

WILSON NADRUZ JUNIOR

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO C-JUN NO MIOCÁRDIO DE RATOS
SUBMETIDO À SOBRECARGA PRESSORA AGUDA**

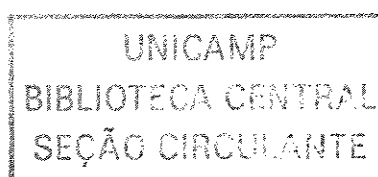
Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de Clínica Médica, do médico Wilson Nadruz Júnior.



*Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Orientador*

CAMPINAS

2003



Nº CHAMADA T/ UNICAMP	
N126r	
V	EX
TOMBO BC/ 56586	
PROC. 16 - 124/03	
C ☐	D ☒
PREÇO R\$ 11,00	
DATA	
Nº CPD	

CM00192163-9

3ib id 307095

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

N126r

Nadruz Júnior, Wilson

Regulação da expressão e ativação do fator de transcrição c-jun no miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressora aguda / Wilson Nadruz Júnior. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Kleber Gomes Franchini

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

1. Coração. I. Kleber Gomes Franchini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

WILSON NADRUZ JUNIOR

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO C-JUN NO MIOCÁRDIO DE RATOS
SUBMETIDO À SOBRECARGA PRESSORA AGUDA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do título de Doutor em
Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2003

2003.02

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

Kleber Franchini

Membros:

1. Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Francisco Rafael Martins Laurindo

2. Prof. Dr. Edécio Cunha Neto

Edécio Cunha Neto

3. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Fernando Ferreira Costa

4. Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho

Otávio Rizzi Coelho

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

Data: 16/04/2003

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Wilson e Dulce,
à minha irmã Cláudia
e à minha noiva Vera Regina*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela orientação segura e valiosa, pela confiança depositada em meu trabalho e, sobretudo, pelo exemplo profissional e científico.

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

Às amigas Thaís Theizen, Sábata Constancio, Cláudia Kobarg, Cláudia Raquel, Carolina Clemente e Adriana Torsoni pela inestimável ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos amigos e colegas deste laboratório e de vários outros em que realizei meu trabalho, pelas inúmeras contribuições e amizade.

Aos Drs. Horácio Fittipaldi Junior, Milton Cunha Filho, Paulo Nunes Meireles e José Luiz de Lima Filho pelas influências marcantes no início de minha carreira, que me estimularam a desenvolver o espírito científico.

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

“O conhecimento científico é um empreendimento que revela não apenas novos fatos, mas provoca reflexões e revelações, como uma pintura ou um poema”

Max Perutz

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	<i>xxxi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1. Sobrecarga hemodinâmica e hipertrofia ventricular.....	37
1.2. <i>Genes de expressão imediata</i> , c-Jun e hipertrofia cardíaca.....	38
1.3. Os fatores de transcrição MEF2.....	42
1.4. Hipertrofia cardíaca e MAPKs.....	46
2. OBJETIVOS.....	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1. Animais.....	57
3.2. Materiais.....	57
3.2.1. Anticorpos.....	57
3.2.2. Enzimas, reagentes, sais e drogas.....	57
3.3. Monitorização hemodinâmica.....	59
3.4. Modelo animal de sobrecarga de pressão.....	60
3.5. Imunoprecipitação e preparação de extratos totais.....	61
3.6. Análise das proteínas por immunoblotting.....	62
3.7. Análise das proteínas por imunohistoquímica.....	63
3.8. Preparação de extratos nucleares.....	64
3.9. Gel Shift.....	65
3.10. Reações de Atividade Quinase.....	66

3.11. Isolamento do RNA total e análise por Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR).....	67
3.12. Fracionamento celular.....	68
3.13. Transfecções de plasmídeos contendo gene reporter do promotor de <i>c-jun</i> e ensaios com gene reporter <i>in vivo</i>	69
3.14. Cultura primária de miócito ventricular de ratos neonatos (MVRN).....	71
3.15. Transfecção de plasmídeos em cultura primária de MVRNs, estimulação com fenilefrina e ensaios com gene reporter.....	72
3.16. Transfecção de oligodeoxinucleotídeos (ODNs) em cultura primária de MVRNs.....	73
3.17. Imunohistoquímica com microscopia confocal a <i>laser</i>	74
3.18. Método Estatístico.....	75
3.19. Protocolos experimentais.....	75
4. RESULTADOS.....	79
4.1. Ativação de MEF2 e expressão de c-Jun no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda.....	81
4.1.1. Hemodinâmica.....	81
4.1.2. Expressão protéica e distribuição de MEF2 no miocárdio submetido à sobrecarga pressora.....	82
4.1.3. Ativação de MEF2 no miocárdio submetido à sobrecarga pressora.....	83
4.1.4. Efeito da sobrecarga pressora sobre a ativação de p38 e ERK5..	85

4.1.5. Ativação da via ERK5-MEF2 no miocárdio submetido à sobrecarga pressora.....	88
4.1.6. Efeito da sobrecarga pressora sobre a expressão de c-Jun.....	90
4.2. Regulação do promotor do <i>c-jun</i> no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda.....	92
4.3. Ativação de c-Jun no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda.....	95
4.3.1. Efeito da sobrecarga pressora sobre Quinases N-terminal de c-Jun (JNKs).....	95
4.3.2. Efeito da sobrecarga pressora sobre a fosforilação e distribuição subcelular de c-Jun.....	98
4.3.3. Papel de c-Jun na ativação do complexo AP1 por sobrecarga pressora.....	100
4.4. Regulação do promotor do <i>c-jun</i> em miócitos cardíacos isolados submetidos à estimulação com fenilefrina.....	102
5. DISCUSSÃO.....	107
5.1. Regulação de c-Jun por estímulos hipertróficos.....	109
5.2. Ativação de MEF2 por estímulos hipertróficos.....	115
6. CONCLUSÕES.....	121
7. SUMMARY.....	125
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
9. ANEXOS.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

μCi	MicroCuri
$[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$	Adenosina trifosfato marcado com isótopo de fósforo 32
$[^{125}\text{I}]$	Isótopo de iodo 125
$[^{32}\text{P}]$	Isótopo de fósforo 32
ADS	Solução salina contendo Tampão HEPES, utilizada em experimentos com miócitos cardíacos isolados
AP1	Proteína Ativadora-1 (Fator de transcrição)
ATF2	Fator Ativador de Transcrição – 2 (Fator de transcrição)
ATP	Adenosina trifosfato
DMEM	Meio de cultura <i>Eagle</i> modificado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERK	Quinase Responsiva a estímulos extracelulares (subfamília das MAPKs)
ERK5 ou BMK1	Quinase Responsiva a estímulos extracelulares-5 (subfamília das MAPKs)
HDACs	Deacetilases de Histona Classe II
HEPES	Ácido (hidroxi-piperazina)etanosulfônico
JNK	Quinase N-terminal de c-Jun (subfamília das MAPKs)
MADS	Domínio presente em alguns fatores de transcrição originalmente descrito em: MCM1, Agamous, Deficiens e Serum response factor
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEF2	Fator Ativador de Miócito-2 (Fator de transcrição)

MKK	Quinase de MAPK
MVRN	Miócito ventricular de ratos neonatos
NF- κ B	Fator Nuclear <i>kappa</i> -B (Fator de transcrição)
ODN	Oligodeoxinucleotídeo
p38	p38-MAPK (subfamília das MAPKs)
p60src	Proteína originalmente definida como produto do sarcoma de Roux
PBS	Tampão Fosfato-Salino
pJC6GL3	Plasmídeo contendo o promotor selvagem do gene <i>c-jun</i>
pJSXGL3	Plasmídeo contendo o promotor do gene <i>c-jun</i> mutado no elemento MEF2
pJTXGL3	Plasmídeo contendo o promotor do gene <i>c-jun</i> mutado no elemento AP1
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Análise por Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia de Polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SV40	Promotor do gene Vírus Símio-40, utilizado como promotor controle de transfecção em ensaios de gene reporter
Tris-HCl	Tampão Tris-hidroximetilaminometano e ácido clorídrico
Trisma	Tris-hidroximetilaminometano

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1. Expressão gênica no miocárdio submetido à sobrecarga pressora sustentada.....	39

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1. Diagrama esquemático do promotor do <i>c-jun</i>	42
FIGURA 2. Diagramas esquemáticos das isoformas dos fatores MEF2.....	43
FIGURA 3. Esquema das vias de sinalização das subfamílias das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) e seus principais substratos.....	48
FIGURA 4. Representação do modelo experimental utilizado nos ensaios <i>in vivo</i> .	60
FIGURA 5. Registros de pressão arterial obtidos em experimento de coarctação da aorta.....	61
FIGURA 6. Representação esquemática dos plasmídeos usados nos ensaios de gene reporter para avaliação da atividade do promotor de <i>c-jun</i>	70
FIGURA 7. <i>Protocolo experimental:</i> Ativação de MEF2 e expressão de <i>c-jun</i> no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda.....	75
FIGURA 8. <i>Protocolo experimental:</i> Ativação do promotor de <i>c-jun</i> em resposta à sobrecarga pressora.....	76
FIGURA 9. <i>Protocolo experimental:</i> Ativação do fator de transcrição c-Jun no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	76
FIGURA 10. <i>Protocolo experimental:</i> Regulação do promotor do <i>c-jun</i> em miócitos ventriculares de ratos neonatos tratados com fenilefrina.....	77
FIGURA 11. Efeito da coarctação da aorta nas medidas de pressão arterial de ratos	81

FIGURA 12. Expressão de MEF2 no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga.....	82
FIGURA 13. Localização imunohistoquímica de MEF2 no miocárdio de ratos.....	83
FIGURA 14. Ensaio de “gel shift” avaliando a atividade de ligação de proteínas MEF2 com o DNA em extratos nucleares de miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	85
FIGURA 15. Ativação e expressão de p38 e ERK5 no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	87
FIGURA 16. Influência da sobrecarga pressora na localização imunohistoquímica de ERK5 no miocárdio de ratos.....	87
FIGURA 17. Associação <i>in vivo</i> entre MEF2 e ERK5 no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	89
FIGURA 18. Atividade quinase de ERK5 sobre MEF2 no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	89
FIGURA 19. Expressão de RNA mensageiro e de proteína de c-Jun no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	90
FIGURA 20. Influência da sobrecarga pressora na localização imunohistoquímica de c-Jun no miocárdio de ratos.....	91
FIGURA 21. Atividade do promotor de <i>c-jun</i> e influência dos elementos AP1 e MEF2 em resposta à sobrecarga pressora no miocárdio de ratos.....	94
FIGURA 22. Ativação e expressão subcelular de JNKs no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	96

FIGURA 23. Influência da sobrecarga pressora na localização imunohistoquímica de JNKs no miocárdio de ratos.....	97
FIGURA 24. Fosforilação e expressão subcelular de c-Jun no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	99
FIGURA 25. Ensaios de “gel shift” avaliando a atividade de ligação de AP1/c-Jun com o DNA em extratos nucleares de miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.....	101
FIGURA 26. Atividade do promotor de <i>c-jun</i> e influência dos elementos AP1 e MEF2 em reposta à estimulação com fenilefrina em miócitos ventriculares de ratos neonatos.....	103
FIGURA 27. Efeito da transfecção de ERK5-antisense e ERK5-sense na ativação do promotor do <i>c-jun</i> em miócitos ventriculares de ratos neonatos tratados com fenilefrina.....	104
FIGURA 28. Efeito da transfecção de ERK5-antisense e ERK5-sense na expressão de ERK5, MEF2 e p38 em extratos de miócitos ventriculares de ratos neonatos.....	104
FIGURA 29. Efeito da transfecção de ERK5-antisense e ERK5-sense na localização imunohistoquímica de ERK5, MEF2 em miócitos ventriculares de ratos neonatos avaliada por microscopia confocal a <i>laser</i>	105
FIGURA 30. Modelo proposto da regulação da expressão e ativação de c-Jun por estímulos hipertróficos.....	124

RESUMO

A expressão precoce dos *genes de expressão imediata* constitui uma característica fundamental do miocárdio durante o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. O *gene de expressão imediata c-jun* codifica um fator de transcrição que tem sido apontado como um importante regulador da resposta hipertrófica em miócitos cardíacos.

Neste estudo, investigamos se a sobrecarga pressora aguda ou o tratamento com fenilefrina estimulou a transcrição de *c-jun* em miócitos cardíacos e avaliamos a importância dos fatores de transcrição da família MEF2 neste processo. Experimentos de immunoblotting e imunohistoquímica demonstraram que MEF2 é bastante expresso no miocárdio de ratos e é localizado predominantemente no núcleo de miócitos cardíacos. Ensaaios de “gel shift” de extratos nucleares revelaram um aumento significativo na afinidade de MEF2 pelo DNA após 1 e 2 horas de sobrecarga pressora. Demonstramos também que a sobrecarga pressora induziu a uma translocação nuclear progressiva e ativação de ERK5. Experimentos de co-imunoprecipitação e de atividade quinase *in vitro* indicaram que a atividade da ERK5 foi paralela a uma maior associação entre ERK5/MEF2 e a uma maior capacidade da ERK5 fosforilar MEF2 *in vitro*. Ensaaios de gene reporter utilizando transfecção *in vivo* de plasmídeos contendo o promotor do *c-jun* demonstraram que a sobrecarga pressora induziu a um aumento consistente na transcrição de *c-jun* no miocárdio de ratos. Ao se utilizar plasmídeos contendo o promotor do *c-jun* mutado no sítio MEF2, observamos que não houve ativação da transcrição do *c-jun* em resposta à sobrecarga hemodinâmica. A mutação do sítio MEF2 também aboliu a ativação do promotor do *c-jun* em resposta ao tratamento com fenilefrina em miócitos cardíacos ventriculares de ratos neonatos. Além disto, demonstramos que a transfecção dos miócitos ventriculares de ratos neonatos com um oligodeoxinucleotídeo ERK5-antisense inibiu a ativação do promotor do *c-jun* em resposta à fenilefrina. Estes achados identificam MEF2

como um regulador potencial da transcrição do *c-jun* e sugerem que ERK5 pode ser um importante mediador da ativação do promotor do *c-jun* e de MEF2 em resposta a estímulos hipertróficos em miócitos cardíacos.

Além de estudar a regulação da expressão de c-Jun, também investigamos a sua ativação no miocárdio submetido à sobrecarga pressora aguda. Experimentos de immunoblotting utilizando subfrações celulares e estudos de imunohistoquímica demonstraram que a sobrecarga pressora induziu a um aumento concomitante na expressão de c-Jun e na fosforilação na serina-63 no núcleo de miócitos cardíacos. Observamos que a fosforilação de c-Jun foi paralela à fosforilação e translocação de JNK1 para o núcleo de miócitos cardíacos. Além disto, ensaios de “gel shift” revelaram que a sobrecarga pressora induziu a um aumento na atividade de ligação de c-Jun com o DNA, que se correlacionou com o aumento de sua expressão. Estes dados demonstram que c-Jun é regulado por uma combinação de expressão e fosforilação e indicam que este sinergismo amplifica a ativação de c-Jun no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora.

1. INTRODUÇÃO

1.1. SOBRECARGA HEMODINÂMICA E HIPERTROFIA VENTRICULAR.

A hipertrofia ventricular é uma resposta adaptativa do miocárdio à sobrecarga hemodinâmica (HEFTI et al., 1997). Em situações de sobrecarga pressora crônica, tais como a hipertensão arterial sistêmica e a coarctação da aorta, a hipertrofia miocárdica produz diminuição do raio da cavidade ventricular e aumento na espessura de sua parede, resultando em normalização da tensão na parede ventricular (LORELL & CARABELLO, 2000).

Apesar de ser considerada uma resposta compensatória ao aumento da tensão parietal, a hipertrofia ventricular esquerda é também fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular, presumivelmente por predispor a eventos isquêmicos miocárdicos, arritmias cardíacas e desenvolvimento de insuficiência cardíaca (LORELL & CARABELLO, 2000). Este fato é bem ilustrado em uma meta-análise recente envolvendo mais de 48 mil pacientes, que demonstrou risco médio de 2,3 vezes de morbidade cardiovascular associado à hipertrofia ventricular esquerda, independente do nível de pressão arterial e de outros fatores de risco (VAKILI et al., 2001).

Evidências epidemiológicas demonstram que a hipertensão arterial sistêmica é o principal fator de risco para o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda (DEVEREUX & ROMAN, 1995). Por exemplo, em pacientes com hipertensão arterial sistêmica essencial leve a moderada, estima-se que a incidência de hipertrofia ventricular esquerda, avaliada por índices ecocardiográficos, situa-se entre 12 e 30% em adultos hipertensos não selecionados e entre 20-60% em pacientes com hipertensão arterial não complicada avaliados em centros de referência (DEVEREUX & ROMAN, 1995). Estes

dados indicam que a sobrecarga hemodinâmica é um determinante principal do fenótipo hipertrófico do miocárdio.

Contudo, os mecanismos celulares envolvidos no aumento da massa ventricular esquerda em resposta à sobrecarga hemodinâmica ainda não foram elucidados. Neste contexto, diversas vias moleculares que traduzem o estímulo hipertrófico em sinais bioquímicos têm sido descritas como importantes para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (HEFTI et al., 1997; HUNTER & CHIEN, 1999; SUSSMAN et al., 2002; FREY & OLSON, 2003). Não obstante, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na regulação gênica que determina o fenótipo hipertrófico em resposta à sobrecarga pressora.

1.2. GENES DE EXPRESSÃO IMEDIATA, C-JUN E HIPERTROFIA CARDÍACA.

Na hipertrofia cardíaca há um aumento na massa e volume dos miócitos terminalmente diferenciados, resultando em um incremento do peso cardíaco sem aumento do número de miócitos cardíacos (CHIEN et al., 1993). Durante este processo, os miócitos cardíacos ativam um padrão distinto de expressão gênica que resulta em alterações qualitativas e quantitativas no conteúdo de proteínas contráteis (CHIEN et al., 1991; RUWHOF & VAN DER LAARSSE, 2000). Três classes de genes têm sido descritas como reguladas pela sobrecarga pressora sustentada: os *genes de expressão imediata*, os genes que codificam proteínas fetais e os genes de expressão constitutiva (KOMURO et al., 1988; IZUMO et al., 1988; KOMURO & YAZAKI, 1993) (TABELA 1). Como indicado na TABELA 1, os primeiros genes ativados por sobrecarga pressora são os *genes de expressão imediata*.

TABELA 1. Expressão gênica no miocárdio submetido à sobrecarga pressora sustentada.

Classes de Genes	Exemplos	Período de expressão após sobrecarga hemodinâmica
Genes de expressão imediata	<i>c-jun</i> <i>c-fos</i> <i>c-myc</i> <i>egr-1</i>	10 minutos – 18 horas
Genes fetais	<i>β-miosina de cadeia pesada</i> <i>fator natriurético atrial</i> <i>alfa-actina esquelética</i>	6 horas em diante
Genes de expressão constitutiva	<i>Miosina de cadeia leve-2v</i> <i>α-miosina de cadeia pesada</i>	12-24 horas em diante

Este padrão de expressão gênica é observado tanto em modelos de sobrecarga hemodinâmica em animais, como em miócitos cardíacos isolados tratados cronicamente com agonistas ou submetidos a estiramento mecânico sustentado (SADOSHIMA et al., 1992; SADOSHIMA & IZUMO, 1997; YAMAZAKI et al., 1998). Este dados indicam que, embora diferentes vias de sinalização celular sejam ativadas por estímulos hipertróficos distintos, o programa gênico relacionado às alterações fenotípicas da hipertrofia cardíaca encontra-se conservado.

Os *genes de expressão imediata* apresentam uma expressão bastante precoce e codificam fatores de transcrição expressos normalmente em pequenas quantidades em miócitos cardíacos, tais como o c-Jun, c-Myc e c-Fos. Embora o aumento nas suas

expressões seja limitado após o estímulo hipertrófico, diversos estudos demonstraram que estes fatores de transcrição, e em especial o c-Jun, exercem um papel importante na ativação subsequente do programa gênico associado à hipertrofia cardíaca, tais como α -actina esquelética (BISHOPRIC et al., 1992), fator atrial natriurético (CORNELIUS et al., 1997), e miosina de cadeia leve-2v (GOSWAMI et al., 2001).

O papel dos *genes de expressão imediata* no desenvolvimento das alterações fenotípicas da hipertrofia cardíaca é pouco conhecido. Em estudos recentes, camundongos transgênicos com expressão da forma ativa de c-Myc no miocárdio desenvolveram hipertrofia cardíaca (XIAO et al., 2001). Por outro lado, miócitos cardíacos de ratos transfectados com um dominante negativo de c-Jun não desenvolveram hipertrofia em resposta a estímulos com endotelina e fenilefrina (OMURA et al., 2002).

De maneira geral, a regulação dos *genes de expressão imediata* em células miocárdicas submetidas a estímulos hipertróficos é ainda pouco conhecida. No entanto, vários estudos demonstraram um aumento precoce e breve na expressão de RNA mensageiro de c-Jun no miocárdio submetido à sobrecarga hemodinâmica assim como em miócitos cardíacos isolados tratados com agonistas ou submetidos a estiramento mecânico (SCHUNKERT et al., 1991; ROCKMAN et al., 1991; SADOSHIMA et al., 1992; CLARKE et al., 2002).

O complexo AP1 (Proteína Ativadora-1) é um fator de transcrição formado pela homo e heterodimerização dos fatores de transcrição c-Jun, c-Fos e ATF2 (Fator Ativador de Transcrição-2) (KARIN et al., 1997). Este complexo é reconhecido por regular genes envolvidos em diversos eventos celulares, tais como proliferação, sobrevivência e hipertrofia celular (ANGEL & KARIN, 1991; OMURA et al., 2002). O c-Jun é um dos principais componentes do complexo AP1 e pode ser regulado tanto pelo aumento em sua

expressão quanto por modificações em sua atividade de transcrição (ou transativação). A abundância de c-Jun é regulada principalmente pelo aumento em sua transcrição gênica (KARIN, 1995). Por outro lado, a fosforilação de serinas e treoninas em seu domínio amino-terminal mediada por proteínas quinases conhecidas como Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) pode aumentar a meia-vida da proteína por inibir a sua degradação pelo sistema ubiquitina (MUSTI et al., 1997). Neste caso, a fosforilação de c-Jun nas serinas 63 e 73 pelas Quinases N-Terminal de c-Jun ou JNKs (uma subfamília das MAPKs) é a principal mediadora deste processo (KARIN et al., 1997). Além de aumentar a estabilidade protéica, a fosforilação de c-Jun nas serinas 63 e 73 é também a principal responsável pelo aumento de sua atividade de transcrição (SMEAL et al., 1994).

O promotor do gene *c-jun* contém sítios de ligação para diversos fatores de transcrição tais como Sp1, GATAA, AP1 e MEF2 (COSO et al. 1997) (FIGURA 1). Porém, evidências obtidas em modelos experimentais distintos têm indicado que os sítios AP1 e MEF2 são os elementos regulatórios mais importantes para a transcrição de *c-jun* em resposta a estímulos extracelulares (COSO et al., 1997; MARINISSEN et al., 1999; SHIN & HAN, 1999; ANDREUCCI et al., 2002). A observação de que a transcrição de *c-jun* pode ser regulada pelo complexo AP1 possibilita que o fator de transcrição c-Jun possa também regular a sua própria transcrição (ANGEL et al., 1988).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão e ativação de c-Jun no miocárdio em resposta a estímulos hipertróficos é ainda incipiente. Algumas evidências demonstraram que c-Jun encontra-se precocemente fosforilado em ventrículos esquerdos submetidos à sobrecarga pressora aguda (FISCHER et al., 2001). Por outro lado, estudos prévios distintos mostraram que a sobrecarga pressora aguda induz a um rápido aumento na expressão do RNA mensageiro de *c-jun* no miocárdio de ratos (SCHUNKERT

et al., 1991; ROCKMAN et al., 1991). Entretanto, a contribuição destes eventos para a ativação de c-Jun no miocárdio, assim como a caracterização dos mecanismos regulatórios de sua expressão em resposta à sobrecarga pressora permanecem desconhecidas.

