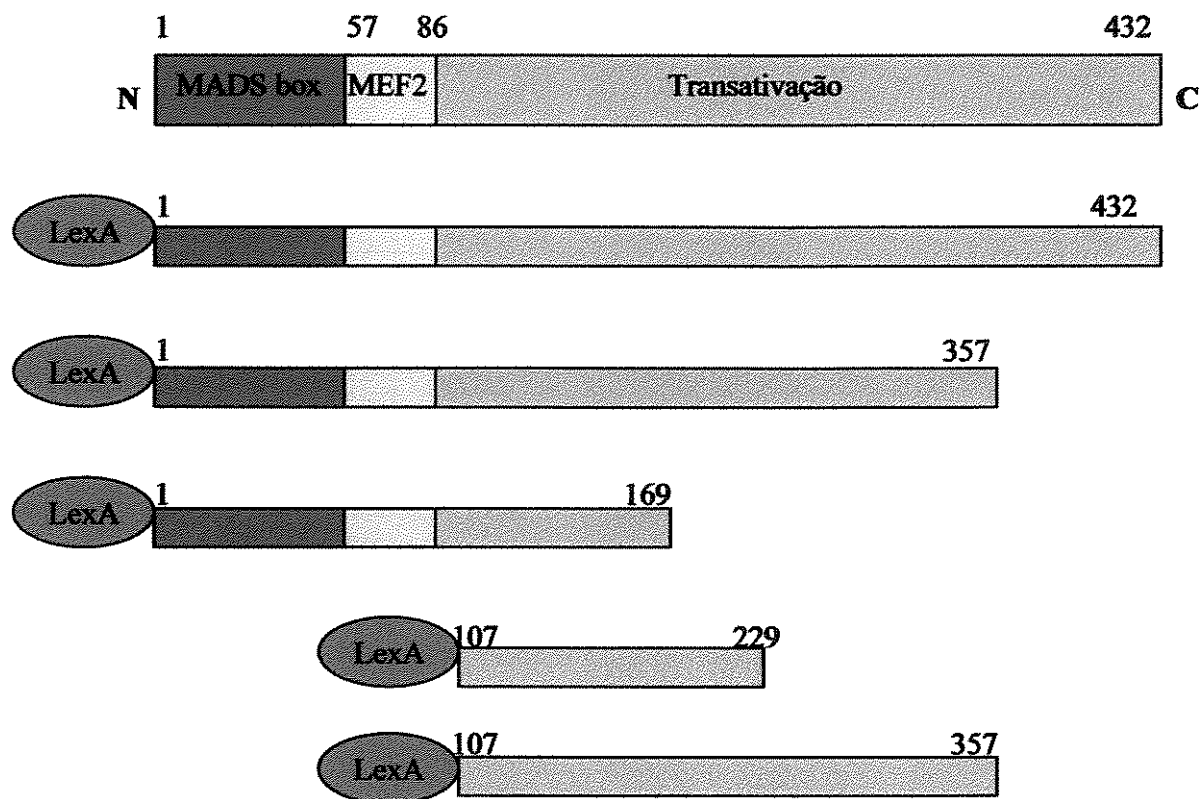


Figura 15. Representação esquemática dos domínios da proteína MEF2C e dos mutantes de deleção MEF2C.

A figura mostra a presença do domínio Lex A (N-terminal) que foi adicionado às proteínas truncadas pelo vetor de expressão pBTM116 para posterior triagem de sistema de dois-híbridos em levedura. As construções referentes aos mutantes de deleção de cima para baixo foram denominadas: pBTMEF2C(1-432), pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-169), pBTMEF2C(107-229) e pBTMEF2C(107-357).

nas extremidades dos produtos de PCR obtidos. Diferentes tamanhos do cDNA Mef2c foram amplificados de acordo com a representação esquemática da figura 15. Os produtos de PCR obtidos foram identificados como cDNA mef2c por sequenciamento antes de serem clonados. Estes produtos abrangeram as seqüências codificadoras dos aminoácidos 1-169, 1-357, 1-432, 107-229 e 107-357.

Os produtos de PCR foram purificados e digeridos com a enzima de restrição *Bam* HI e quantificados. Os fragmentos de cDNA de Mef2c foram então ligados no vetor pBTM116 previamente digerido com *Bam* HI gerando construções denominadas pBTMEF2C(1-169), pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-432), pBTMEF2C(107-229) e pBTMEF2C(107-357). Essas construções foram transformadas em *E. coli*.

MEF2A (hum)	MGRKKTRMDRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANSSNKYASTDMDKVKYTYNHSRTNSDVANK
MEF2A (cam)	MGRKKTRMDRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANSSNKYASTDMDKVKYTYNHSRTNSDVTRK
MEF2B (hum)	MGRKKSR-DRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANSANRYASTDMDRVKYTYSHSRTNTD-TKR
MEF2B (cam)	MGRKKSR-DRNRVTTKRKGKKAYSVCDCDANSARYASSDMDRVKYTYSHSRTNAD-TKR
MEF2C (hum)	MGRKKTRMDRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANSTNKYASTDMDKVKYTYNHSRTNSDVTRK
MEF2C (cam)	MGRKKTRMDRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANSTNKYASTDMDKVKYTYNHSRTNSDVTRK
MEF2D (hum)	MGRKKRT-DRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANHSNKYASTDMDKVKYTYNHSRTNAD-TRK
MEF2D (cam)	MGRKKRT-DRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANHSNKYASTDMDKVKYTYNHSRTNADAHNN
MEF2D (rat)	MGRKKRT-DRNRVTTKRKGKKAYSVCDCANHSNKYASTDMDKVKYTYNHSRTNAD-TRK

MEF2A (hum)	KHRGCDSDDTSYVTHTKYKKNNDMMNRNHKAGNSMS---VTVVTSNASTNGSSVSSAASS
MEF2A (cam)	KNGCNDADDYHSSDRKNDSDKRG-----GNSMS---VTVVTSNSD-TNGSSVSSAASS
MEF2B (hum)	RGGDGDGGKRRAGGGDA-----RRYAAAMSDVVYAGCDSGGAASRSRAAKAGGVHSSHT
MEF2B (cam)	RGVGDGDMGGGKRTGGDRGSASRRYVAAMSVSSYRVATGCDGGGVSVHSRAYRGHSSHA
MEF2C (hum)	KNGCDSDDADDSVGHSSDKYRKNDMSRRCVNMVSVSSHNSVYSNVSSGNNNAHSRNSM
MEF2C (cam)	KNGCDSDDADDSVGHSSDKYRKNDMSRRCVSMVTVSSHNSVYSNVSTGNNNAHSRNSM
MEF2D (hum)	KNGCDSDDGD-----SSDKYRRASDGRRYGSTVANAMVTVVSNS--SNSSSVTSVTSS
MEF2D (cam)	DRCSDAAT-----TKYKDDKMSYRA--SSVANAMVTVVSNSM-SNSSSVTSVTSS
MEF2D (rat)	KNGCDSDDGD-----SSDKYRRASDGRRYGSSVANAMVTVVSNSM-SNSSSVTSVTSS

MEF2A (hum)	TTDSSMSTTHRNVSGARSTGNAGGMSTTDTVNGAGSSVGNVNSRASNGATGANSKVM
MEF2A (cam)	TAT-SMSATHRNVSGARSTGSAGSMSTTDTVNGAGNSVGNVNSRASNGTGANSGKVM
MEF2B (hum)	SKTYTGRRSDGGAG-RGGNTSRYSNGCSTATGGSGGVGAAWARRVAARRSASSASRGA
MEF2B (cam)	SKTYATDGRRDGVGARGGTSRSYSGSGAGAGSASGSTDCSGDAAGSWTRDAVDARVAR
MEF2C (hum)	SGVTHRSAGNTGGMGDTSGACTSAGNGYGNRNSGVSGNNKNMAKSM-----
MEF2C (cam)	SGVTHRSAGNTGGMGDTSGACTSAGNGYGNRNSGVSGNNKN-AKSM-----
MEF2D (hum)	TDRSARNSVSGRASAGAMGGDNSANGACSVGNGYVSARASGVANGNSNKVAKSTHSTGA-
MEF2D (cam)	TDRSARNSVSGRASAGAMGGDNSANGACSVGNGYVSARASGVANGNSNKVAKSTHNTGA-
MEF2D (rat)	TDRSARNSVSGRASAGAMGRDNSANGACNVGNGYVSARASGVANGNGNKVAKSTHNTGA-

Resultados

```

MEF2A (hum) KSGGGNGMNSRKDRVSSKGMMSNTRSSSATA-----TVVSVTTSGVYSAMTAYNTD
MEF2A (cam) KSGGGSGMNSRKDRVASSKGMMSNARSSSATA-----TVVSVTTSGVYSAMTAYNTD
MEF2B (hum) ATRSCSSGWSCGGCAGCWTAGGRRSGGTSRSGTARARGDTSASSKT-----
MEF2B (cam) CKGSRGGSTVSKRSVTGTSGDRSYARARSASHRTDSWR-----
MEF2C (hum) -----NGMNNRKDRVGSKNTMSVNRNNSASA-----TVVSVATTGGMGGYSASTTY
MEF2C (cam) -----NGMNNRKDRVGSKNTMSVNRNNSASA-----TVVSVATTGGMGGYSASTTY
MEF2D (hum) -----SRKDRVTSAGKGMHHTDHDNNARGVSSSTHSTTVVSVATSSGSS-MTAYNTD
MEF2D (cam) -----SRKDRVTSAGKGMHH-----NNARGVSSSTHSTTVVSVATSSGSS-MTAYNTD
MEF2D (rat) -----SRKDRVTSAGKGMHH-----NNARGVSSSTHSTTVVSVATSSGSS-MTAYNTD

MEF2A (hum) Y-STSADSAGNSGMSGVSAWHHGAASSVAGG-----SGSNSNTNNSKSSRDRMTSG--
MEF2A (cam) Y-STSADSAGTSGMSGASAWHHGTTSSVAGG-----SGSNSNTNNSKSSRDRMTSGHH
MEF2B (hum) -----
MEF2B (cam) -----
MEF2C (hum) GTYSSSADSSSGNTASAHGSVTGWHHNMSASGACTSTHSSSNSSTSNKSVSRDRITTTTRY
MEF2C (cam) GTYSSSADSSSGNTASAHGSVTGWHHNMSASGACTSTHSSSNSSTSSKSVSRDRITTTTRY
MEF2D (hum) YTSASSASSGGSGNVTAWSHVSSNGSHVGAATVTTTHHSKSVSSRRSAAVAARGDGSSAG
MEF2D (cam) Y-SASSASSAGAGNVTAWSHVSSNGSHVGAATVTTTHHSKSVSSRRSAAVAARG-GSSAG
MEF2D (rat) Y-SASSASSAGAGNVTAWSHVSSNGSHVGAATVTTTHHSKSVSSRRSAAVAARG-GSSAG

MEF2A (hum) ---RM-GRSVDSSSSSSSYDGSDDRDGRDHSVGR-NTDRSSVKRMRMDAWVT
MEF2A (cam) HHHRM-GRSVDSSSSSSSYDGSDDRDGRDHSVGRANTDRSSVKRMRMDTWVT
MEF2B (hum) -----
MEF2B (cam) -----
MEF2C (hum) HT-RHAGRSVDSSSCSSSYDGSDDRDHRNHSGTRS--DRSSVKRMRSGWAT-
MOU2C (cam) HTTRHAGRSVDSSSCSSSYDGSDDRDHRNHSGTRS--DRSSVKRMRSGWAT-
MEF2D (hum) GSYTGDRDDGRGDGTGRAAGSAVKRMRDWTWK-----
MEF2D (cam) GSYTGDRDDGRGDGTGRAAGSAVKRMRDWTWK-----
MEF2D (rat) GSYTGDRDDGRGDGTGRAAGSAVKRMRDWTWK-----

```

Figura 16. Alinhamento das seqüências de proteína da família MEF2 (A, B, C e D).

As abreviaturas significam o seguinte: (hum): humano, (cam): camundongo, (rat): rato. Os números de acesso das seqüências MEF2 (no banco de dados do NCBI) são os seguintes: MEF2A (hum) XM 007627, MEF2A (cam) NM 013597, MEF2B (hum) NM005919, MEF2B (cam) 008576, MEF2C (hum) XM011316, MEF2C (cam) NM025282 , MEF2D (hum) XM001363, MEF2D (rat) NM030860. MEF2D (cam) T02505 (no banco de dados TRANSFAC).

Os clones transformados com as construções de Mef2C em pBTM116 foram submetidos ao PCR de colônia para selecionar as construções com o cDNA de Mef2 na orientação correta, já que a utilização de uma única enzima de restrição poderia gerar construções com a orientação do cDNA incorreta. O vetor pBTM116 adiciona o domínio Lex A (domínio de ligação ao DNA ou Binding Domain) à proteína de fusão e o cDNA Mef2c deve ser clonado "in frame" com esse domínio na região N-terminal. Após a análise de clones por PCR de colônia, foi obtido, no mínimo, um clone para cada construção de Mef2c em pBTM116 na orientação correta.

O isolamento relativamente fácil do cDNA de Mef2c por RT-PCR e não dos outros membros da família Mef2, pode ser tomado como um indicativo da abundância relativa de MEF2C no miocárdio de ratos adultos.

4.7. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS CONSTRUÇÕES DE MEF2C

As construções pBTMEF2C(1-169), pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-432), pBTMEF2C(107-229) e pBTMEF2C(107-357) foram sequenciadas e analisadas com o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As seqüências também foram analisadas pelo programa CLUSTAL W (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) demonstrando a alta similaridade apresentada entre as seqüências da proteína MEF2C de rato, camundongo e humano.

4.8. ENSAIO DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURA

4.8.1. ESCOLHA DO MUTANTE DE DELEÇÃO MEF2C PARA "ISCA" DO DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURA E ANÁLISE DE AUTO-TRANSATIVAÇÃO

As construções pBTMEF2C(1-169), pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-432), pBTMEF2C(107-229) e pBTMEF2C(107-357) foram co-transformadas com o vetor pGADT7-rec vazio na cepa *L40* da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A finalidade dessa co-transformação foi verificar se os mutantes de deleção de Mef2c ativariam o sistema de forma inespecífica, podendo dar origem a resultados falsos positivos, ou seja, o domínio de transativação de MEF2C poderia ativar o sistema dando a impressão de ocorrer interações onde nenhuma interação verdadeira ocorreria.

Dois promotores foram testados independentemente: do gene repórter *his3* que promove o crescimento da cepa na ausência de histidina no meio e do gene repórter *lacZ* que promove a produção da β -galactosidase. Assim, o resultado negativo para interação entre as proteínas truncadas de MEF2C e o domínio GAL4 foi detectado pela ausência de crescimento em meio sem histidina e pela ausência de um pigmento azul nas colônias positivas pela quebra do substrato X-gal.

O promotor do gene repórter *his3* foi autoativado nos mutantes de Mef2c das construções pBTMEF2C(1-357), e pBTMEF2C(1-432).

No ensaio do promotor do gene repórter *lacZ*, houve auto-transativação por três dos cinco mutantes de deleção testados, pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-432) e pBTMEF2C(107-357) quando co-transformados com o vetor vazio pGADT7-rec, não podendo ser utilizados como "isca" na triagem do sistema de duplo-híbrido em levedura (Figura 17). A presença de auto-transativação do gene repórter pode significar que a

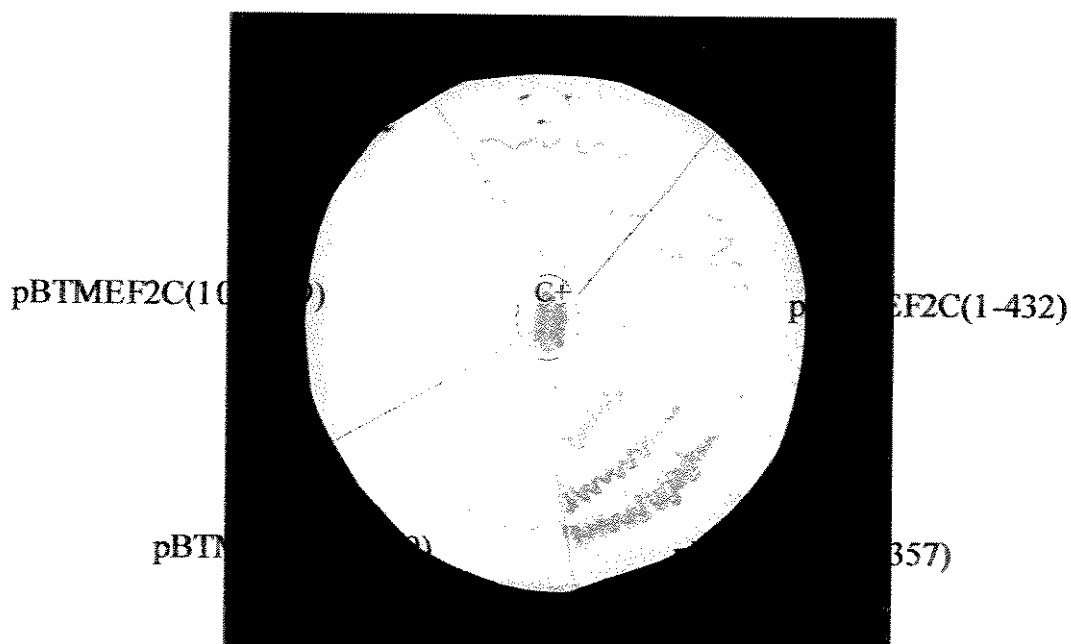


Figura 17. Teste de β -galactosidase em papel dos mutantes de deleção.

Construções pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-432) e pBTMEF2C(107-357) auto transativam o promotor do gene repórter *lacZ* quando co-transformados com o vetor vazio pGADT7-rec em levedura. C+: Controle positivo pBTM116FAKNX + pVP16FYNSH2 (POLTE e HANKS; 1995).

Resultados

proteína de fusão LexA-MEF2C autoativou o sistema, pois sendo um fator de transcrição, também possui um domínio de ativação C-terminal. Outra possibilidade, é que LexA-MEF2C interagiu com o domínio de ativação GAL4 do vetor vazio da biblioteca. Como controles positivos, foram utilizadas leveduras co-transformadas com as construções pBTM116FAKNX + pVP16FYNSH2 (gentilmente cedidas pelo Dr. Steve Hanks, Nashville, USA, cuja interação está bem definida e documentada em POLTE & HANKS, 1995).

4.8.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA

Sabendo que o fator MEF2 é ativado e permanece ativado por um intervalo de tempo durante a coarctação da aorta em ratos, nossa hipótese foi que a utilização de uma biblioteca de coração coarctado aumentaria a chance de encontrarmos proteínas cuja expressão fosse induzida por estímulo mecânico e que interagissem com MEF2C. Como essa biblioteca não se encontrava disponível comercialmente, uma biblioteca de cDNA de coração de rato coarctado foi construída com auxílio do *kit Matchmaker Library Construction & Screening* da Clontech.

A biblioteca foi construída a partir de 2 µg de RNA total extraído de coração de rato coarctado por 6h. Seguindo o protocolo do kit, a partir deste RNA, fitas simples de cDNA foram sintetizadas por reação de transcrição reversa com uma mistura de oligonucleotídeos PolidT, Random e SMART.

Os oligonucleotídeos do kit denominados 5'PCR e 3'PCR foram anelados nas extremidades 5' e 3' do cDNA fita simples e o cDNA foi amplificado por PCR, transformando as fitas simples em duplas. Terminada a reação de amplificação, o cDNA

dupla fita da biblioteca foi purificado em coluna para selecionar moléculas de cDNA maiores que 200 pares de bases.

O cDNA de coração de rato da biblioteca amplificado e purificado em coluna foi transformado, juntamente com o vetor pGADT7-rec linearizado na cepa *L40* de *Sacharomyces cerevisiae* para ocorrer a recombinação do cDNA no vetor *in vivo*. A seleção dos clones foi nutricional e após a transformação, as células de levedura foram plaqueadas em meio SD-L e incubadas por 3 a 5 dias. O número estimado de unidades formadoras de colônia obtidas foi de $5,5 \times 10^5$.

4.8.3. TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE cDNA

A biblioteca de cDNA de coração de rato coarctado construída por recombinação foi re-transformada com a construção pBTMEF2C(1-169) para dar início aos ensaios de interação ou triagem de duplo-híbrido. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio SD-L-W-H + 10mM 3-AT. 100.000 clones recombinantes foram testados, sendo que 130 (Figura 18 A) cresceram no meio seletivo e destes 130, apenas 90 clones apresentaram resultado positivo para o teste de β -galactosidase (Figura 18 B). Os 90 clones foram isolados e incubados em meio líquido SD-L por 3 dias para perderem o plasmídeo isca pBTMEF2C(1-169) facilitando assim o isolamento do plasmídeo pGADT7rec(cDNA).

O mesmo screening foi feito com a construção pBTMEF2C(107-229), onde apenas 38 clones cresceram em meio seletivo e nenhum deles apresentou resultado positivo para o teste de β -galactosidase.

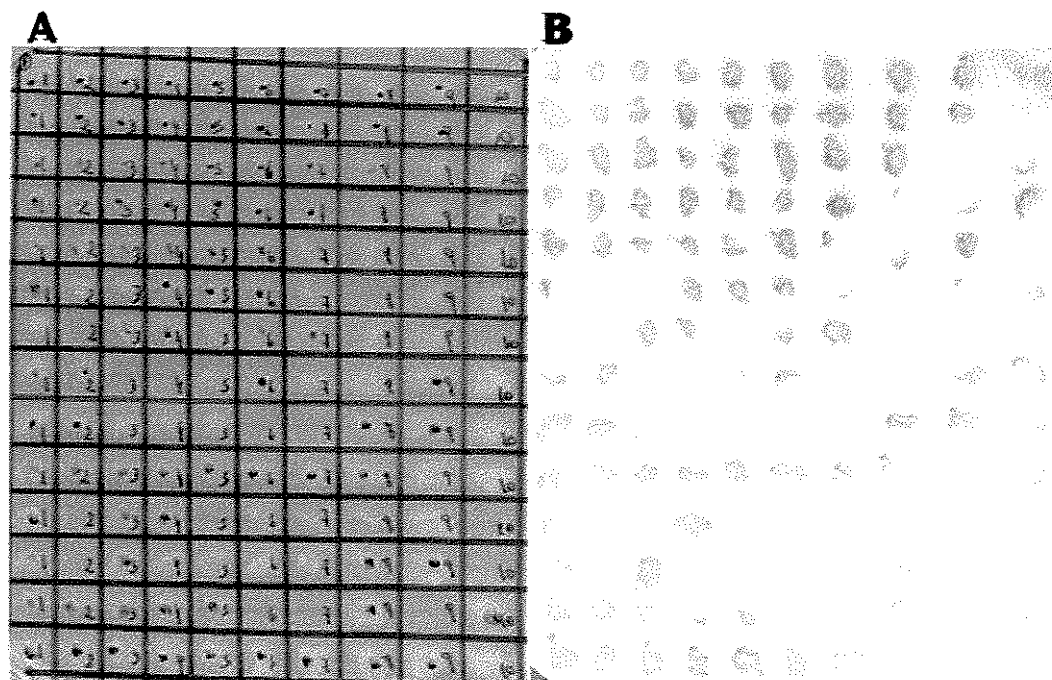


Figura 18. Triagem de duplo-híbrido em levedura.

Clones da biblioteca de coração de rato em levedura co-transformados com pBTMEF2C(1-169) como “isca” A) Crescimento em meio SD-L-W-H + 10 mM 3AT B) Teste de β -galactosidase em papel

4.8.4. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DO cDNA

Os clones de levedura contendo vetores pGADT7-rec(cDNA) que apresentaram interação na triagem da biblioteca tiveram seus vetores isolados, isto é, o DNA do plasmídeo foi extraído e re-transformado em *E.coli DH5α*. Este passo é necessário porque tanto a qualidade quanto a quantidade do DNA extraído das leveduras é muito baixo. Após nova extração de DNA das bactérias, este foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III (figura 19) para pré-selecionar as amostras de sequenciamento, já que é comum encontrar diversos clones com a mesma proteína. As amostras escolhidas foram purificadas e sequenciadas. A sequência de cDNA, foi inicialmente traduzida em ORFs ("Open Reading Frames") e a sequência de aminoácidos resultante foi analisada no programa BLAST do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

A tabela II demonstra os resultados encontrados. Desses, duas proteínas foram escolhidas para estudos de interação: a região C-terminal da Miosina de cadeia pesada e a proteína regulatória Ki-1/57.

Inicialmente, o aparecimento do cDNA de miosina foi interpretado como artefato, já que a quantidade relativa de miosina na biblioteca de cDNA de coração de rato deva ser alta. No entanto, a repetição do resultado e o fato de somente a região C-terminal da miosina de cadeia pesada aparecer em quatro clones sequenciados, aliado à especulação na literatura sobre a transdução de sinais de proteínas do citoesqueleto, nos levou a considerar a interação MEF2-Miosina como um fenômeno biológico a ser explorado.

Além da miosina, obtivemos quatro sequências de uma proteína que apresentou mais de 90% de identidade com a região N-terminal de uma proteína denominada Ki-1/57

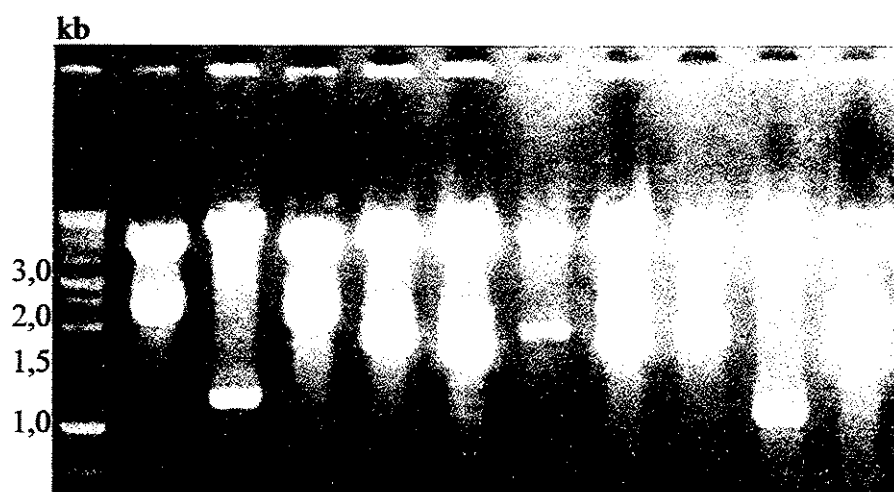


Figura 19. Digestão de DNA de clones isolados da biblioteca em pGADT7-rec(cDNA) que interagiram com MEF2C na triagem de duplo-híbrido em levedura e apresentaram resultado positivo no teste de β -galactosidase. A enzima utilizada foi *Hind* III.

que apresenta 413 aminoácidos. Até o momento, não foram determinados os domínios dessa os domínios dessa proteína, nem sua função. No entanto, podemos supor que a interação requeira a extremidade N-terminal de Ki-1/57, pois as quatro seqüências encontradas possuem essa região (Figura 20). Além da região C-terminal da miosina de cadeia pesada e da proteína Ki-1/57, também foram encontradas outras seqüências de proteínas que interagem com MEF2C(1-169) (Tabela II). O componente C5 do proteassoma apareceu uma única vez. A subunidade RC10 do proteassoma já foi identificada como gene dependente de MEF2C em estudos de hibridização substrativa e array (LIU et al, 2001). A proteína hipotética de camundongo XP_165124 ainda não possui função, nem domínios conhecidos.

Desses resultados, duas proteínas foram escolhidas para estudos de interação: a região C-terminal da Miosina de cadeia pesada e a proteína regulatória Ki-1/57.

Identidade no BLAST	tamanho da seqüência obtida	Porcentagem aa idênticos	Tamanho, número e origem da proteína no banco de dados
component C5 of proteasome	70 aminoácidos	87%	240 aa gi 1165122 emb CAA56701.1 Mus musculus
alpha cardiac myosin heavy chain	156 aa	86%	1938 aa gi 56655 emb CAA34064.1 Rattus norvegicus
beta myosin heavy chain	195 aa	84%	1935 aa gi 16508127 gb AAL17913.1 Mus musculus
alpha cardiac myosin heavy chain	123 aa	79%	1938 aa gi 56655 emb CAA34064.1 Rattus norvegicus
hypothetical protein XP_165124	94 aa	43%	610 aa gi 29891163/ref XP_16512 Mus musculus
Ki-1/57 ou Hyaluronan binding protein 4 (clone 12.8.1)	153 aa	92%	413aa ref NP_055097.1 hyaluronan binding protein 4; [Homo sapiens]

Ki-1/57 ou Hyaluronan binding protein 4 (clone 6.4.1)	168 aa	98 %	413aa ref NP_055097.1 hyaluronan binding protein 4; [Homo sapiens]
Ki-1/57 ou Hyaluronan binding protein 4 (clone 1.3.2)	110 aa	71%	413aa ref NP_055097.1 hyaluronan binding protein 4; [Homo sapiens]
Ki-1/57 ou Hyaluronan binding protein 4 (clone 8.6.1)	125 aa	95%	413aa ref NP_055097.1 hyaluronan binding protein 4; [Homo sapiens]

Tabela II. Clones obtidos na triagem de duplo-híbrido em levedura.

12.8.1	1	MMKIPTKPKK	RDRIQGALGS	PVAAAGAAMO	ESFGCVVANR	FHQLLDES
1.3.2	1	LMKIPTKPKK	RDRIQGALGS	PVAAAGAAMO	ESFGCVVANR	FHQLLDES
6.4.1	1	MMKIPTKPKK	RDRIQGALGS	PVAAAGAAMO	ESFGCVVANR	FHQLLDES
8.6.1	1	MMKIPTKPKK	RDRIQGALGS	PVAAAGAAMO	ESFGCVVANR	FHQLLDES
Ki-1/57	1	mk-----	-----GALGS	PVAAAGAAMO	ESFGCVVANR	FHQLLDES
12.8.1	51	PFDILREAER	RRQQQLQKR	RDEAAAAAGA	GPRGGRSPAG	ASGHRAGAGG
1.3.2	51	PFDILREAER	RRQQQLQKR	RDEAAAAAGA	GPRGGRSPAG	ASGHRAGAGG
6.4.1	51	PFDILREAER	RRQQQLQKR	RDEAAAAAGA	GPRGGRSPAG	ASGHRAGAGG
8.6.1	51	PFDILREAER	RRQQQLQKR	RDEAAAAAGA	GPRGGRSPAG	ASGHRAGAGG
Ki-1/57	38	PFDILREAER	RRQQQLQKR	RDEAAAAAGA	GPRGGRSPAG	ASGHRAGAGG
12.8.1	101	RRESHKERKt	-----	-----	-----	-----
1.3.2	101	RRESQKERKS	LPAPVAQRPD	SPGGGLQAPG	QKRTPIIGEQ	HGWNDRmpSGR
6.4.1	101	RRESQKERKS	LPAPVAQRPD	SPGGGLQAPG	QKRTPRRGEQ	QGWNDsr-GP
8.6.1	101	RRESQKERKS	LPAPVAQRPD	SPGG-----	-----	-----
Ki-1/57	88	RRESQKERKS	LPAPVAHRPD	SPGGGLQAPG	QKRTPRRGEQ	QGWNDsr-GP
12.8.1	111	-----	-----	-----	-----	-----
1.3.2	151	RGML-----	-----	-----	-----	-----
6.4.1	150	EGMLERAERR	SYREYptl--	-----	-----	-----
8.6.1	125	-----	-----	-----	-----	-----
Ki-1/57	137	EGMLERAERR	SYREYrpyet	erqadftaek	fpdekpgdrf	drdrplrgrg
Ki-1/57	187	gprggmrgrg	rggpgnrsvd	afdgrgkref	eryggndkia	vrtednmggc
	237	gvrtwgsgkd	tsdveptapm	eeptvveesq	gtpeeespak	vpeleveeet
	287	qvqemtldew	knlgqetrpq	pefnirkpes	tvpskavvih	kskyrddmrv
	337	ddyeddshvf	rkpanditsq	leinfgnlpr	pgrgarggtr	ggrgrirrae
	387	nnypraevvm	qdvapnpddp	edfpals		

Figura 20. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos clones encontrados na triagem de duplo-híbrido com a seqüência de Ki-1/57 humano (Dados NCBI NP_055097.1) Aminoácidos realçados em amarelo são idênticos. Programa usado: DIALIGN encontrado no site <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign>

4.9. ESTUDO DE INTERAÇÃO: ASSOCIAÇÃO DE MEF2 COM MIOSINA EM CORAÇÃO DE RATO

Para testar a interação da porção C-terminal da miosina de cadeia pesada com MEF2C encontrada na triagem de duplo-híbrido, foi feito um ensaio de imunoprecipitação. 5 mg de extrato total de ventrículo esquerdo (VE) de um “pool” de ratos controle e ratos submetidos a 6h de coarctação da aorta foram incubados com 10 µg de anticorpo anti-MEF2 (Santa Cruz) e após 8 horas de incubação, proteína A-sefarose foi adicionada ao extrato, seguido por mais 3h de incubação. As pérolas de proteína A-sefarose foram então lavadas e fervidas com tampão de Laemmli. Como controles, foram utilizados somente os extratos de VE de ratos controle e 6h de coarctação. No *Western blot* com anticorpo anti-Miosina, foi observada a presença da Miosina tanto no extrato de VE de rato como no imunoprecipitado (Figura 21). No entanto, não foi detectada nenhuma diferença quantitativa de imunoprecipitação da miosina entre extratos protéicos de ratos controle e submetidos a 6h de coarctação da aorta.

A interação entre MEF2C, um fator de transcrição, e miosina, uma proteína do citos esqueleto, ainda não foi descrita na literatura. Essa interação de MEF2C e a porção C-terminal da miosina encontrada no sistema de duplo-híbrido pode ser confirmada por ensaio de imunoprecipitação, no entanto, o papel funcional dessa interação sobre o papel regulatório de MEF2C no miócito cardíaco ainda permanece desconhecido.

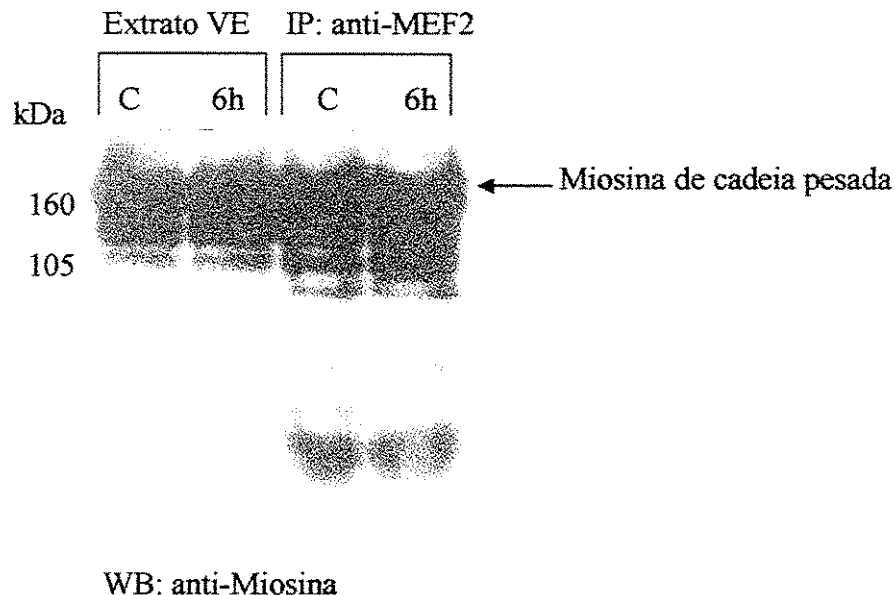


Figura 21. Miosina co-imunoprecipita com MEF2 em extrato de ventrículo esquerdo (VE) de rato controle (C) e coarctado por 6h.

4.10. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

O cDNA Mef2c da construção pBTMEF2C(1-169) foi digerido com *Bam* *HI* e subclonado no vetor pGEX5x-2, previamente digerido com *Bam* *HI*, defosforilado e purificado. Após a transformação da ligação em *E. coli* DH5 α , os clones positivos foram selecionados por digestão e a determinação da orientação do cDNA na construção foi feita por PCR de colônia. A construção denominada pGEXMEF2C(1-169) foi então transformada na cepa *BL21(RIL) Códon Plus* e testes de indução da expressão da proteína foram feitos. A expressão da proteína recombinante denominada GST-MEF2C(1-169) foi induzida pelo acréscimo de IPTG. Sua composição é de 405 aminoácidos e peso molecular

teórico de 46,8 kDa (Figura 22 A) Para sua purificação, GST-MEF2C(1-169) foi acoplada em pérolas de Glutathiona-sefarose.

A proteína recombinante GST-MEF2C(1-169) não foi isolada como banda única, mas como quatro bandas, sendo que a maior corresponde ao tamanho esperado (Figura 22 B). As outras três bandas correspondem a proteínas menores. Na tentativa de explicar a presença dessas proteínas menores, uma análise foi feita da sequência codificante da proteína GST-MEF2C(1-169). Foi observada a presença de códons de iniciação ATG em 6 posições ao longo da sequência codificante da proteína GST-MEF2C(1-169), estes AUGs poderiam ter sido reconhecidos como sítios alternativos de iniciação da tradução no ribossomo, causando a formação dos 4 polipeptídeos menores. No entanto, quando um experimento de *Western blot* com anticorpo anti-GST foi realizado, ficou claro que a presença dos polipeptídeos menores ocorreu devido à degradação C-terminal da proteína dentro da célula, senão não seriam reconhecidos pelo anticorpo. Além disso os quatro polipeptídios já estavam presentes no lisado total, antes da purificação de GST-MEF2C(1-169).

A construção contendo o cDNA inteiro de Ki-1/57 humano clonado no vetor de expressão pGEX-2T(Amersham Biosciences) denominada pGEX2TKIC foi cedida pelo Dr. Jörg Kobarg (CEBIME, LNLS, Campinas –SP). A construção pGEX2TKIC foi transformada na cepa de expressão *BL-21(RIL) Códon Plus* e a proteína recombinante GST-Ki-1/57 foi expressa pela adição de 0,5 mM de IPTG seguindo uma incubação da cultura bacteriana por 4h a 37°C. A composição da proteína recombinante GST-Ki-1/57 é de 633 aminoácidos e peso molecular teórico de aproximadamente 72 kDa, desses, 220 aminoácidos (26kDa), são originários da proteína GST, fundida N-terminalmente à sequência.

