

ÁLISSON CAMPOS CARDOSO

**FAK interage com MEF2 e ativa região
intrônica regulatória do *fosfolamban* em
resposta ao estímulo mecânico**

**Campinas - SP
2008**

ÁLISSON CAMPOS CARDOSO

**FAK interage com MEF2 e ativa região
intrônica regulatória do *fosfolamban* em
resposta ao estímulo mecânico**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica. Área de Concentração: Medicina experimental

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

**Campinas - SP
2008**

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

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

C179f Cardoso, Álisson Campos
 FAK interage com MEF2 e ativa região intrônica regulatória do
 fosfolamban em resposta ao estímulo mecânico / Álisson Campos
 Cardoso. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Kleber Gomes Franchini
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Regulação da expressão gênica. 2. Interações proteína-
proteína. 3. Transdução de sinal celular. I. Franchini, Kleber
Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : FAK interacts with MEF2 and drives the Stretch-Induced
Activation of an intronic enhancer of phospholamban gene in
cardiomyocytes**

Keywords: • Gene expression regulation
 • Protein, protein interaction
 • Cellular signal transduction

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira
Profa. Dra. Ljubica Tasic

Data da defesa: 04 - 08 - 2008

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

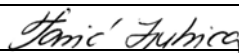
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini

Membros:

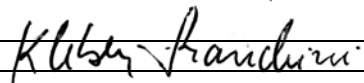
Professor (a) Doutor (a) **Marcos Antonio de Oliveira**



Professor (a) Doutor (a) **Ljubica Tasic**



Professor (a) Doutor (a) **Kleber Gomes Franchini**



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

Data: 04/08/2008

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pelas oportunidades e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Por compartilhar comigo seu tema de pesquisa e principalmente seus conhecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular e de vários outros laboratórios em que realizei meu trabalho pelas inúmeras contribuições na realização deste estudo.

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

*"A ciência lhes fornece apenas um ângulo da sabedoria e, a ela, é
preciso juntar os ângulos da arte, da filosofia, da política,
da religião, para que se possa obter uma visão
harmoniosa de tudo"*

Newton Freire Maia

Lista de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Mecanismos de Mecanotransdução	15
1.2 Quinase de Adesão Focal (FAK)	17
1.2.1 Estrutura	17
1.2.2 Mecanismos de Ativação da FAK	18
1.2.3 Controle da Atividade da FAK	19
1.2.4 Efeitos da Ativação da FAK no Coração	21
1.2.5 Distribuição Subcelular da FAK	22
1.3 Fatores de Transcrição MEF2	24
1.4 Justificativa	26
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo:	28
2.2 Objetivos específicos:	28
2.3 Hipótese:	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Animais	30
3.2 Materiais	30
3.2.1 Soluções e tampões	30
3.2.2 Meios de Cultura	31
3.2.3 Anticorpos	31
3.2.4 Oligonucleotídeos	31
3.3 Monitorização hemodinâmica	32
3.4 Modelo de sobrecarga de pressão	33
3.5 Preparação de extratos totais de proteínas do ventrículo esquerdo de rato	34
3.6 Western Blotting	35
3.7 Fracionamento subcelular	36
3.8 Indução e purificação de proteínas recombinantes	37
3.9 Ensaio de precipitação (Pulldown assay)	39
3.10 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA ou gel shift)	40
3.10.1 Marcação da sonda de DNA	40
3.10.2 Reação de ligação e eletroforese do complexo DNA/Proteína	40
3.11 Ensaio Pulldown de DNA	41
3.12 Isolamento e estiramento de miócitos ventricular de ratos neonatos	42
3.13 Ensaio com gene reporter	42
3.14 Análise Estatística	43

4. RESULTADOS	45
4.1 Expressão, fosforilação e distribuição da FAK em ventrículo esquerdo submetidos a sobrecarga pressórica aguda.	46
4.2 Efeito da sobrecarga pressórica aguda no miocárdio na interação das proteínas nucleares com a região intrônica pln1.	49
4.3 Estudos de interação FAK com pln1	51
4.4 Estudo da interação MEF2 com a sonda pln1 por ensaios de gel shift e Pulldown de DNA.	53
4.5 A porção Cterminal da FAK interage com o fator de transcrição MEF2.	55
4.6 Função regulatória da sequência intrônica pln1 e o efeito do estiramento na expressão do gene reporter.	58
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXO	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Esquema dos mecanismos envolvidos na transdução de sinal em miócitos cardíacos, que levam a hipertrofia em decorrência de um estímulo mecânico.	16
Figura 02. Esquema representativo da estrutura linear da FAK, demonstrando os 3 domínios (FERM, KINASE E FAT). Acima representado os resíduos de tirosina que são fosforilados durante a sua ativação.....	18
Figura 03. Esquema representativo da estrutura do gene pln, demonstrando em verde os exons, em preto a região intrônica central e em vermelho a região de 182pb identificada em ensaio de ChIP com anticorpo anti-FAK (plni1).	26
Figura 04. Esquema representativo do modelo de constrição da aorta utilizado nos experimentos in vivo. Representando o local onde é inserido o clamp de prata no arco aórtico e os transdutores de pressão na carótida direita e na femoral direita.	32
Figura 05. Registro representativo de pressão arterial de ratos, obtido em experimento de coarctação da aorta, demonstrando o aumento na pressão arterial na aorta ascendente desses animais, após a constrição do arco aórtico.	34
Figura 06. Gel representativo demonstrando o extrato total de proteínas de coração assim como as frações nuclear e citoplasmática do ensaio de fracionamento subcelular. M: Marcador de peso molecular; ET: Extrato total; FN: Fração nuclear; FC: Fração citoplasmática	37
Figura 07. Gel representativo demonstrando o extrato total de E.coli sem a indução da expressão gênica com o IPTG (IPTG -) e após a indução da expressão da proteína recombinante GST-FERM com IPTG (IPTG +) e em seguida demonstrando a purificação da proteína recombinante GST-FERM utilizando pérolas de glutationa sefarose.	38
Figura 08. A) Gráfico representativo do registro de pressão sistólica na carótida esquerda de ratos submetidos à constrição do arco aórtico, demonstrando o aumento da pressão na carótida desses animais. B) Gráfico representativo da média das pressões sistólicas avaliadas na artéria carótida esquerda (PSC) e na artéria femoral esquerda (PSF) dos ratos controle e dos ratos submetidos à constrição do arco aórtico por 60 minutos. (n=8) *p<0,05 comparado a PSC de animais controle. CT- controle; CoAo- Constrição da aorta.	47
Figura 09. A) Western blotting representativos da expressão e da fosforilação da FAK em extratos protéicos de coração de ratos controle (pool de 2 animais) e submetidos a sobrecarga pressórica por 10, 30 e 60 minutos (pool de 2 animais). B) Western blotting e gráfico representativos da expressão de FAK no extrato total (T) e nas subfrações citosólica (C) e nuclear (N) do miocárdio de ratos controle e submetidos a coarctação da aorta (CoAo) por 60 minutos.....	49
Figura 10. Gel shift e gráfico representativo da interação proteína DNA, entre os extratos nucleares de coração de ratos controle (CT) ou submetidos a diversos tempos de coarctação da aorta (CoAo), 10, 30 e 60 minutos com a sonda plni1. SF: sonda fria.	51

Figura 11. Gel shift representativo, demonstrando que não houve interação entre FAK ou suas porções com a sonda plni1.	52
Figura 12. A) EMSA representativo, demonstrando o complexo de associação entre as proteínas nucleares de ratos controle e ratos coarctados com fragmento plni1 (seta) e a diminuição da formação do complexo utilizando o fragmento plni1 contendo a mutação no sítio de ligação do MEF2 no DNA. B) EMSA representativo, demonstrando o complexo de associação entre a proteína recombinante GST-MEF2 com a sonda plni1 (seta) e a diminuição da formação do complexo utilizando o fragmento plni1 contendo a mutação no sítio de ligação do MEF2. C) Pulldown de DNA entre a construção GST-MEF2 e a sonda plni1. Como controle da especificidade usamos um competidor (sonda fria) e o controle negativo da reação (GST).	54
Figura 13. A) Western blotting representativo da interação entre FAK e MEF2 por ensaio de coimunoprecipitação. B) Ensaio de precipitação (Pulldown assay) entre as proteínas recombinantes GST-FERM, GST-Cterminal e o controle GST, com extrato nuclear de coração de rato submetido a coarctação da aorta por 60 minutos. C) Ensaio de precipitação para demonstrar a interação direta entre a proteína recombinante GST-MEF2 e a proteína purificada FAK fosforilada no seu sítio de autofosforilação (FAK + ATP). D) Ensaio de precipitação para demonstrar a interação direta entre a proteína recombinante GST-MEF2 e a porção Cterminal da FAK clonada com cauda de histidina. KDa - KiloDalton	57
Figura 14: Microscopia de luz ultravioleta demonstrando o ensaio de EGFP nas células que receberam os vetores ptk-EGFP, ptk-PLN-EGFP e ptk-MUT-EGFP respectivamente. As imagens são compostas pelo filtro vermelho e verde no alto da figura (figuras menores) e pela sobreposição de ambas as imagens (figuras maiores).	58
Figura 15: A) Gráfico representativo demonstrando a atividade de luciferase das células transfectadas com o vetor basal Tk e das células transfectadas com o vetor contendo a região intrônica plni1 e submetidas ou não a 60 minutos de estiramento. (*p<0,05 comparado ao TK; #p<0,05 comparado ao CT). B) Gráfico representativo demonstrando a atividade de luciferase das células transfectadas com os vetores ptk-LUC, ptk-PLN-LUC e ptk-MUT-LUC respectivamente. CT: Controle. (*p<0,05 comparado ao TK; #p<0,05 comparado ao MUT). U.A.- Unidades Arbitrárias.	60
Figura 16. Modelo da sinalização via FAK, demonstrando que a FAK transloca-se para o compartimento nuclear, em decorrência de estímulo mecânico, onde interage com o fator de transcrição MEF2 e coopera para a ativação da expressão gênica do pln.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ANF	- Fator natriurético atrial
ATP	- Adenosina tri-fosfato
C	- Fração citosólica do fracionamento subcelular
ChIP	- Imunoprecipitação de cromatina
CoAo	- Constrição da aorta
CT	- Controle
DMEM	- Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTT	- 1,4-Dithiothreitol
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFP	- <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EMSA	- Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética
ERK	- <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	- <i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAT	- <i>Focal Adhesion Targeting</i>
Grb2	- Growth factor receptor-bound protein 2
GST	- Glutathione S-Transferase
HDAC-II	- Desacetilases de histonas da classe II
IPTG	- Isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo
JNK	- Jun N-terminal kinase
KDa	- KiloDalton
Luc	- Luciferase
MADS Box	- MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor
MAP	- Proteína ativada por mitógeno
MEF2	- <i>Myocyte enhancer factor 2</i>
Mdm2	- <i>Mouse double minute 2</i>
MOPS	- N-morpholino propanesulfonic acid
Mut	- <i>pln1</i> contendo mutação no sítio de ligação para MEF2
MVRN	- miócitos ventriculares de ratos neonatos
N	- Fração nuclear do fracionamento subcelular

pb	- Pares de base
PBS	- Tampão salina fosfato
PCR	- Reação de polimerização em cadeia
PI 3-quinase	- Phosphoinositide 3-kinases
<i>pln</i>	- Gene que codifica a proteína <i>fosfolamban</i>
<i>pln1</i>	- Região intrônica do gene que codifica o fosfolamban, identificada em ensaios de imunoprecipitação de cromatina com anticorpo anti-FAK.
PMSF	- Phenylmethylsulphonyl fluoride
PSC	- Pressões sistólicas avaliadas na artéria carótida esquerda
PSF	- Pressões sistólicas avaliadas na artéria femoral esquerda
RNA	- Ácido ribonucléico
SERCA	- <i>Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SHP2	- Src homology 2-containing tyrosine phosphatase
siRNA_{FAK}	- Small interference RNA para a FAK
T	- Extrato protéico total
Tk	- promotor <i>thymidine kinase</i> do vírus Herpes simplex
U.A.	- Unidades Arbitrárias

Estudos anteriores demonstraram que em miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos ocorre pronta fosforilação e ativação da FAK. Resultados de estudos recentes, realizados em corações de ratos indicaram que em resposta a estímulos mecânicos, a FAK, além de ser ativada, localiza-se no núcleo dos miócitos cardíaco. Estudos conduzidos em corações de ratos *Wistar* adultos, utilizando a técnica de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com anticorpo anti-FAK, identificaram uma sequência intrônica de 182pb do gene *fosfolamban* (*plni1*), contendo sítio para a ligação do fator de transcrição MEF2. Portanto, no presente estudo, investigamos se a região intrônica do gene que codifica o *fosfolamban* tem função regulatória transcricional. Utilizando técnicas de EMSA (Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética), ensaios de Precipitação e de gene reporter, avaliamos a interação entre a FAK e *plni1* além da função regulatória transcricional dessa sequência. Como resultado, demonstramos que ocorre pronta ativação da FAK e seu acúmulo no núcleo de miócitos cardíacos de ventrículo esquerdo de ratos submetidos a coarctação da aorta. Através de ensaios de EMSA, demonstramos que proteínas nucleares de ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecarga pressórica, apresentaram um aumento na interação com a sonda *plni1* em relação aqueles de ratos controles. Também, ensaios de EMSA indicaram uma interação entre MEF2 e a sonda *plni1*, mas não entre a FAK ou seus domínios (FERM e Cterminal) com a sonda *plni1*. Ensaaios de precipitação com fragmentos recombinantes da FAK (GST-FERM e GST-Cterminal) com extratos nucleares de coração de ratos coarctados indicaram uma associação entre FAK e MEF2. Ensaaios adicionais demonstraram que a interação entre FAK e MEF2 é dependente do domínio Cterminal e do estado fosforilado da FAK. Estudos de transfecção com gene reporter, utilizando plasmídeo contendo a sequência *plni1*, em cultura de miócitos cardíacos submetidos ao estiramento, demonstraram que a região intrônica *plni1* possui função regulatória transcricional e esse papel é dependente da ligação do fator de transcrição MEF2 ao seu sítio específico no DNA. Portanto, esses dados indicam que FAK e MEF2 podem estar envolvidos na regulação da expressão do gene *pln* através de regulação mediado pela região intrônica *plni1*.

Palavras chave: Regulação da expressão gênica, Interações proteína-proteína, Transdução de sinal celular.

Previous studies have shown that mechanical stress induces phosphorylation and activation of FAK in cardiac myocytes. Recent studies carried out in rat overloaded hearts indicated that FAK re-locates in the nucleus of the cardiac myocytes. By assays in the nuclei of overloaded cardiac myocytes with chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach with anti-FAK antibody, we identified an intronic sequence of phospholamban gene (*pln1*), containing a MEF2 consensus site. In the present study, we investigated whether *Pln1* has any regulatory function in the *pln*. To accomplish this, we combined techniques such as EMSA (*Electrophoreses Mobility Shift Assay*), reporter gene and pulldown assays. FAK was shown to be rapidly activated and to accumulate in the nuclei of cardiac myocytes taken from overloaded left ventricle. Using EMSA assays, we demonstrated that nuclear extracts of left ventricle rats overloaded, interacted with the *pln1* probe. EMSA assays, also indicated an interaction between MEF2 and the *pln1* probe, but no interaction was found between FAK or its domains (FERM and Cterminal) with the *pln1*. Pulldown assays with FAK recombinant fragments (GST-FERM and GST-Cterminal) and nuclear extracts from left ventricle overloaded indicated that FAK and MEF2 physically interact through FAK Cterminal domain. Reporter gene assays, using a construction of *pln1* coupled luciferase transfected to cardiac myocytes culture underwent stretching, had demonstrated that the intronic region has transcriptional regulatory function and this role is dependent of the transcription factor MEF2 binding site in the DNA. Therefore, these data indicate that FAK and MEF2 interact in the nuclei of cardiac myocytes and that FAK/MEF2 complex may regulate *phospholamban* gene expression through the *pln1*.