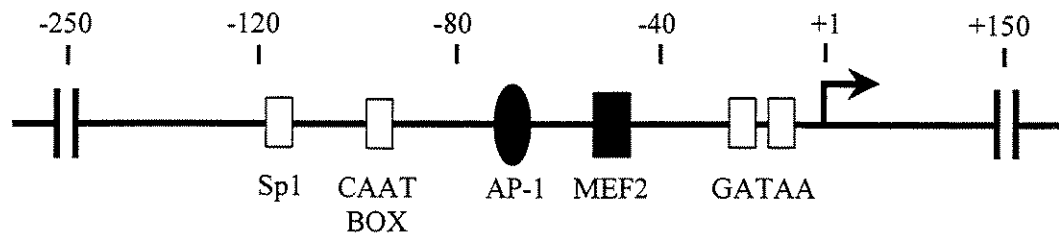


FIGURA 1. Diagrama esquemático do promotor do *c-jun* contendo seus principais elementos regulatórios.

1.3. OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO MEF2.

Vários fatores de transcrição que regulam a expressão gênica no coração foram inicialmente descritos em células de músculo esquelético indicando que o músculo cardíaco e o esquelético compartilham alguns fatores reguladores (GUPTA et al., 1991; YU et al., 1992; MOKKENTIN et al., 1993). Um destes fatores é o fator ativador de miócitos (MEF2 - myocyte-specific enhancer binding factor-2 ou myocyte enhancer factor-2).

Sítios potenciais de ligação para o MEF2 foram identificados em regiões promotoras de vários genes expressos no coração, incluindo creatina-quinase, miosina de cadeia leve e miosina de cadeia pesada, sugerindo que o MEF2 poderia influenciar a expressão gênica no coração (AMACHER et al., 1993; NAVANKASATTUSAS et al., 1992; ADOLPH et al., 1993).

Os fatores MEF2 encontram-se ativados durante o crescimento cardíaco fisiológico e são essenciais para o desenvolvimento normal do coração (LIN et al., 1997; KOLODZIEJCZYK et al., 1999; NAYA et al., 2002). Por outro lado, as proteínas MEF2 encontram-se também ativadas em modelos distintos de hipertrofia cardíaca, incluindo situações de sobrecarga crônica de pressão e volume (MOLKENTIN & MARKHAM, 1993; DOUD ET AL., 1995) e em animais transgênicos (KOLODZIEJCZYK et al., 1999; PASSIER et al. 2000). Esta ativação de MEF2 em múltiplos modelos de hipertrofia cardíaca sugere que estes fatores podem exercer um papel central na regulação de mecanismos de sinalização celular durante o crescimento cardíaco normal e hipertrófico.

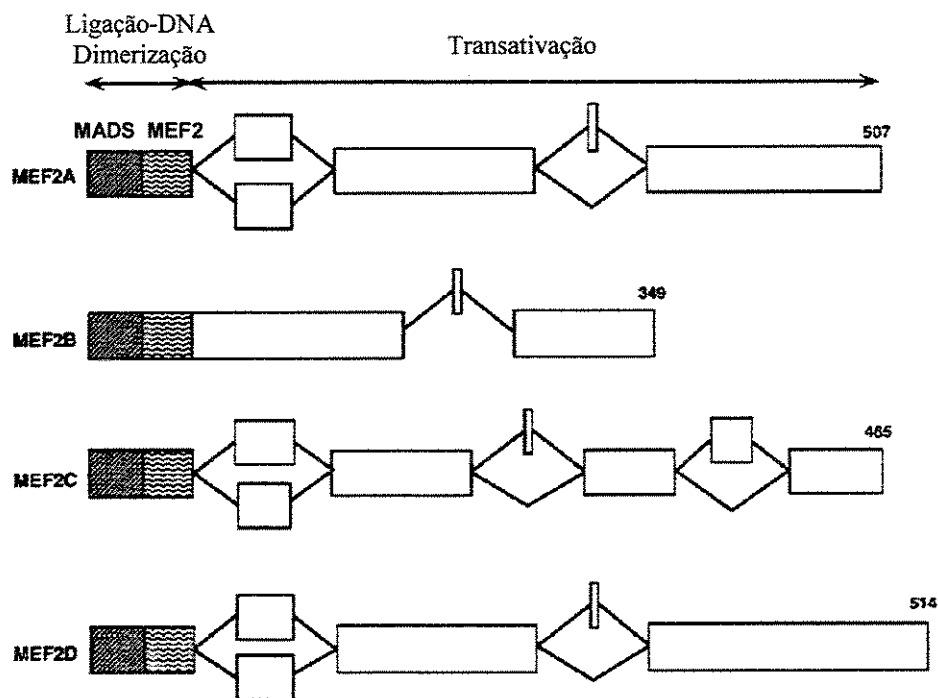


FIGURA 2. Diagramas esquemáticos das isoformas dos fatores MEF2. Os produtos dos 4 genes que as codificam são demonstrados (MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D). Exons alternativos dentro dos domínios de transativação C-terminal são indicados, assim como o número de aminoácidos na forma completa de cada proteína.

Quatro genes distintos codificam proteínas MEF2 (OLSON et al., 1995). Os genes são designados, respectivamente, *mef-2A*, *B*, *C*, *D* e compartilham mais de 80% de homologia na extremidade NH₂ terminal conhecida como MADS (de: fatores de transcrição MCM1, Agamous, Deficiens e Serum response factor) e um domínio adjacente conhecido como MEF2 (FIGURA 2). O Domínio MADS promove homo e heterodimerização e interação com fatores de transcrição basais tipo *helix-loop-helix* enquanto que o domínio MEF2 é responsável pela ligação com a sequência específica de DNA (POLLOCK & TREISMAN, 1991; MARTIN et al., 1993; MARTIN et al., 1994). A porção C-terminal é responsável pela atividade de transcrição gênica (ou transativação) e apresenta-se em tamanhos e constituição variáveis devido a “*splicing* alternativo” dos genes *mef2* (BLACK & OLSON, 1998).

A regulação dos fatores de transcrição MEF2 se faz por modificação da afinidade de ligação por sua sequência específica no DNA, no controle de sua localização nuclear e na modulação de sua capacidade de estimular a transcrição gênica (ou transativação) (BLACK & OLSON, 1998).

Dentre os mecanismos específicos de regulação, foram descritos: a interação com as Deacetilases de histona Classe II (HDACs), a desfosforilação mediada por calcineurina e a fosforilação reversível em resíduos de treonina e serina mediada por proteínas quinases.

As HDACs reprimem a atividade de MEF2 ao deacetilar a porção N-terminal das histonas, o que resulta em condensação da cromatina (PASSIER et al., 2000; LU et al., 2000). Este mecanismo inibe a atividade de transcrição de MEF2, porém sem afetar a afinidade de MEF2 pelo DNA. Neste contexto, a Calmodulina Quinase estimula a atividade de transcrição de MEF2 principalmente por liberá-lo dos efeitos inibitórios das HDACs, através da fosforilação de dois resíduos de serina na região N-terminal das HDACs

(MCKINSEY et al., 2000). A fosfatase calcineurina também pode aumentar a atividade de transcrição de MEF2, através da desfosforilação de alguns resíduos específicos (PASSIER et al., 2000; WU et al., 2000).

Diversas proteínas quinases podem fosforilar e ativar diretamente os fatores de transcrição MEF2, incluindo-se Caseína Quinase II (MOLKENTIN et al., 1996), Calmodulina Quinase (BLAESER et al., 2000) e Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (HAN et al., 1997; KATO et al., 1997; YANG et al., 1998; BLACK & OLSON, 1998; ORNATSKY et al., 1999; ZHAO et al., 1999; YANG et al., 1999; ZETSER et al., 1999).

A fosforilação mediada por Caseína Quinase II estimula a ligação de MEF2 com DNA mas é encontrada de maneira constitutiva *in vivo*, não sendo considerada, desta forma, um mecanismo regulatório importante (BLACK & OLSON, 1998).

A Calmodulina Quinase fosforila e ativa diretamente a isoforma MEF2D (BLAESER et al., 2000), mas seu efeito regulatório sobre MEF2 é basicamente devido à sua ação sobre as HDACs, conforme discutido anteriormente (MCKINSEY et al., 2002).

As principais quinases implicadas na ativação direta de MEF2 têm sido as MAPKs. Porém, entre as subfamílias de MAPKs conhecidas até o momento, apenas a p38 e a Quinase Responsiva a Estímulos Extracelulares-5 (ERK5) têm sido descritas como capazes de fosforilar e ativar isoformas de MEF2 (MARINISSEN et al., 1999; HAN & MOLKENTIN, 2000).

Apesar de as proteínas MEF2 estarem intimamente relacionadas à regulação da expressão de proteínas exclusivamente musculares, evidências recentes têm indicado um papel relevante desta família de fatores de transcrição na regulação de *genes de expressão imediata*. Experimentos em células HeLa, fibroblastos, linfócitos T, células C2C12 e

miócitos vasculares demonstraram que MEF2 apresenta uma ação central na regulação da transcrição de *c-jun in vitro* (HAN & PRYWES, 1995; COSO et al., 1997; SHIN & HAN, 1999; ANDREUCCI et al., 2002; SUZUKI et al., 2002). Estes dados permitem a formulação da hipótese de que as proteínas MEF2 poderiam também regular a expressão dos *genes de expressão imediata* em outras células, como os miócitos cardíacos, os quais apresentam uma expressão significativa de MEF2 (OLSON et al., 1995).

Estudos em modelos transgênicos investigaram o efeito de algumas proteínas moduladoras da ativação de MEF2 no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Por exemplo, a hiperexpressão de Calmodulina Quinase IV no miocárdio induziu a um aumento na atividade de transcrição de MEF2 e ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em camundongos (MCKINSEY et al., 2000). Em concordância com estes dados, camundongos transgênicos que expressaram uma forma mutante de HDAC, a qual não se dissociava de MEF2, inibiu a ativação de transcrição de MEF2 e o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em resposta estímulos hipertróficos (ZHANG et al., 2002). Por outro lado, foi demonstrado que a p38 fosforila o MEF2 no miocárdio hipertrófico de camundongos transgênicos *mdx:MyoD*^{-/-}, os quais apresentam mutação nos genes da distrofina e do fator de transcrição MyoD (KOLODZIEJCZYK et al., 1999). Contudo, a importância dos diversos mecanismos regulatórios na ativação de MEF2 em modelos fisiológicos de hipertrofia cardíaca permanece ainda desconhecida.

1.4. HIPERTROFIA CARDÍACA E MAPKs.

Vários receptores na superfície celular transmitem seus sinais ao núcleo através de cascatas membrano-citoplasmáticas constituídas por proteínas quinases. Conforme descrito

anteriormente e ilustrado na FIGURA 3, as MAPKs têm papel importante na regulação de c-Jun e MEF2. As MAPKs constituem os componentes finais de vias que regulam diversos processos celulares, tais como transcrição gênica e crescimento celular (COBB, 1999). Existem 4 subfamílias de MAPKs bem caracterizadas em mamíferos: as Quinases Responsivas a Estímulos Extracelulares (ERKs), as Quinases N-Terminal de c-Jun (JNKs), a p38 e a Quinase Responsiva a Estímulos Extracelulares-5 (ERK5).

As JNKs possuem diversas isoformas que se agrupam em bandas em torno de 54KDa (JNK2) e 46KDa (JNK1). As isoformas das p38-MAPKs pesam cerca de 38KDa (origem de seu nome), enquanto as ERKs possuem duas isoformas principais: ERK1 (44KDa) e ERK2 (42KDa) (COHEN, 1997; COBB, 1999). Já a ERK5 pesa aproximadamente 90KDa e por este fato é também chamada de BMK1 ou Big MAPK (ZHOU et al., 1995). Esta última proteína possui uma particularidade, que é a presença de um domínio C-terminal que interage exclusivamente com componentes da família de fatores de transcrição MEF2 (KASLER et al., 2000).

As MAPKs são ativadas por fosforilação de resíduos de treonina e tirosina catalisadas por MAPK-Quinases (MKKs) específicas (SUGDEN & CLERK, 1998; LAWLER et al., 1998). Por exemplo, as ERKs são ativadas pelas MKK1 e 2, as JNKs pelas MKK4 e 7, as p38-MAPKs pelas MKK3 e 6 e a ERK5 pela MKK5.

Todas as MAPKs fosforilam resíduos de serina e treonina em substratos com o consenso mínimo (Serina/Treonina)Prolina, mas fatores adicionais influenciam a especificidade do substrato. Os substratos das MAPKs incluem diversos fatores de transcrição, como Elk1, c-Jun, ATF2, e MEF2, os quais são fosforilados em seus domínios de transativação, aumentando sua capacidade de estimular a transcrição gênica (COHEN, 1997; SUGDEN & CLERK, 1998).

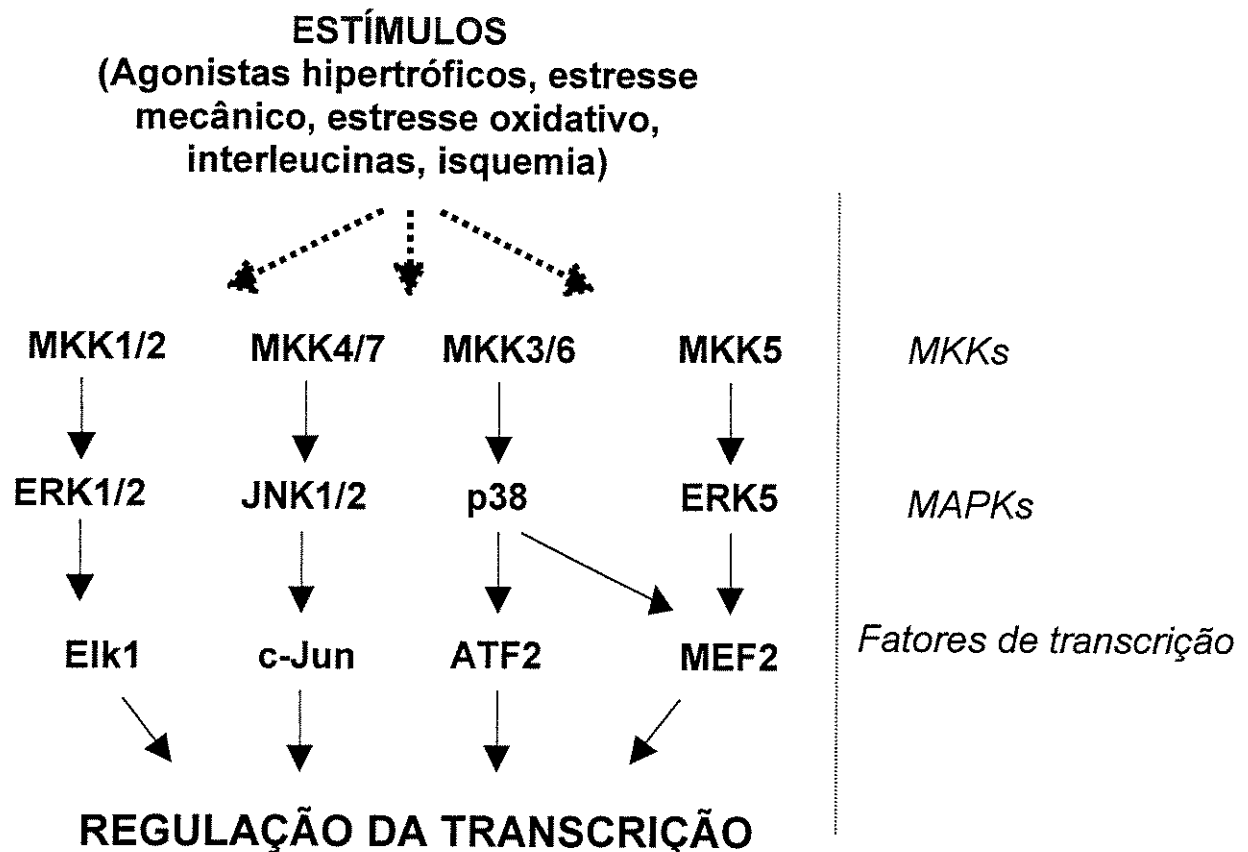


FIGURA 3. Diagrama esquemático das vias de sinalização das subfamílias das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) e seus principais substratos (fatores de transcrição).

Os estímulos responsáveis pela ativação das MAPKs em miócitos cardíacos podem ser múltiplos e discrepantes, podendo-se incluir fatores de crescimento, interleucinas, hipóxia e estresse mecânico. A cascata ERK é ativada em miócitos cardíacos principalmente por agonistas do Receptor Acoplado à Proteína-G, como a Endotelina-1, Angiotensina II e fenilefrina (SUGDEN & CLERK, 1997). Por outro lado, evidências recentes têm indicado a ativação desta via através de proteínas mecano-sensíveis como o complexo Integrinas-Quinase de Adesão Focal (SEKO et al., 1999; FRANCHINI et al., 2000). As cascatas JNK e p38-MAPK são ativadas preferencialmente por condições que levam ao "estresse" celular, incluindo: choque hiperosmótico (BOGOYEVITCH et al.,

1995), hipóxia/reoxigenação (LADEROUTE & WEBSTER., 1997), radicais livres (CLERK et al., 1998) e sobrecarga mecânica (KOMURO et al., 1996), embora agonistas do Receptor Acoplado à Proteína-G também as ativem (SUGDEN, 1999). Por fim, a ERK5 pode ser ativada por estresse oxidativo, fatores de crescimento, interleucinas e sobrecarga mecânica (NICOL et al., 2001; TAKEISHI et al., 2001).

As MAPKs têm sido apontadas como moléculas sinalizadoras importantes para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Todas as MAPKs estão ativadas em homogenatos de miocárdios de roedores submetidos à sobrecarga pressora crônica e esta ativação parece estar correlacionada à manutenção do fenótipo hipertrófico (CHOUKROUN et al., 1999; SENBONMATSU et al., 2000; TAKEISHI et al., 2001). Por outro lado, ERKs, JNKs e p38 também se encontram precocemente ativadas em homogenatos cardíacos de animais que sofreram sobrecarga hemodinâmica aguda (KIM et al., 1999; FRANCHINI et al., 2000; FISCHER et al., 2001). A hiper-expressão *in vitro* de componentes das quatro subfamílias das MAPKs em miócitos cardíacos promoveu o desenvolvimento do fenótipo hipertrófico nestas células (SUGDEN & CLERK, 1998; CLERK, 1999; NICOL et al., 2001). Por outro lado, animais transgênicos hiper-expressando componentes das vias das ERKs e ERK5 no coração desenvolveram hipertrofia cardíaca (BUENO et al., 2000; NICOL et al., 2001).

Não obstante, os eventos celulares regulados pela ativação precoce das MAPKs em células cardíacas permanecem desconhecidos. Um possível efeito da ativação precoce das MAPKs poderia ser a regulação de *genes de expressão imediata* no coração, através da fosforilação de fatores de transcrição como o c-Jun, ATF2 e MEF2 (COHEN, 1997; THOMSON et al., 1999). Recentemente, algumas observações têm indicado que algumas MAPKs participam na regulação da expressão de c-Jun em miócitos cardíacos isolados tratados com endotelina (CLERK et al., 2002). Contudo, a regulação miocárdica de *genes*

de expressão imediata mediada pelas MAPKs em modelos fisiológicos de sobrecarga hemodinâmica permanece inexplorada.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Estudar a expressão, distribuição e ativação de MEF2, assim como sua regulação por MAPKs em ventrículos esquerdos submetidos à sobrecarga pressora aguda.
2. Determinar a expressão e distribuição de c-Jun em tecidos cardíacos submetidos à sobrecarga pressora aguda.
3. Investigar os mecanismos regulatórios da expressão miocárdica de c-Jun por sobrecarga pressora aguda.
4. Investigar a ativação do fator de transcrição c-Jun em ventrículos esquerdos submetidos à sobrecarga pressora aguda.
5. Estudar a influência de MEF2 e ERK5 na transcrição de *c-jun* em miócitos ventriculares de ratos neonatos estimulados com o agonista hipertrófico fenilefrina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.2. Materiais:

3.2.1. Anticorpos:

Anticorpos policlonais para MEF2 (sc-313), p38 (sc-7149), c-Jun (sc-1694), JNK (sc-474) e monoclonais para fosfo-p38 (sc-7973), fosfo-c-Jun (sc-822) e fosfo-JNK (sc-6254) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Anticorpos policlonais para ERK5 (442686) foram obtidos da Calbiochem (EMD Biosciences, Darmstadt, Alemanha). Anticorpos contra imunoglobulina G de camundongos, contra imunoglobulina de coelhos conjugados à peroxidase e contra imunoglobulina de coelhos conjugados à biotina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).

3.2.2. Enzimas, reagentes, sais e drogas

Calbiochem (Darmstadt, Alemanha)

Metano-hidroximetilamina (Trisma), Ácido (hidroxi-piperazina)etanosulfônico (HEPES), fosfato de sódio, fosfato monobásico de sódio, ditioneitol, ortovanadato de sódio.

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

Albumina bovina, aprotinina, poli-L-lisina, acrilamida, bis-acrilamida, penicilina e estreptomicina, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), fenilefrina, 3,3'-diamionobenzidina, vermelho de fenol, azul de tripan, azul de bromofenol, hematoxilina, estreptavidina conjugada a Cy2, rodamina conjugada à faloidina.

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

Dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de magnésio, fluoreto de sódio, pirofosfato de sódio, triton X-100, tween-20, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de manganês, peróxido de hidrogênio, parafina, isopropanol.

Labsynth Produtos para Laboratório (Diadema, SP, Brasil)

Sacarose, glicerol, glicose, sulfato de magnésio, ácido clorídrico, xilol, álcool etílico.

Nutricell (Campinas, SP, Brasil)

DMEM (Meio de cultura de *Eagle* modificado)

Life Technologies (Grand Island, NY, EUA)

Lipofectamina, ATP, agarose, brometo de etídio, soro fetal bovino, soro equino, poli(dI-dC), Trizol, DNaseI, *Taq* DNA polimerase e sistema de preamplificação Superscript.

Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA, EUA)

Paraformaldeído

Amershan (Piscataway, NJ, EUA)

Percoll, [¹²⁵I] conjugado à Proteína-A, Proteína-A-sepharose e [³²P]ATP

Promega (Madison, WI, EUA)

kit de ensaio dual de gene reporter, tampão para ensaio de gene reporter, fosfatase alcalina de intestino de bezerro, quinase polinucleotídeo T4

Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, EUA)

Colagenase tipo II

3.3. Monitorização hemodinâmica: Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura 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, foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°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 4).