Um experimento de *Western blot* foi feito para identificação das proteínas recombinantes fundidas a GST que foram utilizadas no experimento de co-precipitação. Para tanto, lisados bacterianos que expressaram as proteínas GST, GST-MEF2C(1-169) e GST-Ki-1/57 foram incubados com pérolas de Glutathiona-sefarose por 2h a 4°C para o acoplamento e purificação das proteínas recombinantes. As pérolas foram então lavadas e fervidas com solução de Laemmli e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE. Uma réplica desse gel foi corada com azul de Coomassie para visualização das bandas protéicas (Figura 23 A) e o outro gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose para

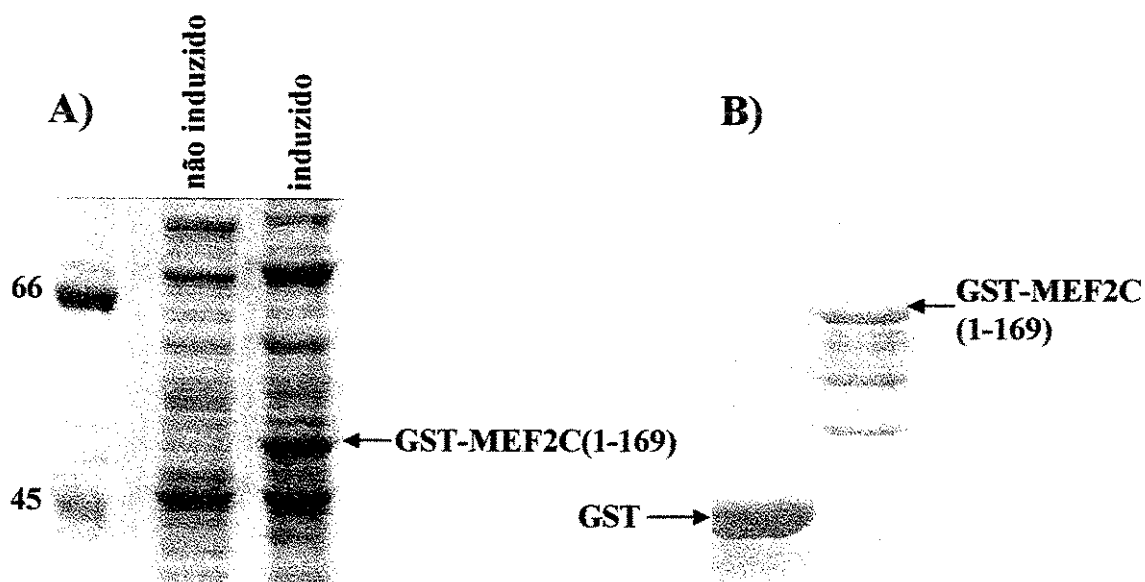


Figura 22. Expressão de GST-MEF2C(1-169)

A) SDS-PAGE corado com azul de Coomassie de extratos não induzido e induzido de bactérias transformadas com pGEX-MEF2C(1-169). B) Proteínas recombinantes GST e GST-MEF2C(1-169) purificadas.

experimento de *Western blot* visando à identificação das proteínas expressas (Figura 23 B). Todas as proteínas recombinantes purificadas fundidas a GST foram reconhecidas pelo anticorpo anti-GST de camundongo monoclonal cedido pelo Dr. Jörg Kobarg (LNLS, Campinas, SP).

4.11. ESTUDO DE INTERAÇÃO: ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO *IN VITRO*

A interação encontrada no ensaio de duplo-híbrido entre MEF2C (1-169 aa) e Ki-1/57 (1-413 aa) foi confirmada pelo ensaio de co-precipitação *in vitro*. Para tanto, as pérolas de sefarose-GSH acopladas a GST (controle) e GST-MEF2C(1-169) foram incubados com a proteína 6xHis-Ki-1/57 (Gentilmente cedida pelo Dr. Jörg Kobarg). A figura 24 demonstra que 6xHis-Ki-1/57 interage especificamente com GST-MEF2C(1-169), sem, no entanto, se ligar a proteína controle GST. Experimentos de *Western blot* com o anticorpo anti-Ki confirmaram a ligação das duas proteínas *in vitro*. Um gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie foi utilizado para a visualização das bandas protéicas e um *Western blot* com anticorpo anti-GST identificou a presença tanto da proteína controle GST como de GST-MEF2C no ensaio.

4.12. ESTUDO FUNCIONAL DA INTERAÇÃO DE MEF2 COM Ki-1/57 POR ENSAIO DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Uma reação de EMSA foi executada para avaliar o efeito de Ki-1/57 sobre a propriedade de ligação ao DNA de MEF2C *in vitro*. Para este experimento, foi utilizada a proteína recombinante GST-MEF2C(1-169) e a sonda de DNA dupla-fita MEF2 marcada radioativamente. A proteína recombinante GST-MEF2C(1-169) formou um complexo de

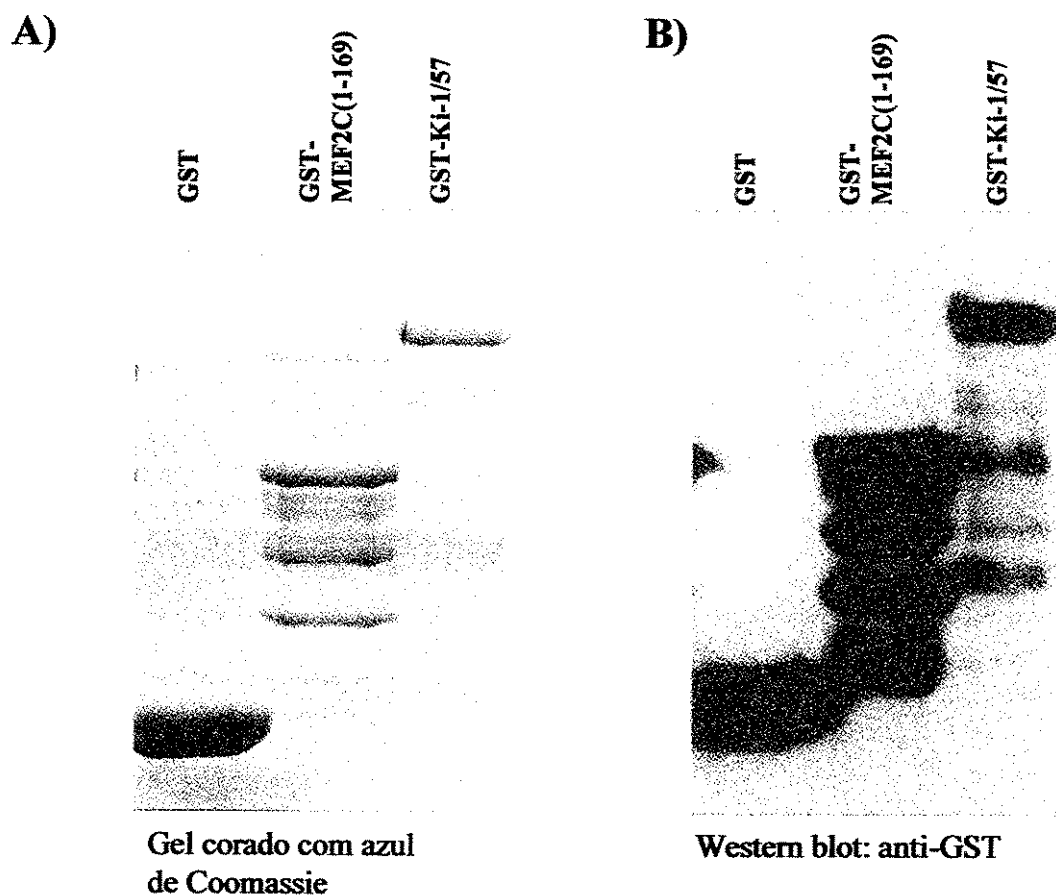


Figura 23. Proteínas recombinantes fundidas a GST são reconhecidas pelo anticorpo anti-GST. A) Gel de SDS-PAGE de proteínas recombinantes purificadas, corado com azul de Coomassie. B) Western blot da réplica do gel com anticorpo anti-GST,

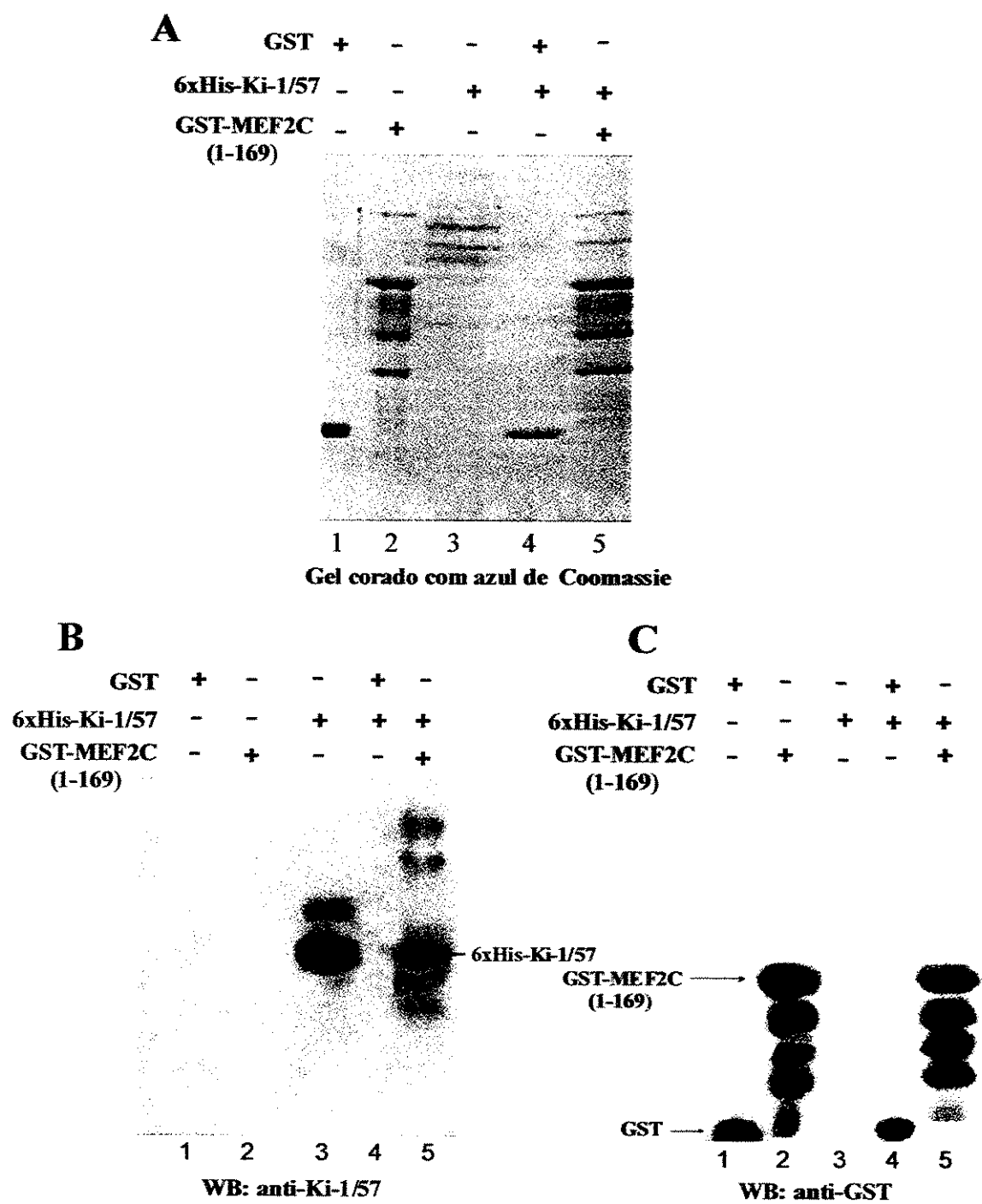


Figura 24. Ki-1/57 interage com MEF2C *in vitro*.

Ensaio de co-precipitação. A) Gel corado com azul de Coomassie com quantidade de proteínas carregadas B) Western blot com anticorpo anti-Ki-1/57 C) Western blot com anticorpo anti-GST.

ligação com a sonda de DNA, já que possui os domínios MADS-box e MEF2 que conferem as propriedades de dimerização e ligação ao DNA, demonstrando que a proteína reteve sua atividade biológica (Figura 25). O complexo DNA/proteína não se apresentou como uma banda compacta, mas como uma banda alongada, provavelmente, pela presença dos 4 polipetídeos menores da proteína GST-MEF2C(1-169) já discutidos anteriormente. A adição das proteínas recombinantes GST-Ki-1/57 e 6xHis-Ki-1/57 nos poços 4 e 6 promoveram uma diminuição na intensidade da banda de complexo DNA/proteína. A adição de GST não exerceu efeito sobre o complexo DNA/proteína formado, assim como a proteína 6xHis-RACK1, que serviu como controle. Controles feitos somente com GST, GST-Ki-1/57 e 6xHis-Ki-1/57 mais a sonda de DNA de MEF2 marcada não formaram complexos. Ficou evidente que o efeito causado pela interação das proteínas Ki-1/57 com MEF2C é inibitório sobre a formação do complexo de DNA/proteína.

No âmbito do método de EMSA, a especificidade é definida como a habilidade de uma determinada proteína de discriminar entre sua sequência alvo e outras sequências presentes no sistema. A especificidade também pode ser definida como a medida da razão da constante de afinidade da ligação ao DNA específica com a constante de afinidade da ligação inespecífica (CAREY, 1991). Para testar a especificidade de formação dos complexos entre a proteína recombinante GST-MEF2C(1-169) e sua sonda MEF2 específica, ensaios de competição utilizando 100x de excesso molar de sondas competidoras foram realizados demonstrando que a ligação da proteína é específica. A adição de anticorpo anti-MEF2 formou rastro na parte superior do complexo (Supershift) e serviu para identificar a proteína GST-MEF2C(1-169).

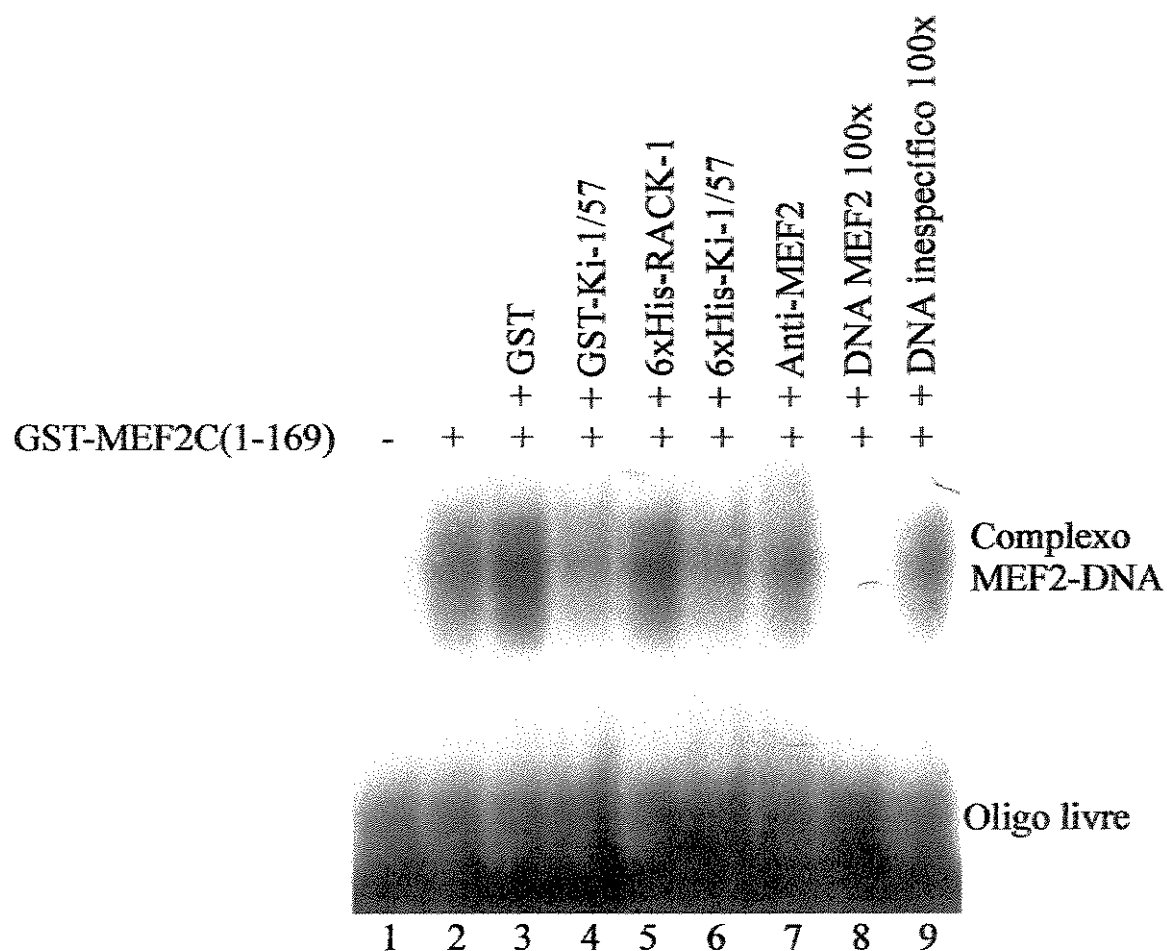


Figura 25. A interação entre MEF2C e Ki-1/57 *in vitro* inibe a ligação de MEF2C ao DNA.

Poço 1: Controle negativo; poço 2: EMSA da proteína recombinante GST-MEF2C(1-169);

poços 3 – 6: EMSA de GST-MEF2C(1-169) mais a adição da proteína indicada; poço 7:

supershift; poços 8 e 9: competição específica e inespecífica.

4.13. EXPRESSÃO DE Ki-1/57 EM CORAÇÃO DE RATO

Extratos protéicos totais de miocárdio de ratos controles e submetidos a períodos de 1 a 6h de coarctação da aorta foram extraídos, quantificados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e as membranas foram incubadas com anticorpo Anti-Ki-1/57. O *Western blot* foi revelado com [¹²⁵I]Proteína A. Na figura 26 , o aumento da expressão da proteína Ki-1/57 no coração de rato ocorre proporcionalmente ao tempo de coarctação da aorta. Num resultado anterior, já havíamos demonstrado que MEF2 não apresenta variação na expressão após a coarctação da aorta (Figura 12).

4.14. ASSOCIAÇÃO DE MEF2 E Ki-1/57 EM CORAÇÃO DE RATO

A associação de MEF2 com Ki-1/57 também foi observada *in vivo* por meio de experimento de co-imunoprecipitação de MEF2 do coração dos animais seguida de um western-blot do imunoprecipitado com anticorpo anti-Ki-1/57. A associação de MEF2 e Ki-1/57 ocorre no ventrículo esquerdo de animais controle e diminui consideravelmente após 1h de coarctação da aorta (Figura 27). Este resultado demonstra que a associação MEF2/Ki-1/57 é alterada com o estímulo mecânico no coração.

4.15. MICROSCOPIA CONFOCAL: MEF2 E Ki-1/57 SE ENCONTRAM CO-LOCALIZADOS EM MIÓCITO CARDÍACO

Em miócitos cardíacos isolados de ventrículos esquerdos de ratos controle, a marcação com anticorpo anti-MEF2 (em verde na figura 28A) demonstrou uma localização predominantemente nuclear da proteína, embora também tenha sido observada uma marcação de menor intensidade no sarcoplasma da célula seguindo um padrão de

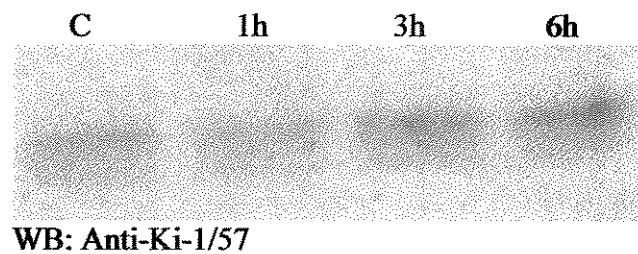


Figura 26. Análise da expressão de Ki-1/57 por Western blot em VE de ratos controle e submetidos a coarctação da aorta num período de 1 a 6h.

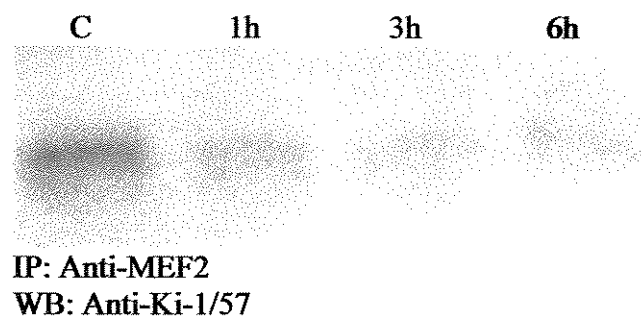


Figura 27. A associação de MEF2 com Ki-1/57 diminui com o estímulo mecânico.

Ensaio de co-imunoprecipitação de extrato protéico de VE de ratos controle e submetidos a estímulo mecânico com anticorpo anti-MEF2 e Western blot com anticorpo anti-Ki-1/57.

distribuição sarcomérico. A marcação com anticorpo anti-Ki-1/57 (figura 28B em vermelho) mostrou uma distribuição tanto nuclear como sarcoplasmática da proteína. Neste caso, a marcação de Ki-1/57 foi mais forte no sarcoplasma do que no núcleo da célula. A dupla-marcação com anticorpos Anti-MEF2 e anti-Ki-1/57 indica que MEF2 e Ki-1/57 se encontram co-localizados no núcleo de miócitos cardíacos, mas não estão co-localizados no sarcoplasma (Figura 28 C).

4.16. MICROSCOPIA CONFOCAL: A SOBRECARGA MECÂNICA REDUZ SIGNIFICATIVAMENTE A CO-LOCALIZAÇÃO DE MEF2 E Ki-1/57 EM MIÓCITOS CARDÍACOS

Miócitos cardíacos isolados de ratos submetidos a coarctação da aorta também foram marcados com anticorpo anti-MEF2 e anti-Ki-1/57 para estudos de co-localização. Neste caso, foi notada uma diminuição de MEF2 (Figura 28D) no sarcoplasma assim como uma diminuição de Ki-1/57 (Figura 28E) no núcleo, onde a co-localização das duas proteínas dentro do núcleo não pode mais ser detectada (Figura 28F).

4.17. FRACIONAMENTO SUBCELULAR

Para confirmar os resultados de localização de Ki-1/57, foi feito um ensaio de fracionamento celular seguindo a metodologia descrita por MIZUKAMI et al, (1997). Foram utilizados corações de ratos controle e submetidos a 6h de coarctação da aorta para o fracionamento. O *Western blot* com anticorpo anti-Ki-1/57 da figura 29 demonstra que no coração de animais controle, Ki-1/57 se encontra tanto no núcleo como no sarcoplasma. Enquanto que no coração de animais submetidos a 6h de coarctação, Ki-1/57 praticamente

desapareceu da fração nuclear. Este resultado está de acordo com os obtidos na microscopia confocal.

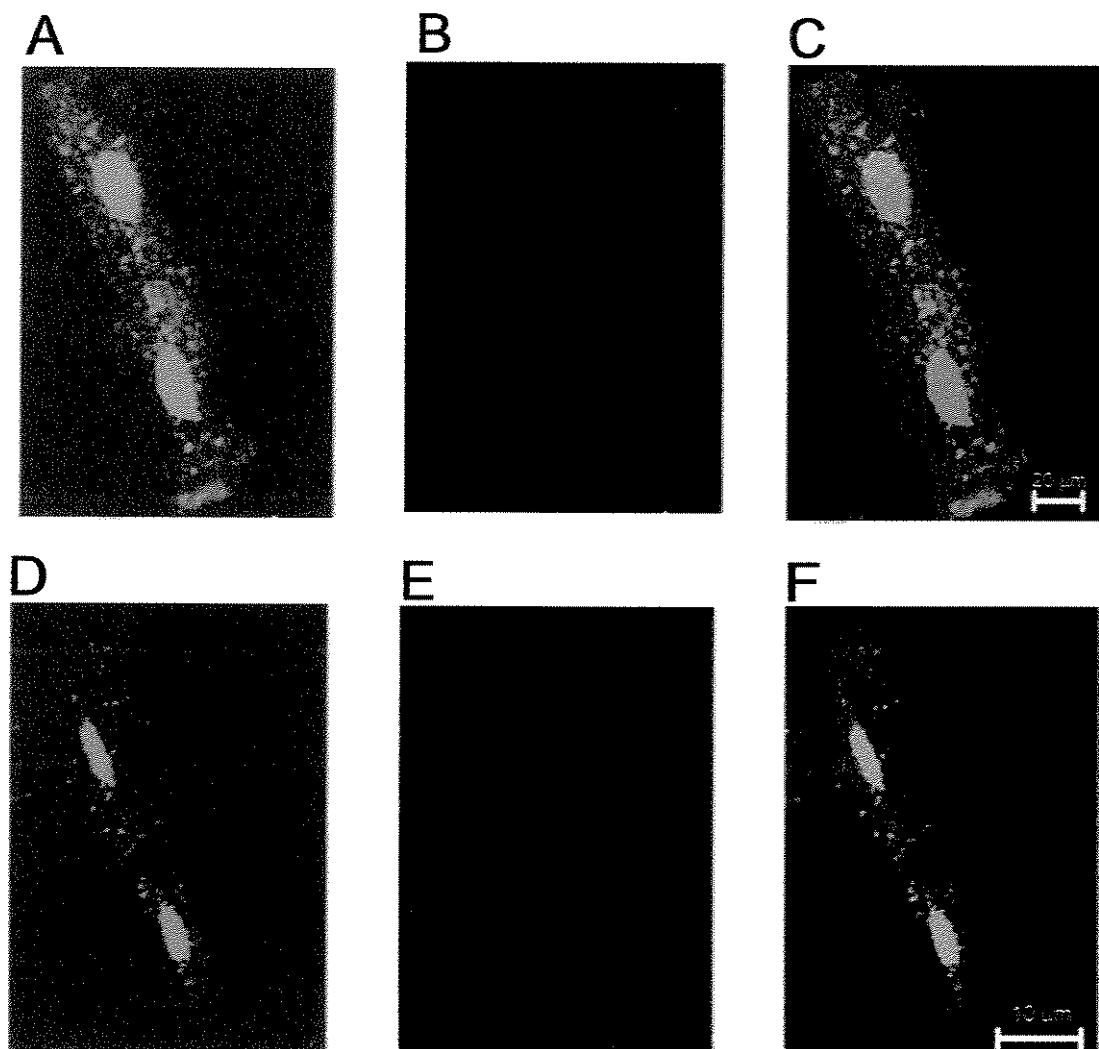


Figura 28. Imunolocalização de MEF2 (verde) e Ki-1/57 (vermelho) em cardiomiócitos de ratos adultos isolados avaliada por Microscopia Confocal a Laser.

A) Miócitos isolados de ratos controles marcados com anticorpo anti-MEF2, B) Miócitos isolados de ratos controles marcados com anticorpo anti-Ki-1/57; C) Sobreposição de imagens de A e B. D) Miócitos isolados de ratos coarctados por 1 h

marcados com anticorpo anti-MEF2; E) Miócitos isolados de ratos coarctados marcados com anticorpo anti-Ki-1/57, F) Sobreposição de imagens de D e E.

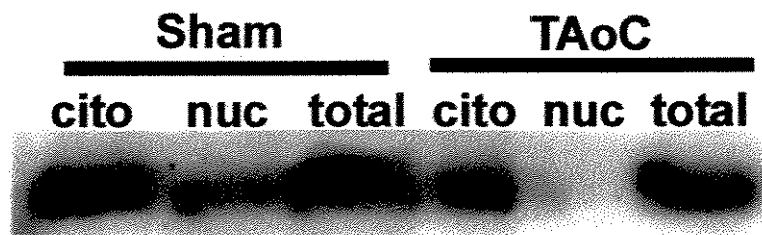


Figura 29. Ki-1/57 diminui no núcleo de miócitos de ratos submetidos à coarctação da aorta. Fracionamento subcelular de ventrículo esquerdo de ratos controle (Sham) e submetidos a 6h de coarctação da aorta transversa (TAoC). Cito: fração citosólica, Nuc: fração nuclear e total: fração citosólica e nuclear.

5. DISCUSSÃO

5.1. EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DOS FATORES MEF2 EM MIOCÁRDIO DE RATOS POR SOBRECARGA MECÂNICA

O modelo experimental de sobrecarga mecânica por coarctação da aorta, com diminuição do diâmetro da mesma, já foi amplamente utilizado na indução de sobrecarga e resposta hipertrófica do miocárdio e causa aumento imediato da resistência ao fluxo sanguíneo, impondo uma carga adicional de trabalho ao coração (FRANCHINI et al, 2000; TORSONI et al, 2003; SCHMITT et al, 2003).

A expressão de MEF2 em ventrículo esquerdo de animais controle e coarctado não apresentou diferença por Western blot. Assim a expressão dos quatro fatores de transcrição da família MEF2 foi avaliada pela técnica de RT-PCR sob diferentes tempos de coarctação da aorta em coração de rato adulto. Os resultados demonstram que não houve aumento na expressão de MEF2A, MEF2C e MEF2D com tempos de até 4h de coarctação da aorta. No entanto, após 24h, notamos um decréscimo na expressão de MEF2A e um aumento na expressão de MEF2D. A expressão de MEF2C se manteve praticamente inalterada durante o tempo do experimento. A expressão de MEF2B não foi observada em animais controle, nem coarctados por diferentes intervalos de tempo. A diminuição na expressão de MEF2A também já foi observada em hipertrofia induzida por administração de isoproterenol após 8h de tratamento, assim como a ausência de expressão de MEF2B em coração de ratos adultos. (PESTI E MORISCOT, 2002). Parece que o mecanismo de regulação da atividade dos fatores MEF2 não depende do seu nível de expressão, mas do controle de sua localização e de sua atividade transcricional, possivelmente através de modificações pós-traducionais como, por exemplo, a fosforilação (YU, 1996). Podemos citar a ativação de MEF2D pela fosfatase CamK (BLAESER et al, 2000) que fosforila MEF2D, aumentando assim sua atividade transcricional. No entanto, o efeito regulatório sobre MEF2D é basicamente

devido a sua ação sobre as Histona Deacetilases, conforme será discutido posteriormente (McKINSEY et al, 2002).

Para confirmar se a sobrecarga mecânica seria um estímulo suficiente para ativação do fator de transcrição MEF2, experimentos de EMSA (*Eletrophoretic Mobility Shift Assay*) foram realizados com extratos nucleares de coração de animais submetidos à coarctação da aorta por diferentes tempos. Os resultados da figura 14 demonstram que o extrato de coração que sofreu coarctação a partir de 10 min já apresentou um aumento da ligação entre a proteína MEF2 com sua sequência consenso de DNA em relação ao controle. A formação do complexo DNA/proteína ficou ainda mais pronunciada com extratos de coração submetidos à uma hora ou mais de coarctação da aorta. Um possível mecanismo de regulação da atividade de MEF2 é a modulação de sua afinidade de ligação ao DNA (WU & OLSON, 2002). Já foi verificado, que o aminoácido Ser59, situado entre os domínios MADS Box e MEF2 é fosforilado tanto *in vivo* como em *in vitro* na proteína MEF2C. A fosforilação da Ser59 de MEF2C pela Caseína Quinase II (CKII) aumenta a atividade de ligação ao DNA, assim como a transcrição mediada por MEF2C (MOLKENTIN et al., 1996). Além deste, outros resíduos situados na região C-terminal de MEF2C podem ser potencialmente fosforilados, no entanto, os efeitos dessa fosforilação sobre a afinidade de ligação ao DNA, ainda não são conhecidos. Tampouco se sabe a fosforilação de MEF2C seria responsável pelo aumento relativo de sua afinidade ao DNA após o estímulo mecânico. Assim, os resultados indicam que a sobrecarga mecânica no coração aumenta a afinidade de ligação ao DNA do fator de transcrição MEF2.

5.2. ESCOLHA DO MUTANTE DE DELEÇÃO DE MEF2C PARA ENSAIO DE DUPLO-HÍBRIDO

No ensaio para definir qual mutante de deleção seria empregado como “isca” no sistema de duplo-híbrido, as construções pBTMEF2C(1-169), pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-432), pBTMEF2C(107-229) e pBTMEF2C(107-357) foram co-transformadas com o vetor pGADT7-rec vazio na cepa *L40* da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Houve auto-ativação do promotor do gene repórter *lacZ* por três dos cinco mutantes de deleção testados: pBTMEF2C(1-357), pBTMEF2C(1-432) e pBTMEF2C(107-357) que foram desconsiderados para o ensaio de duplo-híbrido. A presença de auto-ativação do gene repórter pode significar que a proteína de fusão LexA-MEF2C autoativou o sistema, pois sendo um fator de transcrição, também possui um domínio de ativação C-terminal. Outra possibilidade, embora menos provável, é que LexA-MEFC interagiu com o domínio de ativação GAL4 do vetor vazio da biblioteca.

O primeiro estudo de mapeamento das regiões de ativação transcricional de MEF2C foi feito por MOLKENTIN e colaboradores (MOLKENTIN et al, 1996b) em células 10T1/2 com um repórter de MCK, usando mutantes de deleção fundidos a proteína GAL4. Este estudo demonstrou que mutantes de deleção contendo os aminoácidos 1-198 apresentavam cerca de 70% da atividade transcricional de MEF2C inteiro, enquanto que os que tinham apenas os aminoácidos 1-143 apresentavam apenas 2% da atividade. Também foi demonstrado por MOLKENTIN et al. (1996b) que os aminoácidos 144-465 são importantes para a ativação transcricional.

Nossos resultados da transativação encontrados, estão de acordo com os resultados publicados por JANSON e colaboradores (JANSON et al, 2001). Janson e colaboradores demonstraram em seus estudos de mapeamento de regiões regulatórias de MEF2C que um

forte domínio de ativação transcricional está situado entre os aminoácidos 312-350 dessa proteína. Os dados de Janson também indicam um domínio inibitório de transcrição entre os aminoácidos 386 a 473. Este fenômeno também foi observado, já que o mutante de deleção contendo os aminoácidos 1-357, quando co-transformado com pGADT7-rec vazio transativou fortemente o promotor de *his3* possibilitando o crescimento da levedura, mesmo em altas concentrações do inibidor 3-AT (3-amino-1,2,3-triazol - um inibidor da rota de síntese da histidina) enquanto que o mutante contendo os aminoácidos 1-432 foi sensível às concentrações mais altas do inibidor (Dado não mostrado). Também segundo Janson e colaboradores, a ativação de genes repórter foi mínima em mutantes contendo as deleções C-terminal nos aminoácidos 169 ou anteriores, o que também está de acordo com nossos resultados.

5.3. INTERAÇÃO DE MEF2C COM MIOSINA

O aparecimento do cDNA de miosina foi interpretado inicialmente como artefato, já que a quantidade relativa de miosina na biblioteca de cDNA de coração de rato adulto é, provavelmente, alta. No entanto, a repetição do resultado e o fato de somente a região C-terminal da miosina de cadeia pesada aparecer nos clones seqüenciados, aliado à especulação na literatura sobre o envolvimento de proteínas do citoesqueleto na mecanotransdução de sinais, nos levou a considerar a interação MEF2-Miosina como um possível mecanismo a ser explorado.

Atualmente, a superfamília da miosina se encontra agrupada em quinze classes e as miosinas musculares ou "convencionais" pertencem à classe II (SELLERS, 2000). A miosina muscular contém duas cadeias pesadas (MHC) de aproximadamente 220 kDa e quatro cadeias leves (MLC) de aproximadamente 20 kDa. A molécula de miosina inteira é

geralmente caracterizada em duas regiões funcionais: a cabeça e a cauda. As regiões N-terminais de cada cadeia pesada e de duas cadeias leves formam o domínio da cabeça, chamado fragmento S1 (MILLIGAN, 1996). O fragmento S1, formador do domínio do motor catalítico é conservado em vários organismos, assim como entre outras classes de miosinas (SELLERS E GOODSON, 1995) e contém os sítios de ligação para actina e nucleotídeos. A região C-terminal das duas cadeias pesadas formam a longa cauda. A extremidade C-terminal da cauda, também conhecida por meromiosina leve, contém domínios "coiled coil" envolvidos na polimerização da miosina. Existem várias isoformas de miosina provindas da combinação de isoformas de cadeias leves e pesadas. Por exemplo, a miosina de cadeia pesada β é expressa no ventrículo cardíaco assim como no músculo esquelético enquanto que a miosina de cadeia pesada α é principalmente expressa nos átrios do músculo cardíaco. Os fatores envolvidos na regulação da expressão de isoformas de miosina no coração incluem o hormônio da tireóide e condições de sobrecarga (CLARK et al, 2002).

O fator MEF2 é conhecido por, junto com outros fatores de transcrição, regular a expressão da miosina se ligando a regiões consenso no promotor da mesma. A interação de um fator de transcrição da família MEF2, uma proteína predominantemente nuclear, com a miosina que é exclusivamente encontrada no citoesqueleto, parece pouco provável de ocorrer. No entanto a descoberta de uma nova classe de miosinas chamada de miosina "não convencional" demonstrou a possibilidade deste tipo de interação estar realmente ocorrendo. As chamadas miosinas "não convencionais" apresentam diferentes funções, em potencial, como a regulação do crescimento celular e do desenvolvimento (Myo3p de levedura), da diferenciação leucocitária (M9b humana), do transporte de RNA (Myo4p de levedura), e da

sinalização celular (myr5 de rato) (MERMALL et al, 1998). Já foi encontrada uma isoforma de miosina I no núcleo de fibroblastos de rato. Uma análise mais apurada demonstrou que essa isoforma de miosina I parece formar complexos com a RNA polimerase II e poderia afetar a transcrição (PESTIC-DRAGOVICH et al, 2000).

Um exemplo de interação entre fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto é o do fator NF-3AT. Este fator exibe uma localização dupla, no núcleo e ligado à linha Z do músculo esquelético. Sua translocação nuclear é regulada durante o desenvolvimento e pela atividade das fibras musculares maduras (LIU et al, 2001). O fator NF-AT3 é provavelmente ligado à linha Z pela interação com a calcineurina, uma proteína fosfatase cálcio-dependente que pode defosforilar NF-3AT, ativando-o e permitindo sua entrada no núcleo. (FREY et al, 2000; OLSON et al, 2000). Os fatores de transcrição NF-AT e a calcineurina são mediadores bem caracterizados de hipertrofia em músculo esquelético e cardíaco (OLSON et al, 2000) indicando que este mecanismo provavelmente seja crítico para a função de miócitos normais (CLARK et al, 2002).

A interação de MEF2C com miosina e a interação de fatores NFAT com proteínas do citoesqueleto também chama a atenção por um mecanismo de ativação de MEF2 calcineurina-dependente que envolve o recrutamento de fatores NFAT. Quando defosforilada pela Calcineurina, NFATc2 é translocada para o núcleo onde se associa diretamente com MEF2A e -D (BLAESER et al, 2000). NFATc2 estimula a transcrição dependente de MEF2 por facilitar o recrutamento dos co-ativadores p300 para os elementos de resposta a MEF2 no promotor dos genes (YOUN et al, 2000).

5.4. INTERAÇÃO DE MEF2C COM Ki-1/57

Continuando com o sequenciamento de clones positivos para interação na triagem de duplo-híbrido, obtivemos quatro seqüências de cDNA de rato que apresentaram mais de 90% de identidade com a região N-terminal de uma proteína denominada Ki-1/57 de origem humana e que apresenta 413 aminoácidos.

A proteína Ki-1/57 humana foi inicialmente isolada de células Sternberg-Reed de linfoma de Hodgkin como uma molécula de 57 kDa que apresentou reatividade cruzada com o anticorpo Ki-1 anti-CD30 (SCHWAB et al., 1982; HANSEN et al, 1989; FROESE et al, 1987, KOBARG et al, 1987). Análises de microscopia eletrônica demonstraram que Ki-1/57 está localizada no citoplasma, nos poros nucleares e no núcleo da célula, onde está freqüentemente associada com o nucléolo (RHODE et al., 1992). Ki-1/57 também é chamada de *Intracellular Hyaluran-Binding Protein 4* (IHABP4) por sua capacidade de se ligar ao ácido hialurônico *in vitro* (HUANG et al, 2000).

