

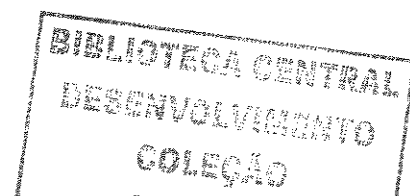
PRISCILA MEIRELLES FONSECA SIESSER

**MECANOTRANSDUÇÃO EM CARDIOMIÓCITOS DE
RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE
MECÂNICO AGUDO: O PAPEL DA QUINASE DE ADESÃO
FOCAL (FAK) E DO CITOESQUELETO**

CAMPINAS

2004

i



PRISCILA MEIRELLES FONSECA SIESSER

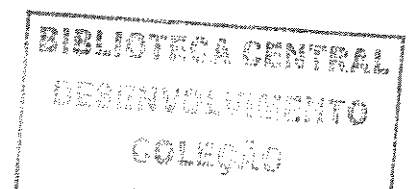
**MECANOTRANSDUÇÃO EM CARDIOMIÓCITOS DE
RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE
MECÂNICO AGUDO: O PAPEL DA QUINASE DE ADESÃO
FOCAL (FAK) E DO CITOESQUELETO**

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
Clínica Médica, na área de concentração em Ciências
Básicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2004



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	Si18m
V	EX
TOMBO BC/	65645
PROC.	16-86-03
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	14-9-05
Nº CPD	

Bibid 364701

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

Si18m

Siesser, Priscila Meirelles Fonseca

Mecanotransdução em cardiomiócitos de ratos adultos submetidos ao estresse mecânico agudo: o papel da quinase de adesão focal (FAK) e do citoesqueleto / Priscila Meirelles Fonseca Siesser. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Kleber Gomes Franchini

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

I. Miocárdio. 2. Hipertrofia. I. Kleber Gomes Franchini. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

Membros:

1. Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

2. Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

3. Profa. Dra. Maria Julia Marques

4. Prof. Dr. Jose Eduardo Pereira Wilken Bicudo

5. Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 04/06/2004

200520592

DEDICATÓRIA

À minha grande família

AGRADECIMENTOS

À Sylvia, Lineu, Gisele, Márcio, Carolina, Mariane, André, Gabriel, Mateus, João e Camila, pela torcida e bons momentos compartilhados.

Ao Bill, meu marido, pelo carinho, torcida e inestimável compreensão.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela valiosa orientação, convivência e imensa contribuição para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, meu primeiro e sempre presente orientador.

Ao Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad, pela oportunidade de realizar parte deste estudo em seu laboratório.

Ao Curso de Pós Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, por tornar possível a realização deste trabalho.

Aos colegas Adriana, Patrícia, Marcus, Cláudia K., Fabíola, Kiara, Silvana, Rosana, Antônio, Rodrigo e Luis, pela amizade e colaboração.

À Thais Theizen, pela convivência e valioso auxílio técnico, determinante na realização deste estudo.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP, pelo apoio técnico e uso de seus equipamentos.

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

*“A magia não é olhar a vida pelo olho
mágico. A magia é poder abrir a porta.”*

Nilza Menezes

	<i>Pág</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xxi</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>xxv</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1. INTRODUÇÃO	<i>37</i>
1.1. Sobrecarga Hemodinâmica e Hipertrofia Cardíaca	<i>39</i>
1.2. Mecanotransdução em Cardiomiócitos	<i>41</i>
1.2.1. Canais iônicos	<i>41</i>
1.2.2. Fatores parácrinos e autócrinos	<i>42</i>
1.2.3. Citoesqueleto	<i>42</i>
1.2.3.1. Citoesqueleto sarcomérico e extra-sarcomérico	<i>43</i>
1.2.3.2. O citoesqueleto e a mecanotransdução de sinais	<i>47</i>
1.2.3.2.1. Costâmeros	<i>52</i>
1.2.3.2.2. Linhas Z	<i>54</i>
1.2.3.2.3. Discos Intercalares	<i>56</i>
2. OBJETIVOS	<i>59</i>
3. MATERIAIS E MÉTODOS	<i>63</i>

3.1. Animais	65
3.2. Materiais	65
3.2.1. Anticorpos	65
3.2.2. Reagentes e sais	65
3.3. Métodos	66
3.3.1. Preparação experimental	66
3.3.2. Modelo de Sobrecarga Pressora	68
3.3.3. Coleta e Homogeneização de Miocárdio	69
3.3.4. Análise de Proteína por <i>immunoblotting</i>	70
3.3.5. Procedimento para Análise Morfológica em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	71
3.3.6. Procedimento para imunolocalização de proteínas em Microscopia Eletrônica de Transmissão.	72
3.3.6.1. Processamento para embebição em LR-White	72
3.3.6.2. Imunomicroscopia eletrônica	73
3.3.7. Ensaio de ligação com GST-miosina-beads	74
3.3.7.1. Obtenção da proteína híbrida GST-miosina acoplada a beads de glutationala	75
3.3.7.2. Ensaio de ligação com GST-miosina-beads	76
3.3.8. Fracionamento celular	77

4. RESULTADOS	79
4. 1. Análise Hemodinâmica	81
4.2. Análise Morfológica ultraestrutural de miocárdios submetidos à sobrecarga pressora aguda	83
4.3. Análise por <i>Immunoblotting</i>	88
4.3.1. Expressão e fosforilação em tirosina da FAK em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda	88
4.3.2. Expressão, fosforilação em tirosina e associação da Src em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda	89
4.3.3. Expressão e fosforilação das proteínas efectoras ERK e JNK em miocárdios de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda	91
4.4. Distribuição da quinase de adesão focal em miocárdios de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda	93
4.5. Interação entre a FAK e a Miosina de Cadeia Pesada (MHC) - Ensaio de ligação com GST-miosina	102
4.6. Fracionamento celular	104
5. DISCUSSÃO	107
6. CONCLUSÕES	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
8. ANEXOS	147

LISTA DE ABREVIATURAS

[¹²⁵I] Isótopo de iodo 125

ANF – fator natriurético atrial

CAS – substrato associado a Crk (*Crk associated substrate*)

DOCK – proteína de 180-kDa downstream a Crk (*180-kDa protein downstream of Crk*)

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ERK – quinase responsiva a estímulos extracelulares (subfamília das MAPKs)

FAK – quinase de adesão focal

FAT – *focal adhesion targeting*

GDP – guanosina difosfato

Grb2 - *growth factor receptor-bound protein 2*

GST – *glutathione S transferase*

GTP - guanosina trifosfato

HEK - *human embryo kidney*

JNK – quinase N-terminal de c-Jun (subfamília das MAPKs)

MDCK - *Madin-Darby canine kidney*

MEK - MAP kinase kinases

MEKK - MEK kinase

MHC – miosina de cadeia pesada

MLC – miosina de cadeia leve

MLP – *muscle related LIM protein*

NFAT3 - *Nuclear factor of activated T cells 3*

PBS – tampão-fosfato-salina

PI3K – fosfatidilinositol-3 quinase

PKC – fosfoquinase C

PLC – fosfolipase C

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila

RBL-2H3 - *rat basophilic leukemia cells*

SDS – dodecil sulfato de sódio

SEK - *stress-activated protein kinase activator*

SH2 – *Src homology 2*

SH3 – *Src homology 3*

Shc - *Src-homology/collagen*

SOS - *Son of sevenless* (SOS); fator trocador de nucleotídeo guanina que ativa Ras

Src – proteína originalmente definida como produto do sarcoma de Roux

Trisma – Tris-hidroximetilaminometano

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1. Estrutura do Sarcômero	44
FIGURA 2. Diagrama ilustrativo dos costâmeros	45
FIGURA 3. Diagrama ilustrativo da linha Z	46
FIGURA 4. Diagrama ilustrativo do disco intercalar	47
FIGURA 5. Diagrama esquemático da estrutura da FAK	49
FIGURA 6. Fluxograma – Abordagens metodológicas	67
FIGURA 7. Representação do modelo experimental utilizados nos ensaios <i>in vivo</i> ...	68
FIGURA 8. Proteínas GST e GST-miosina utilizadas nos ensaios de ligação	76
FIGURA 9. Esquema ilustrativo do ensaio de ligação com as proteínas GST e GST-miosina	77
FIGURA 10. Registros de pressão arterial obtidos em experimento de constrição da aorta	82
FIGURA 11. Efeito da constrição da aorta nas medidas de pressão arterial de ratos ..	83
FIGURA 12. Ultraestrutura dos cardiomiócitos	85
FIGURA 13. Ultraestrutura dos costâmeros	86
FIGURA 14. Ultraestrutura dos discos intercalares	87
FIGURA 15. Ultraestrutura da díade cardíaca	87
FIGURA 16. Ultraestrutura do Interstício Miocárdio	88

FIGURA 17. Expressão e Ativação da FAK em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda	89
FIGURA 18. Expressão, Ativação e Associação da Src em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda	91
FIGURA 19. Expressão e ativação dos efetores downstream ERK e JNK em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda	92
FIGURA 20. Distribuição da FAK em cardiomiócitos de miocárdio controle	97
FIGURA 21. Distribuição da FAK em cardiomiócitos de miocárdio submetidos à sobrecarga pressora aguda por 3 e 10 minutos	99
FIGURA 22. Distribuição da FAK em cardiomiócitos de miocárdio submetidos à sobrecarga pressora aguda por 30 e 60 minutos	101
FIGURA 23. Ensaio de ligação com GST e GST-miosina	103
FIGURA 24. Fracionamento celular	105
FIGURA 25. Modelo de ativação da FAK em cardiomiócitos submetidos a aumentos agudos de tensão	114

RESUMO

O estresse mecânico é o principal fator responsável pelos ajustes funcionais e estruturais do miocárdio em resposta a sobrecarga de trabalho. Tal estímulo determina a ativação de uma intrincada rede de vias de sinalização celulares que, por fim, culminam com o crescimento hipertrófico de cada cardiomiócito. A quinase de adesão focal (FAK) tem sido implicada como a principal molécula sinalizadora envolvida na resposta dos cardiomiócitos ao estresse mecânico. No entanto, os mecanismos da ativação da FAK pelo estímulo mecânico ainda não são conhecidos.

No presente estudo investigamos a ativação e distribuição subcelular da FAK em cardiomiócitos submetidos à sobrecarga pressora aguda, visando assim contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de ativação da FAK pelo estímulo mecânico. A sobrecarga pressora por períodos de 3 a 60 minutos levou a fosforilação da FAK nos seus resíduos de tirosina Tyr-397, -576/7, -861 e 925, conforme detectado pelos anticorpos fosfoespecíficos. Tal ativação foi paralela ao aumento da associação FAK/Src e simultâneo aumento da atividade da Src, constatada pela fosforilação da Tyr-418. A ativação do complexo FAK/Src foi ainda acompanhada pela ativação de efetores *downstream*, ERK e JNK (MAPKs), possivelmente reguladores de processos celulares vinculados a resposta hipertrófica.

A análise por imunomicroscopia eletrônica com anticorpos contra a FAK demonstrou que em cardiomiócitos de ratos controle a FAK se encontrava preferencialmente localizada junto aos costâmeros, linhas Z, discos intercalares e filamentos do sarcômero. Além disso, a sobrecarga pressora por períodos de 3 a 60 minutos induziu a formação de agregados da FAK juntos a estes mesmo sítios subcelulares e, posteriormente, levou a translocação da FAK para o compartimento nuclear, dado este confirmado por fracionamento celular. Paralelamente, estudo desenvolvido em nosso laboratório, com o emprego da metodologia de duplo híbrido em uma biblioteca de cDNA de rato adulto na busca de novas proteínas que interagissem com a FAK, revelou que esta quinase interage com a cauda da miosina de cadeia pesada (MHC). Este dado foi confirmado no presente estudo em ensaios de ligação com GST-miosina, que detectou a interação FAK/MHC em extratos ventriculares de ratos controle e sobrecarregados. A interação entre a FAK e a MHC se encontrava aumentada em ventrículos esquerdos obtidos de ratos submetidos à sobrecarga hemodinâmica por 10 minutos se comparada aquela dos

ventrículos controle, mas sofreu redução significativa em ventrículos esquerdos obtidos de ratos submetidos à sobrecarga pressora por 60 minutos. Dados similares foram obtidos para a FAK fosforilada em sua tirosina 397, conforme detectado com anticorpos fosfoespecíficos.

Nossos resultados sugerem que a ativação da FAK pelo estímulo mecânico pode ocorrer junto a múltiplos sítios subcelulares (costâmeros, linhas Z, discos intercalares e filamentos de miosina), os quais atuariam como verdadeiros mecanosensores em cardiomiócitos, desempenhando importante papel na mecanotransdução de sinais decorrente do estresse mecânico. No mais, nossos dados sugerem ainda que a FAK pode desempenhar funções no compartimento nuclear relacionadas à resposta hipertrófica em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico.

ABSTRACT

Mechanical stress is the major element responsible for functional and structural adjustments of the heart to overload. Such a stimulus activates an intricate net of cellular signaling pathways which, eventually, culminate with the hypertrophic growth of cardiac myocytes. FAK has been implicated as a signaling molecule involved in the early response of cardiac myocytes to mechanical stress. However, the mechanism of FAK activation by mechanical stimuli is still not known.

In the present study we investigated FAK activation and subcellular distribution in cardiac myocytes subjected to acute pressure overload in order to gain a better understanding of the mechanisms of FAK activation by a mechanical stimulus. Pressure overload lasting from 3 to 60 min was shown to induce FAK phosphorylation at Tyr-397, -576/7, -861 and -925 as detected by phosphospecific antibodies. This phosphorylation was paralleled by increased FAK/Src association and Src activity, as demonstrated by Tyr-418 phosphorylation. FAK/Src complex activation was accompanied by ERK and JUNK activation (MAPKs), which may regulate cellular processes related to the hypertrophic response.

Immunogold analysis with antibodies against FAK showed that in cardiac myocytes from sham-operated rats Fak was closely associated with costameres, Z lines, intercalated discs and sarcomeric filaments. Furthermore, pressure overload lasting from 3 to 60 min induced FAK to cluster at the same subcellular sites and at last translocate into the nuclei of cardiac myocytes. The translocation to nuclei was confirmed by tissue fractioning experiments.

A parallel study in our laboratory employed the yeast two-hybrid screening of an adult rat c-DNA library and revealed an interaction between FAK and the C-terminal coiled-coil region of the alpha myosin heavy chain (MHC). This finding was confirmed in the present study by performing GST-myosin binding assays, which detected the FAK/MHC interaction in both sham-operated and pressure overloaded left ventricles. The FAK/MHC interaction was shown to be increased in 10 min-overloaded left ventricles as compared to sham operated ventricles. However, a marked reduction of FAK/MHC interaction was observed in 60 min-overloaded ventricles. Similar findings were obtained for FAK397Y, as detected by phosphospecific antibody.

Our data suggest that FAK activation by mechanical stimulus can occur in association with multiple subcellular sites in cardiac myocytes (costameres, Z lines, intercalated discs, and myosin filaments). Thus, these sites may truly act as mechanosensors, exerting an important role in signal mechanotransduction triggered by mechanical stress. In addition, our data suggest that FAK may have functions in the nuclear compartment, which might be related to the hypertrophic response in cardiac myocytes subjected to mechanical stress.

1. INTRODUÇÃO

O stress mecânico é o principal fator responsável pelos ajustes funcionais e estruturais do miocárdio em resposta à sobrecarga de trabalho. Tal estímulo determina a ativação de uma intrincada rede de vias de sinalização celulares que, por fim, culminam com o desencadeamento da resposta hipertrófica. O problema central na pesquisa desta área está em decifrar os mecanismos moleculares que acoplam o estímulo mecânico à resposta hipertrófica.

1.1. Sobrecarga Hemodinâmica e Hipertrofia Cardíaca

Sobrecargas hemodinâmicas determinam respostas autorreguladoras que permitem ao coração modificar seu desempenho preservando estrategicamente a homeostase circulatória (COOPER, 1987; OPEIE, 1997). Em resposta a aumentos agudos da carga hemodinâmica, o coração faz uso do mecanismo de Frank-Starling para otimizar a contração cardíaca (revisado por LORELL et al., 2000), enquanto outros mecanismos celulares, especialmente neurohumorais, são capazes de aumentar a disponibilidade de Ca^{++} para o complexo protéico responsável pela geração de força, resultando no aumento da força de contração (OPEIE, 1997; LORELL et al., 2000).

A adaptação a aumentos fixos e prolongados da carga hemodinâmica se faz através do crescimento hipertrófico de cada cardiomiócito, uma vez que a precoce diferenciação destas células durante o desenvolvimento do coração culmina com a perda da capacidade de divisão celular (CHIEN et al., 1993; revisado por LORELL et al., 2000), impossibilitando a hiperplasia. Aparentemente, a resposta hipertrófica do cardiomiócito é desencadeada por uma combinação de estímulos mecânicos e neurohumorais, incluindo a endotelina-1 (ET) e a angiotensina-II (AngII) (BOGOYEVITCH et al., 1994; BOGOYEVITCH, et al., 1996; EBLE et al., 2000; TAYLOR et al., 2000). No entanto, independentemente do estímulo desencadeador, a resposta fenotípica do cardiomiócito é homogênea, sendo representada pelo crescimento hipertrófico, o que sugere que um mecanismo comum e estereotipado pode ser o responsável pelo desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (CHIEN, 1999; revisado por WAGNER et al., 1999).

A resposta inicial do cardiomiócito ao aumento da carga hemodinâmica inclui alterações qualitativas na expressão de genes específicos e aumento quantitativo da expressão de proteínas estruturais e envolvidas no metabolismo celular (COOPER, 1987; VAN BILSEN & CHIEN, 1993). O primeiro grupo de genes ativados em decorrência da sobrecarga hemodinâmica são os genes de resposta imediata, incluindo c-fos, c-jun, c-myc e ergr-1, seguido da indução de genes fetais, incluindo a β -miosina de cadeia pesada (β -MHC), o fator natriurético atrial (ANF) e a α -actina esquelética e, finalmente, de genes de expressão constitutiva, incluindo a miosina de cadeia leve (MLC) e a actina cardíaca (KOMURO et al., 1988; IZUMO et al., 1988; KOMURO & YAZAKI, 1993; NADRUZ et al., 2003).

Em conjunto, as alterações no padrão de expressão gênica em decorrência da sobrecarga cardíaca conferem ao cardiomiócito os elementos necessários ao crescimento hipertrófico. De notável importância, o aumento da síntese de componentes do aparato contrátil e consequente deposição sarcomérica (revisado por SUGDEN, 2001) permitem que os cardiomiócitos se acomodem às novas demandas de elevada capacidade contrátil (revisado por SUGDEN, 2001). Na hipertrofia concêntrica, induzida por sobrecarga pressora, a deposição de sarcômeros se dá preferencialmente em paralelo ao maior eixo do cardiomiócito (revisado por SUGDEN, 2001), enquanto que na hipertrofia excêntrica, induzida por sobrecarga de volume, tal deposição ocorre preferencialmente em série (revisado por SUGDEN, 2001).

O crescimento hipertrófico conjunto dos cardiomiócitos culmina no aumento da espessura das câmaras cardíacas. A hipertrofia tende a reduzir o aumento na tensão da parede das câmaras provocado pela sobrecarga hemodinâmica como indicado pela relação de Laplace ($T = P \times R / 2e$), cancelando o efeito do aumento na tensão provocada pelo aumento da pressão ventricular, seja sistólico ou diastólico (CARO et al., 1978). Esta relação indica que a tensão é o próprio ou relaciona-se ao estímulo que sinaliza a necessidade de hipertrofia miocárdica (GUNTHER & GROSSMAN, 1979). Quando o aumento na espessura da parede miocárdica é suficiente para normalizar o aumento de tensão diz-se que a hipertrofia é compensatória. No entanto, este processo adaptativo

freqüentemente evolui para um estado descompensado, em que o miocárdio desenvolve várias anomalias, incluindo dilatação das câmaras, desorganização sarcomérica, aumento anormal do tecido intersticial, metabolismo energético alterado e perda de cardiomiócitos, resultando em falência cardíaca (KATZ, 1994). Portanto, o estresse mecânico é um fator crítico não somente na determinação do crescimento hipertrófico em resposta a sobrecarga hemodinâmica, mas também no desencadeamento das etapas iniciais que levam a degeneração e morte dos cardiomiócitos, contribuindo para a deterioração estrutural e funcional do miocárdio (KATZ, 1994; CHIEN, 1999).

1.2. Mecanotransdução em Cardiomiócitos

Embora se saiba que a sobrecarga hemodinâmica prolongada relaciona-se com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, os mecanismos moleculares que acoplam o estímulo hipertrófico iniciado no sarcolema à reprogramação gênica no cardiomiócito ainda são pouco conhecidos. Abordagens diversas acumulam evidências de que múltiplos mecanismos contribuem para o desencadeamento da resposta hipertrófica.

1.2.1. Canais iônicos:

Uma das possibilidades aponta para a participação de canais iônicos sensíveis ao estiramento celular no processo de transdução do sinal. Alguns estudos indicam que a entrada de sódio através de canais de cátions, sensíveis ao estiramento, é um pré-requisito na resposta cardíaca ao aumento de carga (BOHELER & SCHWARTZ, 1992). Esta entrada de sódio provoca aumento imediato da expressão gênica do trocador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ (KENT et al., 1993). No entanto, esse mecanismo parece estar mais relacionado à adaptação funcional responsável pelo aumento de força gerada por cada cardiomiócito do que o efeito anabólico específico que determina a síntese de proteínas contráteis nesta célula.

1.2.2. Fatores parácrinos e autócrinos

Vários estudos têm demonstrado que fatores parácrinos e autócrinos, cuja produção pode ser estimulada pelo estresse mecânico, constituem um importante mecanismo na sinalização celular vinculada a resposta hipertrófica. Exemplos relativamente bem conhecidos são os peptídeos vasoativos angiotensina II e endotelina-1, capazes de induzir o fenótipo hipertrófico em cardiomiócitos (revisado por WAGNER et al., 1999; SUGDEN & BOGOYEVITCH, 1996). Estes peptídeos medeiam suas funções por meio da ativação de receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCR) que, por sua vez, determinam a ativação de múltiplos sistemas de mensageiros secundários que, por fim, afetam fatores nucleares e a regulação da expressão gênica (WAGNER et al., 1999). Dentre os mensageiros secundários, destaca-se a ativação da Ras, a qual pode conduzir a ativação da vias de sinalização das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos), incluindo a raf/ERK (revisado por HEFTI et al., 1997) e a MEKK1/SEK/JNK (BOGOYEVITCH et al., 1996), as quais podem regular processos nucleares vinculados à resposta hipertrófica.

1.2.3. Citoesqueleto

Recentemente, estudos têm sugerido que o citoesqueleto dos cardiomiócitos pode ser um importante elemento na transdução de sinais relacionada ao desencadeamento da resposta hipertrófica. Tal hipótese emergiu principalmente de uma grande variedade de estudos em diversas áreas de conhecimento que demonstraram a participação do citoesqueleto na transdução de sinais em outros tipos celulares (revisado por GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; BERSHADSKY, & GINGER, 1999; ALENGHAT & INGBER, 2002). Dado o elevado grau de complexidade do citoesqueleto dos cardiomiócitos e o fato deste mecanismo geral de mecanotransdução ser o foco do presente estudo, faz-se necessária a sua descrição.

1.2.3.1. Citoesqueleto sarcomérico e extra-sarcomérico

O músculo cardíaco é constituído por cardiomiócitos, que são células alongadas, separadas entre si por especializações da membrana conhecidas como discos intercalares. Os cardiomiócitos caracterizam-se por apresentarem um a dois núcleos centrais e o citoplasma preenchido por miofibrilas e mitocôndrias, responsáveis, respectivamente, pela contração e pelo suprimento energético necessário à contração. As miofibrilas estão distribuídas paralelamente ao maior eixo da célula e são compostas pela justaposição em série de unidades contráteis, os sarcômeros, os quais são demarcados pelas linhas Z (FIGURA 1A e B). Ao microscópio eletrónico, são visíveis as bandas A, alternadas com as bandas I, conferindo aos cardiomiócitos aspecto estriado. A banda I é constituída de filamentos delgados de actina ancorados na linha Z através de homodímeros de α -actinina, β -actinina e nebulina (revisado por CLARK et al., 2002; EPSTEIN & DAVIS, 2003), enquanto que a banda A é constituída de filamentos espessos de miosina que se sobrepõem com os filamentos delgados de actina. O centro da banda A é constituído apenas por filamentos espessos de miosina, sendo conhecido como banda H. Esta, por sua vez, é ainda bisseccionada pela linha M, cuja função é manter os filamentos de miosina latero e longitudinalmente alinhados (FIGURA 1A e B) (revisado por EPSTEIN & DAVIS, 2003).

Aos filamentos delgados de actina, associam-se duas proteínas filamentosas, a tropomiosina e a troponina, envolvidas na regulação do mecanismo da contração do cardiomiócito. Um terceiro sistema de filamentos é constituído pela titina, uma proteína complexa de alto peso molecular, que se associa à linha Z e se estende à linha M (FIGURA 1B) (MARUYAMA et al., 1977; WANG et al., 1979; CLARK et al., 2002). Este sistema desempenha importante função na integridade e comprimento do sarcômero (revisado por GRANZIER & LABEIT, 2004).

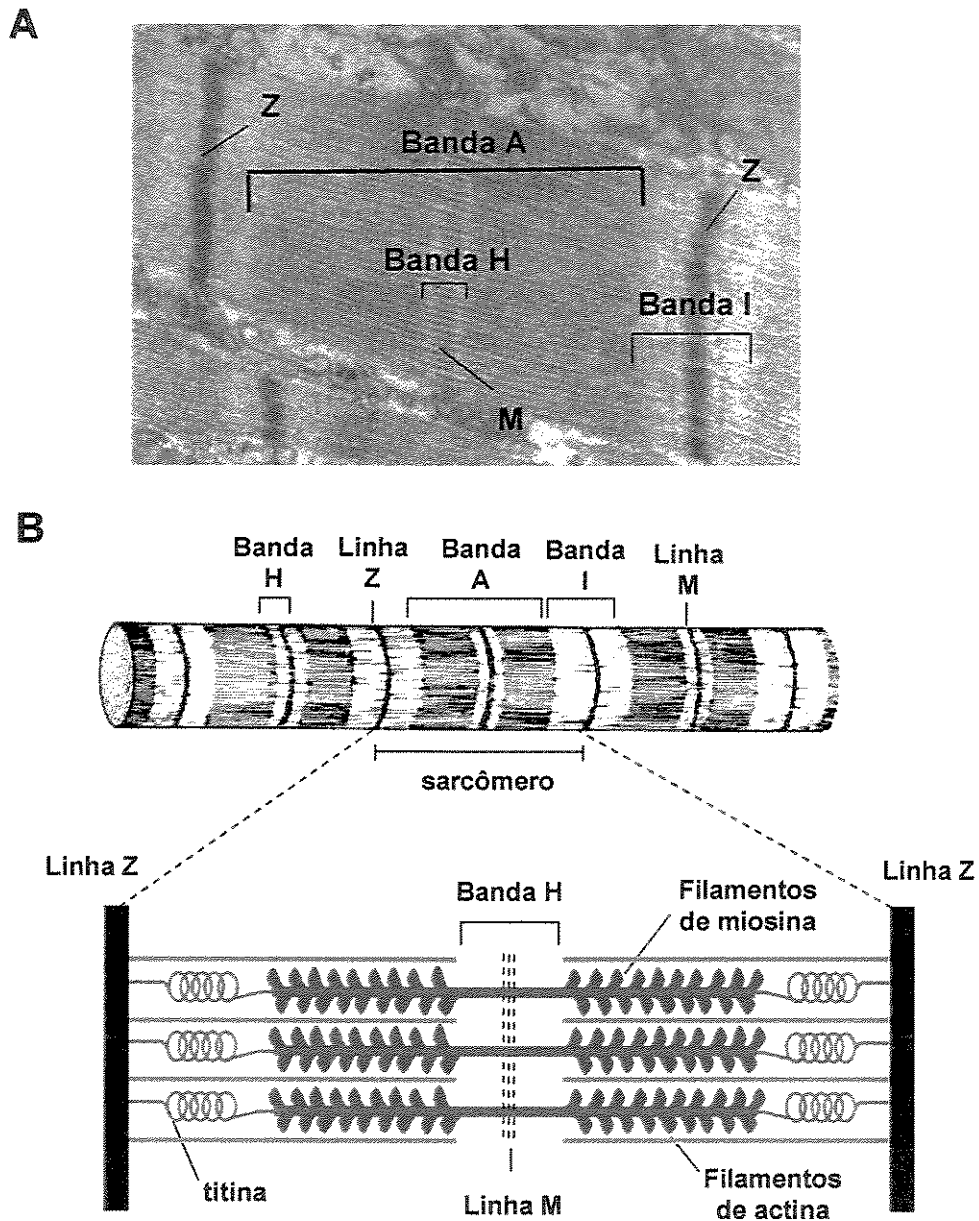


FIGURA 1 – O Sarcômero. A - fotomicrografia de secção de músculo cardíaco de rato adulto (47.260x). Observar o sarcômero e a demarcação das bandas A, I e H e as linhas Z e M. B – Diagrama ilustrando a miofibrila e a posição dos filamentos delgados e espessos do sarcômero, bem como dos filamentos de titina. Modificado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995 e ALBERTS et al., 1994.

Os cardiomiócitos encontram-se fortemente ancorados à matriz extracelular, o que determina um complexo acoplamento mecânico que permite a transmissão recíproca de forças entre o interstício e os cardiomiócitos (SUSSMAN et al, 2002). A adesão dos cardiomiócitos à matriz extracelular ocorre por meio de regiões especializadas, denominadas costâmeros (FIGURA 2). Originalmente descritos no início da década de 80 (PARDO et al., 1983a; CRAIG & PARDO, 1983b), os costâmeros são complexos protéicos subsarcolêmicos que se distribuem periodicamente em coincidência com a linha Z das miofibrilas periféricas e a estas se acoplam principalmente por meio de filamentos intermediários de desmina (revisado por CLARK et al., 2002). Estas estruturas permitem que na face citoplasmática o sarcômero se conecte ao sarcolema e, na face extracelular, o sarcolema se conecte a proteínas da matriz extracelular. Além da adesão dos cardiomiócitos a matriz extracelular, os costâmeros são responsáveis pela transmissão lateral da força contrátil gerada nos sarcômeros (DANOWSKI et al, 1992) e ainda garantem a integridade do sarcolema durante a contração (revisado por CLARK et al, 2002).

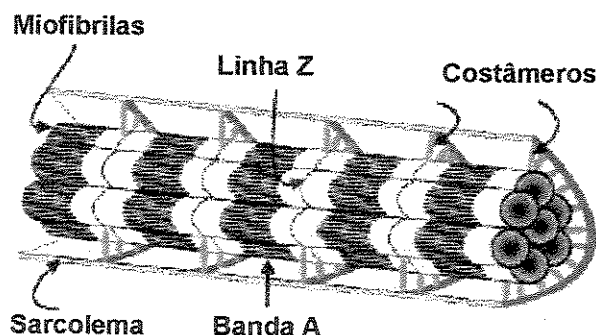


FIGURA 2 – Diagrama ilustrativo dos costâmeros - estruturas subsarcolêmicas distribuídas em coincidência com as linhas Z e que acoplam fisicamente as miofibrilas periféricas ao sarcolema. Modificado de ERVASTI, 2003.

Além de acoplarem as miofibrilas periféricas aos costâmeros, os filamentos de desmina são ainda responsáveis pelo alinhamento das linhas Z de miofibrilas adjacentes, provendo um meio pelo qual a contração das miofibrilas individuais seja coordenada e uniformemente transmitida aos costâmeros (revisado por CLARK et al., 2002). Tal como

estes, as linhas Z também são constituídas por uma intricada rede de proteínas estruturais (FIGURA 3), onde se associam proteínas sinalizadoras (CLARK et al., 2002).

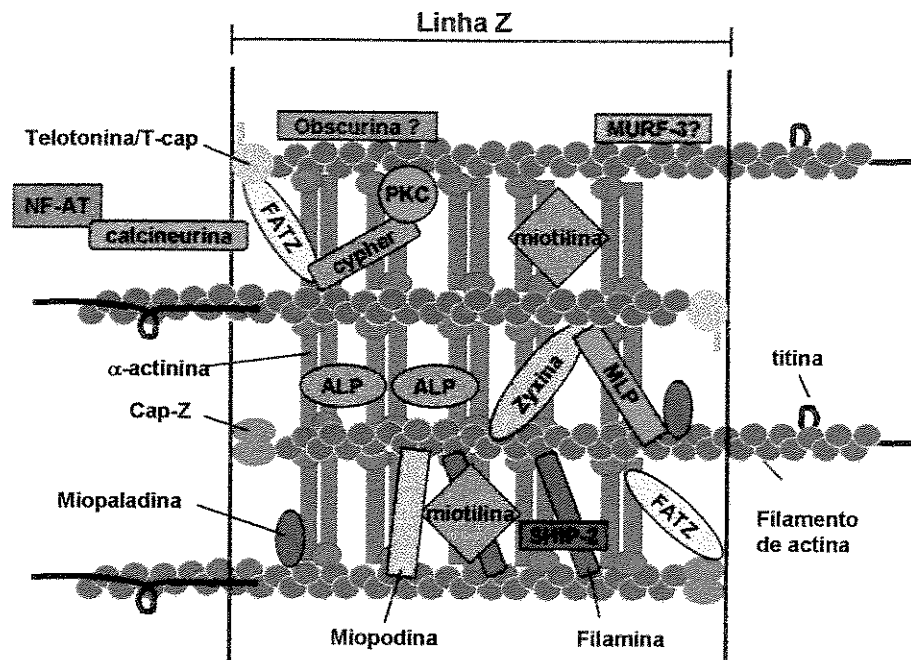


FIGURA 3 – Diagrama ilustrativo da organização molecular dos componentes da linha Z. Modificado de CLARK et al., 2002.

Os cardiomiócitos se unem uns aos outros por meio de junções especializadas conhecidas como discos intercalares (FIGURA 4). Estas estruturas são constituídas por complexos juncionais, responsáveis por ao menos três funções distintas: (1) conectar os filamentos finos de actina de células adjacentes, por meio da *fascia adherens*, desempenhando função análoga à linha Z; (2) unir fortemente uma célula a outra, por meio de desmossomos; (3) propiciar continuidade elétrica entre cardiomiócitos vizinhos, por meio de junções comunicantes, permitindo assim a rápida transmissão do potencial de ação, necessário à contração cardíaca (ALBERTS et al., 1994).

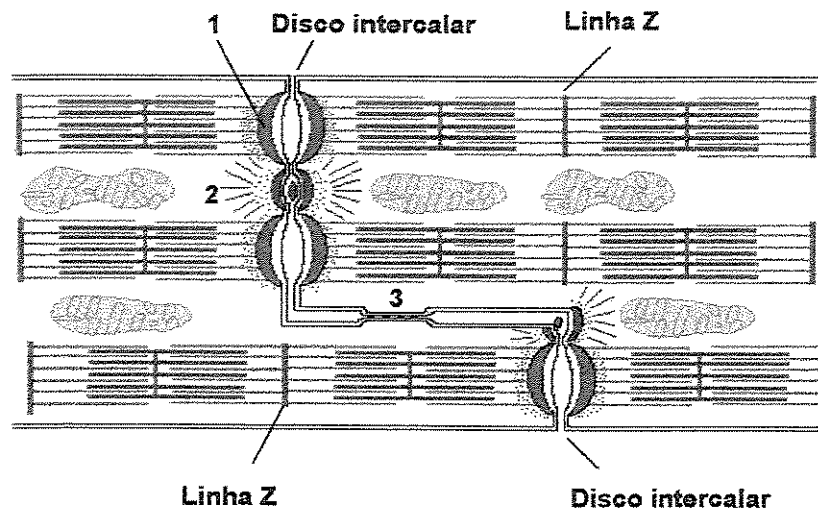


FIGURA 4: esquema ilustrativo do disco intercalar e das junções especializadas que o compõem: (1) a *fascia adherens*, que ancora os filamentos de actina de sarcômeros terminais; (2) o desmossomo, que une os cardiomiócitos adjacentes; (3) a junção comunicante, que permite a passagem de íons de uma cardiomiócito para outro, facilitando a propagação da despolarização da membrana, desencadeadora da contração. Modificado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995.

Os cardiomiócitos apresentam um sistema de túbulos T, que são invaginações da membrana, que envolvem o sarcômero ao nível das linhas Z e transmitem a despolarização do sarcolema às cisternas do retículo sarcoplasmático, propiciando a liberação de Ca^{++} e contração uniforme do cardiomiócito (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

1.2.3.2. O Citoesqueleto e a Mecanotransdução de Sinais

A idéia de que o citoesqueleto participa na mecanotransdução de sinais em cardiomiócitos emergiu principalmente de dados obtidos em estudos realizados com outros tipos celulares. Nestes, uma grande variedade de estudos destacou o papel desempenhado pelas integrinas na mecanotransdução de sinais, bem como por proteínas sinalizadoras, em especial as tirosinas quinases.

As integrinas são receptores heterodiméricos transmembrana, compostos de subunidades α e β (HYNES, 1987; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999), que se localizam nas adesões focais em vários tipos celulares, acoplando a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. O domínio extracelular da subunidade β é responsável pela ligação com elementos da matriz extracelular, enquanto que seu domínio citoplasmático se associa a proteínas estruturais do citoesqueleto, incluindo a talina, α -actinina e filamina (HORWITZ et al., 1986; OTEY et al., 1990, SHARMA et al., 1995), formando um elo de ligação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (BURRIDGE et al., 1988). Apesar de as integrinas terem sido consideradas por muito tempo apenas como moléculas adesivas, estudos desenvolvidos nos últimos 15 anos têm demonstrado que as integrinas são receptores capazes de transmitir sinais em ambas direções através da membrana celular (CLARK & BRUGGE, 1995; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; ROSS & BORG, 2001).

Dado que as integrinas não apresentam atividade enzimática, acredita-se que mudanças conformacionais sofridas por estas quando de sua agregação decorrente da ligação a elementos da matriz extracelular sejam transmitidas a proteínas sinalizadoras intracelulares associadas a estes sítios (revisado por GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). A FAK é tida como a principal proteína sinalizadora na mediação da sinalização celular via integrinas (GUAN et al., 1991; KORNBERG et al., 1992), embora também possa ser ativada por receptores tirosina quinases e por receptores acoplados a proteína G estimulados por fatores parácrinos como endotelina-1 e angiotensina II (EBLE et al., 2000; SALAZAR & ROZENGURT, 2001, TORSONI et al., 2003), constituindo assim um efector comum a múltiplas vias de sinalização.

A FAK é uma proteína tirosina quinase citoplasmática, cuja estrutura apresenta diversos domínios, permitindo que a mesma se associe a múltiplos substratos e determine a ativação de diversas vias de sinalização celulares (revisado por PETIT & THIERY, 2000). A estrutura da FAK é única dentre as famílias de proteínas tirosina quinases, sendo dividida em três domínios: o domínio N-terminal, o domínio quinase e o domínio C-terminal (FIGURA 5) (SCHALLER et al., 1992; HANKS et al., 1992). O domínio N-terminal da

FAK é composto em sua maior parte pelo domínio FERM (~300aa), o qual é homólogo ao domínio FERM encontrado na proteína banda 4.1, na família das quinases JAK e na família das proteínas ERM, que inclui a ezrina, radixin e moesina (GIRAULT et al., 1999). *In vitro*, o domínio N-terminal da FAK interage com a extremidade citoplasmática da subunidade da integrina beta (SCHALLER et al., 1995), porém ainda não há provas de que esta interação ocorra *in vivo*. Recentemente, o papel do domínio FERM tem sido vinculado a um mecanismo de autoinibição da FAK (COOPER et al., 2003).

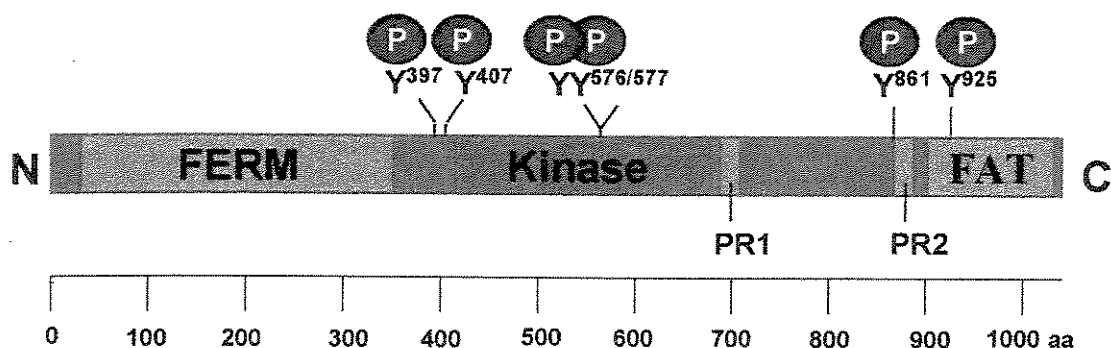


Figura 5: Esquema representativo da estrutura linear da FAK, mostrando seus domínios, sítios de fosforilação em tirosina e seqüências ricas em prolina (PR1 e PR2).

O domínio C-terminal da FAK apresenta uma seqüência de aproximadamente 100aa designada de FAT (do inglês, *Focal Adhesion Targeting*) sendo esta responsável por direcionar a FAK à adesão focal (HILDEBRAND et al., 1993; SHEN & SCHALLER, 1999) e pela associação com as proteínas paxilina (HILDEBRAND et al., 1995) e talina (CHEN et al., 1995). A sinalização via FAK requer que esta se torne fosforilada em seus resíduos de tirosina 397, 407, 576/7, 861 e 925. O resíduo de tirosina 397 é ativado por mecanismos intra e intermoleculares de autofosforilação (SCHALLER et al., 1994; TOUTANT et al., 2002; KATZ et al., 2002), embora também possa ser fosforilado pela Src (CALALB et al., 1995). A autofosforilação da FAK resulta na formação de um sítio de alta afinidade para domínios SH2 de tirosina quinases da família da Src (SCHALLER et al., 1994; XING et al., 1994) e leva ao recrutamento desta, resultando na formação do complexo FAK/Src. A interação da FAK com a Src propicia a liberação de mecanismos

autoinibitórios da Src, que então promove sua autofosforilação em seu resíduo de tirosina 418 (SCHALLER et al., 1999).

O resíduo 397 fosforilado constitui ainda um sítio de ligação a outras proteínas sinalizadoras, tais como a subunidade regulatória de 85KDa da PI3K (CHEN et al., 1996), a PLC- γ (ZHANG et al., 1999), a Shc (SCHLAEPFER et al., 1998) e a Nck (GOICOECHEA et al., 2002). A associação da FAK com a subunidade regulatória de 85KDa da PI3K aumenta a atividade desta, levando a produção dos fosfolipídios PI (3,4)P₂ e PI(3,4,5)P₃, os quais são capazes de interagir com a kinase Akt. Esta, por sua vez, desempenha importante papel na inibição da apoptose, por meio da fosforilação e regulação de componentes da maquinaria que controla a morte celular, incluindo a BAD e a caspase-9 (revisado por VIVANCO e SAWYERS, 2002). Neste contexto, a associação da FAK à PI3K constitui um modo pelo qual a sinalização via integrinas pode sinalizar positivamente a sobrevivência celular (HANKS et al., 2003).

A fosforilação dos demais resíduos de tirosina da FAK, 407, 576/7, 861 e 925 se dá por meio da atividade da Src (CALALB et al., 1995; CALALB et al., 1996; SCHLAEPFER & HUNTER, 1996). Os resíduos de tirosina 576 e 577 se encontram no interior do domínio quinase da FAK (FIGURA 5), e a fosforilação destes sítios está envolvida na regulação da atividade enzimática (CALALB et al., 1995; MAA & LIU, 1998; OWEN et al., 1999). Já a fosforilação da tirosina 925, localizada no domínio C-terminal da FAK, cria sítios de ligação para domínios SH2 de proteínas tal como a proteína adaptadora Grb2 (SCHLAEPFER et al., 1994). Esta, por sua vez, se associa com a SOS, determinando a ativação da via da Ras, que culmina com a ativação da ERK, reguladora do crescimento celular (CHARDIN et al., 1993; SCHLAEPFER et al., 1994; SCHLAEPFER et al., 1998).

A fosforilação das tirosinas 407 e 861, localizadas respectivamente nos domínios N e C terminais da FAK, tem papel pouco conhecido. Recentemente, estudos sugeriram que a fosforilação da tirosina 861 promoveria a ativação da FAK por estimular o mecanismo intramolecular de autofosforilação da tirosina 397 (LEU & MAA, 2002).

O complexo FAK/Src tem como principal substrato a proteína CAS (revisado por HANKS et al., 2003), a qual se associa, via domínios SH3, a domínios ricos em prolina presentes na extremidade C-terminal da FAK (HARTE et al., 1996; POLTE & HANKS, 1997). Uma vez fosforilada, a CAS se associa a Crk e propicia, por exemplo, a associação deste complexo com proteína a DOCK 180 que estimula a troca de GDP por GTP em Rac (HASEGAWA et al., 1996; KIYOKAWA et al., 1998). Esta, por sua vez, conduz a ativação da via de sinalização da JNK (BISHOP & HALL, 2000), que pode contribuir para os mecanismos que regulam a sobrevivência celular (ALMEIDA et al., 2000; CHO & KLEMKE, R. L. 2000).

Em cardiomiócitos, a primeira evidência em suporte a participação do citoesqueleto na mecanotransdução de sinais surgiu de um estudo desenvolvido por KUPPUSWAMY e colabores (1997), o qual demonstrou a fosforilação da quinase Src, simultânea a sua redistribuição da fração citosólica para a fração citoesquelética de extratos de ventrículos direitos de gatos, em decorrência da sobrecarga pressora induzida por meio da oclusão parcial da artéria pulmonar. Posteriormente, em estudo semelhante, LASER e colaboradores (2000) estenderam estes achados ao demonstrarem a presença das quinases FAK, Src e CAS, e das proteínas adaptadoras Nck e Shc na fração citoesquelética de extratos de ventrículos direitos de gatos submetidos à sobrecarga pressora por 48h.

Paralelamente, estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram a ativação de um complexo sinalizador multiprotéico, incluindo as quinases FAK e as proteínas Grb2, ERK, Akt e PI3K, em miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressora por meio do bandejamento da aorta (FRANCHINI et al, 2000; DOMINGOS et al., 2002). Com estes achados, este estudo apresentou fortes evidências de que a FAK, reguladora de processos celulares como crescimento e sobrevivência em outros tipos celulares (revisado por HANKS et al., 2003), pode também estar vinculada à regulação destes mesmos processos celulares em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico. Embora tal estudo não tenha demonstrado dados da participação do citoesqueleto nesta sinalização, presumia-se que a formação deste complexo sinalizador multiprotéico ocorria junto ao citoesqueleto, nos pontos em que se encontravam as integrinas, tal como postulado para outros tipos

celulares. Além disso, estudo recente desenvolvido em nosso laboratório demonstrou que a expressão de um dominante negativo da FAK (MT-FAK) induz a diminuição dos níveis de expressão do ANF, dado este indicativo de que a FAK esteja envolvida no controle da expressão de genes na hipertrofia (TORSONI et al., 2003).

Poucas são as evidências obtidas quanto à participação direta das integrinas na transdução de sinais relacionada ao desencadeamento da resposta hipertrófica em cardiomiócitos. Estudos demonstraram que a superexpressão das subunidades beta 1A e D da integrina acarretou no aumento dos níveis de expressão do ANF em cardiomiócitos neonatos tratados com felinefrina (ROSS et al, 1998; PHAM et al., 2000). Consistente com isto, o bloqueio da sinalização celular mediada por integrinas, alcançado pela superexpressão de domínios citoplasmáticos livres da beta integrina 1A, resultou na diminuição da expressão do ANF, inibindo a resposta hipertrófica induzida por estimulação adrenérgica (ROSS et al, 1998). Embora os dados obtidos nestes estudos sejam consistentes, os autores vinculam o papel das integrinas na resposta hipertrófica induzida pela estimulação adrenérgica, não havendo menção do papel destas quando da estimulação mecânica.

1.2.3.2.1. Costâmeros

Em cardiomiócitos, as integrinas estão localizadas nos costâmeros (TERRACIO et al, 1989; TERRACIO et al, 1991; IMANAKA-YOSHIDA *et al.*, 1999), os quais são análogos das adesões focais observadas em outros tipos celulares. Suporte para este paralelo é dado pela sua localização na interface célula-matriz e pela sua composição protéica que, além das integrinas, inclui também os componentes estruturais como a vinculina (PARDO et al, 1983a; PARDO et al, 1983b), a talina (BELKIN et al., 1986) e a α -actinina (revisado por BORG et al., 2000). Apesar de a similaridade, apenas recentemente os costâmeros passaram a ser considerados potenciais candidatos a mecanossensores e sítios de regulação de processos celulares em cardiomiócitos (BORG et al., 2000; ALENGHAT & INGBER, 2002; SUSSMAN et al., 2002; CLARK et al., 2002;

EPSTEIN & DAVIS, 2003; ERVASTI, 2003; PYLE & SOLARO, 2004), tal como o fazem as adesões focais em outros tipos celulares.