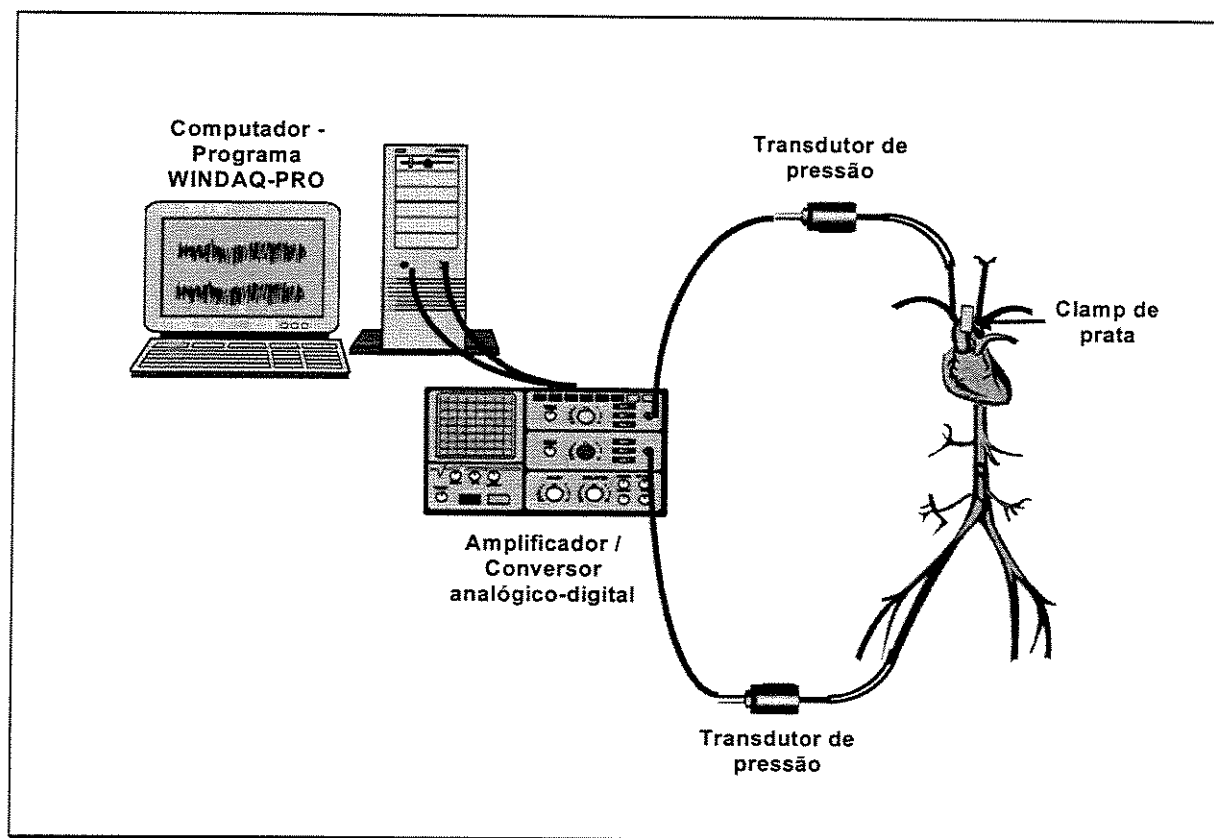


FIGURA 4. Representação esquemática do modelo utilizado nos experimentos *in vivo*.

3.4. Modelo animal de sobrecarga de pressão: Logo após a monitorização hemodinâmica, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo, a aorta torácica transversa dissecada e um “clamp” de prata (diâmetro interno - 50 μ m) foi colocado na croça da aorta entre o tronco braquiocefálico e a artéria carótida comum esquerda produzindo aumento da resistência ao fluxo sanguíneo e consequente sobrecarga de pressão no coração. A cavidade torácica foi fechada e os ratos mantidos anestesiados. Foram estudados os ratos em períodos que variaram de 10 minutos a 2 horas após constrição da aorta. A sobrecarga de pressão foi considerada satisfatória quando o “clamp” produziu um aumento de 40 a 50mmHg na pressão sistólica da aorta ascendente

(mensurada através da artéria carótida direita) sem induzir a uma queda significativa nos níveis pressóricos da aorta abdominal (mensurada através da artéria femoral) (FIGURA 5). Os animais controle foram submetidos à cirurgia fictícia, com abertura da cavidade torácica, porém sem colocação do clamp de prata.

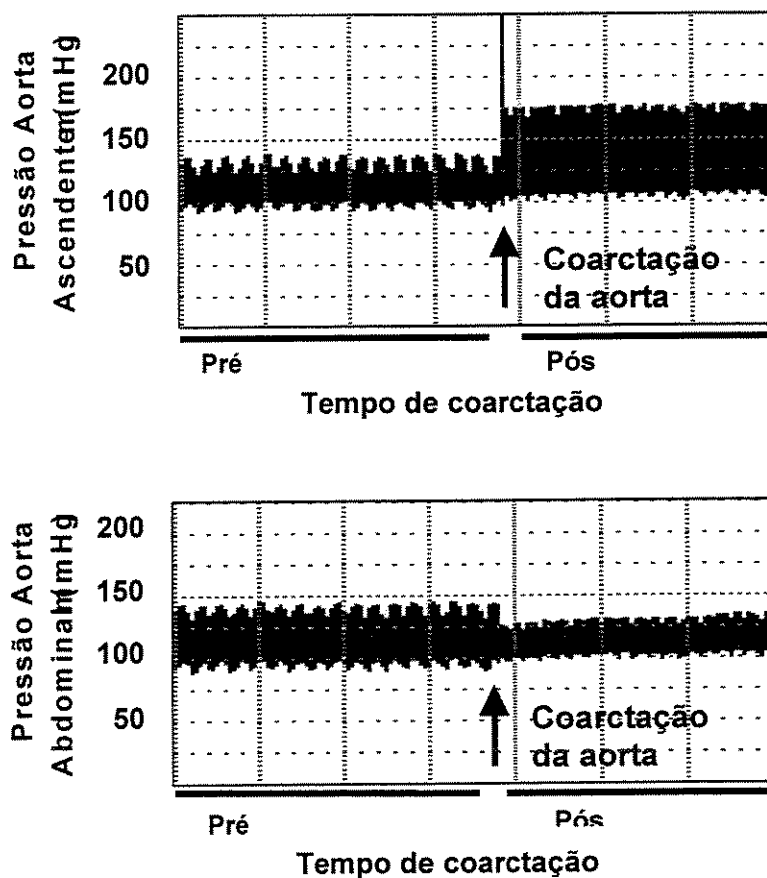


FIGURA 5. Exemplos de registros de pressão arterial obtidos em experimento de coarctação da aorta.

3.5. Imunoprecipitação e preparação de extratos totais: No fim de cada período de constrição da aorta, a cavidade torácica foi aberta e os corações rapidamente removidos, cortados em pequenos pedaços 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 utilizado para a análise por extrato total e imunoprecipitação. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BRADFORD et al. (1976). Para o protocolo de imunoprecipitação, foi feita a reação do sobrenadante com 10µg de anticorpos primários, estando as amostras mantidas sob agitação leve na câmara fria durante a noite. Cinquenta microlitros de Proteína A-Sepharose 6MB foram acrescentados a cada amostra, mantendo-as sob agitação na câmara fria por mais duas horas. Após centrifugação por 20 minutos a 11000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi submetido à lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem para imunoprecipitado (Tris-HCl 100mM, pH 7,4, EDTA 1mM, Triton X-100 0,5%, ortovanadato de sódio 2mM).

3.6. Análise das proteínas por immunoblotting: As proteínas obtidas de extratos totais e de imunoprecipitados foram tratadas com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100mM e aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas contidas no sobrenadante foram submetidas a gel de SDS-poliacrilamida a 12%, em aparelho de eletroforese miniaturado da Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi

realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência miniaturado da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10µg de anticorpos primários diluídos em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite e depois lavadas por 30 min com solução basal. As membranas foram subsequentemente incubadas em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2µCi de [¹²⁵I]-Proteína A (30µCi/µg) por 2 horas em temperatura ambiente e então lavadas novamente por 30 minutos conforme descrito acima. [¹²⁵I]-Proteína A ligada aos anticorpos específicos foi detectada por auto-radiografia usando filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA) com intensificadores Cronex Lightening Plus (Du Pont, Wilmington, DE, EUA) a -80°C por 12-48 horas. A intensidade das bandas nas auto-radiografias foi quantificada por densitometria óptica, utilizando um *scanner* (HP3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, MA, EUA).

3.7. Análise das proteínas por imunohistoquímica: A análise imunohistoquímica das proteínas foi realizada conforme descrito previamente (DOMINGOS et al., 2002). Corações submetidos a diferentes períodos de coarctação da aorta foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS 0,1M, através de imersão por 24 horas a 4°C. O material foi então processado e incluído em parafina. Os blocos foram cortados (cortes de 5µm) e aderidos a lâminas que haviam recebido um banho prévio de Poli-L-lisina. As lâminas foram desparafinizadas com xilol, hidratadas (em banhos de álcool com concentração

decrecente) e lavadas com PBS 0,1M, pH 7,4 (três trocas de 5 minutos). Após bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (0,03% em PBS 0,1M, pH 7,4) por 30 minutos, lavagem com PBS 0,1M e incubação com albumina bovina (3% em PBS 0,1M, pH 7,4) por 45 minutos em temperatura ambiente, os cortes foram incubados durante a noite a 4°C com o anticorpo primário (diluição 1:75) em solução de albumina bovina 1% em PBS 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS 0,1M e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluição 1:100) em solução de albumina bovina 1% em PBS 0,1M, pH 7,4 por 2 h em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS 0,1M e incubados com solução reveladora contendo diaminobenzidina e contracolorados com Hematoxilina de Harris. Após estas etapas, foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de álcool e as lâminas montadas. Na ausência de anticorpos primários, o uso de anticorpos secundários (controle negativo) não produziu marcação significativa.

3.8. Preparação de extratos nucleares: A obtenção dos extratos nucleares foi realizada conforme descrito previamente (THAI et al., 1998) com pequenas modificações. Os ventrículos esquerdos foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Um “pool” de 2 corações foi utilizado em cada tempo experimental. Os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido com ajuda de cadinho e pistilo e homogeneizados em 10 volumes de tampão A (sacarose 250mM, HEPES 10 mM, pH 7,6, cloreto de potássio 25mM, EDTA 1mM, glicerol 10%, PMSF 0,1mM, 2 µg/ml de aprotinina e ortovanadato de sódio 10 mM) utilizando um *potter* ou *Dounce pestle* modelo BB065 (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA). O homogenato foi derramado sobre metade do volume de tampão

B (sacarose 1M, HEPES 10mM, pH 7,6, cloreto de potássio 25mM, EDTA 1mM, glicerol 10%, PMSF 0,1mM, 2 µg/ml de aprotinina e ortovanadato de sódio 10mM) e centrifugado a 3900g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi re-suspendido em tampão A/glicerol (9:1) e derramado sobre um terço do volume de tampão B/glicerol (9:1). O gradiente foi centrifugado a 48000g por 30 minutos a 4 °C. O extrato nuclear semipurificado foi re-suspendido em 1 volume de tampão de extrato nuclear (HEPES 10mM, pH 7,6, cloreto de potássio 400mM, cloreto de magnésio 2mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 10%, ditiotritol 1mM, PMSF 0,1mM, 2 µg/ml aprotinina e ortovanadato de sódio 10mM). As proteínas nucleares foram então extraídas em gelo por 30 minutos, e o material particulado foi removido por centrifugação a 13000g em uma microcentrífuga por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi dialisado contra o tampão C (HEPES 25mM, pH 7,6, cloreto de potássio 100mM, EDTA 0,1mM, glicerol 10%, ditiotritol 1mM, PMSF 0,1mM, 2 µg/ml aprotinina e ortovanadato de sódio 10mM) por 3 a 4 horas a 4 °C. O dialisato foi analisado para quantificação de proteína (BRADFORD et al., 1976) e guardado a -80°C.

3.9. Gel Shift: Os oligonucleotídeos contendo a sequência de consenso MEF2 (GATCGCTCTAAAAATAACCCTGTCG) e AP1 (CGCTTGATGACTCAGCCGGAA), obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA), foram marcados com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP utilizando a quinase polinucleotídeo T4. As sondas (5,7pM) foram incubadas com 20µg de extrato nuclear em 20µL de volume final de solução contendo 1µg poli(dI-dC), cloreto de potássio 50mM, cloreto de magnésio 5mM, HEPES 15mM, pH 7,9, EDTA 1mM, ditiotritol 0,1mM, glicerol 5% por 20 min em temperatura ambiente. Para estudos de competição, os extratos foram incubados com 100X de excesso de oligonucleotídeos

frios (não marcados com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP) contendo a sequência de consenso MEF2, AP1 e em alguns experimentos, a sequência de consenso NF- κ B (AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC). Para os ensaios de *supershift*, os extratos nucleares foram previamente incubados com 1 μ g de anticorpo anti-MEF2, anti-c-Jun, anti-fosfo-c-Jun ou 1 μ g de imunoglobulina contra camundongo não imune por 45 minutos antes do início da eletroforese a 4°C. Para avaliar o efeito do nível de fosforilação na afinidade de proteínas nucleares pela sequência de DNA reconhecida por MEF2, os extratos nucleares foram previamente incubados com 1 μ L de fosfatase alcalina de intestino de bezerro por 30 minutos antes do início da eletroforese a 4°C. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% a 400 V por 90 min a 4 °C. Os géis secos foram então expostos e as bandas visualizadas por auto-radiografia.

3.10. Reações de Atividade Quinase: A atividade quinase de ERK5 foi mensurada através da avaliação de sua autofosforilação, conforme descrito por ABE et al. (1997). ERK5 foi isolada por imunoprecipitação com anticorpo anti-ERK5 e proteína A-sepharose conforme descrito anteriormente. Os imunoprecipitados foram lavados duas vezes em tampão de lavagem (HEPES 20mM, pH 7,2, EDTA 2mM, cloreto de magnésio 10mM, ditioneitol 1mM e Triton X-100 0,1%). ERK5 imunoprecipitada foi re-suspensa em 15 μ M ATP, cloreto de magnésio 10mM, cloreto de manganês 10mM e a reação quinase foi iniciada após a adição de 3 μ Ci de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP em um volume final de reação de 15 μ L. Após 20 min a 30°C, a reação foi interrompida pela adição de tampão de Laemmli, seguida de aquecimento por 5 minutos a 100°C. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8%, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e avaliadas por auto-radiografia. A autofosforilação da ERK5 foi determinada através de densitometria,

sendo a especificidade da banda confirmada posteriormente por immunoblotting utilizando anticorpo anti-ERK5.

Para avaliação da atividade quinase *in vitro* da ERK5 sobre MEF2, foi realizada uma modificação do protocolo de KOŁODZIEJCZYK et al. (1999). ERK5 imunoprecipitada de homogenatos de ventrículos esquerdos de corações controle e sob sobrecarga foi adicionada a uma suspensão de imunoprecipitados obtidos com anticorpo anti-MEF2 provenientes de ventrículos esquerdos de ratos controle, sendo esta mistura lavada duas vezes em tampão de lavagem (HEPES 20mM, pH 7,2, EDTA 2mM, cloreto de magnésio 10mM, ditioneitol 1mM e Triton X-100 0,1%). Posteriormente os imunoprecipitados foram incubados em tampão quinase (HEPES 20mM, EDTA 1mM, ortovanadato de sódio 1mM, cloreto de magnésio 20mM) e 10 μ Ci [γ -³²P]ATP em um volume final de 30 μ l. Após 20 minutos a 30°C, a reação foi terminada pela adição de tampão de Laemmli e a fração solúvel foi submetida à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8% e transferida a membranas de nitrocelulose. Estas foram submetidas à auto-radiografia e a fosforilação de MEF2 foi avaliada pela densitometria das bandas correspondentes a sua altura esperada (~70KDa). A especificidade da banda foi confirmada posteriormente por immunoblotting utilizando anticorpo anti-MEF2.

3.11. Isolamento do RNA total e análise por Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR): Após extração, os ventrículos esquerdos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos congelados foram pulverizados com ajuda de cadinho e pistilo e homogeneizados em Reagente de Trizol, e o RNA total foi isolado por precipitação com isopropanol e digerido com a enzima DNase I

por 10 minutos para remoção de DNA contaminante, conforme descrito por FERRERI et al. (1999). Alíquotas de 6µg de RNA total foram usadas para síntese de DNA complementar com o sistema de preamplificação *Superscript* de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar foi amplificado por PCR usando *Taq* DNA polimerase com oligonucleotídeos derivados do gene *c-jun* de rato (5'-GACCTTCTACGACGATGC-3' e 5'-CAGCGCCAGCTACTGAGGC-3') ou do gene da *beta-actina* (5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3' e 5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3') (RODRIGUEZ-BARBERO et al., 1995), sintetizados pela Life Technologies. As condições de amplificação consistiram de desnaturação a 94°C por 2 min, anelamento a 45°C por 1 min, e extensão a 72°C por 2 min. O número de ciclos foi de 25. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 1%. Após marcação com brometo de etídio, as bandas de DNA foram visualizadas com transiluminador ultravioleta (Alpha Innotech Corporation, EUA).

3.12. Fracionamento celular: Para fracionamento celular dos homogenatos cardíacos, utilizamos protocolo previamente descrito (MIZUKAMI et al., 1997). Ao fim de cada período de coarctação da aorta, os ventrículos esquerdos foram homogeneizados imediatamente em 5 volumes de tampão de solubilização (sacarose 0,32M, Tris-HCl, pH 7,4, 10mM, EDTA 2mM, ditioneitol 1mM, pirofosfato de sódio 50mM, fluoreto de sódio 50mM, ortovanadato de sódio 1mM, PMSF 2mM e 0,1mg/mL de aprotinina) a 4°C usando o Polytron operado a média velocidade por 30 segundos. Os homogenatos foram centrifugados a 1000g por 10 minutos a 4°C para a obtenção de precipitados contendo a fração nuclear. O sobrenadante foi centrifugado a 100000g por 60 minutos a 4°C para a

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

3.13. Transfecções de plasmídeos contendo gene reporter do promotor de *c-jun* e ensaios com gene reporter *in vivo*: Os plasmídeos pJC6GL3, pJSXGL3 e pJTXGL3 foram generosamente fornecidos pelo Dr. Ron Prywes (Universidade de Columbia, EUA). Estes plasmídeos contêm as posições -225 a +150 do promotor do gene *c-jun* fundido ao gene da luciferase de *firefly* (CLARKE et al., 1998). O plasmídeo pJC6GL3 contém o promotor selvagem do *c-jun*, enquanto pJSXGL3 e pJTXGL3 contêm respectivamente mutações no sítio MEF2 e AP1 (FIGURA 6).

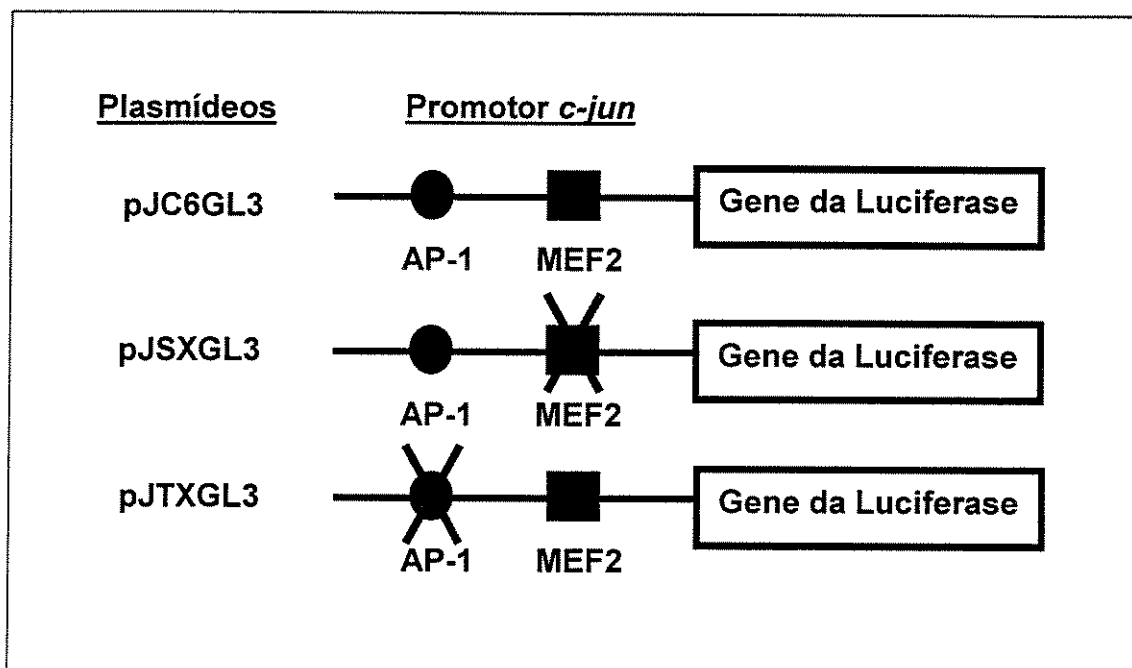


FIGURA 6. Representação esquemática dos plasmídeos usados nos ensaios de gene reporter para avaliação da atividade do promotor de *c-jun*.

Para a transfecção dos plasmídeos, os ratos Wistar foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg por via intraperitoneal) adquirido da Cristália (Itapira, SP, Brasil) e colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C. Os plasmídeos contendo promotores do *c-jun* (200 µg), diluídos em 300µL de solução salina, foram injetados diretamente no ápice do ventrículo esquerdo do rato através de seringas e agulhas de insulina. Além dos plasmídeos contendo os promotores do *c-jun*, foram acrescentados à solução 20µg de plasmídeos contendo o promotor controle SV40 fundido à luciferase de *renilla*. O promotor do gene SV40 apresenta transcrição constitutiva, o que o torna adequado para controle de transfecção. Sete dias após a transfecção, os ratos foram anestesiados com mistura de cloridrato de cetamina e diazepam e submetidos à coarctação da aorta (por 30 minutos ou 3 horas) ou à cirurgia fictícia, conforme descrito anteriormente.

Os ventrículos esquerdos foram então homogeneizados em 1,5 mL de tampão para ensaios com gene repórter. As atividades das luciferases de *firefly* e *renilla* foram feitas em luminômetro, utilizando-se substratos provenientes do *kit* de ensaio dual de gene reporter. Os valores finais de atividade da luciferase de *firefly* correspondem a sua normalização pelos valores de atividade da luciferase de *renilla* em cada amostra.

3.14. Cultura primária de miócito ventricular de ratos neonatos (MVRN): Os miócitos cardíacos utilizados foram obtidos de aproximadamente 25 corações de ratos neonatos Wistar com 1 a 2 dias de vida. Os animais foram sacrificados por decapitação e sua cavidade torácica rapidamente aberta para a remoção do coração. Os corações foram colocados imediatamente em tampão ADS, pH 7,35, pré-aquecido (cloreto de sódio 116 mM, HEPES 20mM, fosfato monobásico de sódio 1mM, glicose 5,5mM, cloreto de potássio 5,4mM, sulfato de magnésio 0,8mM e 0,2mg/mL de vermelho de fenol), tomando cuidado para a retirada completa dos átrios juntamente com os vasos restantes e gorduras excedentes. Os ventrículos foram lavados de 3 a 4 vezes com tampão ADS para a remoção de todo o sangue presente. Em seguida, os ventrículos foram reduzidos a pequenos fragmentos e incubados com tampão de digestão (tampão ADS contendo Colagenase tipo II 0,15%) a 37°C, em *shaker* termostatizado, sob lenta agitação (130 rpm) por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi re-suspendido em 1 mL de soro fetal bovino e levado para centrifugação a 3000 rpm por 4 minutos a 37°C. O precipitado obtido foi ressuspendido em 2 mL de soro fetal bovino e pré-plaqueado para a redução da quantidade de fibroblastos, sob condições padrão (37°C, sob atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono). O tecido foi digerido como descrito três a quatro vezes. Ao final do processamento, todo o material colocado em placa de *Petri* na estufa foi novamente centrifugado a 3000 rpm,

durante 4 minutos a 37°C. O precipitado obtido foi re-suspendido em 1,5 mL de tampão ADS. Os miócitos foram purificados através de um gradiente de Percoll descontínuo (1,060/1,086 g/mL) e centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos a 37°C. A banda contendo os miócitos cardíacos foi lavada com tampão ADS e o precipitado final de células foi então re-suspendido em 5 mL de meio de plaqueamento (DMEM suplementado com 100 U/mL de penicillina e estreptomicina; soro equino 10%; soro fetal bovino 5%, pH 7,2). A viabilidade dos cardiomiócitos foi determinada pelo teste de exclusão do Azul de Tripan. As células foram plaqueadas em uma densidade final de $7,5 \times 10^5$ células por placa de 35mm. Estas placas foram mantidas por 48 horas em condições padrão de cultura (incubadora sob atmosfera úmida a 37°C contendo 5% de dióxido de carbono) e submetidas ao protocolo de transfecção de plasmídeos, oligodeoxinucleotídeos e estimulação com fenilefrina.

3.15. Transfecção de plasmídeos em cultura primária de MVRNs, estimulação com fenilefrina e ensaios com gene reporter: Quarenta e oito horas após o plaqueamento das células, foi iniciada a transfecção dos plasmídeos. A partir desta etapa, todos os passos foram feitos utilizando-se DMEM sem antibióticos como meio. Previamente à transfecção foram preparadas soluções de 2,25µg de DNA (2µg de plasmídeos contendo construções do promotor do *c-jun* fundidos ao gene da luciferase de *firefly* e 0,25µg de plasmídeos contendo o promotor do SV40 fundido ao gene da luciferase de *renilla*) e de lipofectamina (12 µL) em DMEM (volume final 200µL). Para a formação do complexo DNA-lipossoma, as soluções foram misturadas e incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. O meio foi aspirado das placas, as células lavadas com DMEM e o meio aspirado novamente.