A função de Ki-1/57 ainda é desconhecida, no entanto a procura no banco de dados com o cDNA de Ki-1/57 revelou uma proteína chamada CGI-55 com 40,7% de identidade e 67,4% de similaridade com a seqüência de aminoácidos de Ki-1/57 (LEMOS et al, 2003). Este alto grau de similaridade sugere que as duas proteínas podem ser parálogas e podem exercer funções semelhantes na célula. CGI-55 também já foi descrita por se ligar a região 3' do RNA mensageiro que codifica a proteína *Plasminogen Activator Inhibitor type 1* (PAI-1), sendo portanto conhecida como PAI-RBP1 (*Plasminogen Activator Inhibitor – mRNA Binding Protein 1*). Foi especulado que CGI-55 poderia estar envolvida na estabilização do mRNA de PAI-1 (KRUIHOF, 1988; HEATON et al, 2001). PAI-1, por sua vez, reduz a conversão de plasminogênio em plasmina e tem sua expressão aumentada em ratos hipertensos via receptor de angiotensina II (CHEN et al, 2000). Esses dados

sugerem que se Ki-1/57 e CGI-55 forem realmente proteínas parálogas, elas poderiam estar envolvidas em vias de sinalização que levam à hipertrofia cardíaca. Além disso, também foi descrita a interação de Ki-1/57 com a proteína regulatória RACK1 (Receptor of Activated Protein Kinase C 1) (NERY et al., 2004). No mesmo artigo, foi demonstrada a associação de PKC com Ki-1/57 após estimulação de células L540 com PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*). Ki-1/57, quando fosforilada por PKC, deixa de interagir com RACK1 e sai do núcleo. PMA, por sua vez é um agonista hipertrófico bem caracterizado, atuando *downstream* dos receptores de membrana para ativar as isoenzimas de PKC (VIJAYAN et al, 2004).

RACK1 se encontra ativada em carcinomas humanos e em regeneração de tecidos após isquemia renal (BERNS et al, 2000). Além disso, RACK1 já foi implicada funcionalmente no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca não patológica através das PKCs δ e ϵ (CHEN et al, 2001). A interação entre PKC ϵ e RACK1 parece estar relacionada como o fenótipo hipertrofiado de coração em camundongo (PASS et al., 2001). A família de isoenzimas de proteínas quinases C (PKC) já foi descrita como indutora de síntese proteica e mudanças na expressão gênica cardíaca durante a hipertrofia do cardiomiócito (BOGOYEVITCH E SUGDEN, 1996; JALILI et al, 1999).

As principais isoenzimas de PKC que são expressas em cardiomiócitos de mamíferos incluem as PKC α e PKC β , assim como as PKC δ e PKC ϵ . A ligação de cada isoenzima de PKC a sua proteína receptora específica (RACK1) ativa a enzima, promovendo sua translocação para o sítio subcelular onde a mesma poderá desempenhar sua função (CHEN et al, 2001). PMA induz a translocação nuclear de PKC α e esta é tanto necessária, quanto suficiente para o aumento da síntese protéica, assim como para o

aumento na área superficial da célula, que são características da hipertrofia do cardiomiócito (VIJAYAN et al, 2004).

Ensaio de duplo-híbrido demonstraram que a proteína Ki-1/57 também interage com a proteína CHD3 (*Chromatin Helicase-DNA-binding Domain protein 3*) (LEMOS et al, 2003). As proteínas CHD são membros de uma família de proteínas envolvidas na regulação da transcrição e no remodelamento da cromatina.

A interação entre MEF2C and Ki-1/57 foi confirmada *in vivo* por ensaio de co-imunoprecipitação em coração de ratos. A associação entre MEF2 e Ki-1/57 decresce drasticamente quando os animais são expostos à 1h ou mais de sobrecarga mecânica por coarctação da aorta. A dissociação de MEF2 com Ki-1/57 por sobrecarga mecânica é acompanhada por aumento da expressão de Ki-1/57 em coração de ratos a partir de 3h de coarctação da aorta. Um ensaio de co-precipitação com as proteínas recombinantes GST-MEF2C(1-169) e 6x-His-Ki-1/57 também confirmou a interação destas duas proteínas *in vitro*.

A dissociação de MEF2 com Ki-1/57 em resposta a sobrecarga mecânica também foi observada em estudos de imunocitoquímica com microscopia confocal a laser. Em miócitos isolados de ratos controle, MEF2 foi localizada predominantemente no núcleo, embora também tenha sido observada uma marcação de menor intensidade no sarcoplasma da célula seguindo um padrão de distribuição sarcomérico. A marcação de Ki-1/57 mostrou uma distribuição tanto nuclear como sarcoplasmática da proteína. Neste caso, a marcação de Ki-1/57 foi mais forte no sarcoplasma do que no núcleo da célula. A dupla-marcação com anticorpos Anti-MEF2 e anti-Ki-1/57 indicou que MEF2 e Ki-1/57 se encontram co-localizados no núcleo de miócitos cardíacos, mas não apareceram co-localizados no sarcoplasma da célula.

Miócitos cardíacos isolados de ratos submetidos a coarctação da aorta também foram marcados com anticorpo anti-MEF2 e anti-Ki-1/57 para estudos de co-localização. Neste caso, foi notada uma diminuição de MEF2 no sarcoplasma assim como uma diminuição de Ki-1/57 no núcleo, onde a co-localização das duas proteínas não pode mais ser detectada. Este último resultado foi confirmado por um experimento de fracionamento celular de corações de ratos controle e submetidos a coarctação da aorta. Os extratos subcelulares foram submetidos a Western blot com anticorpo anti-Ki-1/57 e o resultado deste indica uma diminuição significativa da proteína no núcleo da célula de animais coarctados em relação aos animais controle.

É interessante notar que no mesmo período de tempo, 1 hora, em que foi observada a dissociação de MEF2 e Ki-1/57 por coarctação da aorta em coração de ratos, MEF2 é ativado e tem a afinidade por seu DNA aumentada, observada como um aumento significativo do complexo DNA/proteína no ensaio de EMSA (NADRUZ et al, 2003).

Para avaliar o efeito de Ki-1/57 sobre a propriedade de ligação ao DNA de MEF2C, um ensaio de EMSA foi feito utilizando as proteínas recombinantes GST-MEF2C(1-169) e GST-Ki-1/57. A proteína recombinante GST-MEF2C(1-169) formou complexo de ligação com a sonda de DNA, demonstrando que a proteína reteve sua atividade. A adição da proteína GST-Ki-1/57 ou 6xHis-Ki-1/57 na reação de ligação, promoveu uma diminuição na intensidade da banda de complexo DNA/proteína. A adição de GST não exerceu efeito sobre o complexo DNA/proteína formado, assim como a proteína 6xHis-RACK1, que serviu como controle. Ficou evidente que o efeito causado pela interação das proteínas Ki-1/57 com MEF2C é inibitório sobre a formação do complexo de DNA/proteína.

Provavelmente, a inibição causada por Ki-1/57 se estenda sobre a transcrição de genes regulados pelos fatores MEF2. Já foi relatado anteriormente por nosso grupo que o

estímulo mecânico ativa MEF2 no miocárdio. Também foi observado que em corações de ratos transfectados com construções contendo ou não os sítios AP-1 e MEF2 do promotor de *c-jun* acoplado ao gene repórter, a ativação dos fatores MEF2 é essencial para a ativação transcricional de *c-jun* induzida por estímulo mecânico (NADRUZ et al, 2003).

Os fatores MEF2 podem ser regulados a nível transcricional e pós-transcricional. (BLACK e OLSON, 1998). As MAP Quinases p38 e ERK5 apresentam efeito regulatório sobre os fatores MEF2 (YANG et al, 1998; KATO et al, 2000). Além dessas enzimas, também são conhecidas algumas proteínas repressoras de MEF2 que regulam sua atividade transcricional negativamente como MITR (*MEF2 Interacting Transcription Repressor*) (ZHANG et al, 2001) e HDACs (Histonas Deacetilases da classe II) (ZHANG et al.,2002). O mecanismo de acetilação/deacetilação de histonas já foi amplamente descrito na literatura como um mecanismo fundamental de regulação de transcrição e postula que a acetilação de histonas pelas HATs (Histonas Acetilases) resulta no relaxamento das estruturas do nucleossomo, estimulando a transcrição, enquanto que as Histona-Deacetilases (HDACs) exercem um efeito antagônico, reprimindo a transcrição (KORNBERG, 1999).

A associação entre HDAC4 e MEF2 foi relatada independentemente por dois grupos em 1999: MISKA e colaboradores observaram que MEF2A co-imunoprecipita e se co-localiza com HDAC4 *in vivo* e que a transcrição dependente de MEF2 é reprimida pela atividade de deacetilase de HDAC4 (MISKA et al, 1999). WANG e colaboradores acharam evidências que MEF2C recruta HDAC4 para reprimir a transcrição (WANG et al, 1999). Uma das hipóteses regulatórias dos fatores MEF2 apresentada por McKINSEY e colaboradores, diz que a regulação da miogênese depende de HDAC5, uma Histona

Deacetilase da classe II que mantém MEF2 reprimido no núcleo. HDAC5 só libera MEF2 quando for fosforilada pela Calmodulina Quinase (CaMK), estimulando assim a migração de HDAC5 para o citoplasma e liberando MEF2 para cooperar com MyoD, ativando os genes requeridos para a miogênese (McKINSEY et al, 2000).

Ki-1/57 apresenta um padrão de tráfico núcleo-citoplasmático semelhante a HDAC4 quando fosforilada por PKC (NERY et al, 2004). No entanto, a inibição que Ki-1/57 exerce sobre MEF2 parece ser diferente das HDACs. A inibição que HDAC4 exerce ocorre sem interferir na ligação de MEF2 ao seu DNA consenso (CHAN et al, 2003).

A repressão da ligação de MEF2 ao seu DNA já foi observada com a proteína Notch. O receptor transmembrana Notch interfere com a atividade muscular induzida por fatores miogênicos bHLH. Uma forma ativada de Notch bloqueia a ligação de MEF2C ao seu DNA, assim como sua habilidade de cooperar com os fatores MyoD e miogenina para ativar a miogênese (WILSON-RAWLS et al, 1999).

Os resultados encontrados nos levam a crer que a interação de MEFC com Ki-1/57 possa ter importância funcional na regulação de MEF2C durante o processo de hipertrofia cardíaca.

6. CONCLUSÃO

- 1) Os fatores MEF2 são ativados por estímulo mecânico no miocárdio. Essa ativação ocorre por um aumento de formação de complexo DNA/Proteína em ensaios de EMSA. No entanto, não houve aumento na expressão dos fatores MEF2 após as primeiras horas de estimulação mecânica.
- 2) Em uma triagem de duplo-híbrido de biblioteca de coração de rato com a “isca” MEF2C(1-169) de rato foram isolados 4 clones contendo o cDNA codificante de uma região C-terminal da miosina de cadeia pesada e 4 clones de uma região N-terminal da proteína reguladora Ki-1/57.
- 3) A interação entre MEF2C e miosina foi confirmada por imunoprecipitação. A interação entre MEF2C e Ki-1/57 foi confirmada por imunoprecipitação, co-precipitação e análise microscópica da imuno-co-localização.
- 4) O estímulo mecânico não interfere na associação de MEF2 com a miosina, enquanto que a associação entre MEF2 e Ki-1/57 diminui após o estímulo mecânico em coração de ratos.
- 5) A interação de Ki-1/57 com MEF2C apresenta caráter inibitório, pois diminui a capacidade de ligação ao DNA de MEF2C. Essa inibição foi visualizada pela adição da proteína Ki-1/57 num ensaio de EMSA, resultando na diminuição da formação do complexo DNA/Proteína de MEF2C com sua região consenso de DNA.
- 6) MEF2 e Ki-1/57 se encontram tanto no núcleo, como no citoplasma de miócitos cardíacos. Em situação controle, essas duas proteínas se encontram co-localizadas

predominantemente no núcleo. No entanto, a quantidade de Ki-1/57 no núcleo diminui consideravelmente após estímulo mecânico no coração, não sendo mais possível se observar a co-localização de Ki-1/57 com MEF2 no núcleo dos miócitos nesta situação.

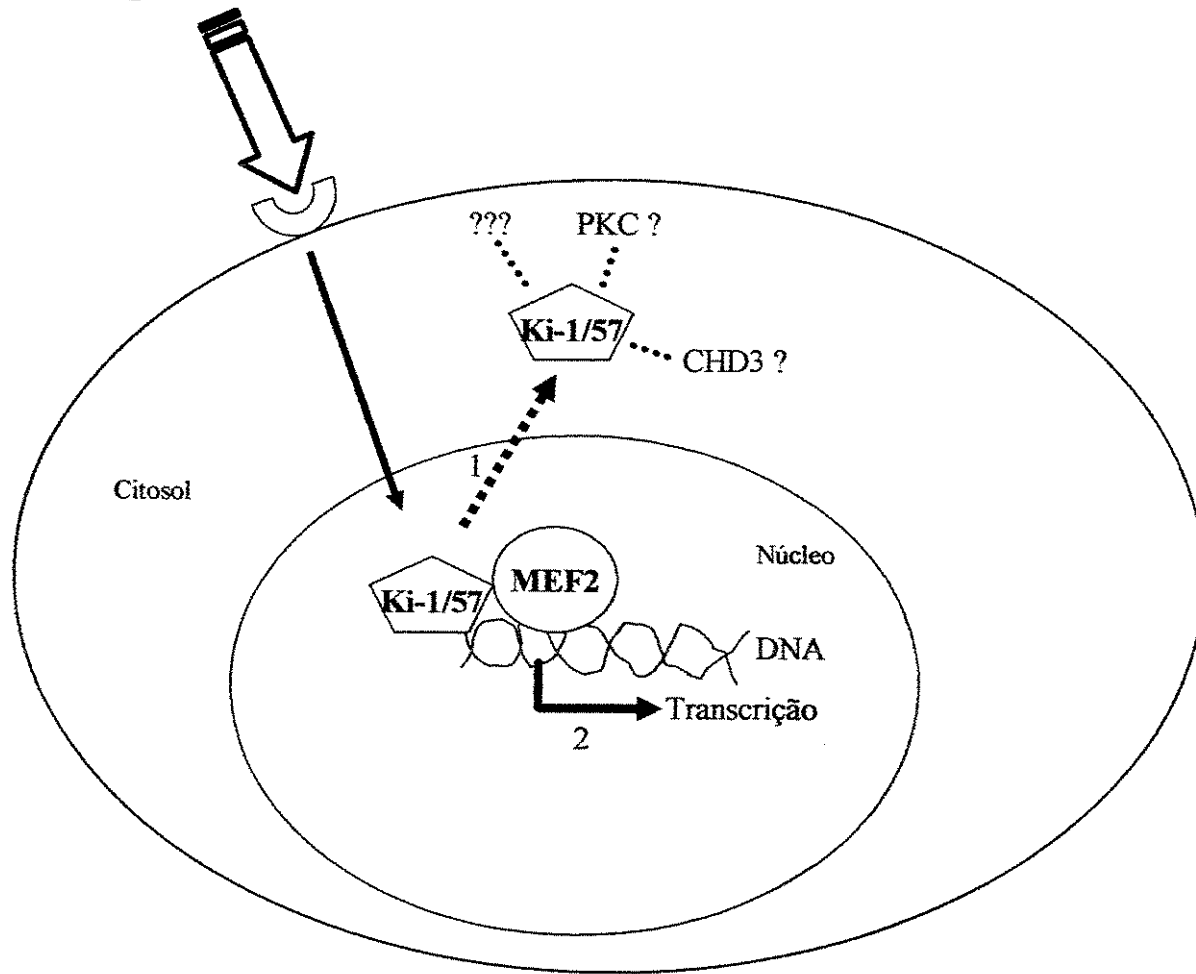
Os resultados demonstram claramente o efeito inibitório de Ki-1/57 sobre MEF2, sendo que esse efeito parece ser regulado por estímulo mecânico. O estímulo mecânico inibe a associação das duas proteínas, assim como sua co-localização no núcleo de miócitos, possivelmente liberando MEF2 para atuar na transcrição de genes músculo-específicos. Um mecanismo semelhante de inibição dos fatores MEF2 já foi relatado com as Histona-Deacetilases de classe II (HDACs) (Mc KYNSEY et al, 2000). Neste caso, a inibição da ligação ao DNA de MEF2 por sua região consenso de DNA não foi observada.

Parece que a interação de MEF2 com Ki-1/57 apresenta um novo mecanismo de sinalização para a regulação de MEF2. Esse novo mecanismo responde ao estímulo mecânico no miocárdio.

Propomos um modelo baseado no modelo de McKINSEY e colaboradores (McKINSEY et al, 2000) em que a fosforilação da HDAC5 pela CamK seria responsável pela saída da HDAC5 do núcleo, liberando MEF2 para a transcrição.

No nosso modelo (Figura 30), a sobrecarga mecânica no coração do rato induziria a uma dissociação da interação entre MEF2 e Ki-1/57 no núcleo do miócito e a ativação de MEF2. Com a sobrecarga mecânica, Ki-1/57 sofreria alguma mudança pós-traducional por meio de outras proteínas prováveis (PKC?, CHD3?, ???) e sairia do núcleo da célula, cessando seu efeito inibitório sobre MEF2. MEF2 por sua vez, ficaria liberado para a transcrição de genes específicos pelo aumento de afinidade com seu DNA consenso.

**Estímulo hipertrófico por
sobrecarga mecânica**



- 1) Saída de Ki-1/57 do núcleo por mecanismo ainda não determinado (Fosforilação por PKC? Associação com CHD3?).
- 2) Aumento da ligação de MEF2 ao seu DNA, ativando assim a transcrição de genes regulados por MEF2.

Figura 30. Modelo esquemático do mecanismo proposto de inibição de Ki-1/57 sobre MEF2 e sua liberação através da sobrecarga mecânica em coração de rato.

7. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTONE, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMEN, J.G.; SMITH, J.A.; STUHL, K. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*. **John Wiley & Sons, Inc.** 1995

BERNS, H.; HUMAR, R.; HENGERER, B.; KIEFER, F. N.; BATTEGAY, E. J. *RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas*. **FASEB J.** 14, 2549-2558, 2000.

BLACK, B.L.; OLSON, E.N. *Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins*. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** 14:167-96, 1998.

BLAESER, F.; HO, N.; PRYWES, R.; CHATILA, T.A. *Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors*. **J. Biol. Chem.** 275, 197-209, 2000.

BOGOYEVITCH, M.A.; SUGDEN, P. H. *The role of protein kinases in adaptational growth of the heart*. **Int J Biochem Cell Biol** 28: 1-12, 1996.

BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding*. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

BREITBART, R.E.; LIANG, C.S.; SMOOT, L.B.; LAHERU, D.A.; MAHDAVI, V.; NADAL-GINARD, B. *A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage*. **Development** 118:1095-1106, 1993.

CHAN, J.K.L.; SUN, L.; YANG, X-J.; WU, Z. *Functional characterization of an amino-terminal region of HDAC4 that possesses MEF2 binding and transcriptional repressive activity*. **J Biol .Chem.** 278, (26):23515-23521, 2003.

CHEN, H-C.; BOUCHIE, J.L.; PEREZ, A.S.; CLERMONT, A.C.; IZUMO, S.; HAMPE, J.; FEENER, E.P. *Role of angiotensin AT1 receptor in rat aortic and cardiac PAI-1 gene expression*. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 20:2297-2302, 2000.

CHEN, L.; HAHN, H.; WU, G.; CHEN, C-H.; LIRON, T.; SCHECHTMAN, D.; CAVALLARO, G.; BANCI, L.; GUO, Y.; BOLLI, R.; DORN, II G.W.; MOCHLY-ROSEN, M. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of δ PKC and PKC ϵ . **Proc. Nat. Acad. Sciences USA**, 98 (20):11114-11119, 2001.

COOPER, G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. **Annu. Rev. Med.** 48:13-23, 1997.

CAREY, J. Gel Retardation. **Methods in Enzimology**, 208: 103-117, 1991.

CLARK, K.A.; McELHINNY, A. S.; BECKERLE, M.C.; GREGORIO, C.C. Striated Muscle Cytoarchitecture:an intricate web of form and function. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**, 18:637-706, 2002.

FRANCHINI, K. G.; TORSONI, A. T.; SOARES, P. H. A.; SAAD, M. J.. A. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ. Res.** 87:558-565, 2000.

FREY, N.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. **Proc. Nat. Acad. Sciences USA**, 97:14632-37. 2000.

FROESE, P.; LEMKE, H.; GERDES, J.; HAVSTEEN, B.; SCHWARTING, R.; HANSEN, H.; STEIN, H. Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus transformed human B and T lymphoid cell lines. **J. Immunol.** 139, 2081-2087, 1987.

GROSSMAN, W. Cardiac hypertrophy: usefull adaptation or pathologic process? **AM. J. MED** 69:559-572, 1980.

GUPTA, M.P.; GUPTA, M.; ZAK, R.; SUKHATME, V.P. Egr-1, a serum-inducible zinc finger protein, regulates transcription of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. **J. Biol. Chem** 266: 12813-12816, 1991.

HAN, T.-H.; PRYWES, R. Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-Jun promoter. **Mol. Cell. Biol.** 15:2907-2915, 1995.

HAN, J.; MOKKENTIN, J.D. Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. **Trends Cardiovasc. Med.** 10, 19-22, 2000.

HAN, A.; PAN, F.; STROUD, J.C.; YOUN, H.D.; LIU, J.O.; CHE, L. Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor 2. **Nature**, 422:730-734, 2003.

HEATON, J. H.; DLAKIC, W. M.; DLAKIC, M.; GELEHRTER, T. D. Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. **J. Biol. Chem.** 276, 3341-3347, 2001.

HUANG L.; GRAMMATIKAKIS, N.; YONEDA, M.; BANERJEE, S.D.; TOOLE, B. P. Molecular Characterization of a Novel Intracellular Hyaluronan-binding Protein. **J. Biol. Chem.** 275:29829-29839, 2000.

HANSEN, H.; LEMKEM, H.; BREDFELDT, G.; KÖNNECKE, I.; HAVSTEEN, B. The Hodgkin-associated Ki-1 antigen exists in an intracellular and a membrane-bound form. **Biol Chem Hoppe Seyler.** May; 370 (5):409-16, 1989.

HUNTER, J.J.; GRACE, A.; CHIEN, K.R. Molecular and cellular biology of cardiac hypertrophy and failure. In: Molecular basis of Cardiovascular Disease. Ed. K.R. Chien. **W.B. Saunders Company.** Philadelphia, 1999.

- JANSON, C.G.; CHEN, Y.; LI, Y.; LEIFER, D. Functional regulatory regions of human transcription factor MEF2C. **Molecular Brain Research** 97:70–82, 2001.
- JALILI, T.; TAKEISHI, Y.; WALSH, R.A. Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of Gαq, PLCβ1, and PKC. **Cardiovasc Res** 44: 5-9, 1999.
- KATO, Y.; ZHAO, M.; MORIKAWA, A.; SUGIYAMA, T.; CHAKRAVORTTY, D.; KOIDE, N.; YOSHIDA, T.; TAPPING, R.I.; YANG, Y.; YOKOCHI, T.; LEE, J-D. Big Mitogen-activated Kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. **J. Biol. Chem.** 275(24):18534-18540, 2000.
- KEEGAN, L.; GILL, G.; PTASHE, M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukariotic regulatory protein. **Science** 231: 699-704. 1986.
- KOBARG, J.; SCHNITTGER, S.; FONATSCH, C.; LEMKE, H.; BOWEN, M.A.; BUCK, F.; HANSEN, H.P. Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen. **Exp. Clin. Immunogenet.** 14, 273-280, 1997.
- KOMURO, I.; KAIDA, T.; SHIBAZAKI, Y.; KURABAYASHI, M.; KATOH, Y. Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. **J. Biol. Chem.** 265:3595–98, 1990.
- KOŁODZIEJCZYK, S.M.; WANG, L.; BALAZSI, K.; DEREPIENTIGNY, Y.; KOTHARY, R.; MEGENEY, L.A. MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. **Curr. Biol.** 9, 1203–1206, 1999.
- KORNBERG, R.D. Eukaryotic transcriptional control. **Trend Cell Biol.**, 12:46–49, 1999.
- KRUITHOFF, E.K.O. Plasminogen activator inhibitors: a review. **Enzyme**, 40:113-121, 1988.

- LAI, M. M.; BURNETT, P. E.; WOLOSKE, H.; BLACKSHAW, S.; SNYDER, S. H. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. **J. Biol. Chem.** 273, 18325–18331, 1998.
- LEMOS, T. A.; PASSOS, D. O.; NERY, F.C.; KOBARG J. Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD3. **FEBS Letters** 533:14-20, 2003.
- LIN, Q.; SCHWARZ, J.; BUCANA, C.; OLSON, E. N. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. **Science** 276: 1404-7. 1997.
- LORREL, B.H.; CARABELLO, B.A. Left ventricular hypertrophy pathogenesis detection and prognosis. **Circulation**, 4:470-479, 2000.
- LIU, Y. W.; CSERESNYES, Z.; RANDALL, W. R.; SCHNEIDER, M. F. Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. **J. Cell Biol.** 155:27-39. 2001.
- MA, J.; PTASHNE, M. A new class of yeast transcriptional activators. **Cell** 51:113-119, 1987.
- MA, J.; PTASHNE, M. Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. **Cell** 55: 443-446, 1988.
- MARTIN, J.F.; SCHWARZ, J.J.; OLSON, E.N. Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. **Proc. Nat. Acad. Sciences USA** 90:5282–86, 1993.
- MAR, J.H.; ORDAHL, C.P. M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. **Mol. Cell. Biol.** 10:4271-4283, 1990.

- McDERMOTT, J.C.; CARDOSO, M.C.; YU, Y.T.; ANDRES, V.; LEIFER, D. hMEF2C gene encodes skeletal muscle-and brain-specific transcription factors. **Mol. Cell. Biol.** 13:2564–77, 1993.
- McKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N. MEF2: a calcium – dependent regulator of cell division, differentiation and death. **Trends in Biochemical Sciences**, 27 (1):40-47, 2002.
- McKINSEY, T.A.; ZHANG, C-L.; LU, J.; OLSON, E.N. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. **Nature**, (408):106-111, 2000.
- MERMALL, V.; POST, P.L.; MOOSEKER, M.S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. **Science**, 279:527-533, 1998.
- MILLIGAN, R.A. Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. **Proc. Nat. Acad. Sciences USA** 93:21-26, 1996.
- MISKA, E.A.; KARLSSON, C.; LANGLEY, E.; NIELSEN, S.J.; PINES, A.; KOUZARIDES, T. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. **EMBO J.** 18:5099-5107, 1999.
- 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: 16657-16662, 1997.
- MOLKENTIN, J.D.; BROGAN, R.S.; JOBE, S.M.; MARKHAM, B.E. Expression of the alpha-myosin heavy chain gene in the heart is regulated in part by an E-box-dependent mechanism **J. Biol. Chem.** 268: 2602-2609, 1993.
- MOLKENTIN, J.D.; BLACK, B.L.; MARTIN, J.F.; OLSON, E.N. Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. **Mol Cell Biol** 16:2627-2636, 1996a.

- MOLKENTIN JD., LI L, OLSON, EN. Phosphorilation of the MADS-box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity. **J Biol Chem**, 271:17199-204, 1996b.
- MOLKENTIN, J.D.; DORN II, I.G. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. **Annu. Rev. Physiol.** 63: 391–426, 2001.
- NADRUZ, W.J.; KOBARG, C.B.; CONSTÂNCIO, S.S.; CORAT, P.D.C.; FRANCHINI, K.G. Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium – regulation by Myocyte Enhancer Factor2. **Circ Res** 92: 243–251, 2003.
- NAVANKASATTUSAS, S.; ZHU, H.; GARCIA, A.V.; EVANS, S. M.; CHIEN K.R. A ubiquitous factor (HF-1a) and a distinct muscle factor (HF-1b/MEF-2) form an E-box-independent pathway for cardiac muscle gene expression. **Mol. Cell. Biol.** 12: 1469-1479, 1992.
- NERY, F.C.; PASSOS, D.O.; GARCIA, V.S.; KOBARG, J. Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C. **J Biol Chem** 279: 11444-11456, 2004.
- OLSON, T.M.; DOAN, T.P.; KISHIMOTO, N.Y.; WHITBY, F.G.; ACKERMAN, M.J.; FANANAPAZIR, L. Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. **J.Moll Cell Cardiol.** 32:1687-94. 2000.
- OLSON, E.N.; SRIVASTAVA, D. Molecular pathways controlling heart development. **Science** 272:671–76, 1996.
- OLSON E.N.; SCHNEIDER, M.D. Sizing up the heart: development redux in disease. **Genes & Development**, 17:1937–1956, 2003.
- OMENS, J.H. Stress and strain as regulators of myocardial growth. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** 69:559-572, 1998.

PASS, J.M.; ZHENG, Y.; WEAD, W.B.; ZHANG, J.; LI, R.C.X.; BOLLI, R.; PING, P. PKC ϵ activation induces dichotomous cardiac phenotypes and modulates PKC ϵ -RACK1 interactions and RACK1 expression. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 280:H946-H955, 2001.

PESTI-CORREIA FISLER, C.; MORISCOT, A.S. ISOPROTERENOL (ISO) induced cardiac hypertrophy modulates MEF-2 gene expression. Painel. **XVII Reunião Anual da FESBE**, Salvador, Ba, 2002.

PESTIC-DRAGOVICH, L.; STOJILJKOVIC, L.; PHILIMONENKO, A.A.; NOWAK, G.; KE, Y.; SETTLAGE, R.E.; SHABANOWITZ; HUNT, D.F.; HOZAK, P.; DE LANEROLLE, P. A myosin I isoform in the nucleus. **Science**, 290, 337-341. 2000.

POLTE, T. R.; HANKS, S. K. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130cas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92:10678-10682, 1995.

ROHDE, D.; HANSEN, H.; HAFNER, M.; LANGE, H.; MIELKE, V.; HANSMANN, M. L.; LEMKE, H. Cellular localizations and processing of the two molecular forms of the Hodgkin-associated Ki-1 (CD30) antigen. **Am. J. Pathol** 140, 473-482, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition. **Cold Spring Harbor**, N Y 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COUSON, A.R. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 74: 5463-5467, 1977.

SADOSHIMA, J.; JAHN, L; TAKAHASHI, T.; KULIK, T.J.; IZUMO, S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. **J Biol Chem**. 267:10551-10560, 1992.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. **Annu. Rev. Physiol.** 59:551-71, 1997

SCHWAB, U.; STEIN, H.; GERDES, J.; LEMKE, H.; KIRCHNER, H.; SCHAADT, M.; DIEHL, V. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. **Nature**, 299:56-67, 1982.

SCHMITT, J. P.; SEMSARIAN, C.; ARAD, M.; GANNON, J.; AHMAD, F.; DUFFY, C.; LEE, R.T.; SEIDMAN, C.E.; SEIDMAN, J.G. Consequences of pressure overload on sarcomere protein mutauin-induced hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation**, 108(9): 1627-1633, 2003.

SELLERS, J.R. Myosins: a diverse superfamily. **Biochim. Biophys. Acta** 1496:3-22. 2000.

SELLERS, J.R.; GOODSON, H.V. Motor proteins2: myosin. **Protein Profile** 2:1323-423. 1995.

SPARROW, D.B.; MISKA, E.A.; LANGLEY, E.; REYNAUD-DEONAUTH, S.; SPOHR, G.; KOUZARIDES, T.; MOHUN, T. MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. **EMBO J** 18:5085-5098. 1999.

STERNBERG, E.A; SPIZZ, G.; PERRY, W.M.; VIZARD, D.; WEIL, T.; OLSON, E. N. Identification of upstream and intragenic regulatory elements that confer all-type restricted and differentiation-specific expression on the muscle creatine kinase gene. **Mol. Cell. Biol.** 8:2896-2909, 1988

SEIDMAN, C.E.; WONG, D.W.; BLOCH, K.D.; J.G. SEIDMAN, J.G. Cis-acting sequences that modulate atrial natriuretic factor gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 85:4104-4108, 1988.

TORSONI, A. S.; FONSECA, P. M.; ALBERTO-CROSSARA, D. P.; FRANCHINI, K. G. Early activation of p₁₆₀ ROCK by pressure overload in rat heart. **Am J Physiol Cell Physiol.** 284: C1411-C1419, 2003.

VIJAYAN, K.; SZOTEK, E. L.; MARTIN, J. L.; SAMAREL, A. M. Protein Kinase C α -Induced Hypertrophy of Neonatal Rat Ventricular Myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** July 22, 2004

WILSON-RAWLS, J.; MOKKENTIN, J.D.; BLACK, B.L.; OLSON E. Activated Notch Inhibits Myogenic Activity of the MADS-Box Transcription Factor Myocyte Enhancer Factor 2C **Molecular and Cellular Biology**, Apr. 1999, p. 2853–2862, 1999.

WANG, A.H.; BERTOS, N. R.; VEZMAR, M.; PELLETIER, N.; CROSATO, M.; HENG, H. H.; TH'NG, J.; HAN, J.; YANG, X-J. HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDA1, Is a Transcriptional Corepressor . **Molecular and Cellular Biology** 19, (11): 7816–7827, 1999.

WU, H.; OLSON, E. N. Activation of the MEF transcription factor in skeletal muscles from myotonic mice. **J. Clin. Invest.** 109: 1327-1333 2002.

YOUN, H-D.; CHATILA, T.A.; LIU, J.O.; Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. **EMBO J.** 19, 4323–4331, 2000.

YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; YAZAKI, Y. Signaling pathways for cardiac hypertrophy. **Cell Signal.** 10:693-698, 1998.

YANG, C-C.; ORNATSKY, O.I.; MCDERMONT, J.C.; CRUZ, T.F.; PRODY, C.A. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. **Nuc Acids Res**, 26 (20):4771-4777, 1998.

YU, Y.T.; BREITBART, R. E.; SMOOT, L. B.; LEE ,Y.; MAHDAVI, V.; NADALGINARD, B. Human myocyte specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue restricted MADS box transcription factors. **Genes Dev.** 6(9):1738-98, 1992.

YU, Y. T. J. Distinct Domains of Myocyte Enhancer Binding Factor-2A Determining Nuclear Localization and Cell Type-specific Transcriptional Activity **J. Biol. Chem.** 271:24675-24683, 1996.

ZHANG, C.L.; MCKINSEY, T.A.; OLSON, E.N. The transcriptional corepressor MITR is a signal Responsive inhibitor of myogenesis. **Proc. Nat. Acad. Science USA** 98: 7354-7359, 2001.

ZHANG, C.L.; McKINSEY, T.A.; CHANG, S.; ANTOS, C.L.; HILL, J.A.; OLSON, E.N. Class II Histone Deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. **Cell**, 110: 479-488, 2002.

8. *ANEXOS*

Em anexo, se encontram artigos relacionados à tese ou a atividades paralelas da aluna durante o período de doutorado:

NADRUZ, W. J.; KOBARG, C. B.; CONSTÂNCIO, S. S.; CORAT, P.D.; FRANCHINI, K.G. Load-Induced Transcriptional Activation of c-jun in Rat myocardium - Regulation by Myocyte Enhancer Factor 2. **Circ. Res.** ; 92:243-251, 2003.

NADRUZ, W. J.; KOBARG, C. B.; KOBARG, J.; FRANCHINI, K.G. c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute overloaded rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 286: H760-H767, 2004.

FONSECA, P. M.; INOUE, R.Y.; KOBARG, C. B.; KOBARG, J.; FRANCHINI, K. G. Targeting to C-Terminal Myosin Heavy Chain Tail May Explain Mechano-Transduction Involving Focal Adhesion Kinase in Cardiac Myocytes. **Circ Res**, 96:73-81, 2005.

KOBARG, C. B.; KOBARG, J.; CROSARA-ALBERTO, D. P.; THAÍS HOLTZ THEIZEN, T.H.; FRANCHINI, K.G. MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57. **FEBS Letters**, 2005, aceito para publicação.

Load-Induced Transcriptional Activation of *c-jun* in Rat Myocardium

Regulation by Myocyte Enhancer Factor 2

Wilson Nadruz, Jr, Claudia B. Kobarg, Sábata S. Constancio, Patrícia D.C. Corat, Kleber G. Franchini

Abstract—The increased expression of immediate-early genes is a key feature of the myocardial response to hypertrophic stimuli. In this study, we investigated whether pressure overload or phenylephrine treatment stimulated myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-dependent transcriptional activation of *c-jun* in cardiac myocytes. Western blotting and immunohistochemical analysis of rat myocardium demonstrated that p70^{MEF2} is highly expressed in the rat heart and is predominantly located at the nuclei of cardiac myocytes. Electrophoretic mobility shift assays of myocardial nuclear extracts revealed a consistent DNA binding activation of MEF2 after 1 and 2 hours of pressure overload. We further showed that pressure overload induced a progressive nuclear translocation and activation of extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5). Coimmunoprecipitation and *in vitro* kinase assays indicated that the activation of ERK5 was paralleled by increased association of ERK5/p70^{MEF2} and by enhanced ability of ERK5 to phosphorylate p70^{MEF2}. Experiments with *in vivo* transfection of the left ventricle with the *c-jun* promoter reporter gene showed that pressure overload induced a consistent increase of *c-jun* transcriptional activity in the rat myocardium. Rendering the MEF2 site of the *c-jun* plasmid inactive by mutation abolished the load-induced activation of the *c-jun* promoter reporter gene. Mutation of the MEF2 site also abolished the phenylephrine-induced *c-jun* promoter activation in neonatal rat ventricular myocytes. In addition, we demonstrated that neonatal rat ventricular myocyte transfection with ERK5-antisense oligodeoxynucleotide inhibited the phenylephrine-induced *c-jun* promoter activation. These findings identify MEF2 as a potential regulator of *c-jun* transactivation and suggest that ERK5 might be an important mediator of MEF2 and *c-jun* promoter activation in response to hypertrophic stimuli in cardiac myocytes. (*Circ Res.* 2003;92:243-251.)

Key Words: pressure overload ■ transcription factors ■ myocyte enhancer factor 2 ■ *c-jun*
■ extracellular signal-regulated kinase 5

Long-term hemodynamic overload induces myocardial hypertrophy and remodeling of cardiac chambers that assume a key role in the compensation of the increased hemodynamic burden.¹ The initial response of cardiac myocytes to mechanical stress includes a coordinated rapid and transient activation of immediate-early genes, which is followed by activation of the fetal gene program and a time-dependent increase in protein synthesis.² The immediate-early genes (ie, *c-jun*, *c-fos*, and *c-myc*) encode for transcription factors that are normally expressed at low levels in cardiac myocytes. Nevertheless, the signaling mechanisms involved in the regulation of these genes by hypertrophic stimuli remain to be determined.