Curiosamente, a grande maioria dos estudos que demonstram a participação da sinalização mediada pelas integrinas e proteínas sinalizadoras em cardiomiócitos submetidos ao aumento de tensão não relaciona seus dados à estrutura do costâmero. Apenas recentemente, dois estudos realizados em nosso laboratório obtiveram dados sugestivos de que os costâmeros estariam vinculados a esta sinalização, ao demonstrarem evidências da localização da FAK junto a estes sítios. Primeiramente, o estudo desenvolvido por DOMINGOS e colaboradores (2002), com o emprego da imunoperoxidase em secções histológicas de corações submetidos à sobrecarga hemodinâmica em sistema de Langendorff, demonstrou que a FAK apresentava-se distribuída ao longo do sarcolema de cardiomiócitos de ratos adultos, distribuição esta similar àquela dos costâmeros. Dados similares foram obtidos por TORSONI e colaboradores (2003) que, em estudo com cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos ao estiramento, demonstraram por microscopia confocal a agregação da FAK junto aos miofilamentos, em um padrão que se assemelhava à distribuição dos costâmeros, sendo tal agregação concomitante a ativação desta quinase constatada na análise por *immunoblotting*. Contudo, a abordagem metodológica utilizada nestes estudos propiciou apenas dados sugestivos da localização da FAK junto aos costâmeros, sendo necessária abordagens adicionais para que se possa concluir sobre a participação dos costâmeros na mecanotransdução de sinais em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico.

A importância dos costâmeros vem sendo ainda destacada na função normal do músculo por meio de estudos que investigam as causas de uma variedade de distrofias (COHN & CAMPBELL, 2000; BLAKE et al., 2002) e cardiomiopatias (CHIEN, 2001). Estes estudos constataram que um grande número de proteínas estruturais componentes dos costâmeros causa doenças musculares quando mutadas ou ausentes. Um exemplo clássico disto é a distrofia de Duchene, na qual a proteína distrofina truncada (PORTER et al., 1992) resulta na desorganização costamérica e perda da integridade do sarcolema (COHN & CAMPBELL, 2000; BLAKE et al., 2002).

Similarmente, estudos desenvolvidos por MILNER e colaboradores (1996) demonstraram que camundongos desprovidos de filamentos de desmina, responsáveis por ancorar o aparato contrátil ao sarcolema, apresentam defeitos graves na arquitetura e ultraestrutura do músculo cardíaco, incluindo entre outras a perda do alinhamento lateral das miofibrilas e alterações na ancoragem das miofibrilas ao sarcolema. Com abordagem metodológica semelhante em estudo posterior, MILNER e colaboradores (1999) demonstraram que estes camundongos desenvolvem hipertrofia cardíaca com dilatação ventricular, comprometimento da função sistólica e, por fim, falência cardíaca. Além disso, outro estudo com camundongos desprovidos da proteína MLP (de *muscle related LIM protein*), envolvida na ancoragem das miofibrilas ao citoesqueleto sarcomérico, também apresentam alterações na arquitetura dos cardiomiócitos, conduzindo a cardiomiopatia dilatada (DCM) (ARBER et al., 1997).

Em conjunto, estes dados indicam que a integridade dos costâmeros é um requisito fundamental no desempenho de suas funções e, portanto, pode ser determinante na mecanotransdução de sinais em cardiomiócitos.

1.2.3.2.2. Linhas Z

Recentemente, estudo desenvolvido por KOVACIC-MILIVOJEVIC e colaboradores (2001) com análise em microscopia confocal sugeriu a localização da FAK, CAS, tensina e paxilina nas linhas Z em cardiomiócitos neonatos tratados com endotelina-1, sugerindo que estas estruturas representem importantes sítios da transdução de sinais em cardiomiócitos. No entanto, dado que neste estudo não foram realizadas duplas-marcações de cada proteína sinalizadora com actina e/ou MHC, usualmente utilizadas na demarcação das bandas dos sarcômeros, o padrão de estriação observado para a marcação da FAK, CAS, tensina e paxilina não necessariamente reflete o posicionamento das linhas Z em cardiomiócitos. No mais, dado que este estudo empregou o tratamento com endotelina na indução da resposta hipertrófica, os achados obtidos não permitem inferir quanto ao papel

das linhas Z na transdução de sinais na resposta hipertrófica induzida por estímulo mecânico.

Ainda que os dados quanto à localização destas proteínas sinalizadoras junto às linhas Z requeiram confirmação adicional, outras fontes estão a favor da hipótese de que as linhas Z desempenham papel na mecanotransdução de sinais em cardiomiócitos durante a resposta hipertrófica. Estudos mostram que as linhas Z sofrem alterações no formato da sua rede de componentes quando da interação entre a actina e miosina, sugerindo que tais estruturas constituam mecanosensores em cardiomiócitos (GOLDSTEIN *et al.*, 1988; GOLDSTEIN *et al.*, 1989). Além disso, as linhas Z são sítios agregadores de inúmeras moléculas sinalizadoras de vias de transdução de sinais, envolvidas em processos celulares variados (BORG *et al.*, 2000; CLARK *et al.*, 2002; PYLE & SOLARO, 2003). Foram identificadas nas linhas Z proteínas sinalizadoras tais como a PKC (revisado por PYLE & SOLARO, 2004), proteínas ancoradoras da quinase PKA (PAWSON & SCOTT, 1997), a fosfatase calcineurina (FREY *et al.*, 2000) e o fator de transcrição NF-AT3 (OLSON *et al.*, 2000). Em adição, uma variedade de proteínas associadas à linha Z apresenta uma dinâmica distribuição no cardiomiócito, podendo translocar das linhas Z para outros sítios subcelulares para transmitir sinais (revisado por Clark *et al.*, 2002). Como exemplo, recentes estudos sugerem que o fator de transcrição NF-AT3 se associa às linhas Z por meio da interação com a calcineurina (FIGURA 3), capaz de defosforilá-lo, ativando-o e permitindo que este se transloque para o núcleo, onde desempenha função como mediador da hipertrofia cardíaca (OLSON *et al.*, 2000).

Similarmente, a proteína MLP, também constituinte das linhas Z, tem sido implicada na comunicação com o núcleo, já que sua translocação para este compartimento foi observada durante a progressão da hipertrofia ventricular direita induzida por sobrecarga pressora crônica (ECARNOT-LAUBRIET *et al.*, 2000). Sua capacidade de interagir *in vitro* com o fator de transcrição MyoD sugere que possa desempenhar um papel na regulação da transcrição (KONG *et al.*, 1997). A translocação de componentes das linhas Z para o compartimento nuclear sugere que estas estruturas estejam envolvidas na comunicação existente entre o citosol e o núcleo, sendo consistente com a idéia de que as

mesmas possam desempenhar importante papel na mecanotransdução de sinais que levam ao desencadeamento da resposta hipertrófica.

A observação de que as linhas Z concentram uma grande quantidade de componentes de diversas vias de sinalização celulares sugerem que tais estruturas constituam centros organizadores, capazes de integrar uma variedade de sinais bioquímicos (GRANZIER & LABEIT, 2004; PYLE & SOLARO, 2004). Tais centros direcionariam a localização de proteínas próximas a seus substratos (PYLE & SOLARO, 2004), facilitando o seu papel como mecanosensor, e possibilitando responder às alterações de tensão no sarcolema (CLARK et al., 2002). Embora as especulações presentes na literatura favoreçam a idéia de que as linhas Z desempenhem um importante papel como mecanosensor, faltam dados concretos da participação destas estruturas na transdução de sinais induzida por estímulo mecânico.

1.2.3.2.1. Discos Intercalares

Os discos intercalares também são apontados como potenciais mecanotransdutores de sinais em cardiomiócitos (SUSSMAN et al., 2002), com base na idéia de que tais estruturas podem ser importantes na transmissão de forças entre os cardiomiócitos e a matriz. Consistente com esta hipótese, KOVACIC-MILIVOJEVIC e colaboradores (2001) demonstraram a localização da FAK junto aos discos intercalares de cardiomiócitos de ratos neonatos tratados com endotelina. Similarmente, estudos desenvolvidos por YI e colaboradores (2003) constataram a translocação desta quinase para os discos intercalares em cardiomiócitos de ratos espontaneamente hipertensos, sugerindo que tal translocação pode constituir uma etapa essencial na transdução de sinais mediada pelas integrinas em cardiomiócitos.

A importância das linhas Z e dos discos intercalares na transdução de sinais foi também sugerida por estudos que vincularam o desenvolvimento de cardiomiopatias e falência cardíaca a mutações em componentes da linha Z, a exemplo da titina (GERULL et al., 2002; WU et al., 2002; SATOH et al., 1999; KIMURA et al., 2001; HEIN e SCHAPER,

2002) e da MLP (ARBER et al., 1997) e componentes dos discos intercalares, como a vinculina (OLSON et al, 2002). Tais estudos postulam que cardiomiopatias poderiam não só se originar de alterações na integridade das estruturas celulares, mas também do comprometimento da sinalização intracelular normal, determinado pela ausência ou não funcionalidade de certas proteínas, devido a mutação ou total ablação de seus genes (PYLE & SOLARO, 2004; SUSSMAN et al., 2002).

Os dados presentes na literatura sustentam a multiplicidade de mecanismos pelos quais o estímulo hipertrófico pode ser transduzido em sinais bioquímicos que, por fim, determinam a resposta hipertrófica em cardiomiócitos. Em adição, crescem as evidências da importância da sinalização da FAK e seus efetores, bem como da participação do citoesqueleto na transdução de sinais vinculada à resposta hipertrófica em cardiomiócitos. No entanto, boa parte dos estudos sustenta seus achados em modelos experimentais distintos e nem sempre comparáveis, a exemplo daqueles que utilizam a cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos, na qual se emprega o tratamento com peptídeos vasoativos na indução da resposta hipertrófica. Tais estudos propiciam dados quanto transdução de sinais no modelo de estimulação adrenérgica, porém pouco nos dizem quanto aos mecanismos de mecanotransdução de sinais em cardiomiócitos adultos submetidos ao aumento de tensão. Além disso, muitos destes estudos trazem dados pouco conclusivos, que requerem confirmação adicional. Assim sendo, o presente estudo pretendeu avaliar os eventos da sinalização da FAK que resultam no desencadeamento da resposta hipertrófica, bem como descrever minuciosamente a localização da FAK em cardiomiócitos de ratos adultos submetidos à sobrecarga hemodinâmica. Por meio de informações quanto à ativação e localização da FAK, o presente estudo se propõe a inferir sobre os mecanismos de ativação desta quinase, especialmente quanto a participação do citoesqueleto em cardiomiócitos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Estudar a expressão e ativação da quinase de adesão focal (FAK) e de efetores *downstream* em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga hemodinâmica aguda;
2. Determinar a localização ultraestrutural *in situ* da FAK em cardiomiócitos de miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga hemodinâmica aguda;
3. Investigar a interação da FAK com outras proteínas presentes nos cardiomiócitos;
4. Inferir quantos aos mecanismos de ativação da FAK em cardiomiócitos submetidos ao aumento de tensão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 150g a 200g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB).

3.2. Materiais

3.2.1. Anticorpos

Anticorpos policlonais para porção N-terminal da FAK (sc-557), porção C-terminal da FAK, Src (sc-18), JNK (sc-474), ERK 1/2 (sc-153) e monoclonais para fosfo-JNK (sc-6254) e fosfo-ERK (sc-7383) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Anticorpos policlonais para FAK tyr-397, FAK tyr-407, FAK tyr-576/7, FAK tyr-861, FAK tyr-925, Src tyr-418 foram obtidos da Biosource (EMD Biosciences, Darmstadt, Alemanha). Anticorpos contra imunoglobulina G de camundongos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Anticorpos contra imunoglobulina G de coelhos conjugados à partículas de ouro 10nm foram adquiridos da Electron Microscopy Science (Washington, PA, EUA).

3.2.2. Reagentes e sais

- *Calbiochem (Darmstadt, Alemanha)*

Fosfato de sódio, fosfato monobásico de sódio, ditioneitol, ortovanadato de sódio.

- *Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).*

Albumina bovina, aprotinina, acrilamida, bis-acrilamida, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e paraformaldeído.

- *Merck S/A (Ind. Quim., RJ, Brasil)*

Dodecil sulfato de sódio (SDS), fluoreto de sódio, pirofosfato de sódio, triton X-100, tween-20, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de sódio, cloreto de potássio.

- *Labsynth Produtos para Laboratório (Diadema, SP, Brasil)*

Sacarose, glicerol, ácido clorídrico, álcool etílico.

- *Electron Microscopy Sciences (Washington, PA, EUA)*

Glutaraldeído, Epon 812, acetato de uranila, citrato de chumbo.

- *Amersham (Piscataway, NJ, EUA)*

[¹²⁵I] Proteína-A-sepharose

3.3. Métodos

As abordagens metodológicas empregadas no presente estudo estão esquematizadas em fluxograma (FIGURA 6).

3.3.1. Preparação experimental

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico (50mg/Kg), colocados em mesa cirúrgica com temperatura controlada a 38°C, submetidos a intubação orotraqueal e mantidos em ventilação espontânea em ar ambiente enriquecido com oxigênio. Em seguida, foram submetidos à monitorização das pressões arteriais por meio da inserção de cateteres de polietileno (PE50 – Clay Adams, Parsipany, EUA) nas artérias carótida comum direita e femoral direita, os quais estavam acoplados a transdutores de pressão COBE (Arvada, CO, EUA).

O sinal da pressão arterial captado pelo transdutor foi amplificado por um amplificador GP4A Stemtech (Stemtech, Milwaukee, WI, USA), conectado a um conversor analógico-digital que, por sua vez, se conectava a um computador carregado com programa WINDAQ-PRO (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA). Os sinais foram gerados a uma frequência de amostragem de 100Hz e gravados em canais individuais, obtendo-se a monitorização hemodinâmica contínua das artérias carótida comum direita e da artéria femoral direita (FIGURA 7).

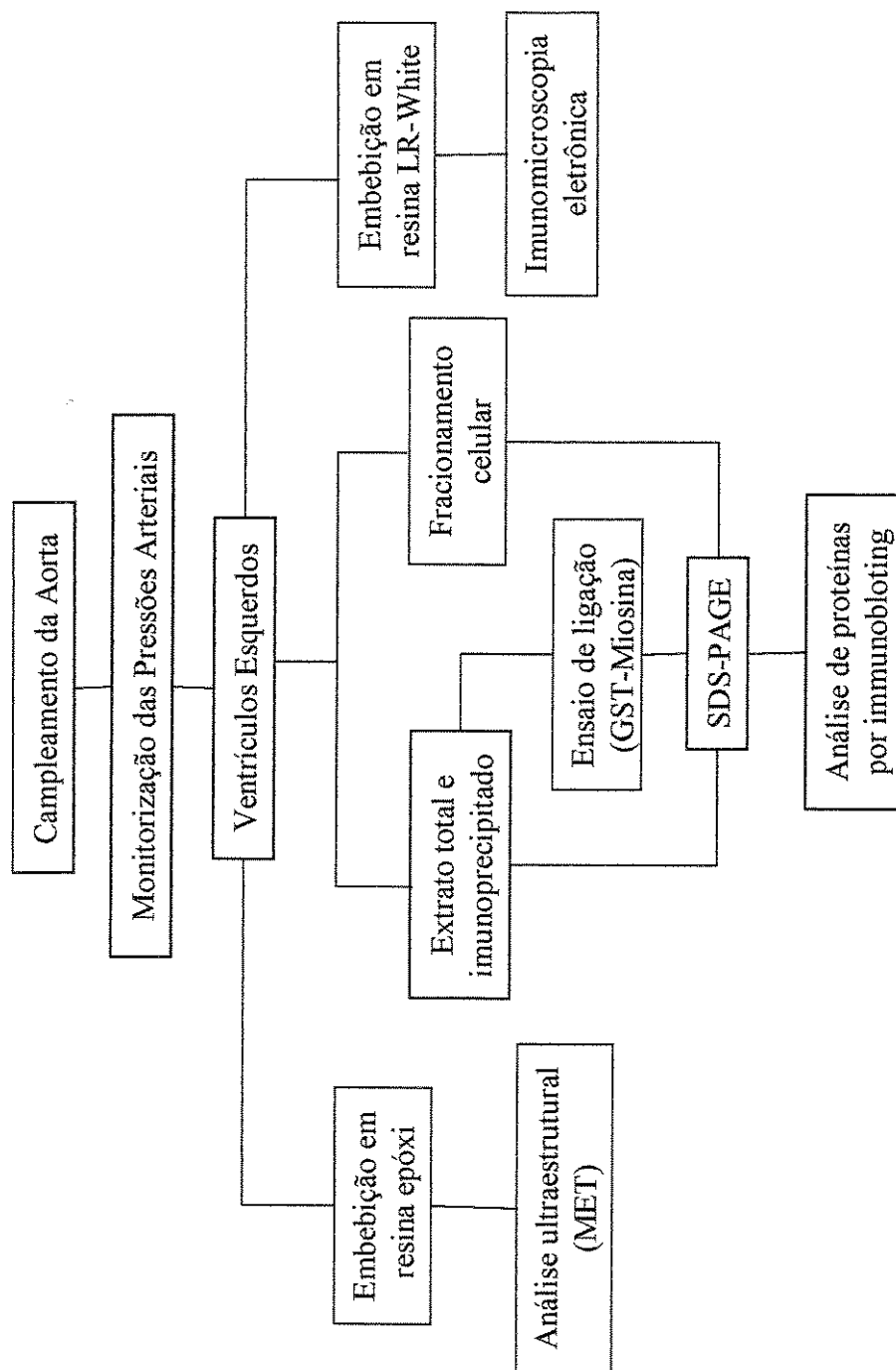


Figura 6 - O fluxograma esquematiza as abordagens metodológicas empregadas no presente estudo.

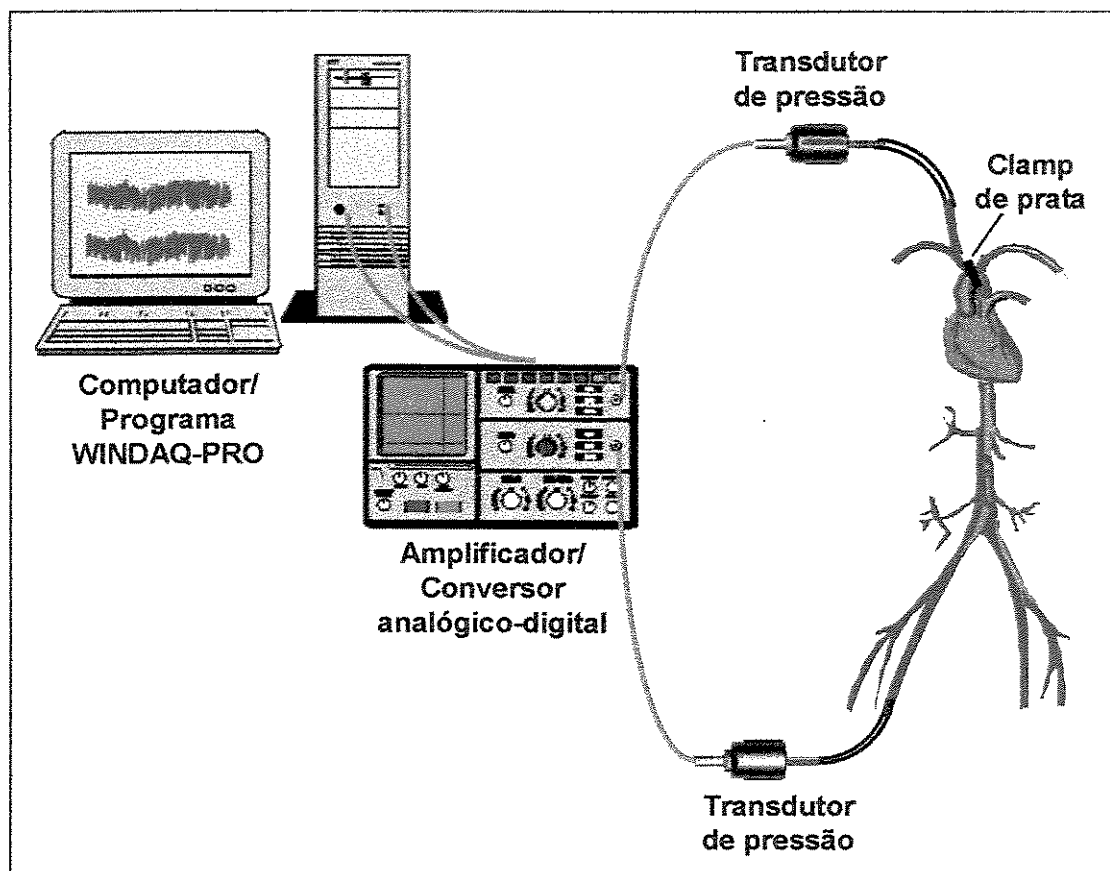


FIGURA 7 - Representação esquemática do modelo utilizado nos experimentos *in vivo*.

3.3.2. Modelo de Sobrecarga Pressora

Posterior a monitorização das pressões arteriais, os animais tiveram a cavidade torácica aberta no segundo espaço intercostal esquerdo para a colocação de um clamp de prata (diâmetro interno de 50 μm) na croça da aorta após a saída do tronco braquiocefálico e antes da saída da carótida comum esquerda, causando diminuição do diâmetro arterial, aumento na resistência ao fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, impondo sobrecarga de trabalho ao coração. Imediatamente após a colocação do clamp de prata, os animais tiveram suas cavidades torácicas fechadas.

Foram estudados os ratos submetidos à coarctação aguda por períodos de três, dez, trinta e sessenta minutos. Os animais submetidos à constrição da aorta foram mantidos anestesiados até o momento da coleta do coração. Tais animais tiveram suas pressões

arteriais periodicamente monitoradas, de modo a garantir a manutenção do coração em condição de sobrecarga pressora durante todo o período da preparação experimental.

Uma vez registradas as pressões arteriais pós-constricção da aorta, os animais foram sacrificados com injeção de solução de KCl 1M, via cânula introduzida na veia jugular. Animais controles, submetidos à cirurgia fictícia, sem a colocação do clamp na aorta, foram hemodinamicamente monitorados e sacrificados tal como os animais submetidos à constricção aguda da aorta.

A análise dos dados obtidos na monitorização hemodinâmica foi realizada nos programas Windaq e Excel, resultando nos valores de pressão sistólica na aorta ascendente (PSC), pressão diastólica na aorta ascendente (PDC), pressão média na aorta ascendente (PAMC) e frequência cardíaca (FC), permitindo assim a exata determinação da sobrecarga hemodinâmica imposta.

Como animais controles ideais ao estudo, foram considerados aqueles cujas pressões arteriais sistólica e diastólica apresentavam valores próximos a 130 e 90 mmHg, respectivamente. Foram considerados adequados ao estudo da sobrecarga pressora os animais que apresentavam um aumento de ao menos 30mmHg ao valor basal da pressão sistólica da aorta ascendente, sem que houvesse diminuição significativa nos níveis pressóricos da aorta abdominal.

3.3.3. Coleta e Homogeneização de Miocárdio

Nos diversos experimentos em que a expressão, fosforilação e associação de proteínas foi o objeto de estudo, os ventrículos esquerdos foram coletados ao final dos períodos de constricção da aorta, cortados em fragmentos menores e homogeneizados rapidamente em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização (1% Triton-X 100, 100 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4], 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2 mmol/L 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 o ensaio. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BRADFORD e colaboradores (1976) utilizando-se reagentes BIO-RAD e solução de albumina bovina como padrão. O sobrenadante desses tecidos foi utilizado tanto como extrato total, para análise da expressão e fosforilação de proteínas, como para a imunoprecipitação, a fim de avaliar a associação entre as proteínas.

A imunoprecipitação foi realizada com 10µg de anticorpos primários adicionados a extratos ventriculares contendo 5mg de proteínas, durante 12 horas, sob agitação, a 4° C. Em seguida, os extratos foram incubados com 50µl Protein A Sepharose 6 MB, por 2 horas, a 4° C e então centrifugados a 11000rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi submetido à lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem para imunoprecipitado (Tris-HCl 100mM, pH 7,4, EDTA 1mM, Triton X-100 0,5%, ortovanadato de sódio 2mM).

3.3.4. Análise de Proteína por *immunoblotting*

Os extratos totais e as proteínas precipitadas foram tratados com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotreitol 100mM, aquecidos em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Após este procedimento, ambos foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8%, 10% e 12%, em aparelho de eletroforese miniaturado da Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca, EUA), a 35 miliampères em corrente constante. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 min a 120 V (constante) em aparelho miniaturado da Bio-Rad.

Em seguida, as membranas foram incubadas em solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20), acrescida de 5% leite em pó magro, por 1 hora a temperatura ambiente, de modo a reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos primários às proteínas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com 10µg de anticorpos

primários específicos, diluídos em solução basal, contendo 3% de leite em pó magro, por 12 horas à 4°C. Após lavagem por 30 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas com 2 µCi de [¹²⁵I]proteína A (30 µCi/µg) em 10 ml de solução basal, contendo 1% de leite em pó magro, por 2 horas em temperatura ambiente e então lavadas novamente como descrito anteriormente. A [¹²⁵I]Protein A ligada aos anticorpos específicos foi detectada por auto-radigrafias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA), com intensificadores Cronex Lightning Plus (Du Pont, Wilmington, DE, EUA) a -80°C por 48-72 horas. Em se tratando de anticorpos primários monoclonais, as membranas foram lavadas conforme descrito acima e fez-se a incubação com anticorpos anti-imunoglobulina de camundongos obtidos em coelho, seguida por nova lavagem e incubação com [¹²⁵I]Proteína A.

3.3.5. Procedimento para Análise Morfológica em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após registro das pressões arteriais, os animais foram sacrificados em diversos tempos pós-constrição da aorta ascendente (3, 10, 30 e 60 minutos) com injeção de solução de KCl 1M, via cânula introduzida na jugular. Animais controles, ou seja, sem a campeamento da aorta foram monitorados e sacrificados tais como os animais submetidos a cirurgia.

Visando a análise ultraestrutural dos miocárdios submetidos à sobrecarga pressora acima, ventrículos esquerdos foram coletados nas condições acima relatadas, cortados em fragmentos menores de aproximadamente 2mm em uma placa de petri contendo solução fisiológica e, imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 3% em tampão-fosfato de sódio 0,1M, pH 7.4. Após aproximadamente 12 horas em solução fixadora, as amostras de ventrículos esquerdos foram processadas para a embebição em resina epóxi Epon 812 (Electron Microscopy Science, Washington, PA, EUA), de acordo com as seguintes etapas:

- Lavagem em tampão-fosfato-salina (PBS) 0,05M, pH 7,4, durante 15min;
- Pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1%, em tampão-fosfato de sódio 0,1M,

pH 7.4, durante 2 horas, a 4°C;

- Lavagem em salina glicosada (sacarose 7,3% e NaCl 0,6% em água destilada), durante 20min;
- Contrastação com solução de acetato de uranila 0,5% e sacarose 13,3% (em água destilada) durante aproximadamente 4 horas;
- Lavagem em salina glicosada (sacarose 7,3% e NaCl 0,6% em água destilada), durante 20min;
- Desidratação em gradiente crescente de acetona (30, 50, 70, 80, 95 e 100%) durante 15min cada;
- Embebição em mistura de acetona e resina epóxi nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 durante 1 hora em cada e embebição em resina pura durante 12 horas;
- Embebição final em moldes de silicone
- Polimerização a 60° C durante 72 horas.

Secções semifinas, de 500nm de espessura, foram obtidas no ultramicrotomo (Leica, modelo Ultracut UCT) e coradas com Azul de Toluidina a 0,5% para análise prévia em microscópio de luz. Posteriormente, secções ultrafinas de 70nm foram obtidas no ultramicrotomo, com navalha de diamante, sendo coletadas em telas de cobre e contrastadas em acetato de uranila a 2%, por 15 minutos, e em citrato de chumbo a 0,5%, por 5 minutos. As secções foram então analisadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO Schott Zeiss EM 906. Fotomicrografias foram obtidas em chapas de filmes (Kodak Electron Microscope Film), os quais foram ampliados em papel fotográfico Kodak (Kodak Professional).

3.3.6. Procedimento para imunolocalização de proteínas em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

3.3.6.1. Processamento para embebição em LR-White

Uma vez registradas as pressões arteriais, os animais foram sacrificados em diversos tempos pós-constricção da aorta ascendente (3, 10, 30 e 60 minutos) com injeção de solução

de KCl 1M, via cânula introduzida na jugular. Animais controles, ou seja, sem a bandagem da aorta foram monitorados e sacrificados tais como os animais submetidos à cirurgia.

Após a remoção do coração, os ventrículos esquerdos foram cortados em fragmentos menores (2mm de espessura) em uma placa de petri contendo solução fisiológica, e imediatamente imersos em solução fixadora de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,1% em tampão fosfato de sódio salina 0,1M, de pH 7,4, na qual permaneceram por 1 hora, a 4° C. Posterior à fixação, as amostras de ventrículos esquerdos foram processadas para inclusão em resina LR-White, conforme as etapas que se seguem:

- Lavagem em tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, por 45 minutos, a 4° C;
- Tratamento em solução de glicina 0,1M, durante 1 hora, a 4° C.
- Lavagem em tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, por 45 minutos;
- Desidratação em gradiente crescente de N-N dimetilformamida 50, 70, 80, 90 e 100%, durante 30 minutos cada, a 4° C;
- Embebição em mistura de N-N dimetilformamida e resina LR-White, nas proporções de 1:1, 1:2 e resina pura, durante 1 hora cada, a – 20° C;
- Embebição em resina pura durante 12 horas a – 20° C;
- Inclusão realizada em cápsulas *beem* de fundo chato (Electron Microscopy Science, Washington, PA, EUA)
- Polimerização induzida com luz ultravioleta (15 Watts) a – 20° C, por 72 a 96 horas.

Secções semifinas de aproximadamente 500nm foram obtidas em ultramicrotomo (Leica, modelo Ultracut UCT) e coradas em solução de Azul de toluidina 0,5%, por 1 minuto. Uma vez definida a área de interesse, secções ultrafinas de 70-100nm de espessura foram obtidas no ultramicrotomo, com navalha de diamante, e coletados em telas de níquel.

3.3.6.2. *Imunomicroscopia eletrônica*

Secções ultrafinas de LR-White, coletadas em telas de níquel foram lavadas em PBS 0,1M, pH 7,4, e tratadas com solução de BSA 3%/ PBS 0,1M, pH 7,4, durante 1 hora, a

temperatura ambiente, para bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpos primários contra as porções amino- e carboxi-terminais da FAK, diluídos em BSA 1%/ PBS 0,1M, pH 8,2, na proporção de 1:50, durante 12 horas, em câmara úmida, a 4° C. Após este período, as secções foram lavadas em PBS 0,05M, pH 7,4, por 30 minutos e incubadas com o anticorpo secundário anti IgG de coelho, conjugado com ouro 10nm, diluído em BSA 1%/PBS 0,1M, pH 8,2, na proporção de 1:20, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Após nova lavagem em PBS 0,1M, pH 7,4, as secções foram lavadas em água ultrapura (Milli-Q) e secadas a temperatura ambiente. A contrastação das secções foi realizada em acetato de uranila 2% durante 2 minutos e em citrato de chumbo a 0,5%, por 10 segundos. As observações das secções foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO Schott Zeiss EM 906. Fotomicrografias foram obtidas em chapas de filmes Kodak (Kodak Electron Microscope Film), as quais foram ampliados em papel fotográfico Kodak (Kodak Professional)

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo em que as secções ultrafinas do ventrículo esquerdo foram submetidas às mesmas etapas, porém com omissão do anticorpo primário, permitindo discriminar ligações inespecíficas do anticorpo secundário ao tecido.

3.3.7. Ensaio de ligação entre proteínas

Paralelamente ao presente estudo, experimentos desenvolvidos em nosso laboratório (dados ainda não publicados) tiveram sucesso no emprego da metodologia de duplo híbrido em leveduras na determinação de proteínas candidatas à associação com a FAK. Utilizando-se uma sequência codificadora do domínio N-terminal e parte do domínio quinase da FAK como vetor isca, fez-se um *screening* de uma biblioteca de cDNAs, obtidos de miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora por um período de 6 horas. Como resultado do emprego desta metodologia, a proteína que demonstrou ser capaz de interagir com a sequência da FAK apresentou alta homologia com uma sequência da cadeia pesada da miosina cardíaca alfa (*alpha cardiac myosin heavy chain*), presente na porção C-terminal (cauda) desta proteína. Visando confirmar a interação entre a FAK e a miosina no presente estudo, utilizamos o ensaio de ligação *in vitro* com GST-miosina-beads.

3.3.7.1. Obtenção da proteína híbrida GST-miosina acoplada a beads de glutationa

Para a obtenção da proteína híbrida GST-miosina acoplada a beads de glutathione, o fragmento de cDNA de miosina encontrado no duplo-híbrido foi amplificado por PCR, inserido no vetor pGEX5X-2, que contém sequência codificadora para GST, e utilizado na transformação de células competentes de *E.coli*. Como controle, células competentes foram transformadas com vetor pGEX5X-2 contendo apenas a sequência codificadora para GST.

Em seguida, ambas populações de bactérias foram crescidas separadamente e induziu-se a expressão da GST e GST-miosina por 4 horas, a 30°C, em meio de cultura adicionado de 0.3 mM IPTG. As bactérias foram lisadas em três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, obtendo-se extratos bacterianos que foram incubados com *beads* de glutathione, por 3 horas a 4°C, para conjugação destes com as proteínas GST e GST-miosina. Posteriormente, fez-se a lavagem dos *beads* com tampão de lavagem HNET (25 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% TritonX-100, 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2 mmol/L PMSF, e 0.1 mg de aprotinina/ml), sob centrifugação 5000 rpm, sendo posteriormente estocados a -20°C até momento do uso em solução HNE (HNET sem a adição de TritonX-100) acrescida de 50% de glicerol. Amostras dos *beads* foram tratadas com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100mM, fervidas por 5 minutos, e resolvidas em gel de SDS-poliacrilamida a 12% para se estimar os conteúdos de GST e GST-miosina por volume de *beads*, com base na concentração do marcador de peso molecular (FIGURA 8).

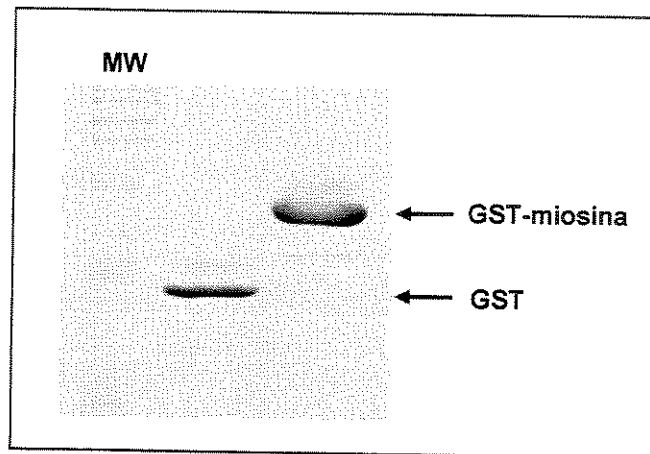


FIGURA 8 - gel de SDS-poliacrilamida (12%) corado com Coumassie mostrando as bandas das proteínas GST (26KDa) e GST-miosina (48KDa) utilizadas nos ensaios de ligação. Os conteúdos de GST e GST-miosina por volume de *beads* foram estimados com base na concentração do marcador de peso molecular.

3.3.7.2. Ensaio de ligação com GST-miosina-beads

Realizou-se o ensaio de ligação com a proteína híbrida GST-miosina (FIGURA 9), incubando-se 10ug de GST-miosina conjugados aos *beads* de glutationa com 5mg de proteínas em extratos totais de miocárdio controle e submetidos à sobrecarga pressora por períodos de dez e sessenta minutos, obtidos conforme descrito no item 3.3.3. Para controle das ligações inespecíficas de proteínas a proteína GST, 5mg de proteínas em extratos totais de miocárdio foram incubados com *beads* de glutationa conjugados a 10ug de GST. A incubação foi realizada por 12 horas, a 4°C, sendo seguida pela lavagem dos *beads* associados a proteínas do extrato em tampão de lavagem (Tris-HCl 100mM, pH 7,4, EDTA 1mM, ortovanadato de sódio 2mM) por meio de centrifugações sucessivas a 5000 rpm, a 4°C.

Após lavagem, os precipitados de GST e GST-miosina foram tratados com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotreitol 100mM, fervidos por 5 minutos, e as amostras foram resolvidas em gel de SDS-poliacrilamida a 8%. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi submetida a análise por *immunoblotting* (item 3.3.4),

com anticorpos específicos anti-FAK (N-terminal) e anti FAK fosforilada em seu resíduo de tirosina 397 (FAK tyr-397).

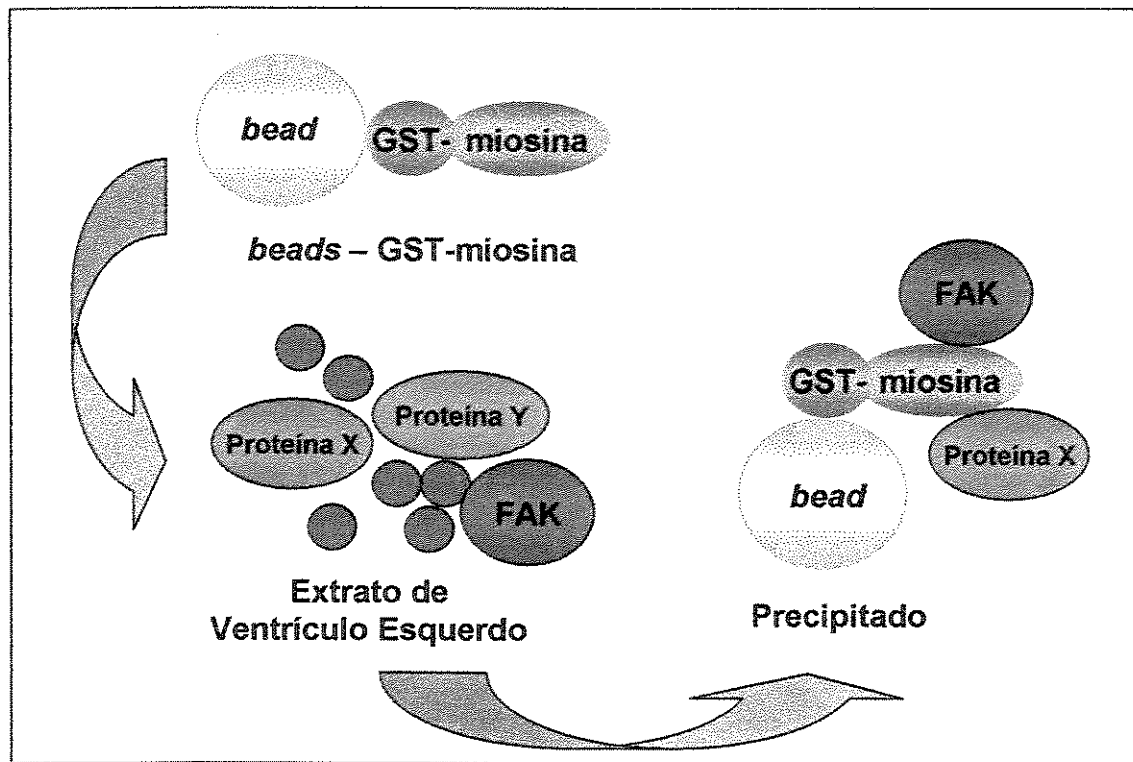


FIGURA 9 - esquema ilustrativo do ensaio de ligação com a proteína quimérica GST-miosina. Os extratos de ventrículo esquerdo foram incubados com beads-GST-miosina, centrifugados e lavados para obtenção dos precipitados contendo as proteínas associadas a miosina, as quais foram resolvidas em gel de SDS-poliacrilamida e submetidas a análise por *immunoblotting*.

3.3.8. Fracionamento celular

O fracionamento celular dos homogenatos cardíacos foi realizado com base em protocolo previamente descrito (MIZUKAMI et al., 1997). Ao final de cada período de constrição da aorta, os ventrículos esquerdos foram homogeneizados imediatamente em 5 volumes de tampão de solubilização (sacarose 0,32M, Tris-HCl, pH 7,4, 10mM, EDTA 2mM, ditiotreitól 1mM, pirofosfato de sódio 50mM, fluoreto de sódio 50mM, ortovanadato de sódio 1mM, PMSF 2mM e 0,1mg/mL de aprotinina) a 4°C usando o Polytron operado a média velocidade por 30 segundos. Os homogenatos foram centrifugados a 1000g por 10

minutos a 4°C para a obtenção de precipitados contendo a fração nuclear. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000g por 60 minutos a 4°C para a obtenção da fração citosólica. O precipitado contendo a fração nuclear foi solubilizado em tampão Triton (Triton X-100 1%, cloreto de sódio 150mM, Tris-HCl, pH 7,4, 10mM, EDTA 1mM, pirofosfato de sódio 50mM, fluoreto de sódio 50mM, ortovanadato de sódio 1mM, PMSF 2mM e 0,1mg/mL de aprotinina) por 30 minutos, sob agitação constante. A suspensão foi centrifugada a 15000g por 30 minutos a 4°C e o extrato nuclear foi obtido do sobrenadante. As frações citosólica e nuclear foram analisadas para quantificação de proteína (BRADFORD et al., 1976) e as proteínas desnaturadas após adição de tampão de Laemmli, seguida de aquecimento por 5 minutos a 100°C.

As proteínas das frações nucleares e citosólicas foram resolvidas em gel de SDS-poliacrilamida, transferidas para as membranas de celulose e submetidas a análise por *immunoblotting* com anticorpos contra as porções amino- e carboxi-terminais da FAK, conforme descrito no item 3.3.4.

4. RESULTADOS

4. 1. Análise Hemodinâmica

O estudo da ativação e distribuição da FAK em miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga hemodinâmica requer que os animais sejam adequadamente preparados para a condição experimental por meio de anestesia e constrição da aorta controladas. A sobrecarga pressora foi induzida por meio da constrição da aorta ascendente com a colocação de um clamp de prata. A aferição e monitorização das pressões arteriais foi realizada através de cateteres inseridos nas artérias carótida e femoral direitas. A realização de medidas da pressão arterial no sistema arterial montante e jusante a oclusão permitiu a seleção de animais que apresentavam um aumento significativo na pressão sistólica arterial (superior a 30 e inferior a 50mmHg), sem reduções significativas nos níveis pressóricos da aorta abdominal. Estes animais foram considerados ideais ao estudo nas condições de sobrecarga hemodinâmica (FIGURA 10). Similarmente, animais submetidos à cirurgia fictícia, sem a colocação do clamp de prata, tiveram suas pressões arteriais aferidas e monitoradas, tendo sido, considerados ideais como controle do estudo apenas aqueles que apresentavam níveis fisiológicos de pressões arteriais sistólica e diastólica (valores próximos a 130 e 90 mmHg).

Conforme demonstrado na FIGURA 11A, a constrição aguda da aorta por períodos de três, dez, trinta e sessenta minutos, produziu um aumento de aproximadamente 40 mmHg na pressão arterial sistólica aferida na aorta ascendente. Em contrapartida, os níveis pressóricos na aorta abdominal de animais submetidos à sobrecarga hemodinâmica não apresentaram alterações significativas quando comparados aos dos animais controle (FIGURA 11B).

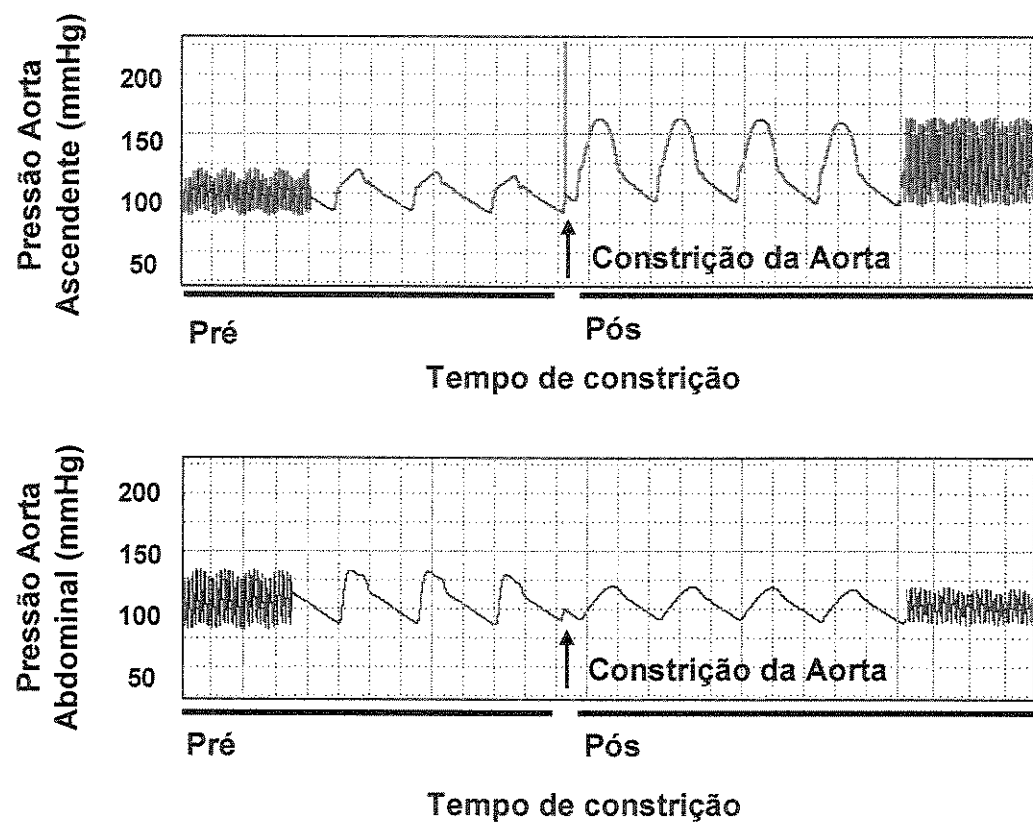


FIGURA 10: Exemplos de registros de pressão arterial obtidos em experimento de constrição da aorta.

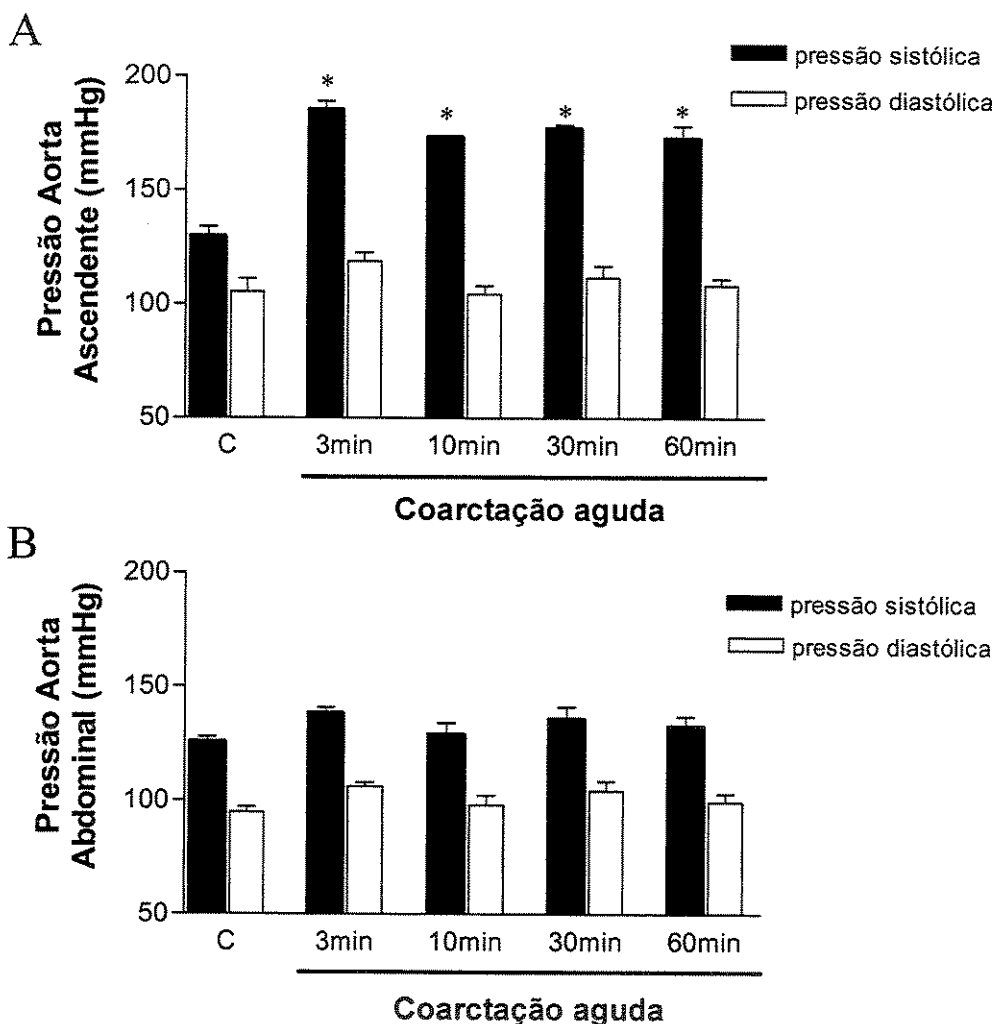


FIGURA 11: Pressão arterial aferida na aorta ascendente (A) e abdominal (B) durante o período experimental (n=10). *p<0,05.