Para cada poço de 35mm, foram adicionados 800µL de meio e 200µL da suspensão DNA-lipossoma diretamente sobre as células. As células foram incubadas por 5 horas em condições padrão. Após este período, foi adicionado em cada placa 1mL de DMEM contendo 20% de soro fetal bovino e 10% de soro equino, sem remoção do meio de transfecção. As células foram incubadas por 18 horas sob condições padrão e o meio trocado por DMEM sem soro. Após 6 horas nas mesmas condições anteriores, o meio foi aspirado, e metade das placas foi exposta a DMEM sem soro contendo 100µM de fenilefrina e a outra metade foi exposta apenas a DMEM sem soro. Após 3 horas, o meio foi aspirado, as células foram extraídas em tampão para ensaios com gene reporter (200µL por placa) e a atividade de luciferase mensurada em luminômetro.

3.16. Transfecção de oligodeoxinucleotídeos (ODNs) em cultura primária de MVRNs:

Para inibição da síntese de ERK5 em MVRNs, utilizamos a metodologia de ODN-antisense, conforme descrito por GLENNON et al. (1996). Esta técnica utiliza a transfecção de pequenas sequências de ODNs complementares ao RNA mensageiro que codifica a proteína em estudo. Estes ODNs, ao se ligarem com o RNA mensageiro específico, inibem sua tradução e consequentemente bloqueiam a síntese da proteína desejada. A sequência de ODN-antisense de ERK5 (antisense-ERK5) (5'-GGCTTTCGAGGTTTCAG-3') foi complementar aos nucleotídeos 91-105 do RNA mensageiro de ERK5 (GeneBank AJ005424). A sequência senso (senso-ERK5) (5'-CTGAACCTCGAAAGCC -3') foi utilizada como controle da reação. Ambas as sequências antisense-ERK5 e senso-ERK5 não apresentaram reações cruzadas com os nucleotídeos contidos no banco de dados

GeneBank. Os ODNs utilizados foram protegidos contra degradação por adição de um radical fosforotioato e foram sintetizados pela Life Technologies.

Vinte quatro horas após a transfecção dos plasmídeos de gene reporter, as células foram transfectadas com 1 μ mol/L de antisenso-ERK5 ou senso-ERK5 e 12 μ L de lipofectamina em DMEM (volume final – 1mL) por 6 horas sob condições padrão de cultura. Os MVRNs foram lavados com DMEM e mantidos em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino por 18 horas. As células foram então mantidas em meio sem soro por 6 horas e estimuladas ou não com fenilefrina 100 μ M por 3 horas. Após este período, as células foram coletadas para os experimentos de gene reporter. Para os estudos de immunoblotting e imunohistoquímica com microscopia confocal a *laser*, MVRNs foram coletados imediatamente depois de mantidos por 18 horas em meio com 10% de soro fetal bovino.

3.17. Imunohistoquímica com microscopia confocal a *laser*. Os MVRNs foram fixados com paraformaldeído 4% e sacarose 4% em PBS 0,1M, pH 7,4, por 15 minutos em temperatura ambiente. As células fixadas foram pré-incubadas em tampão de bloqueio (leite desnatado 3% em PBS 0,1M) contendo Triton X-100 0,6% por 45 minutos em temperatura ambiente, seguido por incubação com anticorpos primários (1:75 em PBS 0,1M) anti-MEF2 e anti-ERK5 durante a noite a 4°C. O material foi lavado com PBS 0,1M e incubado com anticorpos secundários conjugados à biotina (1:250 em PBS 0,1M) por 2 horas a 25°C. Após lavagem, foram incubadas com estreptavidina-Cy2 (1:500 em PBS 0,1M) e faloidina conjugada à rodamina (1:500 PBS 0,1M) por 45 minutos a 25°C e montadas. A marcação com faloidina foi utilizada pois esta substância interage com a f-

actina e nos permite obter uma boa noção da morfologia celular. Os sinais positivos foram visualizados por microscopia confocal a *laser* (Zeiss LM510). Na ausência de anticorpos primários, o uso de anticorpos secundários (controle negativo) não produziu marcação significativa.

3.18. Método Estatístico: Os dados estão representados como a média $\pm$ erro padrão dos valores. As diferenças entre as médias dos valores foram testadas pela análise de variância de 1 via e pelo teste de Bonferroni. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

3.19. Protocolos experimentais:

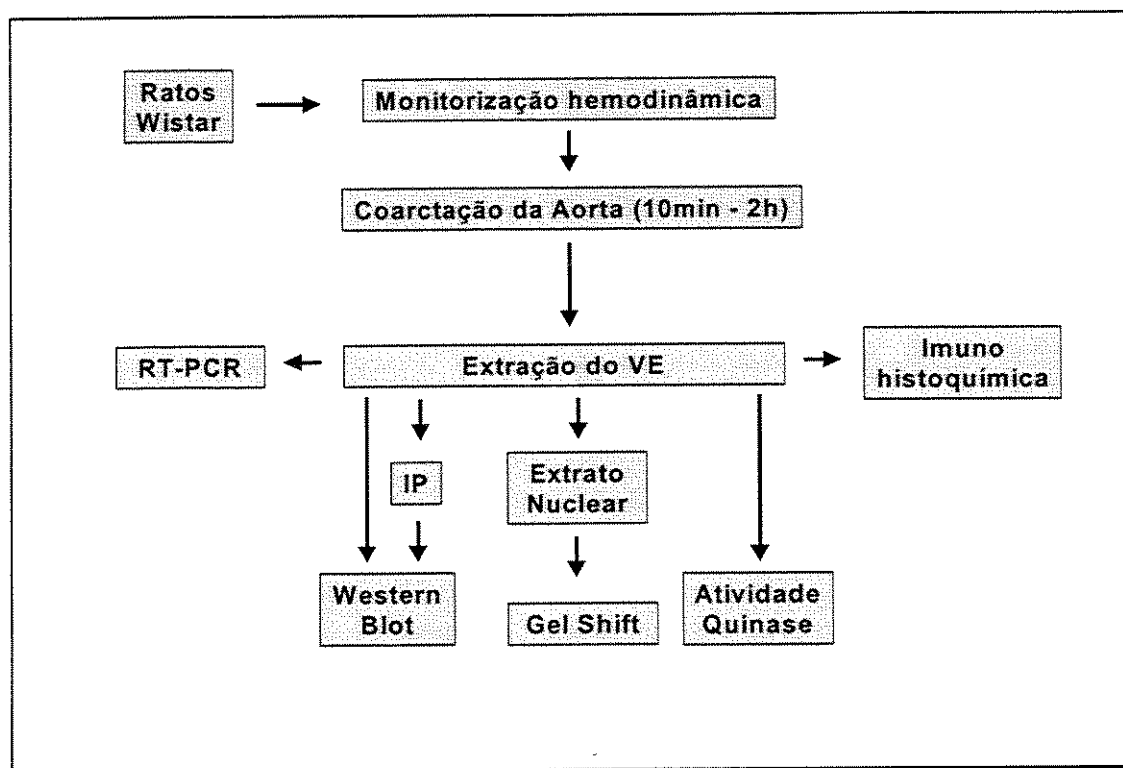


FIGURA 7. Protocolo experimental – Objetivos 1 e 2: Ativação de MEF2 e expressão de *c-jun* no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora aguda

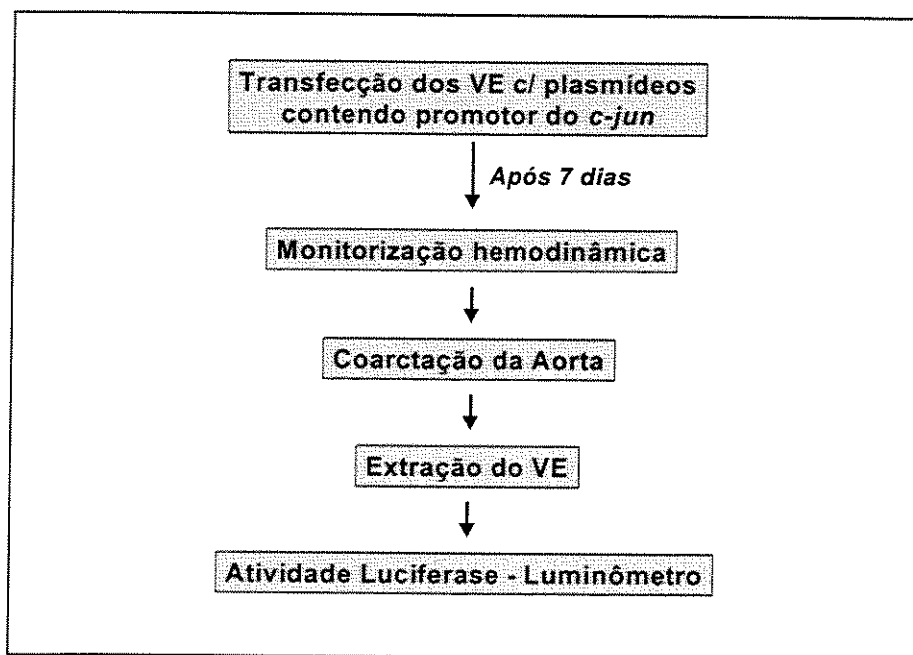


FIGURA 8. Protocolo experimental – Objetivo 3: Ativação do promotor de *c-jun* em resposta à sobrecarga pressora.

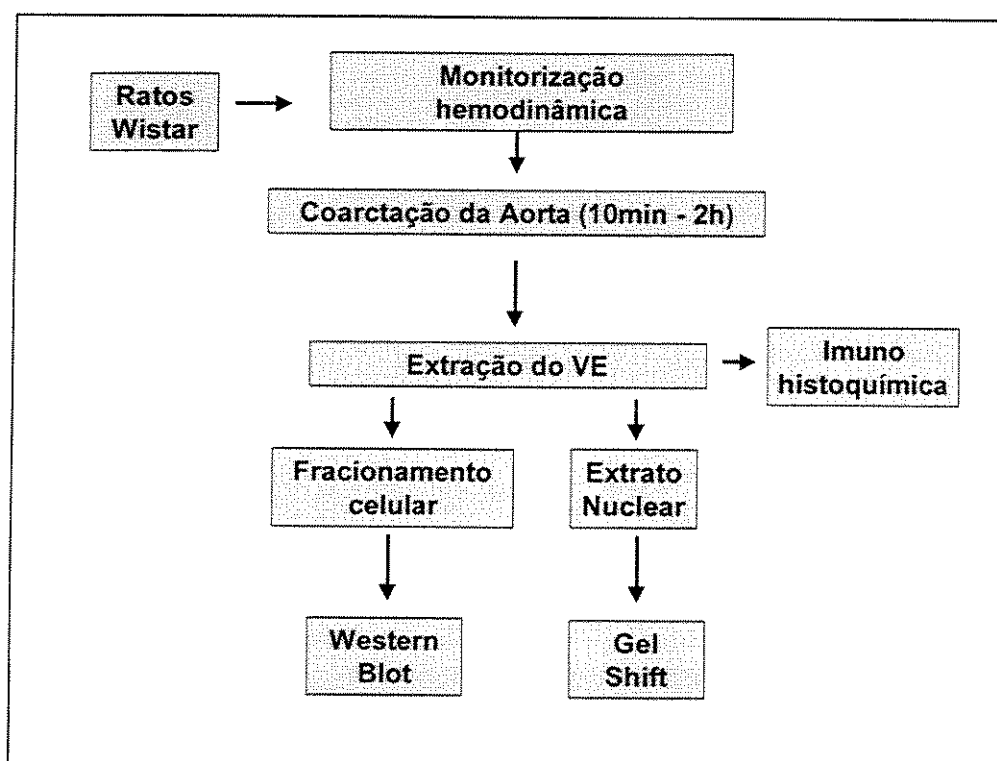


FIGURA 9. Protocolo experimental – Objetivo 4: Ativação do fator de transcrição c-Jun no miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressora.

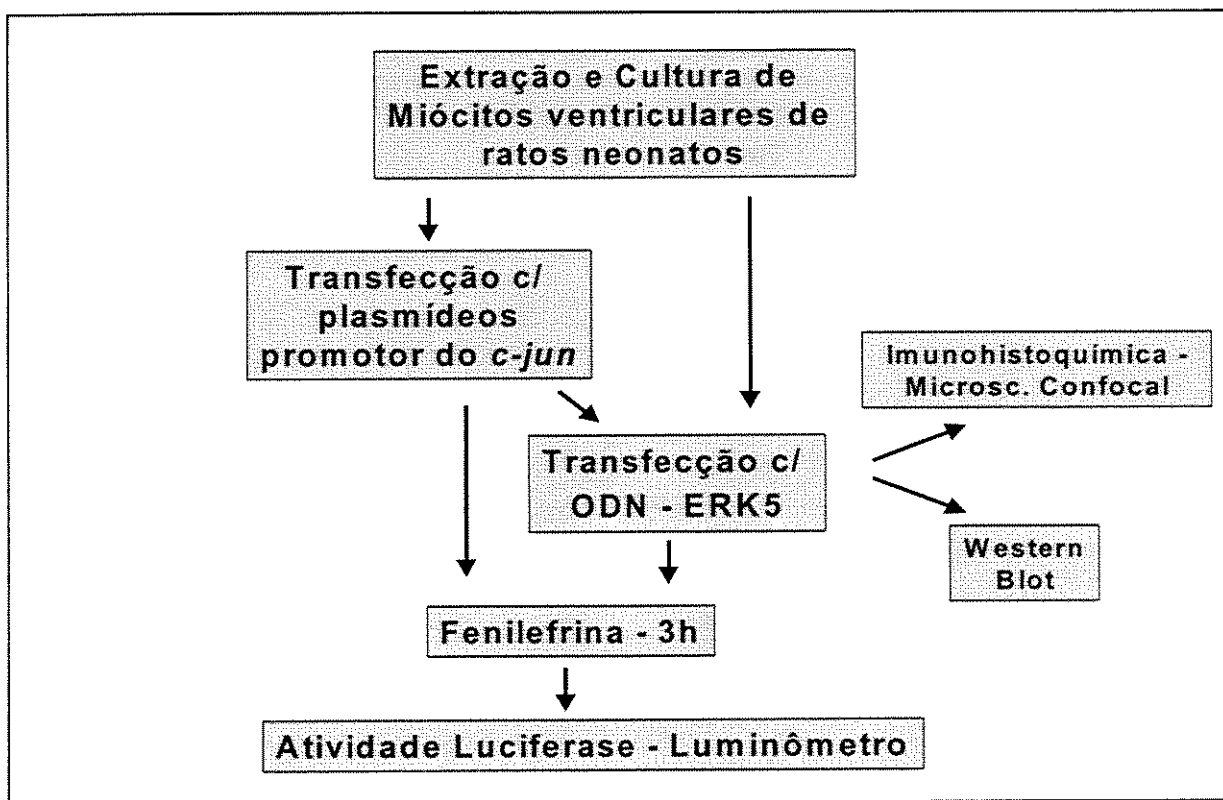


FIGURA 10. *Protocolo experimental - Objetivo 5:* Regulação do promotor do *c-jun* em MVRNs tratados com fenilefrina

4. RESULTADOS

4.1. ATIVAÇÃO DE MEF2 E EXPRESSÃO DE C-JUN NO MIOCÁRDIO DE RATOS SUBMETIDO À SOBRECARGA PRESSORA AGUDA

4.1.1. Hemodinâmica.

A FIGURA 11 demonstra o efeito da constrição da aorta sobre a pressão arterial na aorta ascendente e abdominal dos ratos anestesiados. Houve um aumento de ~40 mmHg na pressão arterial sistólica aferida na aorta ascendente (de 130 a 170 mmHg) no período de 10 minutos a 2 horas após a constrição da aorta (FIGURA 11A). Por outro lado, os níveis de pressão arterial na aorta abdominal dos animais coarctados não apresentaram alterações significativas em relação aos dos animais controle (FIGURA 11B).

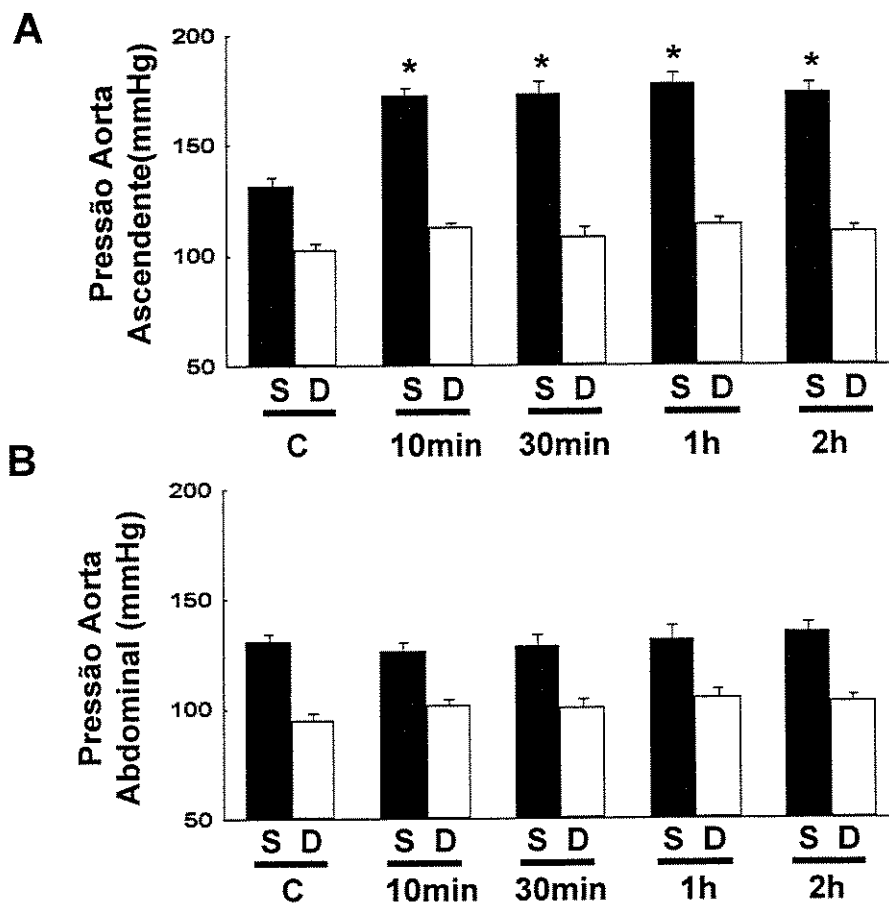


FIGURA 11. Pressão arterial aferida na aorta ascendente (A) e abdominal (B) durante o período experimental (n=15). S, Sistólica; D, Diastólica. * $p < 0,05$.

4.1.2. Expressão protéica e distribuição de MEF2 no ventrículo esquerdo submetido à sobrecarga pressora.

Como primeira etapa no estudo da regulação do fator de transcrição MEF2 no miocárdio submetido à sobrecarga hemodinâmica, experimentos com imunoblotting foram realizados para investigar a quantidade da proteína MEF2 presente no ventrículo esquerdo de ratos. Conforme demonstrado na FIGURA 12, o anticorpo anti-MEF2 reconheceu uma banda dupla em ~70 kDa nos homogenatos de ventrículo esquerdo. O achado desta banda dupla está de acordo com observações prévias (ZETSER et al., 1999; CHEN et al., 2000), e se explica pelos fatos de o anticorpo utilizado (sc-313, Santa Cruz Biotechnology) apresentar reação cruzada com diversas isoformas (A, B e D) de MEF2 e de os genes que codificam as proteínas MEF2 apresentarem extenso “*splicing* alternativo”. A constrição da aorta por 10 minutos a 2 horas não produziu alterações significativas nos níveis protéicos de MEF2 no miocárdio dos ratos.

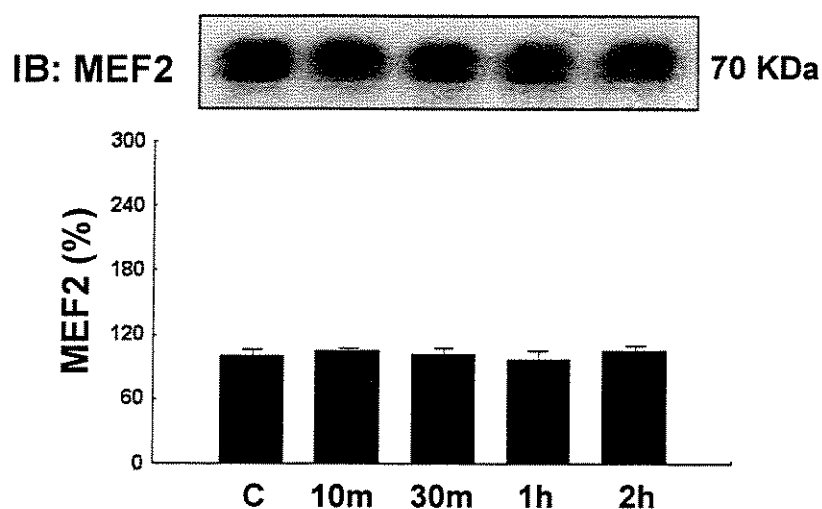


FIGURA 12. Expressão de MEF2 em ventrículos esquerdos de animais controle e coarctados através de imunoblotting com anticorpo anti-MEF2 (n=6). IB, imunoblotting, C, controle.

A proteína MEF2 foi então localizada no miocárdio de ratos através de imunohistoquímica com peroxidase de cortes de parafina. O fator de transcrição MEF2 foi detectado predominantemente no núcleo de miócitos cardíacos, com discreta marcação específica no sarcoplasma (FIGURA 13B). Por outro lado, a sobrecarga pressora não produziu mudanças expressivas na distribuição de MEF2 em miócitos cardíacos durante o período estudado (dados não mostrados).

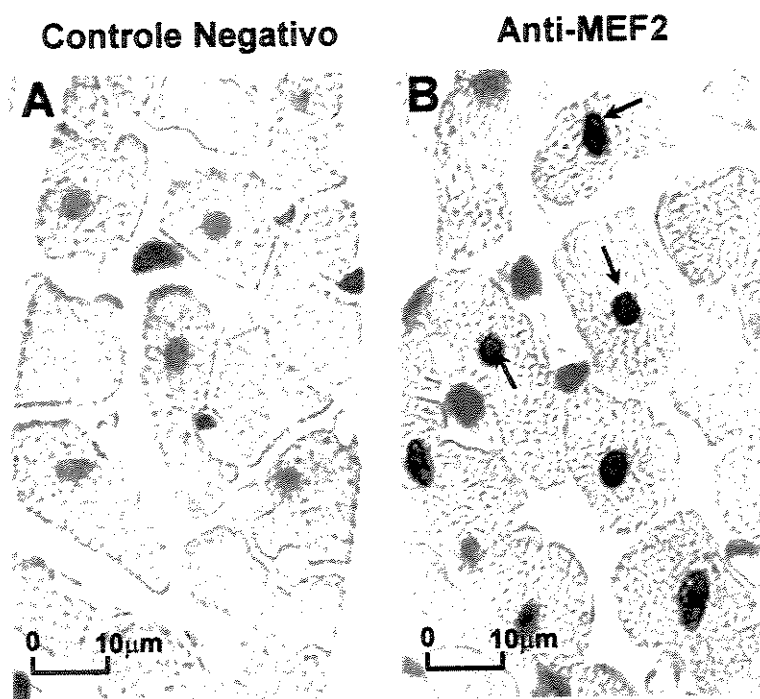


FIGURA 13. Avaliação imunohistoquímica demonstrando A. Controle negativo e B. localização de MEF2 no miocárdio de ratos controle, mais intenso no núcleo de miócitos cardíacos (marcação marrom – setas).