Keywords: Gene expression regulation, Protein, protein interaction, Cellular signal transduction

1. INTRODUÇÃO

Estímulos mecânicos têm papel central na patogênese de alterações fenotípicas do miocárdio e câmaras cardíacas nas várias doenças que acometem o coração. Além do mais, a persistência de tensão aumentada na parede das câmaras cardíacas é um dos principais fatores que contribui para a deterioração funcional progressiva que caracteriza a insuficiência cardíaca (CHIEN, 1999; HOSHIJIMA e CHIEN, 2002; BERENJI et al. 2005). No entanto, são ainda pouco conhecidos os mecanismos pelos quais forças mecânicas externas são transformadas em sinais bioquímicos intracelulares e levam à mudança na programação transcricional que, em última instância, é responsável pelas alterações na estrutura e função dos miócitos cardíacos.

1.1 Mecanismos de Mecanotransdução

O termo mecanotransdução refere-se ao mecanismo celular em que forças mecânicas externas são transformadas em sinais bioquímicos intracelulares (SAMAREL, 2005). No entanto os mecanismos moleculares que acoplam o estímulo hipertrófico à reprogramação gênica em miócitos cardíacos ainda são pouco conhecidos.

O citoesqueleto dos miócitos cardíacos tem função importante na transdução de eventos mecânicos em eventos bioquímicos. Como sustentam e ancoram as estruturas sub-celulares, as proteínas do citoesqueleto sofrem tensão e se deformam podendo servir como transdutores de força nos miócitos cardíacos (SUSSMAN et al., 2002; EPSTEIN et al., 2003, PENG et al., 2006). As regiões de contato entre estruturas do citoesqueleto sarcomérico e não-sarcomérico de miócitos cardíacos e elementos da matriz extracelular, conhecidas como costâmeros, são consideradas como potenciais sítios de transdução de sinais

mecânicos em sinais bioquímicos (SUSSMAN et al., 2002; EPSTEIN et al., 2003; LAMMERDING et al., 2004; SAMAREL, 2005).

Estudos demonstram que múltiplos mecanismos contribuem para a mecanotransdução em miócitos cardíacos: 1) ativação de proteínas sinalizadoras, como integrinas e enzimas tirosino quinases; 2) canais iônicos sensíveis ao estiramento celular, como canais de K^+ , canais de Cl^- , bombas de Na^+/K^+ e canais de Ca^{++} ; 3) receptores, principalmente receptores tirosino quinases e receptores transmembranas acoplados a proteína G; 4) produção e/ou secreção de fatores de crescimento, como endotelina-I e principalmente de angiotensina II (SADOSHIMA e IZUMO, 1997) (figura 01).

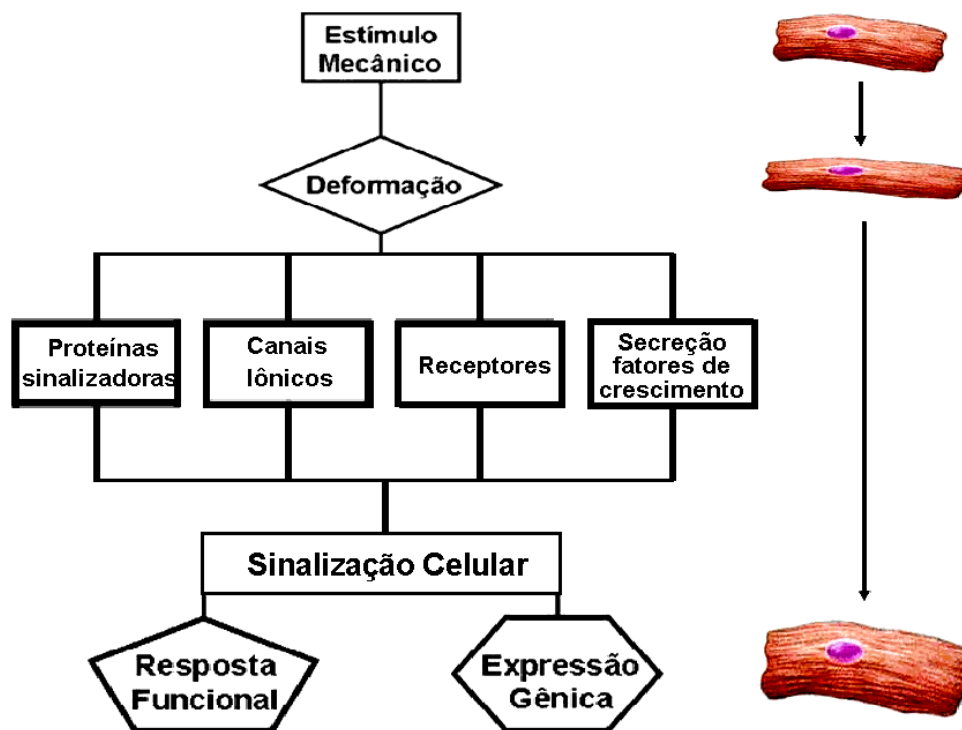


Figura 01. Esquema dos mecanismos envolvidos na transdução de sinal em miócitos cardíacos, que levam a hipertrofia em decorrência de um estímulo mecânico.

1.2 Quinase de Adesão Focal (FAK)

1.2.1 Estrutura

Dentre as importantes moléculas envolvidas nos processos de sinalização celular e mecanotransdução, destacamos a quinase de adesão focal (FAK). Esta proteína é uma tirosino quinase, de aproximadamente 1052 aminoácidos, com um peso molecular aproximado de 125kDa. A FAK possui 3 domínios em sua estrutura: o domínio N-terminal, o domínio quinase e o domínio Cterminal (figura 02).

O domínio N-terminal é composto por um domínio FERM, responsável pela interação com a extremidade citoplasmática da subunidade da integrina beta (SCHALLER et al., 1995), e regula a atividade de quinase da FAK através de um mecanismo inibitório intramolecular (COOPER et al., 2003; LIETHA et al., 2007). Além disso, esse domínio é composto por 3 lobos (F1, F2 e F3). O lobo F1 é responsável pela interação com a proteína supressor tumoral p53. O lobo F2 foi descrito ser responsável pela translocação para o núcleo celular. Já o lobo F3 do domínio FERM está relacionado a interação com a proteína Mdm2 (*mouse double minute 2*) (LIM et al., 2008).

Uma sequência de aminoácidos (*linker*) conecta o domínio N-terminal ao domínio quinase. Esta sequência contém o resíduo de tirosina 397, que é sítio de autofosforilação e ativação da FAK e um sítio para a ligação da porção SH2 da proteína Src (CECCARELLI, et al., 2006). O domínio quinase na região central correspondente a porção catalítica da enzima, apresenta uma alça de ativação que contém os resíduos de tirosina 576 e 577 (CALALB, et al., 1995).

Já o domínio Cterminal, é rico em sítios de interação proteína-proteína (seqüências ricas em prolina), um sítio de reconhecimento SH3 e uma

extremidade Cterminal conhecida como FAT (*Focal Adhesion Targeting*) responsável pela adesão focal (HILDEBRAND et al., 1993) e pela associação com as proteínas talina (CHEN et al., 1995) e paxilina (HILDEBRAND et al., 1995).

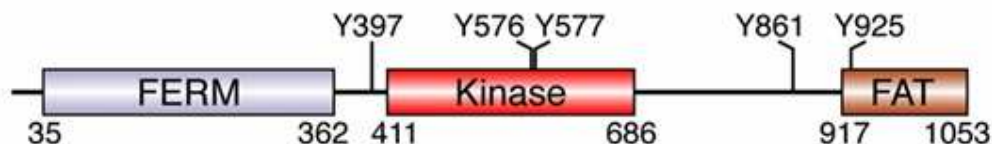


Figura 02. Esquema representativo da estrutura linear da FAK, demonstrando os 3 domínios (FERM, KINASE E FAT). Acima representado os resíduos de tirosina que são fosforilados durante a sua ativação.

1.2.2 Mecanismos de Ativação da FAK

A sinalização via FAK requer que esta seja ativada através da autofosforilação no resíduo de tirosina 397. Essa fosforilação em tirosina resulta na formação de um sítio de alta afinidade para a porção SH2 da Src e essa associação favorece a fosforilação em outros resíduos de tirosina da FAK (407, 576, 577, 861 e 925), levando a uma atividade máxima desta enzima (CALALB et al., 1995). Estudos recentes utilizando técnicas de espectrometria de massas identificaram 6 novos sítios de fosforilação (148, 347, 441, 503, 850, 1007), cuja fosforilação não dependeria da associação com a Src (CICCIMARO et al., 2006).

O resíduo 397 fosforilado constitui ainda um sítio de ligação para outras proteínas como a PI3K, participando nas cascatas de sinalização anti-apoptóticas via AKT. Os resíduos de tirosinas 576 e 577 se encontram no interior do domínio quinase da FAK e a fosforilação destes sítios estão envolvidas na regulação da atividade enzimática (MAA e LEU, 1998). Já a fosforilação da tirosina 925, localizado no domínio Cterminal da FAK, cria sítios de ligação para o domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2. Essa associação leva a ativação de

MAPkinases, reguladoras do crescimento e proliferação celular (SCHWARTZ et al., 1995; PARSONS 1996; SCHLAEPFER et al., 1998).

Estudos anteriores demonstraram que estímulos mecânicos em miócitos cardíacos induzem um aumento na fosforilação e, por conseguinte, na atividade da FAK. O estiramento aplicado diretamente em miócitos cardíacos de ratos neonatos provoca a ativação da FAK (TORSONI et al., 2003). Além disso, a ativação da FAK por estiramento não depende da ativação de fatores parácrinos, o que indica ser a ativação da FAK, pelo estiramento, dependente de mecanismo intrínseco do miócito ligado diretamente ao estímulo mecânico (TORSONI et al., 2003). Da mesma forma, a sobrecarga pressórica, induzida pela constricção do arco aórtico, induz um aumento na fosforilação da FAK (FRANCHINI et al., 2000). Uma vez ativada essa proteína ativa uma série de proteínas (ERK, JNK, MAP, RhoA/ROCK) envolvidas no processo de hipertrofia cardíaca (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002; TORSONI et al., 2003; FONSECA et al., 2005; TORSONI et al., 2005; NADRUZ et al., 2005).

1.2.3 Controle da Atividade da FAK

Estudos recentes indicaram que o domínio FERM tem papel importante na regulação de sua atividade e estado de fosforilação em células (TOUTANT et al., 2002; COOPER et al., 2003). Deleções da região N-terminal da FAK resultam em hiperfosforilação da região Cterminal, sugerindo que o domínio FERM exerce influência inibitória no domínio catalítico da FAK (COHEN e GUAN, 2005). Estudos demonstram que o domínio FERM interage com o domínio catalítico, sugerindo que esta interação é responsável pela influência inibitória que a região N-terminal tem na atividade da FAK (COOPER et al., 2003). Com base nesses dados, presume-se que, a ativação da FAK depende de interação com proteínas

regulatórias que se ligam à região amino-terminal e/ou de modificação conformacional intra-molecular que desabilite a interação entre os domínios FERM e catalítico (COOPER et al., 2003).

Ainda neste contexto, foi proposto anteriormente (TORSONI et al., 2003; FONSECA et al., 2005) que ativação da FAK em miócitos cardíacos, pode ser dependente da interação entre o domínio FERM da FAK e a cadeia pesada da miosina sarcomérica. Os resultados desses estudos demonstraram que FAK e miosina estão associadas na banda A sarcomérica em miócitos cardíacos e que a ativação da FAK, por estímulo mecânico, reduz drasticamente essa associação. Esses estudos sugerem que a deformação da miosina sarcomérica induzida pelo estiramento, daria início ao processo de desbloqueio da autoinibição que o domínio FERM exerce no domínio catalítico da FAK, possibilitando a fosforilação e ativação do sítio de tirosina 397.

Estudos anteriores demonstraram que FAK e RhoA estão associadas em miócitos cardíacos não estirados e que a ativação da FAK, por estímulo mecânico é controlada pela via de sinalização RhoA/ROCK. A ativação da Rho aumenta a fosforilação da FAK, por outro lado sua inibição a diminui (TORSONI et al., 2005).

Estudos demonstram que o nível de fosforilação basal da FAK seja regulado pela atividade basal da tirosino-fosfatase SHP2 e também que a sustentação de níveis elevados de fosforilação da FAK em miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos se deve à inibição da atividade da SHP2. (MANES et al 1999). Além disso, estudos demonstram que a inativação da SHP2 é acompanhada por aumento na fosforilação em tirosina e, conseqüentemente, ativação da FAK, em células em cultura (Yu et al., 1998). A depleção da Shp2 através do uso de interferência por RNA (siRNA_{Shp2}), foi acompanhada por um

aumento na fosforilação em tirosina 397 da FAK e induziu o desenvolvimento de fenótipo hipertrófico em miócitos cardíacos não estirados (MARIN et al., 2008).

1.2.4 Efeitos da Ativação da FAK no Coração

A FAK uma vez ativada participa na transdução de sinal em decorrência de estímulo mecânico. Conforme descrito anteriormente, a fosforilação da FAK em tirosina 397 cria sítio para a interação com a Src. Essa interação FAK/Src é importante para a fosforilação de resíduos adicionais de FAK, a associação com PI 3-quinase e Grb2, e ativação das vias de crescimento, mediada pela ERK1/2 e da via de sobrevivência celular mediada pela AKT (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002).

A ativação da FAK por estiramento em miócitos cardíacos tem papel crítico na regulação da re-expressão de genes do programa fetal induzida por estímulo mecânico (TORSONI et al., 2003; NADRUZ et al., 2005). Existe ampla constatação experimental (HOSHIJIMA e CHIEN, 2002) de que a re-expressão do programa gênico fetal é parte essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos.

Estudos em animais com deleção gênica da FAK resultaram em defeitos mesodermis e letalidade embrionária, por volta da segunda semana, principalmente devido a defeitos no desenvolvimento cardíaco (ILIC et al., 1995; FURUTA et al., 1995). Além disso, animais com deleção gênica condicional para FAK em miócitos cardíacos apresentaram também, alta letalidade embrionária com defeitos na parede ventricular e defeitos no septo ventricular (PENG et al., 2008). Esses dados indicam que a FAK estaria envolvida em processos essenciais no desenvolvimento do coração.

Mais recentemente, a importância da FAK para as alterações fenotípicas do ventrículo esquerdo, desencadeadas por sobrecarga pressórica, foi demonstrada em modelo de camundongo com deleção condicional para FAK em miócitos cardíacos. Dois trabalhos independentes foram desenvolvidos utilizando o mesmo modelo e apresentaram fenótipos diferentes. PENG et al., (2006) demonstraram que os animais com deleção restrita para a FAK apresentaram hipertrofia cardíaca excêntrica, aumento da fibrose e aumento no tamanho dos miócitos cardíacos. Por outro lado, DiMICHELE et al (2006), relataram uma atenuação da hipertrofia cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica.

Dados do nosso laboratório, utilizando inibição gênica da FAK através do uso de interferência por RNA (siRNA_{FAK}), demonstraram que animais pré-tratados com siRNA_{FAK} e submetidos a sobrecarga pressórica induzida pela constrição da aorta, apresentaram uma atenuação da hipertrofia ventricular esquerda e uma melhora na função cardíaca. Além disso, esses animais apresentaram uma diminuição do marcador gênico de hipertrofia β -MHC e uma atenuação da fibrose intersticial. Adicionalmente, o estudo demonstrou, que animais submetidos a sobrecarga pressórica e tratados após 4 semanas com siRNA_{FAK}, apresentaram uma regressão da hipertrofia ventricular esquerda, uma atenuação no diâmetro dos miócitos cardíacos e uma atenuação na fibrose intersticial (CLEMENTE et al., 2007). Esses dados indicam que a FAK é importante não apenas para o desenvolvimento da hipertrofia ventricular, mas também para a manutenção do estado hipertrófico induzido por sobrecarga pressórica.

1.2.5 Distribuição Subcelular da FAK

A FAK apresenta uma distribuição citoplasmática em miócitos cardíacos, localizando-se nos pontos de adesão focal e na região intracelular de

junção das integrinas com proteínas do citoesqueleto (CARY e GUAN, 1999). Há evidências também que a FAK está associada a cadeia pesada de miosina em miócitos cardíacos (FONSECA et al., 2005).