4.2. Análise Morfológica ultraestrutural de miocárdios submetidos à sobrecarga pressora aguda

Amostras de miocárdio de ventrículos esquerdos de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda, por períodos de três, dez, trinta e sessenta minutos, apresentando aumento na pressão arterial sistólica superior a 30mmHg e inferior a 50mmHg foram adequadamente coletados, fixados e processados para embebição e

inclusão em resina epóxi. Cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre, contrastados e analisados em microscópio eletrônico de transmissão.

A observação ao microscópio eletrônico de transmissão das secções ultrafinas do miocárdio, submetido ou não à sobrecarga pressora, mostrou que o protocolo experimental empregado para processamento do material em resina epóxi propiciou uma boa preservação da histoarquitetura do miocárdio da parede ventricular, permitindo a análise das características ultraestruturais apresentadas pelos cardiomiócitos e matriz extracelular, além de outros tipos celulares presentes na parede ventricular.

Miocárdios submetidos à sobrecarga pressora aguda, independentemente da duração do estímulo pressor (3, 10, 30 e 60 minutos), não apresentaram diferenças ultraestruturais significativas em seus cardiomiócitos ou na matriz extracelular quando comparados a miocárdios controle, não submetidos ao estímulo mecânico. Em planos de cortes longitudinais (FIGURA 12A), os cardiomiócitos se apresentam como células cilíndricas e alongadas, com 1 a 2 núcleos centrais, e com o citoplasma repleto de miofibrilas e mitocôndrias. As miofibrilas estão distribuídas em paralelo ao maior eixo da célula (FIGURA 12B), sendo cada uma delas constituída pela repetição em série das unidades motoras contráteis do músculo cardíaco, os sarcômeros (FIGURA 12C). Estes, por sua vez, são formados por miofilamentos espessos de miosina e miofilamentos delgados de actina, estando estes últimos ancorados à linha Z. Lateralmente as miofibrilas, estão dispostas as mitocôndrias (FIGURA 12B), que se apresentam em grande quantidade, bem como na região perinuclear do cardiomiócito (FIGURA 12A).

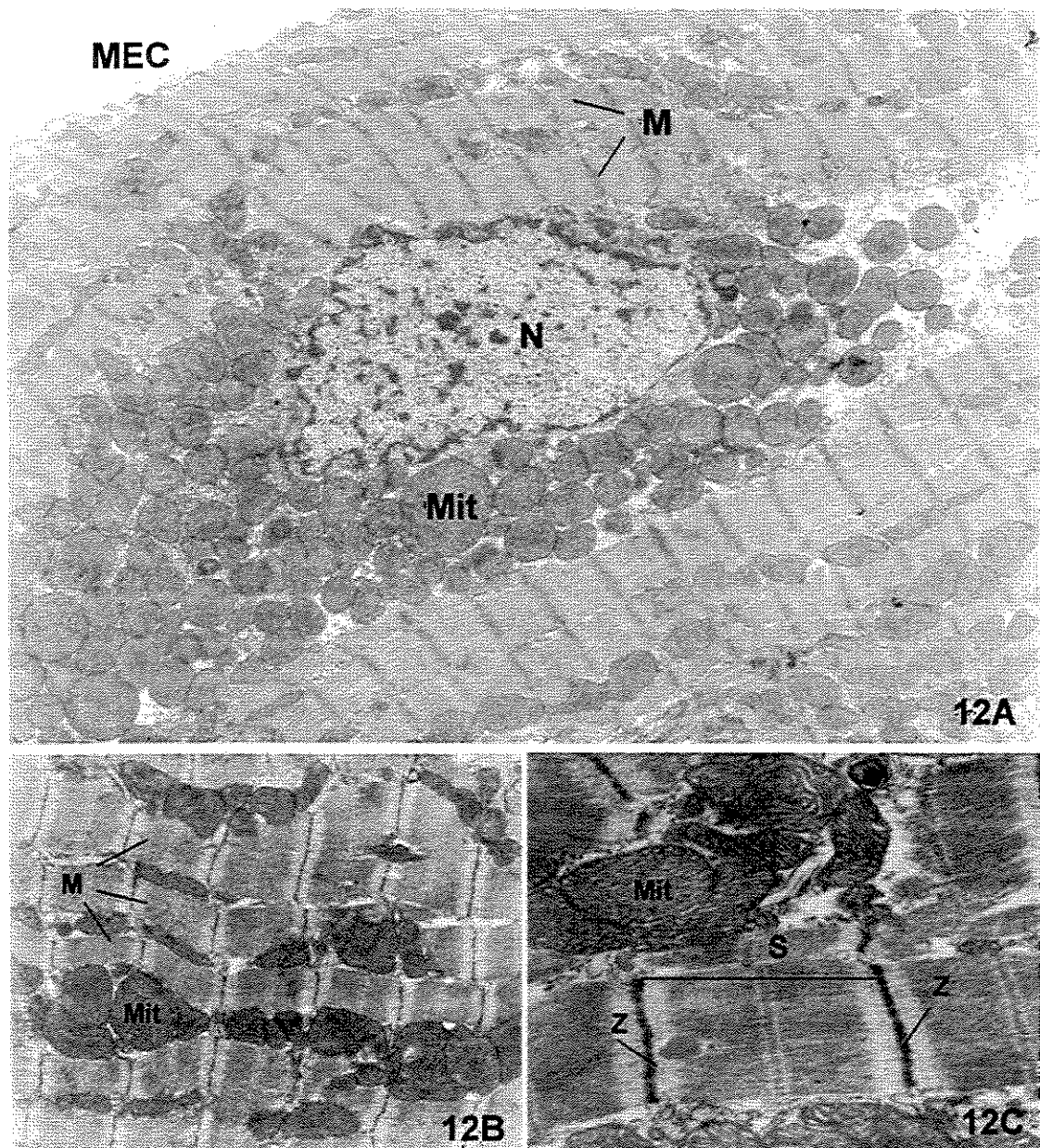


FIGURA 12: fotomicrografias eletrônicas de secções ultrafinas de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por 3 min. A - estrutura típica de um cardiomiócito em corte longitudinal. N: núcleo; M: miofibrilas; Mit: mitocôndrias; MEC: matriz extracelular (7.730x); B - Miofibrilas (M) arranjadas em paralelo e mitocôndrias (Mit) distribuídas lateralmente as miofibrilas (6.120x). C – detalhe do sarcômero, delimitado pelas linhas Z (Z) e mitocôndrias (Mit) (23.380x).

Os cardiomiócitos apresentam estruturas denominadas de costâmeros, que constituem os pontos em que o sarcolema se ancora as miofibrilas periféricas, o que ocorre em coincidência com as linhas Z (FIGURA 13). Foram ainda observados os discos intercalares (FIGURA 14), que são complexos juncionais localizados na interface de cardiomiócitos adjacentes, bem como o sistema de túbulos T, o qual constitui-se de invaginações do sarcolema que envolvem as miofibrilas. Ao nível da linha Z, estes túbulos se associam a uma cisterna do retículo sarcoplasmático, constituindo a díade (FIGURA 15).

Já a matriz extracelular de miocárdios submetidos ou não à sobrecarga pressora aguda era caracterizada por feixes de colágeno esparsos e pouco densos, sendo estes apenas mais abundantes nas regiões perivasculares (FIGURA 16).

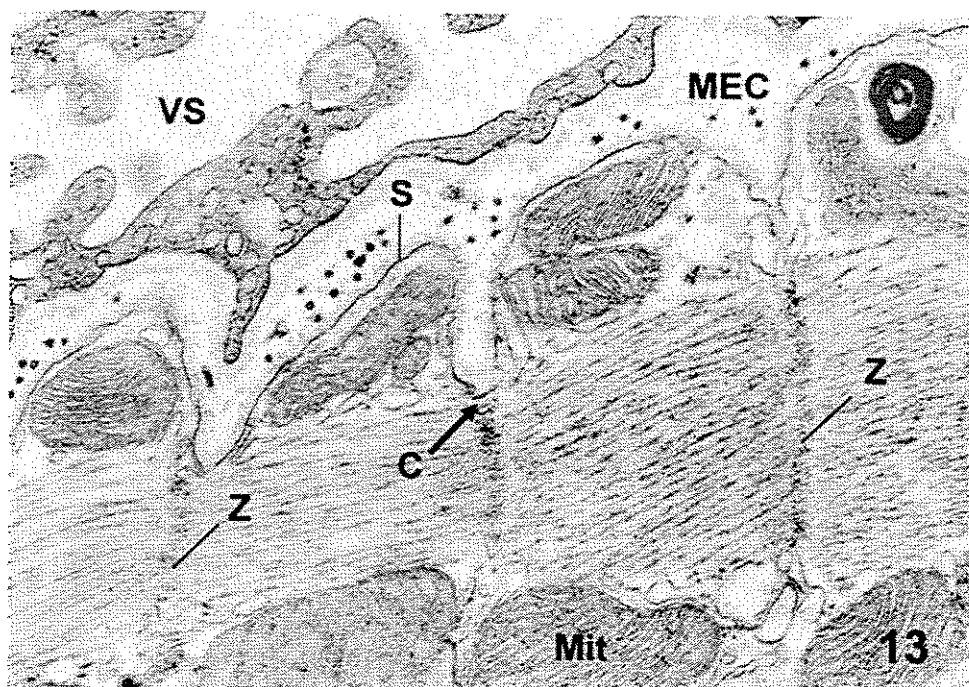


FIGURA 13: fotomicrografia eletrônica de secção ultrafina de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por 30 min. Observar os costâmeros (C), distribuídos periodicamente em coincidência com as linhas Z (Z). Sarcolema (S), mitocôndrias (Mit), matriz extracelular (MEC) e vaso sanguíneo (VS) (30.760x).

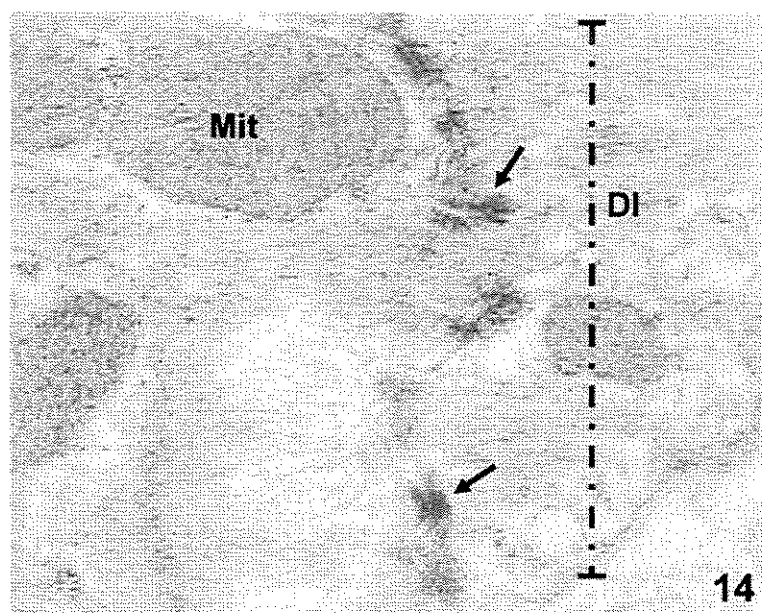


FIGURA 14: fotomicrografia eletrônica de secção ultrafina de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por 30 min. Detalhe do disco intercalar (DI), em que são visíveis os desmossomos (setas). Mitocôndrias (Mit). (41.700x).

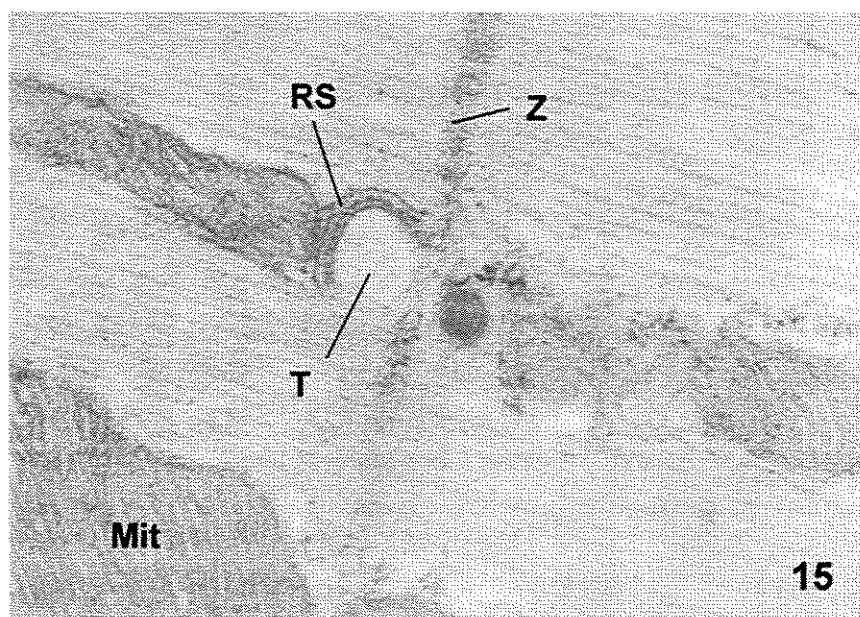


FIGURA 15: fotomicrografia eletrônica de secção ultrafina de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por 30 min. Observe a díade, constituída pela cisterna do retículo sarcoplasmático (RS) associada ao túbulo t (t). Linha Z (Z); mitocôndrias (Mit) (77.080x).

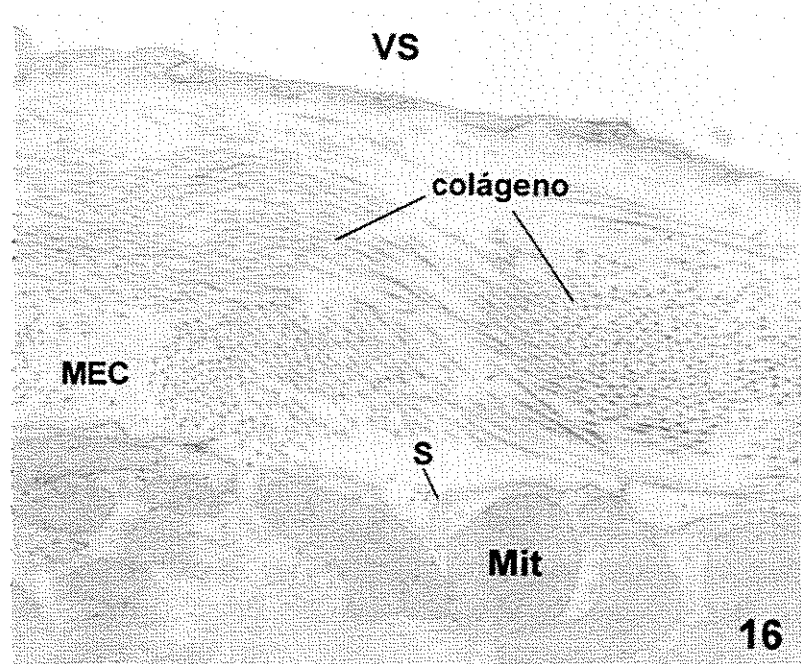


FIGURA 16: fotomicrografia eletrônica de secção ultrafina de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por 30 min. Notar os densos feixes de colágenos observados na matriz extracelular (MEC) em região perivascular. Mitocôndrias (Mit), Sarcolema (S); Vaso sanguíneo (VS) (17.960x).

4.3. Análise por Immunoblotting

4.3.1. Expressão e fosforilação em tirosina da FAK em miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressora aguda

Como etapa inicial no estudo da ativação e distribuição da FAK em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda, experimentos com *immunoblotting* foram realizados para determinar os níveis de expressão e fosforilação desta quinase. Para tal, extratos totais obtidos de ventrículos esquerdos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda (3, 10, 30 e 60 minutos) foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram então incubadas com anticorpo policlonal contra a porção amino-terminal da FAK e com anticorpos fosfo-específicos contra as formas fosforiladas da FAK em suas tirosinas 397, 407, 576/7, 861 e 925.

Conforme demonstrado na FIGURA 17, o estímulo mecânico produz um aumento significativo na fosforilação da FAK na tirosina 397, constatado pelo aumento no conteúdo da FAK tyr-397 em comparação ao conteúdo encontrado para o miocárdio controle. Tal ativação foi observada já nos primeiros três minutos decorridos do início da sobrecarga pressora e se manteve elevada no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora por dez, trinta e sessenta minutos.

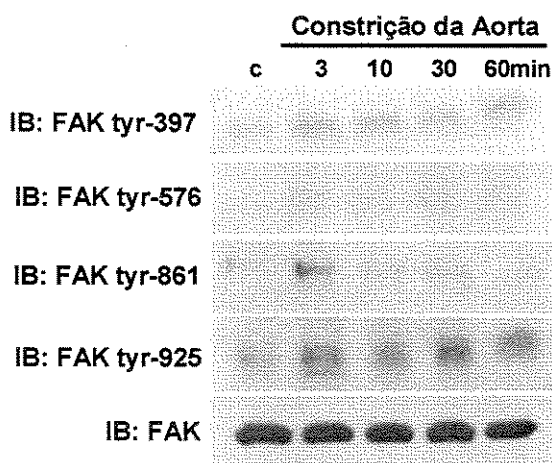


FIGURA 17: *immunoblottings* (IB) representativos da fosforilação da FAK (125KDa) nas tirosinas tyr-397, tyr-576, tyr-861, tyr-925 e do conteúdo total de FAK em ratos controle (C) e submetidos ao aumento de tensão por períodos de 3 a 60 minutos.

Resultados similares foram obtidos para os resíduos de tirosina 576, 861 e 925 da FAK (FIGURA 17), demonstrando que a sobrecarga pressora leva também a fosforilação dos demais resíduos de tirosina da FAK. Em contrapartida, a fosforilação na tirosina 407 não foi detectada nas condições empregadas no presente estudo.

Como demonstrado na FIGURA 17, não houve aumento dos níveis de expressão da FAK, já que se observou a expressão de quantidades semelhantes de FAK (125KDa) no miocárdio de ratos controle e submetidos ao aumento agudo de tensão.

4.3.2. Expressão, fosforilação em tirosina e associação da Src em miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda

O estudo da ativação por fosforilação em tirosina da FAK se estendeu à avaliação dos níveis de expressão e fosforilação da Src, com base em múltiplos relatos que descrevem

a existência de um mecanismo de cooperação mútua entre estas quinases na determinação da ativação das vias de sinalização mediadas pela FAK (RUEST et al., 2001; HANKS et al., 2003). Com a finalidade de avaliar a associação entre a FAK e a Src, extratos totais obtidos de ventrículos esquerdos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda (3, 10, 30 e 60 minutos) foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos contra a porção carboxi-terminal da FAK. As proteínas imunoprecipitadas foram então submetidas à eletroforese, transferidas em membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com anticorpos policlonais contra a Src. Como representado no exemplo da FIGURA 18, a constrição da aorta resultou em um aumento da associação entre as quinases FAK e Src, constatado pelo aumento do conteúdo de Src nos imunoprecipitados com FAK de extratos obtidos de miocárdios submetidos à sobrecarga pressora aguda.

Paralelamente, os níveis de expressão e fosforilação da Src foram avaliados por *immunoblotting* com anticorpos policlonais contra a Src e com anticorpos fosfo-específicos contra a forma fosforilada da Src em sua tirosina 418. Conforme demonstrado na FIGURA 18, o estímulo mecânico levou a um aumento significativo na fosforilação da Src na tirosina 418, constatado pelo aumento no conteúdo de Src tyr-418 em comparação ao conteúdo encontrado para o miocárdio controle. Este aumento no nível de fosforilação da Src na tirosina 418 foi constatado já nos primeiros três minutos da constrição da aorta ascendente, se mantendo praticamente inalterado nos dez minutos, porém reduzindo-se após os trinta e sessenta minutos que se seguiram à coarctação da aorta. Não houve aumento dos níveis de expressão da Src, já que se observaram quantidades semelhantes de Src (60KDa) no miocárdio de ratos controle e submetidos ao aumento agudo de tensão (FIGURA 18).

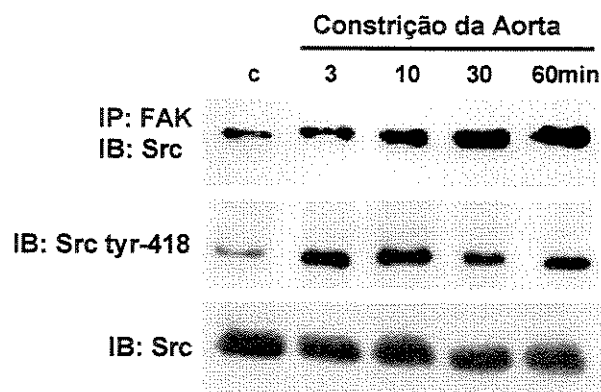


FIGURA 18: *immunoblottings* (IB) representativos da associação entre a FAK e a Src (60KDa), da fosforilação da Src em sua tirosina Tyr-418 e do conteúdo total de FAK em ratos controle (C) e submetidos ao aumento de tensão por períodos de 3 minutos a 60 minutos. IP: imunoprecipitado.

4.3.3. Expressão e fosforilação das proteínas efetoras ERK e JNK em miocárdios submetidos à sobrecarga pressora aguda

Os resultados descritos anteriormente demonstram que a sobrecarga pressora aguda leva a ativação da FAK, bem como a um aumento da interação desta quinase com a Src, o qual é paralelo a ativação desta última. Neste contexto, o presente estudo estendeu suas análises para avaliar os níveis de expressão e fosforilação das MAPKs, ERK e a JNK, proteínas efetoras que atuam em etapas finais nas vias de sinalização celulares mediadas pelas quinases FAK e Src (revisado por HANKS et al, 2003).

Com tal finalidade, extratos totais obtidos de animais controles e animais submetidos a constrição aguda da aorta (3, 10, 30 e 60 minutos) foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram então incubadas com anticorpos policlonais contra a ERK ½ (40 e 42KDa), contra a forma fosforilada da ERK (P-ERK), contra a JNK (46KDa) e com anticorpo monoclonal contra forma fosforilada da JNK (P-JNK).

Conforme demonstrado na FIGURA 19 A, a sobrecarga pressora produziu um aumento significativo no conteúdo da p-ERK, cujo pico máximo ocorreu logo nos primeiros três minutos pós-constricção da Aorta. Decorridos dez minutos de sobrecarga

pressora, houve uma redução no conteúdo da p-ERK que, então retornou aos seus níveis basais após trinta minutos, mantendo-se constante aos sessenta minutos pós-constricção. No entanto, a sobrecarga pressora aguda não causou alterações nos níveis de expressão da ERK, já que quantidades similares desta proteína foram observadas tanto para miocárdio de ratos controle quanto para aqueles submetidos ao estímulo pressor (FIGURA 19A).

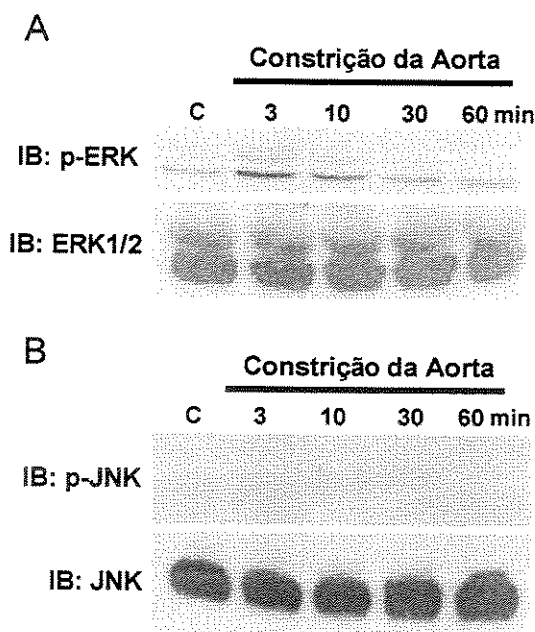


FIGURA 19: *Immunoblottings* (IB) representativos da fosforilação e das quantidades totais da ERK(A) e da JNK (B) em miocárdio de ratos controle (c) e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 3 a 60 minutos.

Como demonstrado na FIGURA 19B, a sobrecarga hemodinâmica levou a um discreto aumento no conteúdo de p-JNK, o qual pode ser observado já nos primeiros três minutos decorridos do início do estímulo pressor. Após dez minutos da constricção da aorta, o conteúdo de p-JNK atingiu seu nível máximo, o qual se manteve estável decorridos trinta minutos de sobrecarga pressora. Em contrapartida, após sessenta minutos, houve uma drástica redução no conteúdo de p-JNK, que atingiu nível inferior ao observado para o miocárdio controle. A sobrecarga pressora aguda não causou qualquer alteração nos níveis de expressão da JNK, uma vez que conteúdos similares desta proteína foram observados para miocárdios controle e submetidos à sobrecarga pressora (FIGURA 19B).

4.4. Distribuição da quinase de adesão focal em miocárdios controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda

Como etapa essencial no estudo da ativação e distribuição da FAK em decorrência da sobrecarga hemodinâmica, avaliou-se a distribuição ultraestrutural desta quinase em cardiomiócitos, visando não somente obter informações precisas de sua localização intracelular, mas também inferir sobre os mecanismos determinantes de sua ativação neste tipo celular. Para esta finalidade, amostras de miocárdio de ventrículos esquerdos de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda (3, 10, 30 e 60 minutos) foram adequadamente coletadas, fixadas e processadas para embebição e inclusão em resina LR-White. Secções ultrafinas foram coletadas em telas de níquel, submetidas à reação de imunolocalização com anticorpos específicos contra as porções amino- e carboxi-terminais da FAK, e analisados em microscópio eletrônico de transmissão.

As reações de imunolocalização em que o anticorpo contra a porção carboxi-terminal da FAK foi empregado apresentaram um sinal de marcação superior àquele obtido com o emprego do anticorpo contra a porção amino-terminal da FAK. Por esta razão, padronizou-se neste estudo o uso do anticorpo contra a porção carboxi-terminal da FAK para a avaliação da distribuição desta quinase em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico agudo.

Nas secções ultrafinas de cardiomiócitos de miocárdio controle (não submetido à sobrecarga pressora), partículas de ouro, indicando a presença da proteína FAK, foram observadas junto aos costâmeros (FIGURA 20A), ao longo dos filamentos que compõem o sarcômero (FIGURA 20 A, B e C), na linha Z (FIGURA 20 A e B) e ao longo dos discos intercalares (FIGURA 20D). Foram também observadas partículas de ouro livres no sarcoplasma.

Já em cardiomiócitos de miocárdios submetidos a um período de três minutos de sobrecarga pressora, observou-se a notável presença de agregados de partículas de ouro, associados às mesmas estruturas descritas para os cardiomiócitos em miocárdio controle, isto é, aos costâmeros (FIGURA 21A), à linha Z (FIGURA 21B e C), aos filamentos que compõem o sarcômero (FIGURA 21B, C) e aos discos intercalares (FIGURA 21D). O

mesmo padrão de localização da FAK foi observado em cardiomiócitos de miocárdios submetidos a dez minutos de sobrecarga pressora.

Em contrapartida, cardiomiócitos de miocárdios submetidos à sobrecarga pressora por períodos de trinta e sessenta minutos apresentavam agregados de partículas de ouro na região peri-nuclear (FIGURA 22 A, B e C) e no interior do núcleo (FIGURA 22 A, B e C). Partículas de ouro e, especialmente, agregados destas foram observados menos freqüentemente nas estruturas prévias e, quando presentes eram, em geral, observadas em coincidência com a linha Z (FIGURA 22D).

Ressalta-se que os controles negativos, ou seja, secções ultrafinas de miocárdio não submetidas à incubação com o anticorpo primário, não apresentaram quaisquer marcações significativas, excluindo a possibilidade de marcação inespecífica pelo anticorpo secundário.

Figura 20 - Fotomicrografias eletrônicas de seções ultrafinas (LR-White) de miocárdio controle submetido a imunomicroscopia eletrônica para a FAK. Notar as partículas de ouro, representando a proteína FAK, junto ao costâmero (c, A), às linhas Z (cabecas de seta, A, B e C), aos filamentos do sarcômero (setas A, B e C) e ao disco intercalalar (setas, D). Ampliações: A – 65.945x; B – 55.600x; C – 81.750x; D – 56.470x.

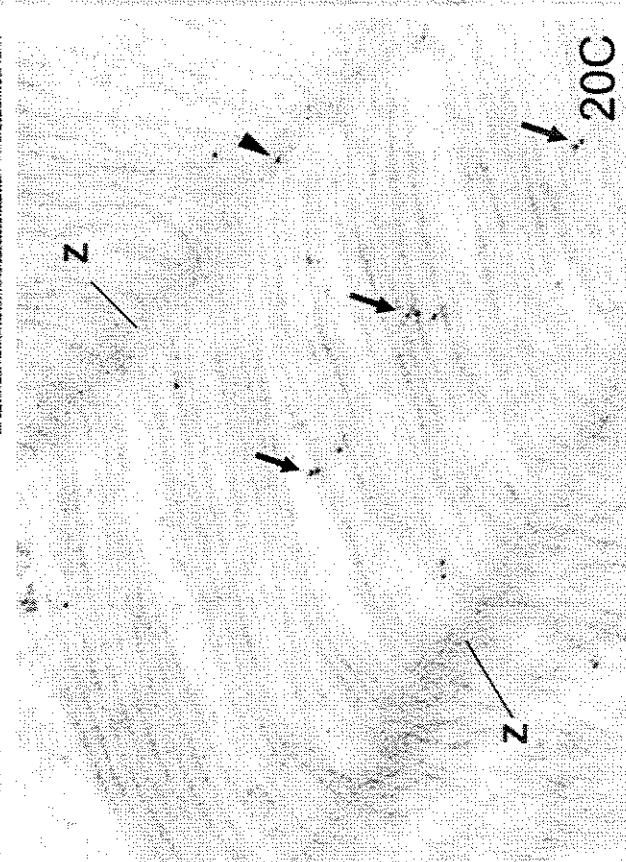
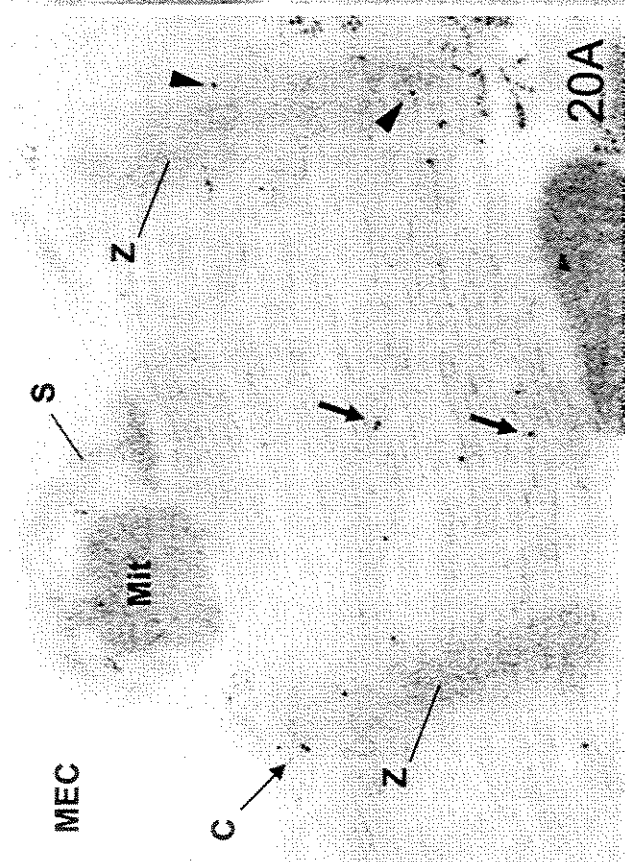
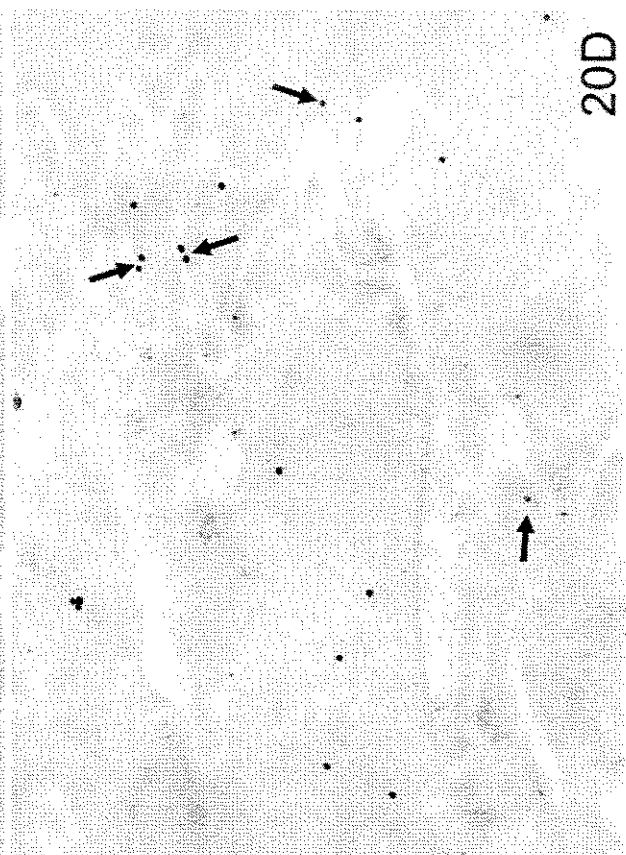
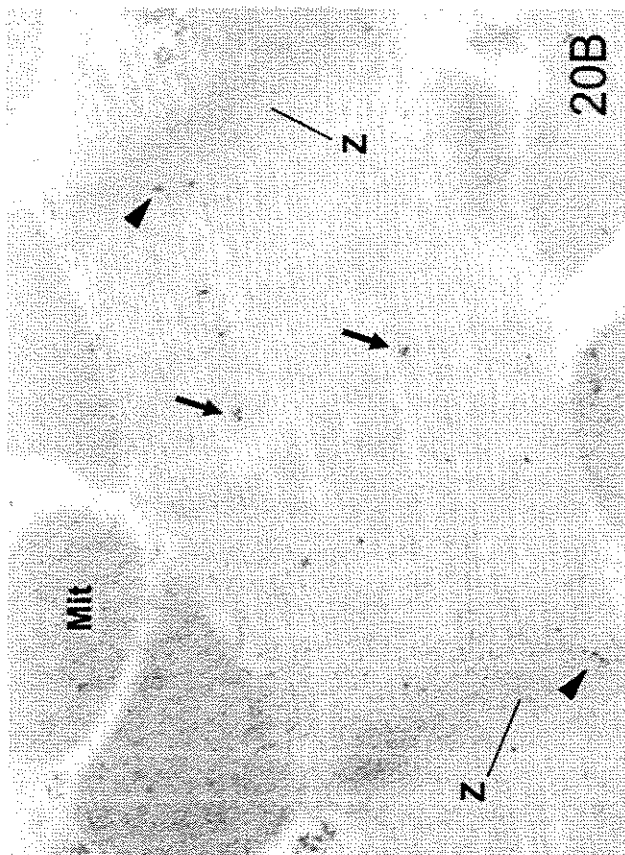


Figura 21 - Sobrecarga pressora aguda conduz a formação de agregados da FAK. Fotomicrografias eletrônicas de seção ultrafina (LR-White) de miocárdio sob aumento de tensão por 3 minutos e submetido a imunomicroscopia eletrônica para a FAK. Notar agregados de partículas de ouro, representando proteína FAK, juntos ao costâmero (c, **A**), à linha Z (cabecas de seta, **B**, e **D**), aos filamentos do sarcômero (setas **B** e **C**) e ao disco intercalar (setas, **D**). Ampliações: A – 98.100x; B – 55.600x; C – 81.660x, D – 51.975x.

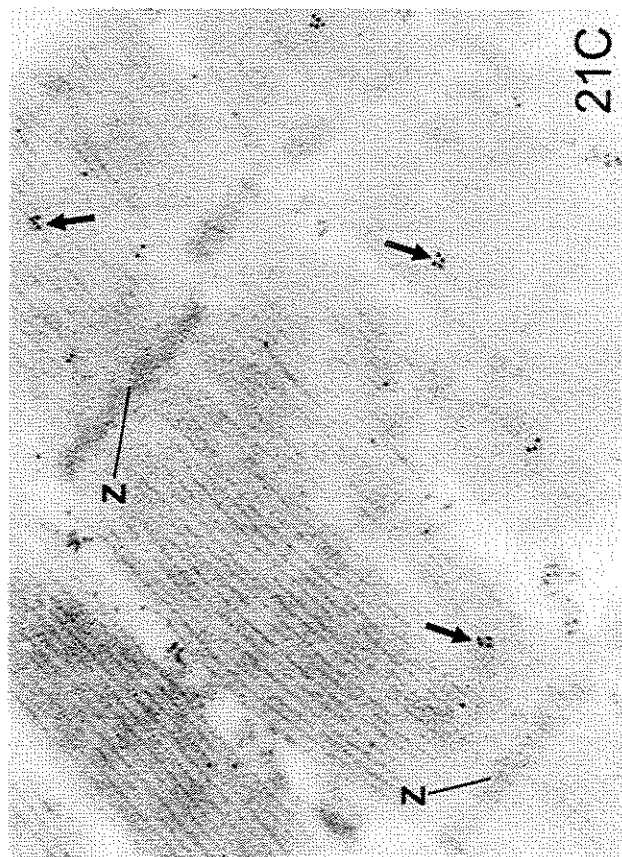
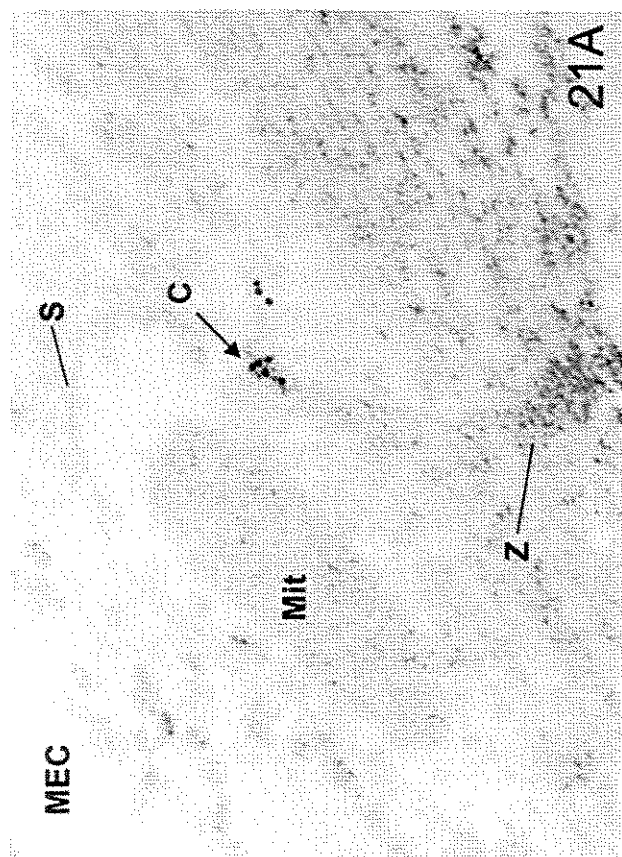
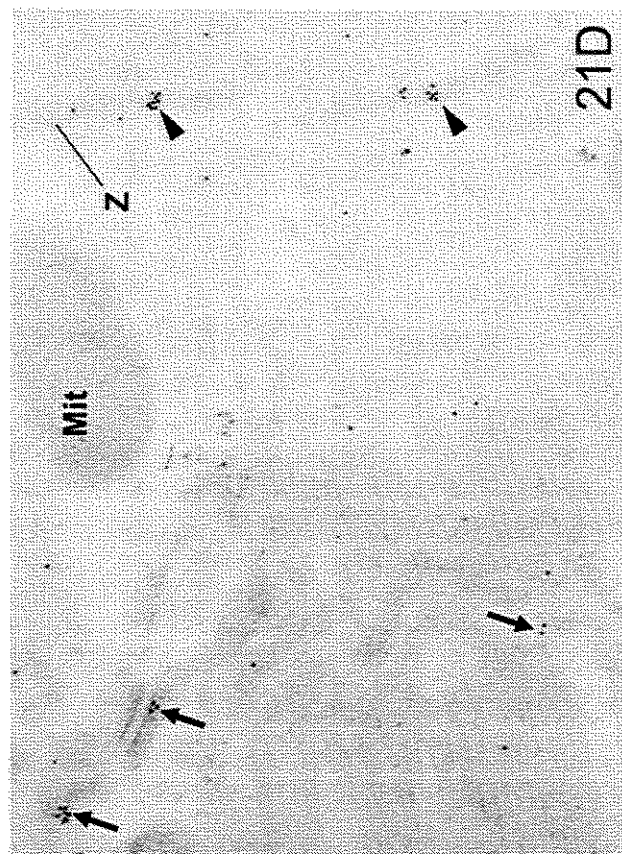
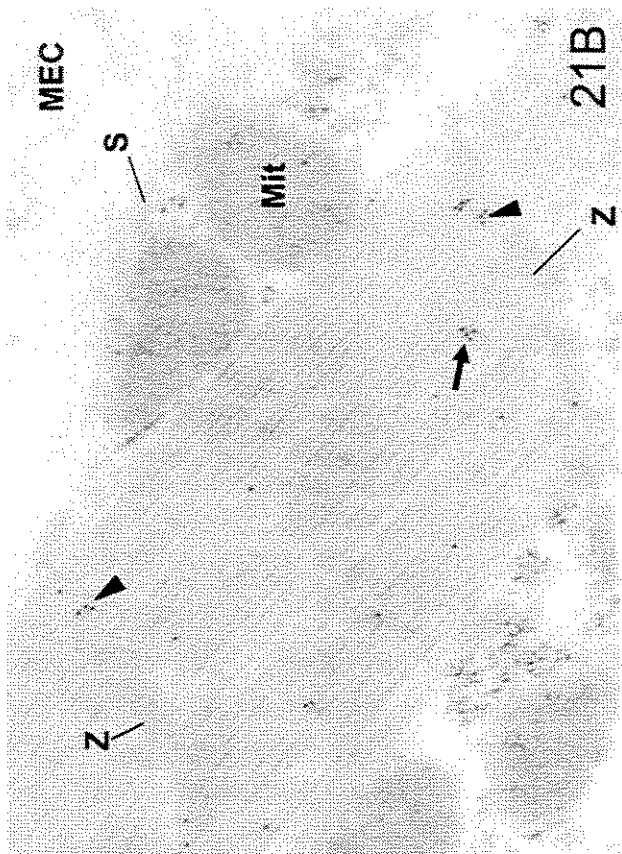
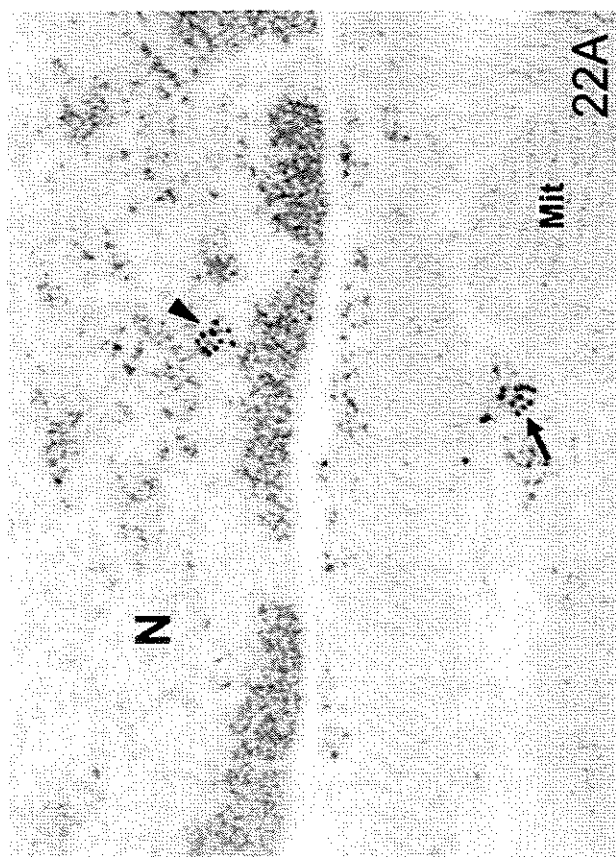
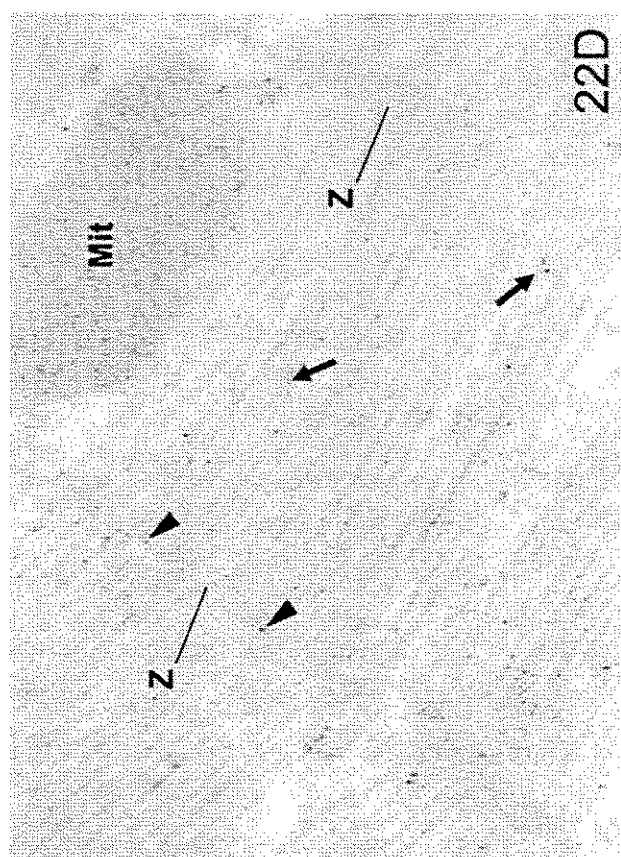


Figure 22 - Sobrecarga pressora aguda leva a translocação da FAK para o núcleo. Fotomicrografias eletrônicas de seção ultrafina (LR-White) de miocárdio sob aumento de tensão por 30 (**A** e **B**) e 60 minutos (**C** e **D**) e submetido a imunomicroscopia eletrônica para a FAK. Notar agregados de partículas de ouro, representando proteína FAK, próximos ao núcleo (setas, **A**, **B** e **C**), no interior do núcleo (cabeças de seta, **A**, **B** e **C**) e raras partículas de ouro juntas aos filamentos do sarcômero (setas, **D**) e às linhas Z (cabeças de setas, **D**). Ampliações: **A** – 96.960x; **B** – 58.690x; **C** – 79.910x; **D** – 63.010x.



4.5. Interação entre a FAK e a Miosina de Cadeia Pesada (MHC) - Ensaio de ligação com GST-miosina

Os resultados obtidos com a análise por imunomicroscopia eletrônica, indicando a localização da FAK junto aos filamentos que compõem o sarcômero, sugeriram que esta quinase se associasse com algum componente destas estruturas. Simultaneamente, na procura de novas proteínas que interagissem com a FAK, estudo desenvolvido em nosso laboratório com o emprego da metodologia de duplo-híbrido demonstrou que a porção amino-terminal da FAK se associa a uma sequência de aminoácidos, identificada como sendo parte da porção C-terminal miosina de cadeia pesada, porção esta que constitui a cauda desta molécula (dados ainda não publicados). Com a finalidade de se confirmar a associação entre a FAK e a miosina, bem como avaliar se esta associação é regulada pelo estímulo pressor, realizou-se o ensaio de ligação com a proteína quimérica GST-miosina. Para tal, extratos totais de miocárdios controle e submetidos à sobrecarga pressora aguda por períodos de dez e sessenta minutos, foram incubados com *beads* de glutatona conjugados a proteína quimérica GST-miosina. Após centrifugação e lavagem, os precipitados foram tratados com tampão de Laemmli, resolvidos em gel de SDS-poliacrilamida, transferidos para membranas de celulose e finalmente submetidos ao *immunoblotting* para a FAK. Como controle de ligação, extratos totais de miocárdio foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sendo incubados com *beads* de glutatona conjugados a GST. Paralelamente, extratos de miocárdio controle foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos anti-FAK e analisados por imunoblotting com os mesmos anticorpos (IP FAK/IB FAK) para que fosse possível avaliar o conteúdo total de FAK presente em extratos de miocárdio de igual conteúdo protéico daqueles submetidos aos ensaios de ligação com GST-miosina (5mg).