4.1.3. Ativação de MEF2 no miocárdio submetido à sobrecarga pressora.

O efeito da sobrecarga hemodinâmica aguda sobre a ativação de MEF2 foi avaliado por análise de “gel shift” de extratos nucleares de ventrículos esquerdos. Neste ensaio, estudamos a interação entre proteínas do extrato nuclear e um oligonucleotídeo (sonda) de

dupla fita marcada com ^{32}P contendo a sequência de consenso de DNA reconhecida por MEF2 (FIGURA 14). Os experimentos de “gel shift” demonstraram um aumento consistente na afinidade de MEF2 pelo DNA após 1 e 2 horas de sobrecarga pressora sustentada (FIGURA 14A). A especificidade da ligação da sonda de DNA por MEF2 foi comprovada em estudos de competição com oligonucleotídeos frios (não marcados com ^{32}P). A incubação do extrato nuclear com um excesso de sonda fria específica para MEF2 inibiu a afinidade do extrato nuclear pela sonda de MEF2 marcada com ^{32}P . Por outro lado, a incubação do extrato nuclear com um excesso de sonda fria específica para um outro fator de transcrição, o NF- κ B, não produziu alterações significativas na reação (FIGURA 14A).

Para confirmar que as proteínas ligadas à sonda marcada com ^{32}P eram MEF2, foram realizados experimentos de “supershift”, utilizando-se o anticorpo anti-MEF2 (FIGURA 14B). Estes experimentos demonstraram que o anticorpo anti-MEF2 interagiu com o complexo proteína-DNA e retardou sua migração no gel de poliacrilamida, o que não ocorreu com o experimento controle, que utilizou imunoglobulina não imune em substituição ao anticorpo anti-MEF2. Este dados confirmaram que o fator de transcrição MEF2 interagiu com a sonda contendo a sequência de consenso de DNA por ele reconhecida.

A fosforilação reversível de MEF2 tem sido descrita como um mecanismo importante na ativação deste fator de transcrição em resposta a diversos estímulos celulares (BLACK & OLSON, 1998). Neste contexto, investigamos se a ativação de MEF2 induzida por sobrecarga pressora era dependente do nível de fosforilação do extrato nuclear. Para avaliar esta questão, incubamos extratos nucleares de corações submetidos à coarctação da aorta com fosfatase alcalina, com o objetivo de induzir à desfosforilação das proteínas e

depois realizamos “gel shift” deste material, Conforme demonstrado na FIGURA 14C, a incubação com fosfatase alcalina aboliu a ligação de MEF2 pelo DNA induzida por sobrecarga hemodinâmica, indicando que este evento é dependente da fosforilação de MEF2 ou de proteínas envolvidas em sua ativação.

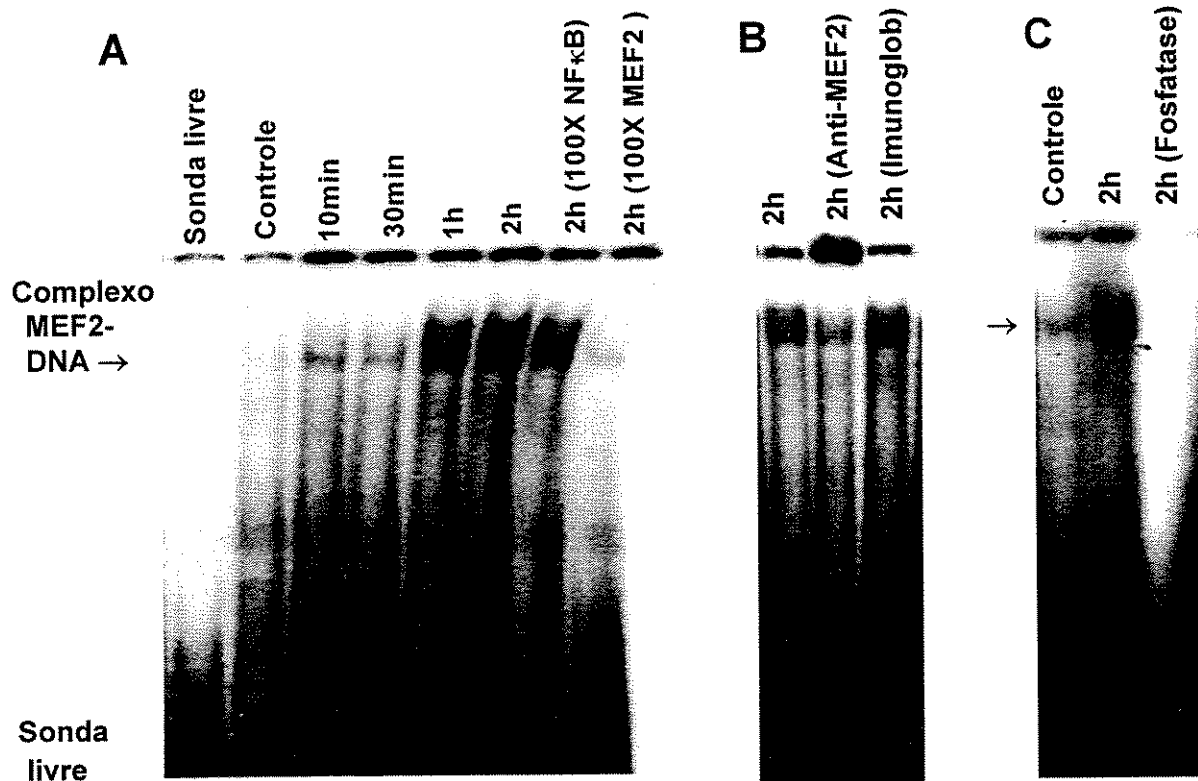


FIGURA 14. Gel shift de extratos nucleares de ventrículos esquerdos utilizando sonda de DNA reconhecida por MEF2 (representativo de 3 experimentos). A especificidade da reação foi determinada por A. competição inespecífica (excesso de 100 vezes de sonda para NF- κ B fria) e específica (excesso de 100 vezes de sonda para MEF2 fria) e B. “supershift” com anticorpo anti-MEF2 ou imunoglobulina não imune (Imunoglob). C. Efeito da incubação do extrato nuclear com fosfatase alcalina.

4.1.4. Efeito da sobrecarga pressora sobre a ativação de p38 e ERK5.

Os resultados descritos anteriormente indicaram que a sobrecarga pressora ativa o fatores de transcrição MEF2 no núcleo de miócitos cardíacos por modificações em suas

proteínas, presumivelmente através de sua fosforilação. Neste contexto, as MAPKs têm sido descritas como as principais quinases responsáveis pela fosforilação de MEF2 em diversos modelos experimentais (BLACK & OLSON, 1998; MCKINSEY et al., 2002). Entretanto, os dados na literatura indicam que apenas as subfamílias p38 e ERK5 são capazes de regular este fator de transcrição (MARINISSEN et al., 1999; HAN & MOLKENTIN, 2000). Para analisar o efeito de p38 e ERK5 na regulação de MEF2 por sobrecarga pressora, estudamos inicialmente se este estímulo ativa p38 ou ERK5 no ventrículo esquerdo de ratos. Experimentos de imunoblotting com anticorpos anti-fosfo-p38 (p-p38) e anti-p38 indicaram que a sobrecarga pressora não alterou a atividade nem a quantidade de p38 no miocárdio de ratos (FIGURA 15A). Por outro lado, através de reações quinase *in vitro*, observamos um aumento progressivo na ativação miocárdica de ERK5 induzida por sobrecarga pressora, a qual atingiu um máximo de 4,2 vezes após duas horas de coarctação da aorta (FIGURA 15B). Experimentos de imunoblotting utilizando anticorpo anti-ERK5 demonstraram que quantidades similares de ERK5 estavam presentes nos homogenatos de corações submetidos à constrição da aorta durante o protocolo experimental (FIGURA 15B). Para avaliar a localização de ERK5, realizamos análise imunohistoquímica de cortes de miocárdio. No ventrículo esquerdo de ratos controle, a ERK5 foi detectada difusamente no citosol de miócitos cardíacos (FIGURA 16A). Entretanto, nos cortes de animais submetidos à sobrecarga pressora, houve uma marcação consistente de ERK5 no núcleo de miócitos cardíacos (FIGURA 16B). Em conjunto, estes dados demonstram que a sobrecarga pressora induziu a uma ativação progressiva e translocação nuclear de ERK5 em miócitos cardíacos de ratos *in vivo*.

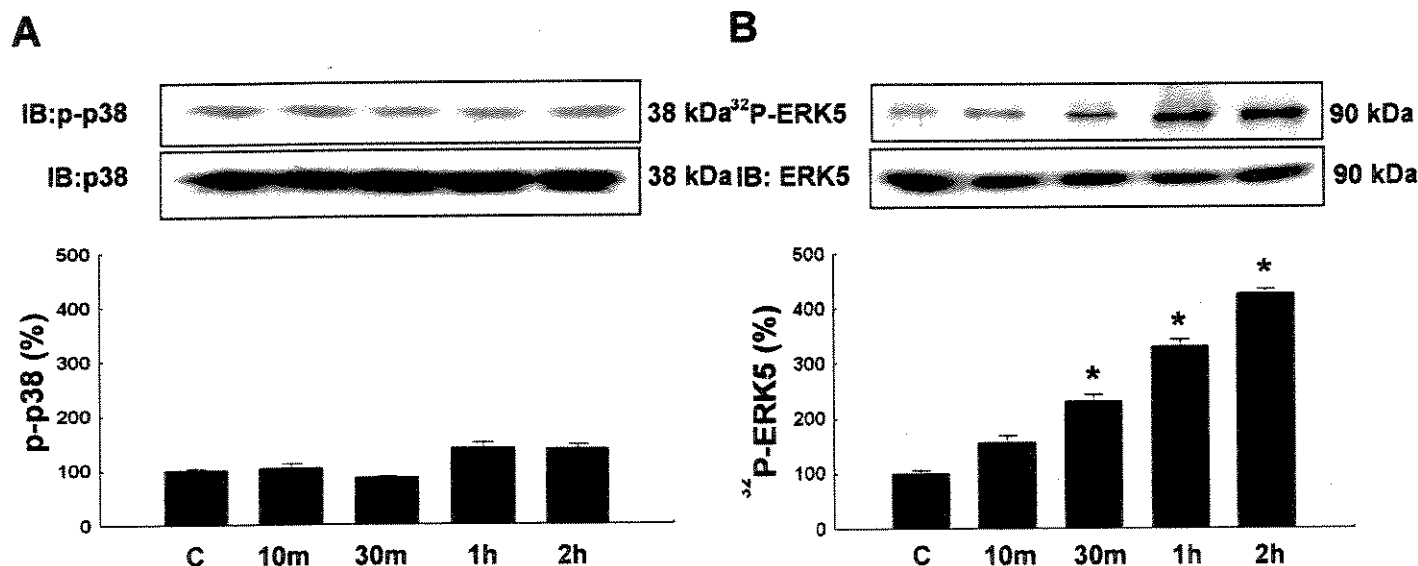


FIGURA 15. A. Experimentos de imunoblotting representativos da expressão da forma ativa de p38 (p-p38) e da quantidade total de p38 e valores médios da atividade de p38 em homogenatos de ventrículos esquerdos (n=6). B. Ensaio representativos da atividade quinase da ERK5 (acima) e da quantidade total de ERK5 (abaixo) e valores médios da atividade da ERK5 em homogenatos de ventrículos esquerdos (n=5). IB, imunoblotting; C, controle. *p<0,05.

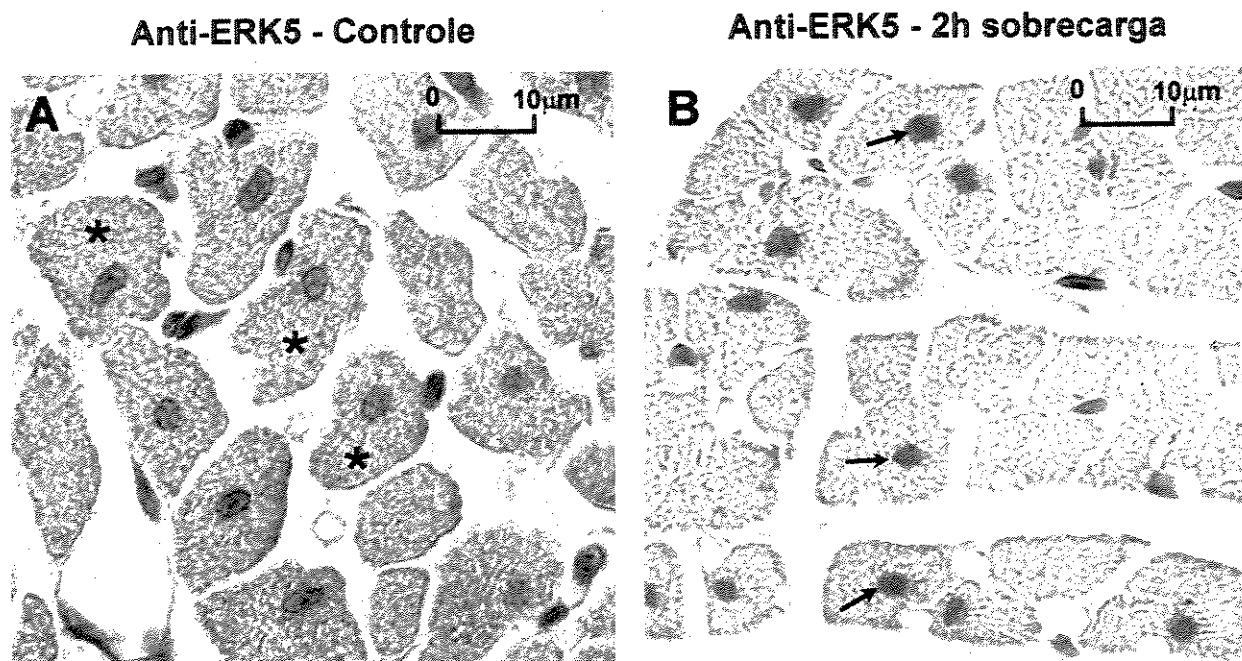


FIGURA 16. A. Distribuição miocárdica de ERK5 em corações controle mostrando imunomarcção difusa no sarcoplasma (marcação amarela – asterisco). B. Localização de ERK5 no miocárdio submetido a 2 horas de sobrecarga pressora. Intensa marcação de ERK5 foi detectada em núcleos de miócitos cardíacos (marcação marrom- setas).

4.1.5. Ativação da via ERK5-MEF2 no miocárdio submetido à sobrecarga pressora.

Por causa das analogias entre a localização e o curso temporal de ativação de MEF2 e ERK5, investigamos se a sobrecarga pressora poderia induzir a uma interação entre MEF2 e ERK5 no miocárdio de ratos. Experimentos de co-imunoprecipitação demonstraram uma associação de MEF2 e ERK5 *in vivo*, progressiva, atingindo um máximo após 2 horas de coarctação da aorta (FIGURA 17). A capacidade de ERK5 fosforilar MEF2 foi então estudada através de reação quinase *in vitro*. Neste ensaio, ERK5 imunoprecipitada de corações de animais controle ou coarctados foi adicionada a MEF2 imunoprecipitada de corações controle e esta mistura foi suspensa em tampão quinase e [γ P³²]ATP. As amostras foram submetidas à eletroforese, transferidas para membrana de nitrocelulose e avaliadas por auto-radiografia. A análise densitométrica indicou um aumento progressivo na fosforilação de MEF2, começando após 30 minutos e atingindo um máximo de 2,2 vezes após 2 horas de coarctação da aorta (FIGURA 18). Experimentos de immunoblotting com anticorpo anti-MEF2 demonstraram que quantidades equivalentes de MEF2 estavam presentes nas amostras contendo imunoprecipitados de MEF2. Por outro lado, uma banda discreta de MEF2 também foi detectada em amostras contendo apenas ERK5 imunoprecipitada, representando provavelmente, a quantidade de MEF2 co-imunoprecipitada com ERK5. Corroborando esta observação, uma pequena banda de MEF2 fosforilado também foi detectada na coluna correspondente aos imunoprecipitados exclusivos de ERK5, indicando que MEF2 é um substrato fisiológico de ERK5.

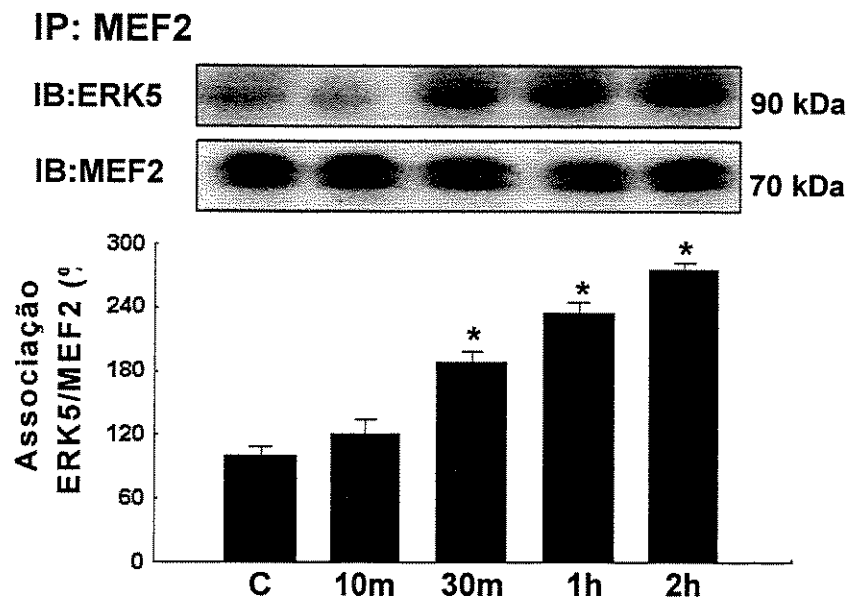


FIGURA 17. Experimento representativo e valores médios (n=5) da associação entre MEF2/ERK5 através de ensaios de co-imunoprecipitação. IP, imunoprecipitação; IB, immunoblotting; C, controle. *p<0,05.

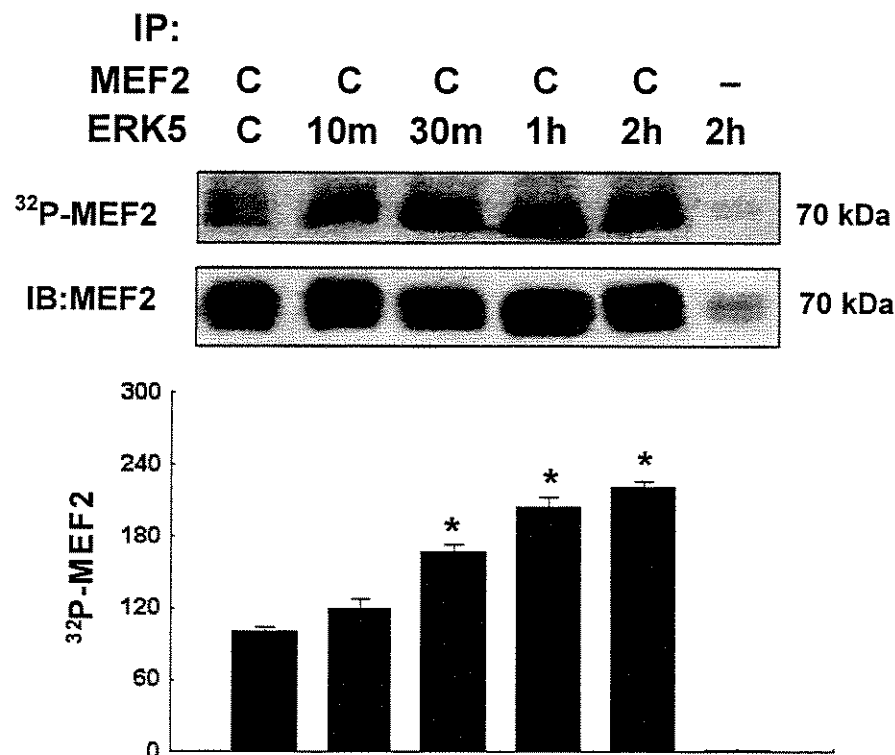


FIGURA 18. Experimento representativo e valores médios (n=5) da fosforilação *in vitro* de MEF2 induzida por ERK5 em corações de ratos controle e submetidos à sobrecarga pressora. IP, imunoprecipitação; IB, immunoblotting; C, controle. *p<0,05.

4.1.6. Efeito da sobrecarga pressora sobre a expressão de c-Jun.

Para caracterizar o efeito da sobrecarga pressora sobre a expressão de c-Jun, foram feitas análises por RT-PCR, immunoblotting e imunohistoquímica de amostras de ventrículo esquerdo de ratos controle e submetidos à coarctação da aorta. A sobrecarga pressora induziu a um aumento bifásico na expressão protéica de c-Jun, com um aumento precoce após 10 minutos (~3 vezes) e um segundo pico após 2 horas de constricção da aorta (FIGURA 19A). Os experimentos com RT-PCR demonstraram que o aumento na expressão protéica de c-Jun foi paralelo a aumentos na expressão de RNA mensageiro de *c-jun*, com picos após 10 minutos e 2 horas de sobrecarga pressora (FIGURA 19B).

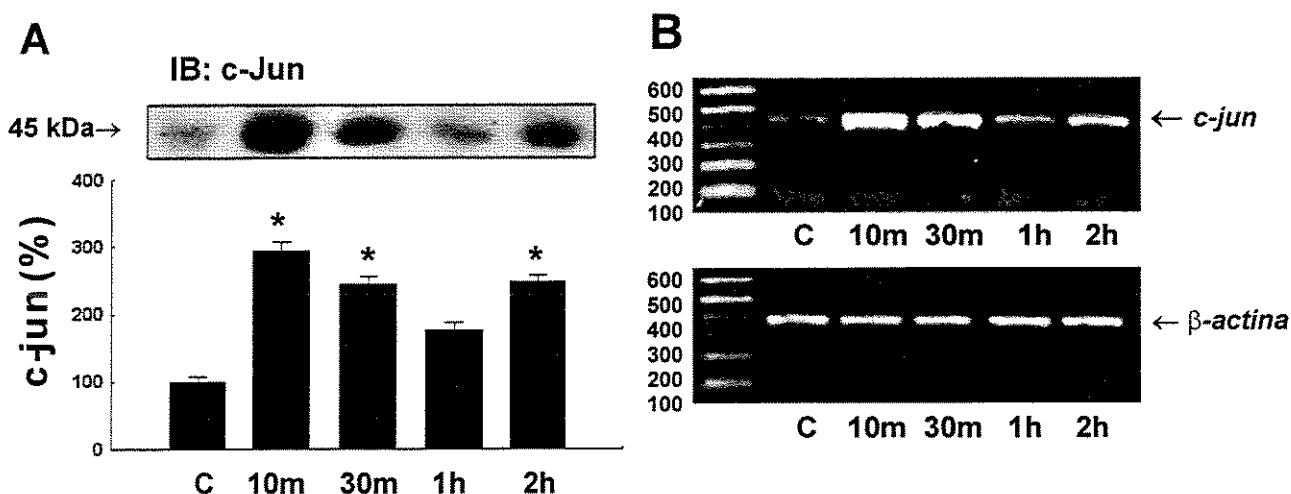


FIGURA 19. A. Experimento representativo de immunoblotting e valores médios (n=6) da expressão de c-Jun em ventrículos esquerdos de animais controle e coarctados. B. RT-PCR representativo (n=3) da expressão do RNA mensageiro de *c-jun* e *β-actina* no miocárdio de ratos durante o período experimental. IB, immunoblotting. C, controle. *p<0,05.

A análise imunohistoquímica de cortes ventriculares obtidos de ratos controle demonstrou uma marcação discreta de c-Jun no sarcoplasma de miócitos cardíacos (FIGURA 20A). Nos cortes obtidos de ratos coarctados por 10 minutos, houve uma maior marcação no citoplasma e núcleos de miócitos cardíacos (FIGURA 20B), enquanto nos animais coarctados por 2 horas, detectamos marcação intensa apenas no núcleo de miócitos cardíacos (FIGURA 20C). Em conjunto, estes dados demonstram que a sobrecarga pressora induz a um aumento bifásico na quantidade de RNA mensageiro e proteína de c-Jun em miócitos cardíacos *in vivo*.