Estímulos mecânicos provocam modificações na localização subcelular da FAK. Em miócitos cardíacos submetidos a 60 minutos de sobrecarga ventricular esquerda, ocorre acúmulo de FAK no compartimento nuclear (FONSECA et al., 2005). Estes dados estão de acordo com dados de estudos anteriores (Yi et al., 2003), que indicam que a FAK transloca-se para o núcleo e discos intercalares de miócitos hipertróficos em ratos espontaneamente hipertensos com falência cardíaca. Miócitos cardíacos de ratos neonatos submetidos a 30 minutos de estiramento apresentam, também grande quantidade de FAK no núcleo (SENYO et al., 2007). Estes dados dão suporte à idéia de que a translocação nuclear da FAK pode exercer função importante na transdução de sinal em miócitos cardíacos.

Ainda em suporte à hipótese de que a FAK pode contribuir diretamente para sinalização no nível do núcleo, a seqüência de aminoácidos da FAK apresenta um domínio LXXLL (onde L é leucina e X é qualquer aminoácido) na porção Cterminal da FAK. Esta seqüência é reconhecida como uma seqüência de reconhecimento de receptores nucleares (SAVKUR e BURRIS, 2004). Portanto, é possível que a seqüência LXXLL da FAK habilite ligações a receptores nucleares e determine sua participação no controle da atividade transcricional.

Além disso, um estudo recente (KADARE et al., 2003) demonstrou que a FAK sofre sumoilação na *Lys*-152 no núcleo de células NIH-3T3 e COS induzida por PIAS1, a qual também regula a atividade de vários fatores de transcrição, incluindo STAT1, p53, c-Jun e receptores de andrógenos. Esta alteração pós-tradução é reconhecida como importante sinalizador de transporte nuclear.

Por fim, (LIM et al., 2008) relataram que o lobo F2 do domínio FERM é o responsável pela localização nuclear da FAK. Mutações pontuais em 5 aminoácidos básicos (Lisina 190, 191, 216, 218 e Arginina 221) no lobo F2 do domínio FERM inibiram a translocação da FAK para o núcleo.

No entanto ainda são pouco conhecidos os mecanismos envolvidos na translocação da FAK para o compartimento nuclear e o papel dela no núcleo.

1.3 Fatores de Transcrição MEF2

Os fatores MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) pertencem à família MADS Box (MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor) e foram descritos pela primeira vez como fatores de transcrição que se ligam a seqüências de DNA ricas em A/T nos promotores de vários genes músculo-específicos. Existem 4 genes da família MEF2 que foram identificados em vertebrados: *mef2a*, *b*, *c* e *d* que são expressos de forma distinta, mas em padrões de sobreposição durante a embriogênese e nos tecidos adultos. Eles possuem domínios de ligação ao DNA quase idênticos na extremidade N-terminal com alta homologia no domínio MADS Box (aminoácidos 1-57). Este domínio é responsável pela ligação ao DNA e dimerização das proteínas, permitindo que os fatores MEF2 se liguem como homo ou heterodímeros a um elemento *cis* com a seqüência (C/T)TA(A/T)₄TA(G/A). Um domínio adjacente ao MADS Box chamado domínio MEF2 (aminoácidos 58-86) que é característico da família, influencia a afinidade de ligação ao DNA assim como a interação com co-fatores. A região Cterminal apresenta o domínio de transativação. Nessa região, também ocorrem processos complexos de *splicing* alternativo, com certos exons presentes em todos os tipos celulares, enquanto outros são limitados a tipos celulares específicos (BLACK e OLSON, 1998).

Recentemente, foi demonstrado que a regulação da expressão de genes do programa hipertrófico por estímulos mecânicos depende da regulação do fator de transcrição MEF2, sabidamente envolvido na regulação da expressão de genes como aqueles que codificam proteínas de resposta imediata (por exemplo, cJUN), proteínas sarcoméricas, proteínas mitocondriais codificadas pelo genoma nuclear e proteínas relacionadas ao transporte celular de glicose (NADRUZ et al., 2003; NADRUZ et al., 2004; NADRUZ et al., 2005). Sítios potenciais de ligação para o MEF2 foram identificados em regiões reguladoras de vários genes expressos no coração, incluindo a *creatina-quinase*, *cadeia leve da miosina* e *fator natriurético atrial*, sugerindo que o MEF2 pode influenciar a expressão gênica no coração (BLACK e OLSON, 1998).

Os fatores da família MEF2 podem ser ativados por Ca^{++} , Calcineurina, MAP quinases p38, ERK5 e CaM quinase. Além disso, os fatores MEF2 também são regulados pela associação com desacetilases de histonas da classe II (HDAC-II) no núcleo. Neste caso, a sinalização pelo Ca^{++} , através da ativação de CaM-quinase leva à fosforilação de HDAC-II, que se transloca para o citosol, permitindo a ativação dos fatores MEF2 (BACKS e OLSON, 2006).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que, além dos fatores acima mencionados, a regulação da atividade transcricional do MEF2 pode ser regulado pela atividade da ERK5 em miócitos cardíacos (NADRUZ et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que a atividade da FAK é um fator crítico para a ativação dos fatores MEF2 em resposta a estímulos mecânicos (NADRUZ et al., 2005). No entanto, são ainda pouco conhecidos os mecanismos pelos quais a FAK regula a atividade do MEF2 e de outros fatores de transcrição potencialmente envolvidos na resposta hipertrófica a estímulos mecânicos.

1.4 Justificativa

Os dados da literatura sustentam a importância da sinalização da FAK na transdução de sinal em resposta a estímulos mecânicos. Várias evidências demonstram que a FAK transloca-se para o núcleo de miócitos cardíacos submetidos ao estiramento e que a FAK, portanto, pode ter papel importante na sinalização para o núcleo. Há estudos que demonstram que a atividade da FAK pode influenciar a expressão de genes. No entanto, são ainda pouco conhecidos os mecanismos intermediários pelos quais a FAK regula a expressão gênica em miócitos cardíacos.

Diante disso, foram realizados experimentos em nosso laboratório conduzidos em corações de ratos *Wistar* adultos submetidos à sobrecarga de pressão por constrição aórtica, utilizando a técnica de Imunoprecipitação da cromatina (ChIP), para identificar possíveis seqüências de DNA genômico associadas a FAK no núcleo de miócitos cardíacos. Resultados preliminares demonstraram que o anticorpo anti-FAK imunoprecipita uma seqüência (*plni1*) de 182pb (pares de base) pertencente a uma região intrônica do gene *fosfolamban* (*pln*), um importante regulador da SERCA (*Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) (figura 03). Este resultado sugere que a sinalização pela FAK controle a expressão do *fosfolamban* em resposta ao estímulo mecânico.

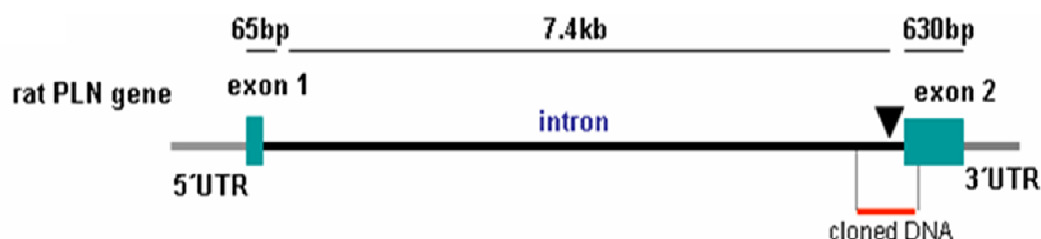


Figura 03. Esquema representativo da estrutura do gene *pln*, demonstrando em verde os exons, em preto a região intrônica central e em vermelho a região de 182pb identificada em ensaio de ChIP com anticorpo anti-FAK (*plni1*).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo

Estudar a regulação de região intrônica do gene que codifica o fosfolamban, identificada em ensaios de imunoprecipitação de cromatina com anticorpo anti-FAK.

2.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1. Efeito da sobrecarga pressórica sobre a expressão, fosforilação e distribuição da FAK em ventrículo esquerdos submetidos a sobrecarga pressórica aguda.

Objetivo específico 2. Investigar se a região intrônica *pln1* possui função regulatória transcricional.

Objetivo específico 3. Estudar a interação da FAK com a região intrônica *pln1*.

2.3 Hipótese

A FAK regula o gene que codifica o fosfolamban através de interação (direta ou indireta) com região intrônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos Wistar, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB), Campinas-SP, com peso entre 150 e 200g.

3.2 Materiais

3.2.1 Soluções e tampões

- Solução Basal (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,02% Tween 20)
- Solução Corante de Proteínas (45% álcool etílico, 10% ácido acético glacial, 0,27% azul de comassie)
- Solução Descorante de Proteínas (5% álcool etílico, 12,5% ácido acético glacial)
- Solução de Lowry:
 - Solução A: 2% Na_2CO_3 ; 0,1N NaOH
 - Solução B1: 1% CuSO_4
 - Solução B2: 2% NaK tartarato
 - Solução C: para cada 10 mL de solução A, adicionar 100 μL de solução B1 e 100 μL de solução B2.
- TBE 1X (89mM Tris HCl; 89mM Ácido Bórico; 2mM EDTA, pH8,0)
- Tampão de estocagem (50mM Hepes pH 7,4; 150mM NaCl; 5mM DTT; 10% Glicerol)
- Tampão de extração para *Western blotting* e imunoprecipitado (100mM Tris-HCL pH 7,4; 100mM pirofosfato de sódio; 10mM EDTA; 100mM fluoreto de sódio; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/mL aprotinina, 10% Triton-X 100)

- Tampão de incubação (20 mM Tris HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 10µg/mL aprotinina; 1mM PMSF; 1mM DTT; 1% Triton X-100)
- Tampão de Laemmli (0,28M Tris-HCl pH 6,8; 30% glicerol; 2,5% SDS; 100mM DTT; 0,002% azul de bromofenol)
- Tampão de lavagem para imunoprecipitado (100mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio)
- Tampão MOPS (4mM MgCl₂, 16mM MOPS, 0,4mM EDTA, pH 7,5)
- Tampão PBS (0,2M NaH₂PO₄; 0,2M Na₂HPO₄; 0,3M NaCl).

3.2.2 Meios de Cultura

- LB: 10g de peptona, 10g de extrato de levedura, 5g de NaCl (1L), autoclavar
- LB-ágar: LB + 15g de ágar-ágar (1 L) autoclavar

3.2.3 Anticorpos

Anticorpo anti-FAK C20 (sc-558), anti-MEF2 C21 (sc-313) adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA)

3.2.4 Oligonucleotídeos

PLNi1_SENSE: 5' CCG GTA CAA AAC TGC ATA TC 3'

PLNi1_ANTISENSE: 5' TGC CAG GAA GAC AAA AGT AG 3'

PlnMef: 5' GTA TGA ACC TAA TCC TTT TAC TAC CGG TAC ATT CCA G 3'

PlnMef Compl.:5' CTG GAA TGT ACC GGT AGT AAA AGG ATT AGG TTC ATA C 3'

3.3 Monitorização hemodinâmica

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis, Brasil) e Diazepam (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil). Esta mistura foi administrada na proporção de 10mg de Cloridrato de Cetamina para 0,07mg de diazepam, e a dose aplicada foi de 0,3mL/100g de peso corporal do animal. Em seguida, os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida (37°C) e submetidos à monitorização da pressão arterial através de inserção de cateteres de polietileno (PE50 – Clay Adams, Parsipany, EUA) nas artérias carótida direita e femoral direita, os quais estavam acoplados a transdutores de pressão COBE (Arvada, CO, EUA). O sinal da pressão arterial foi amplificado por um amplificador GP4A Stemtech (Stemtech, Milwaukee, WI, USA). Este se comunicava a um conversor analógico-digital, conectado a um computador contendo o programa WINDAQ-PRO (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA) para monitoração hemodinâmica contínua e gravação de dados. Os sinais foram gerados a uma frequência de amostragem de 100Hz e gravados em canais individuais (figura 04).

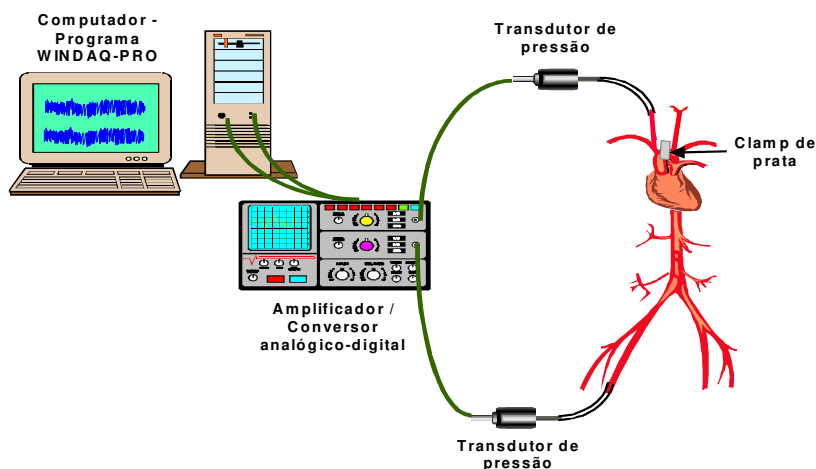


Figura 04. Esquema representativo do modelo de constrição da aorta utilizado nos experimentos *in vivo*. Representando o local onde é inserido o clamp de prata no arco aórtico e os transdutores de pressão na carótida direita e na femoral direita.

3.4 Modelo de sobrecarga de pressão

Logo após a monitorização hemodinâmica, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo. A aorta torácica transversa foi dissecada e um “clamp” de prata (diâmetro interno - 50 μ m) foi colocado na crossa da aorta entre o tronco braquiocefálico e a artéria carótida comum esquerda produzindo aumento da resistência ao fluxo sanguíneo e conseqüente sobrecarga de pressão no coração. Em seguida, a cavidade torácica foi fechada e os ratos mantidos anestesiados durante os períodos estudados que variaram de 10-60 minutos após constrição da aorta. A sobrecarga de pressão foi considerada eficiente quando o “clamp” produziu um aumento de 40 a 50mmHg na pressão sistólica da aorta ascendente (mensurada através da cânula na artéria carótida direita) sem induzir a uma queda significativa nos níveis pressóricos da aorta abdominal direita (mensurada através da artéria femoral) (figura 05). Os animais controle foram submetidos à cirurgia fictícia, com abertura da cavidade torácica, porém sem colocação do clamp de prata. Por fim, os animais foram sacrificados com injeção de solução de cloreto de potássio (KCl) pela cânula arterial, o coração foi extraído e o ventrículo esquerdo foi separado do ventrículo direito e átrios.

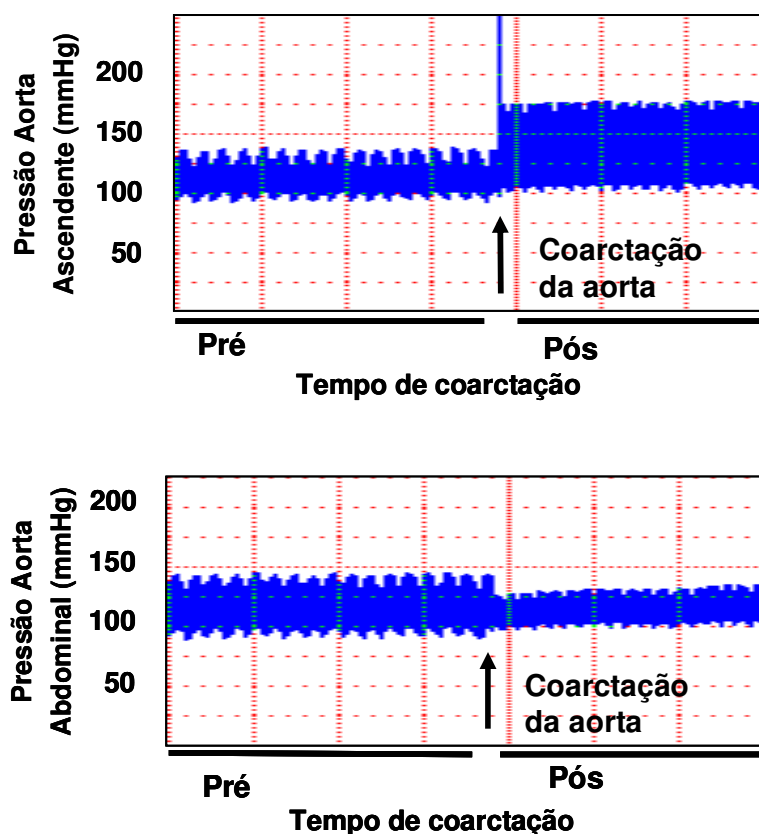


Figura 05. Registro representativo de pressão arterial de ratos, obtido em experimento de coarctação da aorta, demonstrando o aumento na pressão arterial na aorta ascendente desses animais, após a constrição do arco aórtico.