One such gene, *c-jun*, has been shown to be rapidly and transiently activated by mechanical stress in isolated myocytes³ and myocardium.⁴ The *c-jun* promoter contains binding sites for transcription factors such as Sp1, CTF, activator protein-1 (AP-1), and myocyte enhancer factor 2 (MEF2).⁵

Binding of the AP-1 complex (c-Fos/ATF or c-Jun/c-Jun dimer) to the tissue plasminogen activator-responsive element in the *c-jun* promoter has been shown to result in the stimulation of its transcription.⁶ Studies in NIH 3T3 fibroblasts and monocytic cells have shown that MEF2 transcription factors also play an important role in the transcriptional regulation of *c-jun*.^{7,8} Moreover, MEF2 activation in multiple models of cardiac hypertrophy supports the view that factors of this family might play a central role in the regulation of fundamental signaling mechanisms during the myocardial hypertrophic growth.^{9–11} Although it is well established that MEF2 is important for the activation of cardiac muscle-specific genes,¹² the regulation of MEF2 factors in the early phase of load-induced cardiac hypertrophy and the set of genes controlled by these factors in cardiac myocytes remain essentially unknown.

In the present study, experiments were performed to examine the importance of MEF2 in the regulation of *c-jun*

Original received January 24, 2002; resubmission received November 21, 2002; accepted November 26, 2002.

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

Correspondence to Kleber G. Franchini, MD, PhD, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz," 13081-970 Campinas, SP, Brasil. E-mail: franchin@obelix.unicamp.br

© 2003 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000053184.94618.97

transcriptional activation during acute pressure overload in the myocardium of rats. Additional assays were performed to investigate the importance of extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) and the MEF2 element in the regulation of *c-jun* activation induced by phenylephrine in isolated neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs).

Materials and Methods

Experimental Models

Male Wistar rats (160 to 200 g) were subjected to acute pressure overload (10 minutes to 3 hours) induced by constriction of the transverse aorta. NRVMs were cultured as previously described¹³ and subjected to hypertrophic stimuli through treatment with 100 μ mol/L phenylephrine.

Immunoblotting

Homogenates of left ventricles (LVs) were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with primary antibodies (anti-phospho-p38, anti-p38, anti-MEF2A, and anti-*c-jun* from Santa Cruz Biotechnology; anti-ERK5 from Calbiochem) and stained with ¹²⁵I-protein A.

ERK5 Kinase Activity and In Vitro Assay

ERK5 activity was assessed through an autophosphorylation assay.¹⁴ ERK5 activity toward MEF2 was analyzed by in vitro kinase assay, as described previously with modifications.¹¹ Briefly, immunoprecipitated ERK5 from sham or overloaded rat LVs was mixed with MEF2 immunoprecipitated from the LVs of sham rats. The reaction was carried out by addition of [γ -³²P]ATP. Proteins were resolved in SDS-PAGE, and bands corresponding to p70^{MEF2} were quantified by densitometry.

Tissue Preparation for Immunohistochemistry

Procedures for immunohistochemistry were performed as described previously.¹⁵ LVs were fixed with 4% paraformaldehyde and set in paraffin. Sections were incubated with primary antibodies, followed by incubation with peroxidase-conjugated secondary antibodies; the sections were then stained by reacting diaminobenzidine with H₂O₂. Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements.

Isolation of Total RNA/Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis

Total LV RNA was isolated with Trizol reagent.¹⁶ cDNA synthesis was performed in 6- μ g aliquots of RNA with the Superscript preamplification system (Life Technologies). *Taq* DNA polymerase was used to amplify the cDNA in the presence of sense and antisense primers for *c-jun* (5'-GACCTTCTACGACGATGC-3' and 5'-CAGCGCCAGCTACTGAGGC-3', respectively) or β -actin (5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3' and 5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3', respectively).

Preparation of Nuclear Extracts and EMSAs

The preparation of LV nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were carried out as described previously.¹⁷ MEF2 (GATCGCTCTAAAAATAACCCTGTCG) and nuclear factor- κ B (AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC) DNA binding site oligonucleotides were from Santa Cruz. The specificity for MEF2 binding was confirmed by competition assays with unlabeled oligonucleotides and immuno-gel-shift experiments with anti-MEF2A antibody and preimmune serum.

Plasmid Transfection and Dual Reporter Gene Assays

Plasmids¹⁸ containing the murine *c-jun* promoter fused to the firefly luciferase gene (pJC6GL3, wild type) with mutations at the MEF2

(pJSXGL3) and AP-1 (pJTXGL3) sites were generated by Dr Ron Prywes (Columbia University, New York, NY). Experiments were first carried out in the in situ rat hearts. *c-jun* promoter reporter plasmids and the internal control SV40-*renilla* luciferase were injected into the LVs of anesthetized rats. After 1 week of recovery, the rats were subjected to aortic constriction (lasting from 10 minutes to 3 hours). A transconstriction systolic gradient was measured, and the LV was assayed for luciferase activity. In a different set of experiments, *c-jun* promoters and SV-40 reporter plasmids were transfected in NRVMs, which were then treated with phenylephrine. All firefly luciferase values were normalized to *renilla* firefly activities.

ERK5-Antisense ODN Transfection

An ERK5-antisense oligodeoxynucleotide (ODN) (5'-GGCTTTCGAGGTTTCAG-3') based on nucleotides 91 to 105 of the rat ERK5 mRNA partial sequence (GenBank No. AJ005424) was constructed. The sense sequence (5'-CTGAACCTCGAAAGCC-3') was used as a control. All bases were obtained from Life Technologies and were phosphorothioate-protected. The ERK5 ODNs were transfected in NRVMs 24 hours after the transfection with reporter genes. NRVMs were maintained for 18 hours in medium containing 10% serum and then for 6 hours in serum-free medium, treated with phenylephrine for an additional 3 hours, and then harvested for reporter gene assays. Cells used for immunoblotting and confocal analysis were collected immediately after the 18-hour serum exposition.

Laser Confocal Analysis

NRVMs were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with primary antibodies. This was followed by incubation with biotin-conjugated secondary antibodies and then with streptavidin-Cy2 and rhodamine-conjugated phalloidin. Images were obtained with a laser confocal microscope (Zeiss LSM510).

Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Differences between the mean values of the densitometric readings were tested by 1-way ANOVA for repeated measurements and the Bonferroni multiple-range test. A value of $P < 0.05$ indicated statistical significance.

An expanded Materials and Methods section can be found in the online data supplement available at <http://www.circresaha.org>.

Results

Effect of Aortic Constriction on Blood Pressure

Figure 1 summarizes the effect of aortic constriction on systolic blood pressure measured in the ascending and abdominal aortas of anesthetized rats. Systolic blood pressure measured in the ascending aorta increased by ≈ 40 mm Hg (from 130 to 170 mm Hg) in the period ranging from 10 minutes to 2 hours after aortic constriction. Systolic pressures measured in the abdominal aorta were similar in aorta-constricted and in sham-operated rats.

Protein Expression and Activation of p70^{MEF2} in Overloaded Myocardium

As a first step toward studying the regulation of MEF2 in overloaded myocardium, immunoblotting experiments were performed to assess the amount of the MEF2 protein with anti-MEF2A antibody. Because this antibody has been shown to cross-react with other isoforms of MEF2 proteins, the specific product recognized by this antibody was named p70^{MEF2}. As shown in Figure 2A, a prominent double band was stained at ≈ 70 kDa in the homogenates of the rat LV. Experiments performed with blocking peptide indicated the

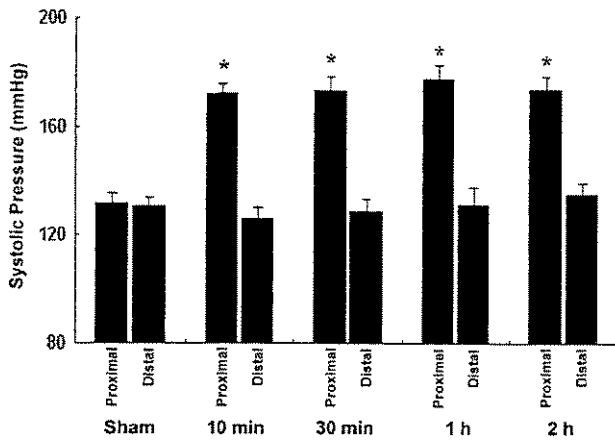


Figure 1. Hemodynamics. Systolic blood pressure measured proximally and distally to aortic constriction ($n=10$) along the experimental period. * $P<0.05$.

specificity of this antibody to $p70^{\text{MEF2}}$ (please see online Figure 1A, available in the data supplement at <http://www.circresaha.org>). Aortic constriction lasting from 10 minutes up to 2 hours produced no change in $p70^{\text{MEF2}}$ protein levels in the rat heart. $p70^{\text{MEF2}}$ was then localized in sections of LV by immunohistochemical staining. Myocardial $p70^{\text{MEF2}}$ was localized predominantly at the nuclei of cardiac myocytes (Figure 2C). Pressure overload caused no major change in the $p70^{\text{MEF2}}$ distribution pattern in cardiac myocytes (data not shown).

To obtain evidence that pressure overload activates MEF2 in the myocardium, we performed EMSA of LV nuclear extracts to study the interaction between MEF2 and an oligonucleotide containing the consensus binding DNA sequence for MEF2 (Figure 2D). A consistent increase in DNA binding activity of MEF2 was observed after 1 and 2 hours of sustained pressure overload. The specificity of the DNA probe for MEF2 binding was confirmed by competition assays with unlabeled oligonucleotides (Figure 2D) and by supershift assay with the anti-MEF2 antibody (Figure 2E). The immuno-gel-shift assay showed that a major component

of the DNA-protein complex was shifted by the anti-MEF2 antibody, confirming that the MEF2 consensus oligonucleotide was bound by MEF2 proteins.

Effect of Pressure Overload on MAPK-MEF2 Pathway

MEF2 proteins have potential mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation sites,¹² which have been suggested to be involved in the activation of this transcription factor.^{19,20} Nevertheless, the available data indicate that only p38 and ERK5 are able to regulate MEF2 factors.^{19,20} To analyze the role of p38 and ERK5 in mediating the load-induced activation of $p70^{\text{MEF2}}$ in the myocardium, we first studied whether pressure overload regulates ERK5 and p38 activity in this tissue. Immunoblotting analysis with antibodies against phospho-p38 and pan-p38 indicated that pressure overload ranging from 10 minutes to 2 hours did not change the activity or quantity of p38 in the LV myocardium (Figure 3A). Immunohistochemical analysis showed that p38-MAPK is constitutively present in the sarcoplasm and nuclei of cardiac myocytes (online Figure 1B). However, in overloaded myocardium, no change was detected in the nuclear and sarcoplasmic staining with specific antibody (data not shown).

Analysis performed through an in vitro kinase assay based on immunoprecipitated ERK5 autophosphorylation showed a progressive increase of ERK5 activity in overloaded hearts that was detected as early as 30 minutes, up to a maximum of 4.2-fold, after 2 hours of pressure overload (Figure 3B). Western blotting with anti-ERK5 antibody showed that equivalent amounts of ERK5 protein were present in LV homogenates during the experimental protocol (Figure 3B). Immunohistochemical analysis of ERK5 in myocardial sections of control rats showed a diffuse staining in the cytosol of cardiac myocytes (Figure 3C). However, consistent nuclear staining of cardiac myocytes was observed in the myocardial sections obtained from rats subjected to pressure overload (Figure 3D).

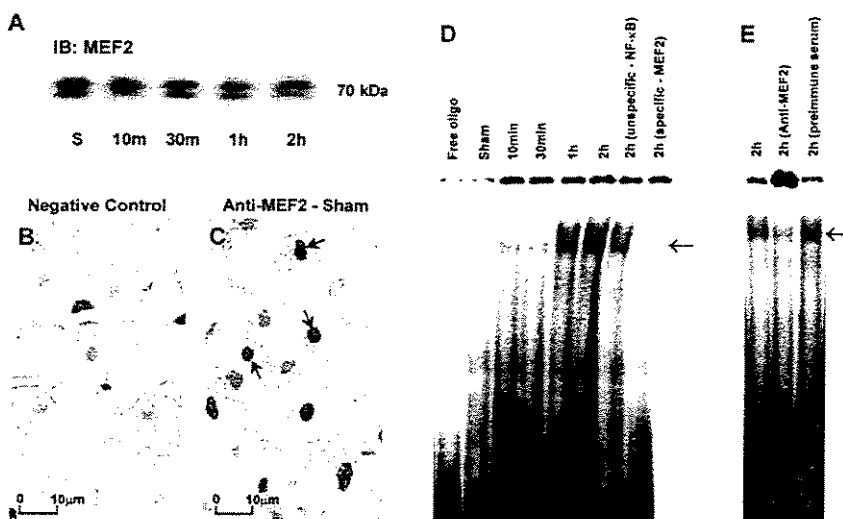


Figure 2. MEF2 expression and activation. A, Representative blot (from 6 experiments) of anti-MEF2 blotting from sham and overloaded heart extracts. IB indicates immunoblotting; S, sham. B and C, Immunohistochemical studies showing negative control (B) and localization of $p70^{\text{MEF2}}$ in the myocardium of sham rats (C), most intense in cardiac myocyte nuclei (brownish staining, arrows). D and E, Representative EMSA (from 3 experiments) using a MEF2 consensus oligonucleotide. Twenty micrograms of protein was used in each sample. Specificity of the MEF2 complex was determined by unspecific (unlabeled nuclear factor [NF]- κ B consensus oligonucleotide) and specific (unlabeled MEF2 consensus oligonucleotide) competition (D) and by immuno-gel-shift assay with anti-MEF2 antibody and preimmune serum (E). Arrows indicate protein-DNA complex.

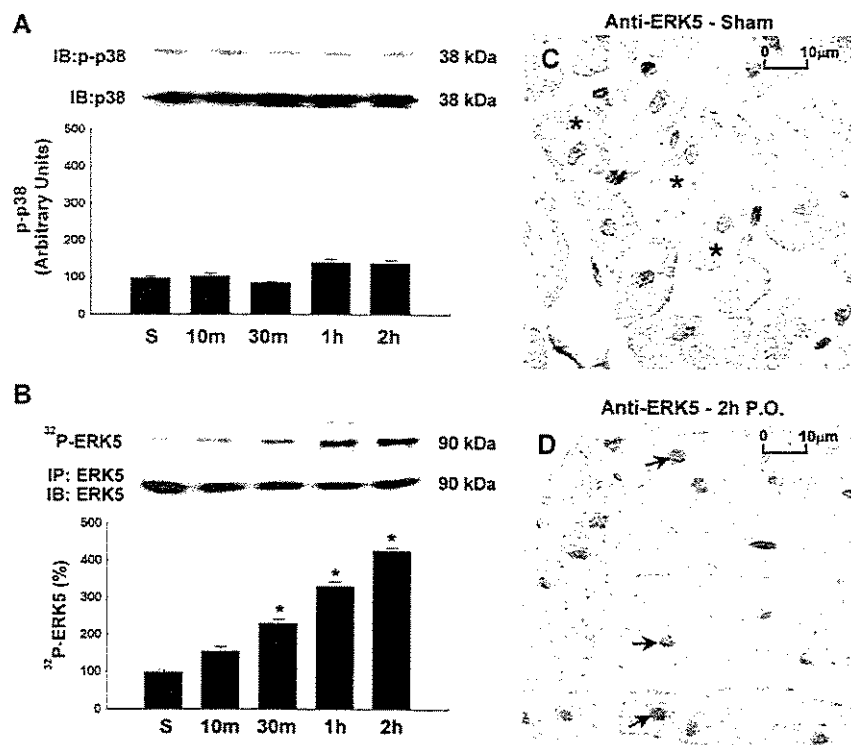


Figure 3. p38 and ERK5 activation. A, Representative blots of myocardial p38-MAPK detected by phosphospecific (top) and regular (bottom) antibodies against p38 and average values (6 experiments) of p38 activity. B, Representative blots showing ERK5 kinase activity (top) and ERK5 protein levels (bottom) and the average values (5 experiments) of densitometric analysis of ERK5 kinase activity. IP indicates immunoprecipitation.

* $P < 0.05$ compared with unloaded hearts.

C, Myocardial distribution of ERK5 in unloaded heart showing diffuse immunostaining at the sarcoplasm (yellowish staining, asterisk). D, Localization of ERK5 protein in myocardium subjected to 2 hours of pressure overload (P.O.). Strong ERK5 staining was detected at cardiac myocyte nuclei (brownish staining, arrows).

We then investigated whether acute pressure overload could induce ERK5 to interact with $p70^{\text{MEF2}}$. Coimmunoprecipitation assays of LV homogenates showed a progressive association between ERK5 and $p70^{\text{MEF2}}$ in vivo (Figure 4A). The ability of activated ERK5 to phosphorylate $p70^{\text{MEF2}}$ was confirmed by an in vitro kinase assay. ERK5 immunoprecipitated from LV homogenates of control and overloaded hearts was added to $p70^{\text{MEF2}}$ immunoprecipitated from LV homogenates of control rats suspended in a kinase buffer and [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP. Densitometric analysis indicated a progressive increase in the phosphorylation of $p70^{\text{MEF2}}$, beginning at 30

minutes and reaching a 2.2-fold maximum increase at 2 hours after the onset of pressure overload (Figure 4B). Immunoblotting analysis showed that an equal amount of MEF2 substrate was present in samples containing immunoprecipitated MEF2. In contrast, a weak band of MEF2 was detected in samples containing only ERK5 immunoprecipitates, which may represent the amount of MEF2 associated with ERK5. Accordingly, a minor phosphorylated MEF2 band was also encountered in the lane correspondent to ERK5 immunoprecipitates alone, further indicating that MEF2 is a physiological substrate of ERK5.

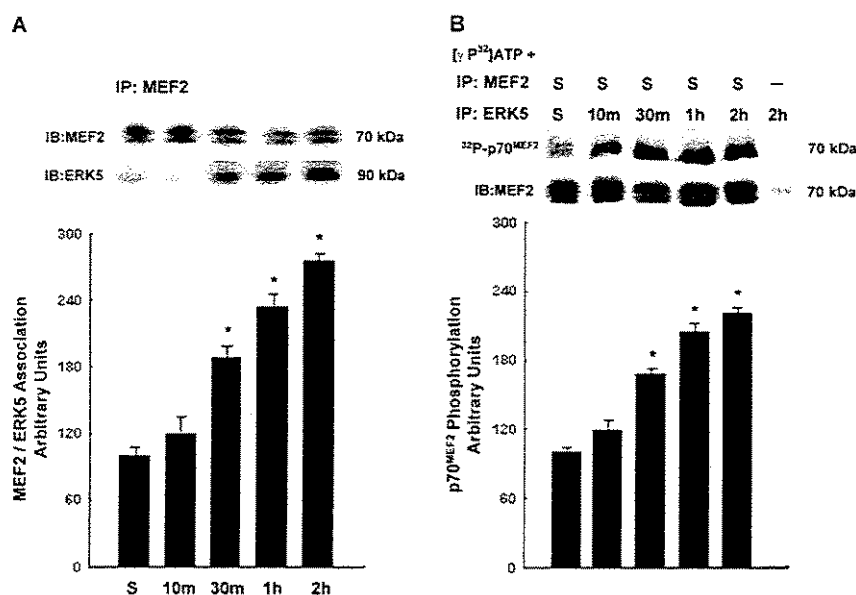


Figure 4. ERK5-MEF2 interaction. A, Representative blot and average values (5 experiments) showing the results of MEF2-ERK5 coimmunoprecipitation experiments. B, Representative blot and average values ($n=5$) of $p70^{\text{MEF2}}$ in vitro phosphorylation mediated by ERK5 in overloaded hearts. Immunoprecipitated ERK5 from sham or overloaded rat LVs was mixed with MEF2 immunoprecipitated from sham hearts. The reaction was carried out by addition of [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP. Proteins were resolved in SDS-PAGE, and bands corresponding to $p70^{\text{MEF2}}$ were quantified by densitometry. * $P < 0.05$.

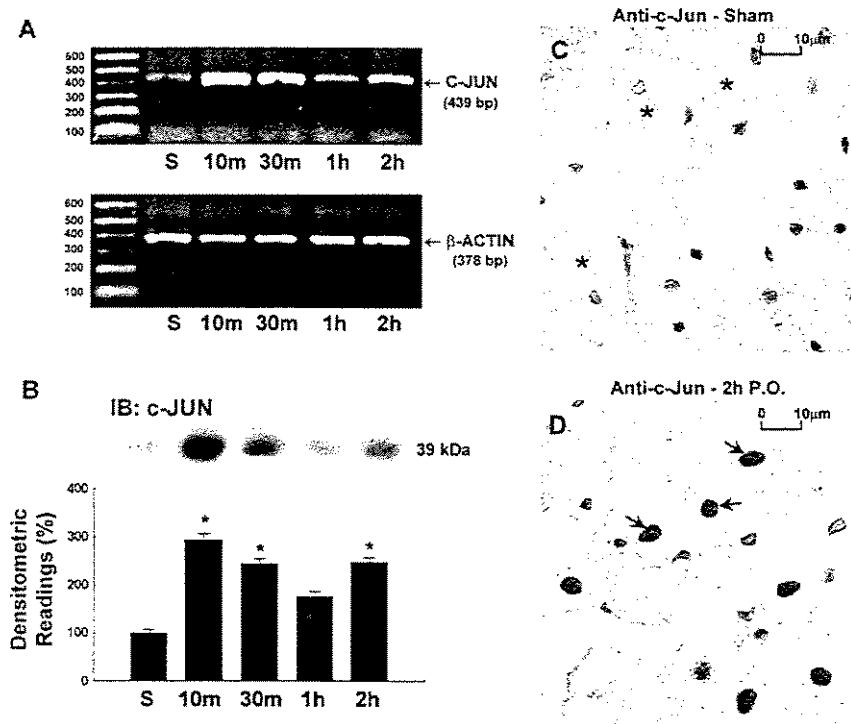


Figure 5. Regulation of *c-jun* expression by pressure overload. **A**, RT-PCR of *c-jun* and β -actin mRNA in rat myocardium. Representative gels from 3 experiments are shown. **B**, Representative blot and average values of densitometric readings ($n=6$) of the immunoblotting of anti-*c-Jun* from sham and overloaded heart extracts. $*P<0.05$. **C**, Distribution of *c-Jun* in the myocardium of control rats, showing a diffuse immunostaining at the sarcoplasm (yellowish staining, asterisk). **D**, Localization of *c-Jun* in myocardium subjected to 2 hours of P.O. Strong positive signals of *c-Jun* were detected at cardiac myocytes nuclei (brownish staining, arrows).

MEF2 Element Regulates *c-jun* Promoter Activation by Pressure Overload

Pressure overload has been shown to induce a rapid increase in myocardial *c-jun* expression.⁴ In addition, in cell culture systems, *c-jun* expression has been reported to be increased by transcription factors activated by MAPKs, including MEF2 and the AP-1 complex.¹⁹ In the present study, the influence of pressure overload on LV *c-jun* expression was analyzed by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR), Western blot, and immunohistochemistry. Pressure overload induced a biphasic increase in *c-jun* mRNA and protein expression in the LV, with an early peak (≈ 3 -fold) at 10 minutes and a second peak (≈ 2.5 -fold) at 2 hours after aortic constriction (Figures 5A and 5B). In the LVs of control rats, immunostaining with anti-*c-Jun* antibody was found predominantly at the sarcoplasm of cardiac myocytes (Figure 5C). Pressure overload markedly increased the nuclear staining for *c-Jun*, as demonstrated in the representative example of Figure 5D.

Experiments using in vivo transfection of LVs with the *c-jun* promoter reporter gene were performed to evaluate the role of MEF2 in the regulation of load-induced *c-jun* expression in the myocardium (Figure 6). The LV was transfected with *firefly* luciferase-fused plasmids containing wild-type *c-jun* promoter (pJC6GL3), a *c-jun* promoter mutated for the AP-1 site (pJTXGL3), or a *c-jun* promoter mutated for the MEF2 site (pJSXGL3) by direct injection in the wall of the LV (Figure 6A). After 1 week, transfected rats were subjected to aortic constriction or sham operation and euthanized 3 hours after these procedures for the analysis of luciferase activity (Figures 6B and 6C). Pressure overload induced a 2-fold increase in luciferase activity in the LV transfected with the wild-type plasmid (pJC6GL3), which confirmed that

pressure overload induces *c-jun* transactivation. In contrast, LVs of 30-minute-overloaded hearts showed no change in luciferase activity, indicating that the first peak of *c-jun*-enhanced expression was probably regulated by posttranscriptional mechanisms. Pressure overload still increased *firefly* luciferase activity in the LVs of rats transfected with the *c-jun* promoter mutated at the AP-1 site (pJTXGL3) by 2-fold, although the basal luciferase activity of this promoter was 3-fold less than wild-type *c-jun*. In contrast, no change was observed in luciferase activity in the LVs of rats transfected with MEF2-mutated plasmid (pJSXGL3), even though in these experiments this plasmid showed basal activity similar to that of wild-type plasmid. In general, these data support the notion that the MEF2 site plays an important role in *c-jun* promoter transactivation by acute pressure overload.

ERK5 and MEF2 Element Regulate *c-jun* Promoter Activation Induced by Phenylephrine in NRVMs

To further analyze the regulation of *c-jun* promoter activity by ERK5 and MEF2, additional experiments were performed on NRVMs subjected to hypertrophic stimulus with phenylephrine. The results obtained in this model were consistent with the data from our in vivo studies. As shown in Figure 7A, NRVMs transfected with wild-type *c-jun* promoter showed a ≈ 2 -fold increase in luciferase activity after a 3-hour phenylephrine treatment. MEF2 element mutation abolished the phenylephrine-induced increases in *c-jun* promoter luciferase activity. However, similar increases in luciferase activity were found in NRVMs transfected with the AP-1-mutated *c-jun* promoter. It was noticeable that luciferase baseline activities of MEF2-mutated and AP-1-mutated plasmids

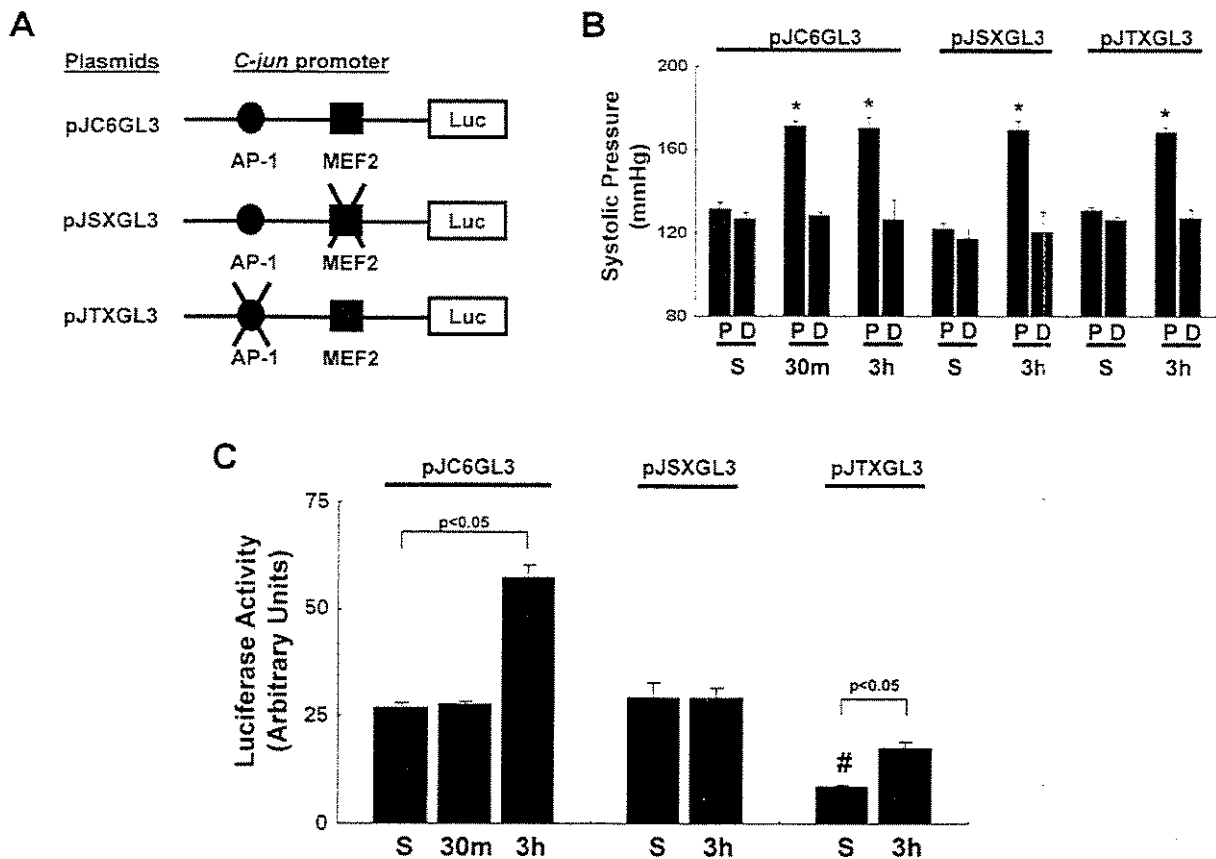


Figure 6. *c-jun* promoter regulation by pressure overload. **A**, Schematic representation of the wild-type murine *c-jun* promoter (pJC6GL3) and its derivatives mutated at MEF2 (pJSXGL3) and AP-1 (pJTXGL3) regulatory elements. **B**, Systolic blood pressure measured proximally and distally to the aortic constriction of sham and overloaded transfected rats. P indicates proximal; D, distal. * $P < 0.05$. **C**, Graphic representing the average values ($n = 6$) of firefly luciferase activity normalized to *renilla* luciferase activity present in each sample. # $P < 0.05$ for sham-pJTXGL3 compared with sham-pJC6GL3 and -pJSXGL3.

were markedly reduced (≈ 50 -fold) compared with the baseline activity seen in NRVMs transfected with the wild-type *c-jun* promoter.

The role of ERK5 on phenylephrine-induced activation of *c-jun* promoter in NRVMs was assessed by transfecting NRVMs with ERK5-antisense ODNs. As shown in Figure 7B, ERK5 antisense produced an inhibitory effect on phenylephrine-induced activation of the *c-jun* promoter similar to the MEF2 element mutation, supporting a central role of ERK5 in the agonist-induced activation of *c-jun* promoter in NRVMs. The effectiveness of ERK5-antisense ODN transfection to reduce ERK5 protein expression and the absence of a deleterious effect of this procedure on NRVMs were demonstrated by immunoblotting and laser confocal analysis with anti-ERK5 antibody (Figures 8A through 8E). As shown in Figure 8A, antisense transfection markedly reduced ERK5 protein expression ($\approx 72\%$), an effect confirmed by immunohistochemical analysis (Figures 8B and 8C). The specificity of this procedure was demonstrated by our data, which indicated that the expression of p38-MAPK and MEF2 were not changed by antisense transfection (Figures 8A, 8D, and 8E).

Discussion

The rapid activation of the immediate-early gene program that includes upregulation of *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, and *egr-1* is

an essential feature of cardiac myocytes in response to hypertrophic stimuli.^{2,21} In the present study, we provided evidence of a rapid activation and interaction of ERK5 and MEF2 in cardiac myocytes in response to mechanical stimuli. By transfecting LVs and NRVMs with the *c-jun* promoter reporter gene, we demonstrated that the MEF2 site of the *c-jun* promoter is essential for the early transcriptional activation of *c-jun* in cardiac myocytes evoked by hypertrophic stimuli. In addition, the transfection of NRVMs with ERK5 antisense abolished *c-jun* promoter activation by phenylephrine. Overall, these results are compatible with the notion that the ERK5-MEF2 pathway might work as a major regulator of early *c-jun* transcriptional regulation in cardiac myocytes in response to hypertrophic stimuli.

Transcriptional Regulation of *c-jun* by MEF2

The early induction of *c-jun* expression in the myocardium in response to acute mechanical stress is a well-characterized phenomenon.⁴ In the present study, we first investigated the regulation of *c-Jun* by characterizing its expression by protein blotting and RT-PCR and its localization in the LV by immunohistochemistry. The analysis of LV sections stained with anti-*c-Jun* antibody indicated that myocardial *c-Jun* is located mostly in cardiac myocytes. In addition, it was shown

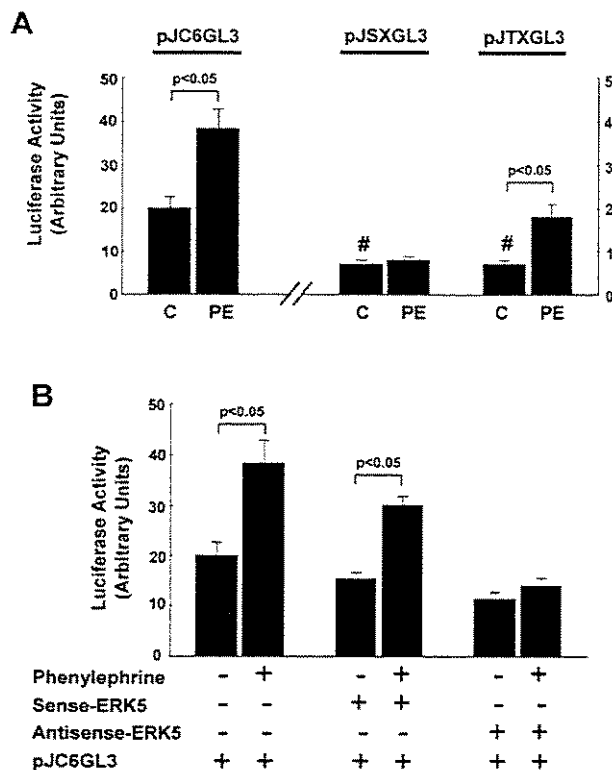


Figure 7. *c-jun* promoter regulation by phenylephrine (PE). A, Graphic representing the average values ($n=4$) of luciferase activity in NRVMs stimulated with PE. C indicates control. # $P<0.05$ compared with control-pJC6GL3. B, Average values ($n=4$) of luciferase activity in pJC6GL3-transfected NRVMs stimulated with PE and transfected with ERK5 ODNs.

that the amount of c-Jun in the nuclei of cardiac myocytes increases dramatically in overloaded hearts, indicating a load-induced translocation of c-Jun to the nuclei. RT-PCR and Western blot analysis of the myocardial homogenates indicated that the enhanced expressions of c-Jun protein and mRNA in overloaded hearts are actually biphasic, with an initial peak at 10 minutes and a later peak at 2 hours after the beginning of sustained pressure overload. Because reporter gene assays showed no increase in *c-jun* promoter activity after 30 minutes of pressure overload, the first peak of c-Jun mRNA and protein expression would be explained by posttranscriptional regulation unless the promoter sequence used in the present study does not contain the appropriate regulatory domains to detect early regulatory function.

The second peak of c-Jun mRNA and protein expression, seen at 2 hours of sustained pressure overload, might represent a more transcriptional regulation of *c-jun*. The analysis of load-induced transcriptional regulation of *c-jun* was assessed by transfection of intact hearts with constructions of the *c-jun* promoter-reporter gene. Wild-type and MEF2 or AP-1 site-mutated constructions were directly injected into intact rat hearts that were then overloaded as a result of aortic constriction. We observed that sustained increases of aortic pressure by 3 hours were paralleled by consistent increases in the wild-type reporter gene activity. Mutation that abolished

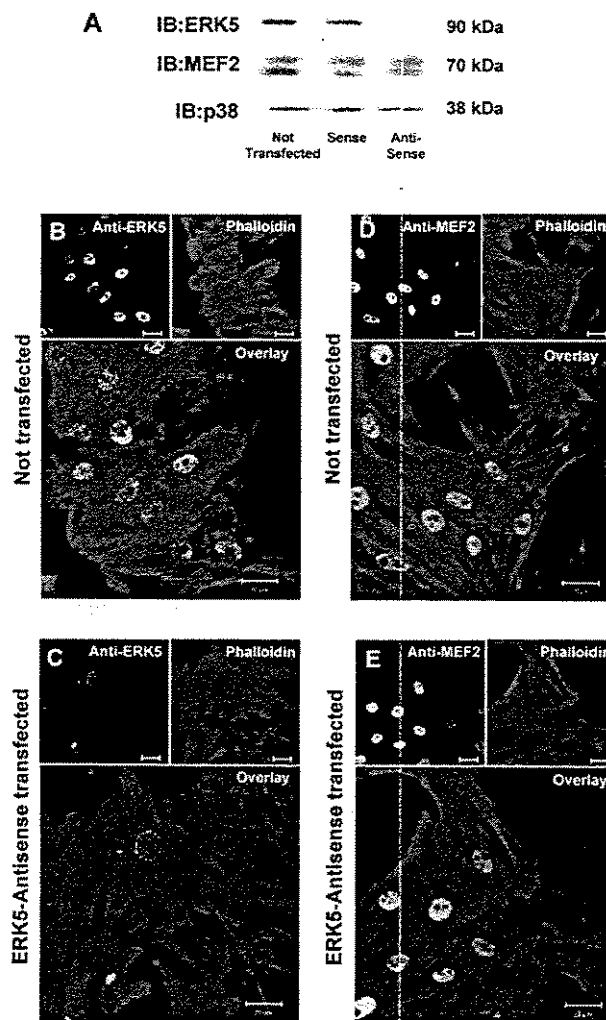


Figure 8. Effect of ERK5 ODNs on NRVMs. A, Representative immunoblotting (from 3 experiments) of extracts from NRVMs transfected or not with ERK5 ODNs performed with anti-ERK5, -MEF2, and -p38 antibodies. B through E, Laser confocal analysis of control and antisense-transfected NRVMs double-labeled with phalloidin and anti-ERK5 or anti-MEF2 antibodies. Cells were collected after maintenance in medium containing serum for 18 hours.

AP-1 binding did not affect the load-induced increase in reporter gene activity, although it was accompanied by a 3-fold reduction in *c-jun* promoter basal activity. These results suggest that the AP-1 site is important for basal but not for load-induced *c-jun* transcription in rat hearts. However, mutation that inhibits binding of MEF2 factors abolished the load-induced increase in reporter gene activity, indicating that the MEF2 site is essential for the load-induced transcriptional activation of *c-jun*. Experiments performed in NRVMs treated with phenylephrine confirmed the results obtained in *in vivo* preparations, strengthening the idea that the MEF2 site of the *c-jun* promoter and presumably MEF2 factors are important regulators of *c-jun* expression in cardiac myocytes in response to hypertrophic stimuli. In this context, although the present study lacks a direct demonstration that changes in MEF2 protein function interfere with *c-jun* expression, sev-

eral studies have shown that procedures that render MEF2 proteins inactive affect *c-jun* promoter-reporter gene activity to a similar extent as mutation of the MEF2 site. This indicates that the use of *c-jun* promoter construction containing MEF2 site mutation is a useful tool to assess the regulatory function of MEF2 transcription factors.^{22–24}

The contribution of MEF2 factors to the regulatory events that occur early in response to hypertrophic stimuli was not previously explored in cardiac myocytes. The idea that MEF2 proteins regulate transcriptional events in the myocardium that precede the activation of muscle-specific genes during the hypertrophic stimuli was strengthened by our demonstration in the present study that p70^{MEF2} is expressed at high levels in cardiac myocyte nuclei and that MEF2 is rapidly activated in overloaded hearts, as demonstrated by EMSA. Although our data indicate that MEF2 factors play an important role to the regulation of *c-jun* expression in response to hypertrophic stimuli, questions such as the relative contribution of specific members of MEF2 family to the regulation of *c-jun* and the importance of this pathway to the whole process of cardiac hypertrophy remain to be determined.