Conforme a FIGURA 23A, a presença das bandas da FAK em precipitados com GST-miosina demonstrou a interação entre estas proteínas, tanto em miocárdio controle, quanto naqueles submetidos à sobrecarga pressora aguda (10 e 60 minutos). No mais, a relação entre o conteúdo total de FAK presente em 5mg de proteínas em extrato de miocárdio (IP FAK/IB FAK) (FIGURA 23A, linha 1) e os conteúdos de FAK presentes nos precipitados de extratos de miocárdio com GST-miosina (FIGURA 23A, linhas 2, 3 e 4)

indicou que uma fração significativa do conteúdo de FAK total é direcionada aos filamentos de miosina.

O conteúdo de FAK presente no precipitado de extratos de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por dez minutos com GST-miosina (FIGURA 23A, linha 3) se mostrou maior que aquele constatado para o miocárdio controle (FIGURA 23A linha 2), não submetido ao estímulo pressor. No entanto, observou-se uma diminuição significativa no conteúdo de FAK no precipitado de extratos de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por sessenta minutos com GST-miosina (FIGURA 23A linha 4).

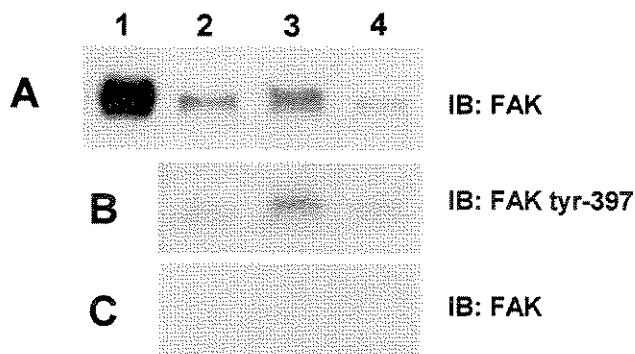


FIGURA 23: *Immunoblottings* (IB) representativos dos ensaios de ligação com as proteínas GST-miosina (A e B) e GST (C, controle negativo). Linhas: (1) imunoprecipitado (IP) de miocardio controle com anticorpos contra a FAK; (2) miocárdio controle; (3) miocárdio submetido à sobrecarga pressora aguda por 10 minutos; (4) miocárdio submetido à sobrecarga pressora aguda por 60 minutos.

Com a finalidade de se avaliar o conteúdo de FAK fosforilada em seu resíduo 397 associado aos filamentos de miosina na condição controle e na condição de sobrecarga pressora, ensaios semelhantes ao supra mencionado foram realizados, sendo adequadamente conduzido para análise por *immunoblotting* com anticorpos policlonais anti-FAK tyr-397Y. Conforme demonstrado na FIGURA 23B, houve um aumento considerável do conteúdo de FAK tyr-397 no precipitado de extrato de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por dez minutos com GST-miosina (FIGURA 23B, linha 3) quando comparado àquele constatado para o miocárdio controle (FIGURA 23B, linha 2), não

submetido ao estímulo pressor. No entanto, observou-se uma diminuição significativa no conteúdo de FAK tyr-397 no precipitado de extratos de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por sessenta minutos com GST-miosina (FIFURA 23B, linha 3).

No controle do ensaio de ligação, em que os extratos de miocárdio foram incubados apenas com os *beads* de glutathione conjugados a GST, não foram constatados conteúdos de FAK nos precipitados de miocárdio controle, e nos precipitados de miocárdios submetidos à sobrecarga pressora por dez minutos e 60 minutos (FIGURA 23C), demonstrando que a interação FAK e miosina é específica.

4.6. Fracionamento celular

Os achados com o emprego da imunomicroscopia eletrônica apresentados neste estudo demonstraram a presença de FAK nos núcleos de cardiomiócitos de miocárdio submetido à sobrecarga pressora por trinta e sessenta minutos. Visando confirmar este achado, experimentos foram realizados em que ventrículos esquerdos provenientes de animais controles e animais submetidos à constrição da aorta por sessenta minutos foram submetidos ao fracionamento celular para obtenção das frações citosólica e nuclear. Tais frações foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e as proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram então incubadas com anticorpos policlonais contra as porções amino- e carboxi-terminais da FAK.

A exemplo da FIGURA 24A, o emprego do anticorpo contra a porção amino-terminal da FAK detectou o conteúdo de FAK (125KDa) preferencialmente presente na fração citosólica dos miócitos cardíacos de miocárdio de ratos controle, embora uma pequena quantidade de FAK (125KDa) tenha sido constatada na fração nuclear. Porém, decorridos sessenta minutos da sobrecarga pressora, ocorreu uma diminuição significativa do conteúdo de FAK (125KDa) na fração citosólica, sendo esta diminuição acompanhada de um aumento do conteúdo de FAK (125KDa) na fração nuclear.

Ainda com o emprego do anticorpo contra a porção amino-terminal da FAK, foi constatada uma segunda banda, de peso molecular de aproximadamente 90KDa. Tal como a FAK 125KDa, esta proteína foi observada preferencialmente na fração citosólica de miócitos cardíacos de miocárdio de ratos controle e predominantemente na fração nuclear

de miócitos cardíacos de ratos submetido à sobrecarga pressora por sessenta minutos (FIGURA 24 A).

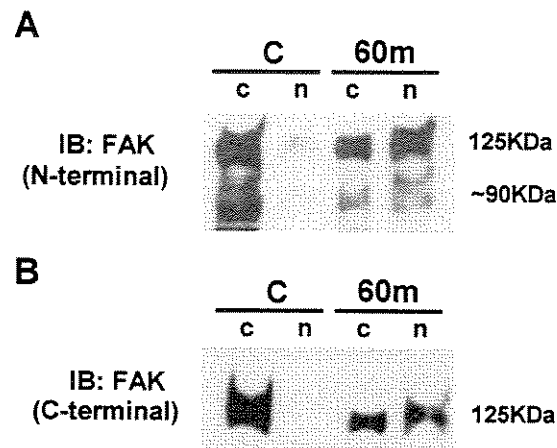


FIGURA 24: *Immunoblottings* (IB) representativos da quantidade de FAK, costatada com o uso de anticorpos contra a porção amino- (A) e carboxi-terminais (B) da FAK, nas frações citosólicas (c) e nucleares (n) de miocárdio de ratos controle (C) e submetidos à sobrecarga pressora aguda por 60 minutos (60 m).

Já o anticorpo contra a porção carboxi-terminal da FAK detectou o conteúdo da FAK (125KDa) exclusivamente na fração citosólica de cardiomiócitos de miocárdio de ratos controle (FIGURA 24B). Após sessenta minutos de sobrecarga pressora, observou-se uma redução significativa do conteúdo da FAK (125KDa) na fração citosólica, paralela a um aumento da quantidade de FAK (125KDa) na fração nuclear. Não foram observadas bandas de pesos moleculares inferiores com o uso deste anticorpo (FIGURA 24B).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizados experimentos para avaliar a expressão, ativação e distribuição subcelular da quinase de adesão focal (FAK) em miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressora aguda. Demonstrou-se que: 1) a sobrecarga pressora aguda induz a rápida ativação da FAK em miocárdio de ratos adultos; 2) a ativação da FAK é acompanhada pelo aumento de sua associação com a Src e sua conseqüente ativação, 3) a ativação do complexo FAK/Src é acompanhada pela ativação dos efetores *downstream* ERK e JNK; 4) a ativação da FAK ocorre paralelamente à rápida agregação desta quinase junto a sítios subcelulares específicos (costâmeros, linhas Z, discos intercalares, filamentos do sarcômeros), potenciais candidatos a mecanosensores em cardiomiócitos; (5) a FAK se associa à cauda da miosina de cadeia pesada (MHC); (6) a FAK transloca-se posteriormente para o núcleo, onde possivelmente desempenha funções ainda desconhecidas na regulação da expressão gênica, que podem ser fundamentais no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

O modelo experimental de sobrecarga pressora por meio da coarctação da aorta, tal como empregado neste estudo, é amplamente utilizado na indução de sobrecarga pressora e resposta hipertrófica do miocárdio (SCHMITT et al., 2003; TORSONI et al., 2003; SCOPACASA et al., 2002; FRANCHINI et al., 2000; KOMURO et al., 1988; COUGHLIN & GIBBS, 1981; DOWELL et al., 1976). A diminuição do diâmetro da aorta causa aumento imediato da resistência ao fluxo sanguíneo que, por sua vez, impõe carga adicional de trabalho ao coração.

No presente estudo, a coarctação da aorta produziu aumentos da pressão sistólica de pelo menos 40 mmHg. Os valores de pressões sistólicas nos ratos coarctados foram sempre maiores ou iguais a 170mmHg, enquanto que os valores médios da pressão no período controle não foram maiores que 130 mmHg. De notável importância, é o fato de que tais aumentos da pressão sistólica na aorta ascendente foram alcançados sem que houvesse queda nos níveis pressóricos da aorta descendente, indicando a preservação da perfusão sanguínea nos órgãos abdominais e patas posteriores. A preocupação com estes valores teve como base a necessidade de se controlar com a máxima precisão possível as condições hemodinâmicas basais e os aumentos da pressão arterial induzidos pela coarctação para reduzir interferências não desejadas na atividade da FAK. Assim foram eliminados da análise, resultados obtidos em ratos que apresentaram níveis basais de pressão arterial

elevados ou muito baixos ($<110\text{mmHg}$), já que estas condições se acompanham de ativação basal da FAK. Por outro lado, o nível absoluto de pressão sistólica atingido após a coarctação também foi considerado importante, porque somente aumentos relativos podem não necessariamente indicar que os ratos se encontram em situações de estado hemodinâmico estável e semelhante. Além disso, também foi importante, como mencionado, o critério de manter a pressão arterial à jusante da coarctação em níveis próximos àquele da situação basal, já que a isquemia da região abdominal provoca a liberação de fatores humorais que sabidamente são capazes de ativar a FAK, via ativação de receptores celulares específicos.

A análise em microscopia eletrônica de transmissão de secções ultrafinas de miocárdios de ratos empregada neste estudo demonstrou, como se esperava, que não existem diferenças ultraestruturais evidentes entre o miocárdio de ratos controle e aqueles submetidos à sobrecarga pressora aguda por períodos de três, dez, trinta e sessenta minutos. Os cardiomiócitos de corações submetidos ao aumento agudo de tensão apresentam as mesmas características morfológicas daqueles em condição controle, preservando a organização de suas estruturas intracelulares, as quais puderam ser facilmente identificadas. No mais, a similaridade entre as características morfológicas observadas no miocárdio de ratos controles e daqueles submetidos à sobrecarga pressora indicou que as condições propiciadas pela preparação do animal e processamento do material não interferem com a integridade do tecido.

A FAK é rapidamente ativada em decorrência do estímulo pressor, levando a formação de um complexo sinalizador multifuncional, o qual considera-se ocupar posição central na transdução e coordenação de respostas rápidas dos cardiomiócitos ao estresse mecânico. No presente estudo nós mostramos dados quanto a fosforilação em tirosina da FAK e sua distribuição celular junto a sítios intracelulares específicos, propiciando avanço no entendimento nos mecanismos de sua ativação por forças mecânicas em cardiomiócitos.

Com o emprego de anticorpos desenhados diretamente a sítios de tirosina específicos da FAK e da Src, nós confirmamos nossas demonstrações prévias de que a sobrecarga pressora aguda induz a rápida ativação do complexo sinalizador FAK/Src

(FRANCHINI et al., 2000), e estendemos estes resultados ao demonstrarmos a fosforilação dos resíduos de tirosina tyr- 397, 576/577, 861 e 925 da FAK.

Os achados neste estudo quanto a autofosforilação da FAK em sua tirosina 397, concomitante ao aumento de sua associação com a Src e ativação desta em sua tirosina 418, seguida ainda pela fosforilação das tirosinas 576/7, 861 e 925 da FAK, estão de acordo com o modelo proposto para a ativação do complexo da FAK em outros tipos celulares. Segundo este modelo, a autofosforilação da FAK determina sua habilidade de interagir com domínios SH2 das tirosinas quinases da família da Src e esta interação promove a atividade catalítica da Src por meio da liberação de interações autoinibitórias (SCHALLER et al., 1999), permitindo que esta quinase se autofosforile em seu resíduo de tirosina 418. Uma vez ativada, a Src promove a fosforilação dos demais resíduos de tirosina da FAK (397, 407, 576/7, 861 e 925) (CALALB et al., 1995; CALALB et al., 1996; SCHLAEPFER & HUNTER, 1996). Consistente com isto, nós demonstramos previamente que a ativação do complexo FAK/Src pelo estímulo mecânico em cardiomiócitos é estritamente dependente da fosforilação da FAK em seu resíduo de tirosina 397 (TORSONI et al., 2003). Além disso, estudo desenvolvido em nosso laboratório por DOMINGOS e colaboradores (2002), em corações submetidos à sobrecarga hemodinâmica em sistema de Langendorff, demonstrou que o estiramento leva não apenas a ativação da FAK e da ERK, mas também a associação entre estas proteínas.

A fosforilação dos resíduos adicionais suporta a idéia de que a FAK pode desempenhar um papel como proteína adaptadora, favorecendo a associação com outras proteínas sinalizadoras relacionadas à ativação de vias de sinalização *downstream* envolvidas em múltiplas funções celulares (PETIT e THIERY, 2000). A fosforilação do resíduo de tirosina 397 não somente inicia a cooperação com a Src, mas parece ser importante para o recrutamento de outras proteínas contendo domínios SH2, incluindo a PLC-gama, a subunidade de 85KDa da PI3K e as proteínas adaptadoras Shc e Nick (CHEN et al., 1996; ZHANG et al., 1999; SCHLAEPFER et al., 1998; GOICOECHEA et al, 2002). Condizente com isto, estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram previamente que a sobrecarga pressora induz um rápido aumento da associação da FAK com a subunidade de 85KDa da PI3 K, e conseqüente aumento da ativação da Akt, indicando que a fosforilação adicional da FAK pode estar envolvida na regulação da

sobrevivência dos cardiomiócitos em resposta ao estresse mecânico (FRANCHINI et al, 2000).

Em adição, a fosforilação da tirosina 397, bem como da 925, cria sítios de ligação para o complexo Grb2-SOS (SCHLAEPFER et al., 1994), constituindo a conexão entre tirosina quinases e a via de sinalização das MAPK (CHARDIN et al., 1993; SCHLAEPFER et al., 1994; SCHLAEPFER et al., 1998). Condizente com isto, o presente estudo demonstrou em miocárdio de ratos a fosforilação da FAK em seu resíduo de tirosina 925 paralela à ativação da ERK em resposta ao estímulo pressor e estudos prévios em nosso laboratório já haviam demonstrado o aumento da associação entre a FAK e a Grb2, sendo esta simultânea à ativação da ERK (FRANCHINI et al., 2000).

Além da ativação da ERK, o complexo FAK/Src está ainda vinculado à ativação da JNK. Em outros tipos celulares, a ativação da JNK decorre da capacidade do complexo FAK/Src de ativar a proteína CAS que, por sua vez, se associa as proteínas CRK e DOCK180, levando a ativação da Rac 1 e consequentemente da JNK (BISHOP e HALL, 2000). Condizente com isto, o presente estudo demonstrou em miocárdio de ratos que a ativação da FAK e Src, e consequente formação do complexo FAK/Src, são eventos paralelos a ativação da JNK em decorrência do estímulo pressor.

Embora em outros tipos celulares a função das MAPKs seja vinculada à regulação da expressão de genes que controlam processos celulares tais como diferenciação, crescimento e sobrevivência (MARSHALL, 1995; COBB, 1999), os eventos celulares regulados pela ativação precoce das MAPKs em cardiomiócitos em decorrência do estresse mecânico ainda permanecem pouco conhecidos. Até o presente momento, sabe-se que as MAPKs, ERK e JNK atuam sobre os fatores de transcrição Elk1 e c-Jun, respectivamente, levando a fosforilação de seus domínios de transativação e, consequentemente, aumentando a capacidade destes de estimular a transcrição gênica (COHEN, 1997; SUGDEN & CLERK, 1998). Assim sendo, a ativação das MAPKs pode estar associada à regulação da expressão de genes de resposta imediata (c-fos, c-jun e egr-1), a qual se encontra rapidamente e transientemente aumentada em miocárdio e em cardiomiócitos isolados submetidos ao estresse mecânico (FRANCHINI et al, 2000). No mais, algumas evidências sugerem que a rápida ativação da ERK poderia contribuir para a re-expressão de genes

fetais, tais como ANF, β -miosina de cadeia pesada, e α -actina (THORBURN et al, 1994). Neste contexto, é plausível presumir que as MAPKs sejam responsáveis, pelo menos em parte, pelas alterações qualitativas e quantitativas da expressão gênica que antecedem o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca decorrente do estresse mecânico (revisado por SUSSMAN et al., 2002).

Embora se conheçam razoavelmente os eventos subsequentes à ativação da FAK nas vias de sinalização celulares envolvidas no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, pouco se sabe sobre os mecanismos que ditam a ativação desta quinase em cardiomiócitos. Neste contexto, no presente estudo empregamos a análise minuciosa da distribuição da FAK em miocárdio de ratos controle e submetido à sobrecarga pressora visando, por meio de informações quanto à localização subcelular desta quinase, contribuir para a determinação dos mecanismos de sinalização da FAK. Com o emprego da microscopia eletrônica demonstramos que, paralela à ativação da FAK em seus múltiplos resíduos de tirosina, a sobrecarga cardíaca induz também a alterações no padrão de distribuição desta quinase em cardiomiócitos, consistente com sua translocação subcelular induzida pelo estresse mecânico. A marcação da FAK em miócitos cardíacos de corações controle foi predominantemente observada junto ao citoesqueleto dos cardiomiócitos, mais precisamente junto aos filamentos dos sarcômeros, linhas Z, costâmeros e discos intercalares. Frente ao estímulo pressor agudo, o comportamento da FAK quanto à sua localização subcelular pode ser considerado como sendo bifásico (FIGURA 25). Em uma fase inicial, imediatamente após a indução da sobrecarga pressora (3 e 10 minutos), as moléculas de FAK se agregam junto aos mesmos sítios subcelulares aos quais tal quinase se encontrava associada na ausência do estímulo pressor. Já em uma fase posterior (30 e 60 minutos), os agregados da FAK são translocados para o compartimento nuclear e poucas moléculas de FAK permanecem associadas às estruturas anteriores, indicando que o estresse mecânico induz a translocação da FAK de sítios citoplasmáticos para o núcleo.

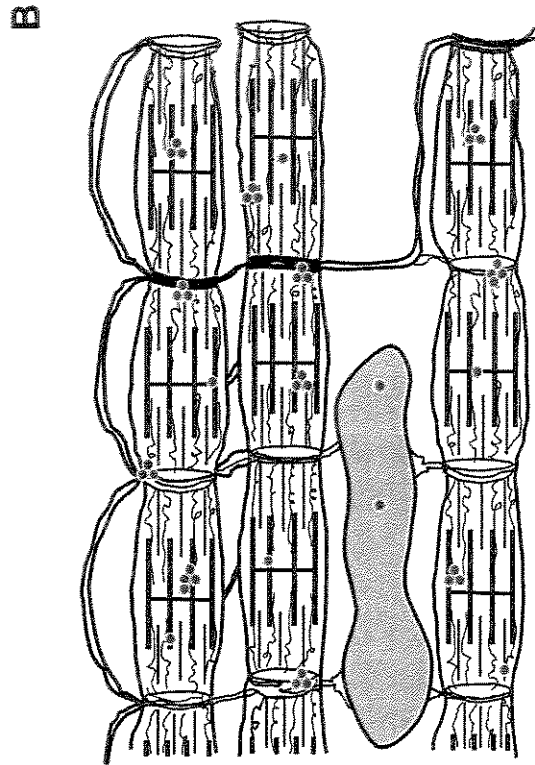
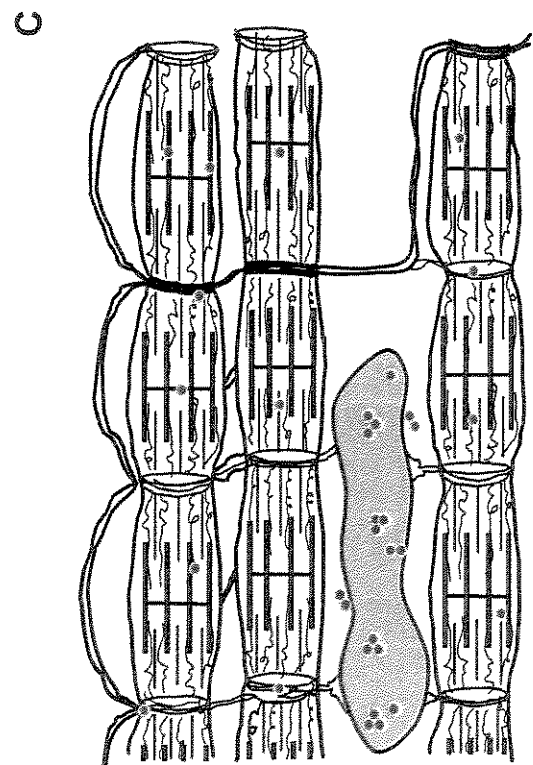
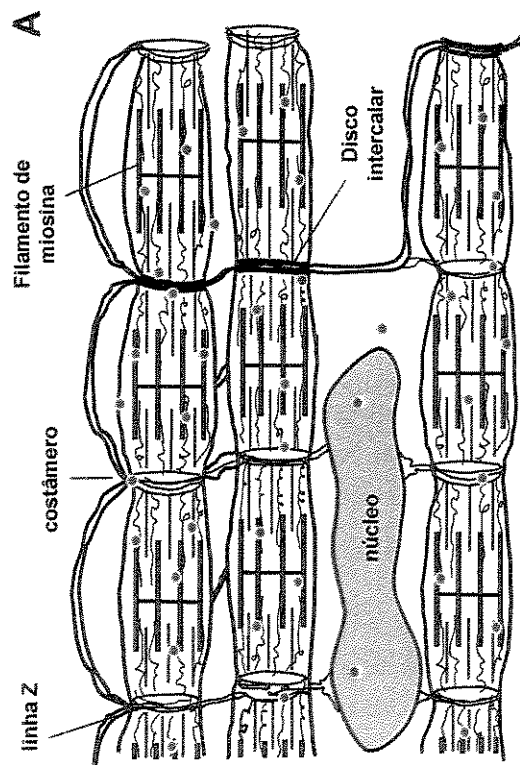


FIGURA 25 - Modelo da ativação e translocação da FAK. Esquemas representativos da: (A) distribuição subcelular da FAK em cardiomiócito controle; (B) formação de agregados da FAK junto aos costâmeros, aos filamentos de miosina, às linhas Z e ao disco intercalar; (C) translocação dos agregados da FAK para o núcleo.

A sobrecarga pressora leva a ativação e agregação da FAK junto a múltiplos mecanossensores em cardiomiócitos, cada qual com sua localização e importância específica. Num segundo momento, os agregados de FAK se translocam para o núcleo, onde esta quinase possivelmente desempenha funções vinculadas a resposta hiperrófica induzida por estímulo mecânico.

A atividade e a fosforilação da FAK se mantiveram inalteradas no período que compreende 3 a 60 minutos de sobrecarga pressora, indicando que a translocação da FAK para estruturas celulares nos cardiomiócitos ocorre após a FAK ser ativada em resposta ao estímulo mecânico. Em adição, nosso presente estudo fortalece a idéia de que a agregação de moléculas da FAK é uma importante etapa na ativação da FAK e na sinalização em resposta ao estresse mecânico em cardiomiócitos. É plausível supor que a formação dos agregados resulte do recrutamento de moléculas de FAK adicionais as quais, dada a proximidade molecular, seriam ativadas pela própria FAK (SCHALLER et al., 1994; TOUTANT et al., 2002; KATZ et al., 2002) ou pela Src (CALALB et al., 1995), resultando na amplificação do sinal inicial.

A localização da FAK junto aos costâmeros, filamentos dos sarcômeros, linhas Z e discos intercalares e, especialmente, a agregação desta quinase juntos a estes mesmos sítios subcelulares concomitante a sua ativação nos minutos iniciais ao estímulo pressor sugerem que tais sítios possam desempenhar papel como mecanossensores em cardiomiócitos, decodificando sinais mecânicos em sinais bioquímicos, por meio da ativação de proteínas sinalizadoras intracelulares. Estas, por sua vez, culminariam com o desencadeamento da resposta hipertrófica, necessária à adaptação cardíaca à sobrecarga de trabalho imposta. Além disso, estes resultados apontam a FAK como sendo um elemento crucial na mecanotransdução em cardiomiócitos submetidos ao aumento de tensão.

A precisa localização da FAK junto aos costâmeros, tal como demonstrada neste estudo, está de acordo com os poucos estudos presentes na literatura que obtiveram evidências da localização da FAK junto aos costâmeros em cardiomiócitos isolados de neonatos, por meio da microscopia confocal (TORSONI et al., 2003) e em cardiomiócitos adultos em secções histológicas processadas para imunoperoxidase (DOMINGOS et al., 2002). Em conjunto, estes dados fortalecem a hipótese de que os costâmeros são análogos às adesões focais observadas *in vitro* para células em cultura (BORG et al., 2000; ALENGHAT & INGER, 2002; SUSSMAN et al., 2002; EPSTEIN & DAVIS, 2003; ERVASTI, 2003; PYLE & SOLARO, 2004), e que desempenham importante papel na mecanotransdução e desencadeamento da resposta hipertrófica em cardiomiócitos submetidos ao aumento de tensão.

Similarmente, o achado quanto a localização da FAK junto aos discos intercalares neste estudo está de acordo com recentes estudos que constataram a FAK nestes sítios em cardiomiócitos neonatos tratados com endotelina (KOVACIC-MILIVOJEVIC et al., 2001) e em cardiomiócitos de ratos espontaneamente hipertensos (YI et al., 2003). Em conjunto, estes dados dão suporte a participação dos discos intercalares na transdução de sinais em cardiomiócitos.

Já a localização e a agregação da FAK junto aos filamentos dos sarcômeros dos cardiomiócitos, em especial quando do aumento de tensão, constituem um achado inédito no presente estudo. Simultaneamente a esta observação, na busca de novas proteínas que interagissem com a FAK, estudo desenvolvido em nosso laboratório com o emprego da metodologia de duplo híbrido demonstrou que a FAK é capaz de interagir com a sequência da β - miosina de cadeia pesada, presente na porção C-terminal (cauda) desta proteína (dados ainda não publicados). Esta foi a primeira demonstração de que uma molécula específica de células musculares interage com a FAK.

Adicionalmente a metodologia de imunomicroscopia eletrônica e de duplo híbrido, a interação entre a FAK e a cauda da miosina foi confirmada no presente estudo em ensaios de ligação com GST-miosina, já que a FAK estava presente nos precipitados de GST-miosina dos extratos analisados (controle, dez e sessenta minutos). No mais, a presença da FAK nos precipitados de GST-miosina de extratos obtidos de miocárdios controle demonstrou que a interação entre estas proteínas não é determinada pelo estímulo pressor. Este achado está ainda de acordo com a observação da FAK junto aos filamentos do sarcômeros em cardiomiócitos não submetidos ao aumento de tensão, tal como constatado pela análise por imunomicroscopia eletrônica.

Além disso, estes ensaios revelaram ainda alterações nas quantidades de FAK e FAK tyr-397 presentes nos precipitados de GST-miosina dos extratos de miocárdios analisados neste estudo. Observou-se, por exemplo, o aumento considerável do conteúdo de FAK no precipitado de GST-miosina em miocárdios de ratos submetidos à sobrecarga pressora por 10 minutos em comparação ao conteúdo desta quinase observado para o miocárdio controle, sendo este dado consistente com a formação de agregados juntos aos filamentos dos sarcômeros, tal como constado pela imunomicroscopia eletrônica. No mais, o aumento no conteúdo de FAK tyr-397 no precipitado de GST-miosina em miocárdios de

ratos submetidos à sobrecarga pressora por dez minutos é consistente com a idéia de que a formação do agregado de moléculas da FAK e conseqüente proximidade molecular otimizariam a ativação de moléculas adicionais de FAK, resultando na amplificação do sinal.

Os ensaios de ligação com GST-miosina demonstraram ainda uma considerável redução nos conteúdos de FAK e de FAK tyr-397 encontrados nos precipitados de GST-miosina de miocárdios submetidos ao estímulo pressor por um período de sessenta minutos. Consistente com esta redução, a análise por imunomicroscopia eletrônica da distribuição da FAK em miocárdio submetidos à mesma condição também constatou a redução significativa na presença de agregados associados aos filamentos de miosina, sendo isto concomitante ao aparecimento de agregados da FAK no compartimento nuclear. A redução significativa na associação entre os filamentos de miosina e a FAK quando decorridos sessenta minutos do estímulo pressor sugere que esta interação possa estar sujeita a regulação, porém estudos futuros são necessários à confirmação desta hipótese.

A idéia de que os costâmeros, as linhas Z, os discos intercalares e os filamentos de miosina atuem mecanossensores em cardiomiócitos implica em assumir que tais sítios estejam envolvidos na ativação da FAK. A exemplo do que se aceita para as adesões focais, é plausível presumir que a ativação da FAK junto aos costâmeros se dê via ativação das integrinas. No entanto, em se tratando de cardiomiócitos, provavelmente a ativação da integrinas não seja apenas determinada pela sua agregação decorrente da adesão celular a matriz extracelular, já que estas células são residentes, pressupondo menor taxa de formação e ruptura de costâmeros. Em outras palavras, outros mecanismos, que não a agregação de integrinas, podem ser capazes de determinar a ativação destes receptores em cardiomiócitos e conseqüentemente resultar na ativação das vias de sinalização celulares envolvidas na resposta hipertrófica.

Em suporte a esta hipótese, alguns estudos com abordagens metodológicas diversas demonstraram que forças mecânicas externas aplicadas às adesões focais pré-existent resultam no crescimento destas estruturas, traduzido no recrutamento de novos componentes às adesões primárias (revisado por WHEHRLE-HALLER & IMHOF, 2002; revisado por GEIGER & BERSHADSKY, 2001; RIVELINE et al., 2001). Estes estudos sugerem que a distorção mecânica das adesões focais por si só pode estar na origem da

sinalização mecânica (WHEHRLE-HALLER & IMHOF, 2002). Corroborando esta hipótese, estudos com células musculares obtiveram fortes evidências de que a tensão é um elemento crítico na estabilidade e organização de proteínas costaméricas (SHARP et al., 1997; BEZAKOVA & LOMO, 2001). Em vista destes achados, é plausível presumir que o aumento de tensão no sarcolema, decorrente da sobrecarga pressora, determine a ativação das integrinas localizadas nos costâmeros, as quais, por sua vez, ativariam a FAK, desencadeando assim a ativação de vias de sinalização celulares em cardiomiócitos.

Embora especulativo, é possível que o aumento de tensão no sarcolema seja também um elemento crítico na determinação da ativação da FAK junto aos demais mecanosensores aqui descritos. Uma hipótese aponta para a possibilidade de que o aumento de tensão no sarcolema poderia ser transmitido aos discos intercalares e linhas Z levando, de alguma forma, a ativação das moléculas de FAK associadas a tais sítios. Corroborando esta hipótese, recente revisão sugeriu que o aumento da tensão no sarcolema seria transmitido às linhas Z, via complexo costamérico, e causaria distorção da rede de proteínas constituintes das linhas Z, induzindo alterações conformacionais e conseqüente ativação de determinadas proteínas sinalizadoras (CLARK et al., 2002). Similarmente, é possível que os filamentos de miosina sejam também capazes de transduzir força mecânica, culminando com a ativação das moléculas de FAK associadas aos mesmos. Experimentos futuros são necessários à elucidação dos mecanismos moleculares que ditariam a ativação da FAK junto aos mecanosensores em cardiomiócitos descritos no presente estudo.

Em vista dos dados apresentados neste estudo, conclui-se que os cardiomiócitos provavelmente dispõem de múltiplos mecanosensores, cada qual com a sua localização específica, que podem desempenhar um importante papel na mecanotransdução em cardiomiócitos. Nossos achados são de grande valor à medida que, não só conferem a prova definitiva da participação e importância dos costâmeros na mecanotransdução em cardiomiócitos, como também ampliam o atual conhecimento ao indicar a participação de outros sítios subcelulares na mecanotransdução de sinais nestas células. Embora a sinalização via linhas Z e discos intercalares desencadeada por estímulo mecânico venha recentemente sendo sugerida nas diversas revisões sobre o assunto, este estudo foi o primeiro a apresentar fortes evidências da participação destas estruturas na mecanotransdução em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico. No mais, os dados

quanto à associação entre os filamentos de miosina e a FAK, demonstrado no presente estudo por meio de provas bioquímicas e imunomicroscopia eletrônica, são dados inéditos na literatura e que apontam para a importante participação dos filamentos de miosina na mecanotransdução em cardiomiócitos.

A importância da existência de múltiplos mecanossensores nos cardiomiócitos está presumivelmente na possibilidade de permitir a ativação de vias de sinalização celulares em diferentes nichos subcelulares. Neste sentido, enquanto os discos intercalares e os costâmeros propiciariam a ativação de vias de sinalização preferencialmente na periferia celular, as linhas Z e os filamentos de miosina seriam cruciais na sinalização celular em toda a profundidade dos cardiomiócitos. Além disso, a existência de múltiplos mecanossensores propiciaria a ativação simultânea de diversas vias de sinalização celulares, dependendo do pool de moléculas associadas a cada um destes sítios subcelulares. Por outro lado, a ativação de uma mesma via de sinalização celular junto a diferentes mecanossensores pode constituir um mecanismo pelo qual um sinal é amplificado, reforçando a necessidade da resposta. Deste modo é possível que cada mecanossensor aqui descrito desempenhe um papel importante como componente integrado a uma rede que resulta em uma resposta orquestrada à condição de sobrecarga pressora. Em sustento a esta idéia, diversos estudos têm apontado a associação entre defeitos em proteínas citoesqueléticas com cardiomiopatias, sugerindo que a integridade estrutural destes mecanossensores é necessária a manutenção da sinalização normal associada aos mesmos (revisado por SUSSMAN et al., 2002).

A análise por imunomicroscopia eletrônica demonstrou não somente a multiplicidade de sítios subcelulares envolvidos nos minutos iniciais do desencadeamento da resposta hipertrófica mediada pela FAK, como revelou ainda que esta quinase é translocada para a região perinuclear e para o núcleo destas células quando submetidas ao aumento de tensão prolongado por trinta e sessenta minutos. Consistentemente, a observação de agregados de FAK junto aos costâmeros, discos intercalares, linhas Z e filamentos de miosina, tal como constatada quando decorridos os minutos iniciais do estímulo pressor, tornou-se claramente menos freqüente. Além disso, os ensaios de ligação com GST-miosina, tal como demonstrado neste estudo, revelaram uma diminuição significativa da quantidade de FAK associada as miofibrilas em miocárdio de ratos

submetido à sobrecarga pressora por sessenta minutos, indicando que tal enzima poderia estar sendo translocada para outro sítio intracelular.

Com o intuito de confirmar este achado, a translocação nuclear da FAK foi adicionalmente testada em experimentos com centrifugação diferencial, nos quais constatou-se, com anticorpos contra as porções amino- e carboxi- terminais da FAK, a presença desta quinase nos extratos nucleares, juntamente com a diminuição do conteúdo da mesma nos extratos citoplasmáticos de miocárdios submetidos à sobrecarga pressora por sessenta minutos. Além da FAK 125KD, a detecção de uma banda adicional de aproximadamente 90KD, resultante do uso do anticorpo policlonal contra a porção amino-terminal da FAK, sugeriu a existência de um fragmento amino-terminal da FAK, o qual, tal como a primeira, sofre translocação para o núcleo quando da sobrecarga pressora por sessenta minutos.

A observação de que a translocação nuclear da FAK se iniciou após 30 minutos do início do estímulo pressor e se concretizou apenas após 60 minutos nestas mesmas condições sugere não apenas que tal fenômeno dependa do estímulo pressor, mas que também dependa de uma persistência mínima do mesmo.

O achado quanto a translocação nuclear da FAK neste estudo está de acordo com estudo recente que, com o emprego da imunocitoquímica e da análise por *immunoblotting*, demonstrou a presença da FAK no núcleo de cardiomiócitos em miocárdio hipertrofiado de ratos espontaneamente hipertensos (YI *et al*, 2003). Em conjunto, estes achados abrem um novo leque de possibilidades quanto às funções desempenhadas pela FAK, uma vez que sugerem que tal quinase possa participar em processos celulares que ocorrem no compartimento nuclear. Neste contexto, em particular quanto aos cardiomiócitos submetidos a aumentos de tensão, é plausível supor que a FAK possa ser fundamental não apenas na transdução de sinais junto aos diversos sítios celulares aos quais se encontra associada, mas também na regulação da expressão de determinados genes vinculados à resposta hipertrófica. De acordo com esta hipótese, experimento realizado em nosso laboratório por TORSONI e colaboradores (2003) demonstrou que a expressão de um dominante negativo da FAK (MT-FAK), mutado em seu sítio de autofosforilação 397, induz a diminuição dos níveis de expressão do ANF, sugerindo que a FAK esteja vinculada direta ou indiretamente à regulação da transcrição do ANF.

Em outros tipos celulares, evidências da translocação nuclear da FAK foram obtidas em estudos que constataram a presença de fragmentos amino-terminais da FAK de aproximadamente 90KD e 50KD em núcleos de células endoteliais durante a apoptose (van de WALTER et al., 1999; LEVKAU et al., 1998). Similarmente, a agregação de fragmentos amino-terminais da FAK no compartimento nuclear foi também constatada em células apoptóticas de glioblastomas (JONES et al, 2001). Em células endoteliais, sabe-se que a clivagem da FAK e conseqüente geração de fragmentos amino-terminais são mediadas pela caspase 3 e estão vinculadas à ruptura das adesões focais que ocorre durante a apoptose (GERVAIS et al., 1998; LEVKAU et al., 1998; LOBO & ZACHARY, 2000). No mais, estudo desenvolvido por BEVIGLIA e colaboradores (2003) demonstrou que a superexpressão de fragmentos amino-terminais induz a apoptose em células cancerosas. Em conjunto, estes achados vinculam a presença da FAK no compartimento nuclear com a viabilidade celular. Contudo, experimentos futuros são necessários para elucidar se a FAK poderia estar envolvida na determinação da viabilidade celular em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico.

Quanto aos mecanismos que determinariam a translocação nuclear da FAK, sabe-se que tal quinase não contém um sinal clássico para localização nuclear, mas estudos recentes têm demonstrado que algumas proteínas apresentam seqüências atípicas de localização nuclear, sendo capazes de transitar do citoplasma para o núcleo (NIGG, 1997; SACHDEV, 1998; SCHMALZ, 1998). Mesmo na total ausência de sinais de localização nuclear, é possível que a FAK seja capaz de se associar com proteínas carreadoras que translocam entre o citoplasma e o núcleo, e assim ser importada para tal compartimento e neste exercer suas funções, tal como uma variedade de proteínas citoplasmáticas (CLARK et al., 2002, YI et al, 2003). Sabe-se, por exemplo, que a proteína nuclear Sam68, interage com a Src (RICHARD et al., 1995) que, por sua vez interage com a FAK ativada. Portanto, sugere-se que a FAK ativada seria translocada para o núcleo por meio de interações proteína-proteína (YI et al, 2003).

Ainda não se deve descartar a hipótese de que a própria FAK possa ser uma proteína carreadora, sendo fundamental na importação de outras proteínas para o interior do núcleo (JONES & STEWART, 2004). Embora muitas sejam as possibilidades, até o momento, sabe-se apenas que a translocação nuclear de fragmentos amino-terminais da FAK

independe da autofosforilação desta quinase em sua tirosina de 397 em células RBL-2H3 (JONES & STEWART, 2004), e em células HEK e MDCK (STEWART et al, 2002). Estudos futuros são necessários à elucidação dos mecanismos que determinam a translocação nuclear da FAK, bem como das funções desempenhadas por esta quinase neste compartimento.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo contribui para o atual conhecimento nesta área de pesquisa ao confirmar a participação dos costâmeros na mecanotransdução de sinais em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico e, principalmente, ao demonstrar fortes evidências de que as linhas Z, os discos intercalares e os filamentos de miosina também desempenham papel como mecanosensores. Portanto, os dados relatados apontam para a idéia de que os cardiomiócitos dispõem de múltiplos mecanosensores, cada qual contribuindo com uma fração importante na intrincada rede de sinais que determinam a resposta hipertrófica.

Os achados deste estudo fortalecem ainda o papel central desempenhado pela FAK e seus efetores downstream no desencadeamento da resposta hipertrófica dos cardiomiócitos frente ao estresse mecânico. No mais, o presente estudo abre novas possibilidades de pesquisa quanto às funções desempenhadas pela FAK no compartimento nuclear e sua relação com a resposta hipertrófica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. The cytoskeleton. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3rd ed. New York, Garland Publishing, 1994. p.787 – 860.
- ALENGHAT, F.J.; INGBER, D. E. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. **Sci STKE**. 2002 (119): PE6. 2002.
- ALMEIDA, E. A.; ILIC, D.; HAN, Q.; HAUCK, C. R.; JIN, F.; KAWAKATSU, H.; SCHLAEPFER, D. D.; DAMSKY, C. H. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. **J Cell Biol.** 149(3):741-54, 2000.
- ARBER, S.; HUNTER, J. J.; ROSS, J. JR; HONGO, M; SANSIG, G; BORG, J; PERRIARD, J. C.; CHIEN, K. R.; CARONI, P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. **Cell**. 88: 393-403, 1997.
- BELKIN, A. M.; ZHIDKOVA, N. I.; KOTELIANSKY, V. E. Localization of talin in skeletal and cardiac muscles. **FEBS Lett**. 200(1):32-36, 1986.
- BERSHADSKY, A.; GINGER, B. Cytoskeleton-associated anchor and signal transduction proteins. Introduction. In: **Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins**. Edited by Kreis, T, Vale R. Oxford, New York, Oxford University Press, 1999, p. 3-11,
- BEVIGLIA, L., GOLUBOVSKAYA, V.; XU, L.; YANG, X.; CRAVEN, R. J.; CANCE, W. G. Focal adhesion kinase N-terminus in breast carcinoma cells induces rounding, detachment and apoptosis. **Biochem J**. 373: 201-10, 2003.
- BEZAKOVA, G.; LOMO, T., Muscle activity and muscle agrin regulate the organization of cytoskeletal proteins and attached acetylcholine receptor (AChR) aggregates in skeletal muscle fibers. **J Cell Biol.** 153(7): 1453-63, 2001.
- BISHOP, A. L.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochem. J**. 348: 241-255, 2000.

- BLAKE, D. J. WEIR, A.; NEWHEY, S. E.; DAVIES, K. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiol Rev.** 82: 291-329, 2002
- BOGOYEVITCH, M. A.; ANDERSON, M. B.; GILLESPIE-BROWN, J.; CLERK, A.; GLENNON, P. E.; FULLER, S. J.; SUDGEN, P. H. Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. **Biochem J.** 314: 115-121, 1996.
- BOGOYEVITCH, M. A.; GLENNON, P. E.; ANDERSON, M. B.; CLERK, A.; LAZOU, A.; MARSHALL, C. J.; PARKER, P. J.; SUDGEN, P. H. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascades in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. **J Biol Chem.** 269: 1110-1119, 1994.
- BOHELER, K. R.; SCHWARTZ, K. Gene expression in cardiac hypertrophy. **Trends Cardiovasc. Med.** 2:176-82, 1992.
- BORG, T. K., GOLDSMITH, E. C.; PRICE, R.; CARVER, W.; TERRACIO, L.; SAMAREL, A. M. Specialization at the Z line of cardiac myocytes. **Cardiovasc Res.** 46: 277 – 285, 2000.
- 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.
- BURRIDGE, K.; FATH, K.; KELLY, T.; NUCKOLLS, G; TURNER, C. Focal adhesion: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Annu Ver Cell Biol.** 4: 487-525, 1988.
- CALALB, M. B.; POLTE, T. R.; HANKS, S. K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for src family kinases. **Mol Cell Biol.** 15: 954-963, 1995.

- CALALB, M. B.; ZHANG, X.; POLTE, T. R.; HANKS, S. K. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. **Biochem Biophys Res Commun.** 228: 662-668, 1996.
- CARO, C.G.; PEDLEY, T.J.; SHROTER, R.C.; SEED, W.A. **The mechanics of the circulation.** Oxford University Press, 1978.
- CHARDIN, P.; CAMONIS, J.; GALE, W. L., VAN AELST, L.; SCHLESSINGER, J., WIGLER, M. H.; BAR-SAGI, D. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. **Science** 260: 1338-1343, 1993.
- CHEN, H. C.; APPEDDU, P. A.; PARSONS, J. T.; HILDEBRAND, J. D., SCHALLER, M. D., GUAN, J. L. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. **J Biol Chem.** 270: 16995-16999, 1995.
- CHEN, H.C; APPEDDU, P. A.; ISODA, H.; GUAN, J.L. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem.** 271, 26329-26334, 1996.
- CHIEN, K. R. To Cre or not to Cre: the next generation of mouse models of human cardiac diseases. **Nature** 407: 227-232, 2001
- CHIEN, K. R.; ZHU, H.; KNOWLTON, K. U.; MILLER-HANCE, W.; VAN-BILSEN, M.; O'BRIEN, T. X.; EVANS, S. M. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. **Annu Rev Physiol.** 55: 77-95, 1993
- CHIEN, K.R. Stress pathways and heart failure. *Cell*, 98: 555-558, 1999.
- CHO, S. Y; KLEMKE, R. L. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 149: 223-236, 2000.
- CLARK, E.A. and BRUGGE, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science** 268: 233-39, 1995.

- CLARK, K. A.; MCELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. C. e GREGORIO, C. C. Striated Muscle Cytoarchitecture: An intricate web of form and function. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 18: 637-706, 2002.
- COBB, M. H. MAP kinase pathways. **Prog Biophys Mol Biol.** 71: 479-500, 1999.
- COHEN, P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. **Trends Cell Biol.** 7: 353-361, 1997.
- COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve.** 23(10):1456-71, 2000.
- COOPER, G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. **Annu Rev Physiol.** 49:501-518, 1987.
- COOPER, L.A.; SHEN, T. L. e GUAN, J.L. Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction. **Mol Cell Biol.** 23: 8030-41, 2003.
- COUGHLIN, P.; GIBBS, C. L. Cardiac energetics in short and long term hypertrophy induced by aortic coarctation. **Cardiovasc Res.** 15(11): 623-31, 1981.
- CRAIG, S.W. e PARDO, J. V. Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. **Cell Motil.** 3: 449-462, 1983.
- DANOWSKY, B. A.; IMANAKA-YOSHIDA, K; SANGER, J. M. e SANGER, J. W. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. **J Cell Biol.** 118: 1411-20, 1992.
- DOMINGOS, P. P.; FONSECA, P. M.; NADRUZ, W. JR; FRANCHINI, K. G. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 282: H556 - 564, 2002.

- DOWELL, R. T.; CUTILLET, A. F.; RUDNIK, M. A.; SODT, P. C. Heart functional responses to pressure overload in exercised and sedentary rats. **Am J Physiol.** 230(1):199-204, 1976.
- EBLE, D. M.; STRAIT, J. B.; GOVINDARAJAN, G.; LOU, J.; BYRON, K. L.; SAMAREL, A. M. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 278: H1695-H1707, 2000.
- ECARNOT-LAUBRIET, A.; DE LUCA, K.; VANDROUX, D.; MOISANT, M. BERNARD, C.; ASSEM, M.; ROCHETTE, L.; TEYSSIER, J.R. Downregulation and nuclear relocation of MLP during the progression of right ventricular hypertrophy induced by chronic pressure overload. **J Mol Cell Cardiol.** 32: 2385-2395, 2000.
- EPSTEIN e DAVIS, 2003, Epstein ND, Davis JS. Sensing stretch is fundamental. **Cell.** 112: 147-150, 2003.
- ERVASTI, JM. Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. **J Biol Chem.** 18: 13591-13594, 2003.
- 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 Natl Acad Sci USA.** 97(26):14632-7, 2000.
- GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. **Curr Opin Cell Biol.** 13(5):584-92, 2001.
- GERULL, B.; GRAMLICH, M.; ATHERTON, J.; MCNABB, M.; TROMBITAS, K.; SASSE-KLAASSEN, S.; SEIDMAN, J. G.; GRANZIER, H.; LABEIT, S.; FRENNEAUX, M.; THIERFELDER, L. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. **Nat. Genet.** 30: 201-204, 2002;

- GERVAIS, F. G.; THORNBERRY, N. A.; RUFFOLO, S. C.; NICHOLSON, D. W.; ROY, S. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. **J Biol Chem.** 273: 17102-17108, 1998;
- GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science.** 285: 1028 – 1032, 1999.
- GIRAULT, J. A.; LABESSE, G.; MORNON, J. P.; CALLEBAUT, I. The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. **Trends Biochem. Sci.** 24: 54-57, 1999.
- GOICOECHEA, S. M.; TU, Y.; HUA, Y.; CHEN, K.; SHEN, T. L.; GUAN, J. L.; WU, C. Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility. **Int J Biochem Cell Biol** 34: 791-805, 2002.
- GOLDSTEIN, M.A.; MICHAEL, L. H.; SCHROETER, J. P., SASS, R. L. Structural states in the Z band of skeletal muscle correlate with state of active and passive tension. **J Gen Physiol.** 92:113–119, 1988.
- GOLDSTEIN, M.A.; MICHAEL, L. H.; SCHROETER, J. P., SASS, R. L. Two structural states of Z-bands in cardiac muscle. **Am J Physiol.** 256: H552-H559, 1989.
- GRANZIER, H. L.; LABEIT, S. The giant protein titin - A major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. **Circ Res.** 94: 284-295, 2004.
- GUAN, J. L. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. **Int J Biochem Cell Biol.** 29: 1085-1096, 1997.
- GUAN, J. L.; TREVITHICK, J. E.; HYNES, R. O. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-KDa protein. **Cell Regul.** 2: 951-964, 1991.
- HANKS, S. K.; CALALB, M. B.; HARPER, M. C.; PATEL, S. K. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. **Proc Natl Acad Sci USA.** 89: 8487-8491, 1992.