3.5 Preparação de extratos totais de proteínas do ventrículo esquerdo de rato

Os ventrículos esquerdos coletados, foram cortados em fragmentos menores e homogeneizados imediatamente em aproximadamente 10 volumes de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, Tris-HCl 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o

sobrenadante foi então utilizado para diferentes ensaios. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BIURETO.

3.6 Western Blotting

As proteínas obtidas das preparações de extratos totais, fracionamento subcelular e *Pulldown* foram tratadas com tampão de Laemmli. Estas amostras foram fervidas a 95°C por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 11000rpm.

Após este procedimento, as proteínas foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE, utilizando-se o aparelho da BIO-RAD miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) e o marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos por 120V a 4°C em aparato de transferência da BIO-RAD. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado em solução basal) por 60 minutos para minimizar a ligação inespecífica dos anticorpos.

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos, diluídos 1:1000 em 10 mL de solução para anticorpo (3% leite em pó desnatado em solução basal) durante toda a noite, a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos em 10 mL de solução basal. Em seguida, as membranas foram incubadas, quando necessário, com anticorpo Bridge 1:5000 e depois com 2μCi de [¹²⁵I] proteína A (30μCi/μg) em 10 mL de tampão de iodo (1% leite em pó desnatado em solução basal) por 4 horas a temperatura ambiente e então lavadas novamente como descrito anteriormente. A proteína A [¹²⁵I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada

por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA), com intensificadores Cronex Lightening Plus (Du Pont, Wilmington, DE, EUA) a -80°C por 24-72h. Os sinais também foram visualizados com o uso do *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, EUA). Neste caso, foi utilizado um anticorpo secundário conjugado com peroxidase numa concentração de 1:3000 a 1:5000 e os procedimentos para a etapa final foram feitos de acordo com as especificações do fabricante. As membranas foram expostas em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA) por diferentes intervalos de tempo (30s- 10min) e estes foram então revelados.

3.7 Fracionamento subcelular

O fracionamento subcelular seguiu a metodologia descrita por MIZUKAMI et al. (1997). Os corações congelados foram pulverizados em cadinho e homogenizados em 6 volumes de tampão A (0.32 M sacarose, 10mM Tris HCl, pH 7.4, 1mM EGTA, 2mM EDTA, 5mM NaN_3 , 10mM DTT, 0.2mM PMSF, 50mM NaF, 1mM Ortovanadato de sódio) utilizando um *potter* ou pistilo modelo BB065 (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA). O homogenato foi centrifugado a 1000g por 10 min a 4°C para obtenção da fração citosólica. O precipitado resultante desta última centrifugação continha a fração de membrana.

A fração nuclear foi solubilizada em tampão B (1% Triton X-100, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,4, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 0,2mM ortovanadato de sódio, 0,2 mM PMSF, 50mM NaF) por 30 min a 4°C com agitação e centrifugada a 15.000g por 30 min a 4°C e o sobrenadante (extrato nuclear) foi armazenado a -80°C . As frações tiveram seu conteúdo protéico quantificado pelo método de Lowry.

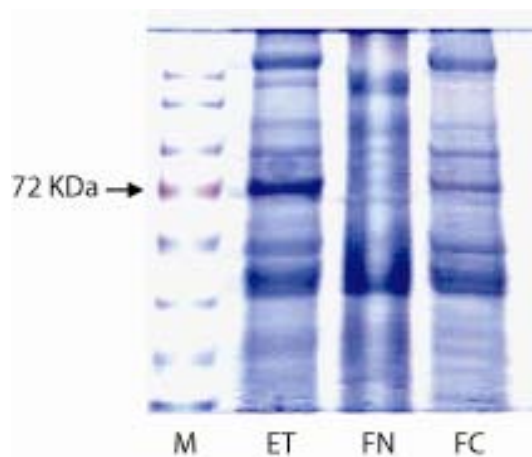


Figura 06. Gel representativo demonstrando o extrato total de proteínas de coração assim como as frações nuclear e citoplasmática do ensaio de fracionamento subcelular. M: Marcador de peso molecular; ET: Extrato total; FN: Fração nuclear; FC: Fração citoplasmática

3.8 Indução e purificação de proteínas recombinantes

As construções codificadoras das proteínas de fusão dos domínios FERM e Cterminal da FAK com glutathione S-transferase (GST) expressas em pGEX2T foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jun-Lin Guan (Department of Molecular Medicine, Cornell University College of Veterinary Medicine). As construções (GST-FERM e GST-Cterminal) foram transformadas em *Escherichia coli* BL21 Codon Plus. As bactérias foram induzidas com 1mM de IPTG por 4 h a 37°C. Amostras do extrato bacteriano antes e após a indução com IPTG, foram centrifugadas e adicionado tampão de Laemmli ao precipitado para posterior visualização em gel de poliacrilamida.

Para a purificação das proteínas, as bactérias foram concentradas em pellets e lisadas com tampão de lise (5mg de lisozima, 25mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 100mM NaF, 10mM Na₃PO₄, 10mM Na₃VO₄, 0,01mg/mL aprotinina, 2mM PMSF) em três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C. Os lisados foram sonicados, submetidos a

centrifugação a 14000 rpm, 4°C por 15 minutos e imobilizados em pérolas de glutationa sefarose (Amersham). As pérolas foram lavadas 8 vezes em tampão PBS (0,2M NaH₂PO₄; 0,2M Na₂HPO₄; 0,3M NaCl). As pérolas de sefarose foram ressuspensas em tampão de estocagem (50mM Hepes pH 7,4; 150mM NaCl; 5mM DTT; 10% Glicerol) e mantidas a -80°C. As proteínas ligadas foram eluídas com tampão de Laemmli e analisadas com eletroforese em gel de poliacrilamida. A proteína GST bacteriana (GST-GST) também foi expressa e purificada para utilização como controle nos ensaios de *Pulldown*. A construção Cterminal clonada com cauda de histidina, em vetor pET 15b foi transformada em *Escherichia coli* BL21 Codon Plus. As bactérias foram induzidas com 1mM de IPTG por 4 h a 37°C. Os lisados com proteínas recombinantes com cauda de Histidina foram sonicados, submetidos à centrifugação e purificados em colunas de purificação de níquel (Clontech).

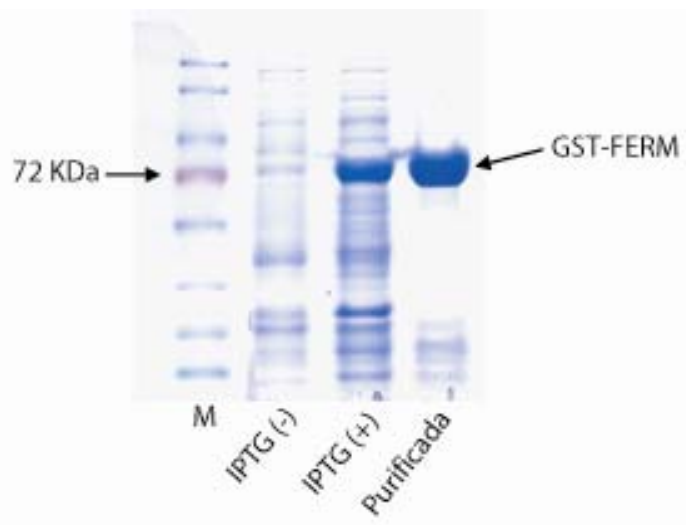


Figura 07. Gel representativo demonstrando o extrato total de *E.coli* sem a indução da expressão gênica com o IPTG (IPTG -) e após a indução da expressão da proteína recombinante GST-FERM com IPTG (IPTG +) e em seguida demonstrando a purificação da proteína recombinante GST-FERM utilizando pérolas de glutationa sefarose.

3.9 Ensaio de precipitação (*Pulldown assay*)

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as proteínas recombinantes GST-FERM e GST-Cterminal, ligadas às pérolas de glutathione sefarose. Aproximadamente, 2 µg de proteínas purificadas foram incubadas com 200 µg de proteínas obtidas dos extratos nucleares de coração de ratos controle ou coarctados por 60 minutos. Como controle para ligação não-específica, 200µg de proteínas foram incubadas com 2µg de GST ligada à pérolas de glutathione. As amostras foram incubadas por 12 horas, 4°C, sob agitação constante. Em seguida, submetidas a centrifugação e o precipitado lavado 3 vezes com 400 µL de tampão de lavagem (100mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio). Por fim, foi adicionado 30 µL de tampão de Laemmli ao precipitado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida. Para ensaio de precipitação entre GST-MEF2 e a proteína recombinante His-Cterminal, foram utilizados aproximadamente 1µg de cada proteína recombinante e incubadas com tampão de incubação (20 mM Tris HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 10µg/mL aprotinina; 1mM PMSF; 1mM DTT; 1% Triton X-100) volume final de 200 µL por 12 horas. Em seguida, submetidas a centrifugação e o precipitado lavado 3 vezes com 400 µL de tampão de lavagem (100mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio) Por fim, foi adicionado 30 µL de tampão de Laemmli ao precipitado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida.

Também foram realizados experimentos com FAK do comprimento nativo recombinante humana e GST-MEF2. Resumidamente, 0,1 µg de GST-MEF2 foi incubada com 0,3 µg da FAK com 5µl de tampão MOPS (4mM MgCl₂, 16mM MOPS, 0.4mM EDTA, pH 7,5) com e sem 500µM de ATP. As reações foram incubadas a 37°C, por 2 horas, 200 rpm. O precipitado foi submetido a 3 lavagens com 100 µL de tampão MOPS. As reações foram inibidas pela adição de

30 µL de tampão de Laemmli e fervura por 5 min. As amostras foram separadas em SDS-PAGE e submetidas a ensaio de Western Blotting.

3.10 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA ou gel shift)

3.10.1 Marcação da sonda de DNA

Oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados e encomendados na escala de 50 nmol, para a região intrônica de 182 pb do gene *pln*: (ver anexo)

PLNi1_SENSE: 5' CCG GTA CAA AAC TGC ATA TC 3'

PLNi1_ANTISENSE: 5' TGC CAG GAA GAC AAA AGT AG 3'

Inicialmente, foi feita a amplificação, através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos sense e antisense, a partir de uma amostra de DNA genômico de coração de rato. A composição final da reação foi: 20mM Tris HCl (pH8,4), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 5 pmol primer sense, 5 pmol primer antisense, 1,25mM de cada deoxinucleotídeo (dCTP, dGTP, dTTP), com exceção do dATP, [α ³²P]-dATP (3000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences, UK) 2 ng de DNA genômico, 2 unidades de Taq DNA polimerase em um volume final de reação de 20 µL, temperatura de anelamento de 52°C.

3.10.2 Reação de ligação e eletroforese do complexo DNA/Proteína

Para o ensaio de gel shift, com extrato nuclear de ventrículo esquerdo de coração de ratos, cerca de 20 µg de extrato nuclear foi incubado a 25°C em um volume final de aproximadamente 30 µl de reação com tampão de incubação (140mM KCl; 5mM NaCl; 20mM Hepes pH 7,0; 2 mM MgSO₄; 100µM EGTA; 1

mM K₂HPO₄; 1μM ZnSO₄; 0,2% Triton X-100) seguindo o protocolo descrito por HALLIKAS et al. (2006). Em seguida, 1 μl de sonda marcada radioativamente (sonda quente), foi incubada por 20 minutos. A mistura foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, em tampão TBE (89mM Tris HCl; 89mM Ácido Bórico; 2mM EDTA, pH8,0) a 150V por 2 horas. A especificidade da reação foi verificada através de ensaios de competição utilizando sonda competidora fria em excesso (100 vezes molar).

3.11 Ensaio *Pulldown* de DNA

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as proteínas recombinantes GST-FERM e GST-Cterminal da FAK, além da proteína recombinante GST-MEF2 (1-169 aminoácidos) e da proteína GST-GST usada como controle negativo, todas ligadas às pérolas de glutathiona sefarose. Aproximadamente, 2 μg de proteínas purificadas foram incubadas com 20 ng de sonda de DNA, *plni1*, marcada radioativamente [α ³²P]-dATP e com 200μl de tampão de incubação 1X (140mM KCl; 5mM NaCl; 20mM Hepes pH 7,0; 2mM MgSO₄; 100μM EGTA; 1mM K₂HPO₄; 1μM ZnSO₄; 0,2% Triton X-100) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram submetidas a centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente e o precipitado lavado 2 vezes com 200 μL tampão de incubação. Por fim, o precipitado foi ressuspensionado em 50 μL de tampão e 10 μL da solução foi aplicada sobre uma membrana de nitrocelulose e exposto por 24 horas em filme fotográfico.

3.12 Isolamento e estiramento de miócitos ventricular de ratos neonatos

Detalhes da técnica de extração e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRN) foram descritos anteriormente (TORSONI et al., 2003). Resumidamente, os corações foram retirados de ratos neonatos (1-2 dias), submetidos a digestão branda com collagenase/pancreatina e separados em gradiente de Percoll (GE Healthcare) por centrifugação. Após a separação, as células foram semeadas em placas com base de silicone recoberta com colágeno tipo I (Bioflex) para estiramento biaxial cíclico em Sistema Flexercell 3000T (Flexercell International, USA). Os MVRN cultivados em placas Bioflex foram estirados em um Flexercell FX-3000 a 115% do comprimento, descansando com uma frequência de 1 Hz (0,5-s estiramento/0,5-s relaxamento) por 60 minutos. As células controle, não estiradas, também foram cultivadas em placas Bioflex e incubadas em meio isento de soro.

3.13 Ensaio com gene reporter

A construção dos plasmídeos para os ensaios de gene reporter foram realizadas pela Dra. Carla Cristina Judice Maria. O plasmídeo ptkEGFP foi construído pela inserção do promotor tk (*thymidine kinase*) do vírus Herpes simplex, utilizando a enzima de restrição *HindIII* no vetor básico pCAT3 (Promega) e pela inserção do EGFP no lugar gene CAT (Clontech). O plasmídeo ptkLUC foi gerado pela inserção do gene para Luciferase no lugar do EGFP. Os plasmídeos ptkEGFP e ptkLUC foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Xavier Neto (INCOR-USP). O fragmento *pln1* foi clonado no vetor pCRScript Amp (Stratagene) e seqüenciado. Esse fragmento foi inserido acima da região promotora tk em ambos os vetores usando as enzimas de restrição *RsaI* e *KpnI*, gerando os plasmídeos ptk-PLN-LUC e ptk-PLN-EGFP. A mutação no sítio do

MEF2 (*mut*) foi gerada através da mudança de 4 pares de base na sequência de reconhecimento do fator MEF2 do fragmento *plni1*, utilizando Quickchange kit (Stratagene) gerando os plasmídeos ptk-MUT-LUC e ptk-MUT-EGFP. Para a mutação foram utilizados os primers para amplificar e inserir a mutação: (ver anexo).

PlnMef: 5'- GTA TGA ACC TAA TCC TTT TAC TAC CGG TAC ATT CCA
G -3'

PlnMef Compl.:5'- CTG GAA TGT ACC GGT AGT AAA AGG ATT AGG
TTC ATA C -3'

Os MVRN foram transfectados com 4µg de plasmídeos contendo construções do *Plni1* e do mutante para o sítio do MEF2 (*Mut*) fundidos ao gene da luciferase de *firefly* e 0,25µg de plasmídeos contendo o promotor SV40 fundido ao gene da luciferase de *renilla* em placas de 60mm usando Lipofectamine™ (Invitrogen) em meio DMEM (volume final 200 µl) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 5 horas em 2 mL de meio DMEM puro sem antibióticos. Após este período, foi adicionado 1mL de DMEM contendo 20% de soro fetal bovino e 10% de soro eqüino, sem remoção do meio de transfecção. Após 24 horas da transfecção, os MVRN foram submetidos ao estiramento por 60 minutos em meio DMEM puro. A atividade de luciferase foi medida através do uso de luminômetro após 48 horas da transfecção. A expressão da proteína EGFP foi avaliada por microscopia de fluorescência após 48 horas da transfecção.