Upstream Activator of MEF2 in Cardiac Myocytes in Response to Hypertrophic Stimuli

MEF2 can be regulated at transcriptional and translational levels.¹² Two other potentially important mechanisms for the regulation of MEF2 activity may lie in the control of their nuclear localization and transcriptional activity, with both probably regulated by reversible phosphorylation of this factor in serine and threonine residues.¹² In this context, MAPKs have been shown to phosphorylate and activate MEF2 transcription factors.^{19,20} In addition, MEF2 activity has been shown to be regulated by dissociation from class II histone deacetylases^{10,25} as well as through dephosphorylation by calcineurin.^{10,26} However, the relative importance and the necessity and sufficiency of each of these mechanisms to MEF2 activation in response to hypertrophic stimuli remain to be elucidated.

Although any MAPK could potentially influence MEF2 activity, the available data have restricted this effect to p38 and ERK5.^{19,20} Moreover, distinct experimental evidence indicates that p38 and ERK5 pathways may regulate cardiac myocyte hypertrophy.^{27,28} In this context, experimental evidence has indicated that MEF2 proteins are targets of p38 activity during cardiac growth in a transgenic murine model of myocardial hypertrophy.¹¹ However, our present data indicate that pressure overload lasting up to 2 hours is not accompanied by a detectable change in the activity of p38 in the rat myocardium. Thus, these results do not support a role for p38 in the early activation of MEF2 in overloaded myocardium of rats. This agrees with a previous observation indicating that the activation of p38-MAPK rather than initiation of the hypertrophic response may be more important in its maintenance over a longer period of time.²⁹ However, this contrasts to a more recent report showing an early activation of p38 in the rat myocardium after aortic constriction.³⁰ The reason for the discrepancies is not apparent, but differences in the experimental design and stimulus

intensity could explain the difference between the results of the present and previous studies. To date, although rats of the present study were subjected to increases in peak systolic pressure of the ascending aorta of ≈ 40 mm Hg, systolic gradients of 100 mm Hg were observed in the above-mentioned study of Fischer et al.³⁰ Such pressure stimulus, by inducing greater systolic stress, might trigger additional effects, such as ischemia and inflammatory activation, which are known to be effective activators of p38-MAPK.³¹

In contrast to p38, our present findings indicate that ERK5 was rapidly activated and migrated to the nuclei of cardiac myocytes of overloaded hearts, as assessed by kinase assays and immunohistochemical analysis, respectively. In addition, we showed that pressure overload induced an ERK5-p70^{MEF2} association and that load-induced activated ERK5 is able to phosphorylate p70^{MEF2} in vitro. These phenomena paralleled the increase in MEF2-DNA binding activity, supporting the idea that ERK5 might modulate the activation of p70^{MEF2} by acute pressure overload in the rat heart. On the other hand, by transfecting NRVMs with ERK5-antisense ODNs, we also demonstrated that ERK5 plays a central role in phenylephrine-induced *c-jun* promoter upregulation. A further suggestion of the interaction of ERK5-MEF2 in the regulation of *c-jun* promoter activation is supported by the fact that ERK5 antisense inhibited the phenylephrine-induced *c-jun* promoter activation to the same extent as MEF2 element mutation.

The mechanisms whereby hypertrophic stimuli induces the activation of ERK5 in vivo remain to be determined, but studies have shown that stimuli such as mechanical stress, ischemia, oxidative stress, interleukins, and growth factors may activate ERK5 in cardiac myocytes.^{28,32,33} Our present results, which show the *c-jun* promoter activation by phenylephrine in NRVMs and its abolition by transfection with ERK5-antisense ODNs, suggest that α_1 -adrenergic receptors may also be involved in ERK5 activation, which is in accord with results from studies that have demonstrated ERK5 activation by G-protein-coupled receptor pathways.^{28,34}

In conclusion, our data indicate that the transcriptional activation of *c-jun* elicited by mechanical and agonist-induced stimuli in cardiac myocytes involves the activation of MEF2, suggesting that this transcription factor may play a central role to the regulation of early gene expression induced by hypertrophic stimuli. In searching for the upstream regulators, we have also shown data compatible with the notion that ERK5 might be an important mediator of MEF2 and *c-jun* promoter activation in response to hypertrophic stimuli. Further work will be required to unravel the importance of *c-Jun* upregulation in the process of myocardial hypertrophy.

Acknowledgments

This study was sponsored by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 99/10263-0, 00/03542-9, and 01/11698-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 521098/97-1). We thank Dr Ron Prywes for providing *c-jun* promoter constructs.

References

1. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102:470–479.

2. Komuro I, Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:55-75.
3. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. 1992;267:10551-10560.
4. Schunkert H, Jahn L, Izumo S, Apstein CS, Lorell BH. Localization and regulation of c-fos and c-jun protooncogene induction by systolic wall stress in normal and hypertrophied rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:11480-11484.
5. Han TH, Lamph WW, Prywes R. Mapping of epidermal growth factor-, serum-, and phorbol ester-responsive sequence elements in the c-jun promoter. *Mol Cell Biol*. 1992;12:4472-4477.
6. Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*. 1988;55:875-885.
7. Coso OA, Montaner S, Fromm C, Lacal JC, Prywes R, Teramoto H, Gutkind JS. Signaling from G protein-coupled receptors to the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor: evidence for a novel c-jun amino-terminal kinase-independent pathway. *J Biol Chem*. 1997;272:20691-20697.
8. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*. 1997;386:296-299.
9. Molken JD, Markham BE. Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates α -cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1993;268:19512-19520.
10. Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest*. 2000;105:1395-1406.
11. Kolodziejczyk SM, Wang L, Balazsi K, DeRepentigny Y, Kothary R, Megency LA. MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol*. 1999;9:1203-1206.
12. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:167-196.
13. Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 1996;78:954-961.
14. Abe J, Takahashi M, Ishida M, Lee JD, Berk BC. c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J Biol Chem*. 1997;272:20389-20394.
15. Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz W Jr, Franchini KG. Load-induced focal-adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol*. 2002;281:H556-H564.
16. Ferreri NR, An S-J, McGiff JC. Cyclooxygenase-2 expression and function in the medullary thick ascending limb. *Am J Physiol*. 1999;277:F360-F368.
17. Thai MV, Guruswamy S, Cao KT, Pessin JE, Olson AL. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice: regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. *J Biol Chem*. 1998;273:14285-14292.
18. Clarke N, Arenzana N, Hai T, Minden A, Prywes R. Epidermal growth factor induction of the c-jun promoter by a Rac pathway. *Mol Cell Biol*. 1998;18:1065-1073.
19. Marinissen MJ, Chiariello M, Pallante M, Gutkind JS. A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH₂-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4289-4301.
20. Han J, Molken JD. Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10:19-22.
21. Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Signaling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal*. 1998;10:693-698.
22. Han TH, Prywes R. Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-jun promoter. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2907-2915.
23. Kato Y, Zhao M, Morikawa A, Sugiyama T, Chakravorty D, Koide N, Yoshida T, Tapping RI, Yang Y, Yokochi T, Lee JD. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem*. 2000;275:18534-18540.
24. Suzuki E, Nishimatsu H, Satonaka H, Walsh K, Goto A, Omata M, Fujita T, Nagai R, Hirata Y. Angiotensin II induces myocyte enhancer factor 2- and calcineurin/nuclear factor of activated T cell-dependent transcriptional activation in vascular myocytes. *Circ Res*. 2002;90:1004-1011.
25. Lu J, McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with myo II histone deacetylases. *Mol Cell*. 2000;6:233-244.
26. Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams ES. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J*. 2000;19:1963-1973.
27. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*. 1998;273:2161-2168.
28. Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson EN. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2001;20:2757-2767.
29. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*. 1998;83:345-352.
30. Fischer TA, Ludwig S, Flory E, Gambaryan S, Singh K, Finn P, Pfeffer MA, Kelly RA, Pfeffer JM. Activation of cardiac c-Jun NH₂-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. *Hypertension*. 2001;37:1222-1228.
31. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart: p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res*. 1996;79:162-173.
32. Takeishi Y, Abe J, Lee JD, Kawakatsu H, Walsh RA, Berk BC. Differential regulation of p90 ribosomal S6 kinase and big mitogen-activated protein kinase 1 by ischemia/reperfusion and oxidative stress in perfused guinea pig hearts. *Circ Res*. 1999;85:1164-1172.
33. Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W, Lee JD, Kawakatsu H, Lawrence EG, Hoit BD, Berk BC, Walsh RA. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1637-1648.
34. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:368-376.

c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart

Wilson Nadruz Jr.,¹ Claudia B. Kobarg,¹ Jörg Kobarg,² and Kleber G. Franchini¹

¹Department of Internal Medicine, School of Medicine, State University of Campinas, 13081-970 Campinas; and

²Center of Structural Molecular Biology, National Synchrotron Light Laboratory, 13084-971 Campinas, São Paulo, Brazil

Submitted 8 May 2003; accepted in final form 30 September 2003

Nadruz, Wilson, Jr., Claudia B. Kobarg, Jörg Kobarg, and Kleber G. Franchini. c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H760–H767, 2004; 10.1152/ajpheart.00430.2003.—The transient increase in the expression of transcription factors encoded by immediate-early genes has been considered to play a critical role in the coordination of early gene expression during the hypertrophic growth of cardiac myocytes. Here, we investigated the regulation of c-Jun and its upstream activators JNKs in the myocardium of rats subjected to acute pressure overload induced by transverse aortic constriction. Western blotting and immunohistochemistry analysis demonstrated that both JNK1 and JNK2 were transiently activated by pressure overload, but only JNK1 was activated at the nuclei of cardiac myocytes. JNK1 activation was paralleled by phosphorylation of c-Jun at serine-63 in the myocardial nuclear fraction and by an increase in c-Jun expression in cardiac myocytes. A consistent increase in DNA binding of activator protein-1 (AP-1) complex was observed after 10 and 30 min of pressure overload and Supershift assays confirmed that c-Jun was a major component of activated AP-1 complex. Moreover, experiments performed with the specific JNK inhibitor SP-600125 abolished c-Jun phosphorylation and markedly attenuated its expression as well as the expression of the fetal gene β -myosin heavy chain. Overall, these findings demonstrate a molecular basis for load-induced activation of c-Jun in cardiac myocytes and its connection with the regulation of fetal gene, characteristic of the acute response to pressure overload.

pressure overload; protein; myocardium; activator protein-1

HYPERTROPHY IS AN ADAPTIVE response of cardiac myocytes to increased hemodynamic stress (24, 25). The development of the hypertrophic phenotype is characterized by a coordinated pattern of gene expression, which includes an early and transient expression of immediate-early genes, followed by a recapitulation of an embryonic pattern of genetic transcription, and an increase in contractile protein content (16, 24). The immediate-early genes are rapidly and transiently activated in response to sustained hypertrophic stimuli and encode transcription factors, such as c-Jun, c-Fos, and c-Myc, that are normally expressed at low levels in cardiac myocytes (12, 15, 16).

c-Jun homo activating and heterodimers with c-Fos and transcription factor-2 constitute transcription factors of the activator protein-1 (AP-1) complex (13). c-Jun has been shown to be regulated either by increased expression or by posttranslational enhancement of its transcriptional activity, which includes phosphorylation of serines-63 and -73 by JNKs (7, 29).

In the myocardium, mechanical overload has been shown to increase c-Jun expression only transiently (5, 23, 27), but several lines of evidence indicate that this transcription factor might be important for the subsequent activation of genes that are characteristically expressed during cardiac hypertrophy, such as α -skeletal actin and atrial natriuretic factor (1, 5). Transfection of cardiac myocytes with a dominant negative of c-Jun has been shown to inhibit cardiac myocyte hypertrophy in response to phenylephrine and endothelin, suggesting that c-Jun might play an important role in cardiac hypertrophy (20).

Concerning the regulation of c-Jun expression in overloaded myocardium, we recently demonstrated that the increases in c-Jun expression occur through a combination of an unknown posttranscriptional mechanism and transcriptional regulation by myocyte enhancer factor-2 transcription factors in the rat myocardium (19). On the other hand, posttranslational regulation of c-Jun by hemodynamic overload has been also previously suggested (9). However, little is known about the signaling mechanisms involved in the activation of c-Jun by mechanical stress in cardiac myocytes *in vivo*.

In the present study, we aimed to investigate the activation of c-Jun induced by pressure overload and the role of JNK isoforms in this process. EMSA and supershift assays revealed that c-Jun was a major component of the AP-1 complex activated by pressure overload. Western blotting and immunohistochemistry analysis demonstrated that both JNK1 and JNK2 were transiently activated by pressure overload, but only JNK1 was activated at the nuclei of cardiac myocytes. JNK1 activation was paralleled by c-Jun phosphorylation in the myocardial nuclear fraction and by an increase in c-Jun expression in cardiac myocytes. Experiments performed with specific JNK inhibitor abolished c-Jun phosphorylation and markedly attenuated its expression as well as the expression of the fetal gene β -myosin heavy chain (β -MHC).

MATERIALS AND METHODS

Animals. The experiments were performed on male Wistar rats (160–200 g) obtained from animal facilities of the State University of Campinas (Campinas, Brazil). All animals received care in compliance with the principles of laboratory animal care formulated by the university's Animal Care and Use Committee.

Antibodies and chemicals. Mouse monoclonal anti-phospho-JNK (sc-6254), anti-phospho-c-Jun (sc-822), anti-phospho-ERK1/2 (sc-7383), rabbit polyclonal anti-JNK1/2 (sc-571), anti-ERK1/2 (sc-153), anti-c-Jun (sc-1694), and anti-JNK1 (sc-474) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). [¹²⁵I]protein A was from Amersham. The JNK inhibitor SP-600125 was from

Address for reprint requests and other correspondence: K. G. Franchini, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zefferino Vaz," 13081-970 Campinas, São Paulo, Brazil (E-mail: franchini@obelix.unicamp.br).

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

Calbiochem. Anti-mouse IgG antibody and all other grade chemicals were from Sigma.

Aortic constriction. Rats were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg rat body wt ip) and placed on a temperature-controlled surgical table. Catheters were placed in the right common carotid artery and right femoral artery for blood pressure measurement. The transverse thoracic aorta was dissected, and a silver clip (500 μ m ID) was positioned around the transverse thoracic aorta between the brachiocephalic truncus and the left common carotid branches. The thoracic cavity was closed and the rats were studied after a period of 10 up to 120 min after surgery. Sham-operated animals underwent an identical procedure except for placement of the silver clip.

Pharmacological inhibition of JNK. Wistar rats were treated with the specific JNK inhibitor SP-600125 (6 mg/kg ip) 1 h before aortic constriction as previously described (28). Sham rats were treated with vehicle (6 ml/kg dimethyl sulfoxide). After 10 min, 4 and 6 h of pressure overload, blood pressure was measured, the hearts were excised, and whole extracts (19) of the left ventricle were analyzed by immunoblotting with anti-JNK1/2, anti-phospho-JNK, anti-c-Jun, anti-phospho-c-Jun, anti-ERK1/2, and anti-phospho-ERK1/2 as well as by RT-PCR for β -MHC.

Subcellular fractionation. Subcellular fractionation was performed as previously described (18) except for minor modifications. At the end of each aortic constriction period, the thoracic cavity was opened and the left ventricle excised and homogenized in 5 volumes of solubilization buffer composed of 0.32 mol/l sucrose, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/l EGTA, 2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 50 mmol/l sodium pyrophosphate, 50 mmol/l sodium fluoride, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 2 mmol/l PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml at 4°C with the use of a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments; Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 s. The homogenates were centrifuged (1,000 g, 10 min, 4°C) to obtain pellets that contained the nuclear fraction. The supernatant was centrifuged (100,000 g, 60 min, 4°C) to obtain the cytosolic fraction. The nuclear fraction was solubilized in Triton buffer [1% Triton X-100, 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l EDTA, 50 mmol/l sodium pyrophosphate, 50 mmol/l sodium fluoride, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 2 mmol/l PMSF, and 0.1 mg of aprotinin/ml], and then centrifuged (15,000 g, 30 min, 4°C). The nuclear extract was obtained from the supernatant.

Protein analysis by immunoblotting. Aliquots of subcellular or whole myocardial extracts were treated with Laemmli sample buffer containing 100 mmol/l DTT and heated in a boiling water bath for 5 min, after which they were subjected to SDS-PAGE (10% bis-acrylamide) in a miniature gel apparatus (Mini-Protein, Bio-Rad Laboratories; Richmond, CA). Electrophoretic transfer of proteins from the gel to nitrocellulose membrane was performed for 90 min at 120 V (constant) in the Mini-Protein miniature transfer apparatus. Nonspecific protein binding to the nitrocellulose membrane was reduced by preincubating the filter in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20) overnight at 4°C. The nitrocellulose membrane blot was incubated with primary antibodies diluted in 10 ml of blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4°C and then washed for 60 min in blocking buffer without milk or BSA. The blots were subsequently incubated with 2 μ Ci of [¹²⁵I]protein A (30 μ Ci/ μ g) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at room temperature and then washed again for 30 min as described above. [¹²⁵I]protein A bound to the specific antibodies was detected by autoradiography using preflashed XAR film (Eastman Kodak; Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screens (DuPont; Wilmington, DE) at -80°C for 24 h. Band intensities were quantified by optical densitometry of the developed autoradiographs.

Tissue preparation for immunohistochemistry. Immunohistochemical assays were performed as previously described (8). Rats were

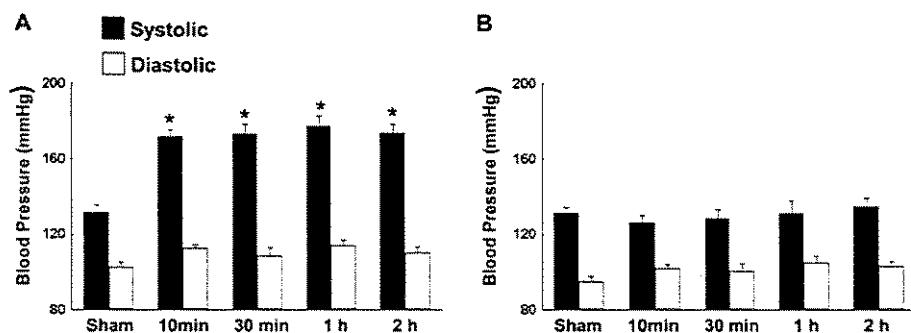
heparinized and euthanized with a lethal dose of lidocaine. The ventricles were fixed by overnight immersion with 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/l phosphate buffer, pH 7.4, and processed to inclusion in paraffin. Sections (5 μ m) were transferred to poly-L-lysine-coated glass slides. The endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.03% H₂O₂ in 0.1 mol/l PBS at room temperature for 30 min. The sections were preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk on 0.1 mol/l PBS) for 45 min at 37°C, followed by overnight incubation with the primary antibodies (1:75) at 4°C. The sections were extensively rinsed in 0.05 mol/l PBS and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:100) for 2 h at 25°C. After being washed in the same method as above, the sections were subjected for 10 min to freshly prepared diaminobenzidine that contained H₂O₂ (0.8%). Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies failed to produce any significant staining.

Preparation of nuclear extracts and EMSA. Nuclear extracts were prepared as described previously (30). Left ventricles were harvested and snap frozen in liquid nitrogen. A pool of two hearts was used for each experimental period. The frozen tissues were pulverized in liquid nitrogen and homogenized in 10 volumes of homogenization buffer A (250 mmol/l sucrose, 10 mmol/l HEPES, pH 7.6, 25 mmol/l KCl, 1 mmol/l EDTA, 10% glycerol, 0.1 mmol/l PMSF, 2 μ g/ml each aprotinin and leupeptin, and 10 mmol/l sodium orthovanadate) with 10 strokes of a Teflon pestle. The homogenate was layered over a one-half volume of buffer B (1 mol/l sucrose, 10 mmol/l HEPES, pH 7.6, 25 mmol/l KCl, 1 mmol/l EDTA, 10% glycerol, 0.1 mmol/l PMSF, 2 μ g/ml each aprotinin and leupeptin, and 10 mmol/l sodium orthovanadate) and centrifuged at 3,900 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in buffer A-glycerol [9:1 (wt/wt)] and layered over a one-third volume of buffer B-glycerol [9:1 (wt/wt)]. The gradient was centrifuged at 48,000 g for 30 min at 4°C. The semipurified nuclear pellet was resuspended in 1 vol of nuclear extraction buffer (10 mmol/l HEPES, pH 7.6, 400 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 0.1 mmol/l EDTA, 10% glycerol, 1 mmol/l DTT, 0.1 mmol/l PMSF, and 10 mmol/l sodium orthovanadate). Nuclear proteins were then extracted on ice for 30 min, and the particulate material was removed by centrifugation at 13,000 g in a microfuge for 10 min at 4°C. The supernatant was dialyzed against buffer C (25 mmol/l HEPES, pH 7.6, 100 mmol/l KCl, 0.1 mmol/l EDTA, 10% glycerol, 1 mmol/l DTT, 0.1 mmol/l PMSF, 2 μ g/ml each aprotinin and leupeptin, and 10 mmol/l sodium orthovanadate) for 3 to 4 h. The dialysate was assayed for total protein (Bradford) and stored at 70°C.

EMSA were performed as previously described with modifications (19). AP-1 DNA-binding site oligonucleotides (CGCTTGATGACT-CAGCCGGAA) were from Santa Cruz Biotechnology. The oligonucleotides were end labeled with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase. The probes (5 and 7 pmol/l in final reaction volume) were incubated with 20 μ g of nuclear extracts in a 20- μ l reaction containing 1 μ g poly(dI-dC), 50 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, and 2% glycerol for 20 min at room temperature. For competition studies, the extracts were incubated with $\times$ 100 excess of unlabeled AP-1 oligonucleotides. For immunogel shift assays, the extracts were incubated with 3 μ g of anti-c-Jun antibody or nonimmune serum 45 min before electrophoresis at room temperature. The samples were then analyzed on a nondenaturing 6% polyacrylamide gel and run at 400 V for 90 min at 4°C. The dried gels were exposed and the bands were visualized by autoradiography.

RT-PCR analysis. Left ventricles were homogenized in TRIzol reagent, and total RNA was isolated by precipitation with isopropyl alcohol as previously described (19). A 5- μ g aliquot of total RNA was used for cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified by PCR using Taq DNA polymerase with oligonucleotides derived from the β -MHC gene (5'-CCAACACCAACCTGTC-

Fig. 1. Hemodynamics. Blood pressure measured at ascending (A) and abdominal (B) aorta ($n = 10$) along the experimental period is shown. $*P < 0.05$.



CAAGTTC-3' and 5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3') or β -actin gene (5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3' and 5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'). Oligonucleotides were synthesized by Life Technologies. The amplification conditions consisted of denaturing at 94°C for 2 min, annealing at 45°C (β -actin) and 54°C (β -MHC) for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. The number of cycles was 25. PCR products were size fractionated with agarose gel electrophoresis. After being stained with ethidium bromide, the DNA bands were visualized with a UV transilluminator.

Statistical analysis. The data are presented as means $\pm$ SE. Differences between the mean values of the densitometric readings were tested with one-way ANOVA, followed by post hoc multiple comparisons with the use of Bonferroni's corrected t -test. A value of $P < 0.05$ indicated statistical significance.

RESULTS

Effect of aortic constriction on blood pressure. Figure 1 summarizes the effect of aortic constriction on blood pressure measured in the ascending and abdominal aorta of anesthetized

rats. Ascending aorta systolic blood pressure increased by ~ 40 mmHg in the period ranging from 10 min to 2 h after aortic constriction (Fig. 1A). Blood pressure measured in the abdominal aorta remained stable at levels similar to those seen in control rats (Fig. 1B).

Effect of pressure overload on JNKs. Immunoblotting assays with anti-JNK1/2 antibody showed that cytosolic and nuclear fractions of rat left ventricles expressed both p46 (JNK1) and p54 (JNK2) isoforms (Fig. 2A). Experiments with fractional centrifugation of left ventricular myocardial homogenates obtained from sham-operated rats indicated that the amounts of JNK1 and JNK2 were 8.2- and 12.5-fold greater in the cytosolic than in the nuclear fraction, respectively (Fig. 2, A and B). A significant nuclear translocation of JNK1 was detected after 10 min of aortic constriction, as indicated by the increase in the amount of this protein detected in the nuclear fraction, simultaneously to a reduction in the cytosolic fraction. On the basis of these data, we estimated in 23% the nuclear translocation of

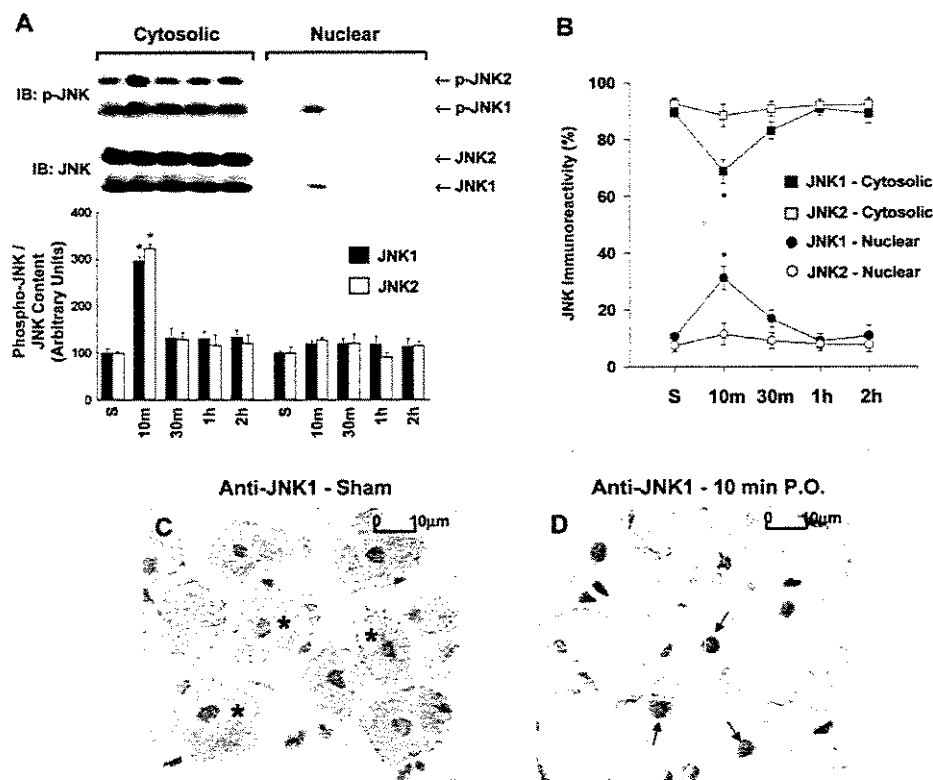


Fig. 2. JNK expression and activation by pressure overload. A: representative immunoblot (IB) from six experiments of cytosolic and nuclear subfractions from sham-operated and overloaded hearts using anti-JNK and anti-phospho-JNK (p-JNK) antibodies. B: amounts of JNK1 and JNK2 determined by densitometry from immunoblots. S, Sham. $*P < 0.05$. C: distribution of JNK1 in the myocardium of control rats, showing a diffuse immunostain at the sarcoplasm (yellowish stain marked with *). D: localization of JNK1 in myocardium subjected to 10 min of pressure overload (PO). Strong positive signals of JNK1 were detected at cardiac myocytes nuclei (brownish stains are marked with arrows).

JNK1 (Fig. 2B). The redistribution of JNK1 induced by pressure overload was confirmed by immunohistochemical analysis of myocardial tissue with a specific antibody against JNK1 (sc-474). In control hearts, JNK1 was mainly found in the cytosol of cardiac myocytes (Fig. 2C), whereas in overloaded hearts (10 min), a marked anti-JNK1 antibody staining was observed at nuclei of cardiac myocytes (Fig. 2D).

With the use of a specific antibody against the phosphorylated isoforms of JNKs, we assessed the effect of pressure overload on the activity of these kinases (Fig. 2A). The small amount of activated baseline JNK was found predominantly in the cytosolic fraction of rat heart. Pressure overload induced an

early (10 min of aortic constriction) and transient phosphorylation of JNK1 and JNK2 in the cytosolic fraction of the rat heart (3-fold for JNK1 and 3.2-fold for JNK2). This was accompanied by an increase in the intensity of phosphorylated JNK1 band in the nuclear fraction. However, the ratio of phosphorylated JNK1 to total JNK1 remained unaltered, indicating that the increased JNK1 phosphorylation seen in the nuclear fraction of 10-min-overloaded hearts was due to nuclear translocation of phosphorylated JNK1. We were unable to find a significant increase in JNK2 phosphorylation in the nuclear fraction, although a robust activation of this isoform was detected in the cytosolic fraction.

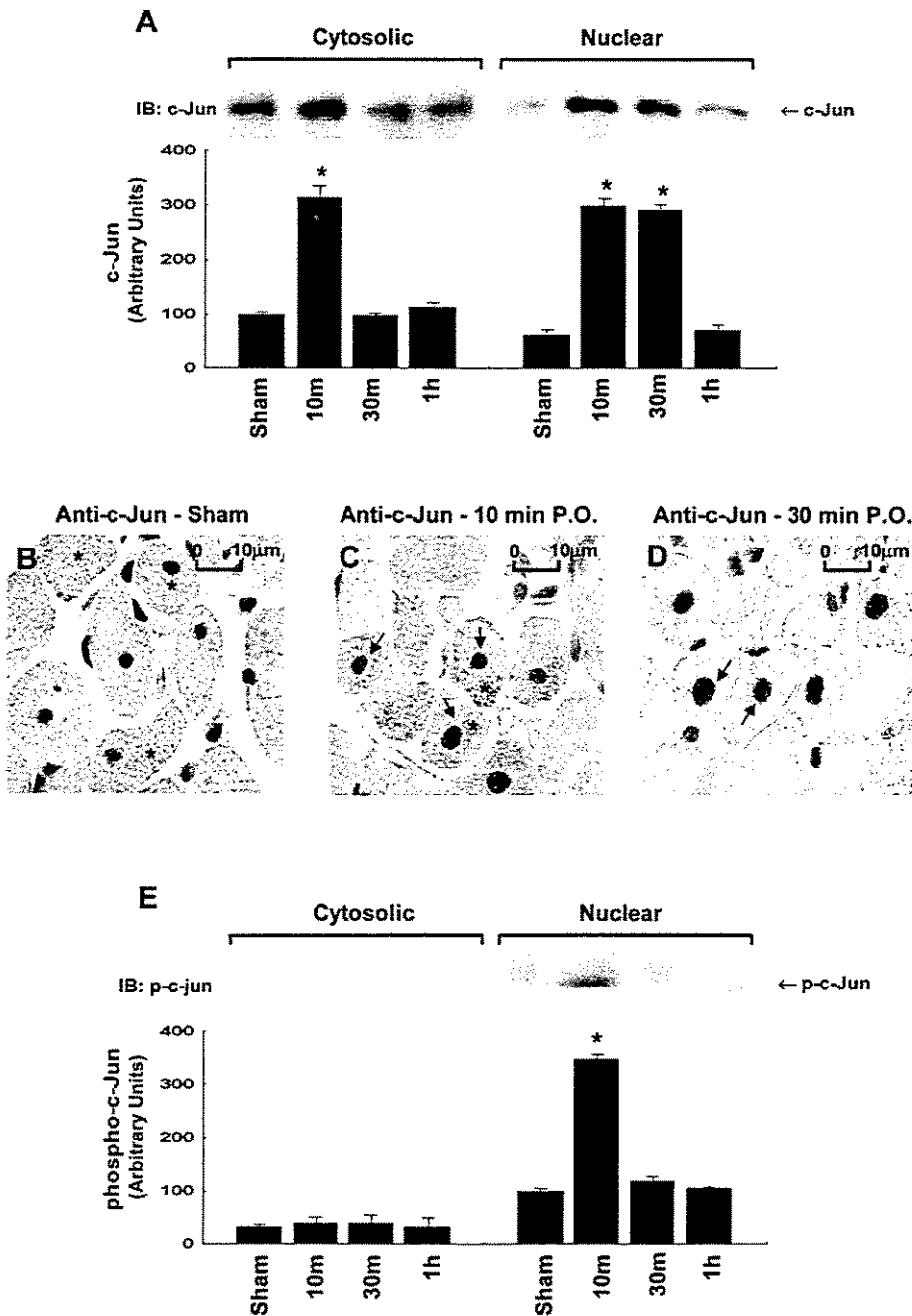


Fig. 3. Subcellular expression and phosphorylation of c-Jun by pressure overload. A: representative immunoblot ($n = 6$) of cytosolic and nuclear subfractions from sham-operated and overloaded hearts using anti-c-Jun antibodies. B: distribution of c-Jun in the myocardium of control rats, showing a diffuse immunostaining at the sarcoplasm (yellowish stain marked with *). C and D: localization of c-Jun in myocardium subjected to 10 and 30 min of PO. *Intense c-Jun immunostaining at the sarcoplasm (yellowish staining). Arrows show strong positive signals of c-Jun at cardiac myocytes nuclei (brownish staining). E: representative immunoblot ($n = 6$) of cytosolic and nuclear subfractions from sham-operated and overloaded hearts using anti-phospho-c-Jun antibodies. * $P < 0.05$.

Regulation of c-Jun expression/phosphorylation by pressure overload. The effect of hemodynamic overload on c-Jun expression was assessed by immunoblotting of subcellular fractions and by immunohistochemistry of myocardial sections with anti-c-Jun antibody. Immunoblotting of myocardial sub-fractions showed a minor c-Jun expression in both the cytosolic and nuclear fractions in the left ventricles of sham-operated rats. A marked increase in c-Jun expression was observed in the cytosolic fraction (~3-fold) after 10 min and in the nuclear fraction (~5-fold) after 10 and 30 min of aortic constriction (Fig. 3A). Cellular localization of c-Jun was then assessed by immunohistochemical analysis. In sham-operated hearts, a faint immunostaining of c-Jun antibody was detected in the cytosol of cardiac myocytes (Fig. 3B). In 10-min-overloaded hearts, increased c-Jun immunostaining was noted in the cytosol and in the nuclei of cardiac myocytes (Fig. 3C), whereas in 30-min-overloaded hearts, a marked increase in c-Jun expression was only detected in the nuclei of cardiac myocytes (Fig. 3D).

JNK has been shown to enhance the transcriptional activity of c-Jun by phosphorylation of serine-63 (7, 28). Immunoblotting analysis of myocardial subcellular fractions using a phosphospecific antibody against serine-63 c-Jun revealed a significant (3.5-fold) increase in the amount of serine-63-phosphorylated c-Jun in the nuclear fraction after 10 min of pressure overload (Fig. 3E). In contrast, no significant increase in c-Jun phosphorylation was detected in the cytosolic fraction along the experimental period.

Regulation of AP-1 activation by c-Jun in overloaded myocardium. c-Jun is a major component of the AP-1 complex of transcription factors (13). To investigate whether the increased expression of c-Jun in the overloaded myocardium was associated with increased DNA binding and activation of this transcription factor, we performed EMSA and supershift assay of left ventricle nuclear extracts with an oligonucleotide containing the consensus binding DNA sequence for AP-1 complex of transcription factors (Fig. 4A). A consistent increase in DNA binding activity of AP-1 was observed after 10 and 30 min of sustained pressure overload. The specificity of the DNA probe for AP-1 binding was confirmed by competition assays with unlabeled oligonucleotides for AP-1 binding (Fig. 4A). The DNA protein complex was competed away by a $\times 100$ molar excess of unlabeled AP-1 oligonucleotide.

We then evaluated the role of c-Jun in the load-induced activation of AP-1 in rat myocardium through Supershift assays with anti-c-Jun antibody using nuclear extracts of 30-min-overloaded myocardium (Fig. 4, A and B). The intensity of the band corresponding to the DNA-protein complex was diminished when the reaction mixture containing the anti-c-Jun antibody was used. However, this did not occur when the reaction mixture contained the nonimmune serum.

Role of JNK inhibition on c-Jun expression/phosphorylation and on fetal type gene expression. To further investigate the influence of load-induced JNK activation on c-Jun phosphorylation and expression in the early period after aortic constriction, rats were treated with the pharmacological JNK inhibitor SP-600125 and left ventricle extracts analyzed with antibody against c-Jun and phospho-c-Jun. The results shown in Fig. 5A indicate that SP-600125 treatment efficiently abolished the load-induced activation of JNKs. The specificity of JNKs inhibition by SP-600125 was indicated by the absence of effect

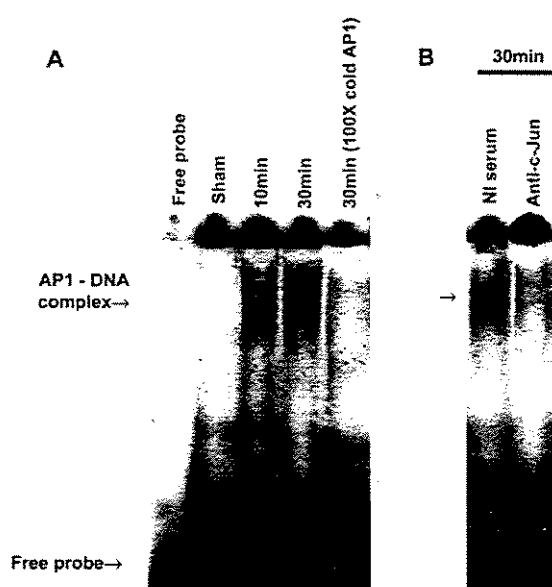


Fig. 4. DNA binding of activator protein (AP)-1/c-Jun by PO. A: representative EMSA (from 3 experiments) with the use of an AP-1 consensus oligonucleotide. Protein (20 μ g) was used in each sample. Specificity of the AP-1 complex was determined by specific (unlabeled AP-1 consensus oligonucleotide) competition. B: supershift assay with nonimmune (NI) serum and anti-c-Jun antibodies. Arrows indicate protein-DNA complex.

of this inhibitor on ERK activation. Western blot analysis staining with anti-c-Jun and anti-phospho-c-Jun antibodies revealed that JNK inhibition significantly reduced the early increases in c-Jun expression and phosphorylation at serine-63 induced by pressure overload (Fig. 5B). Treatment with SP-600125 produced no change in rat blood pressure in this study (Fig. 5C).

To test whether JNK-mediated signaling is involved in the load-induced expression of the myocardial fetal gene program, we examined the regulation of β -MHC expression in left ventricles by RT-PCR. As shown in Fig. 5D, β -MHC transcripts increased significantly after 6 h of pressure overload. Treatment with SP-600125 did not change the baseline β -MHC transcript, but abolished its increase induced by pressure overload. Figure 5D also shows that neither pressure overload nor the treatment with SP-600125 changed β -actin mRNA expression in left ventricles.

DISCUSSION

The present data add comprehensive information on c-Jun activation induced by acute pressure overload in the rat heart. EMSA showed that DNA binding of AP-1 complex is rapidly enhanced by pressure overload in myocardial cells. Further analysis with Supershift assay revealed that c-Jun is a major component of DNA protein complex. By combining immunoblotting of subcellular fractions and immunohistochemical analysis of rat myocardium we showed that increased c-Jun expression by pressure overload was accompanied by transient JNK-induced phosphorylation of serine-63 in this transcription factor at the nuclei of cardiac myocytes. The correspondence of JNK1 subcellular distribution and activation with those of c-Jun indicates that this isoform, rather than JNK2, is responsible for c-Jun phosphorylation in overloaded myocardium.