- HANKS, S. K.; RYZHOVA, L.; SHIN, N-Y e BRÁBEK, J. Focal Adhesion Kinase Signaling and their implications in the control of cell survival and motility. **Frontiers in Bioscience**. 8: d982-996, 2003.
- HARTE, M.T.; HILDEBRAND, J.D.; BURNHAM, M. R., BOUTON, A. H. PARSONS, J. T. p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. **J Biol Chem**. 271, 13649-13655, 1996.
- HASEGAWA, H.; KIYOKAWA, E.; TANAKA, S.; NAGASHIMA, K.; GOTOH, N.; SHIBUYA, M.; KURATA, T.; MATSUDA, M. DOCK180, a major Crk-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. **Mol Cell Biol**. 16: 1770-1776, 1996.
- HEFTI, M. A.; HARDER, B. A.; EPPENBERG, H. M.; SCHAUB, M. C. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol** 29: 2873-2892, 1997.
- HEIN, S.; SCHAPER, J. Weakness of a giant: mutations of the sarcomeric protein titin. **Trends Mol Med**. 8(7):311-3, 2002.
- HILDEBRAND, J. D.; TAYLOR, J. M.; PARSONS, J. T. Identification of sequences required for the efficient localization of focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. **J Cell Biol**. 123: 993-1005, 1993.
- HILDEBRAND, J.D.; SCHALLER, M. D.; PARSONS, J. T. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. **Mol Biol Cell** 6, 637-647. 1995.
- HORWITZ, A.; DUGGAN, K ; BUCK, C., BECKERLE, M. C., BURRIDGE, K. A. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin – a transmembrane linkage. **Nature**. 320, 531-533, 1986
- HYNES, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**. 48: 549 -554, 1987.
- IMANAKA-YOSHIDA, K.; ENOMOTO-IWAMOTO, M.; YOSHIDA, T.; SAKAKURA, T. Vinculin, Talin, Integrin α -6 β -1 and laminin can serve as components of

- attachment complex mediating contraction force transmission from cardiomyocytes to extracellular matrix. **Cell Motil Cytoskeleton**. 42: 1-11, 1999.
- IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B; MAHDAVI, V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. **Proc Natl Acad Sci USA**. 85: 339-343, 1988.
- JONES, G.; MACHADO, J. JR.; MERLO, A. Loss of focal adhesion kinase (FAK) inhibits epidermal growth factor receptor-dependent migration and induces aggregation of nh(2)-terminal FAK in the nuclei of apoptotic glioblastoma cells. **Cancer Res**. 61: 4978-4981, 2001.
- JONES, G.; STEWART, G. Nuclear import of N-terminal FAK by activation of the FcεRI receptor in RBL-2H3 cells. **Biochem Biophys Res Comm**. 314: 39-45, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Tecido Muscular. In: **Histologia Básica**. 8ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1995. p.159 – 177.
- KATZ, B-Z.; MIYAMOTO, S.; TERAMOTO, H.; ZOHAR, M.; KRYLOV, D.; VINSON, C.; GUTKIND, J. S.; YAMADA, K. M. Direct transmembrane clustering and cytoplasmic dimerization of focal adhesion kinase initiates its tyrosine phosphorylation. **Biochem Biophys Acta**. 1592: 141–152, 2002.
- KATZ, A. M. The cardiomyopathy of overload: an unusual growth response in the hypertrophied heart. **Ann Intern Med**. 121:363-371, 1994.
- KENT, R.L.; ROZICH, J.D.; MCCOLLAM, P.L., et al. Rapid expression of the Na + -Ca²⁺ exchanger in response to cardiac pressure overload. **Am J Physiol**. 265: H1024–29, 1993.
- KIMURA, A.; ITO-STOH, M.; HAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; ARIMURA, T. Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy in Asian populations. **J Cardiol**. 37: 139-146, 2001.

- KIYOKAWA, E.; HASHIMOTO, Y.; KOBAYASHI, S.; SUGIMURA, H.; KURATA, T.; MATSUDA, M. Activation of Rac 1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK 180. **Genes Devel.** 12: 3331-3336, 1998.
- KOMURO, I.; YAZAKI, Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. **Annu Rev Physiol.** 55: 55-75, 1993.
- KOMURO, I.; KURABAYASHI, M.; TAKAKU, F.; 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.
- KONG, Y.; FLICK, M. J.; KUDLA, A. J.; KONIECZNY, S. F. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. **Mol Cell Biol.** 17: 4750-60, 1997.
- KOVACIC-MILIVOJEVIC B, ROEDIGER F, ALMEIDA EA, DAMSKY CH, GARDNER DG, ILIC D. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. **Mol Biol Cell.** 12: 2290-307, 2001.
- KUPPUSWAMY, D.; KERR, C.; NARISHIGE, T.; KASI, V.S.; MENICK, D. R.; COOPER, G. Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. **J Biol Chem.** 272: 4500-4508, 1997.
- LASER M, WILLEY CD, JIANG W, COOPER G IV, MENICK DR, ZILE MR, KUPPUSWAMY D. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. **J Biol Chem.** 275: 35624 - 35630, 2000.
- LEU, T. H. e MAA, M. C. Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at tyr-397. **Oncogene.** 21: 6992-7000, 2002.
- LEVKAU, B.; HERREN, B.; KOYAMA, H.; ROSS, R.; RAINES, E. W. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125Fak and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. **J Exp Med.** 187: 579-586, 1998.

- LOBO, M. and ZACHARY, I. Nuclear localization and apoptotic regulation of na amino-terminal domain focal adhesion kinase fragment in endothelial cells. **Bioch Bioph Res Com.** 276: 1068-1074, 2000.
- LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left Ventricular Hypertrophy. Patogénesis, Detection and Prognosis. **Circulation.** 102: 470-479, 2000.
- MAA, M.-C.; LEU, T-H. Vanadate-dependent FAK activation is accomplished by the sustained FAK Tyr-576/577 phosphorylation. **Biochem Biophys Res Comm.** 251, 344-349, 1998.
- MARSHALL, C. J. 1995 Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. **Cell.** 80(2): 179-185, 1995.
- MARUYAMA, K.; MATSUBARA, R.; NATORI, Y.; NONOMURA, S.; KIMURA, S.; et al. Connectin, an elastic protein of muscle. **J Biochem.** 82: 317-337.
- MILNER, D. J.; TAFFET, G. E.; WANG, X.; PHAM, T.; TAMURA, T. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. **J Mol Cell Cardiol.** 31: 2036-76, 1999.
- MILNER, D. J.; WEITZER, G.; TRAN, D. BRADLEY, A.; CAPETANAKI, Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. **J Cell Biol.** 134: 1255-1270, 1996.
- MIZUKAMI, Y.; YOSHIOKA, K.; MORIMOTO, S.; YOSHIDA K. A novel mechanism of JNK activation (Nuclear translocation and activation of JNK 1 during ischemia and reperfusion. **J Biol Chem.** 272: 16657-16662, 1997.
- NADRUZ, W, Jr; KOBARG, C. B.; CONSTANCIO, S.S.; CORAT, P. D. C. e 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.

- NIGG, E. A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. **Nature**. 386: 779-787, 1997.
- OLSON, E. N. e WILLIAMS, R. S. Calcineurin signaling and muscle remodeling. **Cell**. 101: 689-92, 2000.
- OLSON, T. M.; ILLENBERGER, S.; KISHIMOTO, N. Y.; HUTTELMAIER, S.; KEATING, M. T.; JOCKUSCH, B. M.; Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. **Circulation**. 105: 431-437, 2002.
- OPEIE, L.H. Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In: **Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine**. Editor: E. Braunwald. 5th Ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1997.
- OTEY, C. A.; PAVALKO, F. M.; BURRIDGE, K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. **J Cell Biol**. 111, 721-729, 1990.
- OWEN, J. D.; RUEST, P. J.; FRY, D. W.; HANKS, S. K. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. **Mol Cell Biol**. 19: 4806-4818, 1999.
- PARDO, J. V.; SILICIANO, J. D. e CRAIG, S. W. A vinculin-containing cortical lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. **Proc Natl Acad Sci. USA**. 80: 1008-12, 1983a.
- PARDO, J. V.; SILICIANO, J. D. e CRAIG, S. W. Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. **J Cell Biol**. 97: 1081-88, 1983b.
- PAWSON, T.; SCOTT, J. D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science**. 278: 2075-2080, 1997.
- PETIT, V.; THIERY, J. P. Focal adhesions: structure and dynamics. **Biol Cell**. 92: 477-494, 2000.

- PHAM, C. G.; HARPF, A. E.; KELLER, R. S.; VU, H. T.; SHAI, S. Y. et al. Striated muscle-specific beta (1D)-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. **Am J Physiol Heart Circ. Physiol.** 279: H2916-H26, 2000.
- POLTE, T. R. e HANKS, S. K. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130Cas) are elevated in cytoskeletal-associated fractions following adhesion and Src transformation: requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich-motifs. **J Biol Chem.** 272: 5501-5509, 1997.
- PORTER, G. A; DMYTRENKO, G. M.; WINKELMANN, J. C.; BLOCK, R. J. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. **J Cell Biol.** 117: 997-1005, 1992.
- PYLE, W. G.; SOLARO, R. J. At the crossroads of myocardial signaling - The role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. **Circ Res** 94: 296-305, 2004.
- RICHARD, S.; YU, D.; BLUMER, K.; HAUSLADEN, D.; OLSZOWY, M.; CONNELLY, P.; SHAW, A. Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with Src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C γ 1. **Mol Cell Biol.** 15: 186-197, 1995.
- RIVELINE, D.; ZAMIR, E.; BALABAN, N. Q.; SCHWARZ, U. S.; ISHIZAKI, T.; NARUMIYA S.; KAM, Z; GEIGER, G; BERSHADSKY, A. D. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. **J Cell Biol.** 153(6): 1175-1186, 2001.
- ROSS, R. S. and BORG, T. K. Integrins and the myocardium. **Circ Res.** 88: 1112 – 1119, 2001.

- ROSS, R. S.; PHAM, C.; SHAI, S. Y. ET AL. $\beta 1$ integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. **Circ Res.** 82: 1160 – 1172, 1998.
- RUEST P.J.; N.-Y. SHIN; T.R. POLTE; X. ZHANG; S.K. HANKS. Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7641-7652, 2001.
- SACHDEV, 1998; SACHDEV, S.; HOFFMANN, A.; HANNINK, M. Nuclear localisation of IkBa is mediated by the second Ankyrin repeat: The IkBa Ankyrin repeat: the IkBa Ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. **Mol Cell Biol.** 18, 2524–2534, 1998.
- SALAZAR, E. P.; ROZENGURT, E. Src family kinases are required for intergrin-mediated but not for G-protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at tyr-397. **J Biol Chem.** 276: 17788-17795, 2001.
- SATOH, M.; TAKAHASHI, M. SAKAMOTO, T; HIROE, M; MARUMO, F.; KIMURA, A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. **Biochem Biophys Res Commum.** 262: 411-17, 1999.
- SCHLAEPFER, D. D. and 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.** 16: 5623-5633, 1996.
- SCHLAEPFER, D. D.; HANKS, S. K.; HUNTER, T.; VAN DER GEER, P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. **Nature.** 372: 786-791, 1994.
- SCHALLER, M. D.; HILDEBRAND, J. D.; PARSONS, J. T. Complex formation with focal adhesion kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. **Mol Biol Cell.** 10: 3489-3505, 1999.
- SCHALLER, M. D.; OTEY, C. A.; HILDEBRAND, J. D.; PARSONS, J. T. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. **J Cell Biol.** 130: 1181-1187, 1995.

- SCHALLER, M.D.; BORGMAN, C. A.; COBB, B. S.; VINES, R. R.; REYNOLDS, A. B.; PARSONS, J. T. pp125Fak a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. **Proc Natl Acad Sci USA**. 89: 5192-5196, 1992.
- SCHALLER, M.D.; HILDEBRAND, J.D.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W.; VINES, R.R.; PARSONS, J.T. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125 FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. **Mol Cell Biol**. 14:1680-1688, 1994.
- SCHLAEPFER, D. D.; JONES, K. C.; HUNTER, T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. **Mol Cell Biol**. 18: 2571-2585, 1998.
- SCHMALZ, D. 1998 Nuclear import of protein kinase C occurs by a mechanism distinct from the mechanism used by proteins with a classical nuclear localization signal. **J Cell Sci**. 111: 1823-1830, 1998.
- 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 mutation-induced hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation**. 108(9):1133-8, 2003.
- SCOPACASA, B. S.; TEIXEIRA, V. P.; FRANCHINI, K. G. Colchicine attenuates left ventricular hypertrophy but preserves cardiac function of aortic-constricted rats. **J Appl Physiol**. 94(4): 1627-1633, 2003.
- SHARMA, C. P.; EZZEL, R. M.; ARNAOUT, M. A. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. **J Immunol**. 154: 3461-3470, 1995.
- Sharp, W. W.; Simpson, D. G.; Borg, T. K.; Samarel, A. M.; Terracio, L. Mechanical forces regulate focal adhesion and costamere assembly in cardiac myocytes. **Am J Physiol**. 273(2):H546-56, 1997.
- SHEN, Y.; SCHALLER, M. D. Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. **Mol Biol Cell**. 10: 2507-2518, 1999.

- STEWART, A.; HAM, C.; ZACHARY, I. The focal adhesion kinase amino-terminal domain localizes to nuclei and intercellular junctions in HEK 293 and MDCK cells independently of tyrosine 397 and the carboxy-terminal domain. **Biochem Biophys Res Commun.** 299, 62-73, 2002.
- SUGDEN, P. H.; BOGOYEVITCH, M. A. Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. **Trends Cardiovasc Med.** 6: 87-94, 1996.
- SUGDEN, P. H.; CLERK, A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (C-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. **Circ Res.** 83: 345-352, 1998.
- SUGDEN, P. H. Mechanotransduction in Cardiomyocyte Hypertrophy. **Circulation.** 103: 1375-1377, 2001.
- SUSSMAN, M. A.; McCULLOCH, A.; BORG, T. K. Dance band of the titanic - biochemical signaling in cardiac hypertrophy. **Circ Res.** 91: 888-898, 2002.
- TAYLOR, J. M.; ROVIN, J. D.; PARSONS, J. T. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. **J Biol Chem** 275: 1920-19257, 2000.
- TERRACIO, L.; GULLBERG, D.; RUBIN, K.; CRAIG, S.; BORG, T.K. Expression of collagen adhesion proteins and their association with the cytoskeleton in cardiac myocytes. **Anat Rec.** 223: 62-71, 1989.
- TERRACIO, L.; RUBIN, K.; GULLBERG, D. et al. Expression of collagen-binding integrins during cardiac development and hypertrophy. **Circ Res.** 68: 734-744, 1991.
- THORBURN, J.; MCMAHON, M. THORBURN, A. Raf-1 kinase activity is necessary and sufficient for gene expression changes but not sufficient for cellular morphology changes associated with cardiac myocyte hypertrophy. **J Biol Chem.** 269: 30528-30586, 1994.

- TORSONI, A. S.; CONSTANCIO, S. S.; NADRUZ, W. JR.; HANKS, S. K.; FRANCHINI, K. G. Focal Adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. **Circ Res** 93: 140-147, 2003.
- TORSONI, A. S.; FONSECA, P. M.; ALBERTO-CROSSARA, D. P.; FRANCHINI, K. G. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. **Am J Physiol Cell Physiol**. 284: C1411-C1419, 2003.
- TOUTANT, M.; COSTA, A.; STUDLER, J. M.; KADARE, G.; CARNAUD, G.; GIRAULT, J. A. Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. **Mol Cell Biol** 22: 7731-7743, 2002.
- VAN BILSEN, M.; CHIEN, K. R. Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. **Cardiovasc Res** 27: 1140-1149, 1993.
- van de WALTER, B.; NAGELKERKE, J. F.; STEVES, J. L. Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells. **J Biol Chem** 274: 13328-13337, 1999.
- VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. **Nature Rev Cancer**. 2: 489-501, 2002.
- WAGNER, M.; MASCARENO, E.; SIDDIQUI, M. A. Q. Cardiac hypertrophy: Signal transduction, Transcriptional Adaptation, and altered growth control. **Ann N Y Acad Sci**. 874:1-10, 1999.
- WANG, K.; MCCLURE, J.; TU, A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. **Proc Natl Acad Sci USA**. 76: 3698-3702, 1979.
- WHEHRLE-HALLER, B.; IMHOF, B. A. The inner lives of focal adhesions. **Trends Cell Biol**. 12: 382-389, 2002.

- WU, Y.; LABEIT, S.; LEWINTER, M. M.; GRANZIER, H. Titin: an endosarcomeric protein that modulates myocardial stiffness in DCM. **J Card Fail.** 8 (6): S276-286, 2002.
- XING, Z.; CHEN, H. C.; NOWLEN, J. K.; TAYLOR, S. J.; SHALLOWAY, D.; GUAN, J. L. Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the SH2 domain. **Mol Biol Cell.** 5: 413-421, 1994.
- YI, X. P.; WANG, X.; GERDES, M. e LI, F. Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium. **Hypertension.** 41: 1317-1323, 2003.
- ZHANG, X.; CHATTOPADHYAY, A.; JL, Q. S.; OWEN, J. D.; RUEST, P. J.; CARPENTER, G.; HANKS, S. K. Focal adhesion kinase promotes phospholipase c-gamma 1 activity. **Proc Natl Acad Sci USA.** 96: 9021-9026, 1999.

8. *ANEXOS*

Em anexo encontram-se,

- Manuscritos relacionados a atividades paralelas desenvolvidas pelo o aluno durante o período de tese.

FONSECA, P. M.; SHIN, N. Y.; BRABEK, J.; RYZHOVA, L.; WU, J.; HANKS, S. K. Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation. **Cell Signal**. 16(5):621-629, 2004.

TORSONI, A. S.; FONSECA, P. M.; CROSARA-ALBERTO, D. P.; FRANCHINI, K. G. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. **Am J Physiol Cell Physiol**. 284(6): C1411-9, 2003.

DOMINGOS, P. P., FONSECA, P. M.; NADRUZ, W. JR; FRANCHINI, K. G. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 282(2): H556-64, 2002.

TAMBASCIA, R. C.; FONSECA, P. M.; CORAT, P. D.; MORENO, H. JR.; SAAD, M. J., FRANCHINI, K. G. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. **Hypertension**. 37(6): 1423-8, 2001.

Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation

Priscila M. Fonseca^{a,1}, Nah-Young Shin^{a,1}, Jan Brábek^{a,1}, Larisa Ryzhova^a,
Jiong Wu^b, Steven K. Hanks^{a,*}

^a Department of Cell and Developmental Biology, Vanderbilt University School of Medicine, U-4200 MCN Learned Laboratories, Nashville, TN 37232, USA

^b Cell Signaling Technology, Inc., 166B Cummings Center, Beverly, MA 01915, USA

Received 6 October 2003; received in revised form 10 October 2003; accepted 12 October 2003

Abstract

Crk-associated substrate (CAS) is a tyrosine kinase substrate implicated in integrin control of cell behavior. Phosphorylation, by Src family kinases, of multiple tyrosine residues in the CAS substrate domain (SD) is a major integrin signaling event that promotes cell motility. In this study, novel phosphospecific antibodies directed against CAS SD phosphotyrosine sites (“pCAS” antibodies) were characterized and employed to investigate the cellular regulation and localization of CAS SD tyrosine phosphorylation. An analysis of CAS and focal adhesion kinase (FAK) variants expressed in CAS- and FAK-deficient cell lines, respectively, indicated that CAS SD tyrosine phosphorylation is substantially achieved by Src family kinases brought into association with CAS through two distinct mechanisms: direct binding to the CAS Src-binding domain and indirect association through a FAK bridge. Cell immunostaining with pCAS antibodies revealed that CAS SD tyrosine phosphorylation occurs exclusively at sites of integrin adhesion including both nascent focal complexes formed at the edges of extending lamellipodia as well as mature focal adhesions underlying the cell body. These findings further document a role for FAK as an important upstream regulator of CAS SD tyrosine phosphorylation and implicate CAS-mediated signaling events in promoting membrane protrusion/lamellipodium extension during cell motility.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Crk-associated substrate; FAK; Phosphospecific antibodies; Src

1. Introduction

Integrin-mediated adhesion to the extracellular matrix affects diverse cell behaviors including motility, differentiation, proliferation, and survival and is thus critical for many physiological and pathological processes (reviewed in Refs. [1–4]). Integrin adhesion sites in cultured cells are commonly observed as “focal adhesions,” discrete ventral areas where the integrins cluster, mediate transmembrane linkage to the actin cytoskeleton, and transduce biochemical signals (reviewed in Refs. [5,6]). Cell motility requires focal adhesions to be dynamic structures that undergo regulated assembly and disassembly, which is achieved through the regulatory actions of Rho-family GTPases [5–8]. Activated Rac1 is important for assembly of nascent adhesions, termed “focal complexes,” that form along the

periphery of spreading cells and at the edges of leading lamellipodia [9–11]. Focal complexes mature into focal adhesions as they stabilize, and tension is exerted through cytoskeletal contraction triggered by activated RhoA [12]. Rac1 may also participate in the disassembly or turnover of focal adhesions during cell motility, through its ability to antagonize RhoA [13] and stimulate p21-activated kinase PAK [14].

In concert with their adhesive properties, integrins affect cell motility by activating intracellular signaling pathways that regulate Rho-family GTPases. Activation of focal adhesion kinase (FAK), a nonreceptor tyrosine kinase prominently localized to focal adhesions [15,16], is a major upstream event in integrin signaling. FAK signaling involves autophosphorylation on Tyr-397 and subsequent recruitment to this site of Src homology 2 (SH2) domain-containing signaling effectors including Src family kinases (SFKs) (reviewed in Refs. [17–19]). A positive role for FAK/SFK complexes in cell motility and invasion is supported by numerous studies (reviewed in Refs. [17–19]).

* Corresponding author. Tel.: +1-6153438502; fax: +1-6153434539.

E-mail address: steve.hanks@vanderbilt.edu (S.K. Hanks).

¹ These authors contributed equally to this work.

Crk-associated substrate (CAS) is a tyrosine kinase substrate implicated in integrin control of cell behavior (reviewed in Ref. [20]). CAS contains an N-terminal Src homology 3 (SH3) domain that binds to FAK and a C-terminal Src-binding domain (SBD) that includes a binding site for the SH3 domain of SFKs. Lying between the CAS SH3 domain and SBD is a substrate domain (SD) characterized by 15 Tyr-X-X-Pro (YxxP) motifs. SFKs, either directly bound to the CAS SBD or indirectly associated with CAS through a FAK bridge, are thought to phosphorylate many or all of the CAS SD YxxP tyrosines ([21] and see Discussion). Once phosphorylated, the SD serves as a docking site for recruitment of other SH2-containing effectors, including adaptor proteins of the Crk family [22,23]. The SH3 domains of Crk family members can interact with DOCK180, leading to Rac1 activation [24–27]. Along with its role in forming focal complexes, Rac1 stimulates the Arp2/3 complex to promote actin polymerization driving membrane protrusion [28,29]. Thus, lamellipodial extension driven by Rac1 activation achieved through the CAS/Crk complex could play an important role in integrin-mediated cell motility. Supporting this hypothesis, evidence has been obtained that CAS/Crk coupling promotes cell migration in a Rac-dependent manner [30]. Cellular responses to CAS SD tyrosine phosphorylation could also result from interactions of the Crk SH3 domain with other effectors including SOS and C3G, respective guanine nucleotide exchange factors for Ras and Rap1 [24,31–33], and from recruitment of other SH2-containing proteins to the phosphorylated SD YxxP sites including adaptors of the Nck family [34], and the SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 [35]. Some of these interactions could also contribute to cell motility. For example, Nck proteins can also stimulate Arp2/3-mediated actin polymerization [29,36], and mouse embryo fibroblasts (MEFs) from Nck1 -/- Nck2 -/- embryos have defects in lamellipodial actin organization and cell motility [37]. In addition to promoting motility, CAS SD tyrosine phosphorylation has been implicated in anchorage-dependent cell proliferation [38] and survival [39–41], transformation by oncogenic Src [42], and uptake of pathogenic bacteria [43].

Antibodies that specifically recognize sites of protein phosphorylation have proven to be extremely useful tools in signal transduction research [44]. Here, we report the development of antibodies directed against phosphorylated YxxP tyrosines of the CAS SD and their application toward understanding integrin signaling mechanisms and cellular CAS function. Through structure/function studies of FAK and CAS expressed in FAK -/- and CAS -/- MEFs, respectively, we determined that cellular CAS SD tyrosine phosphorylation is achieved through both FAK-dependent and FAK-independent mechanisms. Using immunofluorescence microscopy, we determined that activated CAS localizes specifically to sites of integrin adhesion and is found in both mature focal adhesions and nascent focal complexes. These findings provide convincing new evidence for how and where CAS functions in integrin control of cell behavior.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies

Polyclonal antibodies directed against CAS SD YxxP phosphotyrosines were produced by immunizing rabbits with one of three synthetic phosphopeptides corresponding to residues surrounding human CAS YxxP tyrosines 165, 249, or 410: FPSPATDL(pY)QV, GPQDI(pY)DVPPVR, and VVDSGV(pY)AVPPP, respectively, where (pY) indicates phosphotyrosine. The peptides were synthesized with N-terminal cysteine residues and coupled to KLH for immunization. The antibodies were affinity-purified from rabbit antisera by affinity chromatography steps using protein A columns to purify immunoglobulins followed by specific phosphopeptide (immunogen) columns to obtain the pCAS-165, pCAS-249, and pCAS-410 affinity-purified antibodies employed in this study. The anti-CAS monoclonal antibody (clone 21, here designated CAS-TL) and HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG antibodies were obtained from BD Transduction Laboratories. The anti-FAK polyclonal antibody C20 was from Santa Cruz Biotechnology. The anti-vinculin monoclonal antibody ascites fluid (clone hVIN-1) was from Sigma. Cy3-conjugated anti-mouse IgG and FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories.

2.2. Cells, cell culture, and fibronectin replating

CAS+/+ and CAS -/- MEFs [42], kindly provided by Hisamaru Hirai (U. Tokyo), were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The TetFAK cell lines employed for inducible expression of FAK variants [wild type (WT) or F397] were maintained and induced as described [45]. The fibronectin-replating experiment was carried out essentially as described [15].

2.3. Site-directed mutagenesis and expression of CAS and SRC variants

Point mutations were made in mouse CAS cDNA [46] to convert codons for YxxP tyrosines to encode phenylalanine ("FxxP mutations"), using sequential PCR steps [47]. To obtain specific products, primers of 27–29 nucleotides were designed and the annealing temperature was 59 °C. After verifying the mutations by sequencing, the cDNA was subcloned into retroviral vector LZRS-MS-IRES-GFP to allow expression of the CAS variants in conjunction with GFP expressed from a bicistronic transcript [48]. Three successive rounds of viral infection of CAS -/- MEFs were carried out over a 1-week period to increase GFP expression frequency, then two rounds of FACS sorting for cells with high GFP expression were carried out to obtain the cell populations used for study. The WT CAS cDNA and two previously described mutational variants, ΔSH3 (deleted

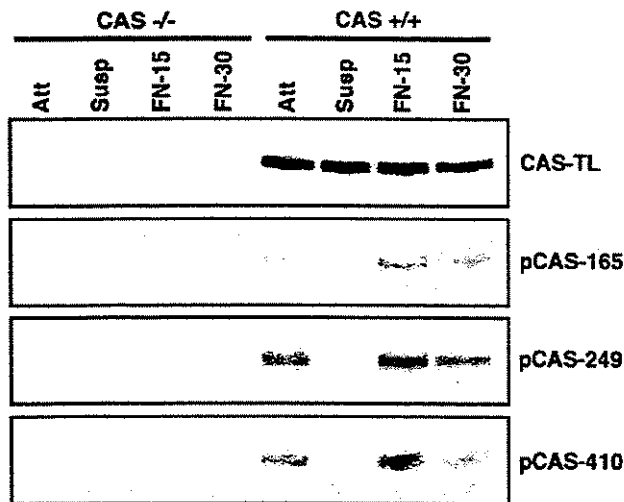


Fig. 2. The pCAS antibodies recognize CAS in an adhesion-dependent manner. Total cell lysates prepared from CAS^{-/-} and CAS^{+/+}MEFs that were either growing under normal attached conditions (Alt), detached by trypsin and held in suspension for 30 min (Susp), or replated onto fibronectin-coated dishes for 15 min (FN-15) or 30 min (FN-30). Replicate blots containing 15 μ g total protein per lane were prepared on nitrocellulose membranes and probed using either CAS-TL, pCAS-165, pCAS-249, or pCAS-410 antibodies as indicated.

bodies that specifically recognize phosphorylated YxxP tyrosines in the CAS SD. Hence, rabbits were immunized with one of three synthetic peptides containing phosphotyrosine residues representing either the 3rd, 7th, or 15th YxxP motif of human CAS corresponding to residues 165, 249, and 410 (equivalent to 169, 253, and 414 of murine CAS) (Fig. 1B and see Materials and methods). The resulting affinity-purified antibodies were designated “pCAS-165,” “pCAS-249,” and “pCAS-410.” In initial characterizations, each pCAS antibody preparation was shown to recognize, by immunoblotting, epitope-tagged mouse CAS

that had been expressed and immunoprecipitated from COS-7 cells, while phosphospecificity was demonstrated by loss of this immunoreactivity upon alkaline phosphatase treatment (data not shown).

To further examine the specificity and experimental usefulness of the pCAS antibodies, a series of immunoblot analyses were carried out on lysates prepared from either CAS^{+/+}MEFs or, as a negative control, CAS^{-/-}MEFs. First, a fibronectin-replating experiment was carried out to determine the ability of the pCAS antibodies to specifically recognize CAS in association with its becoming tyrosine-phosphorylated in response to integrin-mediated adhesion. As shown in Fig. 2 (right lanes), each pCAS antibody recognized a protein band of ~ 130 kDa, indicative of CAS, from lysates of adherent and fibronectin-replated CAS^{+/+} cells, but gave no signal on lysates prepared from cells held in suspension. Confirming the identity of the 130-kDa band as CAS, the pCAS antibodies showed no reactivity against lysates similarly prepared from CAS^{-/-}MEFs (Fig. 2, left lanes). Immunoblotting with the CAS-TL monoclonal antibody that recognizes total CAS protein confirmed both the lack of CAS expression in CAS^{-/-} cells and the presence of CAS in suspended CAS^{+/+} cells. The pCAS antibodies were next evaluated for their ability to detect increases in CAS phosphotyrosine content associated with either expression of SrcF529, an oncogenic variant of mouse Src, or treatment with vanadate which inhibits cellular tyrosine phosphatases. Although SrcF529 expression in CAS^{+/+}MEFs resulted in reduced recovery of CAS in the lysates as detected by the CAS-TL antibody, detection by each pCAS antibody was nevertheless enhanced relative to cells not expressing SrcF529 (Fig. 3A). Vanadate treatment had little effect on CAS-TL signal intensity, but resulted in a dramatic increase in signals obtained with each pCAS antibody (Fig. 3B). Even

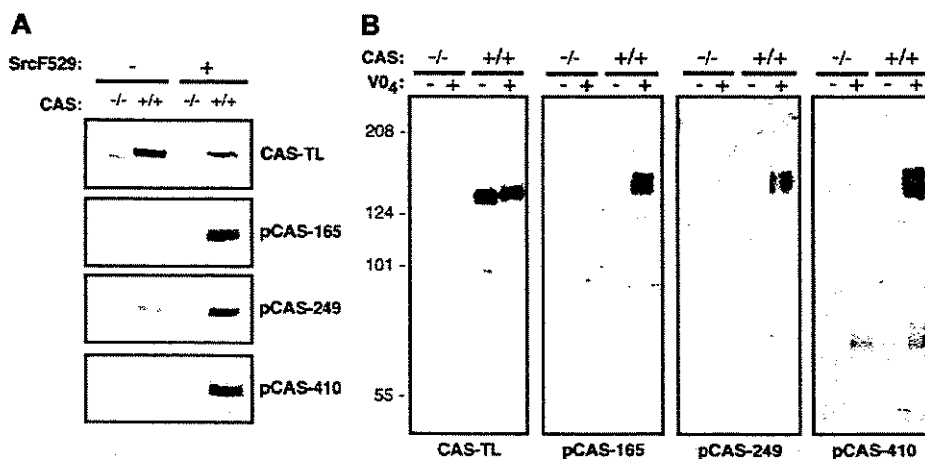


Fig. 3. The pCAS antibodies are sensitive toward tyrosine-phosphorylated CAS. Total cell lysates prepared from CAS^{-/-} and CAS^{+/+}MEFs were analyzed by immunoblotting. Replicate blots containing 15 μ g total protein per lane were prepared on nitrocellulose (for A) or PVDF (for B) membranes and probed using either CAS-TL, pCAS-165, pCAS-249, or pCAS-410 antibodies as indicated. (A) Effect of oncogenic Src expression. CAS^{-/-} and CAS^{+/+} cells that either expressed or did not express the oncogenic mutant of mouse c-Src (SrcF529) were analyzed. (B) Effect of vanadate treatment. Prior to lysis, cells were either pretreated with 500- μ M sodium vanadate for 6 h (VO₄⁺ lanes) or left untreated (VO₄⁻ lanes). Numbers indicate positions of molecular size markers, in kDa.

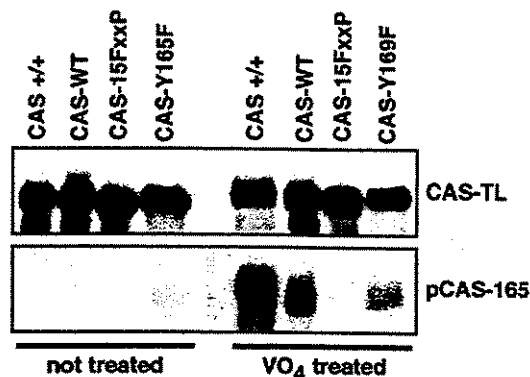


Fig. 4. The pCAS-165 antibody recognizes mouse CAS lacking only the third YxxP tyrosine but not a mutant lacking all 15 YxxP tyrosines. Total cell lysates were prepared from CAS^{+/+}MEFs and from CAS^{-/-}MEFs engineered to stably express either WT CAS, CAS-Y169F in which the third YxxP tyrosine residue was changed to phenylalanine, or CAS-15FxxP in which all 15 YxxP tyrosines were changed to phenylalanine. Prior to lysis, cells were either pretreated with 500 μ M sodium vanadate for 6 h ("VO₄-treated" lanes) or left untreated ("not treated" lanes). Replicate blots containing 25- μ g total protein per lane were prepared on PVDF membranes and probed using either CAS-TL or pCAS-165 as indicated.

after vanadate treatment, the pCAS-165 and -249 antibodies showed little or no cross-reactivity with other proteins, while pCAS-410 recognized another broad band of ~ 70 kDa. The dependency of pCAS antibody reactivity on CAS expression and cell adhesion, along with the enhanced reactivity seen upon oncogenic Src expression and vanadate treatment, demonstrate that each of the three pCAS antibodies has specificity for CAS phosphotyrosine sites.

The pCAS-165 antibody was further characterized to determine its specificity for phosphorylated CAS YxxP tyrosines. For this analysis, CAS^{-/-}MEFs were engineered to stably express one of three variants of the mouse CAS protein: WT CAS, a CAS mutant (CAS-Y169F) in which the equivalent of human CAS Tyr-165 was changed to phenylalanine, or a CAS mutant (CAS-15FxxP) in which all 15 YxxP tyrosine residues were changed to phenylalanine. Immunoblot analysis of whole cell lysates revealed that the pCAS-165 antibody failed to recognize the CAS-15FxxP mutant, but still exhibited significant reactivity toward CAS-Y169F (Fig. 4). Thus, while pCAS-165 is not strictly specific for the third YxxP site against which it was raised, this antibody is nevertheless specific toward phosphorylated CAS YxxP sites. The pCAS-249 and -410 antibodies were also unable to recognize CAS-15FxxP (data not shown), although these too recognized CAS variants carrying phenylalanine substitutions corresponding to the YxxP tyrosine contained in the respective immunogens (see Discussion). Even though they are not specific for single sites, the pCAS antibodies nevertheless are highly selective and sensitive indicators of CAS SD tyrosine phosphorylation at multiple YxxP sites, and thus useful reagents for studies on CAS signaling.

3.2. Regulation of CAS SD tyrosine phosphorylation

Although CAS can directly interact with FAK, studies have indicated that SFKs, rather than FAK, are primarily responsible for tyrosine phosphorylation of CAS (see Discussion). However, it remains unclear if this is achieved primarily through direct SFK binding to the CAS SBD or if a second mechanism, whereby the SFK is indirectly recruited to FAK-associated CAS through the interaction of the SFK SH2 domain with FAK phosphotyrosine-397, substantially contributes to CAS tyrosine phosphorylation. Moreover, past studies detecting CAS phosphotyrosine have relied on general anti-phosphotyrosine antibodies, thus yielding signals not necessarily reflective of YxxP phosphotyrosines. The pCAS antibodies allow a direct assessment of the mechanism of CAS SD tyrosine phosphorylation.

Using the pCAS antibodies, CAS SD tyrosine phosphorylation was examined in CAS^{-/-}MEFs engineered to stably express either WT mouse CAS, a CAS mutant in which the FAK-binding SH3 domain was deleted (CAS-

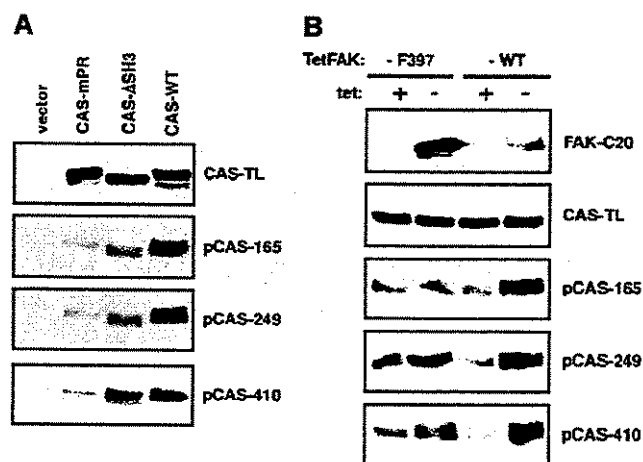


Fig. 5. FAK-dependent and -independent mechanisms regulate CAS SD tyrosine phosphorylation. (A) Both the CAS SH3 domain and the binding site for the Src SH3 domain are required for maximal SD tyrosine phosphorylation. Total cell lysates were prepared from CAS^{-/-}MEFs engineered to stably express either WT CAS, CAS-mPR in which the RPLSPSP motif in the Src-binding domain was changed to RAAASPP, or CAS Δ SH3 in which the SH3 domain was deleted. CAS^{-/-} cells harboring the retroviral vector with no insert ("vector" lanes) served as a negative control. Prior to lysis, cells were treated with 250 μ M sodium vanadate for 6 h. Replicate blots containing 3.5–10 μ g total protein per lane (adjusted to obtain comparable amounts of CAS protein) were prepared on nitrocellulose membranes and probed using either CAS-TL, pCAS-165, pCAS-249, or pCAS-410 antibodies as indicated. (B) FAK expression enhances CAS SD tyrosine phosphorylation. Cells were treated with 250 μ M vanadate for 6 h, then total cell lysates were prepared from TetFAK cell lines, either uninduced ("tet +" lanes) or induced by tetracycline withdrawal ("tet -" lanes) to express either WT FAK ("TetFAK-WT" lanes) or the FAK-Y397F mutant ("TetFAK-F397" lanes). Replicate blots containing 10 μ g total protein per lane were prepared on nitrocellulose membranes and probed as indicated using either anti-FAK C20, CAS-TL, pCAS-165, pCAS-249, or pCAS-410 antibodies.

Crk-associated substrate (CAS) is a tyrosine kinase substrate implicated in integrin control of cell behavior (reviewed in Ref. [20]). CAS contains an N-terminal Src homology 3 (SH3) domain that binds to FAK and a C-terminal Src-binding domain (SBD) that includes a binding site for the SH3 domain of SFKs. Lying between the CAS SH3 domain and SBD is a substrate domain (SD) characterized by 15 Tyr-X-X-Pro (YxxP) motifs. SFKs, either directly bound to the CAS SBD or indirectly associated with CAS through a FAK bridge, are thought to phosphorylate many or all of the CAS SD YxxP tyrosines ([21] and see Discussion). Once phosphorylated, the SD serves as a docking site for recruitment of other SH2-containing effectors, including adaptor proteins of the Crk family [22,23]. The SH3 domains of Crk family members can interact with DOCK180, leading to Rac1 activation [24–27]. Along with its role in forming focal complexes, Rac1 stimulates the Arp2/3 complex to promote actin polymerization driving membrane protrusion [28,29]. Thus, lamellipodial extension driven by Rac1 activation achieved through the CAS/Crk complex could play an important role in integrin-mediated cell motility. Supporting this hypothesis, evidence has been obtained that CAS/Crk coupling promotes cell migration in a Rac-dependent manner [30]. Cellular responses to CAS SD tyrosine phosphorylation could also result from interactions of the Crk SH3 domain with other effectors including SOS and C3G, respective guanine nucleotide exchange factors for Ras and Rap1 [24,31–33], and from recruitment of other SH2-containing proteins to the phosphorylated SD YxxP sites including adaptors of the Nck family [34], and the SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 [35]. Some of these interactions could also contribute to cell motility. For example, Nck proteins can also stimulate Arp2/3-mediated actin polymerization [29,36], and mouse embryo fibroblasts (MEFs) from Nck1 $-/-$ Nck2 $-/-$ embryos have defects in lamellipodial actin organization and cell motility [37]. In addition to promoting motility, CAS SD tyrosine phosphorylation has been implicated in anchorage-dependent cell proliferation [38] and survival [39–41], transformation by oncogenic Src [42], and uptake of pathogenic bacteria [43].

Antibodies that specifically recognize sites of protein phosphorylation have proven to be extremely useful tools in signal transduction research [44]. Here, we report the development of antibodies directed against phosphorylated YxxP tyrosines of the CAS SD and their application toward understanding integrin signaling mechanisms and cellular CAS function. Through structure/function studies of FAK and CAS expressed in FAK $-/-$ and CAS $-/-$ MEFs, respectively, we determined that cellular CAS SD tyrosine phosphorylation is achieved through both FAK-dependent and FAK-independent mechanisms. Using immunofluorescence microscopy, we determined that activated CAS localizes specifically to sites of integrin adhesion and is found in both mature focal adhesions and nascent focal complexes. These findings provide convincing new evidence for how and where CAS functions in integrin control of cell behavior.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies

Polyclonal antibodies directed against CAS SD YxxP phosphotyrosines were produced by immunizing rabbits with one of three synthetic phosphopeptides corresponding to residues surrounding human CAS YxxP tyrosines 165, 249, or 410: FPSPATDL(pY)QV, GPQDI(pY)DVPPVR, and VVDSGV(pY)AVPPP, respectively, where (pY) indicates phosphotyrosine. The peptides were synthesized with N-terminal cysteine residues and coupled to KLH for immunization. The antibodies were affinity-purified from rabbit antisera by affinity chromatography steps using protein A columns to purify immunoglobulins followed by specific phosphopeptide (immunogen) columns to obtain the pCAS-165, pCAS-249, and pCAS-410 affinity-purified antibodies employed in this study. The anti-CAS monoclonal antibody (clone 21, here designated CAS-TL) and HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG antibodies were obtained from BD Transduction Laboratories. The anti-FAK polyclonal antibody C20 was from Santa Cruz Biotechnology. The anti-vinculin monoclonal antibody ascites fluid (clone hVIN-1) was from Sigma. Cy3-conjugated anti-mouse IgG and FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories.

2.2. Cells, cell culture, and fibronectin replating

CAS $+/+$ and CAS $-/-$ MEFs [42], kindly provided by Hisamaru Hirai (U. Tokyo), were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The TetFAK cell lines employed for inducible expression of FAK variants [wild type (WT) or F397] were maintained and induced as described [45]. The fibronectin-replating experiment was carried out essentially as described [15].

2.3. Site-directed mutagenesis and expression of CAS and SRC variants

Point mutations were made in mouse CAS cDNA [46] to convert codons for YxxP tyrosines to encode phenylalanine ("FxxP mutations"), using sequential PCR steps [47]. To obtain specific products, primers of 27–29 nucleotides were designed and the annealing temperature was 59 °C. After verifying the mutations by sequencing, the cDNA was subcloned into retroviral vector LZRS-MS-IRES-GFP to allow expression of the CAS variants in conjunction with GFP expressed from a bicistronic transcript [48]. Three successive rounds of viral infection of CAS $-/-$ MEFs were carried out over a 1-week period to increase GFP expression frequency, then two rounds of FACS sorting for cells with high GFP expression were carried out to obtain the cell populations used for study. The WT CAS cDNA and two previously described mutational variants, Δ SH3 (deleted

SH3 domain) and mPR (RPLSPSP in SBD changed to RAAASPP) [21], were similarly expressed in CAS^{−/−} MEFs using the LZRS-MS-IRES-GFP vector. Similar approaches were taken to generate a cDNA encoding the oncogenic mouse c-Src (Src-Y529F), in which the regulatory C-terminal tyrosine was changed to phenylalanine, and achieve its expression in CAS^{−/−} and CAS^{+/+} MEFs.

2.4. Immunoblotting

Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) then lysed in RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% nonidet P40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 1% aprotinin, and 0.1 mM sodium orthovanadate]. Protein concentrations in the lysates were determined using the bicinchoninic acid protein assay (Pierce, Rockford, MD), and equivalent amounts of total protein were resolved by 7% acrylamide SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose or PVDF membrane. Membranes were blocked 1–2 h in Tris-buffered saline containing 0.2% Tween 20 (TBST) and 5% nonfat dry milk solution, then incubated overnight with primary antibody made up in the blocking solution (0.2 µg/ml for CAS-TL and FAK-C20, 0.03 µg/ml for pCAS antibodies). After extensive washing in TBST, the blots were incubated 1 h with HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibodies, washed extensively in TBST, developed using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), and exposed to autoradiographic film. In some cases, to enhance CAS phosphotyrosine content, cells were treated with 250–500 µM sodium orthovanadate for 6 h prior to lysis.

2.5. Cell immunostaining

Cells were plated on glass coverslips coated with 10 µg/ml human plasma fibronectin and incubated either 2 or 12 h at 37 °C to allow for attachment and spreading. Cells were then washed with serum-free media, fixed in 50% methanol/50% acetone for 5 min at −20 °C, washed three times with PBS, and blocked for 1 h with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA). Immunostaining was then achieved by incubating the cells for 12 h at 4 °C with PBS containing 1% BSA, anti-vinculin monoclonal antibody (1:1000 dilution of ascites fluid), and a pCAS affinity-purified polyclonal antibody (0.3 µg/ml). The cells were then washed three times with PBS and incubated 1 h at room temperature in PBS containing 1% BSA and FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:300 dilution). The cells were again washed three times with PBS and incubated 1 h at room temperature in PBS containing 1% BSA and Cy3-conjugated goat anti-mouse antibody (1:300 dilution). After a final wash in PBS, the coverslips were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and viewed using a Zeiss Axioskop 2 microscope equipped for epifluorescence.