3.14 Análise Estatística

Os resultados de pressão e de atividade de luciferase estão apresentados como média ± erro padrão dos valores. Esses dados foram analisados usando ANOVA. A diferença entre as médias foi considerada

significativa quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 3.0.

4. RESULTADOS

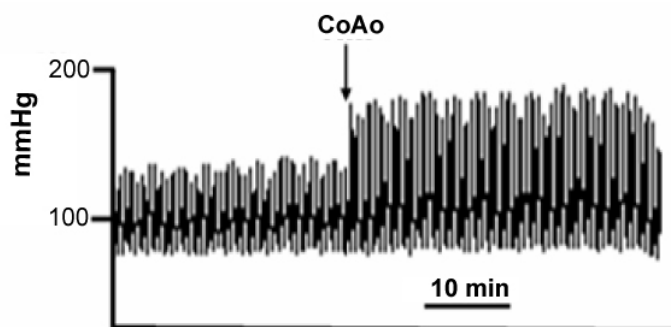
4.1 Expressão, fosforilação e distribuição da FAK em ventrículo esquerdos submetidos a sobrecarga pressórica aguda.

Estudos anteriores (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002) demonstraram que em miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos ocorre pronta fosforilação e ativação FAK. Uma vez ativada, a FAK inicia processos de sinalização através de MAP quinases e pelo fator de transcrição MEF2 que contribuem para a transformação fenotípica dos miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos (NADRUZ et al., 2003). Recentemente, resultados de estudos realizados em corações de ratos indicaram que, em resposta a estímulos mecânicos, a FAK, além de ser ativada, localiza-se no núcleo dos miócitos cardíacos (FONSECA et al., 2005).

No presente estudo, foram realizados experimentos que confirmaram a fosforilação da FAK no ventrículo esquerdo de ratos induzida por sobrecarga pressórica aguda. Desta forma, foram avaliados os níveis de expressão e fosforilação da FAK no ventrículo esquerdo de ratos controle e também no ventrículo esquerdo de ratos submetidos à coarctação da aorta por 10, 30 e 60 minutos. Extratos de ventrículo esquerdo foram analisados através de ensaio de *Western blot* com anticorpo dirigido para a porção carboxi-terminal da FAK. O nível de fosforilação foi determinado através de Western blots com anticorpo fosfo-específico dirigido para a tirosina 397 da FAK.

Conforme demonstrado na figura 8A, o modelo de constrição do arco aórtico produz sobrecarga pressórica estável por até 60 min. Conforme indicado no gráfico da figura 8B, a constrição aguda do arco aórtico produziu aumentos da pressão sistólica na aorta ascendente de aproximadamente 50 mmHg. Os níveis pressóricos na aorta abdominal dos ratos submetidos a constrição da aorta não apresentaram alterações significativas quando comparados com as pressões dos ratos controle.

A)



B)

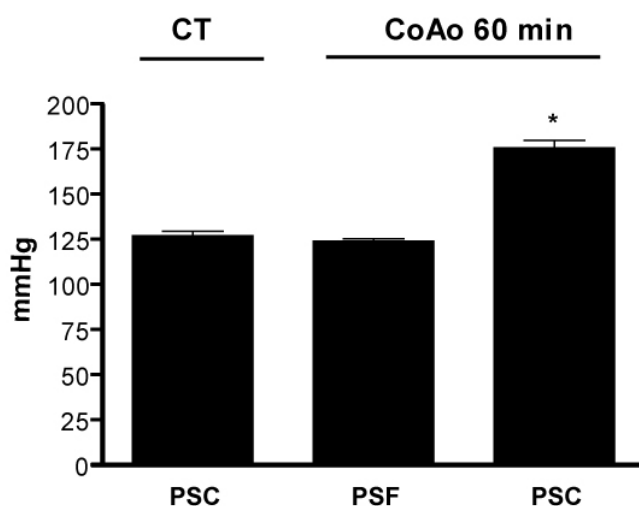


Figura 08. A) Gráfico representativo do registro de pressão sistólica na carótida esquerda de ratos submetidos à constrição do arco aórtico, demonstrando o aumento da pressão na carótida desses animais. B) Gráfico representativo da média das pressões sistólicas avaliadas na artéria carótida esquerda (PSC) e na artéria femoral esquerda (PSF) dos ratos controle e dos ratos submetidos à constrição do arco aórtico por 60 minutos. (n=8) *p<0,05 comparado a PSC de animais controle. CT- controle; CoAo- Constrição da aorta.

Como indicado na figura 9A, a expressão da FAK no ventrículo esquerdo de ratos não se alterou em decorrência do estímulo mecânico. Entretanto, a fosforilação da enzima no sítio de autofosforilação, apresentou um

aumento expressivo nos ventrículos esquerdos dos ratos submetidos a sobrecarga pressórica em relação àqueles dos ratos controle.

Western blotting de frações subcelulares de ventrículo esquerdo de ratos indicaram a localização nuclear FAK no ventrículo esquerdo desses animais, quando submetidos a sobrecarga pressórica. Como indicado na figura 9B, confirmamos que a quantidade de FAK nos extratos totais de ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sobrecarga pressórica é semelhante àquela verificada nos extratos de ratos controle. Nos extratos de ratos controle, a FAK foi detectada preferencialmente na fração citoplasmática enquanto nos extratos de ratos coarctados, a FAK foi detectada predominantemente na fração nuclear. Conforme o gráfico representativo da figura 9B, nos extratos de ratos submetidos a constrição da aorta aproximadamente 65% da FAK foi encontrada na fração nuclear, resultado, semelhante àquele obtido nos estudos anteriores (FONSECA et al., 2005).

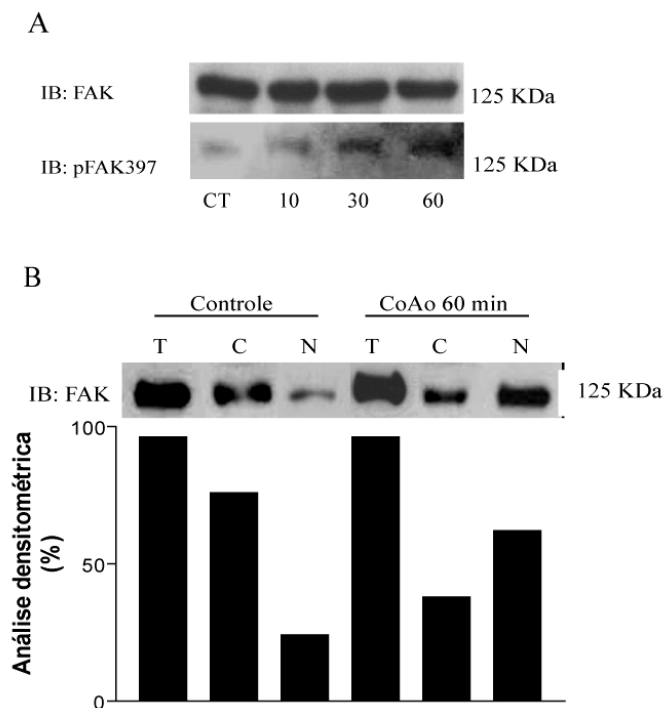


Figura 09. A) *Western blotting* representativos da expressão e da fosforilação da FAK em extratos protéicos de coração de ratos controle (*pool* de 2 animais) e submetidos a sobrecarga pressórica por 10, 30 e 60 minutos (*pool* de 2 animais). B) *Western blotting* e gráfico representativos da expressão de FAK no extrato total (T) e nas subfrações citosólica (C) e nuclear (N) do miocárdio de ratos controle e submetidos a coarctação da aorta (CoAo) por 60 minutos.

4.2 Efeito da sobrecarga pressórica aguda no miocárdio na interação das proteínas nucleares com a região intrônica *pln1*.

Diante dos resultados descritos anteriormente, que reforçam a hipótese que a FAK, em situações de estresse celular, migra para o núcleo, foram realizados ensaios para investigar o papel da FAK no núcleo celular. Uma vez que as funções da FAK no núcleo podem ser dependentes de interações com DNA, direta ou indiretamente, a identificação das seqüências de DNA pode fornecer

bases para o entendimento da influência da FAK na atividade transcricional no núcleo de miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos. Para isso, resultados preliminares conduzidos em corações de ratos *Wistar* adultos submetidos à sobrecarga de pressão por constrição aórtica, utilizando a técnica de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP), demonstraram que o anticorpo anti-FAK, imunoprecipita uma sequência de 182 pb pertencente a uma região intrônica do gene *fosfolambam* (*pln*).

Ensaio de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) foram realizados com extratos nucleares de coração de ratos controle ou submetidos a coarctação da aorta (10, 30 e 60 minutos) para determinar se há interação entre as proteínas provenientes do extrato nuclear de coração de ratos com a sonda *pln1*. Também, avaliamos o efeito da sobrecarga pressórica aguda sob a ligação das proteínas, provenientes do extrato nuclear, com a sonda *pln1*.

Os resultados da figura 10 demonstram que extratos nucleares de coração de animais que sofreram coarctação apresentam, a partir de 10 minutos, um aumento da ligação entre o complexo de proteínas nucleares com a sonda de DNA em relação ao controle. É interessante destacar que a intensidade da formação do complexo DNA/proteína não se alterou com o aumento do tempo de coarctação. A especificidade da reação foi verificada através de ensaios de competição utilizando sonda competidora fria em excesso (100 vezes molar).

CoAo
CT 10 30 60 SF

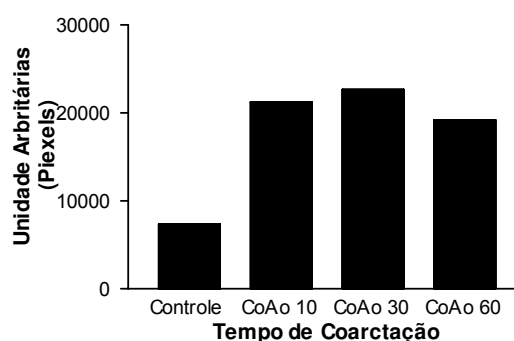
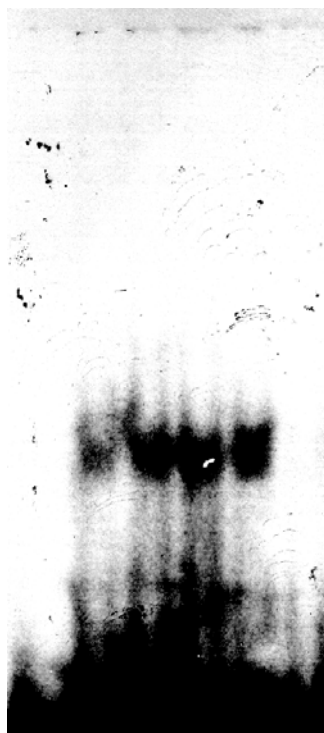


Figura 10. Gel shift e gráfico representativo da interação proteína DNA, entre os extratos nucleares de coração de ratos controle (CT) ou submetidos a diversos tempos de coarctação da aorta (CoAo), 10, 30 e 60 minutos com a sonda *plni1*. SF: sonda fria.

4.3 Estudos de interação FAK com *plni1*

Ensaio de EMSA foram realizados para demonstrar se há interação direta da FAK com a sequência *plni1*. Para o ensaio, foi utilizada a proteína purificada FAK e as porções recombinantes (GST-FERM e GST-Cterminal) da FAK.

Conforme demonstrado na figura 11, através de ensaio de EMSA, não foi observada interação entre a proteína FAK ou suas porções (FERM e Cterminal) com a sonda *plni1*. Estes resultados indicam que a interação FAK/*plni1* se dá de forma indireta, isto é, através de interação com proteínas ligantes do DNA.

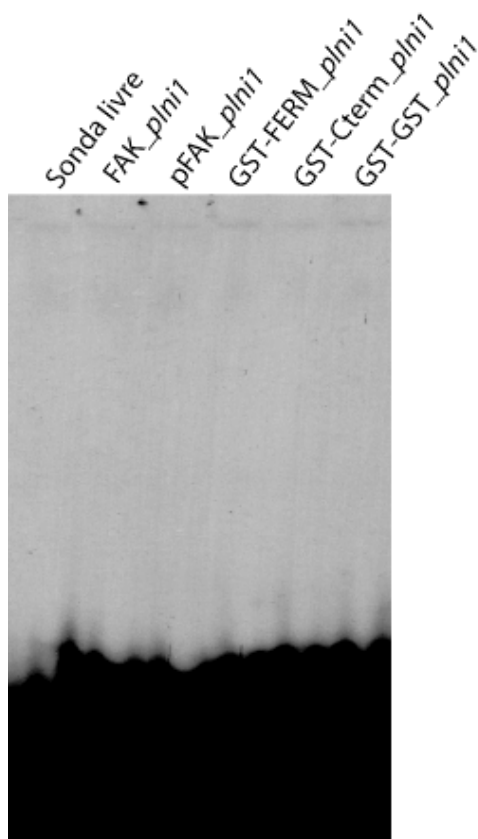


Figura 11. Gel shift representativo, demonstrando que não houve interação entre FAK ou suas porções com a sonda *plni1*.

A seqüência intrônica isolada do gene *pln* foi submetida a buscas por sítios de fatores de transcrição, inicialmente, através do programa TRANSFAC (MatInspector). Como resultados, foram identificados sítios de ligação para diversos fatores de transcrição e dentre eles, o que nos despertou interesse foi o fator MEF2, sabidamente envolvido na regulação da expressão de genes relacionados à hipertrofia. Diante disso, realizamos ensaios para comprovar a interação entre o fator de transcrição MEF2 e a seqüência intrônica *plni1*.

4.4 Estudo da interação MEF2 com a sonda *plni1* por ensaios de gel shift e *Pulldown* de DNA.

Conforme descrito anteriormente, análises *in silico*, demonstraram que a região intrônica *plni1*, contém sítio de ligação para o fator de transcrição MEF2 (5' CTA TTT TTT A 3'). Diante disso, foram realizados ensaios de EMSA e de *Pulldown* de DNA, para avaliar a possível associação do MEF2 com a sonda *plni1*. Extratos nucleares de ventrículo esquerdo de coração de ratos controle ou submetidos a coarctação da aorta por 60 minutos foram incubados com a sonda *plni1*. Conforme demonstrado na figura 12A, a coarctação da aorta provocou um aumento na ligação das proteínas nucleares com a sonda. Por outro lado, ensaios com a sonda *plni1* contendo uma mutação que inativa o sítio MEF2 demonstrou uma diminuição na intensidade da banda correspondente ao complexo de ligação proteína-DNA. Na figura 12B, demonstramos a interação direta entre a construção GST-MEF2 com a sonda *plni1*, assim como a diminuição da intensidade da formação do complexo quando se utilizou a sonda *plni1* contendo mutação no sítio de ligação do MEF2. A especificidade da reação foi verificada através de ensaios de competição utilizando 100 vezes de excesso molar de sondas competidoras (sonda fria).

Além dos ensaios descritos acima, realizamos também ensaios de *pulldown* de DNA com a proteína recombinante GST-MEF2 e a sonda *pln*. A adição da proteína recombinante ligada a pérolas de sefarose provocou a precipitação do DNA. A incubação anterior com um competidor (sonda fria) demonstra a especificidade da ligação. A aplicação do controle GST não formou complexo com o DNA, não havendo a precipitação da sonda (figura 12C).