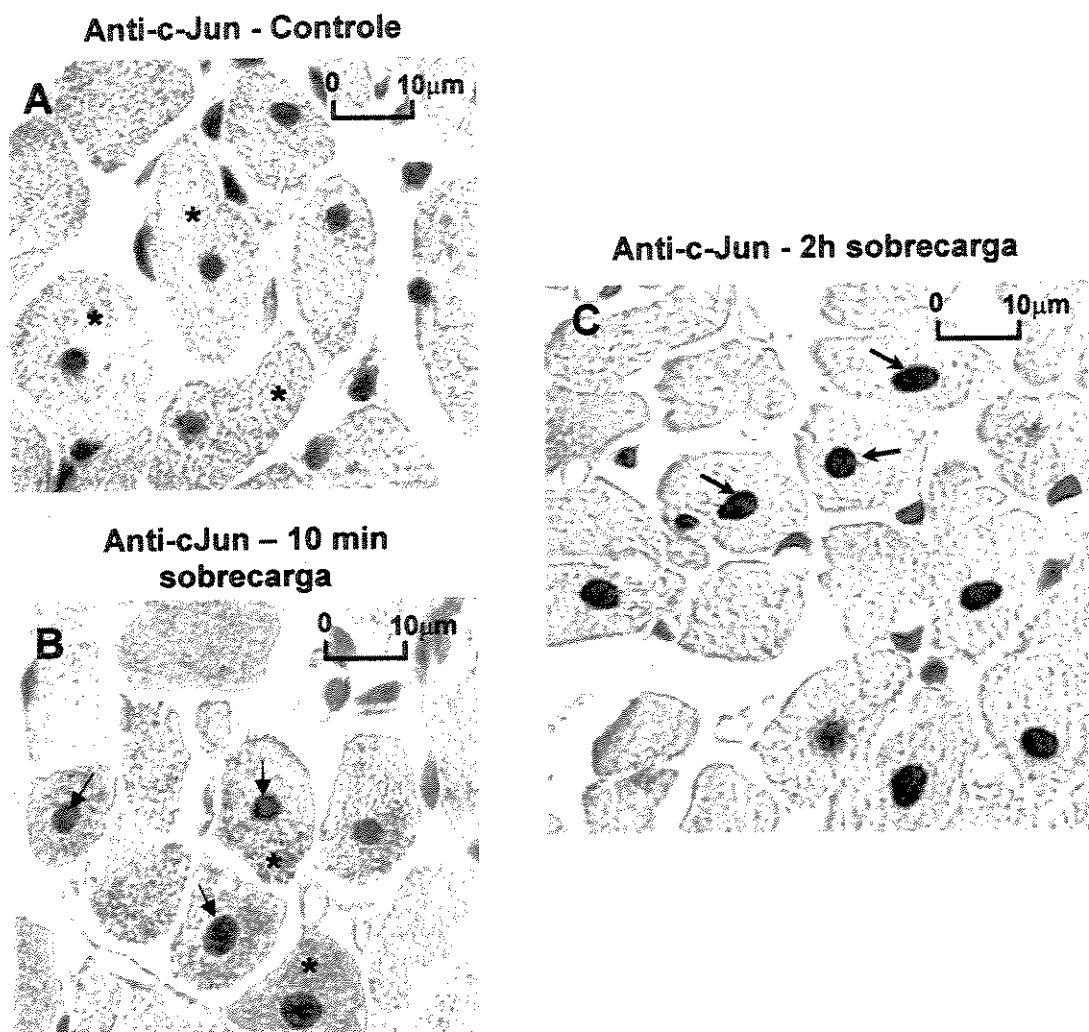


FIGURA 20. Distribuição de c-Jun no miocárdio de ratos A. Controle; e submetidos a B. 10 minutos e C. 2 horas de coarctação da aorta. Asterisco – marcação sarcoplasmática; Seta – marcação em núcleo de miócito cardíacos.

4.2. REGULAÇÃO DO PROMOTOR DO *C-JUN* NO MIOCÁRDIO DE RATOS SUBMETIDO À SOBRECARGA PRESSORA AGUDA.

Nestes estudos realizamos inicialmente transfecções *in vivo* de plasmídeos contendo genes repórteres do promotor do *c-jun* para avaliar o efeito da sobrecarga pressora sobre a transcrição de *c-jun* no miocárdio (FIGURAS 6 e 21). Ventrículo esquerdo de ratos foi transfectado com plasmídeos contendo o promotor selvagem do *c-jun* fundido à luciferase de *firefly* (pJC6GL3) e com o promotor controle SV40 fundido à luciferase de *renilla* através de injeção direta. Após uma semana os ratos transfectados foram submetidos à coarctação da aorta ou cirurgia fictícia e sacrificados 30 minutos ou 3 horas após estes procedimentos para avaliação da atividade de luciferase, que foi calculada pela relação entre a atividade da luciferase de *firefly* / atividade de luciferase de *renilla* (FIGURA 21A). A sobrecarga pressora por 3 horas induziu a uma aumento de 2 vezes na atividade de luciferase do promotor selvagem de *c-jun*, confirmando que a sobrecarga pressora aumenta a transcrição de *c-jun* no ventrículo esquerdo de ratos. Por outro lado, 30 minutos de coarctação da aorta não induziram a um aumento de atividade deste promotor, indicando que o primeiro pico de expressão de *c-jun* é regulado por mecanismos pós-transcrição gênica. O promotor do *c-jun* contém, dentre outros, elementos reguladores MEF2 e AP1, os quais podem aumentar a capacidade de transativação do gene. As transfecções foram então realizadas com promotores do *c-jun* mutados no elemento MEF2 (pJSXGL3) e AP1 (pJTXGL3) (FIGURA 21A). Apesar de os animais transfectados com o promotor selvagem e o promotor MEF2-mutado terem apresentado atividades basais similares, a coarctação da aorta não promoveu um aumento na atividade de luciferase nos ratos transfectados com o

promotor MEF2-mutado. Por outro lado, a sobrecarga pressora aumentou ~2 vezes a atividade de *firefly* luciferase nos ventrículos esquerdos de ratos transfectados com pJTXGL3, embora a atividade basal deste promotor tenha sido 3 vezes menor que nos animais transfectados com o promotor selvagem. Estes dados indicam que o elemento MEF2 exerce um efeito fundamental na transcrição de *c-jun* mediada por sobrecarga pressora, enquanto que o elemento AP1 contribui para regular a expressão basal do *c-jun in vivo* (FIGURA 21A).

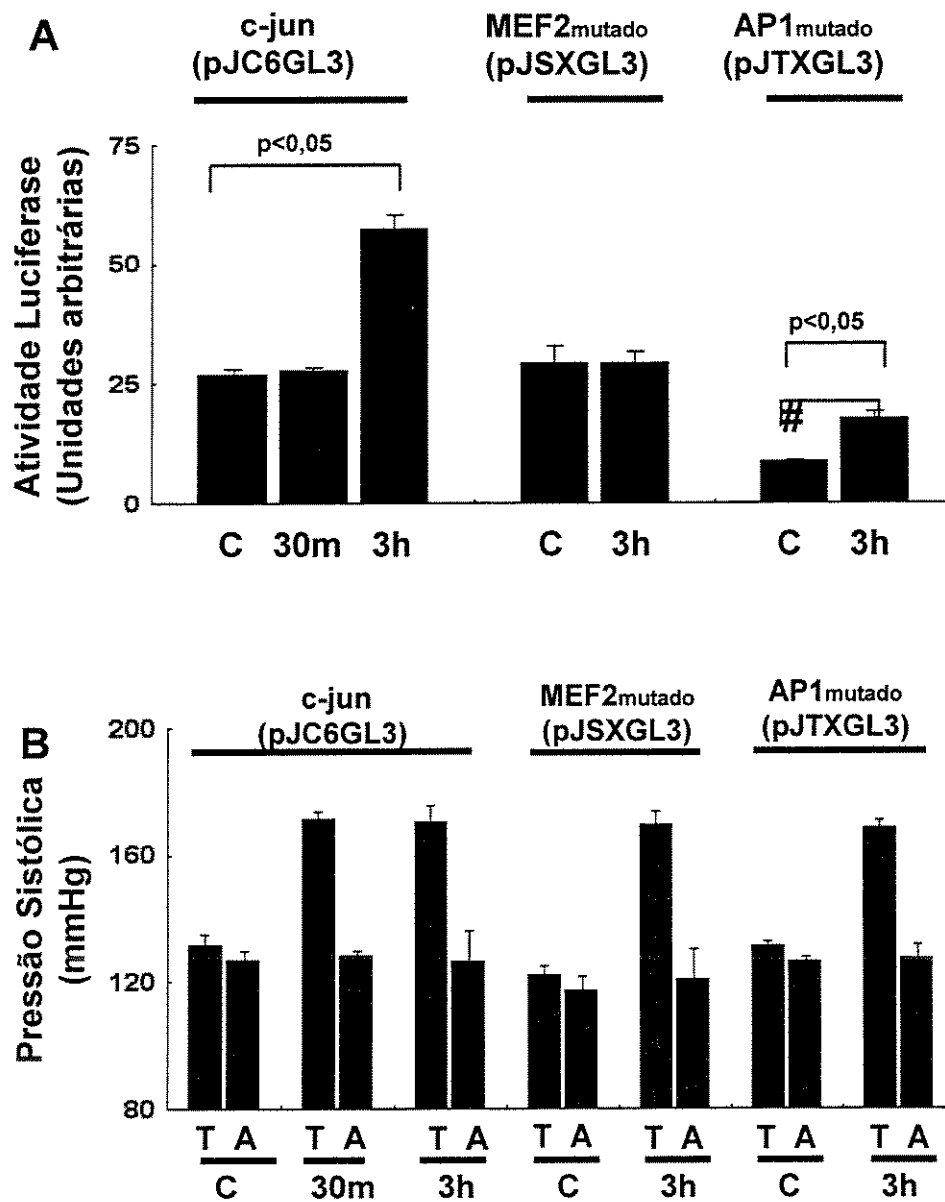


FIGURA 21. A. Valores médios da atividade de luciferase em corações transfectados com genes repórteres do promotor de *c-jun* (n=6). B. Pressão arterial sistólica aferida na aorta ascendente (T) e abdominal (A) dos ratos transfectados. C, controle. # p<0,05 controle-pJTXGL3 comparado a controle-pJC6GL3 e controle-pJSXGL3. * p<0,05.

4.3. ATIVAÇÃO DE C-JUN NO MIOCÁRDIO DE RATOS SUBMETIDO À SOBRECARGA PRESSORA AGUDA.

4.3.1. Efeito da sobrecarga pressora sobre Quinases N-terminal de c-Jun (JNKs).

Para investigar a ativação do fator de transcrição c-Jun mediada por sobrecarga hemodinâmica aguda, avaliamos inicialmente a expressão e fosforilação das JNKs (Quinases N-terminal de c-Jun), que são as quinases que diretamente fosforilam e ativam o c-Jun. Os dados de hemodinâmica dos ratos utilizados nos experimentos a seguir foram agrupados nos valores médios indicados na FIGURA 11. Ensaios de immunoblotting utilizando anticorpo anti-JNK demonstraram que as frações citosólica e nuclear de ventrículos esquerdos de ratos adultos expressam ambas isoformas JNK1 e JNK2. A análise por centrifugação diferencial nos permitiu concluir que JNK1 e JNK2 eram respectivamente 8,2 e 12,5 vezes mais expressas na fração citosólica em comparação com a fração nuclear de homogenatos cardíacos obtidos de ratos controle (FIGURA 22). Translocação nuclear significativa de JNK1 foi observada após 10 minutos de coarctação da aorta, conforme indicado pelo aumento na quantidade desta proteína detectado na fração nuclear e por sua diminuição na fração citosólica. Baseados nestes dados, estimamos a translocação nuclear de JNK1 em 23% (FIGURA 22B). A redistribuição de JNK1 foi então avaliada por análise imunohistoquímica de cortes de ventrículos esquerdos. Em corações controle, a imunomarcagem de JNK foi encontrada principalmente no citosol de miócitos cardíacos (FIGURA 23A). Em animais submetidos a 10 minutos de sobrecarga pressora, uma forte marcação foi observada em núcleos de miócitos cardíacos, corroborando com os resultados de immunoblotting (FIGURA 23B).

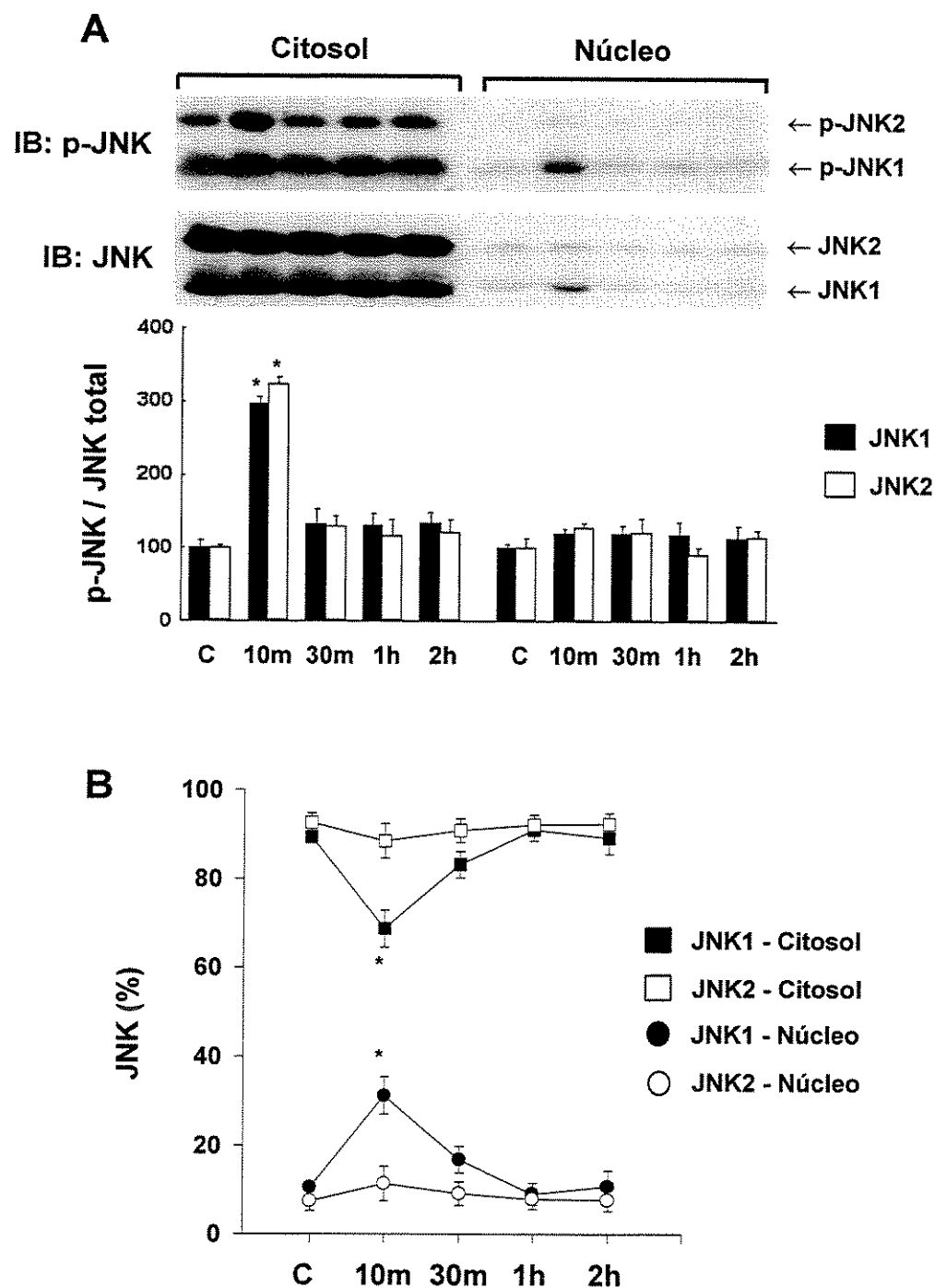


FIGURA 22. A. Experimentos de imunoblotting representativos da expressão da forma ativa de JNKs (p-JNKs) e da quantidade total de JNKs e valores médios da atividade de JNKs nas frações citosólica e nuclear de ventrículos esquerdos de ratos (n=6). B. Gráfico representativo da expressão de JNK1 e JNK2 nas subfrações miocárdicas durante o período experimental. IB, imunoblotting; C, controle. * $p < 0,05$.

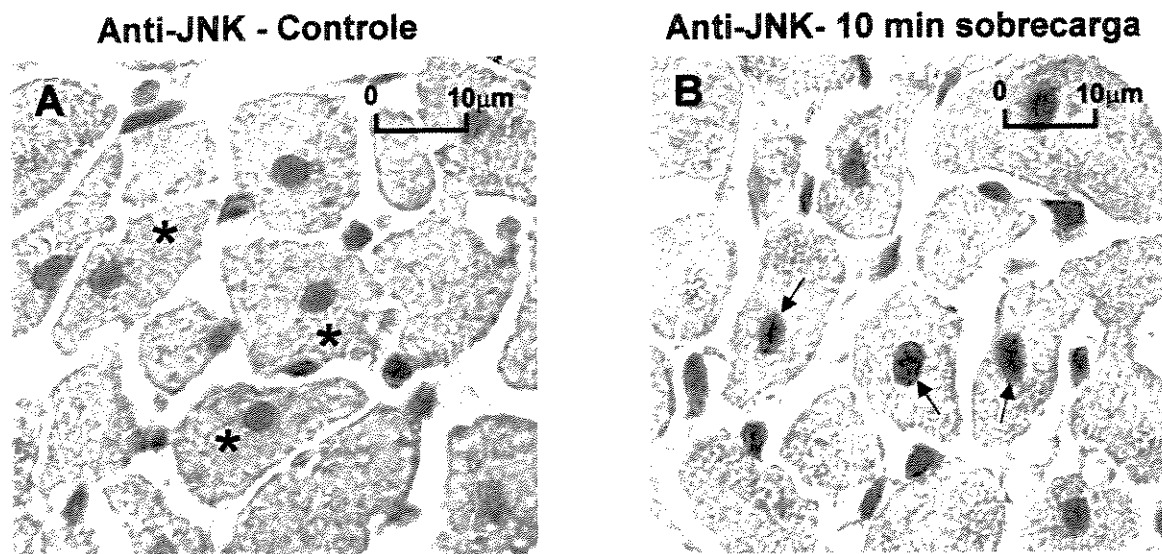


FIGURA 23. A. Distribuição miocárdica de JNK em corações controle mostrando imunomarcção difusa no sarcoplasma (marcação amarela – asterisco). B. Localização de JNK no miocárdio submetido a 10 minutos de sobrecarga pressora. Intensa marcação de JNK foi detectada em núcleos de miócitos cardíacos (marcação marrom- setas).

A ativação das isoformas de JNKs por sobrecarga pressora foi avaliada através do uso de um anticorpo específico contra as formas fosforiladas destas quinases (FIGURA 22A). Sob condições basais, encontramos JNKs ativadas principalmente na fração citosólica do miocárdio de ratos. A sobrecarga pressora induziu a um aumento intenso, porém breve, na fosforilação de JNK1 (~3 vezes) e JNK2 (~3,2 vezes) na fração citosólica após 10 minutos de coarctação da aorta. Este evento foi acompanhado por um aumento na intensidade da banda fosforilada de JNK1 na fração nuclear. Contudo, a razão entre a intensidade das bandas de JNK1 fosforilada / JNK1 total não se alterou, indicando que o aumento na fosforilação de JNK1 na fração nuclear após 10 minutos de coarctação foi consequente à translocação nuclear de JNK1 fosforilada. Por outro lado, embora JNK2 tenha apresentado uma ativação marcante na fração citosólica, não detectamos fosforilação significativa desta isoforma na fração nuclear.

4.3.2. Efeito da sobrecarga pressora sobre a fosforilação e distribuição subcelular de c-Jun.

Para estudar a ativação de c-Jun por sobrecarga hemodinâmica, avaliamos inicialmente a expressão de c-Jun nas subfrações citosólica e nuclear do miocárdio de ratos (FIGURA 24A). Experimentos de immunoblotting demonstraram que o fator de transcrição c-Jun era discretamente expresso em ambas frações citosólica e nuclear em corações de ratos controle. Entretanto, um aumento marcante na expressão de c-Jun foi observado na fração citosólica (~3 vezes) após 10 minutos e na fração nuclear (~4,1 vezes) após 10 e 30 minutos de coarctação da aorta. A localização de c-Jun foi avaliada por imunohistoquímica, conforme demonstrado previamente na FIGURA 20. Em corações controle, uma marcação discreta de c-Jun foi detectada no citosol de miócitos cardíacos (FIGURA 20A). Os animais coarctados por 10 minutos apresentaram um aumento marcante da imunomarcação de c-Jun no citosol e núcleo de miócitos cardíacos (FIGURA 20B), o que estava de acordo com os ensaios de immunoblotting das subfrações celulares.

A atividade de transcrição (ou transativação) de c-Jun pode ser estimulada através da fosforilação de um resíduo de serina localizado na posição 63 por JNKs (SMEAL et al., 1994). Estudos de immunoblotting utilizando um anticorpo específico contra c-Jun fosforilado em Serina-63 revelaram um aumento (~3,5 vezes) na quantidade de c-Jun fosforilado após 10 minutos de sobrecarga hemodinâmica na fração nuclear de ventrículos esquerdos (FIGURA 24B). Por outro lado, não foram detectados aumentos significativos na fosforilação de c-Jun na fração citosólica durante o período experimental. Como a fosforilação de c-Jun mediada por JNK foi temporal e espacialmente concomitante à

ativação nuclear de JNK1, estes dados indicam que esta quinase é responsável pela ativação de c-Jun induzida por sobrecarga pressora no miocárdio de ratos.

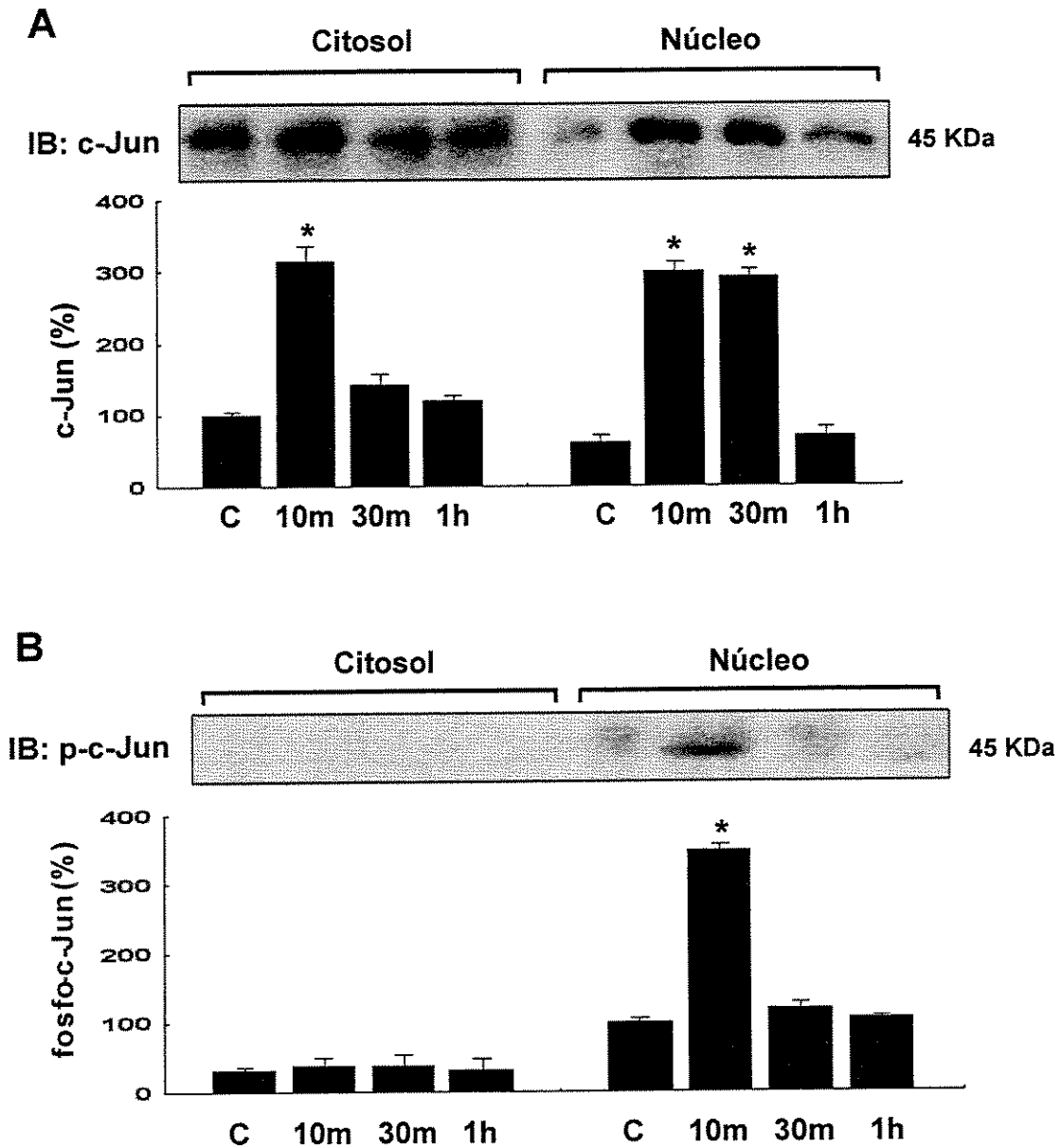


FIGURA 24. Experimentos de immunoblotting representativos e valores médios (n=6) da expressão da **A.** quantidade total de c-Jun; e da **B.** forma ativa de c-Jun (p-c-Jun) nas frações citosólica e nuclear de ventrículos esquerdos de ratos. IB, immunoblotting; C, controle. * $p < 0,05$.