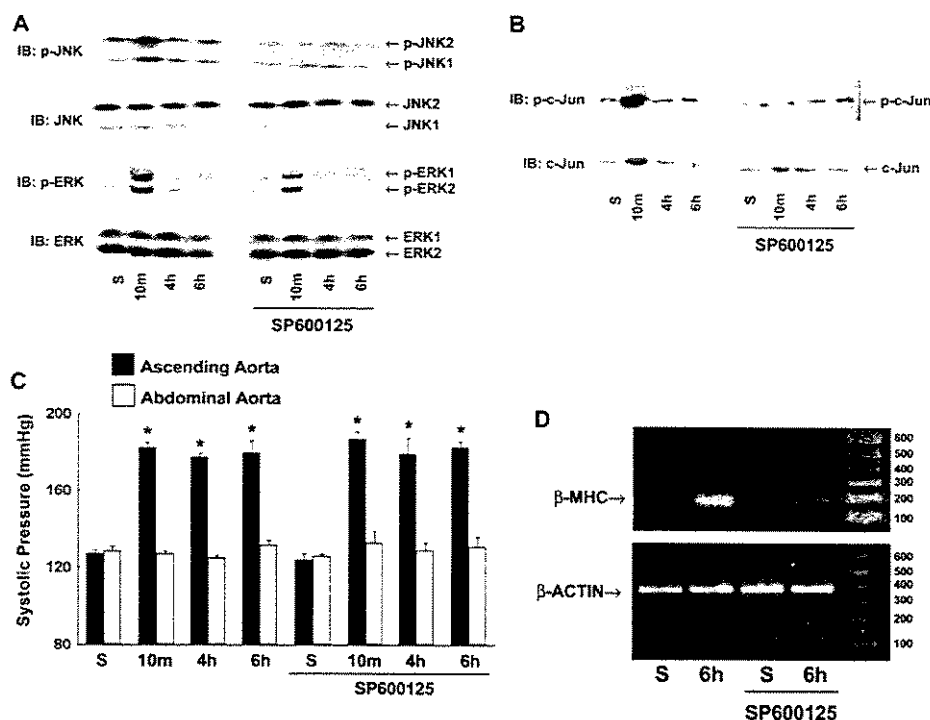


Fig. 5. Effect of JNK inhibitor SP-600125 on c-Jun activation and on β -myosin heavy chain (β -MHC) expression. A and B: representative IB ($n = 3$) from sham and overloaded left ventricular extracts using anti-JNK1/2, anti-phospho-JNK, anti-ERK1/2, and anti-phospho-ERK antibodies (A) and anti-c-Jun and anti-phospho-c-Jun antibodies (B). C: systolic blood pressure measured on sham and overloaded rats. * $P < 0.05$. D: RT-PCR of β -MHC and β -actin mRNA in rat myocardium. Representative gels from three experiments are shown.

The ablation of JNK activity by a specific pharmacological inhibitor impaired the load-induced c-Jun serine-63 phosphorylation and increased expression, confirming the central role of JNKs for the early load-induced c-Jun activation. The inhibition of JNK/c-Jun activation resulted in marked reduction of load-induced β -MHC expression. Overall, these results demonstrate that acute pressure overload regulates c-Jun in cardiac myocytes by a combination of increased expression and phosphorylation induced by JNK activation and that the JNKs/c-Jun pathway plays a role in the regulation of early myocardial gene expression in response to pressure overload.

A transient increase in the expression of myocardial c-Jun induced by mechanical stimuli has been demonstrated in diverse experimental models (23, 27). Recently, we (19) have shown that pressure overload increases c-Jun expression in rat myocardium through an earlier posttranscriptional mechanism and a later transcriptional regulation mediated by myocyte enhancer factor-2 transcription factors in the rat myocardium. In the present study, we extended those observations to show that earlier increases on c-Jun expression are simultaneous to increased serine-63 phosphorylation of this transcription factor. Moreover, our demonstration here that pharmacological

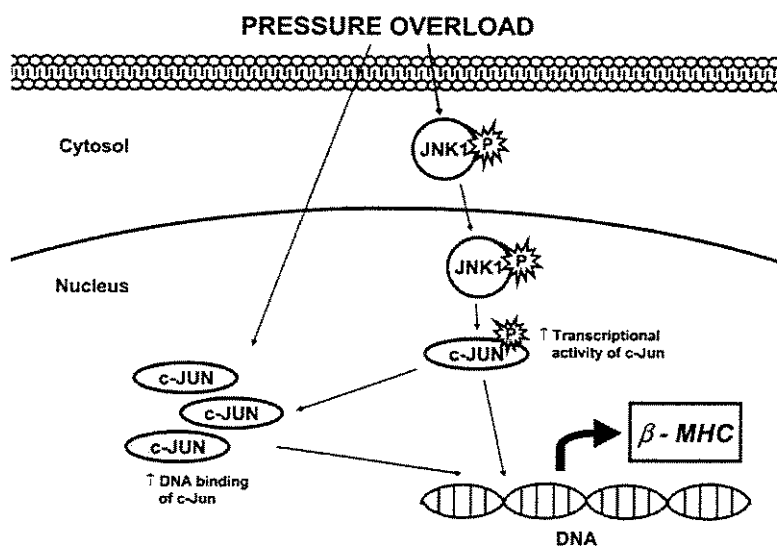


Fig. 6. Schematic model of acute JNK and c-Jun activation induced by PO in the rat heart.



inhibition of c-Jun phosphorylation by JNKs induced a concomitant attenuation on c-Jun expression suggests that post-translational mechanisms might regulate the amount of c-Jun in acute overloaded hearts. Accordingly, recent evidence obtained in isolated cardiac myocytes demonstrated that JNK-induced phosphorylation of c-Jun is required for efficient upregulation of c-Jun protein in response to hypertrophic agonists (4), due to a reduction of ubiquitin/proteasome-mediated c-Jun degradation (10).

By taking advantage of Supershift assays with anti-c-Jun antibody, we provided new evidence that c-Jun is a major component of the activated AP-1 complex in the nuclear fraction of overloaded myocardium. It was noticeable that the increased AP-1/c-Jun DNA-binding was accompanied by increased expression of c-Jun at the nuclei of cardiac myocytes subjected to pressure overload, indicating that the increased expression of c-Jun-induced by pressure overload might play a role in DNA-binding of AP-1 in cardiac myocytes. Accordingly, previous studies (2, 7, 28, 31) have demonstrated that increased c-Jun expression enhances AP-1 DNA binding. On the other hand, besides enhancing c-Jun expression, phosphorylation of serine-63 has been also shown to increase the transcriptional activity of this factor (7, 28). These observations indicate a complex regulation of c-Jun by acute pressure overload, suggesting that although the increased expression of c-Jun might enhance its DNA binding, phosphorylation of serine-63 might increase its expression and transcriptional activity in cardiac myocytes.

Our present results were extended to show that pressure overload also activates JNK1 in both cytosolic and nuclear fractions, whereas JNK2 is only activated in the cytosolic fraction of overloaded left ventricles. The distinct subcellular localization of activated JNK1 and JNK2 suggests different targets for these two kinases (i.e., nuclear proteins for JNK1 and cytosolic proteins for JNK2), which might be of functional importance in cellular signaling mechanisms. Activation of specific JNK isoforms (i.e., JNK1 in the nuclei and JNK2 in the cytosol) in different subcellular compartments was previously found in a model of ischemic preconditioning in rabbit hearts (22). Supporting the idea that this subcellular distribution has a functional meaning, we showed that JNK-mediated phosphorylation of c-Jun coincides in its time course and subcellular localization with the JNK1 activation, indicating that JNK1 rather than JNK2 is the kinase responsible for c-Jun phosphorylation in overloaded myocardium. Accordingly, JNK isoforms have been previously shown to differ in their affinities for substrates (11). However, the mechanisms involved in the differential regulation of JNK1 and JNK2 at subcellular locations was not investigated in the present study, and to the best of our knowledge no study has explored the differential translocation of specific isoforms of JNKs to subcellular compartments. A process that is better understood, however, is the regulatory mechanisms for ERK1 and ERK2 nuclear translocation. Nuclear translocation of ERKs involves at least three distinct regulatory steps, including cytoplasmic retention of ERKs by MEK, phosphorylation and subsequent dimerization of ERKs, and active transport of ERK dimers across the nuclear membrane (6, 14). In analogy to these data, one might speculate that substrates or upstream activators with restricted subcellular distribution could facilitate the recruitment of the respective JNK isoforms by direct physical interactions. How-

ever, further studies are necessary to confirm whether such mechanisms are also valid for JNK regulation.

The functional role of JNKs/c-Jun pathway activation in acutely overloaded myocardium is indicated by our finding here that the ablation of this pathway markedly reduced the increased expression of the marker gene β -MHC. The acute experimental settings of the present study preclude a better understanding of the role of this phenomenon to the development of myocardial structural and functional changes induced by mechanical overload. However, our data agree with previous evidence (3, 17) obtained in rats expressing a myocardial dominant negative of JNK kinase-1 and also with those obtained in mice with myocardial-specific MEKK1^{-/-} genotype. The results of these studies demonstrated that activation of the JNK pathway is essential to the myocardial recapitulation of the fetal gene program in response to aortic banding or to overexpressed G_q protein, respectively. In addition, our present results also agree with those of a study that used a cre-loxP-mediated DNA recombinant approach in adult mice and showed a direct link between JNK activation and β -MHC expression (21). Interestingly, JNK activation in these aforementioned models was followed by cardiac hypertrophy and/or cardiomyopathy, implicating a potential role for the JNK pathway in the development of heart failure. Nevertheless, this idea apparently contrasts with the results of a previous study performed in MEKK1^{-/-} mice, which demonstrated an impairment of load-induced JNK activation without any effect on load-induced myocardial hypertrophic growth (26). The reason for the discrepancies is not apparent but differences in the experimental models, stimuli intensity and timing might be taken to explain the results of the various studies attempting to clarify the role of JNKs on the myocardial phenotypic changes induced by hypertrophic stimuli.

In conclusion, the present report demonstrates that mechanical stress activates AP-1 in cardiac myocytes through a combination of increased c-Jun expression and phosphorylation of this transcription factor by JNK1. A model consistent with our results is shown in Fig. 6. Load-induced activation of JNKs mediates the phosphorylation of c-Jun and regulates the expression and transactivation of this transcription factor. On the other hand, the increased expression of c-Jun is accompanied by enhanced DNA-binding activity. The load-induced activation of the JNK/c-Jun pathway in turn plays an important role in the early expression of the fetal gene β -MHC in acutely overloaded myocardium. These findings demonstrate a molecular basis for load-induced activation of a transcription factor encoded by immediate-early genes in cardiac myocytes and its connection with the regulation of fetal type genes, characteristic of the acute response to pressure overload. The relative importance of these mechanisms to phenotypic myocardial changes, such as hypertrophy and heart failure, needs further investigation.

GRANTS

This study was sponsored by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 99/10263-0 and 01/11698-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. 521098/97-1).

REFERENCES

1. Bishopric NH, Jayasena V, and Webster KA. Positive regulation of the skeletal α -actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 267: 25535–25540, 1992.

2. Castellazzi M, Dangy JP, Mehta F, Hirai S, Yaniv M, Samarut J, Lassailly A, and Brun G. Overexpression of avian or mouse c-jun in primary chick embryo fibroblasts confers a partially transformed phenotype. *Oncogene* 5: 1541–1547, 1990.
3. Choukroun G, Hajjar R, Fry S, del Monte F, Haq S, Guerrero JL, Picard M, Rosenzweig A, and Force T. Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH₂-terminal kinases. *J Clin Invest* 104: 391–398, 1999.
4. Clerk A, Kemp TJ, Harrison JG, Mullen AJ, Barton PJ, and Sugden PH. Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient upregulation of c-Jun protein. *Biochem J* 368: 101–110, 2002.
5. Cornelius T, Holmer SR, Muller FU, Riegger GA, and Schunkert H. Regulation of the rat atrial natriuretic peptide gene after acute imposition of left ventricular pressure overload. *Hypertension* 30: 1348–1355, 1997.
6. Cyert MS. The regulation of nuclear localization during signal transduction. *J Biol Chem* 276: 20805–20808, 2001.
7. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, and Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76: 1025–1037, 1994.
8. Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz W Jr., and Franchini KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H556–H564, 2002.
9. Fischer TA, Ludwig S, Flory E, Gambaryan S, Singh K, Finn P, Pfeffer MA, Kelly RA, and Pfeffer JM. Activation of cardiac c-Jun NH₂-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. *Hypertension* 37: 1222–1228, 2001.
10. Fuchs SY, Fried VA, and Ronai Z. Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene* 17: 1483–1490, 1998.
11. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, and Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15: 2760–2770, 1996.
12. Izumo S, Nadal-Ginard B, and Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 339–343, 1988.
13. Karin M, Liu Z, and Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240–246, 1997.
14. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, and Cobb MH. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605–615, 1998.
15. Komuro I, Kurabayashi M, Takaku F, and Yazaki Y. Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. *Circ Res* 62: 1075–1079, 1988.
16. Komuro I and Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 55: 55–75, 1993.
17. Minamino T, Yujiri T, Terada N, Taffet GE, Michael LH, Johnson GL, and Schneider MD. MEK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3866–3871, 2002.
18. Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, and Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation (nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion). *J Biol Chem* 272: 16657–16662, 1997.
19. Nadruz W Jr, Kobarg CB, Constancio SS, Corat PD, and Franchini KG. Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. *Circ Res* 92: 243–251, 2003.
20. Omura T, Yoshiyama M, Yoshida K, Nakamura Y, Kim S, Iwao H, Takeuchi K, and Yoshikawa J. Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. *Hypertension* 39: 81–86, 2002.
21. Petrich BG, Molkentin JD, and Wang Y. Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. *FASEB J* 17: 749–51, 2003.
22. Ping P, Zhang J, Huang S, Cao X, Tang XL, Li RC, Zheng YT, Qiu Y, Clerk A, Sugden PH, Han J, and Bolli R. PKC-dependent activation of p46/p54 JNKs during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H1771–H1785, 1999.
23. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J Jr, and Chien KR. Segregation of atrial specific and inducible expression of ANF transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8277–8281, 1991.
24. Ruwof C and Van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 47: 23–37, 2000.
25. Sadoshima J and Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59: 551–571, 1997.
26. Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, Yang G, Warden J, Liu J, Takagi G, Karoor V, Hong C, Johnson GL, Vatner DE, and Vatner SF. The MEK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 110: 271–279, 2002.
27. Schunkert H, Jahn L, Izumo S, Apstein CS, and Lorell BH. Localization and regulation of c-fos and c-jun protooncogene induction by systolic wall stress in normal and hypertrophied rat hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11480–11484, 1991.
28. Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, and Brenner DA. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 37: 824–832, 2003.
29. Smeal T, Hibi M, and Karin M. Altering the specificity of signal transducing cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J* 13: 6006–6010, 1994.
30. Thai MV, Guruswamy S, Cao KT, Pessin JE, and Olson AL. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. *J Biol Chem* 273: 14285–14292, 1998.
31. Wang N, Verna L, Hardy S, Forsayeth J, Zhu Y, and Stemerman MB. Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2078–2084, 1999.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Targeting to C-Terminal Myosin Heavy Chain May Explain Mechanotransduction Involving Focal Adhesion Kinase in Cardiac Myocytes

Priscila M. Fonseca,* Rosana Y. Inoue,* Claudia B. Kobarg, Daniella P. Crosara-Alberto, Jörg Kobarg, Kleber G. Franchini

Abstract—Focal adhesion kinase (Fak) has been implicated as a signaling molecule involved in the early response of cardiac myocytes to mechanical stress. The mechanism of Fak activation by mechanical stimuli is not clear. In this study, we report the load-induced Fak activation and its association with myosin heavy chain in cardiac myocytes. Pressure overload lasting from 3 to 60 minutes was shown to induce Fak phosphorylation at Tyr-397, -576/7, -861, and -925 as detected by phosphospecific antibodies. This was paralleled by increases of Fak/Src association and Src activity (Tyr-418 phosphorylation). Yeast two-hybrid screening of an adult rat cDNA library revealed an interaction between Fak and C-terminal coiled-coil region of α -myosin heavy chain. This was confirmed by pulldown assay with GST-C-terminal myosin fragment and native Fak from rat left ventricle. Such interaction was confirmed by coimmunoprecipitation assay with anti-Fak and anti-heavy chain cardiac myosin antibodies, confocal microscopy of double-labeled isolated cardiac myocytes and immunoelectron microscopy with anti-Fak antibody. Fak activation by mechanical stress was accompanied by a reduction of Fak/myosin heavy chain association and its relocation at subcellular sites such as costameres, Z-discs, and nuclei. Thus, our present data identify Fak interaction with C-terminal region of myosin heavy chain adding comprehensive data on Fak activation by mechanical stress and mechanotransduction in cardiac myocytes. (*Circ Res.* 2005;96:73-81.)

Key Words: focal adhesion kinase ■ mechanotransduction ■ cell signaling ■ hypertrophy ■ myosin

Mechanical stress is a major factor involved in the development of myocardial adaptive and maladaptive changes in heart diseases. Local mechanical forces activate signaling mechanisms in cardiac myocytes inducing the expression of specific genetic programs linked to myocardial structural and functional remodeling.^{1,2} Although mechanical forces might directly trigger signaling mechanisms in cardiac myocytes, the mechanism by which they are sensed and converted to biochemical signals remains elusive.

Structures such as sarcomeric lattice, cytoskeleton, and the extracellular matrix operate in the transmission of either passive or active forces in cardiac myocytes.^{3,4} Studies have confirmed the critical importance of the molecular integrity of Z-disc and cytoskeleton to the expression of genetic program induced by mechanical stress in cardiac myocytes. Z-disc structure is organized by N-terminal titin Z repeats linked to α -actinin and associated proteins such as MLP, ALP, telethonin (T-cap), cypher/Zasp, and myotilin.^{4,5} Notably, MLP null mice were shown to fail to upregulate brain and atrial natriuretic factors mRNA in response to stretch.⁶

Human titin mutations as well as deletion of the α -actinin binding proteins such as ALP or MLP in the mouse causes dilated cardiomyopathy.⁶⁻¹⁰ However, the mechanisms by which these structures and proteins detect physical forces and initiate biochemical signals are yet unclear.

The link of Z-discs to sarcolemma at sites known as costameres has been implicated as a potential signaling station to mechanotransduction in cardiac myocytes. Costameres are also sites of integrin clusters and share a similarity to focal adhesions.^{11,12} Focal adhesion kinase (Fak), a primary integrin effector at focal adhesion sites,¹⁵⁻¹⁷ is rapidly activated by mechanical stimuli in cultured neonatal rat ventricular myocytes¹⁸⁻²⁰ and in overloaded myocardium of adult animals.²¹⁻²⁴ The importance of Fak to the regulation of early gene transcription in response to stretch was demonstrated in neonatal rat cardiac myocytes,²⁰ indicating that this kinase may coordinate signaling pathways involved in the hypertrophic growth induced by mechanical stress. However, the mechanisms responsible for Fak activation by mechanical stress in cardiac myocytes are still unclear. Although Fak is

Original received February 23, 2004; resubmission received July 16, 2004; revised resubmission received October 28, 2004; accepted November 23, 2004.

From the Department of Internal Medicine (P.M.F., R.Y.I., C.B.K., D.P.C.-A., K.G.F.), School of Medicine, State University of Campinas, Campinas; and Center of Structural Molecular Biology (J.K.), National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Both authors contributed equally to this study.

Correspondence to Kleber G. Franchini, MD, PhD, Departamento de Clínica Médica Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas Cidade Universitária "Zefferino Vaz" 13081-970 Campinas, SP, Brasil. E-mail franchin@obelix.unicamp.br

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000152390.99806.A5

thought to colocalize with integrins at costameres,^{3,12–14} there is no precise description of Fak localization in cardiac myocytes. We have previously shown²⁰ that stretch induces Fak to cluster at myofilaments in neonatal rat ventricular myocytes, but no evidence linked Fak directly to costameres in such cells. Otherwise, experiments performed with dominant-negative Fak and specific pharmacological Src inhibitor confirmed that Fak activation is strictly dependent on phosphorylation of Tyr397 and cooperation with Src as has been shown in the focal adhesion site. However, the lack of accurate data on localization as well as on the signaling and structural protein partners of Fak in cardiac myocytes preclude a better understanding of Fak activation by mechanical stress in this particular cell type.

Thus, we searched for novel binding partners for Fak by yeast two-hybrid screening of an adult rat left ventricle cDNA library combined with an analysis of Fak localization with immunohistochemistry and immunoelectron microscopy of control and overloaded rat myocardium.

Materials and Methods

Detailed methods are described in the expanded Materials and Methods in the online data supplement available at <http://circres.ahajournals.org>.

Animal Model

Male Wistar rats (160 to 200 g) underwent acute pressure overload induced by controlled constriction of transversal aorta as previously described.²¹ The animals were obtained from the Central Animal House of the University of Campinas and received care in compliance with the principles of laboratory animal care formulated by the Animal Care and Use Committee of the University of Campinas.

Protein Analysis by Immunoblotting

Aliquots of left ventricle extracts (60 µg) containing equal amount of total protein were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated with specific antibodies and [¹²⁵I] Protein A. Band intensities were quantified through optical densitometry of the developed autoradiographs.

Subcellular Fractioning

Subcellular fraction enriched in nuclear proteins was obtained from the pellet of left ventricle extracts centrifuged at 1000g. The remaining supernatant fraction that was enriched in soluble, membrane, and myofilament proteins was designated SMM fraction.

Laser Confocal Analysis

Isolated cardiac myocytes were fixed with 4% paraformaldehyde/sucrose and incubated with anti-Fak and anti-heavy chain cardiac myosin primary antibodies. This was followed by incubation with secondary goat anti-rabbit Alexa488-conjugated and rabbit anti-mouse Alexa568-conjugated antibody. Images were obtained with laser confocal microscope (Zeiss LSM510).

Immunoelectron Microscopy

Fragments of left ventricle were fixed in paraformaldehyde/glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) and embedded in LR White resin at –20°C under UV light. Thin-sections were stained with anti-Fak antibody overnight at 4°C. The sections were then incubated with anti-rabbit IgG-10 nm gold-conjugated antibody diluted 1:20 in 1% BSA (pH 8.2). The grids were stained with 5% uranyl acetate and 0.5% lead citrate, examined, and photographed in a transmission electron microscope (LEO 906). Negative controls were accomplished by incubation with the primary antibody omitted.

cDNA Library

A cDNA library was constructed from of an adult rat LV total RNA. The purified library cDNA was fused to the GAL4 activation domain of pGADT7-rec expressing vector by recombination in L40 yeast strain.

Yeast Two-Hybrid Screening

The pBTM (ADE2)Fak/NX bait construction (provided by Steven K. Hanks, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tenn), expressed a fragment spanning 748 amino acid N terminus of Fak protein fused to LEX A DNA binding domain of the pBTM116 vector. L40 yeast cells with left ventricle cDNA library were cotransformed with FAK/NX bait. Positive clones were tested by galactosidase assay, and cDNA cloned in pGADT7-rec was sequenced. Sequences were translated into amino acid sequence by the ORF Finder and submitted to BLAST and Clustal W in the NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Protein Expression

The encoding C-terminal region of α -myosin heavy chain retrieved after yeast two-hybrid screening was inserted into the vector pGEX5x2 (Amersham Pharmacia Biotech) for expression of recombinant GST-tagged protein in *Escherichia coli* BL21 (RIL) Codon Plus.

Pulldown Assay

GST-tagged myosin fragment (48.2 kDa) was used for the pulldown assay with LV extracts. GST conjugated glutathione beads were used as negative control for nonspecific binding. The pulldown pellets were resolved on SDS-PAGE and the membranes were stained with anti-Fak antibody.

Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Differences between the mean values of the densitometric readings were tested by ANOVA and Bonferroni multiple-range test. A value of $P < 0.05$ indicated statistical significance.

Results

Pressure Overload Induces Fak Phosphorylation at Tyr397, 576/7, 861, and 925

The autophosphorylation of Fak Tyr397 has been shown to be critical for Fak activation. Phosphorylated Tyr397 recruits Src family kinases, which lead to phosphorylation of additional Fak tyrosine residues, which promote the assembly of distinct higher-order individual signaling complexes,^{25–27} providing a mechanism for coordinating signaling through multiple pathways. We previously demonstrated^{21,23} a rapid increase in the phosphorylation and activity of Fak in the myocardium of rats in response to mechanical stimuli. In this study, we examined the effects of pressure overload on phosphorylation of myocardial Fak Tyr397, 407, 576/577, 861, and 925 with phosphospecific antibodies. Experiments were performed in rats subjected to constriction of transverse aorta lasting from 3 to 60 minutes. Blood pressure above and below the level of aortic constriction was monitored to ascertain the stability of the experimental preparation. Aortic constriction produced a rapid and sustained increase of blood pressure measured in the ascending aorta with no change in blood pressure in the abdominal aorta, as compared with blood pressure of control period (Figure 1A).

Pressure overload induced a rapid phosphorylation of Fak Tyr397, beginning at 3 ($\approx$ 2-fold), extending up to 60 minutes ($\approx$ 3-fold) after aortic constriction (Figure 1B and 1C). Similar results were observed with antibodies against tyrosine

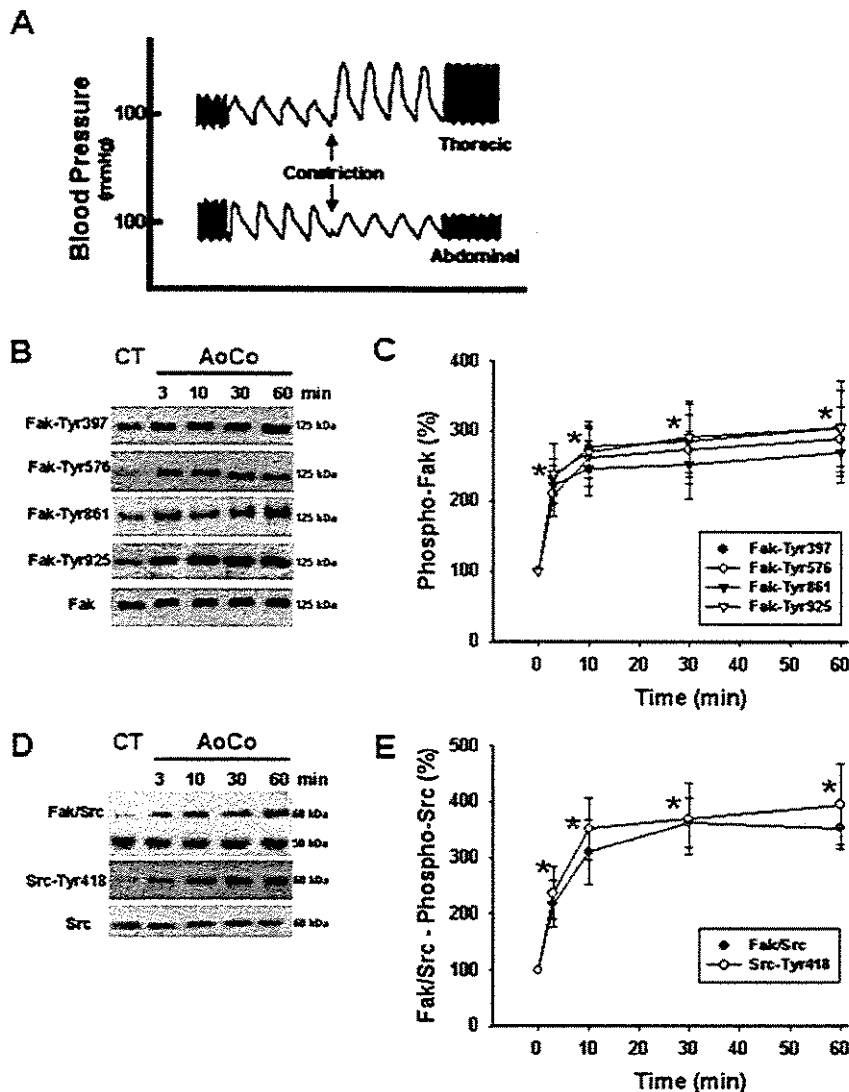


Figure 1. A, Representative blood pressure recording in ascending and abdominal aorta. Aortic constriction was adjusted to increase the ascending aorta systolic pressure by ≈ 40 mm Hg, without reducing the mean blood pressure levels in the abdominal aorta. B, Representative blots showing Fak phosphorylation at tyrosines 397, 576/7, 861, and 925, and the amount of total Fak from control (CT) and overloaded myocardium (AoCo). C, Graphic showing the average values (n=4 individual experiments) of densitometric readings for anti-Fak phosphospecific antibodies. D, top row, Anti-Src immunoblotting of anti-Fak immunoprecipitates (Fak/Src). Middle row, Representative immunoblot of myocardial extracts stained with anti-phosphospecific antibody against Src-Tyr418. Bottom row, Anti-Src immunoblotting of myocardial extracts. In the immunoprecipitates of anti-Fak antibodies, a band of immunoglobulin staining was detected at ≈ 50 kDa, besides the ≈ 60 kDa Src. E, Graphic showing the average values (n=4 individual experiments) of densitometric readings for anti-Src immunoblotting of anti-Fak immunoprecipitates and anti-Src phosphospecific antibody. * $P < 0.05$ compared with controls.

residues 576/577, 861, and 925. Notably, we were unable to detect changes in the phosphorylation of Tyr407 in myocardial extracts from control and acutely overloaded rats (data not shown). No change was observed in the amount of Fak in the immunoblottings of anti-Fak antibody.

Activation of Src by Fak autophosphorylation is central for triggering downstream cellular events.²⁵ Phosphorylation of Tyr418 increases, whereas dephosphorylation decreases Src kinase activity.²⁸ Coimmunoprecipitation assays with anti-Fak and anti-c-Src antibodies showed only a weak binding of Src to Fak in the myocardium of control rats (Figure 1D and 1E). Pressure overload increased the Src binding to Fak, in parallel with Fak Tyr397 phosphorylation, as assessed by coimmunoprecipitation assay with anti-Fak and anti-Src antibodies. Activation of myocardial Src by mechanical stress was examined by Western blotting of myocardial extracts performed with Src phosphospecific antibody against Src-Tyr418. Pressure overload increased Tyr418 phosphorylation, indicating its activation. This occurred while the amount of myocardial Src remained constant, as detected by anti-Src immunoblotting of myocardial extracts.

α -Myosin Heavy Chain Interacts With Fak

We next screened a rat left ventricle cDNA library with yeast two-hybrid system to identify the molecular components that underpin Fak activation pathway. The screening was performed with a bait of N-terminal Fak fragment spanning amino acids 1 to 748 fused to LEX-A DNA binding domain of the pBTM116 vector (pBTM(ADE2)Fak/NX) (Figure 2A). Approximately 3×10^4 clones were screened. A coding sequence of 161 amino acids was found as a strongly interacting protein and characterized as be homologous (98%) to the coiled-coil C-terminal region of α -cardiac myosin heavy chain (NP 058935-gi: 8393804) (Figure 2B). As a first step toward the confirmation of this interaction, the positive clone containing this fragment was plated in minimal medium without histidine and grown against negative and positive controls (Figure 2C). The positive clone was also tested for β -galactosidase turning blue (data not shown).

A pulldown assay with the fusion protein GST-C-terminal myosin fragment (Figure 3A) conjugated to sepharose beads and left ventricle extracts was performed to assess the interaction of the C-terminal myosin fragment with Fak.

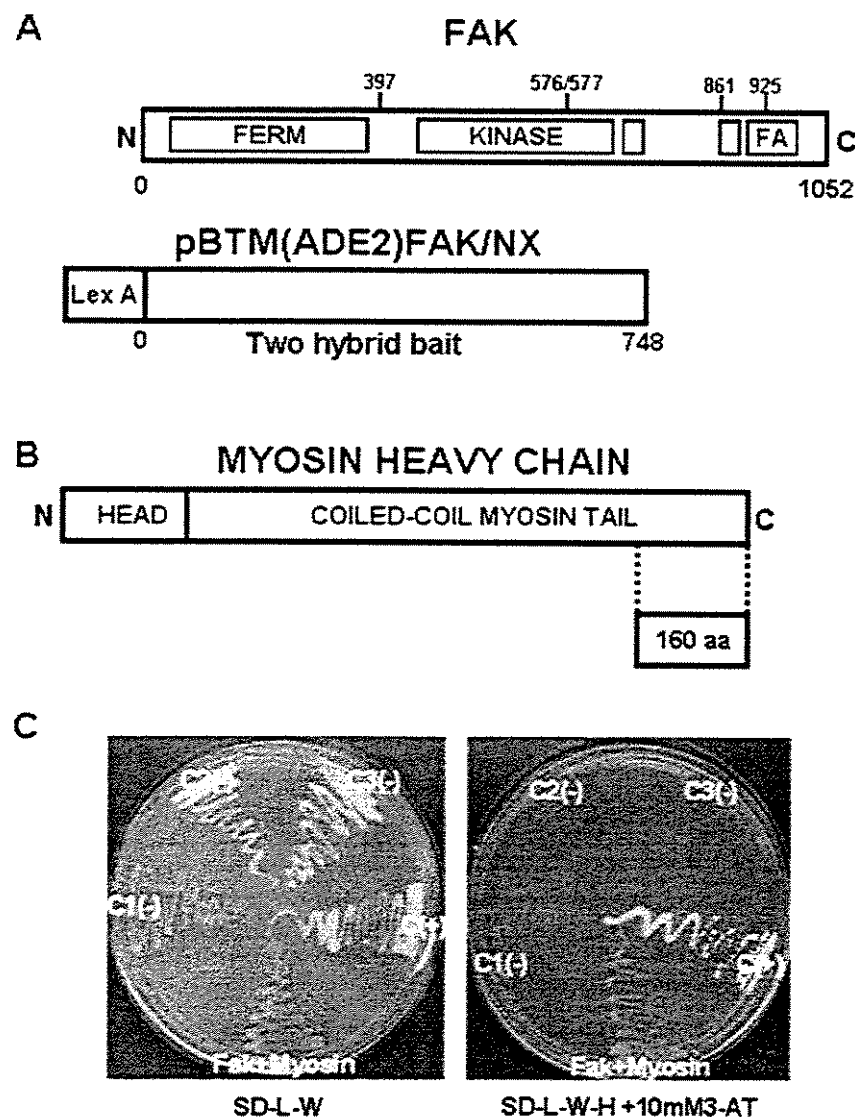


Figure 2. A, Mapping of full-length Fak and the region of Fak protein (FakNX) used as a bait in the two-hybrid screening. Bait consists of Fak N-terminal domain, including FERM domain and the kinase domain. B, Mapping of full-length myosin heavy chain and the fragment found in the two-hybrid screening. Fragment showed 98% homology to the coiled-coil C-terminal region of α -cardiac myosin heavy chain (NP 058935-gi: 8393804). C, Fak interacts with myosin on two-hybrid screen. Yeast strain L40 was cotransformed with negative controls: C1(-) pGADT7Rec+pBTM116, C2(-) pGADT7Rec+FakNX, C3(-) pVP16fynSH2+pBTMADE2FAK(F393); positive control: C(+), pVP16fynSH2+FakNX and Fak+myosin: pGADT7REC(cDNA library myosin)+FakNX.

GST-tagged protein binding assay followed by immunoblotting analysis showed the presence of Fak in the GST-C-terminal myosin fragment precipitates obtained from control and overloaded myocardium (10 and 60 minutes) (Figure 3B). The specificity of this interaction was demonstrated by the lack of Fak in GST precipitates. The relative amount of myocardial Fak able to be targeted to GST-C-terminal myosin fragment was examined by comparing the amount of Fak immunoprecipitated by excess of anti-Fak antibody (Figure 3B, lane 1) with the amount of Fak precipitated by GST-C-terminal myosin fragment (Figure 3B, lanes 2 to 4). Interestingly, the amount of Fak targeted by GST-C-terminal myosin fragment slightly increased at 10 but it was reduced in 60-minute overloaded myocardium compared with extracts of control rats. Next, precipitates of the pulldown assays were blotted with anti-Fak-Tyr397 antibody. As shown in the representative example of Figure 3B, staining with anti-Fak-Tyr397 antibody paralleled the changes in the amount of Fak, but was barely detected in the GST-C-terminal myosin fragment precipitates, suggesting that GST-C-terminal myo-

sin fragment might bind preferentially nonphosphorylated Fak. As shown in Figure 3C, assays performed with isolated GST did not retrieve Fak from myocardial extracts.

The relative amount of Fak associated with myosin heavy chain was estimated by comparing the amount of Fak immunoprecipitated by excess of anti-Fak antibody with the amount of Fak in the anti-heavy chain cardiac myosin immunoprecipitates. The ability of anti-Fak immunoprecipitation to deplete Fak from myocardial extracts from control and overloaded hearts was demonstrated by the reduction of the amount of Fak in the supernatants to almost an undetectable level (see online expanded Material and Methods). As demonstrated in the representative example and in Figure 4, the amount of Fak precipitated by anti-heavy chain cardiac myosin antibody was $\approx 40\%$ of total Fak immunoprecipitated with anti-Fak antibody. Pressure overload markedly reduced the amount of Fak precipitated by anti-heavy chain cardiac myosin antibody, beginning already at 3 minutes and reaching the lowest value in the extracts of 30- and 60-minute overloaded left ventricles. As shown in the representative example of Figure 4, the immunoprecipitates of anti-heavy chain cardiac myosin

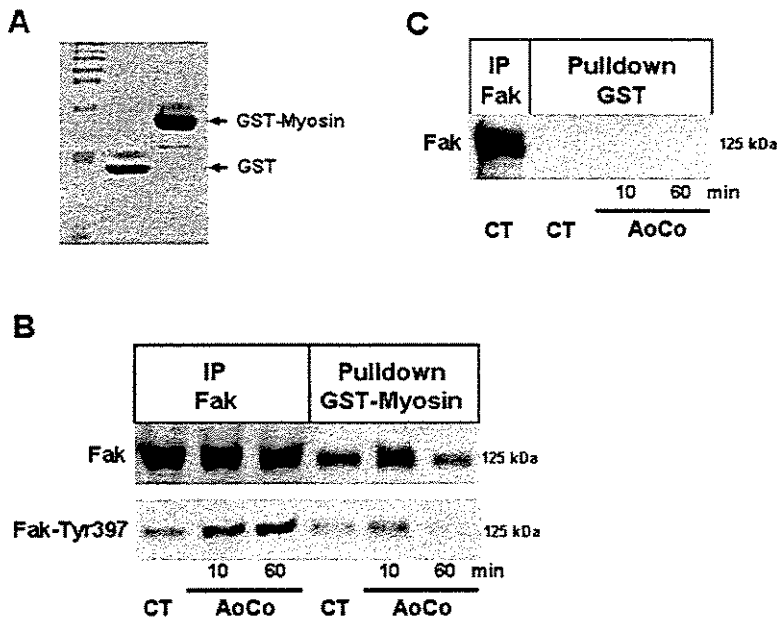


Figure 3. A, Coomassie dyed 12% SDS PAGE showing GST (26 kDa) and GST-C-terminal myosin fragment (≈ 48 kDa) hybrid protein (arrows) used to perform the protein binding assay. B, Representative immunoblottings obtained with anti-Fak and anti-Fak-Tyr397 antibodies of anti-Fak immunoprecipitates (IP) from extracts of control left ventricle and precipitates GST-C-terminal myosin fragment from control, 10- and 60-minute overloaded left ventricles. C, Representative immunoblottings obtained with anti-Fak antibody from extracts treated with GST.

antibody were barely stained with anti-Fak-Tyr397 antibody, further indicating that Fak associated with myosin heavy chain is mainly nonphosphorylated at Tyr397.