3. Results

3.1. Antibodies directed against CAS SD phosphotyrosine sites

Fig. 1 shows the overall structure of CAS and sequence of the SD with YxxP repeats aligned. To support studies on CAS signaling, we sought to develop phosphospecific anti-

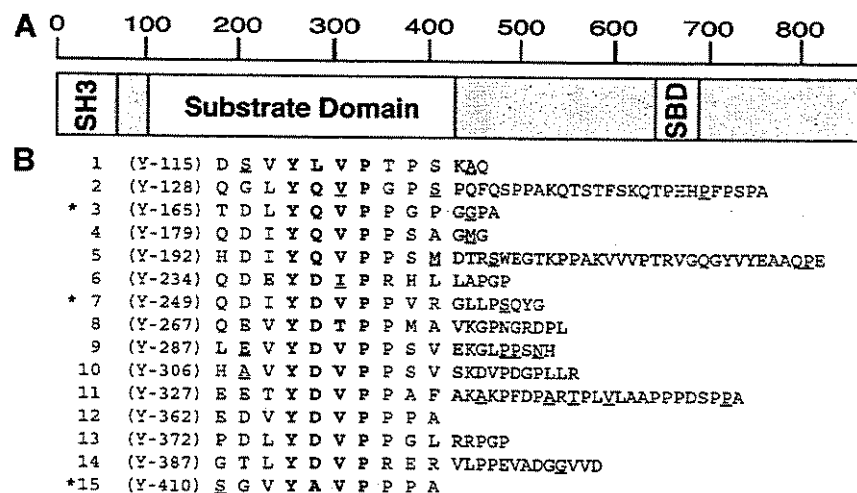


Fig. 1. CAS structural domains and sequence of the SD showing YxxP repeats. (A) Diagram of CAS primary structure showing locations of major domains. Scale bar indicates amino acid number. (B) Sequence of the human CAS SD, with alignment for the 15 YxxP repeats (bold type). Numbers in parentheses indicate amino acid position of the subsequent YxxP tyrosine residue. For murine CAS, these numbers would be incremented by 4, owing to an insertion between the SH3 and SD. Underlined residues are not conserved in murine CAS. Asterisks indicate the three YxxP sites against which pCAS antibodies were raised.

Δ SH3), or a CAS mutant in which the Src SH3-binding site in the SBD was disrupted (CAS-mPR). Immunoblot analysis indicated that each pCAS antibody exhibited significantly less reactivity toward both CAS- Δ SH3 and CAS-mPR, in comparison to WT CAS (Fig. 5A). The loss of pCAS antibody immunoreactivity was most striking for the mPR mutant, suggesting that the direct SFK interaction with the CAS SBD has a major role in promoting CAS SD tyrosine phosphorylation. But clearly, the CAS SH3 domain is also required to achieve maximal SD phosphorylation, consistent with the notion that CAS SD phosphorylation is also substantially achieved by SFKs recruited to CAS via the FAK bridge. To further test the role of FAK in CAS SD tyrosine phosphorylation, we determined pCAS antibody reactivities on blots prepared from lysates of “TetFAK” cell lines. TetFAK-WT and TetFAK-F397 cells express WT FAK and FAK-Y397F, respectively, upon tetracycline withdrawal

from the culture media. Expression of WT FAK resulted in a significant enhancement of CAS SD tyrosine phosphorylation as detected by each of the three pCAS antibodies, while expression of FAK-Y397F (unable to interact with SFKs) had no obvious effect (Fig. 5B). Taken together, these results indicate that CAS SD tyrosine phosphorylation is substantially achieved through two mechanisms: direct SFK association with the CAS SBD and indirect SFK association through a FAK bridge.

3.3. Subcellular localization of CAS SD tyrosine phosphorylation

Since vanadate greatly enhances pCAS antibody signals, cellular CAS SD phosphotyrosine must be rapidly turned over through actions of tyrosine phosphatases. Thus, at any given time, only a small fraction of the total cellular pool of

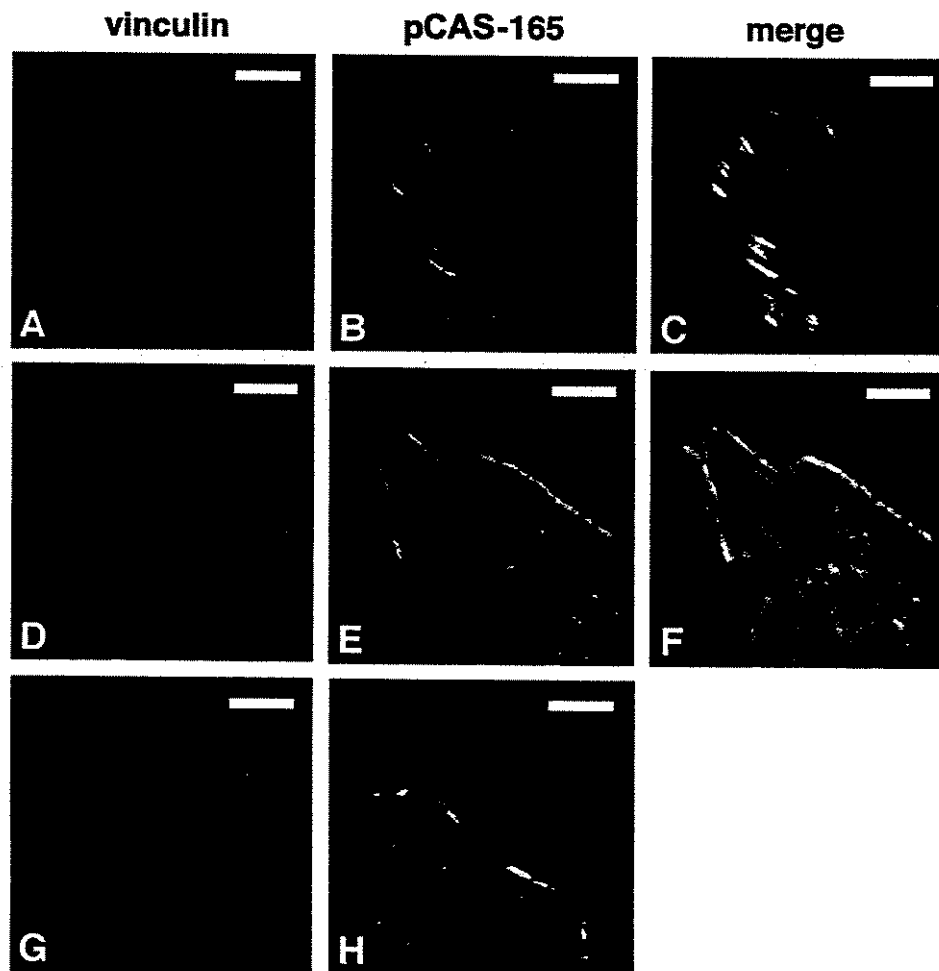


Fig. 6. The CAS SD is phosphorylated in mature focal adhesions and nascent peripheral focal complexes. Indirect immunofluorescence microscopy was used to determine subcellular sites of CAS SD tyrosine phosphorylation in CAS+/+ MEFs, as visualized using the pCAS-165 antibody (panels B, E, H; FITC-conjugated secondary antibody, green color) and co-staining with a monoclonal antibody against vinculin (panels A, D, G; Cy3-conjugated secondary antibody, red color). Merged images of panels A and B or panels D and E are shown in panels C and F, respectively (areas of co-localization represented by yellow color). Panels A–C show an extended region of a cell fixed and stained 12 h after plating on fibronectin. Panels D–F show part of a cell fixed and stained after 2 h on fibronectin. Panels G and H show the edge of a cell extending into a monolayer wound. Note that the pCAS-165 antibody stains mature focal adhesions (panels A–C) and focal complexes at the peripheries of spreading (panels A–F) and migrating (panels G and H) cells. Scale bars are 10 μ m.

CAS will be competent to engage in phosphotyrosine-mediated signaling. Knowing the subcellular location of signaling-competent CAS molecules would provide valuable insight into the regulation and biological role of CAS signaling. Hence, the pCAS-165 antibody was tested for its ability to recognize CAS by cell immunostaining.

Initially, CAS+/+MEFs were examined after growing overnight on fibronectin-coated coverslips, allowing the formation of prominent mature focal adhesions that can be readily visualized using an antibody against vinculin. The pCAS-165 antibody stained the mature focal adhesions with very high specificity as judged by vinculin co-staining (Fig. 6, panels A–C). To determine if phosphorylation of CAS YxxP tyrosines is associated with cell/matrix adhesions as they newly form, CAS+/+MEFs were fixed for immunostaining soon after plating onto fibronectin while they are still undergoing the spreading process. Under this condition, pCAS-165 differentially stained cell adhesion sites, as compared to the vinculin antibody, with strongest immunoreactivity observed in focal complexes at the extreme cell edges (Fig. 6, panels D–F). While pCAS-165 also stained adhesions forming under the cell body, this immunoreactivity was notably weak compared to staining by the anti-vinculin antibody (Fig. 6, panels D–F). The pCAS-165 antibody was further used to stain CAS+/+MEFs that had been allowed to grow to confluency and then “wounded” by scratching the cell monolayer with a pipette tip. Cells at the wound edge send out lamellipodial projections as they migrate in to fill the denuded area, and pCAS-165 prominently stained the focal complexes of such projections (Fig. 5, panels G and H). As a demonstration of immunostaining specificity, the pCAS-165 antibody failed to stain either focal adhesions or focal complexes of either CAS –/– MEFs or these cells expressing the 15FxxP CAS mutant (data not shown). Thus, signaling events resulting from CAS SD tyrosine phosphorylation can occur both within nascent focal complexes as they form along the cell leading edge as well as in the mature focal adhesions that underlie the cell body.

4. Discussion

Phosphorylation by SFKs of YxxP tyrosine residues in the CAS SD has emerged as a major integrin signaling event implicated in cell motility. We have developed and extensively characterized novel “pCAS” phosphospecific antibodies directed against CAS SD YxxP phosphotyrosine sites. The pCAS antibodies were employed to investigate mechanisms and subcellular sites of CAS SD tyrosine phosphorylation. Our results indicate that cellular CAS SD tyrosine phosphorylation is achieved through distinct FAK-dependent and -independent mechanisms. We further demonstrate that CAS SD tyrosine phosphorylation is observed exclusively at sites of integrin-mediated cell adhesion, including both nascent focal complexes formed at the edges

of extending lamellipodia as well as mature focal adhesions underlying the cell body.

The experimental usefulness of phosphospecific antibodies is limited by the extent to which they exhibit specific binding activity. For each of the three pCAS antibodies, specificity toward CAS was demonstrated by lack of immunoblot reactivity toward lysates from vanadate-treated CAS –/– MEFs and acquired immunoreactivity upon expression of WT CAS in these cells. That each pCAS antibody specifically recognizes CAS SD YxxP phosphotyrosine sites was demonstrated by the dramatic increase in CAS immunoreactivity resulting from vanadate treatment and, more importantly, the lack of reactivity toward the CAS-15FxxP mutant. The pCAS antibodies are not strictly specific toward the phosphorylated YxxP sites against which they were raised, however. For pCAS-165, this was evident from the immunoreactivity against the mouse CAS-Y169F variant (murine Tyr-169 being equivalent to human Tyr-165) expressed in CAS –/– cells. Similarly, through transient expression in COS-7 cells, we have observed that the pCAS-249 and -410 antibodies recognize CAS variants containing single phenylalanine substitutions for the YxxP tyrosines contained in their respective immunogens (L. R., N.-Y. S., and S. K. H., unpublished observations). Given the similarity of the YxxP motifs and flanking sequences, it is not surprising that the pCAS antibodies are not single-site specific. Nevertheless, the pCAS antibodies are valuable reagents for monitoring the signaling capacity of CAS.

In addition to activated CAS, the pCAS-410 antibody recognizes by immunoblotting a broad protein band of ~ 70 kDa. Based on its electrophoretic mobility, combined with our observation that pCAS-410 weakly stains focal adhesions in CAS –/– MEFs (P. M. F., N.-Y. S., and S. K. H., unpublished observation), it seems likely that the ~ 70-kDa protein represents tyrosine-phosphorylated paxillin. Notably, the two major tyrosine sites phosphorylated in paxillin, residues 31 and 118 [49], exist within YxxP motifs. In cell immunostaining, the pCAS-249 antibody, in addition to recognizing adhesion sites, gives a particulate cytoplasmic staining pattern in both CAS+/+ and CAS –/– MEFs, indicating that this antibody cross-reacts with a nonfocal adhesion component in this condition (P. M. F., N.-Y. S., and S. K. H., unpublished observation).

We employed the pCAS antibodies to investigate the mechanism of CAS SD tyrosine phosphorylation. Previous studies have implicated SFKs as being primarily responsible for CAS SD tyrosine phosphorylation in integrin signaling [21,50]. Through its SH3 domain, Src binds to the RPLSPSP motif in the CAS SBD [51], which can induce Src kinase activity and CAS phosphorylation [52,53]. Nonetheless, a second mechanism involving FAK could also contribute to CAS SD tyrosine phosphorylation. FAK could recruit SFKs to phosphorylate the CAS SD via simultaneous interactions of its proline-rich motifs with the CAS SH3 domain and its phosphorylated Tyr-397 site with the Src SH2 domain. Supporting this “FAK-

bridge” mechanism, expression of a constitutively active FAK variant (CD2FAK) was shown to dramatically elevate CAS phosphotyrosine content [22], while we have obtained evidence that the FAK-bridge mechanism is more efficient in promoting CAS tyrosine phosphorylation in comparison to SFKs directly bound to the CAS SBD [21]. As judged by pCAS antibody immunoreactivity, CAS mutants in which either the Src SH3 binding site was disrupted (CAS-mPR) or the SH3 domain deleted (CAS- Δ SH3) both exhibited significantly reduced CAS SD phosphotyrosine content as compared to WT CAS. The effect on CAS SD phosphotyrosine content was much more striking for CAS-mPR in comparison to CAS- Δ SH3, suggesting that direct interaction of SFKs with the CAS SBD may be the major mechanism of CAS SD tyrosine phosphorylation. However, these results must be considered in light of CAS SH3 domain multifunctionality. In addition to FAK, CAS SH3 interacts with tyrosine phosphatases PTP1B [54] and PTP-PEST [55], suggesting a function for this domain as a molecular switch regulating both CAS phosphorylation and dephosphorylation. Hence, deletion of the CAS SH3 domain might also be expected to enhance CAS SD phosphotyrosine content due to lack of phosphatase binding. Although we treated cells expressing the CAS variants with vanadate to enhance detection by the pCAS antibodies, tyrosine phosphatases bound to the CAS SH3 domain could still have impacted on the observed pCAS antibody signals as a result of their actions prior to vanadate treatment or from their incomplete inhibition. Thus, the role of FAK/SFK complexes in promoting CAS SD tyrosine phosphorylation could be more substantial than suggested by the data obtained from analyzing the CAS mutants. Indeed, our analysis of Tet-FAK cells further implicated the FAK/SFK complex as a major regulator of CAS SD tyrosine phosphorylation. In these cells, induced expression of WT FAK resulted in a substantial enhancement of pCAS antibody signals, while FAK-Y397F expression had no effect. Thus, we conclude that CAS SD tyrosine phosphorylation is achieved through SFKs either directly bound to the CAS SBD or indirectly associated with CAS through a FAK bridge, with both mechanisms making substantial contributions. Why two mechanisms exist to achieve CAS SD tyrosine phosphorylation is an interesting question open to speculation. One possibility is that the different mechanisms target distinct YxxP sites which could differentially activate downstream signaling events.

Of the three pCAS antibodies, pCAS-165 is best suited for cell immunostaining studies. Using this antibody to stain CAS+/+MEFs, we determined that CAS SD tyrosine phosphorylation occurs exclusively at sites of integrin-mediated adhesion. Notably, pCAS-165 immunoreactivity is enriched in focal complexes along the edges of extending lamellipodia. This observation supports the notion that CAS signaling via recruitment of Crk- and/or Nck-family adaptor proteins could drive lamellipodial extension

through localized Rac1 activation at the leading edge. Past support for this idea has come from biochemical studies showing enrichment of tyrosine-phosphorylated CAS, CAS/Crk complexes, and active Rac in pseudopodia (lamellipodia-like projections) induced by a chemoattractant [56]. By promoting localized Rac1 activation at focal complexes to drive further lamellipodial extension, CAS signaling could act to maintain the direction of movement in cell motility. This could explain why cells deficient in FAK signaling have poor directional persistence in cell motility [57].

In addition to the nascent focal complexes, the pCAS-165 antibody stains mature focal adhesions. Previous reports have documented focal adhesion staining by certain other anti-CAS antibodies raised against unphosphorylated immunogens [58,59]. Unlike the pCAS antibodies, however, these antibodies also exhibited considerable staining of other cellular sites including stress fibers and nuclei [58], and cytoplasm [59]. The ability of anti-CAS antibodies to stain focal adhesions is correlated with their ability to recognize the tyrosine-phosphorylated protein [58,59]. Immunostaining with the CAS-TL antibody, which shows no specificity toward tyrosine-phosphorylated CAS, shows a strong cytoplasmic staining of CAS+/+MEFs (not seen in CAS-/-MEFs) with very little staining of adhesion sites (P. M. F., N.-Y. S., and S. K. H., unpublished observation). Thus, only a small fraction of CAS may be present in the adhesive sites where it is subject to tyrosine phosphorylation. While CAS SD tyrosine phosphorylation in focal complexes is implicated in the process of lamellipodium extension, a functional role for this integrin signaling event in the mature focal adhesions is more open to speculation. Given that Rac1 activation of PAK kinases has also been implicated in focal adhesion turnover [14], it is possible that CAS SD tyrosine phosphorylation within focal adhesions could play a role in regulating this process and thus further stimulate cell motility. Alternatively, CAS signals originating from mature focal adhesions may be important for cell survival/proliferation functions of CAS. It will be of interest for future studies to determine if CAS SD phosphorylation leads to different downstream signals in focal adhesions versus focal complexes.

Acknowledgements

We thank Pranathi Matta for technical assistance, Gary Olson and Ginger Winfrey for help with immunofluorescence microscopy, and Hisamaru Hirai and Amy Bouton for providing cells.

This work was primarily supported by grants GM49882 from the National Institute of General Medical Sciences, DK56018 from the National Institute of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases, and utilized core facilities supported by the Vanderbilt Diabetes Research Training Center and the Vanderbilt-Ingram Cancer Center.

References

- [1] Bökel C, Brown NH. *Dev Cell* 2002;3:311–21.
- [2] Hood JD, Cheresch DA. *Nat Rev, Cancer* 2002;2:91–100.
- [3] Hynes RO. *Cell* 2002;110:673–87.
- [4] Miranti CK, Brugge JS. *Nat Cell Biol* 2002;4:83–90.
- [5] Petit V, Thiery J-P. *Biol Cell* 2000;92:477–94.
- [6] Sastry SK, Burrige K. *Exp Cell Res* 2000;261:25–36.
- [7] Zamir E, Geiger BJ. *Cell Sci* 2001;114:3583–90.
- [8] Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:746–61.
- [9] Nobes CD, Hall A. *Cell* 1995;81:53–62.
- [10] Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO. *J Cell Biol* 1998;142:573–86.
- [11] Rottner K, Hall A, Small JV. *Curr Biol* 1999;9:640–8.
- [12] Chrzanowska-Wodnicka M, Burrige K. *J Cell Biol* 1996;133:1403–15.
- [13] Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Col-lard JG. *J Cell Biol* 1999;147:1009–22.
- [14] Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L. *Mol Cell Biol* 2000;20:6354–63.
- [15] Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8487–91.
- [16] Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5192–6.
- [17] Schaller MD. *Biochim. Biophys. Acta* 2001;1540:1–21.
- [18] Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. *IUBMB Life* 2002;53:115–9.
- [19] Hanks SK, Shin N-Y, Ryzhova L, Bråbek J. *Front Biosci* 2003;8:D982–96.
- [20] Bouton AH, Riggins RB, Bruce-Staskal PJ. *Oncogene* 2001;20:6448–58.
- [21] Ruest PJ, Shin N-Y, Polte TR, Zhang X, Hanks SK. *Mol Cell Biol* 2001;21:7641–52.
- [22] Vuori K, Hirai H, Aizawa S, Ruoslahti E. *Mol Cell Biol* 1996;16:2606–13.
- [23] Burnham MR, Harte MT, Richardson A, Parsons JT, Bouton AH. *Oncogene* 1996;12:2467–72.
- [24] Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M, Vuori K. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15394–9.
- [25] Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Kurata T, Sugimura H, Matsuda M. *J Biol Chem* 1998;273:24479–84.
- [26] Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M. *Genes Dev* 1998;12:3331–6.
- [27] Cheresch DA, Leng J, Klemke RL. *J Cell Biol* 1999;146:1107–16.
- [28] Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T. *Nature* 2000;408:732–5.
- [29] Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW. *Nature* 2002;418:790–3.
- [30] Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresch DA. *J Cell Biol* 1998;140:961–72.
- [31] Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S, Nakamura S, Hatton S. *Mol Cell Biol* 1994;14:5495–500.
- [32] Gotoh T, Hattori S, Nakamura S, Kitayama H, Noda M, Takai Y, Kaibuchi K, Matsui H, Hatase O, Takahashi H, Kurata T, Matsuda M. *Mol Cell Biol* 1995;15:6746–53.
- [33] Xing L, Ge C, Zeltser R, Maskevitch G, Mayer BJ, Alexandropoulos K. *Mol Cell Biol* 2000;20:7363–737.
- [34] Schlaepfer DD, Broome MA, Hunter T. *Mol Cell Biol* 1997;17:1702–13.
- [35] Prasad N, Topping RS, Decker SJ. *Mol Cell Biol* 2001;21:1416–28.
- [36] Rohatgi R, Nollau P, Ho HY, Kirschner MW, Mayer BJ. *J Biol Chem* 2001;276:26448–52.
- [37] Bladt F, Aippersbach E, Gelkop S, Strasser GA, Nash P, Tafuri A, Gertler FB, Pawson T. *Mol Cell Biol* 2003;23:4586–97.
- [38] Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, Giancotti FG. *J Cell Biol* 1999;145:1461–9.
- [39] Almeida EA, Ilic D, Han Q, Hauck CR, Jin F, Kawakatsu H, Schlaepfer DD, Damsky CH. *J Cell Biol* 2000;149:741–54.
- [40] Cho S, Klemke RL. *J Cell Biol* 2000;149:223–36.
- [41] Wei L, Yang Y, Zhang X, Yu Q. *J Cell Biochem* 2002;87:439–49.
- [42] Honda H, Oda H, Nakamoto T, Honda Z, Sakai R, Suzuki T, Saito T, Nakamura K, Nakao K, Isikawa T, Katsuki M, Yazaki Y, Hirai H. *Nat Genet* 1998;19:361–5.
- [43] Weidow CL, Black DS, Bliska JB, Bouton AH. *Cell Microbiol* 2000;2:549–60.
- [44] Nagata K, Izawa I, Inagaki M. *Genes Cells* 2001;6:653–64.
- [45] Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. *Mol Cell Biol* 1999;19:4806–18.
- [46] Polte TR, Hanks SK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10678–82.
- [47] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith K, Struhl K, editors. *Short protocols in molecular biology*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 1995.
- [48] Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrician L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB. *J Cell Biol* 2002;159:465–76.
- [49] Schaller MD, Parsons JT. *Mol Cell Biol* 1995;15:2635–45.
- [50] Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. *EMBO J* 1999;18:2459–71.
- [51] Nakamoto T, Sakai R, Ozawa K, Yazaki Y, Hirai H. *J Biol Chem* 1996;271:8959–65.
- [52] Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, Weidow CL, Ma A, Weed SA, Bouton AH. *Mol Cell Biol* 2000;20:5865–78.
- [53] Pellicena P, Miller WT. *J Biol Chem* 2001;276:28190–6.
- [54] Liu F, Hill DE, Chernoff J. *J Biol Chem* 1996;271:31290–5.
- [55] Garton AJ, Burnham MR, Bouton AH, Tonks NK. *Oncogene* 1997;15:877–85.
- [56] Cho SY, Klemke RL. *J Cell Biol* 2002;156:725–36.
- [57] Wang H-B, Dembo M, Hanks SK, Wang Y-L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11295–300.
- [58] Petch LA, Bockholt SM, Bouton A, Parsons JT, Burrige K. *J Cell Sci* 1995;108:1371–9.
- [59] Bouton AH, Burnham MR. *Hybridoma* 1997;16:403–11.

Early activation of p160^{ROCK} by pressure overload in rat heart

Adriana S. Torsoni, Priscila M. Fonseca,
Daniela P. Crosara-Alberto, and Kleber G. Franchini

Department of Internal Medicine, School of Medicine, State
University of Campinas, 13081-970 Campinas, SP, Brazil

Submitted 4 March 2002; accepted in final form 23 January 2003

Torsoni, Adriana S., Priscila M. Fonseca, Daniela P. Crosara-Alberto, and Kleber G. Franchini. Early activation of p160^{ROCK} by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1411–C1419, 2003. First published February 5, 2003; 10.1152/ajpcell.00098.2002.—We investigated the effects of acute pressure overload on activation of p160^{ROCK} in rat myocardium. Constriction of transverse aorta, controlled to increase peak systolic pressure of ascending aorta by ~40 mmHg, induced a rapid association of RhoA with Dbl-3 and p160^{ROCK}. The binding of p160^{ROCK} to RhoA was rapidly increased, peaking at 30 min (~3.5-fold), but reduced to lower levels (~1.9-fold) by 60 min of pressure overload. The activity of immunoprecipitated p160^{ROCK} toward myosin light chain increased ~2.5-fold within 10 min but decreased to lower levels (~1.6-fold) after 60 min of pressure overload. Confocal microscopic analysis indicated that pressure overload induced the formation of aggregates of p160^{ROCK} and RhoA along the longitudinal axis of cardiac myocytes. Immunoelectron microscopic analysis showed that pressure overload induced the association of p160^{ROCK} and RhoA to Z-line, T-tubule, and subsarcolemmal areas. The rapid activation of p160^{ROCK} by pressure overload and its aggregation in subcellular structures involved in transmission of mechanical force suggest a role for this enzyme in the mechanobiochemical transduction in the myocardium.

mechanical stress; cell signaling; myocardium

MECHANICAL STRESS has been implicated as a major factor responsible for the functional and structural changes of the myocardium to hemodynamic overload (6). Although the effects of mechanical stress could be mediated by activation of mechanosensitive ion channels or by locally and systemically released growth factors (16, 17, 29), the mechanical input itself may trigger cellular signaling mechanisms via the interaction of cells to the underlying extracellular matrix through the transmembrane integrins (13, 21). Integrins connect to a meshwork of F-actin through bridging proteins such as vinculin, talin, and α -actinin at specialized membrane-bound regions known as focal adhesion complexes (3, 10, 25, 27). This system transmits mechanical stimuli through the elastic coupling to sites, such as plasma membrane, internal organelles, or nucleus (21). In addition, integrin clustering leads to

the recruitment and activation of several signaling proteins such as focal adhesion kinase (Fak), c-Src, small G proteins, and MAP kinases to F-actin meshwork (4, 28). These signaling molecules may act as transducers of the mechanical stimuli into intracellular signaling events. Accordingly, our previous studies have shown (7, 8) that either acute pressure overload or stretch induces rapid activation (within 3–5 min) of the multicomponent signaling complex associated with Fak in the myocardium of rats. This effect includes the activation of ERK1/2, involved in cellular functions such as metabolism, gene regulation, and growth (32).

The assembly of focal adhesion complex, a critical step in cellular signaling through Fak, involves multiple steps and pathways and may be regulated by mechanical stimuli or soluble factors, such as growth factors, angiotensin II, and endothelin (3, 10). The small GTPase Rho has been shown to play a central role in the reorganization of F-actin and focal adhesions in response to several different stimuli (11, 15). In cardiac myocytes, RhoA has been shown to be required for phenotypic changes induced by growth factors and stretch (1, 5, 12, 19, 22, 30, 31, 35). However, the signaling mechanisms that mediate these effects are still unclear. Among the putative Rho effectors are a number of protein kinases that bind to and are activated by Rho (15). ROCK, the most extensively characterized Rho effector, stimulates cytoskeletal reorganization in response to various stimuli (15). In particular, ROCK has been shown to stimulate myosin-based contractility by directly and indirectly elevating phosphorylation of the regulatory myosin light chain (2, 18, 34). The resulting activation of myosin triggers myosin filament formation and reorganization of F-actin (20, 33). Despite the fact that Rho/ROCK pathway has been suggested to mediate hypertrophic signals in neonatal cardiac myocytes (12, 19, 36), a clear demonstration that ROCK is activated as well as the identity of the upstream activators in overloaded myocardium is still lacking. Several lines of evidence indicate that Rho-GTPase activity is regulated by proteins known collectively as GAPs (GTPase-activating proteins) and GEFs (guanine nucleotide exchange factors). Although numerous GEFs and enzyme effectors are capable of stimulating nucleotide exchange and medi-

Address for reprint requests and other correspondence: K. G. Franchini, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 13081-970 Campinas, SP, Brasil (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.

ate the effects of small GTPase RhoA, recent studies (24, 26) have shown that Dbl is the main activator of RhoA/ROCK pathway when the stimulus elicits integrin engagement. In this context, it would be relevant to know whether Dbl is involved in the activation of myocardial RhoA/ROCK pathway in response to increased workload.

Thus the aim of the present study was to examine the activity, expression, and cellular location of p160^{ROCK} in the myocardium of rats subjected to acute pressure overload. Additional experiments analyzed the engagement of the upstream activators Dbl-3 and RhoA on the early activation of p160^{ROCK} in the overloaded myocardium.

METHODS

Antibodies and chemicals. Polyclonal goat antibody against p160^{ROCK}, polyclonal rabbit antibody against Dbl-3, and monoclonal mouse antibody against RhoA were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Myosin light chain (MLC) was from Calbiochem. Anti-goat and anti-rabbit IgG biotin-conjugated antibodies, streptavidin-gold 15 nm (Auroprobe), ¹²⁵I-protein A, [γ -³²P]ATP, and protein A-Sepharose 6MB were purchased from Amersham Pharmacia. TRITC-phalloidin, FITC-conjugated anti-goat, and all other reagent grade chemicals were obtained from Sigma.

Experimental animal model. Acute pressure overload was obtained by controlled constriction of the transverse aorta, produced with a micro-Balock clamp in anesthetized rats as described previously (8). Briefly, the animals were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg rat wt) administered via intraperitoneal injections and maintained on a temperature-controlled surgical table for periods ranging from 5 to 60 min. Supplemental doses of pentobarbital sodium were administered along the experimental period, as necessary. Pulsatile arterial pressure was continuously monitored from catheters placed in the carotid and femoral arteries and processed with WINDAQ-PRO data acquisition software (DATAQ Instruments, Akron, OH). The transverse aorta was reached by surgical incision at the second left intercostal space. The micro-Balock clamp was adjusted around the transverse aorta between the right and left common carotid arteries, and the constriction was adjusted to produce stable peak systolic pressure gradients of ~40 mmHg between the ascending and abdominal aorta. Control rats were sham operated. At the end of the arterial pressure monitoring period, the animals were euthanized with a supplemental dose of pentobarbital sodium administered via an endovenous catheter placed in the right jugular vein. The thoracic cavity was then opened, and the ventricles were rapidly removed for Western blot, immunohistochemical, and immunoelectron microscopy studies. All procedures and the care of the rats were in accordance with the university's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Adult rat ventricular myocytes. Cardiac myocytes were isolated from the left ventricle of adult Wistar rats at 160–180 g by collagenase (type IA; Sigma) digestion using a modified Langendorff perfusion according to methods previously described (37). Briefly, rats were anesthetized, and the heart was excised, taking care to remove the pericardium. The aorta was tied onto the cannula, and the heart was perfused with O₂-saturated HEPES-buffered solution (10 mM HEPES, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 6 mM glucose, 1 ml of heparin, and 1 ml of Xylocaine, pH 7.4). After

2 min, the solution was switched to HEPES-buffered solution plus EGTA (4 mM) solution for 10 min, and the heart was then perfused with enzyme solution for about 20 min (HEPES-buffered solution with 0.1% BSA and 300 μ g/ml collagenase). At the end of the digestion, the heart was cut off the cannula and the atria and aorta were dissected away. On a sterile petri dish the ventricular tissue was chopped with small scissors, and the suspension was then filtered through cotton gauze. The myocytes were placed in 40 ml of O₂-saturated HEPES-buffered solution plus 0.1% BSA plus a crescent concentration of Ca²⁺ solution at 37°C. At the end of this period, the Ca²⁺ concentration was 1.2 mM. The myocytes were double-centrifuged at 12 g for 10 min each time. The viability of the isolated cardiac myocytes was 40% as determined by rod-shaped morphology and lack of granulation or blebs. After isolation, the ventricular myocytes were immediately transferred to poly-L-lysine-coated glass slides and then processed for immunohistochemistry.

Tissue preparation for immunoprecipitation. The ventricles were homogenized in 10 volumes of solubilization buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaF, 10 mM EDTA, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, and 0.1 mg/ml aprotinin) at 4°C. The extracts were centrifuged at 8,000 g at 4°C for 20 min, and the supernatant was used for the assays. Protein concentration was determined with the Bradford dye binding method. An equal amount of total protein of the supernatants of these tissues was submitted to immunoprecipitation with specific antibodies and protein A-Sepharose 6MB.

Protein analysis by immunoblotting. Aliquots of whole extracts or immunoprecipitated proteins containing an equal amount of total protein were treated with Laemmli sample buffer and run in SDS-PAGE. The nitrocellulose membranes with transferred proteins were incubated with specific antibodies and ¹²⁵I-protein A. Band intensities were quantified by optical densitometry of the developed autoradiographs.

Immune complex kinase assay. Serine/threonine kinase activity associated with the immune complex of anti-p160^{ROCK} antibody was measured by using MLC as substrate. The immune complex of anti-p160^{ROCK} antibody was immunoprecipitated, washed, resuspended, and incubated with 25 μ g of MLC at 30°C for 20 min in 18 μ l of kinase buffer (100 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM MnCl₂, 5 mM DTT, and 500 μ M Na₃VO₄) containing 2 μ Ci [γ -³²P]ATP. Adding boiling Laemmli sample buffer to the reaction terminated the reaction. After separation by SDS-PAGE, the proteins were transferred to nitrocellulose membrane and the ³²P-labeled MLC band (~20 kDa) was visualized by autoradiography and quantified by densitometry.

Immunofluorescence study. Sections of left ventricle and freshly isolated cardiac myocytes from adult rats were double-stained with TRITC-phalloidin and anti-ROCK or anti-RhoA antibodies. The heart was perfused with a washing solution (PBS, heparin, and lidocaine) and then with a 10% sucrose solution in PBS. The left ventricle was removed, frozen, and stored at -80°C. Cryosections (5 μ m) and freshly isolated cardiac myocytes were transferred to poly-L-lysine-coated glass slides and fixed (2% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4). Nonreactive sites were blocked with 5% nonfat milk in PBS. The sections or isolated cardiac myocytes were incubated with anti-p160^{ROCK} or anti-RhoA antibodies in 1% nonfat milk in PBS overnight at 4°C, followed by incubation with FITC-conjugated secondary antibody and TRITC-phalloidin and mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Immunofluorescence was detected by confocal laser scanning microscopy (CLSM; Carl Zeiss). Double-stained images from FITC and TRITC channels were simul-

taneously acquired from the same area and superimposed. The same sensitivity of the CLSM was used to compare the anti-p160^{ROCK} and anti-RhoA staining in myocardial cryosections of the various groups of rats. As negative controls, cryosections were not incubated with primary antibodies. No specific staining was observed in the negative control.

Tissue preparation for immunogold labeling. Pieces of heart (<1 mm) were fixed in a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C for 1 h, washed for 45 min with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), and treated with 0.1 M glycine for 1 h. After being washed as described above, the pieces were dehydrated through graded concentrations of *N,N*-dimethylformamide, embedded in LR-White resin using gelatin capsules, and polymerized at -20°C under UV light for 3 days. Thin sections were cut with a diamond knife on an ultramicrotome (Leica Ultracut-UCT) and collected on 150-mesh nickel grids. Section staining was performed by floating grids, sections down, on droplets of the immunolabeling and washing solutions placed on parafilm. All incubations involving the antibodies were done in moistened chambers. A noncompetitive blocking step was done with 3% BSA in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 1 h. The incubation with primary antibody diluted 1:50 in 1% BSA was carried out overnight at 4°C. The sections were then incubated with anti-goat IgG biotin-conjugated antibody diluted 1:300 in 1% BSA for 1 h, followed by an incubation with streptavidin-gold 15 nm for 45 min. After immunolabeling, the sections were stained with 5% uranyl acetate for 5 min. Immunostained sections with anti-p160^{ROCK} or anti-RhoA were examined and photographed in a transmission electron microscope (LEO 906). All the experiments were accompanied by a negative control.

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 for repeated measures and Scheffé's test. A value of $P < 0.05$ indicates significant difference.

RESULTS

Acute effects of aortic constriction on hemodynamics. Acute aortic constriction produced a peak systolic gradient between the ascending (~170 mmHg) and abdominal (~130 mmHg) aorta of ~40 mmHg, stable along the 1-h experimental period (Fig. 1). Peak systolic blood pressure of the anesthetized control rats averaged 131 ± 5 mmHg.

Pressure overload induces the association of RhoA with Dbl and p160^{ROCK}. Coimmunoprecipitation experiments were performed with specific antibodies against Dbl-3, RhoA, and p160^{ROCK} in the myocardial homogenates obtained from control and overloaded hearts. Immunoprecipitates obtained with anti-RhoA and anti-p160^{ROCK} antibodies were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Dbl-3 and anti-RhoA antibodies, respectively. As indicated in Fig. 2A, pressure overload enhanced the association of Dbl-3 with RhoA. The amount of Dbl-3 detected in the immunoprecipitates of RhoA increased to ~150% at 5 min and to ~250% at 60 min after the beginning of pressure stimulus. Pressure overload also induced a rapid increase in the association of p160^{ROCK} with RhoA (Fig. 2B). The amount of RhoA detected in the immunoprecipitates of p160^{ROCK} increased to 180 and 350% at 5 and 30 min after the beginning of pressure stimulus,

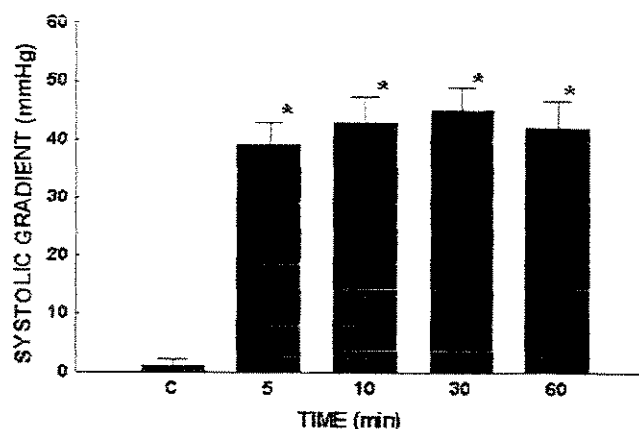
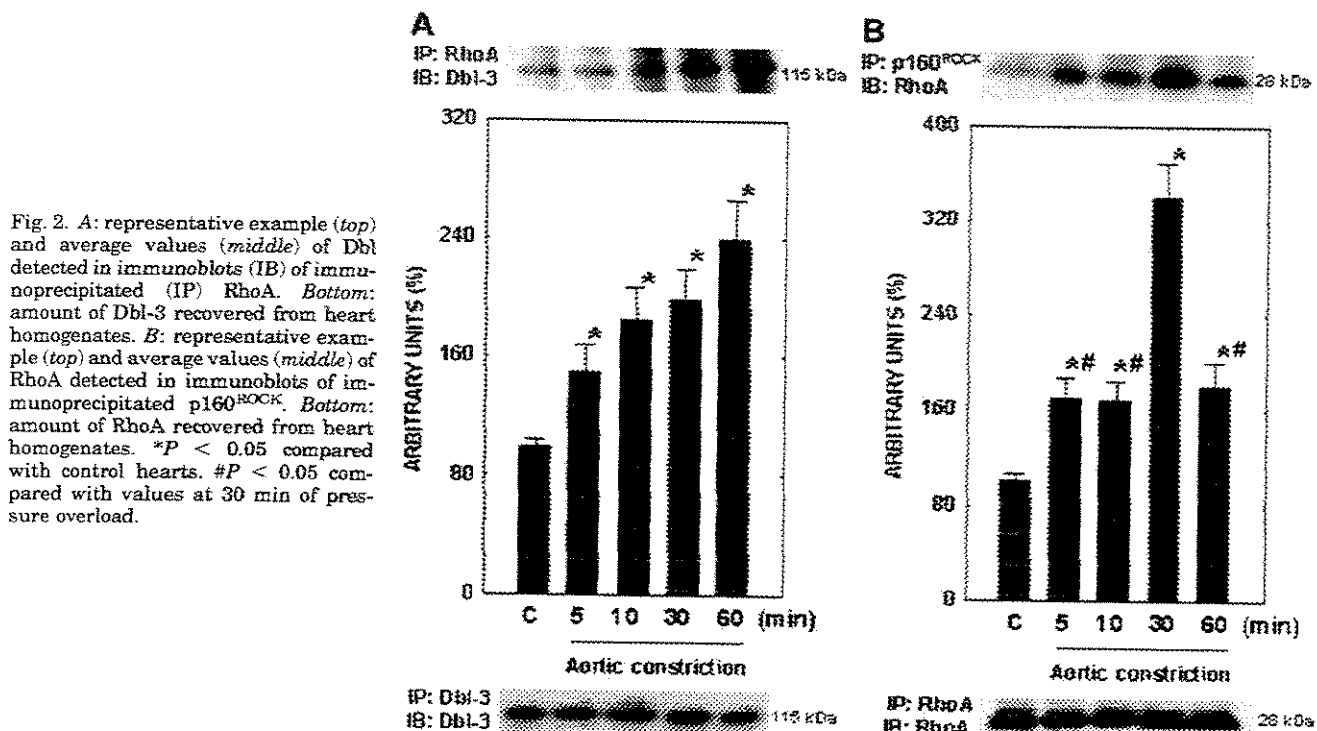


Fig. 1. Systolic gradient across the aortic constriction. Rats ($n = 12$) were subjected to transverse aortic constriction for periods ranging from 5 to 60 min, and blood pressure was measured in the ascending and abdominal aorta simultaneously. * $P < 0.05$ compared with values of control (C) rats.

respectively. After 60 min of pressure overload, p160^{ROCK}/RhoA association was reduced to lower levels compared with those seen at 30 min but remained significantly increased compared with values for control rats. No difference was observed when values of RhoA detected in immunoprecipitates of p160^{ROCK} at 60 min were compared with those at 5 and 10 min of pressure overload. Parallel immunoblotting with anti-Dbl and anti-RhoA revealed that the amount of these proteins remained unaltered in the myocardium over the 60-min period of pressure overload (Fig. 2, A and B, bottom).

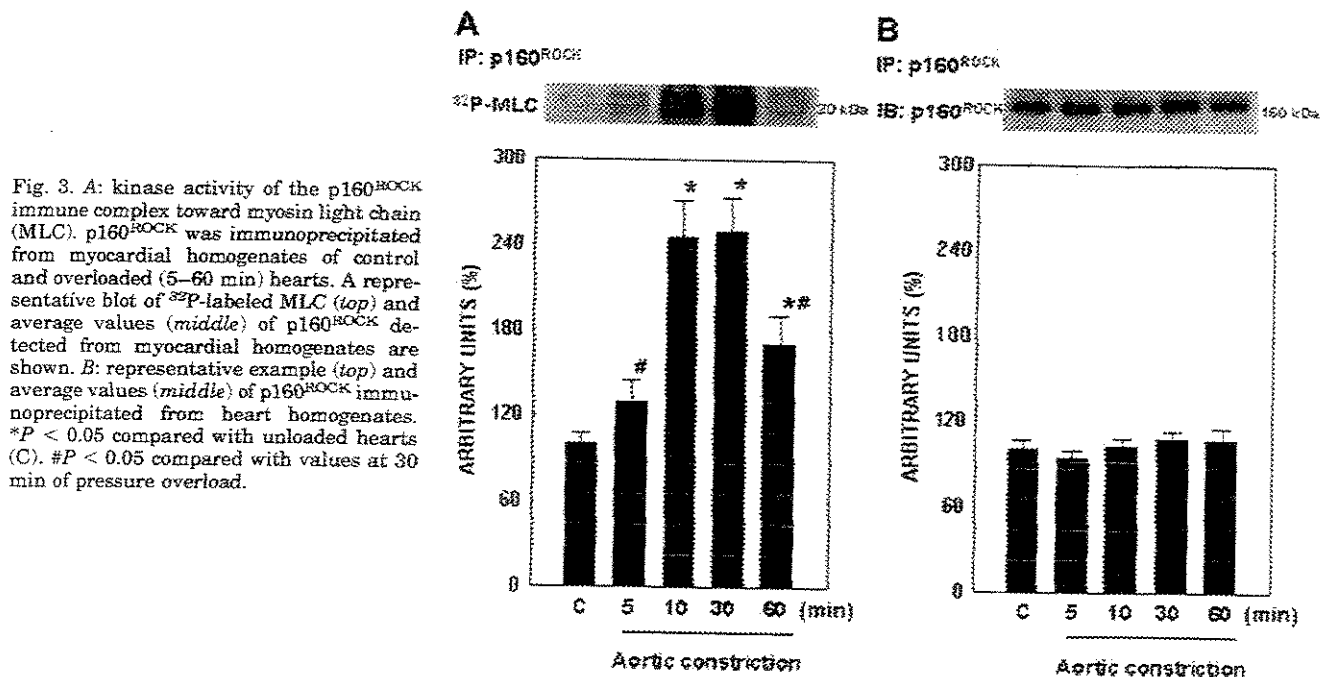
Pressure overload activates p160^{ROCK}. Load-induced activation of p160^{ROCK} in the myocardium was tested with an *in vitro* kinase assay of the immunoprecipitated p160^{ROCK} toward MLC, a cellular substrate for p160^{ROCK}. As shown in Fig. 3A, pressure overload was followed by a consistent increase of the kinase activity of anti-p160^{ROCK} immune complex. p160^{ROCK} activity peaked at 10 min (to ~260%), remained elevated by 30 min, and reduced to a lower level but was still significantly elevated at 60 min of sustained stimulus. As shown in Fig. 3B, the amount of p160^{ROCK} remained unchanged during the experimental period.

Immunolocalization of p160^{ROCK} in cardiac myocytes of rats. p160^{ROCK} was first localized by laser scanning microscopy in sections of adult rat hearts using double-stained TRITC-phalloidin and anti-p160^{ROCK} antibody. In longitudinal sections of left ventricle from control rats, staining was evident in the cardiac myocytes (Fig. 4A). In these cells, immunostaining of p160^{ROCK} was observed along the longitudinal axis of cardiac myocytes with some areas stained as spots organized regularly in the sarcoplasm (Fig. 4). Pressure overload enhanced the spot-pattern staining along the myocytes (Fig. 4B). To verify our findings in rat left ventricular sections, we also determined the localization of p160^{ROCK} in freshly isolated left ventricular myocytes from adult rat hearts (Fig. 5, A-F).



Isolated myocytes also showed consistent staining with anti-p160^{ROCK} antibody, and the distribution patterns of p160^{ROCK} generally reproduced those seen in left ventricular sections of control (Fig. 5, A–C) and overloaded hearts (Fig. 5, D–F), including the enhanced aggregation and the number spots of p160^{ROCK} staining induced by pressure overload.

Experiments were performed with immunogold electron microscopy of myocardial sections to further explore the specific location of p160^{ROCK} in cardiac myocytes. In sections obtained from control hearts, specific labeling with anti-p160^{ROCK} antibody was found to be evenly distributed in the sarcolemma and close to the region of Z lines (Fig. 6A). In the sections obtained from



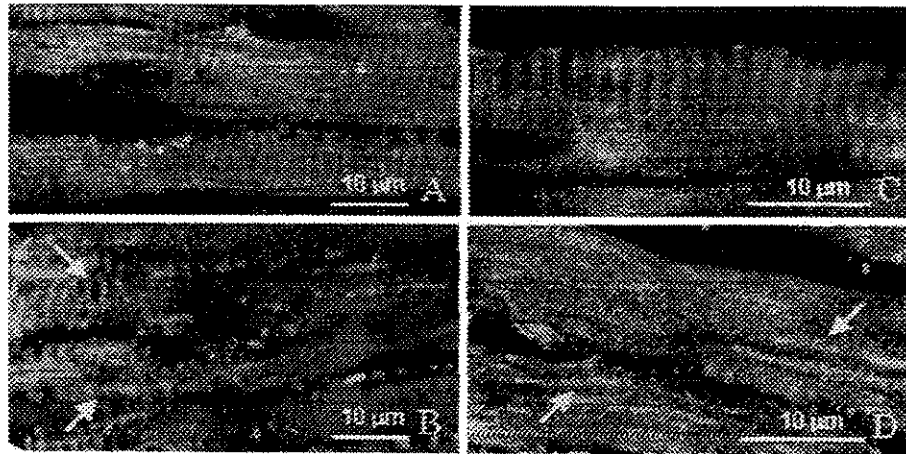


Fig. 4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) studies showing the immunolocalization of p160^{ROCK} (green) and sarcomeric actin (red; phalloidin) in sections of rat left ventricle. *A*: left ventricular section from a control heart, showing the distribution of p160^{ROCK} throughout the sarcoplasm of cardiac myocytes. *B*: representative example of p160^{ROCK} staining in myocardial section of heart subjected to a 30-min period of pressure overload, showing the enhanced spot-pattern staining (arrows) along the myocytes. *C*: left ventricular section from a control heart, showing the distribution of RhoA throughout the sarcoplasm of cardiac myocytes. *D*: anti-RhoA staining in the myocardium of 30-min overloaded rat left ventricle, showing the enhanced spot-pattern staining (arrows) along the myocytes.

overloaded hearts, clusters of p160^{ROCK} were found at regions of T tubules and subsarcolemmal areas as early as 5 min after the beginning of the stimulus (Fig. 6*B*). Moreover, in overloaded hearts, p160^{ROCK} was found more frequently at the Z line and intercalated disk than in sections of control rats as indicated in the representative examples of Fig. 6, *C* and *D*.