4.3.3. Papel de c-Jun na ativação do complexo AP1 no miocárdio submetido à sobrecarga pressora aguda.

c-Jun é um dos principais componentes do complexo de fatores de transcrição AP1 (KARIN et al., 1997). Neste contexto, investigamos se o aumento na expressão/fosforilação de c-Jun induzido por sobrecarga pressora pode regular a ativação do complexo AP1. O efeito da sobrecarga hemodinâmica aguda sobre a ativação de AP1 foi avaliado por análise de “gel shift” de extratos nucleares de ventrículos esquerdos. Neste ensaio, estudamos a interação entre proteínas do extrato nuclear e um oligonucleotídeo (sonda) de dupla fita marcada com ^{32}P contendo a sequência de consenso de DNA reconhecida por AP1 (FIGURA 25). Os experimentos de “gel shift” demonstraram um aumento consistente na afinidade de AP1 pelo DNA após 10 e 30 minutos de sobrecarga pressora sustentada (FIGURA 25A). Esta ativação do complexo AP1 foi paralela ao aumento na expressão de c-Jun no núcleo de miócitos cardíacos induzido por coarctação da aorta. A especificidade da ligação da sonda de DNA por AP1 foi comprovada em estudos de competição com oligonucleotídeos frios (não marcados com ^{32}P). A incubação do extrato nuclear com um excesso de sonda fria específica para AP1 inibiu a afinidade do extrato pela sonda de AP1 marcada com ^{32}P (FIGURA 25A).

Nós então avaliamos o papel de c-Jun na ativação de AP1 no miocárdio de ratos submetido à sobrecarga pressora através de ensaios de “supershift” com anticorpo anti-c-Jun utilizando extratos nucleares de animais submetidos a 30 minutos de coarctação da aorta (FIGURA 25B). A intensidade da banda correspondente ao complexo proteína-DNA diminuiu quando a mistura de reação continha o anticorpo anti-c-Jun mas não a imunoglobulina não-imune. Por outro lado, a incubação prévia com o anticorpo anti-fosfo-

c-Jun (anti-p-c-Jun) não afetou a intensidade da banda correspondente ao complexo proteína-DNA. De maneira geral, estes dados demonstram que c-Jun é um dos principais componentes do complexo AP1 ativado por sobrecarga pressora aguda e indicam que este evento é independente da fosforilação de c-Jun na serina 63.

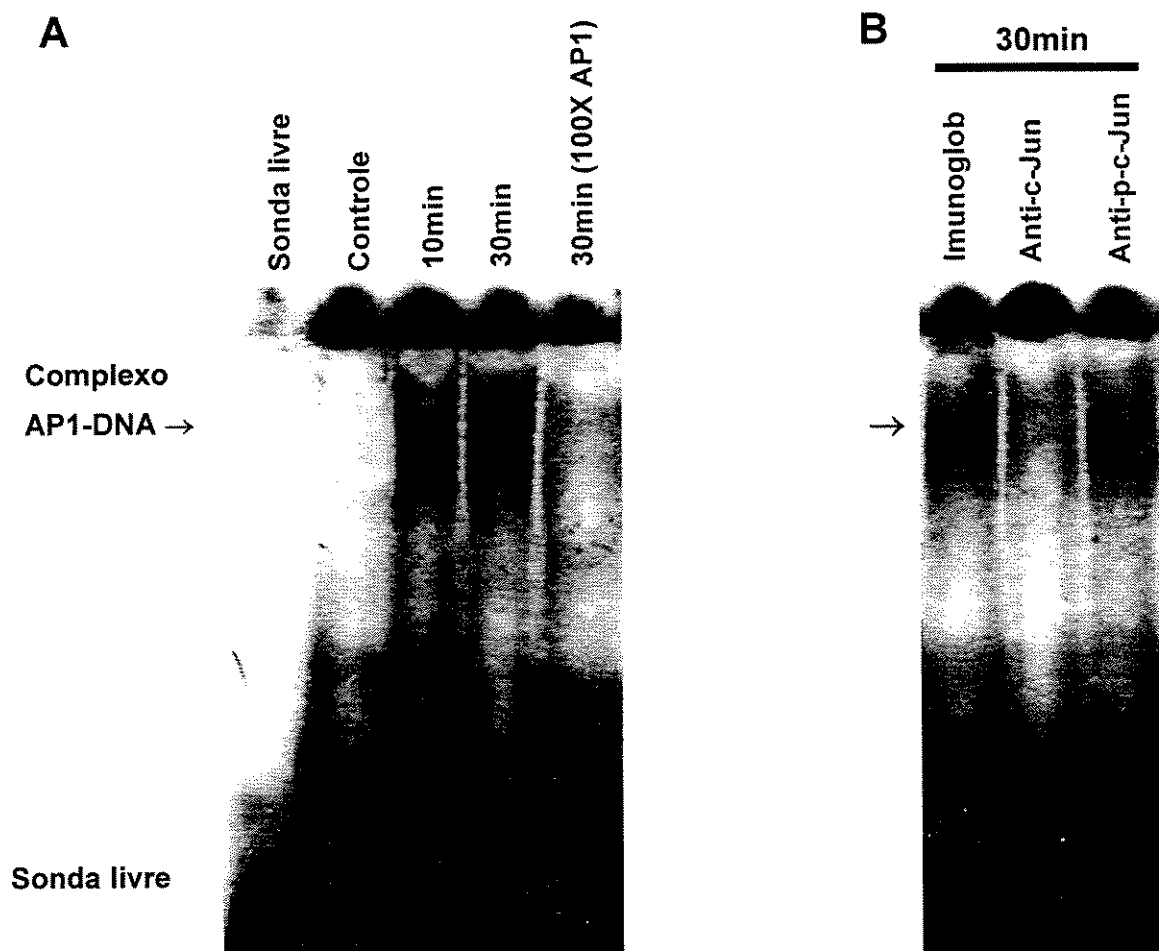


FIGURA 25. “Gel shift” de extratos nucleares de ventrículos esquerdos utilizando sonda de DNA reconhecida por AP1 (representativo de 3 experimentos). **A.** A especificidade da reação foi determinada por específica (excesso de 100 vezes de sonda para AP1 fria). **B.** “Supershift” de extratos nucleares de ventrículos esquerdos de animais coarctados por 30 minutos utilizando imunoglobulina não imune (Imunoglob), anticorpo anti-c-Jun e anticorpo anti-fosfo-c-Jun (anti-p-c-Jun).

4.4. REGULAÇÃO DO PROMOTOR DO *C-JUN* EM MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO COM FENILEFRINA

Estendemos a análise da regulação do promotor de *c-jun* por MEF2 e ERK5 para Miócitos Ventriculares de Ratos Neonatos (MVRNs) submetidos a estímulo hipertrófico com fenilefrina. Este modelo é reconhecido por mimetizar o padrão de expressão gênica que ocorre na hipertrofia miocárdica por sobrecarga pressora *in vivo* e tem sido extensivamente utilizado para estudar mecanismos de sinalização celular em miócitos cardíacos durante este processo (YAMAZAKI et al., 1998). Conforme observado na FIGURA 26, MVRNs transfectados com o promotor selvagem do *c-jun* apresentaram um aumento de 2 vezes na atividade de luciferase (relação entre a atividade de luciferase de *firefly* / *renilla*) após 3 horas de tratamento com fenilefrina. A mutação que inativa o sítio MEF2 aboliu o aumento da atividade do promotor induzido por fenilefrina. Por outro lado, o aumento da atividade de luciferase foi encontrado nos MVRNs transfectados com o promotor de *c-jun* mutado no sítio AP1. Entretanto, observamos que as atividades basais dos plasmídeos mutados nos sítios MEF2 e AP1 estavam diminuídas (~50 vezes) em comparação com a atividade basal observada nos MVRNs transfectados com o promotor selvagem de *c-jun*. Em geral, os resultados dos ensaios de gene reporter obtidos em cultura de MVRNs foram similares àqueles obtidos nos animais submetidos à coarctação da aorta e confirmaram a importância do elemento MEF2 na transcrição de *c-jun* em resposta a estímulos hipertróficos. O papel da ERK5 na ativação do promotor do *c-jun* induzida por fenilefrina foi avaliada pela transfecção dos MVRNs com oligodeoxinucleotídeo (ODN) ERK5-antisense. Conforme demonstrado na FIGURA 27, a transfecção com ERK5-antisense inibiu a ativação do promotor de *c-jun* por fenilefrina, indicando uma ação central

da ERK5 na ativação do promotor do *c-jun* induzido por tratamento com agonistas hipertróficos. Por outro lado, o tratamento com ODN ERK5-senso não produziu alterações significativas na atividade do promotor do *c-jun* em comparação com células não transfectadas com ODNs. Para confirmar a inibição da expressão de ERK5 pelo ERK5-antisenso, realizamos experimentos de immunoblotting e imunohistoquímica com microscopia confocal a *laser*. A FIGURA 28 mostra que o tratamento com ERK5-antisenso seletivamente inibiu a expressão de ERK5 (em ~72%), mas não modificou a expressão de MEF2 e p38 em MVRNs. A análise imunohistoquímica com anticorpos anti-ERK5 e MEF2 demonstrou resultados similares aos de immunoblotting e também revelou que a integridade geral das células não foi modificada pela transfecção com antisenso, conforme análise da marcação com faloidina (FIGURA 29). Em conjunto, estes dados indicam que o efeito do antisenso foi específico sobre ERK5 e que este procedimento não alterou a viabilidade dos MVRNs.

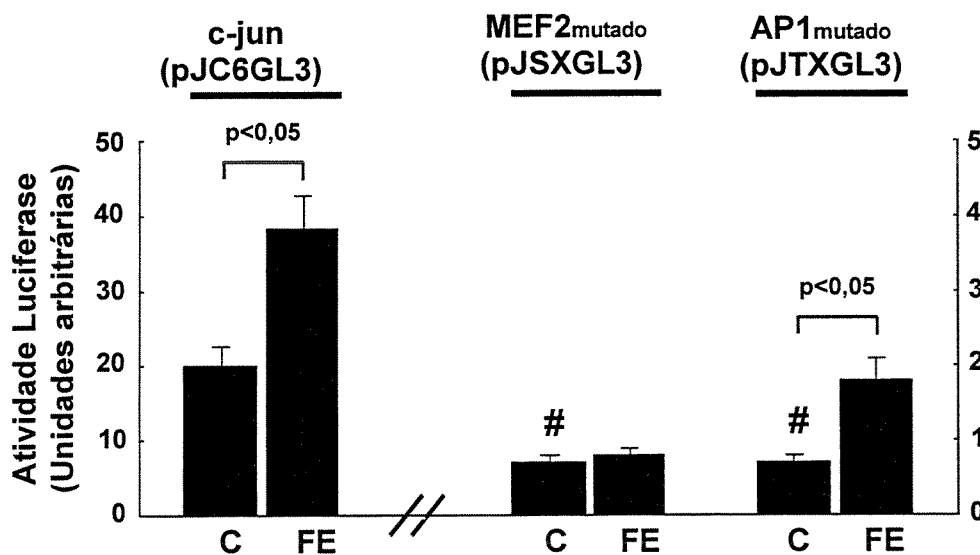


FIGURA 26. Valores médios (n=4) da atividade de luciferase em MVRNs transfectados com genes repórteres do promotor de *c-jun* e tratados com fenilefrina por 3 horas. C, controle; FE, tratados com fenilefrina. # p<0,05 comparado a controle-pJC6GL3.

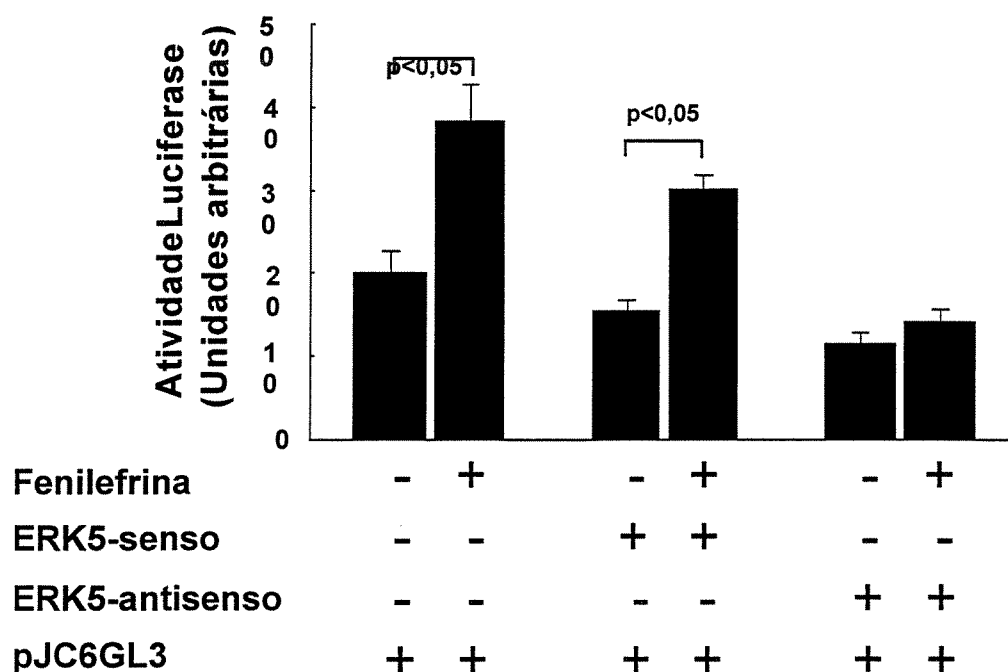


FIGURA 27. Efeito da transfecção de ERK5-antisense e ERK5-senso na ativação do promotor do *c-jun* (pJC6GL3) em MVRNs tratados com fenilefrina.

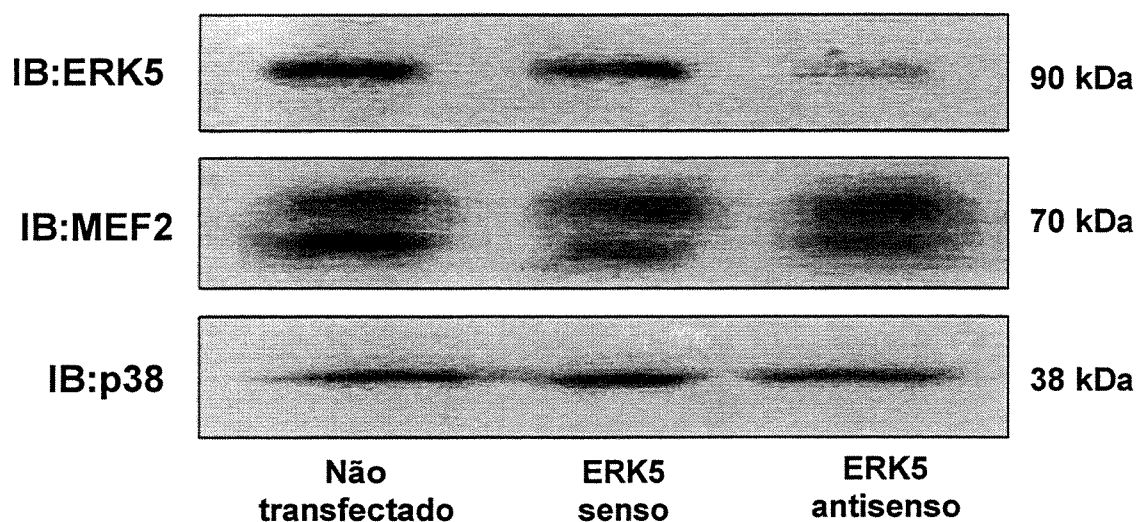


FIGURA 28. Experimentos representativos (n=3) de immunoblotting utilizando anticorpos anti-ERK5, MEF2 e p38 contra extratos de MVRNs não transfectados ou transfectados com ERK5-senso e ERK5-antisense.

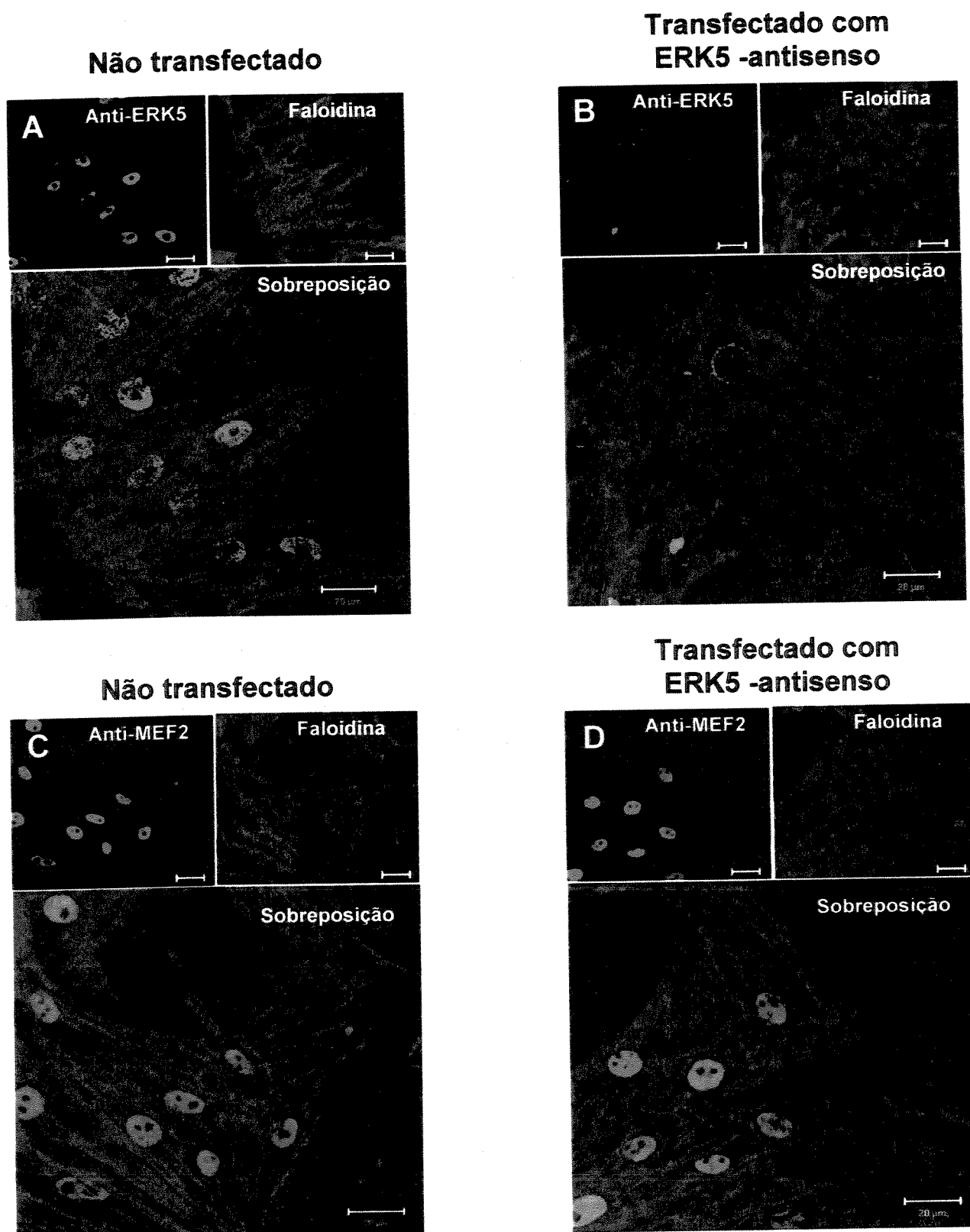


FIGURA 29. Análise imunohistoquímica por microscopia confocal a *laser* de MVRNs não transfectados ou transfectados com ERK5-antisense utilizando dupla marcação com faloidina (vermelho) ou anticorpo anti-ERK5 e anti-MEF2 (verde).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo realizamos experimentos para avaliar a regulação precoce do fator de transcrição c-Jun em miocárdio e miócitos cardíacos isolados de ratos em resposta a estímulos hipertróficos. Demonstramos que: 1) a sobrecarga pressora induz a uma expressão bifásica de c-Jun no miocárdio de ratos adultos; 2) o aumento precoce na expressão de c-Jun no miocárdio de ratos induzido pela sobrecarga pressora é regulado por mecanismos pós-transcrição gênica e, provavelmente, por modificações em sua proteína, enquanto o aumento tardio é regulado por aumento na transcrição gênica; 3) a expressão de c-Jun induzida por sobrecarga pressora é acompanhada por um aumento na fosforilação no resíduo de serina-63 induzida por JNK e por um aumento na ligação deste fator de transcrição com o DNA; 4) os fatores de transcrição da família MEF2 são fundamentais para a transcrição e consequente expressão de *c-jun* induzida por sobrecarga pressora e em miócitos cardíacos isolados estimulados com fenilefrina; 5) a serina-treonina-quinase ERK5 é precocemente ativada, fosforila fatores de transcrição da família MEF2 no miocárdio de ratos submetido à coarctação da aorta e é importante para a transcrição de *c-jun* em miócitos cardíacos estimulados com fenilefrina.

5.1. REGULAÇÃO DE c-JUN POR ESTÍMULOS HIPERTRÓFICOS

O aumento rápido na expressão dos *genes de expressão imediata* é uma característica fundamental da resposta de miócitos cardíacos a estímulos hipertróficos (KOMURO & YAZAKI, 1993; YAMAZAKI et al., 1998). Apesar de a ativação destes genes ser tipicamente limitada ao período inicial da resposta a estímulos hipertróficos, estudos recentes indicam que a atividade das proteínas que codificam é fundamental para o

desenvolvimento completo da hipertrofia cardíaca (XIAO et al., 2001; OMURA et al., 2002).

No presente estudo, investigamos inicialmente a expressão de c-Jun em ventrículo esquerdo de ratos submetido à sobrecarga pressora. Análises realizadas com RT-PCR e immunoblotting de homogenatos cardíacos demonstraram um aumento bifásico na expressão de RNA mensageiro e da proteína c-Jun, com um pico precoce após 10 minutos e um pico tardio após 2 horas de sobrecarga hemodinâmica. Por outro lado, a análise dos cortes de miocárdio marcados com anticorpo anti-c-Jun revelou que o aumento na expressão de c-Jun induzido por coarctação da aorta ocorreu predominantemente em miócitos cardíacos, indicando que a regulação da expressão de c-Jun por estímulo mecânico do miocárdio ocorre preferencialmente neste tipo celular.