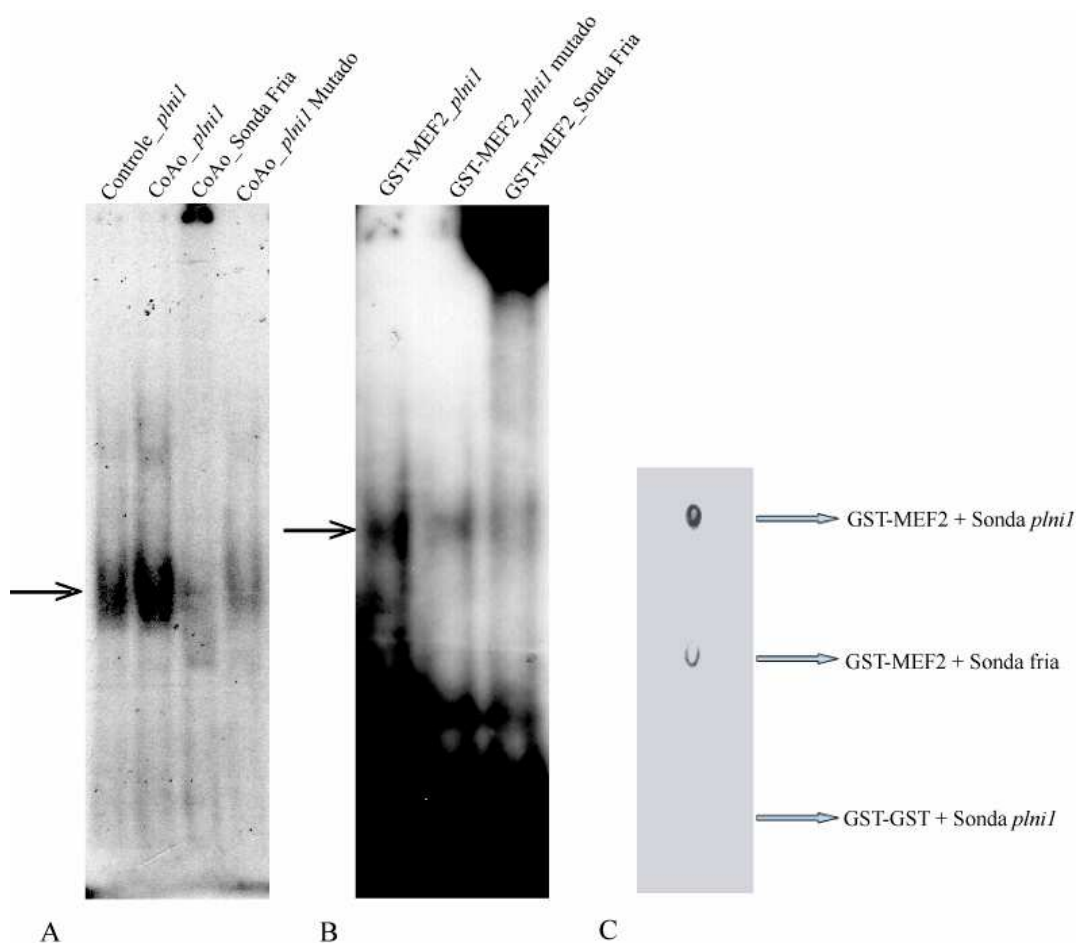


Figura 12. A) EMSA representativo, demonstrando o complexo de associação entre as proteínas nucleares de ratos controle e ratos coarctados com fragmento *plni1* (seta) e a diminuição da formação do complexo utilizando o fragmento *plni1* contendo a mutação no sítio de ligação do MEF2 no DNA.

B) EMSA representativo, demonstrando o complexo de associação entre a proteína recombinante GST-MEF2 com a sonda *plni1* (seta) e a diminuição da formação do complexo utilizando o fragmento *plni1* contendo a mutação no sítio de ligação do MEF2.

C) Pull-down de DNA entre a construção GST-MEF2 e a sonda *plni1*. Como controle da especificidade usamos um competidor (sonda fria) e o controle negativo da reação (GST).

4.5 A porção Cterminal da FAK interage com o fator de transcrição MEF2.

Em ensaios de ChIP com o anticorpo anti-FAK e extrato nuclear de coração de rato, demonstrou-se a precipitação da região intrônica de 182pb do gene *pln*. Porém, ensaios adicionais demonstraram que a FAK não interage diretamente com esse fragmento de DNA. Além do mais, estudos posteriores demonstraram que o fator de transcrição MEF2 interage diretamente com esse fragmento do gene *pln*. Diante disso, ensaios de interação proteína-proteína foram realizados para determinar a possível interação entre FAK e o fator de transcrição MEF2.

Portanto, através de ensaios de precipitação e de coimunoprecipitação, investigamos a associação entre a FAK e o fator MEF2. Procedeu-se a uma imunoprecipitação de extrato nuclear de ventrículo esquerdo de coração de ratos submetidos a coarctação da aorta com anticorpo anti-MEF2 e em seguida *western blotting* com anticorpo anti-FAK para demonstrar se havia associação entre as duas proteínas. Os resultados mostrados na figura 13 A, demonstram que a imunoprecipitação do fator de transcrição MEF2 precipitou também a FAK do extrato protéico.

Para confirmar a associação e determinar qual domínio da FAK é necessário para esta interação, realizamos um ensaio de precipitação com proteínas recombinantes, GST-FERM e GST-Cterminal da FAK, com o extrato nuclear de coração de rato e em seguida *western blotting* com anticorpo anti-MEF2. Na figura 13 B é mostrado o blot representativo deste experimento. Observa-se que apenas a construção GST-Cterminal foi capaz de recuperar MEF2 no extrato nuclear de coração de rato submetido a sobrecarga pressórica por 60 minutos.

Para determinar se a interação é direta e dependente do estado ativado da FAK (pFAK), por meio de sua fosforilação no resíduo de tirosina 397, realizamos ensaios de interação entre a proteína recombinante GST-MEF2 (1-169) com a proteína purificada FAK. Para isso FAK recombinante foi submetida ao ensaio de fosforilação *in vitro* com adenosina tri-fosfato (ATP) por 2 horas e em seguida ao ensaio de interação com a proteína recombinante GST-MEF2 e o controle GST. Em paralelo a proteína FAK não fosforilada foi também submetida ao ensaio de interação com as proteínas recombinantes. O resultado da figura 13 C demonstra que a interação entre FAK e GST-MEF2 é direta e dependente do estado fosforilado da FAK. Por fim, para determinar se a interação entre FAK/MEF2 ocorre através da porção Cterminal da FAK, realizamos ensaios de precipitação utilizando a proteína recombinante GST-MEF2 e a porção Cterminal da FAK clonada em cauda de histidina. Conforme demonstrado na figura 13D há uma interação direta entre a porção Cterminal da FAK e a proteína recombinante GST-MEF2.

A)



B)



C)



D)

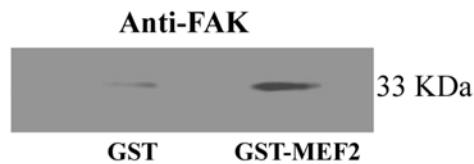


Figura 13. A) *Western blotting* representativo da interação entre FAK e MEF2 por ensaio de coimunoprecipitação.

B) Ensaio de precipitação (*Pulldown assay*) entre as proteínas recombinantes GST-FERM, GST-Cterminal e o controle GST, com extrato nuclear de coração de rato submetido a coarctação da aorta por 60 minutos.

C) Ensaio de precipitação para demonstrar a interação direta entre a proteína recombinante GST-MEF2 e a proteína purificada FAK fosforilada no seu sítio de autofosforilação (FAK + ATP).

D) Ensaio de precipitação para demonstrar a interação direta entre a proteína recombinante GST-MEF2 e a porção Cterminal da FAK clonada com cauda de histidina. KDa - KiloDalton

4.6 Função regulatória da sequência intrônica *plni1* e o efeito do estiramento na expressão do gene reporter.

Ensaio de gene reporter foram realizados utilizando vetores que expressam a proteína fluorescente EGFP. Para isso, região intrônica de 182pb do *pln* (*plni1*) foi clonada em um vetor basal ptkEGFP, originando o plasmídeo (ptk-PLN-EGFP). E um outro vetor foi gerado, inserindo uma mutação no sítio de ligação do fator de transcrição MEF2, originando o plasmídeo (ptk-MUT-EGFP). Os plasmídeos foram transfectados em cultura de miócitos cardíacos, de ratos *Wistar* neonatos de 1 a 2 dias de vida, sobre lamínulas de vidro. Após 48 horas de transfecção as lamínulas foram submetidas à marcação com faloidina e fit e as imagens foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência. A figura 14 demonstra que somente as células que receberam o vetor ptk-PLN-EGFP, apresentaram marcação específica na região citoplasmática da célula, correspondendo à expressão da proteína fluorescente EGFP. Tal marcação não foi observada nas células transfectadas com o plasmídeo basal (ptkEGFP) e nem com o plasmídeo carregando a mutação no sítio de ligação para MEF2 (ptk-MUT-EGFP).

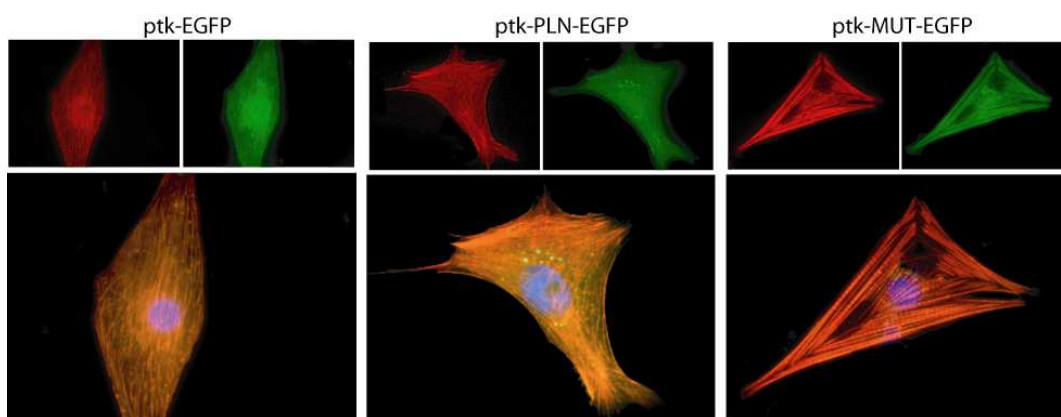


Figura 14: Microscopia de luz ultravioleta demonstrando o ensaio de EGFP nas células que receberam os vetores ptk-EGFP, ptk-PLN-EGFP e ptk-MUT-EGFP respectivamente. As imagens são compostas pelo filtro vermelho e verde no alto da figura (figuras menores) e pela sobreposição de ambas as imagens (figuras maiores).

Além disso, foram realizados também ensaios de gene reporter utilizando vetores que expressam a proteína luciferase. Para isso, o fragmento *pln1* foi clonado em um vetor ptkLUC, originando o plasmídeo (ptk-PLN-LUC). Os plasmídeos foram transfectados em cultura de miócitos cardíacos, de ratos *Wistar* neonatos de 1 a 2 dias de vida, sobre placas de silicone. Após 24 horas de transfecção um grupo de células foi submetido ao estiramento pelo período de 60 minutos. A leitura da atividade de luciferase foi avaliada após 48 horas de transfecção. O ensaio demonstrou que, nas células não estiradas, o fragmento *pln1* (gene reporter) induziu um aumento de aproximadamente 5 vezes na atividade de luciferase nas células transfectadas com ptk-PLN-LUC em relação as células transfectadas com ptkLUC. Já as células que foram submetidas ao estiramento por 60 minutos e transfectadas com o vetor ptk-PLN-LUC, a atividade de luciferase apresentou um aumento de 13,5 vezes em relação ao vetor basal ptkLUC (figura 15 A). Portanto observamos que houve um aumento de 2,7 vezes na atividade de luciferase nas células transfectadas com o plasmídeo e submetidas ao estímulo mecânico por 60 minutos em relação às células controle.

Por outro lado, para avaliar a importância do sítio de ligação para o fator de transcrição MEF2 na atividade de luciferase do gene reporter, um outro vetor foi gerado, inserindo uma mutação no sítio de ligação do fator de transcrição MEF2, originando o plasmídeo (ptk-MUT-LUC). Conforme descrito anteriormente as células transfectadas com ptk-PLN-LUC apresentaram um aumento de aproximadamente 5 vezes na atividade de luciferase em relação as células transfectadas com ptkLUC. Já os miócitos cardíacos transfectados com o vetor ptk-MUT-LUC, apresentou um aumento de apenas 1,5 vezes em relação ao vetor basal ptkLUC. Portanto, conforme podemos observar na figura 15 B, as células que receberam o vetor carregando a mutação no sítio de ligação do MEF2 apresentaram uma redução de aproximadamente 70% na atividade de luciferase em relação às células que receberam o vetor ptk-PLN-LUC.

Estes dados sugerem que a região intrônica de 182 pb possui uma função regulatória na expressão gênica e que esse papel é dependente da ligação do fator de transcrição MEF2 ao seu sítio específico no DNA.

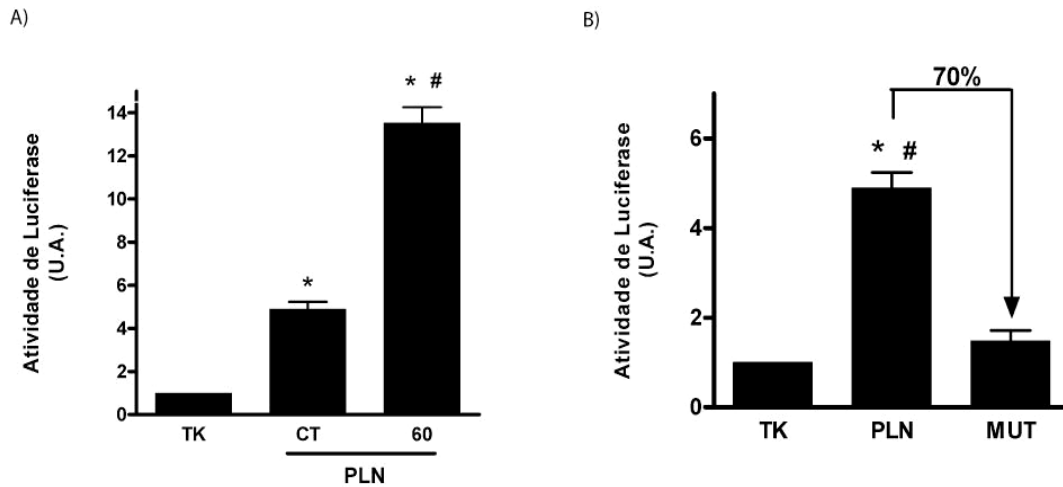


Figura 15: A) Gráfico representativo demonstrando a atividade de luciferase das células transfectadas com o vetor basal Tk e das células transfectadas com o vetor contendo a região intrônica *pln1* e submetidas ou não a 60 minutos de estiramento. (* $p < 0,05$ comparado ao TK; # $p < 0,05$ comparado ao CT).

B) Gráfico representativo demonstrando a atividade de luciferase das células transfectadas com os vetores ptk-LUC, ptk-PLN-LUC e ptk-MUT-LUC respectivamente. CT: Controle. (* $p < 0,05$ comparado ao TK; # $p < 0,05$ comparado ao MUT). U.A.- Unidades Arbitrárias.

5. DISCUSSÃO

A FAK é considerada uma molécula candidata para a mecanotransdução em miócitos cardíacos. A rápida ativação da FAK por estímulos mecânicos, apresentando pronta fosforilação em tirosina, desencadeia uma série de cascatas de sinalização envolvidas na regulação da expressão do programa gênico hipertrófico e crescimento celular. Estudos anteriores demonstraram que a FAK acumula-se no núcleo de miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos. No presente estudo, foram apresentados dados da fosforilação em tirosina da FAK, sua distribuição subcelular e a interação com o fator de transcrição MEF2. Além disso, foram apresentados dados sobre a interação do fator de transcrição MEF2 com a região intrônica de 182pb do gene *p/n* imunoprecipitada em ensaio de ChIP com anticorpo anti-FAK. Por fim, ensaios com gene reporter, que demonstram que a região intrônica *pln1* possui função regulatória.