FAK Colocalizes With Myosin in Cardiac Myocytes

Next, we examined the subcellular localization of Fak by confocal microscopy of isolated cardiac myocytes double-stained with anti-Fak and anti-heavy chain cardiac myosin antibodies. Cardiac myocytes stained with anti-heavy chain cardiac myosin antibody (red) revealed striations, suggesting that the labeled structures represent the myosin in the sarcomeric A-band. As shown in the representative example of Figure 5A, in cardiac myocytes from control left ventricles anti-Fak staining overlaps the anti-heavy chain cardiac myosin staining (yellowish staining), indicating that Fak and myosin heavy chain are colocalized in cardiac myocytes from control left ventricles. In cardiac myocytes from 60-minute overloaded left ventricles, cytoplasmic anti-Fak staining (green) was substantially decreased, but it was still regularly distributed along the myofilaments. Interestingly, the cytoplasmic anti-Fak staining of these cells was no longer overlapping the anti-heavy chain cardiac myosin staining, suggesting a relocation of Fak to distinct sarcomeric sites. Notably, in these cardiac myocytes, we found a consistent staining of cell nuclei with anti-Fak antibody. This nuclear localization of Fak was further examined by immunoblotting performed with anti-Fak antibody and tissue fractions of rat left ventricle (Figure 5B). In extracts from control myocardium, Fak was found preferentially in the supernatant fraction (SMM) of low-speed centrifugation, which was enriched in myofibrils, membranes, and soluble proteins, whereas in the 60-minute overloaded myocardium, Fak was found mainly in the pellet of low-speed centrifugation, which is enriched with nuclear proteins. The relative amounts of Fak in SMM and nuclear fractions were estimated by comparison with the amount of Fak from total myocardial extracts. As shown in

the representative example and graphic of Figure 5B, after 60 minutes of pressure overload, $\approx 70\%$ of Fak was found in the nuclear extracts. We also performed immunoblotting analysis of myocardial fractions with the anti-heavy chain cardiac

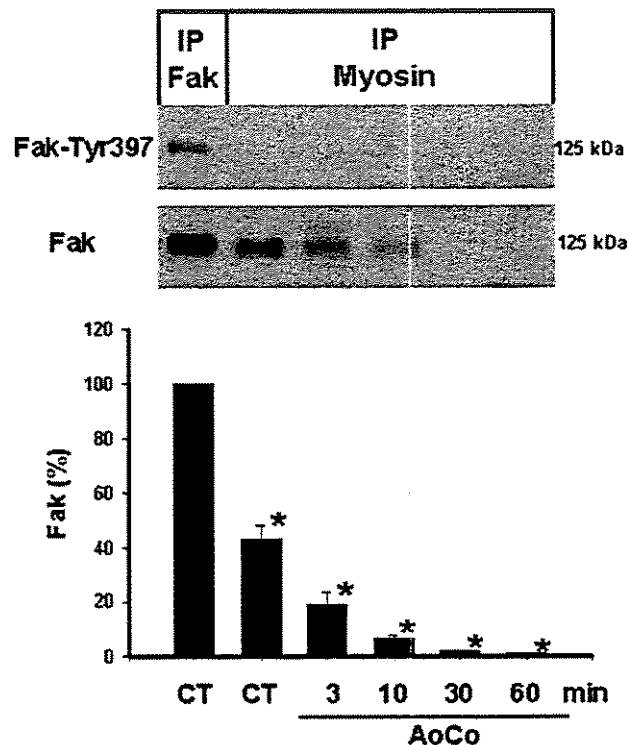


Figure 4. Representative immunoblottings obtained with anti-Fak and anti-Fak-Tyr397 antibodies of anti-Fak and anti-heavy chain cardiac myosin immunoprecipitates (IP) from extracts of control, 3-, 10-, and 60-minute overloaded left ventricles. Graphic shows the average values ($n=4$ individual experiments) of densitometric readings for anti-Fak staining of anti-Fak and anti-heavy chain cardiac myosin antibodies immunoprecipitates. $*P<0.05$ compared with the amount of Fak in anti-Fak immunoprecipitates.

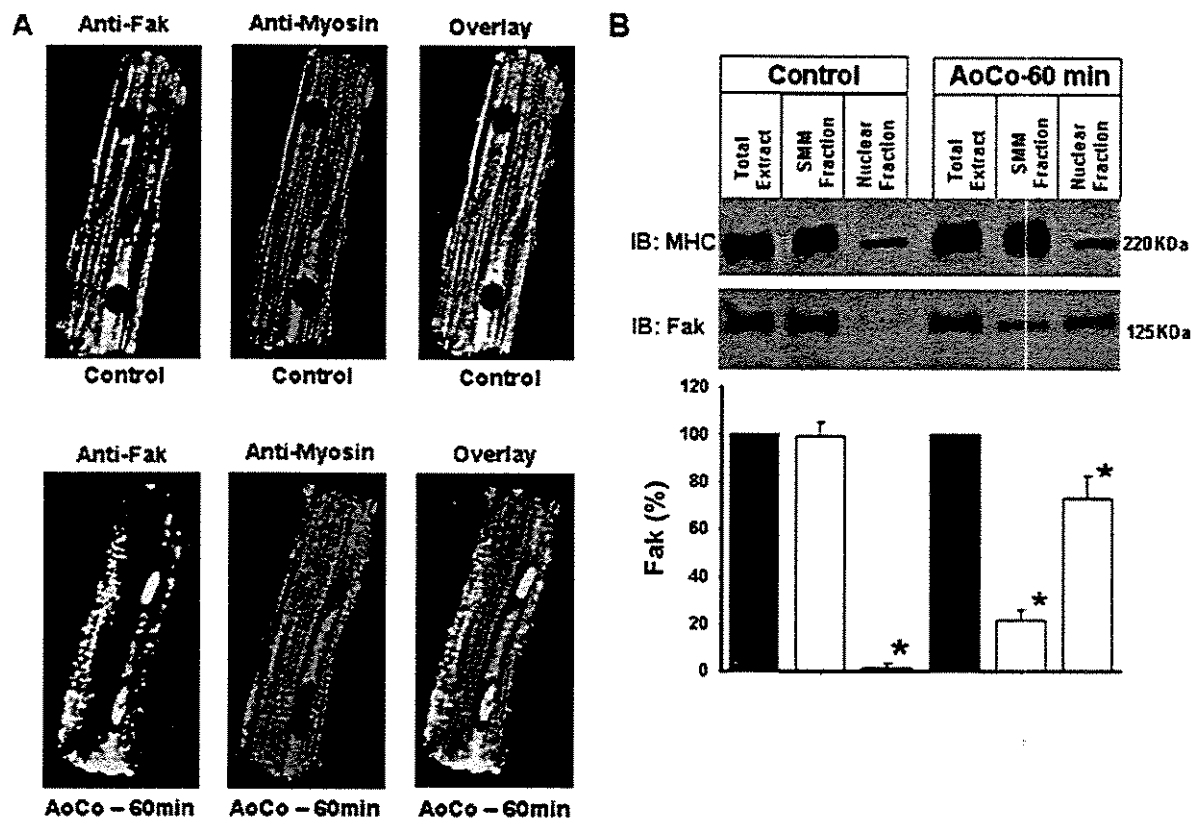


Figure 5. A, Double staining of isolated cardiac myocytes from control and 60-minute overloaded (AoCo) rat heart with anti-Fak and anti-heavy chain cardiac myosin antibodies. B, Representative immunoblottings obtained with anti-heavy chain cardiac myosin and anti-Fak from whole myocardium extracts and subcellular fractioning samples. SMM indicates myocardial extract fraction enriched in soluble, membrane, and myofilaments proteins. * $P < 0.05$ compared with the amount of Fak in myocardial crude extracts.

myosin to examine whether nuclear fractions were free of myofilaments. Although some myosin was detected in nuclear fractions, its amount was similar in the nuclear extracts of control and 60-minute overloaded myocardium, indicating that alterations of Fak levels in nuclear fractions were not related to contamination of nuclear extracts with myofibrils.

Fak subcellular localization was further examined by immunoelectron microscopy. As shown in the representative examples of Figure 6A and 6B, in cardiac myocytes from control left ventricles, immunogold particles were mostly found in the region of sarcomeric A-band. As shown in Figure 6C and 6D, 3 minutes after the onset of pressure overload, anti-Fak immunolabeling was preferentially found as aggregates along the myofilaments, Z-discs, and costameres. Similar localization of Fak was detected in cardiac myocytes from left ventricles subjected to 10-minute pressure overload (data not shown). These results indicated that pressure overload leads to Fak clustering at different subcellular sites.

Discussion

Fak is rapidly activated and triggers the assembly of a multicomponent signaling complex that has been considered to occupy a central position in the transduction and coordination of the earlier responses of cardiac myocytes to mechanical stress. In the present study, we showed comprehensive data on Fak tyrosine phosphorylation, subcellular

distribution, and interaction with C-terminal region of myosin heavy chain, providing insight on the mechanism of its activation by mechanical forces in cardiac myocytes.

By using phosphospecific antibodies against tyrosine residues of Fak and Src, we extended previous demonstration of Fak/Src signaling complex activation by mechanical stress, to show the load-induced phosphorylation of specific Fak tyrosine residues Tyr397, 576/7, 861, and 925 in the rat myocardium. These results agree with a proposed model for Fak activation triggered by autophosphorylation at Tyr397 followed by the engagement of Src, which phosphorylates additional Fak tyrosine residues.²⁹ Consistent with this, we have shown previously that the activation of Fak/Src complex by mechanical stress in cardiac myocytes is strictly dependent on phosphorylation of Fak at Tyr397.²⁰ The phosphorylation of additional tyrosine residues supports the notion that Fak may work as a docking protein providing a scaffold to other signaling molecules related to the activation of downstream pathways involved in multiple cell functions. Phosphorylation of Tyr397 not only starts cooperation with Src, but it also appears to be important for the recruitment of other SH2-containing proteins.^{30–33} Otherwise, the phosphorylation of Tyr397, as well as Tyr925, creates binding sites for the Grb2-SOS complex.^{26,34,35} Accordingly, we have previously shown^{21,23} that pressure overload increases the association of Fak with PI3-kinase and Grb2, which occurs simultaneously to

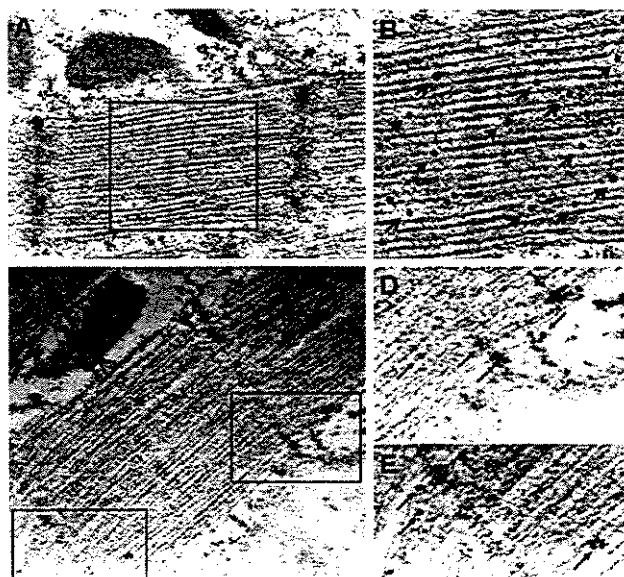


Figure 6. A and B, Anti-Fak antibody immunogold labeling of myocardium from control hearts. Arrows (B) indicate specific anti-Fak antibody staining close to myofilaments. C through E, Immunogold labeling of Fak in myocardium obtained from 3-minute overloaded hearts. Arrows indicate Fak clusters are found at costameres (D), Z-discs (E), and myofilaments (E). Magnification: A, 31 620 $\times$; C, 25 300 $\times$.

Akt and Erk1/2 activation. Additional studies will be necessary to dissect out the potential role of the activation of these signaling systems to Fak influence on early gene expression in response to mechanical stress in cardiac myocytes.

By using yeast-two hybrid screening of a rat left ventricle cDNA library, pulldown, and coimmunoprecipitation assays, we demonstrated that Fak interacts with a C-terminal region of myosin heavy chain. Furthermore, data from confocal immunofluorescence and immunoelectron microscopy with specific antibodies supports the notion that Fak is localized in the sarcomeric A-band, associated with myosin heavy chain. Comparisons of the amount of Fak immunoprecipitated by excess of anti-heavy chain cardiac myosin with that of anti-Fak antibody allowed us to estimate that $\approx 40\%$ of total myocardial Fak is associated with myosin heavy chain. This data raises the question of the localization of the remaining 60% of myocardial Fak. Although we did not perform additional quantitative characterization of Fak distribution in the myocardium of rat left ventricle, it is plausible to assume that this remaining Fak was localized elsewhere in distinct subcellular compartments of cardiac myocytes and other myocardial cell types. Indeed, the immunoelectron microscopy imaging of cardiac myocytes from left ventricles of control rats showed that anti-Fak staining was detected in structures such as costameres and Z discs, although less frequently than in sarcomeric A band. This is the first demonstration of a protein partner of Fak peculiar to muscle cells. The amino acid sequence of C-terminal myosin heavy chain identified as a target to Fak is part of the long C-terminal myosin heavy chain sequence that drives the assembly of two molecules of myosin into a coiled-coil that constitutes the structural backbone of the thick filament.

Although Fak/myosin interaction was not previously known, the ability of Fak to directly bind the coiled-coil regions of the p190RhoGEF³⁶ and the GIT1 ArfGAP³⁷ protein were recently demonstrated. In both cases the interaction occurred via a helical bundle structure of the C-terminal Fak FAT domain by means of an unknown motif. However, in the present study, the two-hybrid screening was performed with Fak N-terminal sequence including the FERM and kinase, but not the FAT domain. Although the N-terminal domain of Fak has also been shown to interact with receptor and cytoplasmic tyrosine kinases, it is not clear yet the specific region responsible for this interaction. Further studies will be needed to identify the surface residues of N-terminal Fak required for myosin heavy chain binding and how its C-terminal region functions to promote Fak association.

Fak phosphospecific antibody against Tyr397 could not detect a significant amount of Fak in the immunoprecipitates of anti-heavy chain cardiac myosin antibody, indicating that most Fak associated with this sarcomeric protein is inactive. Conversely, Fak activation by mechanical stress was paralleled by a drastic reduction in the association of Fak with myosin heavy chain, indicating that such interaction is subjected to regulation by mechanical stress. Notably, a low amount of phosphorylated Fak was found in the precipitates of the pulldown assays, even in the extracts of overloaded myocardium, indicating a preferential interaction of GST-C-terminal cardiac myosin to nonphosphorylated Fak. Together, these results raised the interesting possibility of a direct connection between myosin heavy chain and Fak activation by mechanical stress in cardiac myocytes. Incidentally, myosin heavy chain contains small folded segments that make it a truly elastic protein.³⁸ On the other hand, a recent report³⁹ indicates that Fak activation is dependent on the release of an autoinhibitory interaction of the N-terminal FERM and the kinase domains. Thus, it is conceivable that myosin stretch might cause Fak to assume a conformation that favors Tyr397 autophosphorylation. This implies that C-terminal region of myosin heavy chain filaments might work as a true mechanotransducer, transmitting mechanical forces to activate Fak. However, further studies are needed to confirm the assumptions of this model, as well as to exclude the contribution of agonist mediated Fak activation in overloaded myocardium.

We also found that in the early period after the beginning of pressure overload sarcoplasmic Fak-specific immunofluorescence, although reduced, was no longer overlapping the anti-myosin staining, suggesting a relocation of Fak to distinct sarcomeric sites. This was supported by the findings that immunogold staining was frequently seen as aggregates close to Z-discs and costameres. These findings, together with the demonstration that Fak is rapidly phosphorylated by pressure overload, is consistent with the idea that Fak activation by mechanical stress is accompanied by clustering and translocation to diverse subcellular structures of cardiac myocytes. This agrees with data from our previous studies in isolated cardiac myocytes of neonatal rats,²⁰ indicating that controlled stretch induces Fak to aggregate at the myofilaments, Z-discs, and costameres. Moreover, it is interesting to note that Fak phosphorylation at tyrosine residues have been

shown to regulate the subcellular localization of Fak.⁴⁰ The functional significance of Fak clustering is not completely understood at present, but clustering has been considered to optimize Fak signaling because the molecular proximity in clusters may serve to enhance and sustain Fak signaling.⁴¹ Thus, Fak cluster and target to Z-discs and costameres, which also serve as sites for mechanical sensing, might account for the amplification of Fak signaling triggered by mechanical stress in cardiac myocytes. This implies that the lack of Z-disc integrity would impair the full activation of Fak by mechanical stress. Therefore, it will be interesting to determine whether Fak plays a role in the pathogenesis of cardiomyopathy associated with the lack of structural integrity of Z discs.

Translocation of activated Fak was further supported by our finding in this study that after 60 minutes of pressure overload, almost 70% of Fak was found in the myocardial nuclear extracts. This was strengthened by the demonstration of a consistent staining with anti-Fak antibody of nuclei of cardiac myocyte isolated from 60-minute overloaded left ventricles. Similar translocation of Fak to nucleus was recently reported in cardiac myocytes of spontaneously hypertensive heart failure rats, suggesting that Fak might play a role in the regulation of nuclear processes in response to mechanical stress.⁴² However, the implications of such findings remain to be determined.

In conclusion, the demonstration in this study of the subcellular localization of Fak within the sarcomeric A-bands and its interaction with myosin heavy chain have implications for our understanding of how cardiac myocytes sense and transmit mechanical stimuli. Mechanistic insights of these findings may disclose new pathogenetic aspects of mechanical stress in myocardial hypertrophy and failure.

Acknowledgments

This study was sponsored by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Proc. 01/11698-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Proc. 521098/97-1).

References

- Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med*. 1994;121:363–371.
- Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell*. 1999;98:555–558.
- Sussman MA, McCulloch A, Borg TK. Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2002;91:888–898.
- Epstein ND, Davis JS. Sensing stretch is fundamental. *Cell*. 2003;112:147–150.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:637–706.
- Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*. 2002;111:943–955.
- Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitas K, Sasse-Klaassen S, Seidman JG, Seidman C, Granzier H, Labeit S, Frenneaux M, Thierfelder L. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2002;30:201–204.
- Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*. 1997;88:393–403.
- Faulkner G, Lanfranchi G, Valle G. Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life*. 2001;51:275–282.
- Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z, Sinagra G, Lin JH, Vu TM, Zhou Q, Bowles KR, Di Lenarda A, Schimmenti L, Fox M, Chrisco MA, Murphy RT, McKenna W, Elliott P, Bowles NE, Chen J, Valle G, Towbin JA. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:2014–2027.
- Terracio L, Rubin K, Gullberg D, Balog E, Carver W, Jyring R, Borg TK. Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res*. 1991;68:734–744.
- Borg TK, Goldsmith EC, Price R, Carver W, Terracio L, Samarel AM. Specialization at the Z line of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2000;46:277–285.
- Ross RS, Pham C, Shai SY, Goldhaber JJ, Fenczik C, Glembocki CC, Ginsberg MH, Loftus JC. β_1 Integrin participates in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1998;82:1160–1172.
- Shai S-Y, Harp AE, Babbitt CJ, Jordan MC, Fishbein MC, Chen J, Omura M, Leil TA, Becker KD, Jiang M, Smith DJ, Cherry SR, Loftus JC, Ross RS. Cardiac myocyte-specific excision of the β_1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res*. 2002;90:458–464.
- Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:8487–8491.
- Wang H-B, Dembo M, Hanks SK, Wang Y-L. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:11295–11300.
- Li S, Butler P, Wang Y, Hu Y, Han DC, Usami S, Guan J-L, Chien S. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:3546–3551.
- Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase [p125(FAK)] in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259:8–14.
- Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension*. 2002;39:233–238.
- Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz, Jr W, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2003;93:140–147.
- Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res*. 2000;87:558–565.
- Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper C, Menick DR, Zile MR, Kuppuswamy D. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. 2000;275:35624–35630.
- Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz W Jr, Franchini KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol*. 2002;282:H556–H564.
- Bayer AL, Heidkamp MC, Patel N, Porter MJ, Engman SJ, Samarel AM. PYK2 expression and phosphorylation increases in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol*. 2002;283:H695–H706.
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*. 1995;15:954–963.
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 1994;372:786–791.
- Polte TR, Hanks SK. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130^{cas}) are elevated in cytoskeletal-associated fractions following adhesion and Src transformation: requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem*. 1997;272:5501–5509.
- 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*. 1994;14:1680–1688.
- Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*. 2003;116:1409–1416.

30. Akagi T, Murata K, Shishido T, Hanafusa H. v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7015–7023.
31. Chen HC, Appeddu PA, Isoda H, Guan JL. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:26329–26334.
32. Chen HC, Guan JL. Stimulation of phosphatidylinositol 3'-kinase association with focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269:31229–31233.
33. Han DC, Guan JL. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem.* 1999;274:24425–24430.
34. Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burridge K, Juliano RL. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1994;269:26602–26605.
35. Schlaepfer DD, Hunter T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* 1996;16:5623–5633.
36. Zhai J, Lin H, Nie Z, Wu J, Canete-Soler R, Schlaepfer WW, Schlaepfer DD. Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J Biol Chem.* 2003;278:24865–24873.
37. Zhao ZS, Manser EL, Loo TH, Lim L. Coupling of PAK-Interacting Exchange Factor PIX to GIT1 Promotes Focal Complex Disassembly. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6354–6363.
38. Schwaiger I, Sattler C, Hostetter DR, Rief M. The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nat Mater.* 2002;1:232–235.
39. Cooper LA, Shen TL, Guan JL. Cooper Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol.* 2003;23:8030–8041.
40. Katz B-Z, Romer L, Miyamoto S, Volberg T, Matsumoto K, Cukierman E, Geiger B, Yamada KM. Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. *J Biol Chem.* 2003;278:29115–29120.
41. Katz B-Z, Miyamoto S, Teramoto H, Zohar M, Krylov D, Vinson C, Gutkind JS, Yamada KM. Direct transmembrane clustering and cytoplasmic dimerization of focal adhesion kinase initiates its tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1592:141–152.
42. Yi XP, Wang X, Gerdes AM, Li F. Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium. *Hypertension.* 2003;41:1317–1323.

MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57

Claudia Bandeira Kobarg^a, Jörg Kobarg^c, Daniella P. Crosara-Alberto^b, Thaís Holtz Theizen^b and Kleber Gomes Franchini^{b*}.

^aDepartamento de Fisiopatologia Médica, ^bDepartamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas - Cidade Universitária “Zefferino Vaz” 13081-970 Campinas – SP - Brasil

^cCentro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, 13084-971 Campinas – SP - Brasil

*Corresponding author: Kleber Gomes Franchini, MD, PhD

E-mail: franchin@unicamp.br

Keywords: MEF2, Ki-1/57, Pressure overload, Heart hypertrophy

List of abbreviations: TAoC, Transverse Aortic Constriction; LV, Left Ventricle; h, human; r, rat; m, mouse (e.g.: rMEF2C is MEF2C from rat); yeast two-hybrid system, YTS.

ABSTRACT

Myocyte Enhancer Factor (MEF2) are MADS box transcription factors that play important roles in the regulation of myogenesis and morphogenesis of muscle cells. MEF2 proteins are activated by mechanical overload in the heart.

In this study, we found the interaction of MEF2C with the regulatory protein Ki-1/57 using yeast two-hybrid system. This interaction was confirmed by GST-pull down assay *in vitro* and by co-immunoprecipitation *in vivo*. This interaction is also dependent on pressure overload in the heart. Co-immunoprecipitation assay with anti-MEF2 and anti-Ki-1/57 antibodies demonstrated a basal association between these proteins in the left ventricles of control rats. Pressure overload caused a reduction in this association. Ki-1/57 co-localizes with MEF2 in the nucleus of myocytes of control rats. However, after submitting the animals to pressure overload Ki-1/57 leaves the nucleus thereby decreasing this co-localization. Ki-1/57 also exerts an inhibitory effect upon MEF2C DNA binding activity

These results suggest that Ki-1/57 is a new interacting partner of MEF2 protein and may be involved in the regulation of MEF2 at the onset of hypertrophy.

1. INTRODUCTION

The enlargement of the heart during hypertrophy involves an increase in size and mass of individual cardiac myocytes. This implies a quantitative up regulation of the vast majority of the genes in the cell, a process that is controlled by complex transcriptional events activated by posttranslational activation of a set of transcription factors [1]. The initial response to hypertrophic stimuli include a coordinated rapid and transient activation of immediate-early genes like *c-fos*, *c-jun* and *c-myc* [2] followed by the activation of fetal genes such as α -skeletal-actin, β -MHC, and atrial natriuretic peptide [3] and a time-dependent increase in protein synthesis.

Accumulating data have suggested the significant role of the MEF2 family of transcription factors in the hypertrophic growth of the myocardium. The Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) family belongs to the MADS-box class of transcription factors and plays multiple roles in muscle cells to control myogenesis and morphogenesis. There are 4 genes in the *mef2* family: A, B, C and D. The MEF2 proteins present two N-terminal conserved domains: the MADS box and the MEF domain that are involved in DNA binding and dimerization whereas the C-terminal regions of MEF2 proteins are required for transcriptional activation [4]. MEF2 proteins bind the A/T-rich DNA consensus sequence (C/T)TA(A/T)₄TA(G/A), as homo- and heterodimers [5]. MEF2 transcription factors regulate many skeletal and cardiac muscle proteins like α -Myosin Heavy Chain and Troponins [4]. The MEF2 proteins are widely expressed, unlike MEF2C whose transcripts are restricted to muscle, brain, and spleen [6]. MEF2C is necessary for proper development of the murine heart and vasculature [7] and is up-regulated by the C-terminus of Myogenin [8].

Recently, MEF2 regulation has been broadly explored. MEF2 is constitutively bound to its cognate DNA-binding elements in the nucleus in inactivated cells. MEF2 recruits a family of functionally redundant transcriptional repressors including Cabin1 (also known as Cain) [9], MEF2 Interacting Transcriptional Repressor (MITR) [10,11], and HDAC-4, -5 [12]. These MEF2-specific co-repressors recruit histone deacetylases to MEF2-associated promoter region, which remodel the chromatin structure, thereby silencing the promoter activity. Upon calcium influx, these MEF2 repressors are removed from MEF2 by activated Calmodulin. This enables it to bind to such co activators as p300, leading to transcription and activation of the target genes [13]. Cabin1 was recently identified as a transcriptional repressor of MEF2, which can be

released from MEF2 in a calcium-dependent fashion (14).

The MEF2 transcription factors serve as targets for hypertrophic signaling [12,15]. In the normal adult myocardium, MEF2 exhibits only basal activity, which is likely to be required for maintenance of contractile protein gene expression and energy metabolism [16,17]. We have shown that the rapid activation of MEF2 by hypertrophic stimuli plays a central role in the transcriptional activation of the immediate early gene *c-jun* [15], suggesting that it may play a central role to the regulation of early gene expression induced by hypertrophic stimuli.

In order to identify new proteins that interact with MEF2 proteins and may regulate MEF2 activity in the heart when induced by mechanical overload before the onset of hypertrophy, we used a yeast-two hybrid assay with a MEF2C deletion as bait to screen a cDNA library of rat left ventricle previously induced by 6h of Transverse Aortic Constriction (TAoC). We found that MEF2C interacts with the novel protein Ki-1/57, which exerts an inhibitory effect on MEF2C DNA binding activity. We tested the effect of mechanical overload on the interaction between MEF2 and Ki-1/57 and found that the association of these two proteins decreases in rat heart submitted to TAoC.

Our data suggest that Ki-1/57 might be a negative regulator of MEF2 and that the interaction between the two proteins is subjected to physiological regulation in the heart.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plasmids constructions

RNA was extracted from left ventricle of male Wistar rats with Trizol Reagent (Gibco-BRL) according to the manufacturer's instructions. 1 µg of total RNA was used for First Strand cDNA synthesis with oligo(dT) and reverse transcriptase Superscript II (Gibco-BRL) following manufacturer's protocol.

rMEF2C was isolated from rat heart by RT-PCR using a set of oligonucleotides designed based on the MEF2C murine sequence (Accession Nr. NM_025282 – NCBI Database) because rat MEF2C sequences were not available. The PCR products encoding different fragments of MEF2C were then cloned into pBTM116 and sequenced. The rMEF2C deletion mutants were co-transformed into yeast strain L40 with the empty vector pGADT7-rec (Clontech) used to construct the cDNA library.

2.2. Construction of a Rat Left Ventricle cDNA Library

A rat left ventricle (LV) cDNA library was constructed using the Matchmaker Library Construction & Screening Kit (Clontech) by recombination in yeast strain *L40*. 2 µg RNA of rat LV that had been submitted to 6-hour pressure overload was used for cDNA synthesis according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was amplified by Long Distance PCR using the Advantage2® PCR Kit (Clontech). The purified library cDNA was then fused to the GAL4 activation domain of pGADT7-rec (Clontech) expressing vector by recombination in *L40* yeast strain.

2.3. Yeast Two-Hybrid Screening

The pBTM-MEF2C(1-169) bait construction expresses a fragment spanning the N-terminal of MEF2C protein including MADS box and MEF2 domains fused to the LexA DNA binding domain present in the pBTM116 vector. The rat LV cDNA library in *L40* yeast cells was amplified and cells were co-transformed with pBTM-MEF2C(1-169) according to the protocol supplied by Clontech. The screening was carried out on minimal medium plates without tryptophan, leucine and histidine and containing 10 mM 3-amino-2,4 triazole.

β-galactosidase activity in yeast cells was measured by the filter assay method. Yeast

transformants (Leu⁺, Trp⁺, His⁺) were transferred onto nylon membranes, permeabilized in liquid nitrogen, and placed on Whatman 3MM paper previously soaked in Z buffer (60mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, pH7.0 10 mM MgCl₂, 50 mM 2-mercaptoethanol) containing 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactoside. After incubation at 37 °C for 30 min to 2 h, the yeast cells forming dark blue colonies were taken from replica plates for further analysis. Plasmids from positive clones were isolated and their DNA sequenced.

DNA sequences obtained were translated into amino acid sequences by the ORF Finder and submitted to BLAST and Clustal W found in the NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4. Protein Expression and purification

A cDNA coding for rat MEF2C(1-169) from the pBTM-MEF2C(1-169) construction was sub cloned as a fusion to GST into pGEX5x-2 (Amersham). This new construction was called pGEX-MEF2C(1-169). 6xHis-hKi-1/57 was constructed by sub cloning the cDNA encoding full length human Ki-1/57 (1-413) [18] into pET28a.

GST and GST-rMEF2C(1-169) proteins were expressed in *E. coli* BL-21(RIL) Codon Plus by induction with 0.5 mM IPTG at 30°C for 4h. GST-hKi-1/57 expression was induced with 1 mM IPTG at 37°C for 4h. 6xHis-hKi-1/57 was induced with 1 mM IPTG at 37°C for 6h.

Bacteria were harvested by centrifugation at 10.000 x g for 20 min and lysed by the addition of 5 mg lysozyme in HNE Buffer plus phosphatase and protease inhibitors (25mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10mM NaH₂PO₄, 10 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, and 0.1 mg of aprotinin/ml), incubation for 20 min at 4°C followed by 3 freeze-thaw cycles plus sonication. After centrifugation at 14.000 x g for 20 min, supernatants containing GST-fused proteins were incubated with Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) at 4° for 2h. Sepharose beads were then washed 4 times with HNE buffer plus phosphatase and protease inhibitors and 1% Triton X-100. After the last wash, beads were frozen in a solution containing HNE buffer plus phosphatase and protease inhibitors and 50% Glycerol and stored at -80°C. The supernatant containing h6xHis-Ki-1/57 was applied to a Ni-NTA column (Qiagen). Column washing and elution were performed according to the manufacturer's instructions.

2.5. *In vitro* binding assay, Western blot analysis and antibodies

GST and rGST-MEFC(1-169) conjugated to Glutathione-Sepharose beads were separately incubated with fusion protein 6xHis-hKi-1/57 in a final volume of 500 μ l binding buffer (100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5% Glycerol, 0.5% Triton X-100 and 1 mM PMSF) for 3h at 4°C. After incubation, beads were washed three times with binding buffer and boiled with Laemmli sample buffer. Proteins were then resolved in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes for Western blot analysis. One protein gel was not transferred, but dyed with Coomassie blue for visualizing protein input. Membranes were blocked with 3% non-fat milk for 1h, washed and incubated with primary monoclonal antibodies A26 Anti-Ki-1/57 [19] or Anti-GST [20] overnight. The anti-Ki-1/57 monoclonal antibody A26 detects both the human and murine proteins (rat and mouse) [19]. After incubation, membranes were washed and incubated with 2 μ Ci [I^{125}] labeled protein A for 2h at room temperature. [I^{125}]protein A bound to antibodies was detected by autoradiography.

2.6. Heart extracts and co-immunoprecipitation

Experiments were performed with male Wistar rats (160-200g) that underwent acute pressure overload (1 to 6 h) induced by Transverse Aortic Constriction (TAoC). After the end of TAoC periods, rat left ventricles were removed for preparation of heart extracts as previously described [21]. Briefly, rat left ventricles were homogenized in 10 volumes of solubilization buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris-Cl, pH 7.4, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaF, 10 mM EDTA, 10 mM Na_3VO_4 , 2mM PMSF, and 0.1 mg/ml Aprotinin) at 4°C. The extracts were centrifuged at 8,000 g at 4°C for 20 min, and the supernatant was used for the assays. Protein concentration was determined by the Bradford dye binding method.

For the co-immunoprecipitation experiments, 5 mg of heart extracts were incubated with 20 μ g of antibody Anti-MEF2 C-21 (Santa Cruz) at 4°C overnight. Protein A – sepharose (Amersham) was added to the extracts followed by two more hours of incubation at 4°C. After incubation, Protein A- sepharose beads were washed 3 times with washing buffer (100 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 and 0.5% Triton X-100). The samples were then resuspended in Laemmli sample buffer and heated for 5 min at 100 °C. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with

specific monoclonal anti-Ki-1/57 antibody A26 and radioactively marked with [I^{125}] Protein A. Specific antibodies were detected by autoradiography.

2.7. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

The following synthetic oligonucleotides were designed: MEF2S: 5'-GTGTTGATCGCTCTAAAAATAACCCTGTCG-3' MEF2AS: 5'-GTTGGCGACAGGGTTATTTTITAGAGCGATC -3' for the MEF2 DNA probe (MEF2 consensus sequence underlined). The oligonucleotides were annealed and labeled with [α - 32 P] dATP by fill in reaction with Klenow Polymerase (Promega). 1 μ g of GST-rMEFC(1-169) was incubated with GST-hKi-1/57, 6xHis-hKi-1/57 or 6xHis-hRACK in a 20 μ l final volume in binding buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 2% glycerol, 2% Ficoll , 1 μ g BSA and 1 μ g de Poly[dI-dC]) plus 20 fmol of MEF2 probe (5000 – 10000 cpm) at room temperature for 20 min. For competition assays, a 100-fold molar excess of unlabeled MEF2 probe or of a scrambled DNA probe were incubated with GST-rMEF2C(1-169). For super shift assay, 2 μ g of anti-MEF2 antibody were added to GST-rMEF2C(1-169) 1h prior to the binding reaction. Samples were then submitted to electrophoresis on a non-denaturing 5% polyacrilamide gel and run at 300 V for 2h at 4°C. Gel was dried and exposed on a film and the bands were visualized by autoradiography.

2.8. Immunolocalization by Confocal Microscopy

Adult rat ventricular myocytes isolation: cardiac myocytes were isolated from left ventricle of adult Wistar rats at 160-180g by collagenase (type IA from Sigma) digestion using a modified Langendorff perfusion according to methods previously described [22]. After isolation, ventricular myocytes were immediately transferred to poly-L-lysine coated glass slides and then processed for immunohistochemistry.

Immunofluorescence study: the freshly isolated cardiac myocytes were fixed (8% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4) and blocked with 5% non-fat milk in PBS. The sections of isolated cardiac myocytes were incubated with primary anti-MEF2 (rabbit) or anti-Ki-1/57 (mouse) antibodies in 1% non-fat milk in PBS overnight at 4°C, followed by incubation with anti-rabbit 488® Alexa conjugated secondary antibody (green) and anti-mouse 568® Alexa conjugated secondary antibody (red) then mounted in Vectashield (Vector Labs. Inc.,

Burlingame, CA). Immunofluorescence was detected by confocal laser scanning microscopy (Carl Zeiss, Inc.). Double-stained images from Alexa488 and Alexa568 were acquired by multitracking scanning of the fluorescence imaging with bandpass emission filter BP505-550 for Alexa488 and longpass emission filter LP585 for Alexa568. Double-stained images from Alexa488 and Alexa568 channels were simultaneously acquired from the same area and superimposed. As negative controls, cells were not incubated with primary antibodies. No specific staining was observed in the negative control.

2.9. Subcellular fractionation

Subcellular fractionation was performed essentially as described in [15]. Briefly, frozen hearts were minced and homogenized in 2 volumes of STE buffer (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM NaN₃, 10mM 2-mercaptoethanol, 0.2 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) in a Polytron homogenizer. The homogenates were mixed with 2 volumes of STE buffer and centrifuged (1,000 x g, 10 min) to obtain pellets. The pellet was washed once and suspended in STE buffer (nuclear fraction). The supernatant was centrifuged (100,000 x g, 60 min) to obtain the cytosol fraction and the pellet, which was then suspended in STE buffer (membrane fraction).

The nuclear fraction was solubilized in Triton buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 0.2 mM PMSF, 50 mM NaF). The fraction was centrifuged (15,000 x g, 30 min, 4 °C), and the supernatant (nuclear fraction) was stored at -80°C.

3. RESULTS

3.1. Construction of a non-transactivating deletion mutant of rMEF2C

DNA sequences coding for transcription factors may transactivate the Yeast-Two Hybrid System (YTS) even in the absence of interacting GAL-4 activation domain-prey fusion proteins. It has been previously reported that the C-terminal DNA binding domain of MEF2 transcription factors may auto-transactivate the YTS [11]. In order to identify MEF2C partners we initially screened the ability of diverse rat MEF2C cDNA sequences fused to LEX A DNA binding domain to auto-transactivate the YTS. Figure 1A shows the schematic representation of five different sequences of MEF2C used to screen YTS for auto-activation. As indicated in Figure 1B, only MEF2C mutant deletions pBTM-MEF2C(107-229) and pBTM-MEF2C(1-169) did not auto-transactivate the reporter gene *LacZ* when co-transformed with empty GAL4 activation domain coding vector pGADT7-rec. Constructions pBTM-MEF2C(1-432), pBTM-MEF2C(1-357) and pBTM-MEF2C(107-357) on the other hand, displayed strong auto-activation when expressed in yeast and were discarded for the screening of the cDNA library. The mutant pBTM-MEF2C(107-229) failed to activate the *LacZ* reporter. Thus we used mutant pBTM-MEF2C(1-169) to screen the adult rat left ventricle cDNA library. Although we used a mouse MEF2C sequence to design our oligonucleotides, an alignment of the 169 amino acids of our pBTMEF2C(1-169) construction cloned from rat cDNA (Figure 1C) showed 96% identity to MEF2C from mouse (Accession Number NM_025282).