Immunolocalization of RhoA in cardiac myocytes of rats. In sections of left ventricles from control rats, anti-RhoA antibody consistently stained cardiac myo-

cytes (Fig. 4, *C* and *D*). In overloaded myocardium, anti-RhoA staining was seen more frequently as longitudinal aggregates and spots as indicated in the representative example of Fig. 4*D*. In freshly isolated left ventricular myocytes, anti-RhoA staining was similar to the patterns of left ventricular sections (Fig. 7, *A–F*) and resembled those seen with anti-p160^{ROCK} antibody. Aggregates and spots were more frequently observed in myocytes from overloaded than in those from control hearts (Fig. 7, *D–F*).

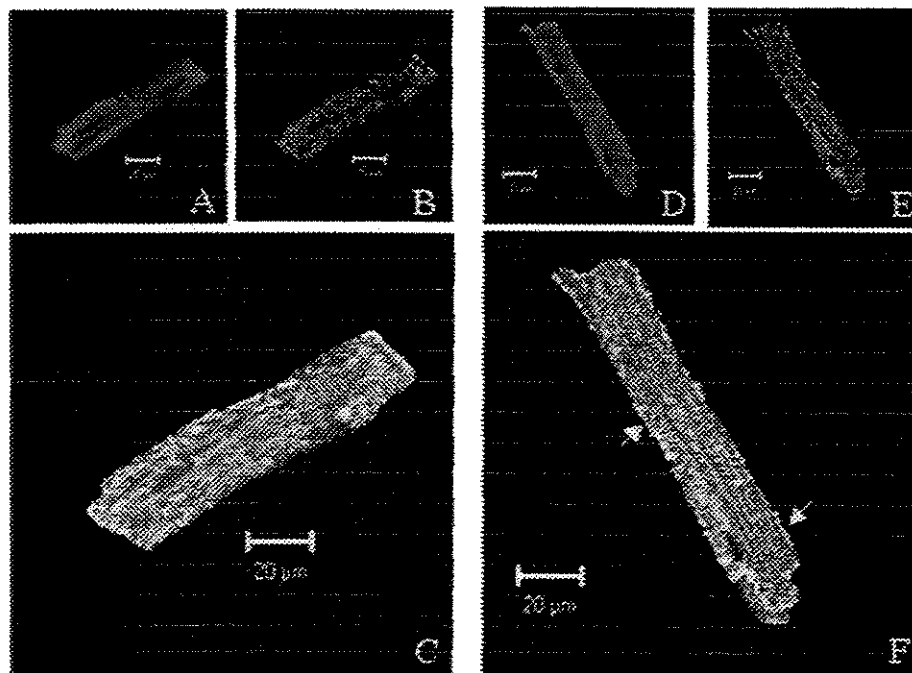


Fig. 5. CLSM studies showing the immunolocalization of p160^{ROCK} (green) and sarcomeric actin (red; phalloidin) in isolated adult rat ventricular myocytes. *A*: phalloidin staining in isolated myocytes from control rats. *B*: representative example of anti-p160^{ROCK} staining of isolated myocytes from control rats. *C*: p160^{ROCK}/phalloidin double staining of isolated myocytes from control rats. *D*: phalloidin staining in isolated myocytes from 30-min overloaded hearts. *E*: anti-p160^{ROCK} staining. *F*: p160^{ROCK}/phalloidin double staining of cardiac myocytes isolated from rat heart subjected to 30 min of pressure overload. Arrows indicate aggregates and spots of anti-p160^{ROCK} specific labeling.

Fig. 6. Immunoelectron micrographs of anti-p160^{ROCK} staining in rat left ventricle. *A*: representative example of p160^{ROCK} staining in the sarcomere and sarcolemma (arrows) in a myocardial section from a control rat. ECM, extracellular matrix; mit, mitochondrion; S, sarcolemma. Magnification, $\times 50,600$. *B*: after 3 min of pressure overload, note clusters (arrows) of colloidal gold particles at T-tubule-like structure at the periphery of the cell. Magnification, $\times 51,700$. *C* and *D*: staining of p160^{ROCK} in 30-min overloaded hearts. Localization of p160^{ROCK} at Z disks (Z; arrows) and intercalated discs (ID; arrows). Magnification, $\times 68,500$ (*C*); $\times 55,000$ (*D*).

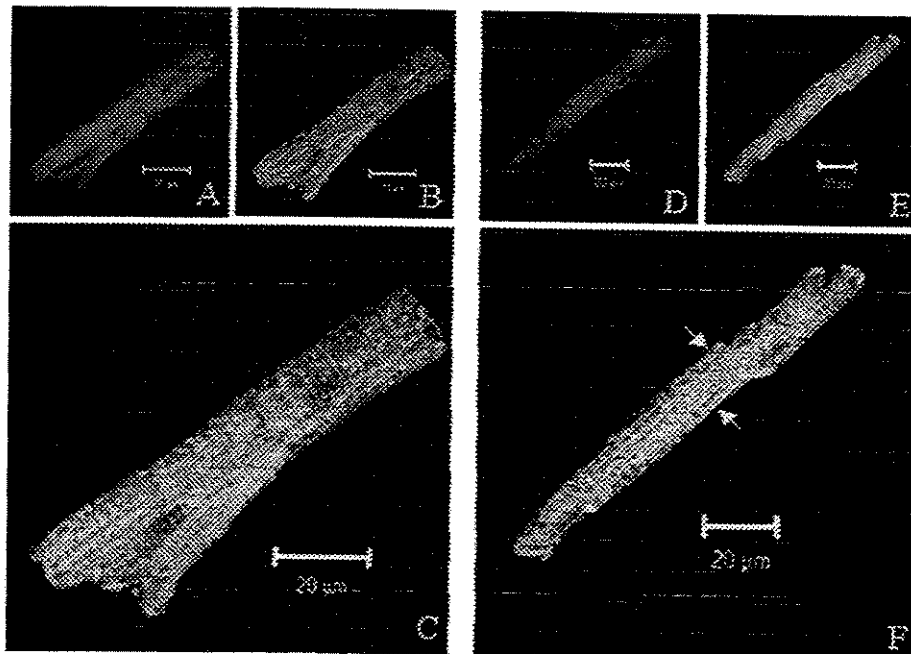
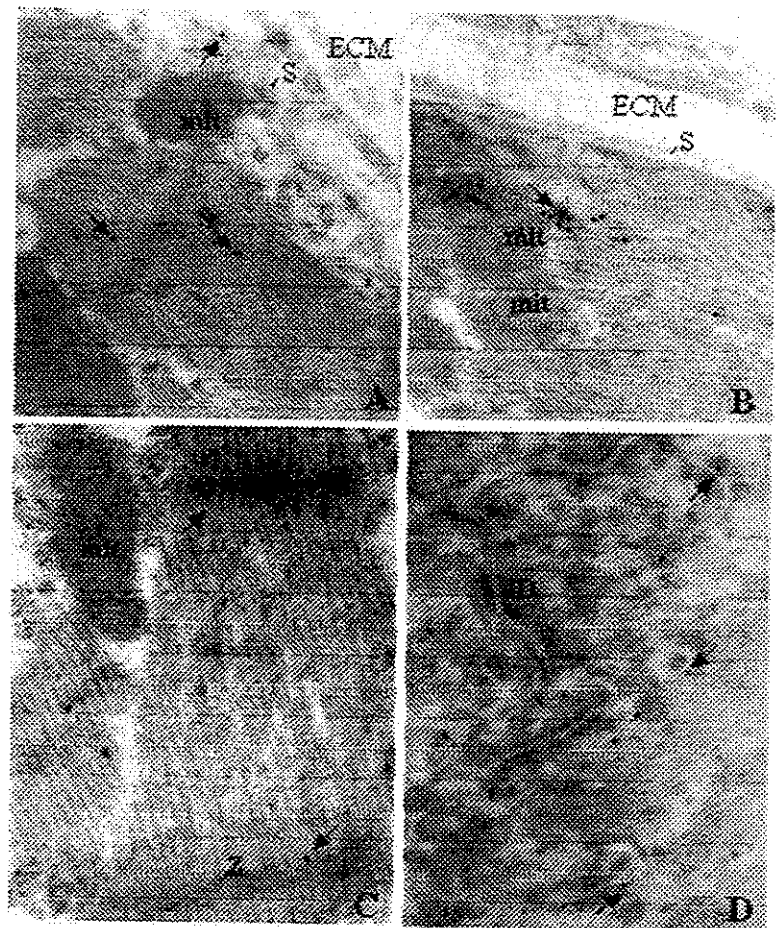


Fig. 7. CLSM studies showing the immunolocalization of RhoA (green) and sarcomeric actin (red; phalloidin) in isolated adult rat ventricular myocytes. *A*: phalloidin staining in isolated myocytes from control rats. *B*: anti-RhoA staining of isolated myocytes from control rats. *C*: RhoA/phalloidin double staining of isolated myocytes from control rats. *D*: phalloidin staining with anti-Rho-A antibody in isolated myocytes from hearts subjected to 30 min of pressure overload. *E*: anti-RhoA staining. *F*: RhoA/phalloidin double staining at 30 min of pressure overload. Arrows indicate aggregates and spots of anti-Rho-A-specific labeling.

Immunogold electron microscopy of myocardial sections with anti-RhoA antibody indicated that in hearts from control rats, Rho-A was frequently seen along the sarcolemma and in the Z-line regions (Fig. 8A). In sections obtained from overloaded myocardium, anti-RhoA staining was detected more frequently as clusters at the Z lines and intercalated disks (Fig. 8, B and C) as well as at subsarcolemmal regions (not shown).

DISCUSSION

This study provided evidence that pressure overload induces a rapid activation of p160^{ROCK} in the adult rat myocardium. Because this activation was paralleled by increases in p160^{ROCK}/RhoA and RhoA/Dbl-3 association, our data also indicate that the rapid activation of p160^{ROCK} in the myocardium may be mediated by Dbl-3/Rho-A complex. These functional protein data were extended to include data provided by immunohistochemistry and immunoelectron microscopic analysis on distribution and location of p160^{ROCK} and RhoA in cardiac myocytes. Immunofluorescence confocal microscopic analysis of adult rat left ventricle sections and freshly isolated adult rat cardiac myocytes showed that pressure overload enhanced the appearance of aggregates of p160^{ROCK} as well as of RhoA, regularly arranged on similar regions along the longitudinal axis of cardiac myocytes. The aggregation of p160^{ROCK} and RhoA staining in cardiac myocytes of overloaded hearts were confirmed by the immunogold electron microscopy, which showed the appearance of clusters of p160^{ROCK} and RhoA at specific regions such as the Z-line, T-tubule-like structures, intercalated disk, and subsarcolemmal/sarcolemmal areas. Overall, these

data support the conclusion that load induces a rapid assembly and activation of Dbl/RhoA/p160^{ROCK} signaling complex at structures compromised with force transmission in adult rat cardiac myocytes.

The finding here that pressure overload induces p160^{ROCK} as well as RhoA to localize and cluster at specific subcellular structures simultaneously to p160^{ROCK}/RhoA association detected by coimmunoprecipitation assays suggests that their activation is dependent not only on the interaction with upstream activators but also on their recruitment to a particular subcellular compartment. p160^{ROCK} contains multiple domains, including a kinase domain in the NH₂ terminus followed by a long coiled-coil region in the middle, that bind RhoA, and then a pleckstrin homology region and a Cys-rich zinc finger at the COOH terminus, which could target this enzyme to membranes and cytoskeletal actin (14). Studies performed in distinct experimental models have confirmed the target of p160^{ROCK} to cytoskeletal proteins (9, 23). The location at specific subcellular structures might confer to p160^{ROCK} the ability to contribute to signaling mechanisms involving cell membrane and cytoskeleton. Thus one could argue that the load-induced activation and target of p160^{ROCK} and RhoA to the Z line, intercalated disk, and subsarcolemmal area, structures that stand and transmit mechanical forces, might indicate a role for these enzymes in mechanobiochemical transduction in cardiac myocytes.

Earlier studies have implicated RhoA/p160^{ROCK} signaling complex in stretch and agonist-induced activation of gene regulation, sarcomerogenesis, and hypertrophy of cardiac myocytes (1, 5, 12, 19, 22, 30, 31, 35).

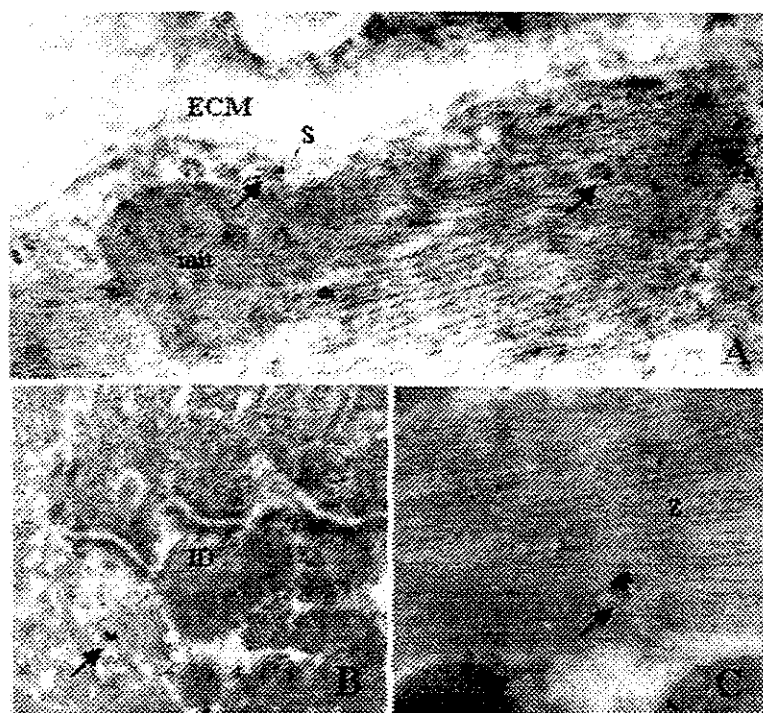


Fig. 8. Immunoelectron micrographs of anti-RhoA staining in rat left ventricle. A: representative example showing sparse RhoA staining in the sarcomere and sarcolemma (arrows) in a myocardial section from a control rat. Magnification, $\times 41,217$. B: after 10 min of pressure overload, note clusters (arrow) of colloidal gold particles at intercalated disk. Magnification, $\times 40,109$. C: staining of RhoA in 30-min overloaded hearts shows localization of RhoA at Z disk (arrow). Magnification, $\times 85,319$.

Our present data indicating rapid RhoA/p160^{ROCK} association and activation of p160^{ROCK} at specific sites suggest that these enzymes play a role in the initial events triggered by increased workload in cardiac myocytes. Accordingly, p160^{ROCK} has been shown to contribute to several independent features of myocardial cell hypertrophy, including increase in cell size, sarcomere organization, and induction of atrial natriuretic factor and β -MHC expression (36). It remains to be determined, however, whether such pleiotropic effects are mediated indirectly by the influence of p160^{ROCK} on stress-induced cytoskeletal organization or by its direct effect on multiple signaling pathways.

Despite the fact that our findings implicate p160^{ROCK} on the initial events elicited by the load-induced Db1/RhoA activation, they do not rule out a possible role for other targets or upstream activators of RhoA in myocardial responses to pressure overload. Several targets of RhoA have been identified besides p160^{ROCK}, including citron kinase, protein kinase N, p140mDia, and rhotekin (15). Although the relative contributions of the various RhoA downstream effectors are still unclear, it is possible that they play distinct role on RhoA-activated signaling mechanisms. In fact, previous studies (22) have demonstrated that protein kinase N regulates atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac myocytes through a serum response element. On the other hand, it has also been shown (36) that the Rho/ROCK pathway contributes to cardiac myocyte hypertrophy induced by α_1 -adrenergic agonist via activation of extracellular signal-regulated kinases and GATA-4, suggesting that the effects of RhoA on gene regulation are mediated by multiple downstream effectors and mechanisms. Interestingly, our present results indicate that the load-induced p160^{ROCK} activation is transient with a peak at 30 min of pressure overload, although Db1/RhoA association, and presumably RhoA activity, was still increased at 60 min of pressure overload. This finding might indicate that after the initial period, when p160^{ROCK} is the major effector of RhoA, other effectors could be activated and play a role in the effects of RhoA on myocardial responses to pressure overload.

In conclusion, we have shown here that p160^{ROCK} is rapidly and transiently activated in the myocardium in response to pressure overload. Given the potential effects of p160^{ROCK} on multiple aspects of the initial cellular response to mechanical stimuli such as cytoskeletal organization, contractility, and influence on gene expression, the early activation of p160^{ROCK} in overloaded myocardium indicates that this enzyme as well as its upstream activators may occupy a central position in the coordination of the initial signaling mechanisms and adaptive changes triggered by mechanical stress in cardiac myocytes.

This study was sponsored by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 98/11403-7, 99/06088-8) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. 521098/97-1).

REFERENCES

1. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Zhu W, Kadowaki T, and Yazaki Y. Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Circ Res* 84: 458–466, 1999.
2. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, and Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271: 20246–21249, 1996.
3. Burridge K and Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signalling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463–519, 1996.
4. Burridge K, Turner CE, and Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125 FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* 119: 893–903, 1992.
5. Clerk A and Sugden PH. Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res* 86: 1019–1023, 2000.
6. Cooper G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Annu Rev Med* 48: 13–23, 1997.
7. Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz Jr W, 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.
8. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, and Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 87: 558–565, 2000.
9. Fujita A, Yuji S, Toshimasa I, Midori M, Kazuko F, Fumitaka U, and Shuh N. Integrin-dependent translocation of p160^{ROCK} to cytoskeletal complex in thrombin stimulated human platelets. *Biochem J* 328: 769–775, 1997.
10. Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 285: 1028–1032, 1999.
11. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509–514, 1998.
12. Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, and Brown JH. The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes: involvement of Rho kinase. *J Biol Chem* 273: 7725–7730, 1998.
13. Ingber D. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechano-transduction. *Annu Rev Physiol* 59: 575–599, 1997.
14. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, and Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 15: 1885–1893, 1996.
15. Kaibuchi K, Kuroda S, and Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68: 459–486, 1999.
16. Kaye D, Pimental D, Prasad S, Maki T, Berger HJ, McNeil PL, Smith TW, and Kelly RA. Role of transient sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro. *J Clin Invest* 97: 281–291, 1996.
17. Kent RL, Hooper JK, and Cooper G. Load responsiveness of protein synthesis in adult mammalian myocardium: role of cardiac deformation linked to sodium influx. *Circ Res* 64: 74–85, 1989.
18. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, and Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245–248, 1996.
19. Kuwahara K, Saito Y, Nakagawa O, Kishimoto I, Harada M, Ogawa E, Miyamoto Y, Hamaoka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Tamura N, Ogawa Y, and Nakao K. The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes—possible involvement of Rho/ROCK pathway

- in cardiac muscle cell hypertrophy. *FEBS Lett* 452: 314–318, 1999.
20. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, and Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285: 895–898, 1999.
 21. Maniotis AJ, Chen CS, and Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 849–854, 1997.
 22. Morissette MR, Sah VP, Glembotski CC, and Brown JH. The Rho effector, PKN, regulates ANF gene transcription in cardiomyocytes through a serum response element. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1769–H1774, 2000.
 23. Nakano K, Takaishi K, Kodama A, Mammoto A, Shiozaki H, Monden M, and Takai Y. Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 10: 2481–2491, 1999.
 24. Olivo C, Vanni C, Mancini P, Silengo L, Torrisi MR, Tarone G, Defilippi P, and Eva A. Distinct involvement of cdc42 and RhoA GTPases in actin organization and cell shape in untransformed and Dbl oncogene transformed NIH3T3 cells. *Oncogene* 19: 1428–1436, 2000.
 25. Polte TR, Naftilan AJ, and Hanks SK. Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J Cell Biochem* 55: 106–119, 1994.
 26. Quang CT, Gautreau A, Arpin M, and Treisman R. Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *EMBO J* 19: 4565–4576, 2000.
 27. Rankin S, Morii N, Narumiya S, and Rozengurt E. Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125^{FAK} and paxillin induced by bombesin and endothelin. *FEBS Lett* 354: 315–319, 1994.
 28. Romer LH, McLean N, Turner CE, and Burridge K. Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 5: 349–361, 1994.
 29. Sadoshima JI, Xu Y, Slayter HS, and Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 977–984, 1993.
 30. Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, and Brown JH. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 459–489, 2000.
 31. Suematsu N, Satoh S, Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Nakamura R, Egashira K, Makino N, and Takeshita A. α_1 -Adrenoceptor-G α_q -RhoA signaling is upregulated to increase myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H637–H646, 2001.
 32. Sugden PH and Clerk A. “Stress-responsive” mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 83: 345–352, 1998.
 33. Sumi T, Matsumoto K, and Nakamura T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276: 670–676, 2001.
 34. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, and Matsumura F. Distinct roles of ROCK (Rho-Kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 150: 797–806, 2000.
 35. Wei L, Wang L, Carson JA, Agan JE, Imanaka-Yoshida K, and Schwartz RJ. Beta-1 integrin and organized actin filaments facilitate cardiomyocyte-specific RhoA-dependent activation of the skeletal alpha-actin promoter. *FASEB J* 15: 785–796, 2001.
 36. Yanazume T, Hasegawa K, Wada H, Morimoto T, Abe M, Kawamura T, and Sasayama S. Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 277: 8618–8625, 2002.
 37. Yang J, Drazba JA, Ferguson DG, and Bond M. A-kinase anchoring protein 100 (AKAP100) is localized in multiple subcellular compartments in the adult rat heart. *J Cell Biol* 142: 511–522, 1998.

Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity

PRISCILA P. DOMINGOS, PRISCILA M. FONSECA,
WILSON NADRUZ, JR., AND KLEBER G. FRANCHINI

Department of Internal Medicine, School of Medicine,
State University of Campinas, Campinas, São Paulo 13081-970, Brazil

Received 24 June 2001; accepted in final form 10 October 2001

Domingos, Priscila P., Priscila M. Fonseca, Wilson Nadruz, Jr., and Kleber G. Franchini. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H556–H564, 2002; 10.1152/ajpheart.00534.2001.—We investigated the influence of stretch and contractile activity on load-induced activation of focal adhesion kinase (FAK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 in isolated rat hearts. Increases of diastolic pressure from ~0 to ~15 mmHg rapidly increased FAK tyrosine phosphorylation (maximum: 2.3-fold) and binding to c-Src (maximum: 2.8-fold) and Grb2 (maximum: 3.6-fold). This was paralleled by activation (maximum: 2.8-fold) and binding of ERK1/2 to FAK. FAK and ERK1/2 were immunolocalized at sarcolemmal sites of cardiac myocytes and in the nuclei, in the case of ERK1/2. Balloon inflation to raise ventricular pressure in hearts perfused with cardioplegic solution also activated FAK and ERK1/2. However, increases in contractile activity induced by increasing calcium concentration in the perfusate (from 0.5 to 5 mM) did not activate the FAK multicomponent signaling complex or ERK1/2 in the myocardium. These results indicate that stretch rather than contractile activity induces FAK and ERK1/2 activation in the myocardium. In addition, the activation and binding of ERK1/2 to FAK suggest that FAK drives the load-induced activation of ERK1/2.

cytoskeleton; cell signaling; rat heart

MECHANICAL INPUT PLAYS A MAJOR ROLE in cardiac adaptive responses to hemodynamic overload (10). In addition to triggering the force-length mechanism and homeometric autoregulation, mechanical input activates signaling mechanisms involved in hypertrophic growth of cardiac myocytes, the hallmark of the myocardial structural adaptation in response to sustained hemodynamic overload (11, 27). How mechanical input is converted to biochemical signals that induce the myocardial hypertrophic response is still not completely understood. However, increasing evidence supports the notion that living cells transduce and transmit forces into biochemical signals through specialized focal sites of the membrane, whereby integrins connect

the cytoskeleton to the extracellular matrix (6, 16, 17, 23). This includes cardiac and skeletal myocytes, where the costameres, the counterpart of the focal adhesion complex, connect the sarcolemma to sarcomere Z lines through cytoskeletal proteins (4, 12, 15, 25, 33, 38). Such structures provide a continuous path for mechanical signal transfer from the extracellular matrix to the sarcomere, nucleus, and internal organelles. In addition, many signaling molecules are immobilized and have their function dependent on the anchorage to the cytoskeleton, which provides a physical basis for mechanobiochemical transduction (6, 14, 17).

Among the various signaling molecules involved in integrin-mediated signaling, focal adhesion kinase (FAK) has received much attention because experimental evidence indicates that it plays a key role in the cellular effects elicited by the integrin/cytoskeletal system, such as cell growth and gene expression (6, 14). The precise mechanism that links integrins to FAK activation is unknown, although it is clear that integrin clustering mediates FAK autophosphorylation, predominantly at Tyr³⁹⁷ (7, 29). After autophosphorylation, additional tyrosine residues of FAK are phosphorylated through the action of c-Src, which binds to FAK at Tyr³⁹⁷ via its SH2 domain (7, 29). This leads to the binding of other SH2 domain proteins such as phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (14) and the Grb2/Sos complex (30), which in turn activate, among others, the Akt and Ras/mitogen-activated protein (MAP) kinase signal transduction cascades, respectively (30, 36). FAK activation has been demonstrated to occur in isolated cardiac myocytes subjected to pulsatile mechanical stretch and in overloaded feline and rat myocardium (13, 18, 20, 32). With the use of an experimental preparation in which the in situ rat heart was subjected to controlled pressure overload, we were able to show that pressure overload elicits rapid activation of the multicomponent signaling complex associated with FAK in the rat heart (13). The close relationship among increased load and FAK/c-Src activation, FAK/PI3K/Grb2 association, and the concurrent activation of Akt and extracellular signal-regulated kinase

Address for reprint requests and other correspondence: K. G. Franchini, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz," 13061-970 Campinas SP, 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.

(ERK)1/2, two potential downstream effectors of the FAK multicomponent signaling complex, indicated that it may play a role in the earlier myocardial responses to increased workload. Although these results provide evidence that FAK is activated in response to hemodynamic overload, the fact that they were obtained in an "in situ" preparation precluded a better understanding about the nature of the mechanical forces involved in this process.

Thus the present study was designed to examine, in an isolated perfused heart preparation, the separate influences of mechanical stimulus, tension development, and contractile activity on FAK activation during increases in myocardial workload. In addition, ERK1/2 activation, a downstream effector of FAK, was studied by using an anti-phospho-specific antibody against ERK1/2. The relative importance of myocardial passive tension and contractile activity on load-induced FAK and ERK1/2 activation were examined by perfusing isolated hearts with cardioplegic solution and by increasing calcium concentration (Ca_0) in the perfusate, respectively. Furthermore, the localization of FAK and ERK1/2 in cardiac myocytes were confirmed by immunohistochemical analysis of myocardial sections. Our findings demonstrate that mechanical stretch, rather than contractile activity, triggers FAK and ERK1/2 activation during increased myocardium workload.

METHODS

Antibodies and Chemicals

Antibodies against FAK, c-Src, Grb2, ERK1/2, phosphorylated (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)-ERK1/2, and phosphotyrosine were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Affinity-purified rabbit anti-mouse IgG was from Dako. ¹²⁵I-labeled protein A ([¹²⁵I]protein A), anti-rabbit IgG-biotin, and streptavidin-peroxidase were from Amersham. Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia. All other reagent grade chemicals were from Sigma.

Isolated Perfused Heart Preparation

All animals received care in compliance with the principles of laboratory animal care formulated by the university's Animal Care and Use Committee. Wistar rats weighing ~200 g were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg ip). After intravenous administration of heparin (500 IU/kg), the rats' chests were opened, and the hearts were rapidly excised and mounted on a nonrecirculating Langendorff perfusion apparatus. Retrograde perfusion was established at a pressure of 70 mmHg with oxygenated normothermic HEPES buffer (pH 7.4) containing (in mM) 20 HEPES, 137 NaCl, 1.2 MgSO₄, 5 KCl, 1.5 CaCl₂, and 16 D-glucose. In experiments performed to analyze the influence of changes in contractile activity on FAK activation, Ca_0 of HEPES buffer was increased from 0.5 mM to 1.5, 3.0, and 5.0 mM. To evaluate the contribution of passive tension-stretch on FAK activation, the hearts were perfused with a cardioplegic solution containing (in mM) 20 HEPES, 127 NaCl, 15 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.5 CaCl₂, and 16 D-glucose; pH 7.4. A small fluid-filled latex balloon connected to a polyethylene-50 tube was positioned into the left ventricular chamber and connected to a pressure

transducer calibrated to a mercury manometer for ventricular pressure monitoring. The pressure signal was amplified (GP4A General Purpose Amplifier, Stentech), digitized using an analog-to-digital converter, and visualized on a personal computer loaded with Windaq software (DATAQ). Data were stored on a disk for off-line analyses. Pressure was recorded at different intraventricular volumes according to the protocols described in *Experimental Design*.

Tissue Homogenization

After the pressure recording session, the heart was rapidly removed from the perfusion apparatus, and the left ventricle was minced coarsely and homogenized in ~10 volumes of solubilization buffer [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.1 mg/ml aprotinin] at 4°C with a Polytron operated at maximum speed for 30 s. The extract was centrifuged at 10,000 g at 4°C for 30 min, and the supernatant was used for the assay. Protein concentration was determined with the Bradford dye-binding method. The supernatant was treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol heated in a boiling water bath for 4 min and then resolved on SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories; Richmond, CA). Equal amounts of total protein were used for all samples.

Protein Analysis by Immunoblotting

Aliquots of whole extracts or immunoprecipitated proteins with specific antibodies and protein A-Sepharose were treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 4 min, after which they were subjected to SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature gel apparatus (Mini-Protean). Electrophoresis of proteins from the gel to nitrocellulose membrane was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean). Non-specific protein binding to the nitrocellulose membrane was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose membrane blot was incubated with anti-FAK, anti-Src, anti-phosphotyrosine, anti-Grb2, anti-ERK1/2, or anti-phosphorylated ERK1/2 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 [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 Kodak 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 (model GS 300 densitometer, Hoefer Scientific Instruments; San Francisco, CA) of the developed autoradiographs.

Tissue Preparation for Morphometry and Immunohistochemistry

The ventricles were fixed by overnight immersion with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and processed to inclusion in Histotec (Merck). Sections used for

morphometric analysis of cardiac myocytes were stained with hematoxylin-eosin. Sections for immunohistochemistry (5 μ m thick) were transferred to poly-L-lysine-coated glass slides. The endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.03% H_2O_2 in 0.1 M phosphate-saline buffer (PBS) at room temperature, for 30 min. The sections were preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk on 0.1 M PBS) for 45 min at room temperature, followed by overnight incubation with the primary antibodies anti-FAK (1:100 dilution) and anti-ERK1/2 (1:75 dilution) at 4°C. The sections were extensively rinsed in 0.05 M PBS and incubated with biotin-conjugated secondary antibodies (1:300 dilution) for 2 h at 25°C. After sections were washed as above, they were incubated with streptavidin-peroxidase complex (1:500 dilution) for 45 min at room temperature, rinsed again, and then subjected to freshly prepared diaminobenzidine (0.5 mg/ml) containing H_2O_2 (0.8%) for 5 min. The sections were then counterstained with hematoxylin and treated with lithium carbonate. Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

Experimental Design

Group 1: diastolic-systolic pressure relationship. After the baseline pressure-recording period (15 min), the volume of the balloon positioned into the left ventricle of each beating heart was increased to raise the diastolic pressure from ~ 0 mmHg to ~ 5 , 10, or 15 mmHg for 10 min. In control hearts, the balloon pressure was maintained at the baseline level for 10 min more. After this period, the hearts were rapidly removed and processed for Western blotting and histology.

Group 2: perfusion with cardioplegic solution. In this protocol, the hearts were perfused with a cardioplegic solution. The balloon positioned into the left ventricle was filled to maintain its pressure at ~ 0 mmHg for 15 min. After this period, the balloon was further inflated to raise the filling pressure to ~ 5 , 10, or 15 mmHg for 10 min more before the hearts were removed and homogenized for Western blotting.

Group 3: changes in Ca_o . In this group, the hearts were prepared as described for group 1, but they were perfused with buffers containing Ca_o of ~ 0.5 , 1.5, 3.0, and 5.0 mM. Diastolic pressure was maintained at ~ 0 mmHg along the 25-min experimental period. After this period, the hearts were rapidly removed and processed for Western blotting.

Statistical Analysis

Data are presented as means $\pm$ SE. Differences between mean values were tested with one-way ANOVA for repeated measures and Bonferroni's multiple-range test. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Increases in Diastolic Pressure Activate FAK Multicomponent Signaling Complex and ERK1/2 in Rat Myocardium

The functional parameters and the diameters of cardiac myocytes of perfused hearts in which diastolic pressure was raised from ~ 0 to ~ 15 mmHg are shown in Fig. 1A and Table 1. Increases of diastolic left ventricular pressure produced the expected increases of

left ventricular systolic pressure, with no significant effect on spontaneous heart rate or on the rate of systolic pressure increase or decrease. The increases in left ventricular diastolic pressure were paralleled by reductions in the diameter of cardiac myocytes, indicating that these cells were progressively stretched by the increasing balloon inflation (Table 1). Moreover, the increases in the left ventricular diastolic and systolic pressures induced by the left ventricular balloon inflation were accompanied by increases in the tyrosine phosphorylation of FAK (Fig. 1B). Increases in diastolic pressure from ~ 0 to ~ 5 mmHg, which increased the systolic pressure by ~ 15 mmHg and reduced the cardiac myocytes diameter by $\sim 15\%$, were accompanied by a twofold increase in the amount of tyrosine-phosphorylated FAK (Fig. 1B). Modest additional increases of FAK tyrosine phosphorylation were observed with balloon inflation to increase diastolic pressure to ~ 10 and ~ 15 mmHg.

FAK autophosphorylation at Tyr³⁹⁷ recruits and activates c-Src, which is responsible for further tyrosine phosphorylation of FAK at residues Tyr⁵⁷⁵⁻⁵⁷⁷, Tyr⁸⁶¹, and Tyr⁹²⁵ (6, 9, 14, 29, 30). This elicits further recruitment of signaling molecules such as Grb2, PI3K, and paxillin, resulting in the formation of a multicomponent signaling complex linked to various cellular functions. As shown in Fig. 1C, the load-induced FAK tyrosine phosphorylation was accompanied by an increase in the amount of c-Src coimmunoprecipitated with FAK, indicating a load-induced binding of c-Src to FAK. This was also paralleled by increases in the binding of Grb2 to FAK (Fig. 1D).

Grb2 potentially links the FAK signaling complex to the Ras/ERK1/2 pathway, related to gene regulation and cell growth. The load-induced activation of ERK1/2 was demonstrated by consistent increases in the amount of ERK1/2 detected with a specific antibody against phosphorylated (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)-ERK1/2 in the homogenates of hearts subjected to increased diastolic pressure (Fig. 2A). The link between FAK and ERK1/2 activation was further demonstrated by the load-dependent coimmunoprecipitation of FAK and ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 shown in Fig. 2B.

Immunohistochemical analysis indicated that myocardial FAK protein was localized mainly in cardiac myocytes (Fig. 3A). At higher magnification (Fig. 3B), FAK immunoreactivity appeared along the sarcolemma of cardiac myocytes and also in spots regularly distributed at the sarcoplasm, resembling the distribution of T-tubules. Immunohistochemical staining was also performed to determine the localization of ERK1/2 in the myocardium. As shown in Fig. 3, C and D, ERK1/2 protein was localized at the nuclei of cardiac myocytes, but a consistent sarcolemmal and sarcoplasmic localization was also detected. The distribution pattern of ERK1/2 in the cardiac myocytes, resembling the FAK distribution pattern, suggests the colocalization of FAK and ERK1/2 both at the sarcoplasmic and sarcolemmal sites.

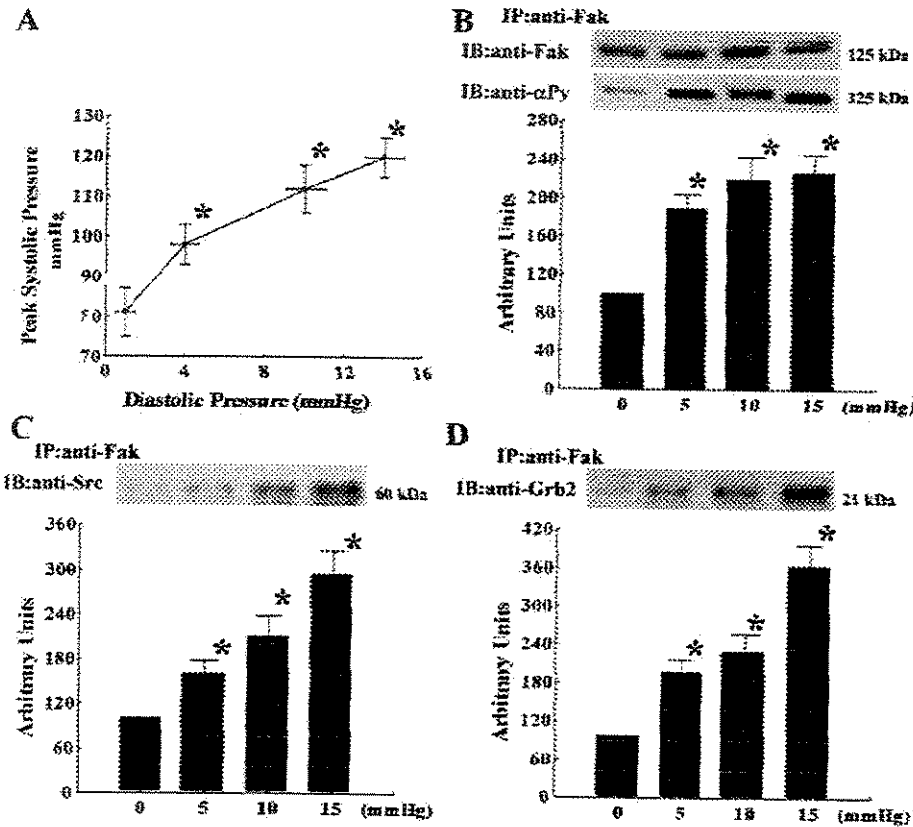


Fig. 1. Load-induced activation of the focal adhesion kinase (FAK) multicomponent signaling complex in the isolated perfused rat heart. A: graphic showing the diastolic/peak systolic pressure relationship of isolated perfused rat hearts ($n = 7$). B: representative blots (top) of immunoprecipitated (IP) FAK from myocardial extracts stained with anti-FAK and anti-phosphotyrosine (anti- α Py) antibodies. Increases in diastolic/peak systolic pressure above the baseline values (0/81 mmHg) was accompanied by increases in the amount of FAK tyrosine phosphorylation, whereas the amount of FAK remained constant. The graphic (bottom) shows the average values of the increases in FAK tyrosine phosphorylation as percent changes compared with baseline values (100%) obtained by densitometric readings of blots ($n = 7$). C: representative blot (top) and average values (bottom) of the amount of c-Src coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of hearts subjected to increasing workload ($n = 7$). D: representative blot (top) and average values (bottom) of the amount of Grb2 coimmunoprecipitated with FAK ($n = 7$ hearts). * $P < 0.05$ compared with control values. IB, immunoblotting.

Effect of Myocardial Passive Tension/Stretch on FAK and ERK1/2 Activation

Because increases in left ventricular diastolic pressure increased systolic pressure, it was not possible, in beating hearts, to distinguish between myocardial stretch and contractile activity as the major determinant of load-induced FAK and ERK1/2 activation. To test for the ability of increases in passive tension/stretch to activate these enzymes, we performed experiments in arrested hearts. As indicated in Fig. 4A, raising intraventricular pressure in these hearts still increased FAK tyrosine phosphorylation as well as the binding of c-Src (Fig. 4B) and Grb2 (Fig. 4C) to FAK.

Moreover, myocardial stretch was followed by ERK1/2 activation (Fig. 5A) and binding to FAK (Fig. 5B).

Effects of Increases in Contractile Activity on FAK and ERK1/2 Activation

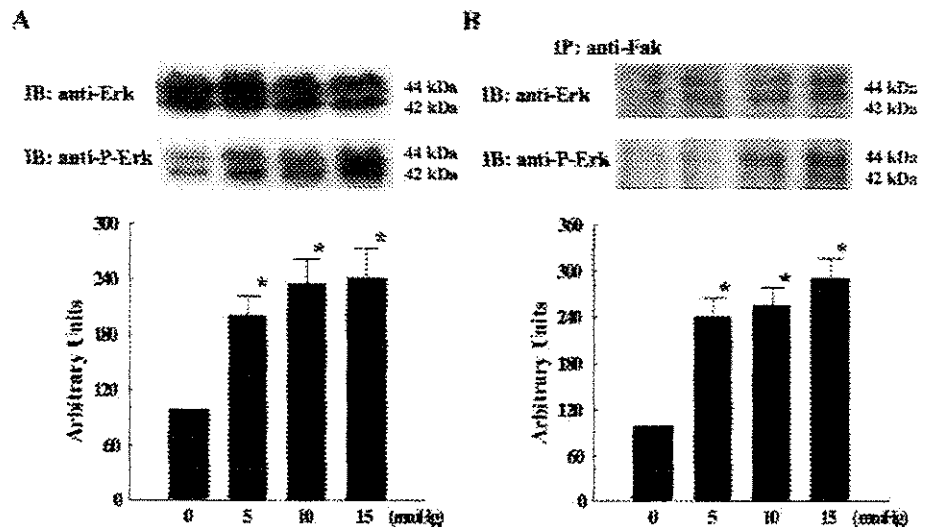
To examine whether increases in myocardial contractile activity alone are able to activate myocardial FAK and ERK1/2, experiments were performed in which the isolated hearts were perfused with different Ca_0 in the perfusate buffer. As shown in Fig. 6A, increases in the perfusate Ca_0 from 0.5 to 5 mM induced progressive increases in systolic pressure. This occurred while the diastolic pressure was maintained

Table 1. Functional parameters and diameters of cardiac myocytes of perfused hearts in which diastolic pressure was raised from ~0 to 15 mmHg

	Diastolic Pressure, mmHg			
	0	5	10	15
Systolic pressure, mmHg	81 ± 4	98 ± 5*	112 ± 6*	120 ± 5*
Diastolic pressure, mmHg	1 ± 0.5	4 ± 0.7*	10 ± 1*	14 ± 1*
Heart rate, beats/min	265 ± 17	275 ± 15	268 ± 12	250 ± 20
+dP/dt, mmHg/s	1,717 ± 92	1,816 ± 89	1,973 ± 114	2,068 ± 120
-dP/dt, mmHg/s	1,152 ± 53	1,428 ± 92	1,378 ± 62	1,400 ± 80
Myocyte diameter, μ m	9 ± 0.4	7.9 ± 0.5*	7.4 ± 0.7*	5.8 ± 0.6*

Values are means ± SE. +dP/dt and -dP/dt, rate of left ventricular pressure rise or decrease, respectively. * $P < 0.05$ compared with control values.

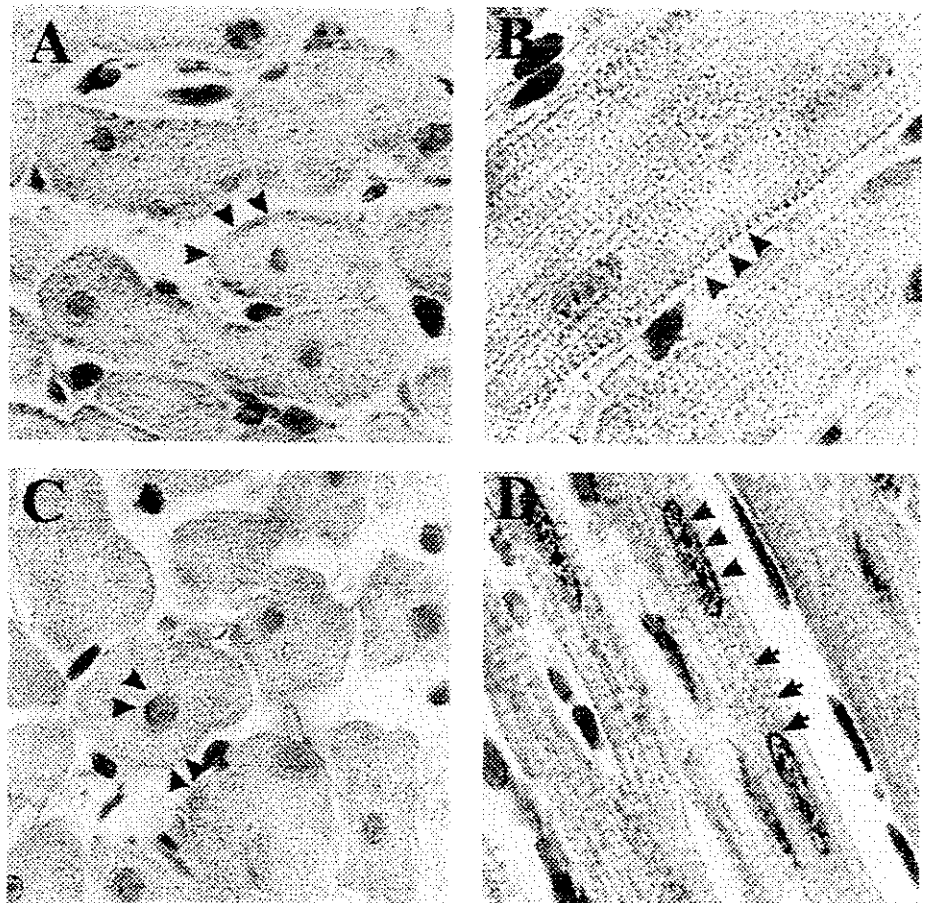
Fig. 2. Load-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation in isolated perfused rat hearts. *A*: representative blots (*top*) of the amount of ERK1/2 and activated ERK1/2 detected by anti-ERK1/2 and anti-phosphorylated (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)-ERK1/2 (P-ERK) in the homogenates of hearts subjected to increasing workload. The graphic (*bottom*) represents the average values of the increases in P-ERK1/2 as percent changes compared with baseline values (100%) obtained by densitometric readings of blots ($n = 6$). *B*: representative blots (*top*) of ERK1/2 and P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of rat hearts subjected to increasing workload. The graphic (*bottom*) represents the average values ($n = 6$) of experiments of the increases in P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK. * $P < 0.05$ compared with control values.



at 0 mmHg. Western blot analysis of FAK tyrosine phosphorylation showed that increases in contractile activity were not accompanied by FAK activation (Fig. 6B). In addition, no change could be demonstrated in the amount of c-Src and Grb2 (Fig. 6C) associated with

immunoprecipitated FAK in the homogenates of hearts perfused with different Ca_o . Besides the lack of FAK multicomponent signaling complex activation, increases in contractile activity alone could not activate ERK1/2, as indicated by the absence of changes in the

Fig. 3. Myocardial distribution of FAK and ERK1/2. *A* and *B*: localization of FAK protein (arrowheads) as seen in longitudinal and transversal myofiber sections. FAK staining was detected predominantly at sarcolemmal sites, but spots are also observed regularly distributed in the sarcoplasm. *C* and *D*: ERK1/2 protein localization (arrowheads and arrows) in longitudinal and transversal myocardial sections. The staining for this protein was detected in the myocyte nuclei, but it was also found at sarcolemmal and sarcoplasmic sites in a distribution similar to that of FAK. Magnification, $\times 1,150$.