Utilizando anticorpo fosfo-específico dirigido para a tirosina 397 da FAK, demonstramos que a coarctação da aorta induziu uma rápida fosforilação da proteína, visto que com 10 minutos de sobrecarga pressórica, já foi possível detectar aumento nos níveis de fosforilação da FAK. Esse aumento nos níveis de fosforilação, não foi acompanhado com aumento nos níveis de expressão da proteína. Outros trabalhos também apresentam resultados semelhantes sobre a fosforilação e expressão da FAK em resposta a sobrecarga pressórica (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002; TORSONI et al., 2003; FONSECA et al. 2005; TORSONI et al., 2005). A fosforilação da FAK em tirosina é um evento crítico na atividade dessa proteína por promover uma alteração conformacional na estrutura da molécula e criar sítios de alta afinidade para a ligação de diversas proteínas envolvidas na sinalização celular (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002).

Ainda mais interessantes são os resultados que demonstram que a FAK acumula-se no núcleo de miócitos cardíacos de ratos submetidos a

coarctação da aorta. Os resultados demonstram que esses animais apresentaram um aumento na quantidade de FAK na fração nuclear quando comparados aos animais controles. Esses dados estão de acordo com dados anteriores que indicaram um aumento na quantidade de FAK nuclear em animais submetidos a coarctação da aorta e em miócitos hipertróficos de ratos espontaneamente hipertensos (Yi et al., 2003; FONSECA et al., 2005). Sua presença no núcleo, tem importância na regulação da expressão de genes envolvidos no controle e na efetivação da resposta hipertrófica do miocárdio.

Muitas outras proteínas associadas a adesão focal, apresentam comportamento de migrar para o compartimento nuclear, dentre elas a Zixina, a Paxilina e a proteína muscular LIM ,(Yi et al., 2006; BOATENG et al., 2007). Uma vez no núcleo, essas proteínas podem estar envolvidas em diversas funções, dentre as quais, na estruturação da cromatina, regulação da atividade transcricional e processamento e exportação do RNAm (SENYO et al., 2007).

Por exemplo, a proteína Abl é pertencente à família de tirosino quinases não receptoras que apresenta, em sua estrutura, um peptídeo sinal de localização nuclear. Esse peptídeo sinal é capaz de se ligar a um receptor nuclear que permite a passagem da proteína, pela membrana nuclear, para dentro do núcleo, onde interage diretamente com o DNA através do domínio Cterminal (DAVID-CORDONNIER et al., 1998; DAVID-CORDONNIER et al., 1999). Portanto é possível que assim como a Abl, a FAK e outras proteínas tirosino quinases são capazes de migrar para o núcleo, associar-se com o DNA e assim participar na regulação da expressão gênica.

Apesar do fato da FAK não possuir a sequência de localização nuclear, é possível que a passagem dela para o compartimento nuclear seja dependente de modificações pós-traducionais, como a sumoilação, ou também mediado pela interação com outras proteínas. Dessa forma, são necessários estudos adicionais

a fim de compreender o papel da FAK no núcleo de miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos. Uma vez que a função da FAK no núcleo seja dependente da interação com outras proteínas ou com o DNA, a identificação de proteínas ou de seqüências de DNA associadas a FAK no núcleo de miócitos cardíacos, pode fornecer bases para o entendimento do papel da FAK na mecanotransdução em miócitos cardíacos.

Conforme descrito anteriormente, ensaios de ChiP utilizando anticorpo anti-FAK demonstraram que a FAK está associada a uma região intrônica de 182pb do gene *pln*. Diante disso, estudos foram realizados a fim de estudar a interação entre FAK e *pln1* e a possível função regulatória transcricional do *pln1*.

Inicialmente, foram realizados ensaios com extratos nucleares de coração de ratos controles ou submetidos a diferentes tempos de coarctação da aorta (10, 30 e 60 minutos), a fim de avaliar se proteínas provenientes de extrato nuclear eram capazes de se ligarem à sonda *pln1* e se essa interação aumentava em resposta a sobrecarga pressórica. Conforme os resultados de EMSA descritos anteriormente, extratos nucleares de coração de ratos coarctados, quando comparados aos de ratos controles, apresentaram um aumento na formação do complexo DNA/proteína a partir de 10 minutos de constrição da aorta. A intensidade do sinal não apresentou diferença significativa com o aumento no tempo de coarctação. É possível que a sobrecarga de pressão provoque uma ativação de proteínas sinalizadoras, que carregam informações ao núcleo celular, levando à modificações na estrutura das proteínas que se ligam ao DNA, aumentando a afinidade dessas proteínas a sonda *pln1*. Por exemplo, o fator de transcrição MEF2 é capaz de se ligar a uma seqüência específica no DNA, porém a atividade da FAK é um fator crítico para a ativação do fator MEF2 em resposta a estímulos mecânicos (NADRUZ et al., 2005).

Ensaio de EMSA realizados para estudar a interação direta entre FAK e *plni1* demonstraram que não houve interação direta da FAK, nem das frações Cterminal ou FERM, com *plni1*. Portanto, é possível que a associação da FAK com o *plni1* seja de forma indireta, ou seja, através da interação com outras proteínas ligantes ao DNA.

De acordo com essa hipótese, existe a proteína citoplasmática β -catenina, que, assim como a FAK, acumula-se no núcleo celular em situações de estresse, associa-se ao DNA indiretamente, através da interação direta com o fator de transcrição LEF-1 (*Lymphoid Enhancer-binding Factor*). Além disso, a interação entre essas duas proteínas provoca um aumento na atividade transcricional do fator LEF-1, sugerindo que a β -catenina é capaz de regular a expressão gênica, através da interação com o fator de transcrição LEF-1 (BEHRENS et al., 1996).

Tendo em vista que não foi possível confirmar uma interação direta da FAK com *plni1*, decidimos avaliar a possibilidade de que a interação se dá através da cooperação com fatores de transcrição. Para isso foi realizada uma busca por sítios de fatores de transcrição na sequência isolada *plni1*, que demonstraram a existência de um sítio para o fator de transcrição MEF2, conservado no gene *pln* de rato, camundongo e humano. Estudos adicionais utilizando EMSA demonstraram que a proteína recombinante GST-MEF2 foi capaz de interagir diretamente com a sonda *plni1*. É importante destacar o fato do fator de transcrição MEF2 interagir com a região intrônica do gene *pln*, sendo que a região promotora do gene *pln* não possui sítio para ligação do MEF2. Ou seja, o papel do MEF2 na regulação do gene *pln*, pode ocorrer através da região intrônica, que possui função regulatória transcricional, agindo como uma região intensificadora da expressão do gene. Além disso, nossos dados demonstraram que a mutação no sítio para MEF2 reduziu drasticamente a capacidade de ligação do GST-MEF2

à sonda e a expressão do gene reporter. Resultados semelhantes foram descritos em *Drosophila*, também em estudos com regiões intrônicas, demonstrando que o sítio para o fator MEF2 na região intrônica no gene estudado é crítico e influência na regulação da expressão desse gene (LIN et al., 1996). Outros estudos também demonstram que regiões intrônicas exercem influência fundamental na regulação da expressão gênica, funcionando como regiões intensificadoras da região promotora (MAS et al., 2004).

Neste estudo, utilizando técnicas com gene reporter, demonstramos que os miócitos cardíacos que receberam plasmídeo contendo o fragmento *plni1* (ptk-PLN-LUC) apresentaram um aumento de 5 vezes em relação às células que receberam o plasmídeo contendo apenas a região promotora basal TK (ptk-LUC). Além disso, quando essas células são submetidas ao estiramento, esse aumento sobe para aproximadamente 13,5 vezes. Estudos anteriores demonstraram que estímulos mecânicos provocam a ativação de proteínas sinalizadoras e de fatores de transcrição que em última instância leva a um aumento na expressão gênica (NADRUZ et al., 2005). Portanto esses dados de gene reporter, associados aos resultados com EMSA, que demonstraram um aumento na interação de proteínas nucleares de coração de ratos coarctados com a sonda *plni1*, demonstram que estímulos mecânicos exercem influência crítica na capacidade de ligação de proteínas nucleares à região intrônica *plni1* e na atividade transcricional do gene reporter contendo a região *plni1*. Os ensaios com plasmídeo carregando mutação no sítio específico de ligação do MEF2, demonstraram uma redução de aproximadamente 70% na atividade de luciferase. Resultados semelhantes foram descritos na literatura (LIN et al., 1996) demonstrando que a mutação no sítio de reconhecimento para o fator MEF2 reduziu drasticamente a atividade de luciferase do gene reporter. Esses resultados demonstram que o sítio de ligação do MEF2 na região intrônica *plni1* tem papel essencial na atividade regulatória transcricional da sequência. A redução na atividade de luciferase do gene reporter

mutado, não foi de 100% provavelmente porque outras proteínas, inclusive outros fatores de transcrição, exercem influência na ativação da região intensificadora *pln1*.

Dados deste estudo demonstram, através de ensaios de precipitação, que a FAK interage diretamente com o fator de transcrição MEF2. Os resultados demonstram que a interação FAK/MEF2 é dependente do estado fosforilado da FAK. Também, conforme demonstrado anteriormente a interação ocorre através da região Cterminal da FAK. É possível que a fosforilação da FAK no resíduo 397, provoque uma mudança conformacional na estrutura da proteína expondo o sítio de interação para MEF2 na região Cterminal. Essa porção Cterminal da FAK possui o domínio LXXLL, presente em diversas proteínas co-ativadoras, que é necessário para a ligação da proteína ao receptor nuclear (SAVKUR e BURRIS, 2004). Recentemente, (XIE et al., 2001) demonstraram que a FAK, através da região Cterminal, é capaz de interagir diretamente e regular a atividade do ativador transcricional STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*).

Além disso, outros trabalhos reforçam a hipótese da interação FAK/MEF2. Recentemente, (NADRUZ et al., 2005) demonstrou que a FAK tem função importante na regulação da atividade do MEF2 em cultura de miócitos cardíacos submetidos a estímulo mecânico. Segundo o estudo, miócitos cardíacos com diminuição da expressão da FAK pelo uso de antisenso, foi acompanhado por uma diminuição da capacidade do MEF2 de se ligar ao DNA.

Ainda neste contexto, estudos com deleção condicional da FAK em miócitos cardíacos demonstram que a inativação da FAK compromete a expressão de MEF2A e os animais que sobreviveram até a idade adulta apresentaram dilatação do ventrículo direito (PENG et al., 2008). Interessantemente, o fenótipo de dilatação do ventrículo direito ocorre também em

animais com deleção para MEF2A (NAYA et al., 2002). Esses resultados sugerem que o MEF2 é um importante alvo da sinalização via FAK.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a FAK associa-se a uma sequência intrônica do gene *pln* através de interação direta com fatores de transcrição da família MEF2. Esta região do gene *pln* foi demonstrada possuir função regulatória transcricional, dependente da ligação do fator de transcrição MEF2 ativado por estímulo mecânico. A interação da FAK com MEF2 foi demonstrada ser dependente do domínio Cterminal da FAK e de seu estado fosforilado. Esses dados indicam que a FAK pode regular processos transcacionais envolvidos na expressão de genes relacionados ao balanço de cálcio em miócitos cardíacos, em cooperação com fatores de transcrição MEF2.

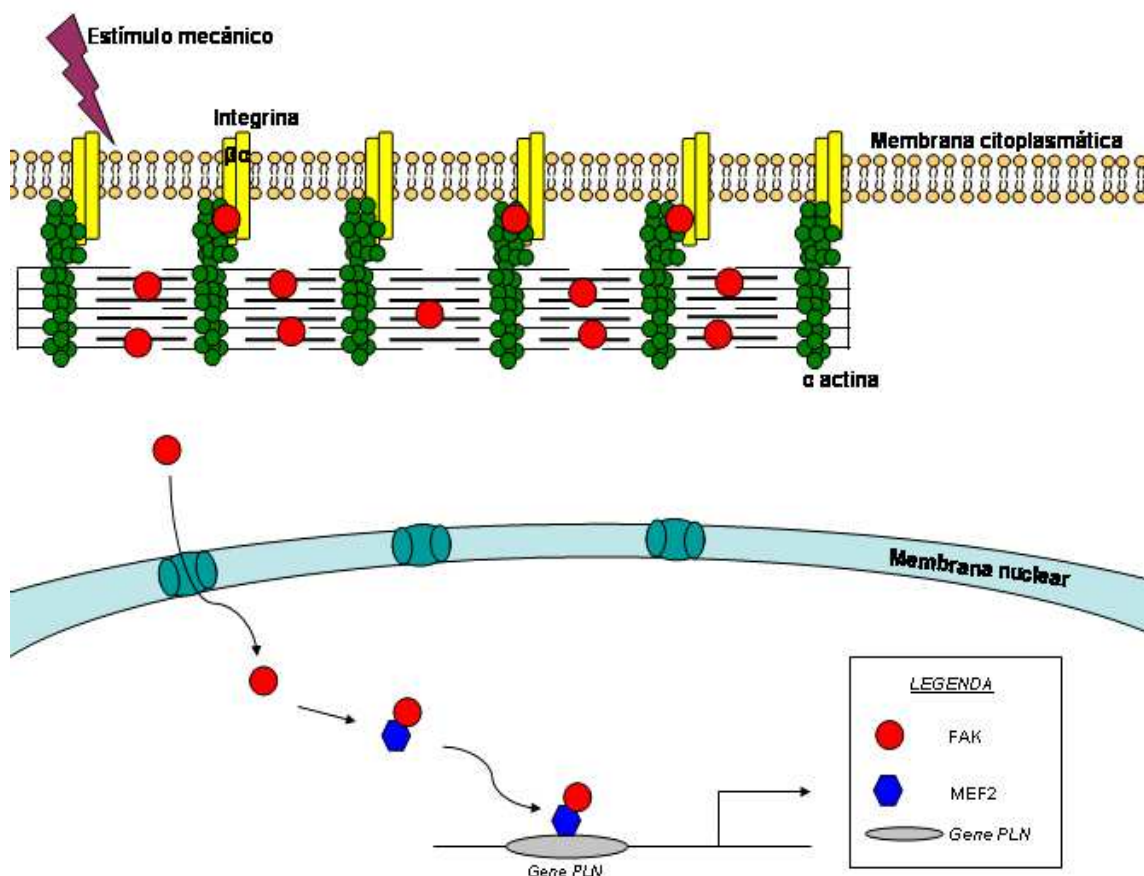


Figura 16. Modelo da sinalização via FAK, demonstrando que a FAK transloca-se para o compartimento nuclear, em decorrência de estímulo mecânico, onde interage com o fator de transcrição MEF2 e coopera para a ativação da expressão gênica do *pln*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Backs J, Olson EN. Control of Cardiac Growth by Histone Acetylation/Deacetylation. *Circ Res* 2006; 98: 15 - 24.

Behrens J, Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; 382: 638-42.

Berenji K, Mark H D, Beverly A R, Joseph A H. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H8-H16.

Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 167-96.

Boateng SY, Belin RJ., Geenen DL, Margulies KB, Martin JL, Hoshijima M, de Tombe PP, Russell B. Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: 259 – 269.

Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 954–963.

Cary LA, Guan JL. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci* 1999; 15: 102-13.

Ceccarelli DFJ, Song HK, Poy F, Schaller MD, Eck MJ. Crystal Structure of the FERM Domain of Focal Adhesion Kinase. *J Biol Chem* 2006; 281: 252 - 259.

Chen CH, Appeddu AP, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of Focal Adhesion Kinase with Cytoskeletal Protein Talin. *ASBMB* 1995; 270: 16995-16999.

Chien K R. Stress pathways and heart failure. *Cell* 1999; 98: 555-558.

Ciccimaro E, Hevko J, Blair I. Analysis of phosphorylation sites on focal adhesion kinase using nanospray liquid chromatography/multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 3681-3692.

Clemente CFMZ, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I, Souza JRM, Franchini KG. Targeting Focal Adhesion Kinase With Small Interfering RNA Prevents and Reverses Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Circ Res* 2007; 101: 1339 - 1348.

Cohen LA, Guan JL. Residues within the First Subdomain of the FERM-like Domain in Focal Adhesion Kinase Are Important in Its Regulation. *J Biol Chem* 2005; 280: 8197 – 8207.

Cooper LA, Shen LT, Guan JL. Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8030-8041.