3.2. N-terminal rMEF2C interacts with rKi-1/57 in the yeast two-hybrid screening

A cDNA library of rat left ventricle that underwent Transverse Aortic Constriction (TAoC) was constructed by yeast recombination with pGADT7-rec vector in yeast strain *L40*. Each clone had its coding cDNA C-terminally fused to the GAL4 activation domain. Using the deletion mutant pBTMEF2C(1-169) as "bait" 1×10^5 transformants were assayed in the library screening and 130 clones were selected on SD-L-W-H + 10 mM 3AT. From 130 transformants, just 90 were positive in the β -galactosidase filter assay. 30 clones were further isolated and sequenced. Four of the isolated clones carried a partial cDNA encoding a rat homologue of human Ki-1/57 (NP_055097.1) identified by BLAST on the NIH internet site. An alignment of the found Ki-1/57 rat amino acid sequence showed that it represents 90% sequence identity with

its human ortholog (Figure 2D).

3.3. The N-terminal of rMEF2C interacts with full length hKi-1/57 *in vitro*

A GST pull down assay was performed to confirm the interaction between hKi-1/57 (h, human) and rMEF2C (r, rat) *in vitro* (Figure 2). For this purpose human recombinant protein 6xHis-hKi-1/57 was incubated with GST-rMEF2C(1-169) or GST fusion proteins conjugated on Gluthatione-sepharose beads. After washing, 6xHis-hKi-1/57 was retained by GST-rMEF2C(1-169), but not by GST. This confirms the ability of rMEF2C(1-169) to specifically bind to 6xHis-hKi-1/57.

3.4. hKi-1/57 decreases rMEF2C DNA binding activity *in vitro*

In order to evaluate the effect of the influence of the interaction between MEF2C and Ki-1/57 on the MEF2C DNA binding activity, we performed an Electrophoretic Mobility Shift Assay. The recombinant protein GST-rMEF2C(1-169) formed a complex with MEF2-DNA consensus sequence *in vitro*, as indicated by the shift showed in lane 2 of Figure 3. This was expected because GST-rMEF2C(1-169) mutant contains both the MADS-box and the MEF2 domain which are responsible for DNA binding and dimerization of MEF2 family of transcription factors. Our demonstration here that the addition of recombinant full length GST-hKi-1/57 reduced the DNA binding activity of GST-rMEF2C(1-169) indicates a negative regulation of GST-rMEF2C(1-169) by GST-hKi-1/57. The specificity of this inhibition was tested by incubating GST-rMEF2C(1-169) with the recombinant full-length control protein 6xHis-hRACK-1. As shown in lane 4 of Figure 3, 6xHis-hRACK1 did not influence GST-rMEF2C(1-169) DNA-binding activity, but the fusion protein 6xHis-hKi-1/57, caused a reduction in DNA/MEF2 complex, comparable to that seen with GST-hKi-1/57. The addition of anti-MEF2 antibody to the binding reaction caused a weak supershift. The results of competition assay with cold MEF2 oligonucleotide and with a cold unrelated oligonucleotide (NF-kB consensus oligonucleotide) further indicated the specificity of the binding reaction. We also performed negative controls with GST, GST-hKi-1/57, 6xHis-hRACK-1 and 6xHis-hKi-1/57. None of these proteins could bind to double stranded MEF2 consensus DNA alone in the conditions of our experiments (data not shown).

3.5. The interaction between MEF2 and Ki-1/57 is regulated by mechanical stress

We have previously shown that MEF2 transcription factors are activated by mechanical overload in left ventricle of rat heart [16]. Here, we first performed western blot and immunohistochemistry analysis to characterize the effect of acute pressure overload on Ki-1/57 and MEF2 expression in the left ventricle and cardiac myocytes of the rat heart. As shown in Figure 4A, pressure overload lasting for 6 hours did not change the expression of MEF2 factors recognized by an antibody raised against MEF2A (which cross-reacts with MEF2C and D. However, a consistent increase (~100%) of a double-band Ki-1/57, was seen at 3 and lasting up to 6 hours after TAoC (Figure 4B). Co-immunoprecipitation assay with anti-MEF2 antibody and immunoblot with anti-Ki 1/57 demonstrated a basal association between these proteins in the left ventricles of control rats. Pressure overload caused a reduction in this association already detected 1 hour after aortic constriction (Figure 4C). In cardiac myocytes extracted from left ventricles of control rats, staining with anti-MEF antibody showed a nuclear localization of MEF2 protein and also a less intense staining at sarcoplasm (Figure 5A), where it was regularly distributed following a sarcomeric pattern of distribution. Staining with anti-Ki-1/57 antibody showed a nuclear and sarcoplasmic distribution (Figure 5B). However, the sarcoplasmic staining was stronger than the nuclear staining and also followed a sarcomeric pattern of distribution. Anti-MEF2 and anti-Ki-1/57 antibodies double staining indicated that MEF2 and Ki-1/57 were co-localized in the nuclei of cardiac myocytes but they were not co-localized in the sarcoplasm (Figure 5C). Pressure overload reduced the amount of MEF2 detected in the sarcoplasm and the amount of Ki-1/57 in the nucleus, where the co-localization of both proteins could no longer be detected (Figure 5 D, E, F).

Subcellular fractions of rat hearts from sham-operated and from those rats that underwent a 6 hour TAoC were analyzed by Western blot with antibody anti-Ki-1/57. As seen in Figure 5G, Ki-1/57 is present in the cytoplasmic as well as in the nuclear fraction of control hearts. However, the amount of Ki-1/57 decreases significantly in the nuclear fraction after TAoC.

4. DISCUSSION

In a yeast two-hybrid screen of a rat LV cDNA library we identified an N-terminal partial cDNA encoding a rat homologue of human Ki-1/57 as a protein partner of rat MEF2C. The interaction between MEF2C and Ki-1/57 was found to reduce the recombinant MEF2C protein binding to the MEF2 DNA consensus sequence *in vitro*. In rat left ventricle, this interaction was rapidly reduced in response to pressure overload. These findings suggest that Ki-1/57 acts upstream of a MEF2C regulatory pathway involved in transcriptional control of myocardial gene expression in response to mechanical stress.

Using rat MEF2C fragment encompassing amino acids 1-169 as bait, we found four clones of an N-terminal partial cDNA encoding a rat homologue of human Ki-1/57 (Accession Number NP_055097.1- NCBI Database), interacting with MEF2C. Ki-1/57 is a 57 kDa protein first found to be expressed in Sternberg-Reed cells in Hodgkin lymphoma and recognized by its cross reactivity with the anti-CD30 antibody Ki-1 [23,24]. The interaction between rMEF2C and hKi-1/57 was confirmed by means of a pull down assay with GST-rMEF2C(1-169) fragment and the fusion protein human 6xHis-hKi-1/57, as well as by co-immunoprecipitation assay with anti-MEF2 and anti-Ki-1/57 antibodies in rat myocardial extracts. Analysis with differential centrifugation of rat left ventricle extracts and immunohistochemistry demonstrated that both rKi-1/57 and rMEF2 are localized preferentially in the nuclei of rat myocardial cells, where they co-localize. This not only extends to cardiac myocytes the previous finding that Ki-1/57 is localized in nuclei [18], but also suggests that this protein may regulate myocardial MEF2 transcriptional activity. Accordingly, experiments with EMSA showed that hKi-1/57 reduces the binding activity of the recombinant GST-rMEF2C (1-169) to the MEF2 DNA consensus sequence. Moreover, the demonstration here that mechanical stress reduced the amount of rKi-1/57 co-immunoprecipitated with rMEF2, as well as the amount of Ki-1/57 in rat myocardial nuclear extracts, further support a functional meaning for Ki-1/57 interaction with MEF2 in cardiac myocytes, possibly as a co-repressor protein partner. Taken together, these data support the hypothesis that by reducing the binding of Ki-1/57 to MEF2 and Ki-1/57 translocation from nuclei to sarcoplasm, mechanical stress potentially favors an increase of MEF2-DNA binding activity implying that such interaction may play a role in the regulation of transcriptional activity in cardiac myocytes in response to mechanical stress. Indeed, this agrees with our previous

finding that mechanical stress rapidly increases in the MEF2-DNA binding activity [15] and thereby coordinates the transcriptional control of immediate early gene in rat heart.

Several MEF2 co-repressors, such as Cabin1/Cain and class II histone deacetylases (HDACs), have been identified and demonstrated to be dynamically regulated by signaling pathways involved in MEF2 activation. Cabin1 binds to MEF2 through the MADS/MEF2 box (DNA binding domain) and sequesters MEF2 in a transcriptional inactive state, contributing to maintain the quiescence of MEF2 in unstimulated cells [25]. Otherwise, inhibition of MEF2 activity by HDAC4 occurs without interfering in DNA binding activity of MEF2 [26]. Phosphorylation by Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) has been shown to promote HDAC4 nuclear export to the cytoplasm and the concomitant de-repression of MEF2 in the nucleus [27]. Our data indicate that Ki-1/57, unlike HDAC4 but similar to Cabin 1, interacts directly with MEF2C. Considering that Ki-1/57 interacts with a fragment of MEF2C containing almost exclusively MADS-MEF2 box [i.e. MEF2C (1-169) fragment], the inhibition that Ki-1/57 exerts on MEF2C activity is presumably related to a direct interference of Ki-1/57 with the ability of MEF2 to binding DNA.

Although we presently did not explore potential upstream regulators of Ki-1/57, previous studies have shown that Ki-1/57 is a substrate for PKC [18], an enzyme known to be critically linked to the response of cardiac myocytes to hypertrophic influences. Novel PKC isoforms (ϵ , δ , η , and θ) have also been shown to enhance MEF2A transcriptional activity [28]. Alternatively, Ki-1/57 has also been shown to specifically interact with other proteins such as Receptor of Activated Kinase-1 (RACK1) [18] and the Chromatin-Helicase-DNA-binding domain protein 3 (CHD3) [20], proteins that have been shown to be potentially involved in the regulation of transcription and chromatin remodeling in diverse cell types. Considering the critical role played by the various isoforms of PKC as well as RACK1 [29] in the myocardial hypertrophic growth, it will be important to determine whether the phosphorylation of Ki-1/57 by PKC is involved in the regulation of MEF2-Ki-1/57 interaction.

In conclusion our present work has shown Ki-1/57 as a novel protein partner for MEF2C in rat myocardium. The demonstration of an *in vivo* association of MEF2 with Ki-1/57 in rat myocardium and that the interaction of MEF2C with Ki-1/57 reduces the MEF2C-DNA binding indicates that Ki-1/57 may serve to maintain the quiescence of MEF2 in non-stressed myocardial cells. Furthermore, the demonstration here that mechanical stress rapidly reduces the *in vivo*

MEF2 / Ki-1/57 association and reduces the amount of Ki-1/57 in the nuclei of myocardial cells, suggests that the coordinated regulation of MEF2 / Ki-1/57 interaction by upstream signaling mechanisms triggered by mechanical stress might be important for the regulation of the early transcriptional events in myocardial cells subjected to hypertrophic conditions. Future studies should address the regulation of MEF2 by upstream signaling pathways as well as the outcome of transcriptional regulation by coordinated MEF2 in concert with Ki-1/57.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are very grateful to Antonio Calixto for assistance with co-immunoprecipitation assays and to Dario O. Passos (LNLS) for providing control proteins and technical advice on pull down assay. We also thank Flavia C. Nery (LNLS) for providing pGEX2T-Ki-1/57 construction and Dr. Carlos Ramos and Luciana R. Camillo (LNLS) for DNA sequencing.

REFERENCES

- [1] Olson, E.N. and Schneider, M.D. (2003) Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes & Dev.* 17:1937-1956.
- [2] Komuro, I., Kaida, T., Shibasaki, Y., Kurabayashi M., Katoh, Y., et al. Stretching cardiac myocytes stimulates proto-oncogene expression. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:3595–98.
- [3] Sadoshima, J., Jahn, L., Takahashi, T., Kulik, T.J. and Izumo, S. (1992) Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 267: 10551–60.
- [4] Black, B.L. and Olson, E.N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:167–96.
- [5] Fickett, J. W. (1996) Quantitative discrimination of MEF2 sites. *Mol. Cell. Biol.* 16, 437–41.
- [6] Shore, P. and Sharrocks, A. The MADS-box family of transcription factor MEF2. (1995) *Eur. J. Biochem.* 29: 1–13.
- [7] Lin, Q., Schwartz, J., Bucana, C. and Olson, E. Control of mouse cardio-myogenesis by transcription factor MEF2C (1997) *Science* 276: 404–1407.

- [8] Rogerson, P.J., Jamali, M. and Skerjanc, I.S. (2002) The C-terminus of myogenin, but not Myo D, targets upregulation of MEF2C expression. *FEBS Lett.* 524: 134-138.
- [9] Lai, M.M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S. and Snyder, S.H. (1998) Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273, 18325–18331.
- [10] Sparrow, D.B., Miska, E.A., Langley, E., Reynaud-Deonauth, S., Spohr, G., Kouzarides, T. and Mohun, T. (1999) MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *EMBO J.* 18: 5085-5098.
- [11] Zhang, C.L., McKinsey, T.A. and Olson, E.N. (2001) The transcriptional co-repressor MITR is a signal Responsive inhibitor of myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7354-7359.
- [12] Lu, J., McKinsey, T.A., Nicol, R.L., and Olson, E.N. (2000) Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4070–4075.
- [13] Youn, H. D., Grozinger, C. M. and Liu, J. O. (2000) Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J. Biol. Chem.* 275, 22563–22571.
- [14] Sun, L., Youn, H.D., Stolow, M., He, W. and Liu, J. O. (1998) Cabin 1, a negative regulator for calcieurin signaling in T-lymphocytes. *Immunity* 8: 703-711.
- [15] Nadruz, J. W., Kobarg, C.B., Constancio, S.S., Corat, P.D. and Franchini, K.G. (2003) Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium – regulation by Myocyte Enhancer Factor2. *Circ. Res.* 92: 243–25.
- [16] Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F.J., Nicol, R.L., McKinsey, T.A., Overbeek, P., Richardson, J.A., Grant, S.R. and Olson, E.N. (2000) CaM Kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J. Clin. Invest.* 105: 1395–1406.
- [17] Naya, F.J., Black, B.L., Wu, H., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Hill, J.A. and Olson, E.N. (2002) Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat. Med.* 8, 1303–1309.
- [18] Nery, F.C., Passos, D.O., Garcia, V.S. and Kobarg, J. (2004) Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 279, 11444-11456.

- [19] Kobarg, J., Schnittger, S., Fonatsch, C., Lemke, H., Bowen, M. A., Buck, F. and Hansen, H.P. (1997) Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen. *Exp. Clin. Immunogenet.* 14, 273-280.
- [20] Lemos, T.A., Passos, D.O., Nery, F.C. and Kobarg, J. (2003) Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD3. *FEBS Lett.* 533, 14-20.
- [21] Torsoni, A.S., Fonseca, P.M., Crosara-Alberto, D.P. and Franchini, K.G. (2003) Early activation of p160 ROCK by pressure overload in rat heart. *Am. J. Cell Physiol.* 284, C1411-C1419.
- [22] Yang, J., Drazba, J.A., Fergunson, D.G. and Bond M. (1998) A-kinase anchoring protein 1- (AKAP100) is localized in multiple subcellular compartments in the adult rat heart. *J. Cell Biol.* 142, 511-522.
- [23] Hansen, H., Lemke, H., Bredfeldt, G., Könnecke, I. and Havsteen, B. (1989) The Hodgkin-associated Ki-1 antigen exists in an intracellular and a membrane-bound form. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 370, 409-16.
- [24] Froese, P., Lemke, H., Gerdes, J., Havsteen, B., Schwarting, R., Hansen, H. and Stein, H. (1987) Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus transformed human B and T lymphoid cell lines. *J. Immunol.* 139, 2081-2087.
- [25] Han, A., Pan, F., Stroud, J.C., Youn, H.D., Liu, J.O. and Che, L. (2003) Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor 2. *Nature* 422, 730-734.
- [26] Chan, J.K.L., Sun L., Yang X.-J. and Wu Z. (2003) Functional characterization of an amino-terminal region of HDAC4 that possesses MEF2 binding and transcriptional repressive activity. *J. Biol. Chem.* 278, 23515-23521.
- [27] Mc Kinsey, T.A., Zhang, C.-L., Lu, J. and Olson, E. N. (2000). Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-111.
- [28] Ornatsky, O.L., Cix, D.M., Tangirala, P., Andreucci, J.J., Quinn, Z.A., Wrana, J.L., Prywes, R., Yu, Y.T. and McDermott, J.C. (1999) Post-translational control of the MEF2A transcriptional regulatory protein. *Nuc. Acids Res.* 27, 2646-2654.
- [29] Pass, J.M., Zheng, Y., Wead, W.B., Zhang, J., Li, R.C.X., Bolli, R. and Ping, P. (2001) PKC ϵ activation induces dichotomous cardiac phenotypes and modulates PKC ϵ -RACK1 interactions and RACK1 expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H946-H955.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Mapping of rMEF2C deletion mutants for auto activation

A: Schematic representation of mMEF2C. Different N- and C-terminal truncations of rMEF2C were fused in frame to the DNA-binding domain of LexA in yeast expression vector pBTM116. **B:** Co-transformation of deletion mutants and empty library vector pGADT7-rec in yeast. The auto-activation was analyzed by testing for β -galactosidase activity in yeast cells. **C:** Alignment of amino acid sequence of isolated rat MEF2C(1-169) and mouse MEF2C (NCBI Accession Number: NP_079558). Different amino acids are written in bold.

Figure 2. rMEF2C interacts with hKi-1/57 *in vitro*

Pull down assay of GST-rMEF2C(1-169) with 6xHis-hKi-1/57. GST-rMEF2C(1-169) or GST protein was conjugated to Glutathione-sepharose beads. Beads with conjugated with GST or GST-rMEF2C(1-169) were separately incubated with 6xHis-hKi-1/57. After extensive washing, beads were boiled in Laemmli buffer and proteins were resolved in 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for Western blotting analysis. Membranes were incubated with primary antibodies Monoclonal A26 Anti-Ki-1/57 and monoclonal Anti-GST overnight. After incubation with secondary antibodies, membranes were washed and incubated with [I^{125}]protein A. Protein bands were detected by autoradiography. The first 3 lanes of the gel and the Western blot are protein input. The fourth lane represents a pull down control with GST and the fifth lane a pull down of GST-rMEF2C(1-169) with 6xHis-hKi-1/57 **A:** Protein gel dyed with Coomassie blue for visualizing all proteins; **B:** Western blot with antibody anti-Ki-1/57; **C:** Western blot with antibody anti-GST; **D:** Alignment of the isolated rat Ki-1/57 and human Ki-1/57 (NCBI NP_055097.1) amino acid sequence. The amino acids in bold represent the differences between these two sequences.

Figure 3. The interaction of hKi-1/57 with rMEF2C *in vitro* decreases rMEF2C DNA binding activity.

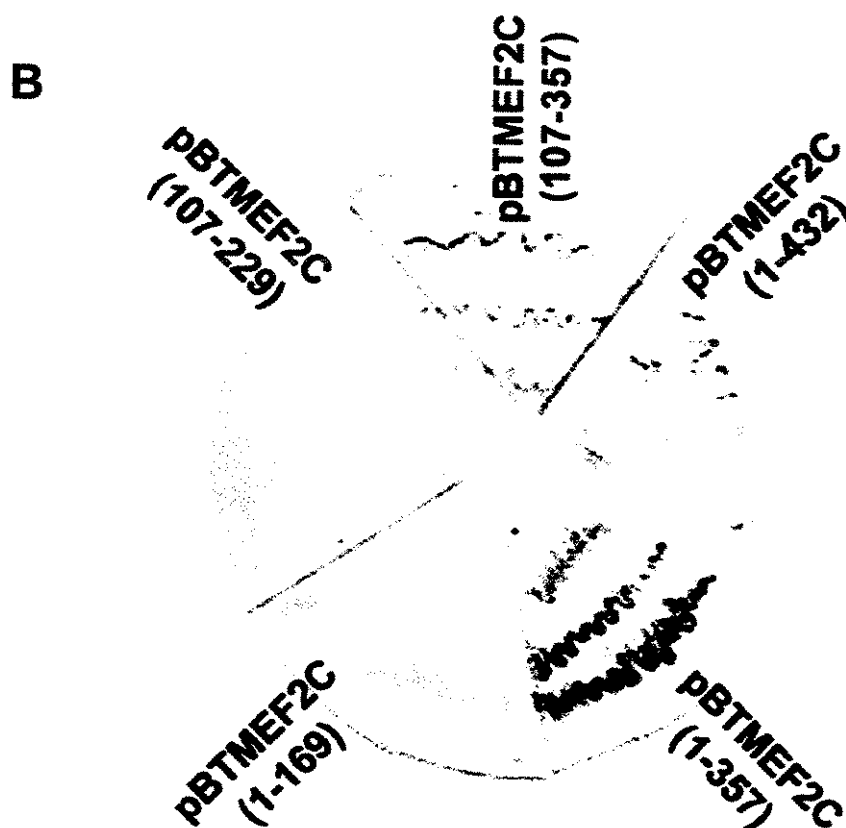
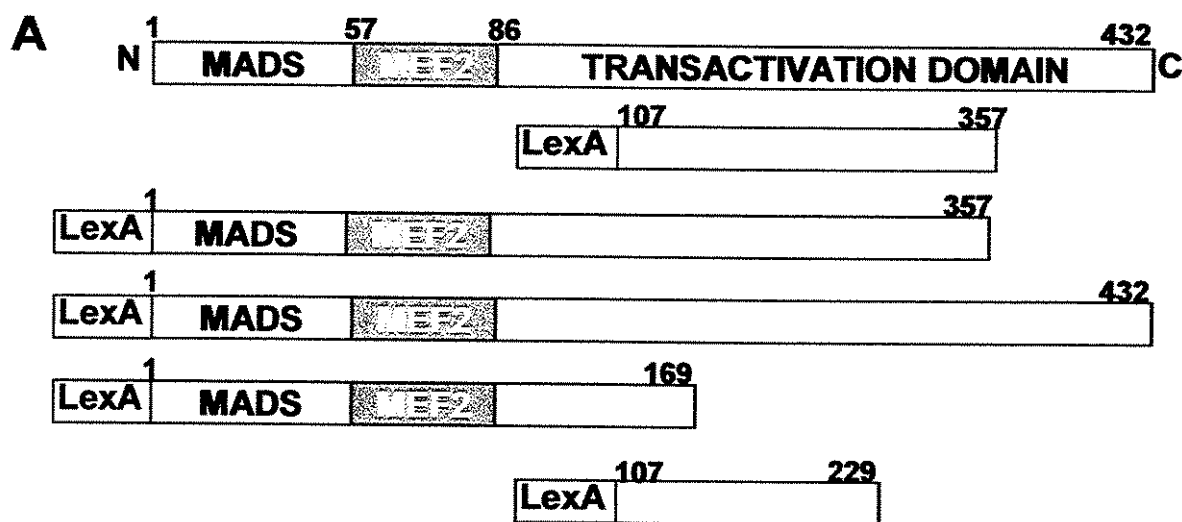
Electrophoretic Mobility Shift Assay of recombinant rat rGST-MEF2C(1-169) protein with radioactively labeled MEF2 consensus DNA. Lane 1 is a negative control without protein. Lane 2 shows the complex formation between GST-rMEF2C(1-169) and the DNA. Lane 3 to 8 were added the same quantity of recombinant GST-rMEF2C(1-169) plus recombinant proteins (h for human), antibody or DNA as indicated in the figure.

Figure 4. rMEF2C associates with rKi-1/57 *in vivo* and its association is dependent on mechanical overload in heart.

S= Sham operated rats; 1h, 3h and 6h are the time period which rats were submitted to TAoC. **A:** Rat heart control protein extracts or rat heart submitted to TAoC protein extracts were immunoblotted with antibody anti-MEF2; **B:** Rat heart protein control extracts or submitted to TAoC were immunoblotted with antibody anti-Ki-157; **C:** MEF2 was immunoprecipitated from rat hearts and immunoblotted with antibody anti-Ki-1/57.

Figure 5. Confocal Laser Scanning Microscopy studies showing the immunolocalization of rMEF2 (green) and rKi-1/57 (red) in isolated adult rat ventricular myocytes. **A:** Anti-MEF2 staining in isolated myocytes from control rats. **B:** anti-Ki-1/57 staining of isolated myocytes from control rats. **C:** Anti-MEF2/anti-Ki-1/57 double staining of isolated myocytes from control rats. **D:** Anti-MEF2 staining in isolated myocytes from hearts subjected to TAoC. **E:** Anti-Ki-1/57 staining in isolated myocytes from hearts subjected to TAoC. **F:** Anti-MEF2/anti-Ki-1/57 double staining in isolated left ventricular myocytes subjected to TAoC. **G:** Western blot of subcellular fractioning with anti-Ki-/57 antibody of rat left ventricle sham operated and submitted to TAoC. 50µg of each fraction was loaded in the gel. cyto: Cytoplasmatic fraction; nuc: nuclear fraction; total: whole protein extract.

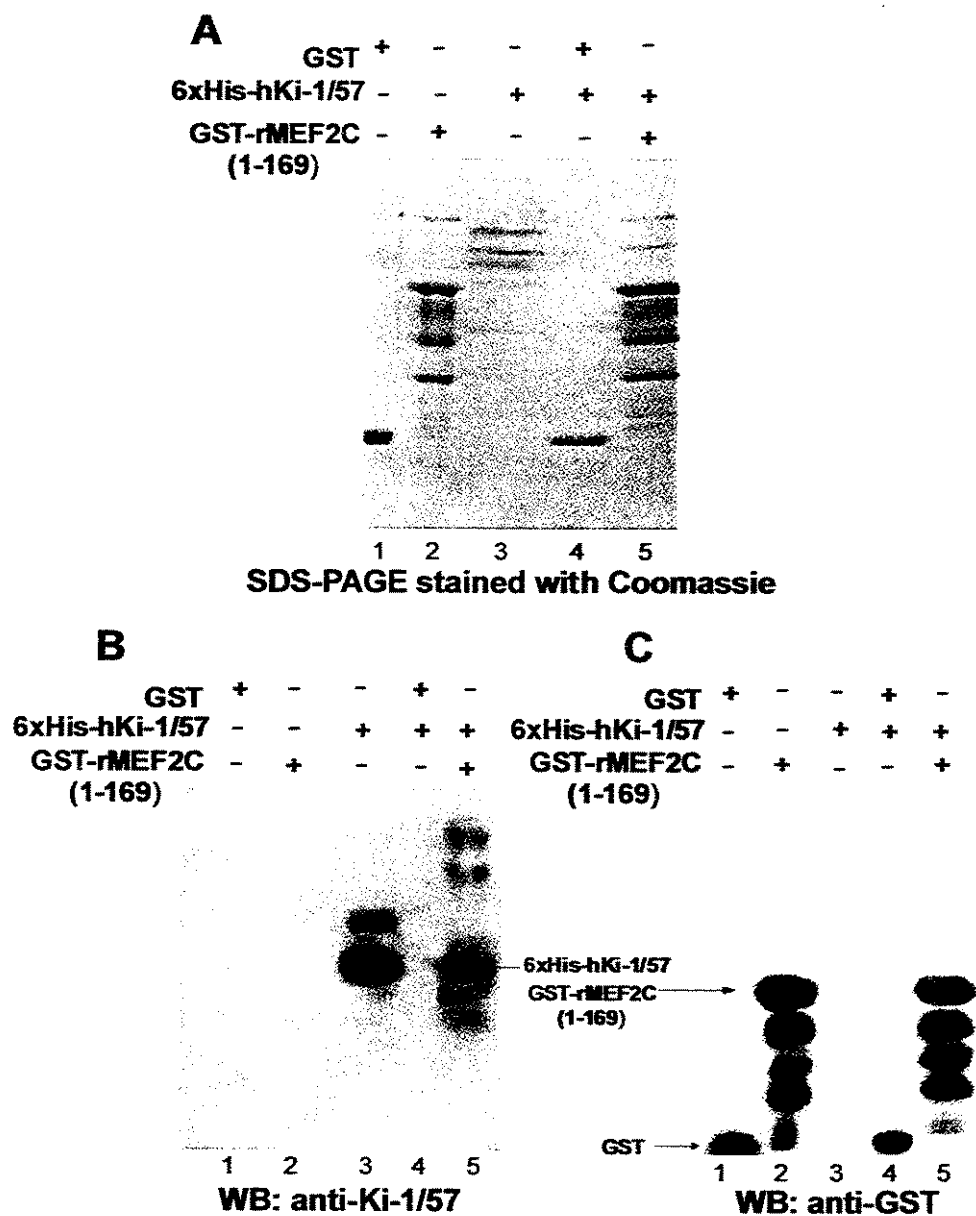
FIGURES 1-5



C

rMEF2C (1-169)	MGRKKIQITRIMDERNRQVTFTKRKFGLMKKAYELSVLCDCEIALIIFNSTNKLQYAST	60
mMEF2C	MGRKKIQITRIMDERNRQVTFTKRKFGLMKKAYELSVLCDCEIALIIFNSTNKLQYAST	60
rMEF2C (1-169)	DMDKVLLKYTEYNEPHESRTNSDIVETLRKKGLNGCDSPDPDADDSVGHSPESEDKYRKI	120
mMEF2C	DMDKVLLKYTEYNEPHESRTNSDIVETLRKKGLNGCDSPDPDADDSVGHSPESEDKYRKI	120
rMEF2C (1-169)	NEDIDLMISRQRLCAVPPPNFEMPVTIPVSSHNSLVYSNPPCQLTGKPNL	169
mMEF2C	NEDIDLMISRQRLCAVPPPSFEMPVTIPVSSHNSLVYSNPVSTLGNPNL	169

Figure 1



D

rKi-1/57	MMKIPTKPKKRDR IQGALGS	PVAAAGAAMQ	ESFGCVVANR	FHQLLDDSD	PFDILREAER	RRQQQLQQR	70
hKi-1/57	----- MK GALGS	PVAAAGAAMQ	ESFGCVVANR	FHQLLDDSD	PFDILREAER	RRQQQLQQR	57
rKi-1/57	RDEAAAAAGA	GPRGGRSPAG	ASGHRAGAGG	RRESQKERKS	LPAPVAQRPD	SPGGGLQAPG	QKRTPRRGEQ 140
hKi-1/57	RDEAAAAAGA	GPRGGRSPAG	ASGHRAGAGG	RRESQKERKS	LPAPVAHRPD	SPGGGLQAPG	QKRTPRRGEQ 127
rKi-1/57	QGWNSR-GP	EGMLERAERR	SYREY PTL	167			
hKi-1/57	QGWNSR-GP	EGMLERAERR	SYREY RPY	155			

Figura 2

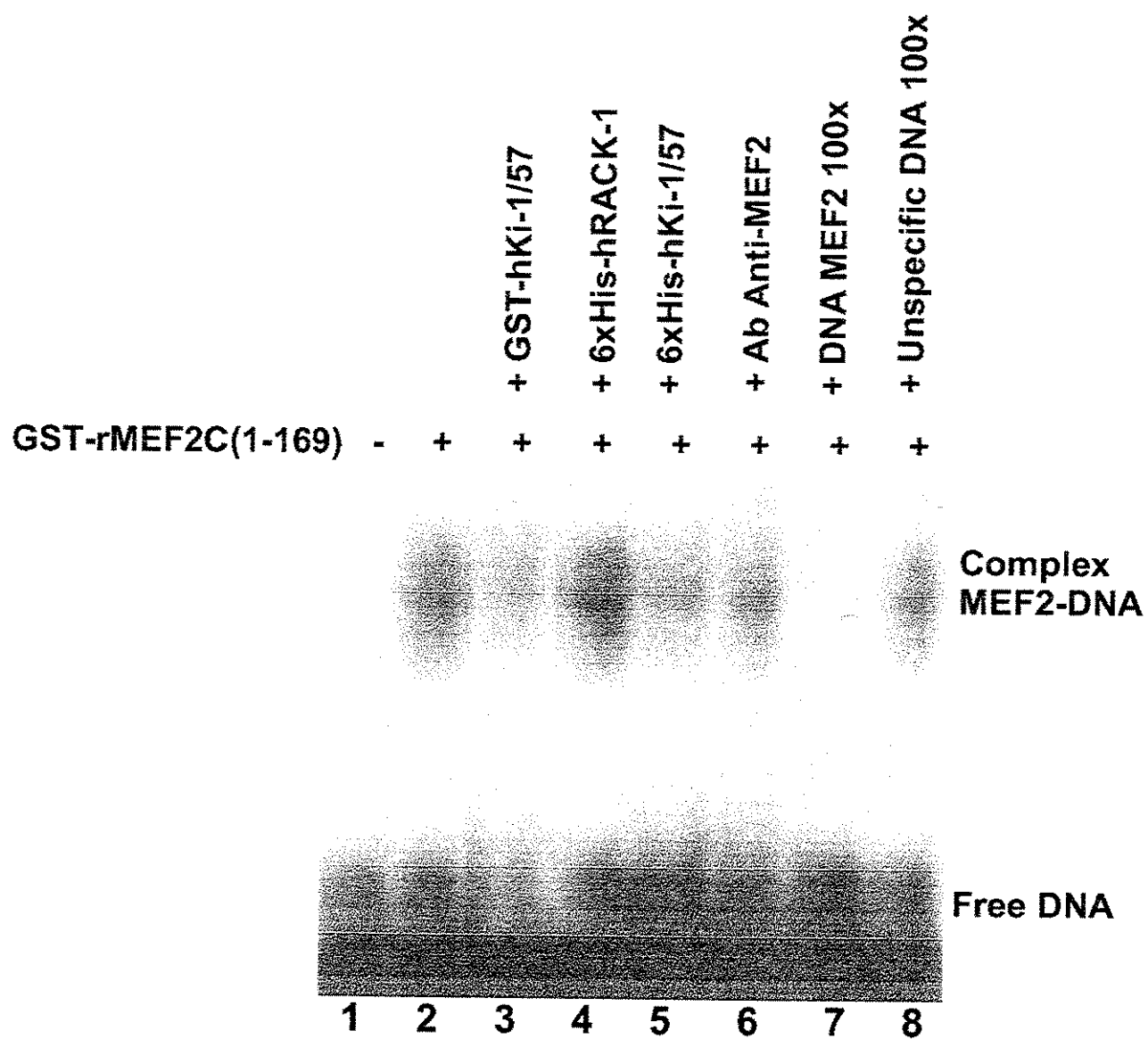


Figure 3

A

IB: Anti-MEF2



B

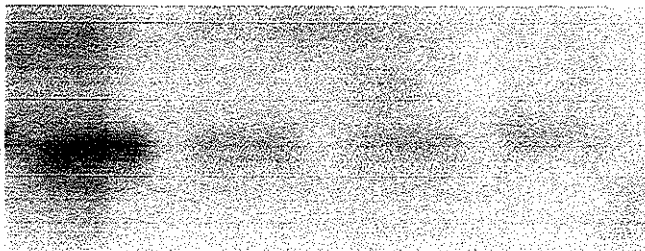
IB: Anti-Ki-1/57



C

IP: Anti-MEF2

IB: Anti-Ki-1/57



S 1h 3h 6h

Figure 4

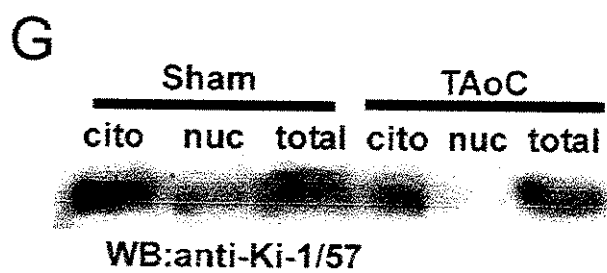
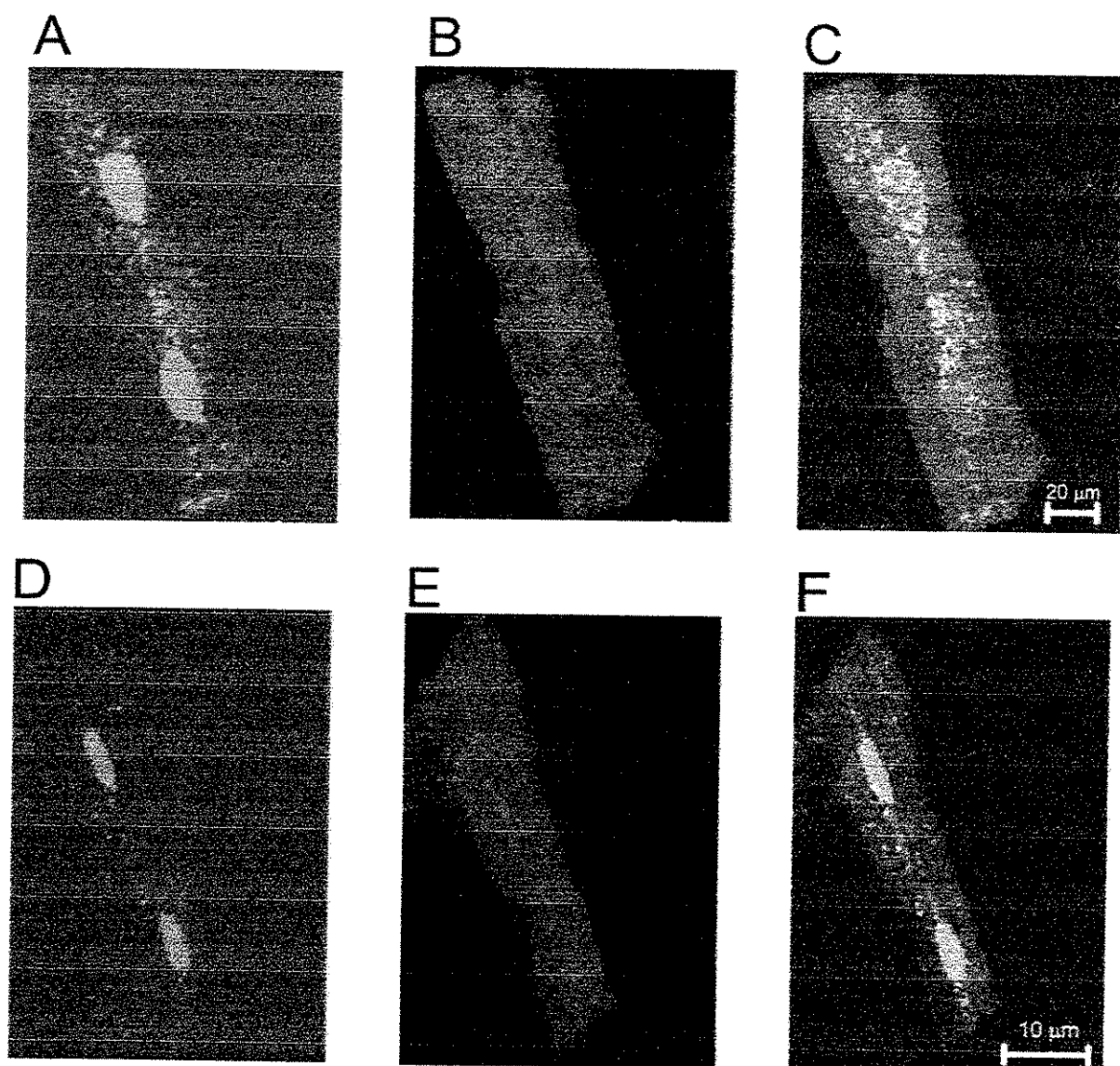


Figure 5