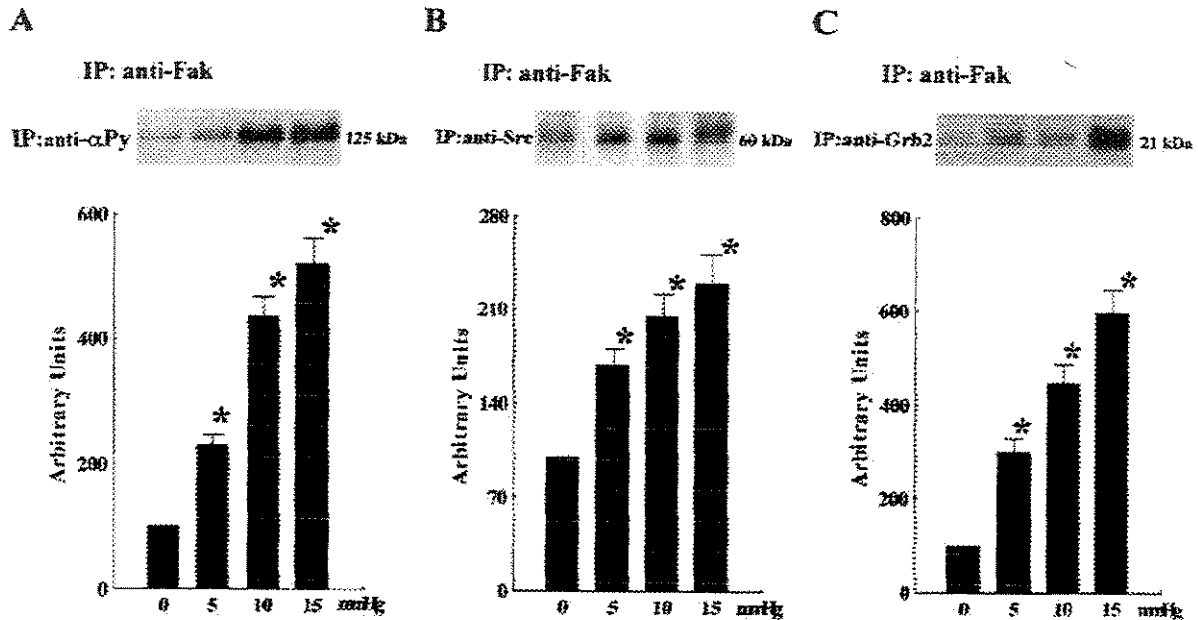


Fig. 4. Effect of increases in left ventricular pressure in isolated rat hearts perfused with a cardioplegic solution in the activation of the FAK multicomponent signaling complex. *A*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of FAK tyrosine phosphorylation detected with anti- α Py in the homogenates of arrested hearts subjected to increasing pressure by the balloon inflation. *B*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of the amount of c-Src coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of arrested hearts subjected to increasing passive tension. *C*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of the amount of Grb2 coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of arrested hearts subjected to increasing passive tension. * $P < 0.05$ compared with the values observed in hearts maintained with diastolic pressure of ~ 0 mmHg (control values).

amount of ERK1/2 detected by the phospho-specific antibody (Fig. 6D).

DISCUSSION

The present study examined the mechanical factors contributing to load-induced activation of the FAK multicomponent signaling complex in the myocardium of isolated perfused rat hearts. The results showed that the activation of the Frank-Starling mechanism induced by increases in left ventricular diastolic pressure

elicited activation of the FAK multicomponent signaling complex, as indicated by the load-induced FAK tyrosine phosphorylation and binding to c-Src and Grb2. Immunohistochemical analysis of myocardial sections confirmed that most of the myocardial FAK was localized in cardiac myocytes. The relative influences of increases in passive tension/stretch and contractile activity on the activation of the FAK multicomponent signaling complex were assessed by comparing the effects of increases in passive tension/stretch in

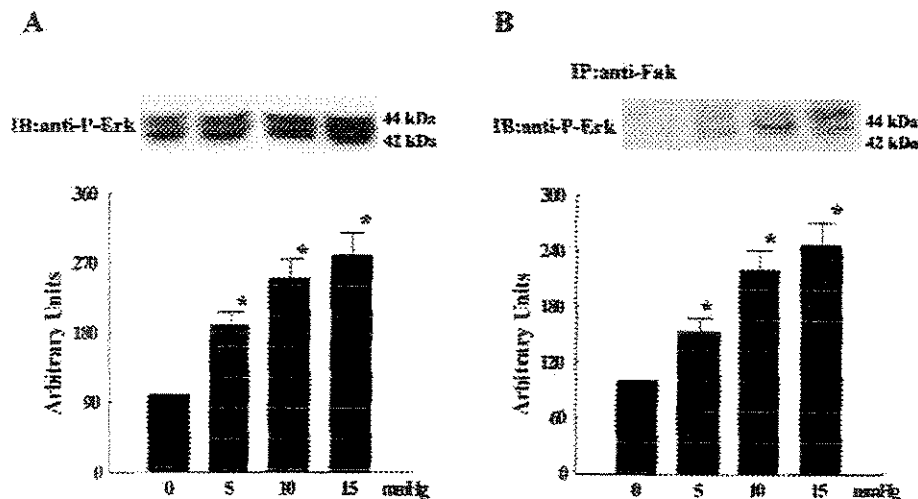
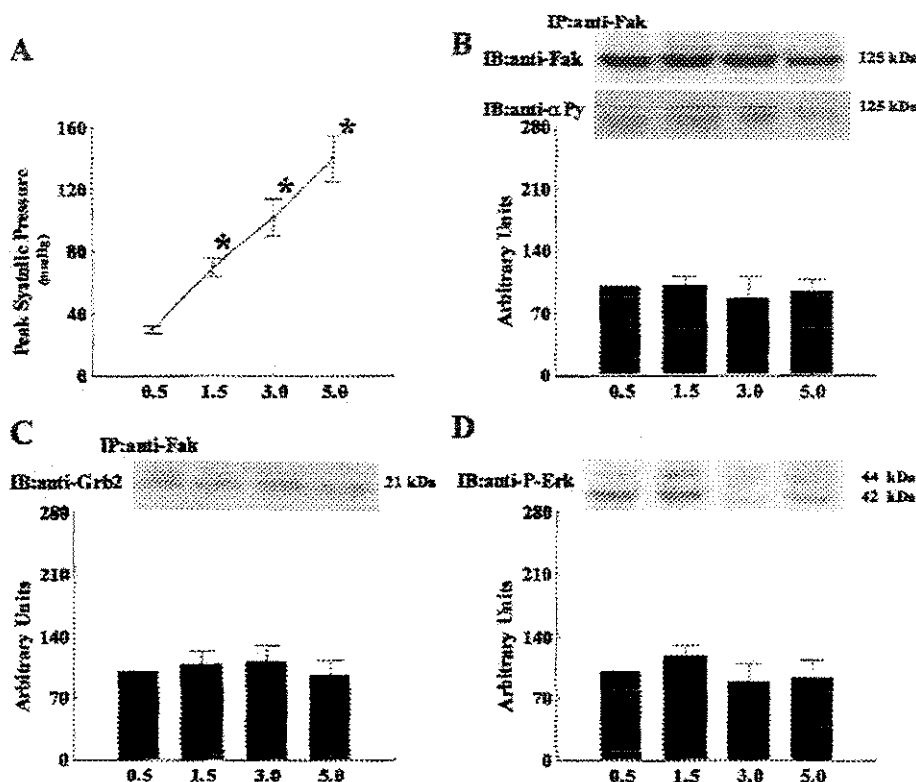


Fig. 5. Effect of increases in left ventricular pressure in isolated rat hearts perfused with a cardioplegic solution in the activation of ERK1/2. *A*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of the amount of activated ERK1/2 detected by anti-P-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) in the homogenates of arrested hearts subjected to increasing passive tension. *B*: representative blots (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of rats subjected to increasing passive tension. * $P < 0.05$ compared with control values.

Fig. 6. Effect of increasing contractile activity in the activation of FAK and ERK1/2. A: graphic showing the average values ($n = 5$) of peak systolic pressure in hearts perfused with HEPES buffer with increasing calcium concentration (Ca_0). Blots (top) and average values (bottom) representing the amount of FAK, its tyrosine phosphorylation (B), Grb2 association with FAK (C), and P-ERK1/2 (D) are shown from hearts perfused with increasing Ca_0 . * $P < 0.05$ compared with control values.



hearts perfused with a cardioplegic solution with those of increases in contractile activity induced by raising Ca_0 in the perfusion buffer. Increases in the myocardial passive tension/stretch activated the FAK multicomponent signaling complex to the same levels as the ones observed in beating hearts after the activation of the Frank-Starling mechanism. However, increases in contractile activity induced by increases in Ca_0 were unable to activate this signaling system. In addition, it was shown that load-induced FAK activation was accompanied by a simultaneous activation of ERK1/2 and binding of ERK1/2 and activated ERK1/2 to FAK. These effects were also related to increases in myocardial passive tension/stretch rather than to its contractile activity. These results indicate that FAK activation drives, at least partially, the load-induced activation of ERK1/2. This notion was strengthened by the demonstration that FAK and ERK1/2 are similarly distributed at sarcolemmal and sarcoplasmic sites of cardiac myocytes.

Mechanical Stress and FAK Activation

Activation of the FAK multicomponent signaling complex induced by increases in mechanical input to myocardial cells might be mediated by a number of factors, namely, the engagement and activation of cytoskeletal proteins associated with the cytoplasmic domains of integrins, release of autocrine/paracrine factors, or stretch-induced activation of ion channels (6, 17, 21, 28, 40). However, studies in cells in culture

showing the strict dependence of FAK activation by mechanical stimuli on integrin engagement and cytoskeletal integrity favor the hypothesis that the integrin/cytoskeletal complex is the dominant mechanism of FAK activation in cells subjected to mechanical stress (31, 35). Accordingly, in our previous study (13), we showed a rapid binding of FAK to β -actin, simultaneous with its activation in the myocardium of rats subjected to acute pressure overload. Moreover, our demonstration here that FAK is chiefly distributed along the sarcolemma, at sites resembling the costameres, further supports the hypothesis that the integrin/cytoskeleton complex is centrally involved in the activation of myocardial FAK in response to mechanical stimuli.

Biochemical events that precede FAK activation might be sensitive to mechanical events related to increases in passive tension, stretch, rate of increases in local tension, or contractile activity. The prevailing hypothesis suggests that integrins may respond to mechanical stress and activate FAK by inducing the exposure of its Tyr³⁹⁷ phosphorylation site to its kinase domain. Occupation of integrin receptors by extracellular matrix proteins is one mode of inducing autophosphorylation of Tyr³⁹⁷ (22, 34). Otherwise, activation of FAK via growth factors or other mediators is thought to occur via activation of transmembrane receptors (14). Presently, we have shown that FAK activation is related to events occurring when the myocardium is subjected to passive tension/stretch but not to contrac-

tile activity or the rate of increases in systolic tension. However, the experimental model used in the present study did not allow distinction between the effects of tension per se and stretch as the factor responsible for FAK activation. Mechanical stretch or tension applied directly to the extracellular domain of integrins results in increased protein tyrosine phosphorylation, cytoskeletal stiffening, and the activation of downstream signaling pathways, suggesting that integrins can function as mechanotransducers (31, 35, 42, 43). Studies in tracheal smooth muscle, however, have suggested that muscle length rather than tension is the primary stimulus for mechanosensitive regulation of FAK activity (37).

Cardiac myocytes are normally subjected to cyclic changes in load. In this regard, a recent study (39) has shown differences in the activation of signaling mechanisms in response to load and stretch during systolic and diastolic phases of the cycle. Different phenotypic responses were observed in cardiac myocytes subjected to stretch during the contraction or relaxation phase of the cycle. Possible differences in the efficiency of load-induced FAK activation by stretch of the myocardial cell during systole or diastole were not explored in the present study and remain an open question.

Load-Induced Activation of ERK1/2 Via FAK Multicomponent Signaling Complex

Experiments showing a load-dependent association of FAK to Grb2, ERK1/2, and phosphorylated ERK1/2 to FAK and a similar distribution of FAK and ERK1/2 at sarcoplasmic and sarcolemmal sites indicated that FAK activation may function as an upstream activator of ERK1/2 in cardiac myocytes. This hypothesis was strengthened by our results showing that load-induced ERK1/2 activation is also dependent on myocardial stretch or increases in passive tension rather than on contractile activity. These results are in accord with the results of previous studies (2, 3, 8, 9, 13, 26, 41, 44) that showed load-induced activation of ERK1/2 in the myocardium and cardiac myocytes. They also agree with recent evidence showing that activation of ERK1/2 may be controlled by cellular adhesion via integrins/FAK activation (1, 24). However, in addition to mechanical stimuli, ERK1/2 can be activated by a wide variety of different stimuli acting through diverse receptor families, including hormones and growth factors, vasoactive peptides, transforming growth factor- β -related polypeptides, inflammatory cytokines of the tumor necrosis factor family, and environmental stresses such as osmotic shock, ionizing radiation, and ischemic injury (19). Alternatively, the integrin/cytoskeletal/FAK mechanism might collaborate in the enhancement of growth factor activation of the ERK1/2 pathway by utilizing the actin network as a scaffold and FAK as a coactivator (1, 24). However, the relative contribution of FAK to ERK1/2 activation via the integrin/cytoskeleton system to load-induced myocardial hypertrophy remains unclear.

ERK1/2 are implicated as important regulators of cardiomyocyte hypertrophic growth in culture. The early activation of ERK1/2 in cardiac myocytes has been suggested to contribute to the reexpression of fetal ventricular genes (e.g., atrial natriuretic factor, β -myosin heavy chain, and skeletal muscle α -actin). More recently, studies (5) have shown that permanent activation of the ERK1/2 pathways in transgenic mice lines with cardiac-restricted expression of an activated MAP or ERK kinase (MEK)1 cDNA developed concentric hypertrophy. This indicates that the MEK1-ERK1/2 signaling pathway stimulates a physiological hypertrophic response associated with augmented cardiac function and partial resistance to apoptosis. The relative importance of integrin/FAK to these mechanisms is unknown.

In conclusion, our results provide further argument for a role of FAK in the early myocardial responses to mechanical stimuli. The demonstration here that stretch or passive tension alone instead of increases in contractile activity can activate FAK and its downstream effectors is compatible with the appealing hypothesis that load-induced FAK activation in myocardial cells could be linked to the integrin/cytoskeletal signaling complex. Furthermore, experiments showing that stretch- or passive tension-induced binding of FAK to Grb2, ERK1/2, and activated ERK1/2, and also a common localization of these enzymes at the sarcolemma and sarcoplasm of cardiac myocytes, indicate a linkage between load-induced FAK and ERK1/2 activation during mechanical overload. Whether this pathway is critical for load-induced hypertrophy in the myocardium deserves further study.

This study was supported by Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 98/114-7 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grant 521098/97-1.

REFERENCES

1. Aplin AE, Stewart AS, Assoian RK, and Juliano RL. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 153: 273–281, 2001.
2. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, and 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* 79: 162–173, 1996.
3. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, and Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 269: 1110–1119, 1994.
4. Borg TK, Goldsmith EC, Price R, Carver W, Terracio L, and Samarel AM. Specialization at the Z line of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 46: 277–285, 2000.
5. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, and Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19: 6341–6350, 2000.
6. Burridge K and Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463–519, 1996.

7. Calalb MB, Polte TR, and Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15: 954-963, 1995.
8. Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, and Sugden PH. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269: 32848-32857, 1994.
9. Clerk A, Michael A, and Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* 142: 523-535, 1998.
10. Cooper G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Annu Rev Med* 48: 13-23, 1997.
11. Cooper G. Load and length regulation of cardiac energetics. *Annu Rev Physiol* 52: 505-522, 1990.
12. Danowski BA, Imanaka-Yoshida K, Sanger JM, and Sanger JW. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol* 118: 1411-1420, 1992.
13. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, and Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 87: 558-565, 2000.
14. Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032, 1999.
15. Imanaka-Yoshida K, Enomoto-Iwamoto M, Yoshida T, and Sakakura T. Vinculin, talin, integrin $\alpha 6 \beta 1$ and laminin can serve as components of attachment complex mediating contraction force transmission from cardiomyocytes to extracellular matrix. *Cell Motil Cytoskeleton* 42: 1-11, 1999.
16. Ingber D. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechano-transduction. *Annu Rev Physiol* 59: 575-599, 1997.
17. Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78: 763-781, 1998.
18. Kuppuswamy D, Kerr C, Narishige T, Kasi VS, Menick DR, and Cooper G. Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. *J Biol Chem* 272: 4500-4508, 1997.
19. Kyriakis JM and Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869, 2001.
20. Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper C, Menick DR, Zile MR, and Kuppuswamy D. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 275: 35624-35630, 2000.
21. Liang F and Gardner DG. Autocrine/paracrine determinants of strain-activated brain natriuretic peptide gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273: 14612-14619, 1998.
22. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, and Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol* 119: 905-912, 1992.
23. Maniotis AJ, Chen CS, and Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 849-854, 1997.
24. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, and Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 135: 1633-1642, 1996.
25. Pardo JV, Siciliano JD, and Craig SW. Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *J Cell Biol* 97: 1081-1088, 1983.
26. Post GR, Goldstein D, Thuerauf DJ, Glembotski CC, and Brown JH. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 271: 8452-8457, 1996.
27. Sadoshima J and Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59: 551-571, 1997.
28. Sadoshima J, Xu Y, Slater HS, and Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 979-984, 1993.
29. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, and Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60SRC. *Mol Cell Biol* 14: 1680-1688, 1994.
30. Schlaepfer DD, Hanks S, Hunter T, and van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786-791, 1994.
31. Schmidt C, Pommerenke H, Durr F, Nebe B, and Rychly J. Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J Biol Chem* 273: 5081-5085, 1998.
32. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, and Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase [p125(FAK)] in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 8-14, 1999.
33. Sharp WW, Simpson DG, Borg TK, Samarel AM, and Terracio L. Mechanical forces regulate focal adhesion and costamere assembly in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H546-H556, 1997.
34. Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Grinsberg MH, and Brugge JS. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem* 269: 14738-14735, 1994.
35. Shyy JY and Chien S. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 9: 707-713, 1997.
36. Sonoda Y, Watanabe S, Matsumoto Y, Aizu-Yokota E, and Kasahara T. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem* 274: 36544-36549, 1999.
37. Tang D, Mehta D, and Gunst SJ. Mechanosensitive tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C250-C258, 1999.
38. Terracio L, Rubin K, Gullberg D, Balog E, Carver W, Jyring R, and Borg TK. Expression of collagen-binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res* 68: 734-744, 1991.
39. Yamamoto K, Quynh N, Dang BS, Maeda Y, Huang H, Kelly RT, and Lee RA. Regulation of cardiomyocyte mechanotransduction by the cardiac cycle. *Circulation* 103: 1459-1464, 2001.
40. Yamazaki T, Komuro I, and Kudoh S. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271: 3221-3228, 1996.
41. Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, Maemura K, Kaida T, Komuro I, Tamemoto H, Kadowaki T, Nagai R, and Yazaki Y. Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268: 12069-12076, 1993.
42. Wang N, Butler JP, and Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260: 1124-1127, 1993.
43. Wang N and Ingber DE. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J* 66: 2181-2189, 1994.
44. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, and Yazaki Y. Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 271: 33592-33597, 1996.

Expression and Distribution of NOS1 and NOS3 in the Myocardium of Angiotensin II-Infused Rats

Rosa C. Tambascia, Priscila M. Fonseca, Patricia D.C. Corat, Heitor Moreno, Jr,
Mario J.A. Saad, Kleber G. Franchini

Abstract—Studies have indicated a complex functional interaction between angiotensin (Ang) II and NO in the heart. The purpose of the present study was to examine the protein expression and tissue distribution of NO synthases 1 (NOS1) and 3 (NOS3) in the myocardium of rats that underwent continuous infusion of Ang II at 2 different rates (10 and 40 ng · kg⁻¹ · min⁻¹) for 6 days. Mean arterial pressure increased by ≈15 mm Hg in rats infused with Ang II at 40 ng · kg⁻¹ · min⁻¹, but it remained close to the values observed in saline-infused rats (≈110 mm Hg) when Ang II was infused at 10 ng · kg⁻¹ · min⁻¹. The protein expression of a 160-kDa NOS1 and a 135-kDa NOS3 were found to increase (≈200%) in the myocardium of rats infused with both subpressor and pressor doses of Ang II. Immunohistochemistry studies showed that NOS1 and NOS3 are differentially expressed in myocardial cells. NOS1 was detected in cardiac myocytes and in smooth muscle cells of small and large coronary arteries, whereas NOS3 was detected in the endothelium and in perivascular and interstitial tissues, but NOS3 was not detected in cardiac or smooth muscle cells. Ang II infusion enhanced the tissue immunoreactivity of both isoforms in their specific locations but did not change the distribution throughout the myocardium. Myocardium staining with anti-angiotensin type 1 (AT₁) receptor antibody indicated that AT₁ receptor is expressed in cardiac myocytes, coronary smooth muscle cells, and interstitial and perivascular tissues. Ang II infusion did not change the protein expression and distribution of AT₁ receptor in the myocardium. These results indicate that long-term increases in the circulating levels of Ang II modulate the protein expression of NOS1 and NOS3 and, consequently, the function of the local myocardial NO system. (*Hypertension*. 2001;37:1423-1428.)

Key Words: angiotensin II ■ nitric oxide ■ nitric oxide synthase ■ heart ■ myocardium

Angiotensin (Ang) II modulates cardiac function and cellular growth in response to physiological and pathological processes.¹ Many of the short- and long-term effects of Ang II on cardiac function and structure are due to its direct action on cardiac myocytes, vascular smooth muscle cells, and cardiac fibroblasts. These effects are mediated through at least 2 different types of receptors, which are broadly distributed in cardiac cells.² However, some of the cardiac effects of Ang II occur through the induction and release of paracrine/autocrine factors, such as transforming growth factor- β , and endothelin-1.^{3,4} In this context, in recent years, experimental evidence has indicated that Ang II and NO influence each other by interacting at various levels of regulation.^{5,6} This may have implications not only for the cardiac functions directly influenced by these factors but also for the pathogenesis of processes such as myocardial ischemia and fibrosis.

In general, Ang II and NO exert antagonistic effects in cellular function and growth.^{6,7} The cellular mechanisms responsible for this antagonism are not clear. In some systems, this interaction seems to be a simple summation of

the effects of Ang II and NO.^{7,8} Ang II is able to activate the NO system by inducing the secretion of NO in small and large coronary arteries. Because NO attenuates the vasoconstrictor effect of Ang II, this can cause a negative feedback system to limit the stimulation by Ang II.⁹ The antagonism of NO on Ang II effects is also seen in the growth effect of Ang II on cardiac fibroblasts.¹⁰

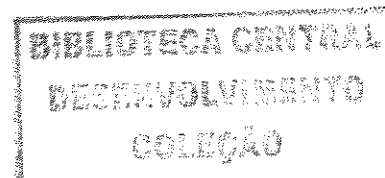
The mutual regulatory influence of Ang II and NO seems to extend to gene regulation. Studies performed in angiotensinogen gene-knockout mice and in rat adrenal medulla suggest that Ang II inhibits the expression of NO synthase (NOS)1.^{11,12} In rats, however, long-term infusion of high doses of Ang II increases the expression of NOS1 and NOS3 in the renal cortex but reduces NOS1 expression in the renal medulla.⁸ The influence of Ang II on the regulation of the constitutively expressed isoforms of NOS in the myocardium remains virtually unexplored.

Thus, the present study was designed to examine the effect of long-term increases in circulating levels of Ang II on the expression, and the cardiac tissue distribution of the constitutive isoforms of NOS (ie, NOS1 and NOS3). Experiments

Received September 7, 2000; first decision October 2, 2000; revision accepted December 4, 2000.

From the Department of Internal Medicine, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. Correspondence to Kleber G. Franchini, MD, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zefferino Vaz," 13081-970 Campinas, SP, Brasil. E-mail: franchini@obelix.unicamp.br
© 2001 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://www.hypertensionaha.org>



were also performed to examine the protein expression and the tissue distribution of angiotensin type 1 (AT₁) receptors in the left ventricle of rats treated or not treated with Ang II.

Methods

The experiments were performed on male Wistar rats (270 to 300 g) obtained from animal facilities of the State University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). All procedures followed the university's guidelines for the use of animals in experimental studies.

Antibodies and Chemicals

Rabbit polyclonal antibodies raised against NOS1, NOS3, and AT₁ were purchased from Santa Cruz Biotechnology. ¹²⁵I-labeled protein A was from Amersham. Ang II was from Calbiochem. All other reagent grade chemicals were from Sigma.

Rat Instrumentation and Arterial Pressure Monitoring

All surgical procedures were performed under aseptic conditions. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (70 mg/kg body wt IM) and diazepam (6 mg/kg body wt IM) and maintained at 37°C. Tygon-tipped polyvinyl cannulas were placed in the lower abdominal aorta and inferior vena cava throughout the femoral artery and vein, respectively. The cannulas were exteriorized at the back of the neck in a 25-cm length of stainless steel spring (0.5-cm diameter) attached to a swivel (Instech) at the top of an individual cage that allowed the animal to move freely in its cage while being infused. The animals received single doses of antibiotic (Pentabiotico Veterinário, 100 mg/kg body wt) and were allowed to recover for 5 days before the study. During this period, 0.9% saline was infused continuously through the venous catheter at a rate of 0.5 mL/h. After this period, saline was substituted for Ang II solutions in 2 different concentrations (10 and 40 ng · kg⁻¹ · min⁻¹) in the experimental animals, whereas control animals continued to receive only saline.

Arterial pressure was monitored daily for 6 days for a 1-hour period from 3:00 to 4:00 PM. The amplified signal was beat-to-beat recorded and sampled at 100 Hz with WINDAQ-PRO data acquisition software (DATAQ Instruments).

Tissue Homogenization

At the end of day 6 of Ang II infusion, the animals were anesthetized, hearts were rapidly removed, and the ventricles were minced coarsely and homogenized in ~10 volumes of solubilization buffer (1% Triton-X 100; 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4); 100 mmol/L sodium pyrophosphate; 100 mmol/L sodium fluoride; 10 mmol/L EDTA; 10 mmol/L sodium vanadate; 2 mmol/L PMSF; and 0.1 mg aprotinin/mL) at 4°C with the polytron operated at maximum speed for 30 seconds. The extracts were centrifuged at 10 000g at 4°C for 30 minutes, and the supernatant was used for the assay. Protein concentrations were determined with the Bradford dye binding method. The supernatant was treated with Laemmli's sample buffer containing 100 mmol/L dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 4 minutes and then subjected to SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories). An equal amount of total protein was used for all samples. Electrophoretic transfer of proteins from the gel to nitrocellulose membrane was performed for 90 minutes at 120 V (constant).

Protein Analysis by Immunoblotting

The nitrocellulose membrane was preincubated 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 membrane was then incubated with anti-NOS1, anti-NOS3, or anti-AT₁ receptor antibodies diluted in 10 mL of blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4°C and washed for 60 minutes in blocking buffer without milk or BSA. The blots were subsequently incubated with 2 μCi of ¹²⁵I-labeled protein A (30 μCi/μg) in 10 mL of blocking buffer for 2 hours at room temperature, and then washed again for 30 minutes as described above. ¹²⁵I-labeled protein A bound to the

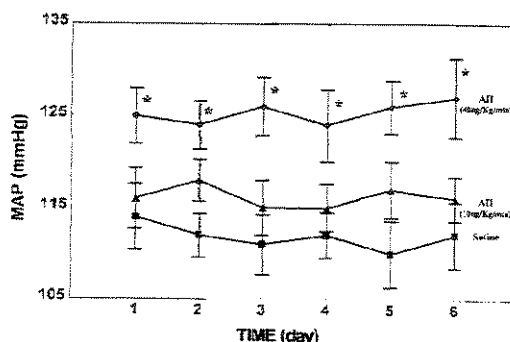


Figure 1. Effects of a 6-day infusion of Ang II and saline ($n=7$) on mean arterial pressure (MAP). Ang II was infused at rates of 10 ($n=8$) and 40 ng ($n=7$) · kg⁻¹ · min⁻¹. * $P<0.05$ vs values of saline-infused rats.

specific antibodies was detected by autoradiography. Band intensities were quantified by optical densitometry of the developed autoradiographs.

Tissue Preparation for Immunohistochemistry

Rats were heparinized, deeply anesthetized with pentobarbital sodium, 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 Histotec (Merck). Sections (5 μm) 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 minutes. The sections were preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk on 0.1 mol/L PBS) for 45 minutes at 37°C, followed by overnight incubation with the primary antibodies anti-NOS1, anti-NOS3, and anti-AT₁ (1:50) 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 hours at 25°C. After washing as above, sections were subjected for 5 minutes 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 (negative controls) failed to produce any significant staining.

Statistical Methods

Data are mean ± SEM of absolute (arterial pressure) or percent (blots) values. Differences among mean values were tested with a 2-way ANOVA for repeated measurements. Bonferroni's multiple-range test was used as a post hoc analysis if the probability from the F test was <0.05.

Results

Effect of Ang II Infusion on Arterial Pressure

Figure 1 summarizes the effects of saline and Ang II infusion on mean arterial pressure over the course of a 6-day period (saline, $n=7$; 10 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ Ang II, $n=8$; 40 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ Ang II, $n=7$). The mean arterial pressure of saline-infused rats remained stable at ~110 mm Hg during the experimental period. No significant change was observed in mean arterial pressure of rats infused with Ang II at 10 ng · kg⁻¹ · min⁻¹, but rats infused with Ang II at 40 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ showed a sustained increase in mean arterial pressure of ~15 mm Hg compared with saline-infused rats.

Effect of Ang II Infusion on Myocardial Expression of NOS1, NOS3, and AT₁

Representative Western blots and the average values ($n=5$) of densitometric readings of blots obtained with anti-NOS1

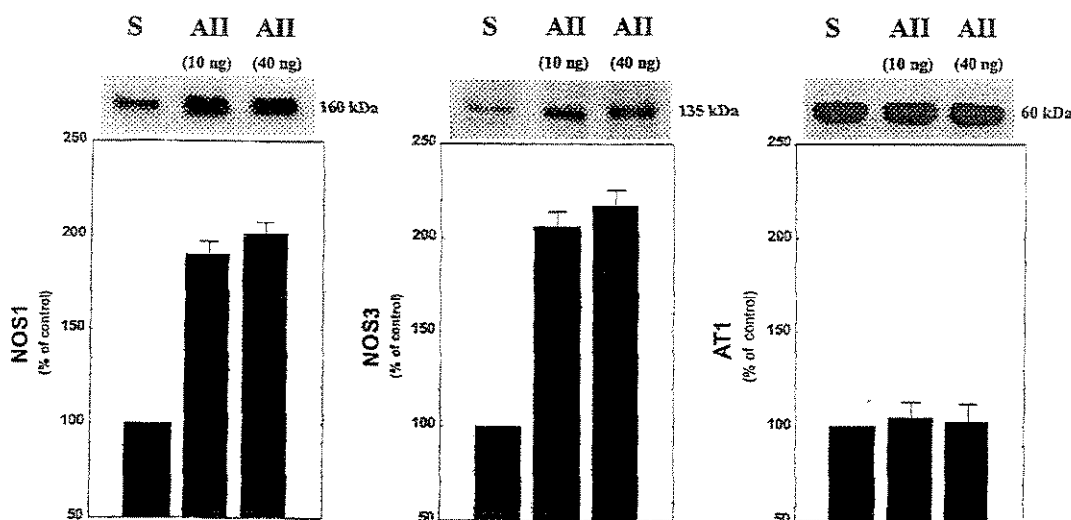


Figure 2. Ang II enhances the protein expression level of NOS1 and NOS3. Representative blots and average values (5 experiments) of myocardial expression of NOS1, NOS3, and AT₁ receptor in saline- (S) and Ang II-infused rats. NOS1 and NOS3 indicate isoforms 1 and 3 of NOS. * $P < 0.05$ vs values of saline-infused rats.

and anti-NOS3 antibodies are shown in Figure 2A and 2B. Single bands of 160 and 135 kDa were observed in blots of myocardial homogenates stained with anti-NOS1 and anti-NOS3 antibodies, respectively. Infusion of Ang II increased the protein expression levels of both NOS1 and NOS3 by $\approx 200\%$. Ang II infused at 10 and 40 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ produced similar increases in the protein expression levels of NOS1 and NOS3.

A single 60-kDa band was observed in Western blots of the myocardium homogenates stained with anti-AT₁ antibody (Figure 2C). Comparable protein expression levels of AT₁ receptor were observed in saline- and Ang II-infused rats.

Effect of Ang II Infusion on Myocardial Distribution of NOS1, NOS3, and AT₁

Figure 3 shows the NOS1 staining in the left ventricle of saline- (Figure 3A and 3C) and 10 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Ang II-infused rats (Figure 3B and 3C). NOS1 staining was detected in cardiac myocytes (Figure 3A and 3B, arrows) and in the smooth muscle cells of small and large coronary vessels (Figure 3C and 3D, arrows and asterisks). No significant staining for NOS1 was detected in the endothelium or in the perivascular tissues (Figure 3C and 3D). Remarkable increases of NOS1 staining intensity were observed in cardiac myocytes and in the smooth muscle cells of coronary arteries of rats infused with Ang II. This effect was similar for Ang II infused at rates of 10 and 40 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (data not shown).

NOS3 staining was detected (Figure 4A and 4B) in the endothelium (arrowheads) and in perivascular and interstitial tissues (asterisks) of myocardial small and large coronary arteries. Virtually no reaction product was detected within the media of coronary arteries (Figure 4A and 4B) or cardiac myocytes (data not shown). Infusion of Ang II increased the staining intensity of both the perivascular and interstitial tissues and apparently left the endothelium staining un-

changed. Again, this effect was similar for both Ang II infusion rates (data not shown).

Figure 5A and B shows the AT₁ receptor staining in the myocardium of saline- and Ang II-infused rats. AT₁ receptor was detected in cardiac myocytes (arrows), in the smooth muscle cells of small and large coronary arteries (arrowheads), and in the perivascular and interstitial tissues. No remarkable difference in the intensity or the distribution of the signal was detected in saline- or Ang II-infused rats (data not shown).

Discussion

The present study showed that long-term infusion of Ang II enhances the protein expression of NOS1 and NOS3 in the rat myocardium. This effect was not dependent on the pressor effect of Ang II because similar increases in the myocardial NOS1 and NOS3 protein levels were found in rats infused with subpressor and pressor doses of this hormone. Myocardial staining with specific antibodies against NOS1 and NOS3 confirmed and extended the observation of Western blot experiments to show that NOS1 and NOS3 are differentially expressed in myocardial cells. NOS1 was detected in cardiac myocytes and in smooth muscle cells of small and large coronary arteries, but it could not be detected in the endothelium or perivascular and interstitial tissues. However, NOS3 was detected in the endothelium and perivascular and interstitial tissues, but it was not detected in cardiac myocytes or in coronary smooth muscle cells. Ang II infusion enhanced the tissue immunoreactivity for both NOS1 and NOS3 in their specific locations, but it did not change the distribution of these isoforms in myocardial structures. Finally, the myocardium staining with anti-AT₁ antibody indicated that the AT₁ receptor, the major effector of cardiac effects of Ang II, is expressed in cardiac myocytes, smooth muscle cells of coronary vessels, and perivascular and interstitial tissue. These data are compatible with the notion that Ang II

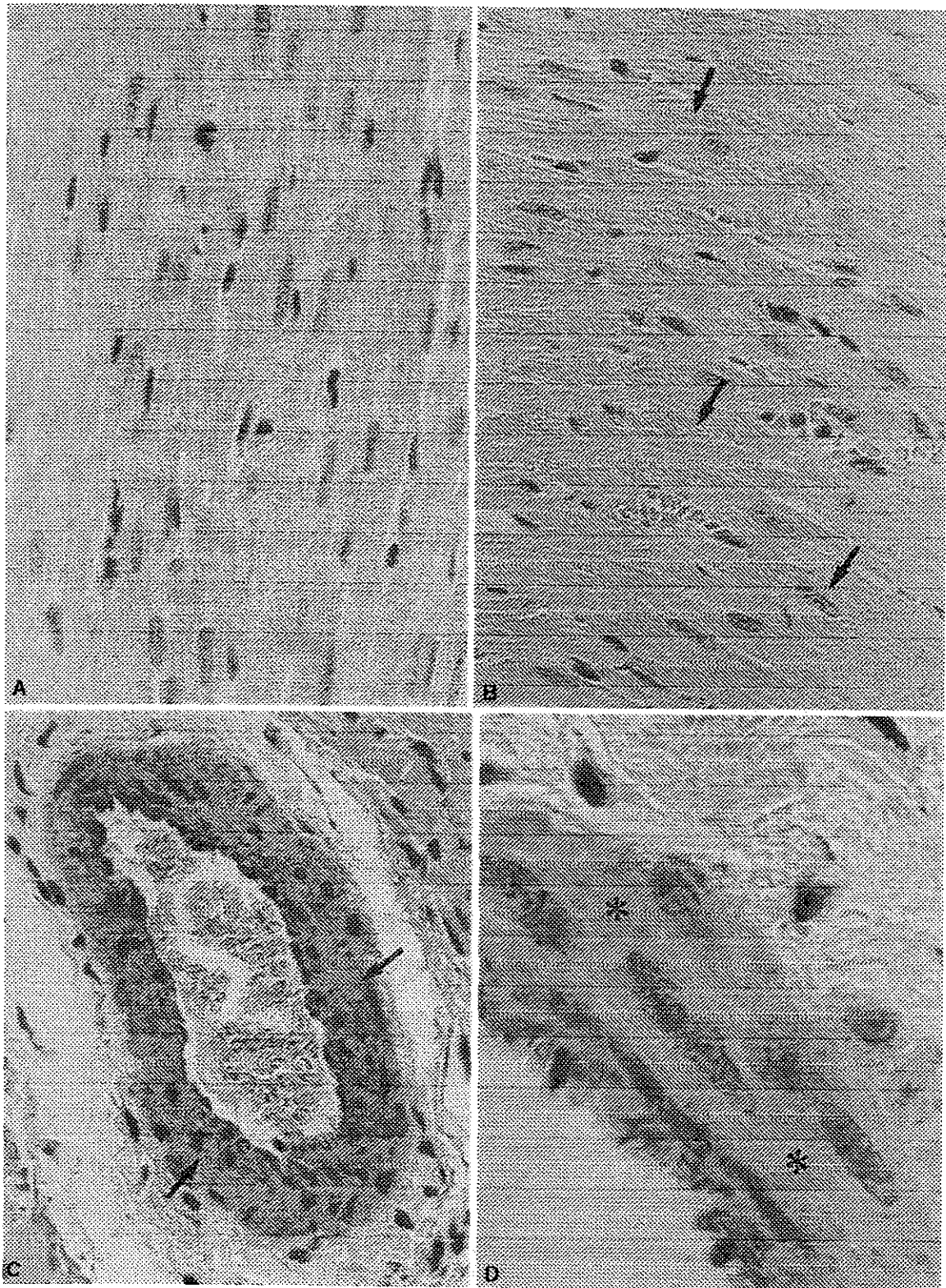


Figure 3. Light photomicrographs of sections of left ventricle from rats infused with saline (A, C) and Ang II ($10 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) stained with anti-NOS1 antibody. These are representative examples of 5 different experiments. A, Cardiac myocytes demonstrating a light positive staining in saline-infused rats. B, Cardiac myocytes of a rat subjected to Ang II infusion, showing a marked staining for NOS1 (arrows). C, A large coronary artery of a rat infused with saline, demonstrating a light staining of smooth muscle cells (arrows). D, High magnification of a large coronary artery of Ang II-infused rat, demonstrating an intense staining of smooth muscle cells (asterisks).

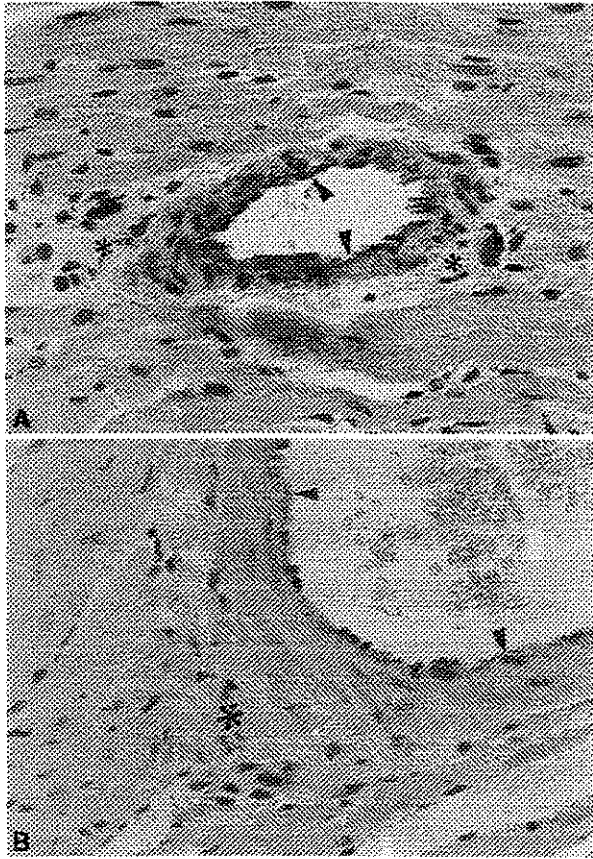


Figure 4. Myocardial distribution of NOS3. A, Representative example of a coronary artery of a saline-infused rat. NOS3 staining is observed in endothelium (arrowheads) and in perivascular tissue (asterisks). B, Representative example of a coronary artery of a rat treated with Ang II ($10 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). NOS3 is also observed in the endothelium and perivascular tissue (arrowheads and asterisk).

modulates the protein expression of NOS1 and NOS3 and, consequently, the function of the NO system in the myocardial cells.

Although the results of the present study indicate that Ang II may regulate the expression of NOS1 and NOS3 in the rat myocardium, the mechanisms responsible for this phenomenon were not explored in the present study. However, because the effects of Ang II on NOS1 and NOS3 protein expression were demonstrated to be independent of the pressor effect of this hormone, it is reasonable to ascribe the enhanced expression of these NOS isoforms to the action of Ang II on myocardial cells, either directly or indirectly through the local release of autocrine/paracrine factors.

The mechanisms for the regulation of NOS1 and NOS3 expression in the myocardium are virtually unknown. However, the NOS1 promoter region has *cis*-acting elements such as AP-2, transcriptional enhancer factor-1, cAMP response binding element, and nuclear factor- κ B, whereas NOS3 promoter region has Sp1, GATA, and cAMP-responsive element.¹³ Accordingly, Ang II regulates the activity of transcription factors such as nuclear factor- κ B and GATA-4 in vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes,

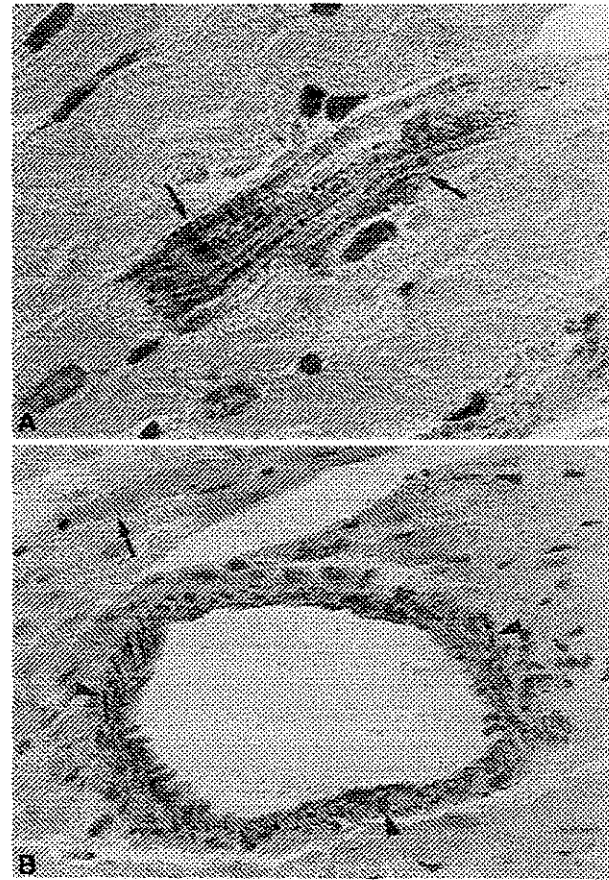


Figure 5. Representative examples of myocardial distribution of AT₁ receptors in saline-infused rats. A, Immunostaining of cardiac myocytes (arrows). B, Immunostaining of vascular smooth muscle of a coronary artery (arrowheads).

respectively.^{14,15} These mechanisms could be implicated in the regulation of NOS1 and NOS3 expression during Ang II infusion. In addition, Ang II upregulates the cardiac expression of various growth factors such as transforming growth factor- β_1 , platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor, which potentially can induce gene expression, including the constitutive isoforms of NOS.¹³

Although NOS1 and NOS3 are known to be expressed in the heart, the cellular distribution of these 2 isoforms is still not clear.¹⁵ The anatomic distribution and physiological roles of NOS1 in the heart have been the subjects of relatively few reports to date. Early reports indicated that NOS1 is expressed exclusively in the myocardial neurons.¹⁶ More recent studies, however, demonstrated that cardiac myocytes, in addition to the neurons, indeed stain for NOS1.¹⁷ Our present data show that in addition to cardiac myocytes, NOS1 is also expressed in smooth muscle cells of coronary arteries. This localization of NOS1 in cardiac and smooth muscle cells may indicate a tissue-specific regulation. Accordingly, it is now well accepted that cardiac, skeletal, and smooth muscle cells express μ NOS1, an elongated splice variant of NOS1.^{18,19} Whether or not the product detected in the present study is the μ NOS1 isoform needs further study.

The results of the present study show a remarkable difference in the distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardial cells. In addition to the expected endothelial location of NOS3, it was also detected in the interstitial and perivascular tissues. Increases in the staining produced by Ang II infusion were easily detected in the interstitial and perivascular tissues, but no staining could be detected in the endothelium. The reason for the absence of detectable changes in the NOS3 staining in the endothelium could be related to the narrow space occupied by the endothelial cell, which makes conclusions difficult in regard to changes in NOS3 expression by immunohistochemical analysis. The increases of NOS3 protein expression in cardiac interstitial and perivascular tissues induced by Ang II could be due to the well-known effect of angiotensin II on interstitial tissue proliferation and fibrosis.

NOS3 was not detected in significant amounts in cardiac myocytes. Although this result agrees with some of the early studies, it contrasts with more recent studies showing that cardiac myocytes indeed express NOS3.¹⁷ The reason for this discrepancy is not clear but could be related to antibody specificity against certain isoforms of NOS3 in cardiac myocytes.

Finally, we have shown that AT₁ receptor is also expressed in cardiac and vascular smooth muscles, as well as in interstitial and perivascular tissues, the structures in which the increases in protein expression of NOS1 and NOS3 were detected. This suggests that Ang II could enhance NOS1 and NOS3 expression via AT₁ receptor. However, the mediation via the angiotensin type 2 receptors is also possible.

In conclusion, the present study demonstrates that long-term infusion of Ang II is accompanied by an increase in the protein expression of NOS1 and NOS3 in the cells of rat myocardium, independent of changes in arterial pressure. The present data also provide evidence that NOS1 and NOS3 are differentially distributed in cardiac myocytes, coronary vessels, and interstitial tissue and that these NOS isoforms are upregulated by Ang II in these specific locations. The Ang II upregulation of NOS1 and NOS3 in myocardial cells could account for the impairment of the direct contractile and growth effects of this hormone on vascular smooth muscle cells, cardiac myocytes, and fibroblasts when plasma or tissue levels of Ang II are increased. This may favor functions such as local blood flow, modulation of oxygen consumption, and inhibition of fibroblasts, vascular smooth muscle cells, and cardiac myocyte growth effects of Ang II.

Acknowledgments

This study was sponsored by grants from Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. 98/11403-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 521098/97-1).

References

- Weber KT, Brilla CG. Pathologic hypertrophy and the cardiac interstitium: fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-1865.
- Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT₁ receptor subtype. *Circ Res*. 1993;73:413-423.
- Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karlner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- β and endothelin from fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1998;40:352-363.
- Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Zagrosek VR. Angiotensin II directly increases transforming growth factor β 1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res*. 2000;46:463-475.
- Li D, Tomson K, Yang B, Mehta P, Croker BP, Mehta JL. Modulation of constitutive nitric oxide synthase, *bc1-2* and *Fas* expression in cultured human coronary endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation and angiotensin II: role of AT₁ receptor activation. *Cardiovasc Res*. 1999;41:109-115.
- Ritchie RH, Schiebinger RJ, Lapointe MC, Marsh JD. Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide. *Am J Physiol*. 1998;275(pt 2):H1370-H1374.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res*. 1998;83:1271-1278.
- Chin SY, Pandey KN, Shi S-J, Kobori H, Moreno C, Navar LG. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of Ang II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1999;277(pt):F797-F804.
- Hennington BS, Zhang H, Miller MT, Granger JP, Reckelhoff JF. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*. 1998;31:283-288.
- Rizvi MA, Myers PR. Nitric oxide modulates basal and endothelin induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:1779-1789.
- Kihara M, Umehara A, Kadota T, Yabana M, Tamura K, Nyuui N, Ogawa N, Murakami K, Fukamizu A, Ishii M. The neuronal isoform of constitutive nitric oxide synthase is up-regulated in the macula densa of angiotensinogen gene-knockout mice. *Lab Invest*. 1997;76:285-294.
- Iwai N, Hanai K, Teoyama I, Kitamura Y, Kinoshita M. Regulation of neuronal nitric oxide synthase in rat adrenal medulla. *Hypertension*. 1995;25:431-436.
- Papademetriou A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43:509-520.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor κ B through AT₁ and AT₂ in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res*. 2000;86:1266-1272.
- Herzig TC, Jobe SM, Aoki H, Molkentin JD, Cowley AW, Izumo S, Markham BE. Angiotensin II type 1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:7543-7548.
- Shah AM, McCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Therap*. 2000;86:49-86.
- Feron O, Bellhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996;271:22816-22814.
- Silvagno F, Xia H, Bredt DS. Neuronal nitric oxide synthase m, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1996;271:11204-11208.
- Schwarz PM, Kleinert H, Försternann U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase 1 expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2584-2590.