David-Cordonnier MH, Hamdane M, Bailly C, D'Halluin JC. The DNA binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures. *Biochemistry* 1998; 37: 6055-6076.

David-Cordonnier MH, Payet D, D'Halluin JC, Waring MJ, Travers AA, Bailly C. The DNA-binding domain of human c-Abl tyrosine Kinase promotes the interaction of a HMG chromosomal protein with DNA. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2265-2270.

DiMichele LA, Doherty LT, Rojas M, Beggs HE, Reichardt LF, Mack CP, Taylor JM. Myocyte-Restricted Focal Adhesion Kinase Deletion Attenuates Pressure Overload-Induced Hypertrophy *Circ Res* 2006; 99:636-645.

Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz WJr, Franchini KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2002; 282: H556–H564.

Epstein ND, Davis JS. Sensing stretch is fundamental. *Cell* 2003; 112:147–150.

Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J, Franchini KG. Targeting to Cterminal Myosin Heavy Chain May Explain Mechanotransduction Involving Focal Adhesion Kinase in Cardiac Myocytes. *Circ Res* 2005; 96: 73 - 81.

Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 2000; 87: 558-565.

Furuta Y, Ilic D, Kanazawa S, Takeda N, Yamamoto T, Aizawa S. Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene* 1995; 16: 1989-1995.

Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, Rautiainen R, Partanen J, Ukkonen E, Taipale J. Genome-wide Prediction of Mammalian Enhancers Based on Analysis of Transcription-Factor Binding Affinity. *Cell* 2006; 124: 47-59.

Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* 1993; 123: 993.

Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 637.

Hoshijima M, Chien KR. Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* 2002; 109:849-855.

Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 1995; 377: 539-544.

Kadare G, Toutant M, Formstecher E, Corvol J.C, Carnaud M, Bouterin MC, Girault JA. PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 47434-47440.

Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in Cardiac Myocytes. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1015:53-70.

Lietha D, Cai X, Ceccarelli DFJ, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase *Cell* 2007; 129: 1177-1187.

Lim TA, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-Enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 2008; 29: 9-22.

Lin M, Nguyen HT., Dybala C, Storti RV. Myocyte-specific enhancer factor 2 acts cooperatively with a muscle activator region to regulate *Drosophila* tropomyosin gene muscle expression. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 4623-4628.

Maa MC, Leu TH. Vanadate-dependent FAK activation is accomplished by the sustained FAK Tyr-576/577 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251(1): 344-9.

Mañes S, Mira E, Gómez-Mouton C, Zhao ZJ, Lacalle RA, Martínez AC. Concerted Activity of Tyrosine Phosphatase SHP-2 and Focal Adhesion Kinase in Regulation of Cell Motility. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3125 – 3135.

Marin TM, Clemente CFMZ, Picardi PK, Pascoal VDB, Lopes-Cendes IT, Saad MJA, Franchini KG. Shp2 Negatively Regulates Growth in Cardiac Myocytes by Controlling Focal Adhesion Kinase and the mTOR/S6 Kinase Pathways. *FASEB J* 2008; 22: 1155.7.

Mas JA, Garcia-Zaragoza E, Cervera M. Two functionally identical modular enhancers in *Drosophila* troponin T gene establish the correct protein levels in different muscle types. *Mol Biol Cell* 2004; 15, 1931–1945.

Mizukami Y, Yoshioka K, Morimotoi S, Yoshida KI. A Novel Mechanism of JNK1 Activation. J Biol Chem 1997; 272: 16657-16662.

Nadruz Jr W, Kobarg CB, Constancio SS, Corat PD, Franchini KG. Load-induced transcriptional activation of *c-jun* in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. Circ Res 2003; 92: 243-251.

Nadruz JrW, Corat MA, Marin TM, Guimaraes Pereira GA, Franchini KG. Focal Adhesion Kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. Cardiovasc Res 2005; 68: 87-97.

Nadruz JrW, Kobarg CB, Kobarg J, Franchini KG. C-Jun is regulated by a combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286:H760-H767.

Naya FJ, Black BL, Wu H, Bassel-Duby R, Richardson JA, Hill JA, Olson EN. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. Nat Med 2002; 8(11): 1303-9.

Parsons JT. Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 146-152.

Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TH, Pariaut R, Alcaraz A, Ji G, Cheng L, Yang Q, Kotlikoff MI, Chen J, Chien K, Gu H, Guan JL. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. J Clin Invest 2006; 116:217-227.

Peng X, Wu X, Druso JE, Wei H, Park AYJ, Kraus MS, Alcaraz A, Chen J, Chien S, Cerione RA, Guan JL. Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. Proc Natl Acad Sci 2008; 105: 6638 - 6643.

Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev Physiol 1997; 59:551-571.

Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:2291-2301.

Savkur RS, Burris TP. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* 2004; 63(3): 207-212.

Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal Adhesion Kinase and Paxillin Bind to Peptides Mimicking β Integrin Cytoplasmic Domains. *J Cell Biol* 1995; 130: 1181-1185.

Schlaepfer DD, Jones KC, Hunter T. Multiple Grb2-Mediated Integrin-Stimulated Signaling Pathways to ERK2/Mitogen-Activated Protein Kinase: Summation of Both c-Src- and Focal Adhesion Kinase-Initiated Tyrosine Phosphorylation Events. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2571 - 2585.

Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 549-599.

Senyo SE, Koshman YE, Russell B. Stimulus interval, rate and direction differentially regulate phosphorylation for mechanotransduction in neonatal cardiac myocytes. *FEBS Lett* 2007; 581: 4241-4247.

Sussman M, McCulloch A, Borg TK. Dance Band on the Titanic: Biomechanical Signaling in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* 2002; 91: 888 – 898.

Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz JrW, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003; 93: 140 – 147.

Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, Franchini, K.G. RhoA/ROCK signaling is critical to activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 2005; 289: H1488-1496.

Toutant M, Costa A, Studler JM, Kadaré G, Carnaud M, Girault JA. Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7731 - 7743.

Xie B, Zhao J, Kitagawa M, Durbini J, Madri JA, Guan JL, Fu XY. Focal Adhesion Kinase Activates Stat1 in Integrin-mediated Cell Migration and Adhesion. *J Biol Chem* 2001; 276: 19512–19523.

Yi XP, Wang X, Gerds AM, Li F. Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium. *Hypertension* 2003; 41:1317-1323.

Yi XP, Zhou J, Huber L, Qu J, Wang X, Gerdes AM, Li F. Nuclear compartmentalization of FAK and FRNK in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 2509 - 2515.

YU DH, QU CK, HENEGARIU O, LU X, FENG GS. Protein-tyrosine Phosphatase Shp-2 Regulates Cell Spreading, Migration, and Focal Adhesion. *J Biol Chem* 1998; 273: 21125.

8. ANEXO

Anexo 1

Sequência de nucleotídeos do gene *phospholamban*

>ref|NC_005119.2|NC_005119:32000371-32008559 Rattus norvegicus chromosome 20, reference assembly (based on RGSC v3.4)

CGCAGCTGAGCTCCCAGACTTCACACAATAACAGTCTGCATTGTGACGATCACAGAAGCCAAGGTAAG
GCACGGTATCACTGACTTTGGACATTCTTACTTTCTGTAATTCGATCTTACTAACTTTTTAAAGAATTC
TAACCCCTAAATTCCAAAAGCTACATAACAAAAGAATCTATGACAAAATGCTTACTTTCTAAATAAAATC
TCACCCATTTACTGACAGTAAAATTAGACCACTTTAAAAGAGATCCTATTACGCCTGTTTGGGCTACTTA
CATTTGGTTATTTTGGTTTTGCACATATGAACCTCCGATTTAAAACCTCCCAATTATATTAGCATATAT
GTTGGTAGAGATAAAATTAATTTTCATGCAAACGTAATGGTTTCCTTTGCTATGTGGCTCTGCTGGAACAA
TGCAGGATGAGGTCACCTATTTACCGCTGGGGGACACAGCTTATTCTCAGCTGTTTATAACTGTGGGGCA
TGCACACTGAGCGCACTTACTTGATGATATCATTGTAGCTCTTAAGGTGAGACAGTAAAAGAGATTTTAA
AGAACAGAAAATGGAGACTACTTCTCAAATGCTCTTGATGACTGTTACTCTCTAAAAATTCAGTCAACC
TTTAAATACTTCTAGAACTTTCATTTTAAATAAGAGAATAGTTTGTTCAGTTTGATTCTATAAAGAAAA
AGTTAGATATTTTTTAAACAAACACATCTTTTTTAAATGACAGAAAAATAATTCAACATTTTTTAAAAATA
AAAAGGGCATTTTGGCATAGGAACATTTCTAAGGAAATTTGAATACATTCTAACATAGAGTACATTTATC
ACATTTTACTCTCCATTGTTTCCTAAGTTTCTGCCATGAATTTAGAAGTAAAACAAAATATCCAGGAAT
GGAGATGCAACACTGTATTATTGCTATTTGTTACAAAGCTCAATTAATAAAAAATGTTTTCTTACTCTTAA
ACCTATTAGATGACATAGAAAAACTCACTTTTACTTCTTACTACTTACATTCTATCATACATAAAATGCTA
AATAAAACTGACCTCTATAATTCTCAATTCCTGTAATCTAAGTCAAAACACAGCTGTCTCCTACGCAGAA
CTCTTGTCGGGAAAACATCTCTAGTATGTGCTCTTAACTCCAAGGAACCTAACACGCCTCTCAATAAAAT
TTGTAACCTTAAAAATATGTTTCTTTGATATTGTACAAATGACACTTGGTGCCAAGTTTATCTGGCAAA
TTTCTGCATTTTTTTTACCTTTTTATTTATCCATTTACTGTGGGGGGGGGCATACAATTGCACGTGTGTGA
AGGTCAGAGGAGGGTTTGTAGGAGTCAGTTCTTTCCCCCACACGTAGGCTTCAGGAAGTGTGAGCTTGGGT
CATCAGGCCTGGCAGCAAGTGAGCCGTCTCCCTGGTCCCTGTGTTTTACTGTAATGCCTATCAATAACAT
TCCCACACTAGAATGACGTGTACAAAAGTTTTTTCAGTGGAGTAGGGGTAGGTAATGAGTTTCTTCCCAC
CAGAATTCCCTTATATAAAACAACTTCTAGAAAAATATAAAATCTGCTATCAAAGCATCTTTAGCAGGTT
AAGAGGATGGCATAATTAGTGCCTGTAGTTAAATTTTCAATAGAAAGTACAGTGCCAGGTATGCTTGAA
CCATGTGTTCAAACTAGCTTTATGGTGACATTGAAGTATTTTGTGTTATAAAGGTACATGCTTTAAAAAA
AAAGATAAAATCAATGAAGAAATGTAAAAAATATAAAAAATTATGAAATATAATGGAAAAAATGAGAAAA
TTGCTTTACCAAAAAGAGTCACATCAATGTCTTTTCTAAAGCAAATCAAATTTATTTTAAACATATATT
AGTAAACATAAAGGAAAATTATGTATTTGGGTCATACATTAATATTATTTCTTAATCTCACCAATTAAG
ACATAATATTTGCATTGGTTATATAATTTAAATTATATATAAAACATTAAGTGAGAATGATTATAGATC
ACCTCTATAAATTAGATAACGTAATTGTATTTATTCTAAAGAACAATTTCTAAGTGCACACAAAACTC
CCTTTTACCTTAATTCTTGGTGTATTTGAATCTCTACATCATAATTTGGAAAACAGATTCTAAAACAAGT
GAGGGCTATGAGGTTACAGAGCTATCCCCAATAACAAGACCTTGAGGAAGAGGTCATTTGCACATCTAA
CCCCACGGTGACTAGCGAGGCTAAGATACACCATCATCTCACAAGTGCTAAACACTACCAATGGTTACT
TCAAGGAAAAATGAGGATGCAAACCTTCTGCTAACTGAAAAGCATTCTCCGTTTCATTTAAGAGCCATCA
AGTGTGTATCTGTACTACTCTATGATATTCTAAACATCATCTTCCAAGTCAGGCATAAAAAGTTACTGA
CGTCTTTAGTTTTTCACGCAGTAAATCTAGTCAGCAAAGGCAGACATTAAGATACTACAATCAGTCAAAT
TAAAAATCCAATTATTTAGCTTGCTTCACTGATAAAAAATATACCTGCAATCCATTTAAACTTTTTATCT
AAAAATCAGATTAATTTTCCATAACTTTGTACAAAGGCTTCAATACTCTATTCCATCCCTACATTCCAT
CAATTTCAATTTCTTACAATTTACAAACTATCCAAGGTCAGTGTTCAGGTTCTGAATGAATTTTGCA
TTGCTATTTACACTATGAGAATAATTTTCATCTAATATAGGAATTCACACATTGATCAGAGCAACAAAAG
TGAAAACCTTAAGAGTTGGGGCTGAAGAACGTAACCTTTCTAAACCACAGCAGCACGGCTGATAACAGCAG
TCTCTTCGGACAGTTCCAAGAGTGTGTAGTACCTCAGCTTCCTGGCCAGCACAAATCTGAAGCACGCAT
TACTAAATAAACAATGGAGATAAAGCCTGAGTGTGTGCCCCGCCCTCACAGAGTCCCGGTCAACCGAG
GACCTCTAGTGCTTTAGAGCGGAACCTTCATCTTCCGGCTTTTCGATGAGTTGAGTCCATCAATGCACTAT
TTAGCAGGGGTTTGTGTTACTAAGTGCTGCTCAATGTTTCTTAGTACTTCCCCAGTACTCTCTGCCACAT
CCTCTTTTTTAAAAAATACAGATGCTGGAGGGTTGGGGATTAGCTCAATGGTAGAGCACTTGCCTAGCA
AGCGCAAGGCCCGGGTTTGGTCCCCAGCTCCAAAGGGGGGAAAAAATACAGATGCTGAAGCTTCATGT
AAGGCTACAAGCACTTTACGGTGGCACACTTGAATCTCAGGCTAAAGTAGGACTGCAGAGTTCAAGACT
AACTAACCAGTGTGACACACACAGACCAGGCAAGACCACACAGTCTAAAAACAGGGCTGTGTTAATTC

Anexo
- 81 -

GCATTCCATGAATCAAGTAATAGGTGCCAAACCTCCAGCCCCTCCGCTCAGGACGAGTGCTAACAT
 ATGAGAGGAGCAGAGAGGCTGGGGCTGTAGACAGTGATAAAATACAGCACTGAGGAACATGAA^{CCGGTAC}
^{AAA}ACTGCATATC^{TATCCAGAGAATGGGTTTAGTATGAACCTAATCCTTTT}ACTATTTT^{TACAT}TCCAGG
 CCTCCTAAAAGGAGACAGCTCGCGTTTGGCTGCCTGCTGTCAACTTTTTATCTTTCTCTTGACTACTTAA
 AAAAGACTTGTCTTC^{CTACTTTTGTCTTCCTGGCA}TCATGGAAAAAGTCCAATACCTTACTCGCTCGGCT
 ATCAGGAGAGCCTCGACTATTGAAATGCCCCAGCAAGCGCGTCAGAACCTCCAGAACCTCTTTATCAATT
 TCTGTCTCATCTTGATATGTCTGCTGCTGATCTGCATCATTGTGATGCTTCTGTGACAAGCTGTCGCCAC
 CGCAGACCTGCACCATGCCAACGCAGCTTACAACCTGGCCCTCCACCACGAGGGAGGCAGTGCCGCCGCC
 TTCCTGCTGGACATCGTCGTGAAGGTCACGATTAAGAGTGAGACTGATGGCAGCCAGTGTGATCATCGGC
 TGGATCTTGTAACCTTTACCACGACTAAGTGTGCACAATGTAGCTGCCCGTTTCCTCAGTGTGGCTCATA
 AATGTCTTTCTAAATACTTCTGACATTGTAGTATGAGTTTTTAATTTTGAAACAGCACTACAAAAAAGT
 TCACTTTCTATATCCAGCACTAGAAAGTTCAACTTATAGCTTCAGTTTGGGAATAAATGAAATTTAAA

[■] Primers para amplificação do *pln1*.

[■] Região onde foi realizada a mutação no sítio de reconhecimento do fator de transcrição MEF2.