A caracterização da expressão do c-Jun em dois picos não havia sido previamente descrita, mas estudos anteriores demonstraram um padrão similar de expressão de outros *genes de expressão imediata* (e.g. *c-fos* e *c-myc*), em resposta à sobrecarga pressora (KOMURO et al., 1988). A importância deste padrão de expressão gênica para a resposta hipertrófica miocárdica ainda é desconhecida, porém, a expressão mais tardia dos *genes de expressão imediata* pode contribuir diretamente para a regulação de genes que codificam proteínas marcadoras do fenótipo de hipertrofia cardíaca, como a alfa-actina-esquelética o fator natriurético atrial (BISHOPRIC et al., 1992; CORNELIUS et al., 1997).

Em experimentos realizados com expressão de gene reporter (promotor do *c-jun* fundido ao gene da luciferase), avaliamos a regulação da expressão de c-Jun em ventrículo esquerdo de ratos submetidos à coarctação da aorta. Os resultados desses experimentos com gene reporter *in vivo* indicaram que a coarctação da aorta por 30 minutos não provoca modificações na atividade do promotor de *c-jun*. Apesar de não termos detectado aumento

na transcrição de *c-jun* após 30 minutos de coarctação, observamos que o primeiro pico de aumento da proteína c-Jun foi acompanhado por um aumento paralelo de seu RNA mensageiro. Estes resultados sugerem que a sobrecarga pressora pode ter induzido a uma diminuição da degradação do RNA mensageiro de c-Jun, caracterizando uma regulação pós-transcrição gênica na expressão desta proteína. Embora estudos anteriores tenham demonstrado que mecanismos pós-transcrição podem ser importantes para a expressão de c-Jun (MORELLO et al., 1990; SHERMAN et al., 1990), nossos resultados são os primeiros a indicar que esta regulação também ocorre em miócitos cardíacos.

Por outro lado, o primeiro pico de expressão de c-Jun em resposta à sobrecarga pressora pode estar relacionada ao aumento de sua meia-vida. Esta hipótese é fortalecida pelos resultados que demonstraram aumento significativo de c-Jun fosforilado em serina-63 na fração nuclear de ventrículos esquerdos após 10 minutos de coarctação. A fosforilação deste resíduo inibe a degradação do fator de transcrição c-Jun pelo sistema ubiquitina/proteasoma, o que resultaria em aumento na sua expressão (KARIN et al., 1997). Contudo, este mecanismo não explicaria o aumento na quantidade de c-Jun na fração citosólica após 10 minutos e na fração nuclear após 30 minutos de sobrecarga pressora. Assim, pode-se sugerir que a sobrecarga hemodinâmica aguda induziu a um aumento precoce na expressão de c-Jun no miocárdio de ratos principalmente por ativar mecanismos pós-transcrição gênica, sendo também possível a contribuição de modificações na proteína c-Jun.

O segundo pico de expressão de *c-jun*, observado após 2 horas de coarctação de aorta representa, provavelmente, o resultado da ativação da transcrição de *c-jun*, como sugerido pelo fato de que a sobrecarga pressora com duração de 3 horas foi acompanhada por aumento na atividade do gene reporter contendo o promotor selvagem de *c-jun*.

Através de construções utilizadas para ensaios de gene reporter contendo mutações específicas no promotor de *c-jun*, caracterizamos quais os elementos envolvidos na regulação de sua transcrição mediada por sobrecarga pressora. A mutação que aboliu a ligação ao elemento AP1 não afetou o aumento na atividade do promotor de *c-jun* induzido pela sobrecarga pressora, embora tenha sido acompanhada por uma redução de ~3 vezes na atividade basal do promotor. Estes resultados sugerem que o elemento AP1 é importante para a transcrição basal, mas não para aquela induzida por sobrecarga pressora em corações de ratos. Por outro lado, a mutação que inibiu a ligação de MEF2 aboliu o aumento na atividade do gene reporter induzida por coarctação da aorta, indicando que MEF2 é essencial para a ativação da transcrição de *c-jun* por sobrecarga pressora.

Os experimentos realizados em miócitos ventriculares de ratos neonatos tratados com fenilefrina estenderam nossas observações para miócitos cardíacos e confirmaram os resultados obtidos *in vivo*, demonstrando que o elemento MEF2 é fundamental para a transcrição de c-Jun em resposta ao estímulo hipertrófico com fenilefrina. Por outro lado, a transcrição basal de c-Jun em miócitos ventriculares de ratos neonatos isolados foi influenciada tanto pelo sítio MEF2 quanto pelo AP1, o que diferiu dos resultados dos experimentos *in vivo* que revelaram a importância apenas do sítio AP1. Embora a razão para esta discrepância não seja conhecida, ela poderia ser explicada pelas diferenças nos estímulos basais aos quais estão expostos miócitos cardíacos *in vitro* e ventrículos esquerdos *in situ*.

Embora os nossos resultados não demonstrem diretamente que mudanças na função da proteína MEF2 interferiram na expressão de *c-jun*, há demonstrações que os resultados obtidos com a inativação dos fatores de transcrição MEF2 são equivalentes àqueles obtidos com inativação do elemento MEF2 contido no promotor de *c-jun* (HAN & PRYWES,

1995; KATO et al., 2000; SUZUKI et al., 2002). Portanto, nossos resultados indicam que o sítio MEF2 do promotor de *c-jun* e, provavelmente, os fatores de transcrição da família MEF2 são importantes reguladores da expressão de *c-jun* nos miócitos cardíacos em resposta a estímulos hipertróficos. Estes dados estão de acordo com estudos prévios em células HeLa, fibroblastos, linfócitos T, células C2C12 e miócitos vasculares que demonstraram dependência da regulação da transcrição de *c-jun* pela ativação de MEF2 (HAN & PRYWES, 1995; COSO et al., 1997; SHIN & HAN, 1999; ANDREUCCI et al., 2002; SUZUKI et al., 2002).

A sobrecarga hemodinâmica aguda promove aumentos precoces na expressão do RNA mensageiro de *c-jun* e induz à fosforilação de c-Jun em homogenatos de corações submetidos à sobrecarga hemodinâmica aguda (SCHUNKERT et al., 1991; ROCKMAN et al., 1991; FISCHER et al., 2001). No presente estudo demonstramos que o aumento da expressão de c-Jun em ventrículo esquerdo submetido à sobrecarga pressora ocorre preferencialmente em miócitos cardíacos. Além disto, demonstramos que este evento é inicialmente acompanhado por uma maior fosforilação de c-Jun no resíduo de serina-63, que é característico do aumento da atividade de transcrição gênica (ou transativação) deste fator de transcrição (DERIJARD et al., 1994; SMEAL et al., 1994). Estes resultados estão de acordo com aqueles de estudos mais recentes que demonstraram que o aumento na expressão de c-Jun em resposta à estimulação com endotelina e fenilefrina é concomitante ao aumento na fosforilação deste fator mediada por JNKs (CLERK et al., 2002).

Os efeitos do aumento da expressão/fosforilação de c-Jun sobre sua afinidade pelo DNA (ou atividade de ligação com o DNA) em resposta à sobrecarga pressora também foram investigadas em nosso estudo. Em ensaios de “gel shift”, confirmamos observações anteriores (FISCHER et al., 2001) de que a ligação do complexo AP1 com o DNA aumenta

precocemente em extratos nucleares de ventrículos esquerdos submetidos à sobrecarga pressora.

Experimentos de “supershift”, utilizando extratos nucleares de ventrículos esquerdos obtidos de animais coarctados por 30 minutos, revelaram que a incubação com o anticorpo anti-c-Jun, mas não o anti-fosfo-c-Jun, diminuiu a intensidade do complexo AP1-DNA. Estes resultados indicam que a fosforilação de c-Jun em serina-63 não foi determinante para o aumento da ligação de AP1 com o DNA, o que está de acordo com demonstrações prévias de que a fosforilação de c-Jun no resíduo de serina-63 não modifica a atividade de ligação deste fator de transcrição com o DNA (KARIN et al., 1995). Por outro lado, os resultados de “supershift” utilizando o anticorpo anti-c-Jun forneceram evidências inéditas de que o c-Jun é um dos principais componentes do complexo AP1 ativado por sobrecarga pressora aguda. É interessante notar que o aumento da ligação de AP1/c-Jun com o DNA foi concomitante ao aumento na expressão de c-Jun no núcleo de miócitos cardíacos de ventrículos esquerdos submetidos à sobrecarga pressora. Como nos ensaios de “gel shift” foram utilizados extratos nucleares de ventrículo esquerdo, podemos especular que o aumento na expressão de c-Jun induzido por sobrecarga pressora pode estar envolvido na regulação da atividade de ligação do complexo AP1 em miócitos cardíacos. Em concordância com nossas observações, estudos realizados em outros modelos experimentais demonstraram que o aumento na expressão de c-Jun está associado a um aumento na ligação do complexo AP1 com o DNA (CASTELAZZI et al., 1990; WANG et al., 1999).

De maneira geral, nossos resultados são compatíveis com a hipótese de que o aumento concomitante da expressão e fosforilação de c-Jun no miocárdio submetido à sobrecarga pressora pode levar a um incremento sinérgico da ligação com o DNA e na

atividade de transcrição gênica deste fator, promovendo a amplificação de seus efeitos na regulação gênica.

5.2. ATIVAÇÃO DE MEF2 POR ESTÍMULOS HIPERTRÓFICOS

Os fatores de transcrição da família MEF2 são reconhecidos como reguladores da expressão de várias proteínas cardíacas (BLACK & OLSON, 1998; KOLODZIEJCZYK et al., 1999; NAYA et al., 2002). Além disto, há demonstrações de que membros desta família encontram-se ativados em modelos crônicos de hipertrofia cardíaca (MOLKENTIN & MARKHAM, 1993; DOUD ET AL., 1995; KOLODZIEJCZYK et al., 1999; PASSIER et al. 2000), sendo este fato, geralmente, correlacionado com a regulação de genes músculo-específicos. Entretanto, a contribuição dos fatores MEF2 na regulação gênica precoce em resposta a estímulos hipertróficos em miocárdio e miócitos cardíacos era desconhecida. No presente trabalho, através dos ensaios de “gel shift” de extratos nucleares demonstramos que a sobrecarga pressora aguda induz a um aumento precoce na afinidade de MEF2 pelo DNA. Por outro lado, ensaios com gene reporter do promotor de *c-jun* revelaram que a atividade de transcrição gênica de MEF2 está precocemente aumentada no miocárdio e em miócitos cardíacos de ratos submetidos respectivamente à sobrecarga pressora e ao tratamento com fenilefrina, respectivamente.

Os experimentos de imunoblotting e imunohistoquímica realizados no presente estudo demonstraram que a quantidade de MEF2 não se alterou após sobrecarga pressora aguda e que este fator localiza-se constitutivamente no núcleo de miócitos cardíacos. Por outro lado, os ensaios de “gel shift” revelaram um aumento na afinidade de MEF2 pelo DNA nos extratos nucleares de ventrículos esquerdos que se correlacionou com o curso

temporal de coarctação de aorta. A abolição da afinidade pelo DNA pelo tratamento com fosfatase indica que este fenômeno é dependente do nível de fosforilação do extrato nuclear. Portanto, estes resultados indicam que modificações nas proteínas MEF2, presumivelmente a fosforilação em resíduos de serina e treonina, estão envolvidas na ativação de MEF2 por sobrecarga hemodinâmica.

Foram descritas três classes de proteínas quinases ativadoras de MEF2, a saber: Caseína Quinase II, Calmodulina Quinase e as MAPKs (MOLKENTIN et al., 1996; BLACK & OLSON, 1998; MCKINSEY et al., 2002). A Caseína Quinase II fosforila um resíduo conservado de serina na posição 59 das proteínas MEF2. A fosforilação deste resíduo pela Caseína Quinase II aumenta dramaticamente a ligação de MEF2C pelo DNA (MOLKENTIN et al., 1996). Contudo, este sítio geralmente apresenta fosforilação constitutiva *in vivo*, não parecendo ser importante na regulação deste fator por estímulos extracelulares (BLACK & OLSON, 1998).

A Calmodulina Quinase é capaz de fosforilar MEF2D, resultando em um aumento na sua atividade de transativação (BLAESER et al., 2000). Entretanto, há demonstrações de que a Calmodulina Quinase também ativa diversas isoformas de MEF2 por mecanismos que não envolvem a fosforilação destes fatores (LU et al., 2000; BLAESER et al., 2000). Neste sentido, estudos recentes indicaram que o principal mecanismo pelo qual a Calmodulina Quinase ativa MEF2 é através da inibição de sua interação com as Deacetilases de Histonas Classe II (HDACs), que normalmente mantêm as proteínas MEF2 inativas (MCKINSEY et al., 2000; MCKINSEY et al., 2002).

As proteínas MEF2 apresentam diversos sítios potenciais de interação com MAPKs (BLACK & OLSON, 1998). Entretanto, resultados de estudos em outros tipos celulares demonstraram que apenas as subfamílias p38 e ERK5 fosforilam e ativam MEF2

(MARINISSEN et al., 1999; HAN & MOLKENTIN, 2000). Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que a ativação de componentes das subfamílias p38 e ERK5 também pode determinar a hipertrofia de miócitos cardíacos (WANG et al., 1998; NICOL et al., 2001). Neste contexto, evidências experimentais indicaram que as proteínas MEF2 são alvos da atividade de p38 durante o crescimento cardíaco em um modelo transgênico de hipertrofia miocárdica, assim como durante o crescimento miocárdico fisiológico em camundongos (KOLODZIEJCZYK et al., 1999). Portanto, as evidências disponíveis sugerem que vias reguladas por MAPKs podem constituir um mecanismo de sinalização chave para a ativação de MEF2 no miocárdio.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o período de até 2 horas de sobrecarga pressora não é acompanhado por mudanças detectáveis na ativação de p38 no miocárdio de ratos, sugerindo que a p38 não tem um papel importante na ativação precoce de MEF2 no miocárdio de animais coarctados. Este fato está de acordo com observações prévias que indicaram que a atividade de p38 está mais envolvida na manutenção do fenótipo hipertrófico em longo prazo do que com o início da resposta hipertrófica (SUGDEN & CLERK, 1998).

No entanto, nossos dados contrastam com aqueles de estudo recente que demonstrou uma ativação precoce de p38 no miocárdio de ratos após sobrecarga pressora aguda (FISCHER et al., 2001). As razões para estas discrepâncias não são aparentes, mas diferenças nos modelos experimentais e na intensidade do estímulo poderiam explicá-las. Por exemplo, no presente estudo, os ratos foram submetidos a aumentos de 40 mmHg na pressão sistólica aferida na aorta ascendente, enquanto no estudo em questão foram referidos gradientes sistólicos na aorta ascendente de 100 mmHg. Este estímulo pressor acentuado poderia induzir a uma maior tensão sistólica no miocárdio, com potencial para

desencadear efeitos adicionais tais como isquemia e resposta inflamatória, que reconhecidamente ativam p38 (BOGOYEVITCH et al., 1996; SUGDEN & CLERK, 1998).

Em contraste com a ativação de p38, nossos resultados de atividade quinase e imunohistoquímica demonstraram que ERK5 foi rapidamente ativada e migrou para núcleo de miócitos cardíacos em corações de animais submetidos à coarctação. Além disso, demonstramos que a sobrecarga pressora induziu a uma associação entre ERK5 e MEF2 e que ERK5 imunoprecipitada de corações submetidos à coarctação da aorta apresentou maior capacidade de fosforilar MEF2 *in vitro*. Estes eventos foram paralelos a um aumento da afinidade de MEF2 pelo DNA, dando suporte à idéia de que a ERK5 poderia modular a ativação de MEF2 por sobrecarga pressora aguda.

Por outro lado, os resultados de experimentos de transfecção de MVRNs com ERK5-antisense, demonstraram que ERK5 exerce uma ação central na ativação do promotor de *c-jun* induzida por fenilefrina. Em concordância com este fato, a mutação do elemento MEF2 no promotor do *c-jun* inibiu a ativação induzida por fenilefrina de maneira comparável à transfecção com ERK5-antisense, indicando que a via ERK5-MEF2 encontra-se precocemente ativada em miócitos cardíacos tratados com agonistas hipertróficos. Em conjunto, estes dados indicam que a ERK5 pode ser um elemento crítico na regulação de MEF2 em miócitos cardíacos em resposta a estímulos hipertróficos.

Os dados na literatura indicam que ERK5 pode ativar MEF2 por dois mecanismos possíveis. O primeiro mecanismo seria a fosforilação dos domínios de transativação demonstrada em MEF2A (na serina 355, treonina 312, treonina 319), MEF2C (na serina 387) e MEF2D (na serina 179) por ERK5, levando a um aumento nas atividades de transativação destas isoformas (KATO et al., 1997; YANG et al., 1998; MARINISSEN et al., 1999; KATO et al., 2000). É interessante que a fosforilação dos resíduos de serina e

treonina acima citados contribui para a regulação da expressão de *c-jun* em células C2C12, fibroblastos e células HeLa (KATO et al., 1997; MARINISSEN et al., 1999; KATO et al., 2000). Por outro lado, ERK5 também pode aumentar a atividade de transativação de MEF2 por possuir um domínio em sua proteína, que facilita o recrutamento de fatores de transcrição basais (KASLER et al., 2000). Nossas observações de que a ERK5 fosforila MEF2 *in vitro* e que a ERK5 e MEF2 estão associadas *in vivo* no miocárdio de ratos coarctados sugerem que ambos os mecanismos poderiam estar envolvidos na regulação de MEF2. Contudo, mais experimentos fazem-se necessários para determinar a participação de cada um destes mecanismos, assim como os possíveis resíduos de MEF2 fosforilados por ERK5 no nosso modelo experimental.

No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez que a ERK5 é precocemente ativada em ventrículos esquerdos submetidos à sobrecarga pressora *in vivo*. Embora não tenhamos explorado as vias intracelulares pelas quais a sobrecarga pressora induz à ativação desta quinase, existem indicações de que a ERK5 é ativada em miócitos cardíacos e em corações isolados por diversos estímulos tais como estresse oxidativo, interleucinas, agonistas hipertróficos e estresse mecânico (NICOL et al., 2001). Ainda neste contexto, a ativação miocárdica de ERK5 por estresse oxidativo parece ser estritamente dependente da ativação de p60-src (TAKEISHI et al., 1999). É interessante notar que resultados de estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que proteínas quinases componentes do complexo de adesão focal, tais como a Quinase de Adesão Focal e a p60-src são também rapidamente ativadas no miocárdio submetido a estresse mecânico (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002).

Por outro lado, a demonstração, no presente trabalho, de que a ativação do promotor de *c-jun* por fenilefrina em miócitos ventriculares de ratos neonatos é abolida pela

transfecção com ERK5-antisense sugere que receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos podem estar envolvidos na ativação de ERK5, o que está de acordo com outros estudos que demonstraram ativação de ERK5 por vias de proteínas G acopladas a receptores (NICOL et al., 2001; MARINISSEN et al., 2001).

6. CONCLUSÕES

A Figura 30 apresenta um modelo esquemático das vias de sinalização celular envolvidas na regulação de c-Jun por estímulos hipertróficos, obtido a partir dos resultados do presente estudo. A sobrecarga pressora aguda, por constrição da croça da aorta, induziu a uma expressão bifásica de c-Jun no miocárdio de ratos adultos. O aumento precoce na expressão de c-Jun foi regulado por mecanismos pós-transcrição gênica e, provavelmente, por modificações em sua proteína, enquanto o aumento tardio foi regulado por aumento na transcrição gênica. O aumento na expressão de c-Jun induzido por sobrecarga pressora foi acompanhado de fosforilação no resíduo de serina-63 induzida por JNK e por uma maior afinidade de c-Jun pelo DNA. Os fatores de transcrição da família MEF2 foram fundamentais para a transcrição de *c-jun* induzida por sobrecarga pressora e em miócitos cardíacos isolados estimulados com fenilefrina, enquanto o complexo AP1 contribuiu para a transcrição basal de *c-jun* em miócitos cardíacos *in vivo* e *in vitro*. Ademais, a ERK5 fosforilou MEF2 no miocárdio de ratos submetido à coarctação da aorta e foi essencial para a transcrição de *c-jun* em miócitos cardíacos estimulados com fenilefrina.

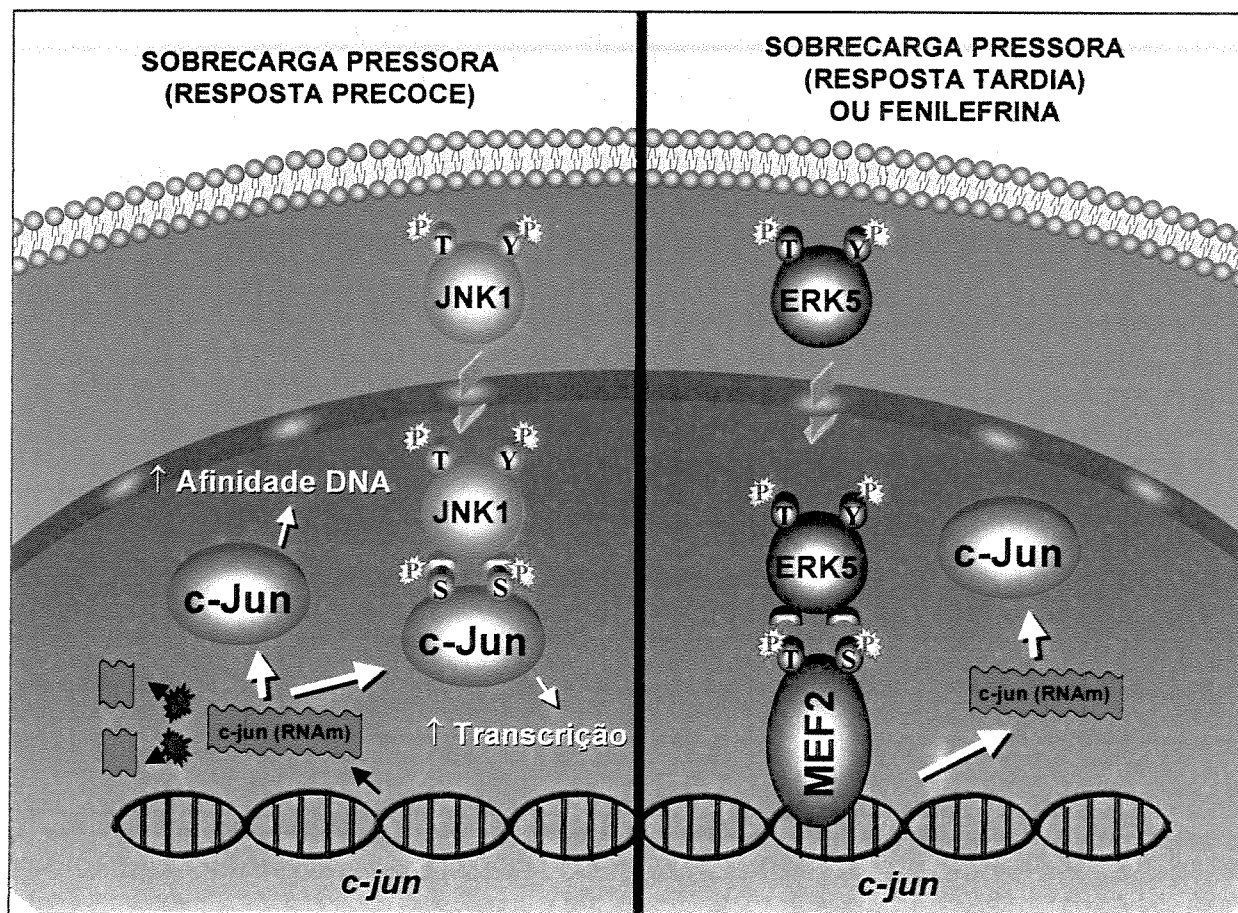


FIGURA 30. Modelo proposto da regulação da expressão e ativação de c-Jun em miócitos cardíacos por estímulos hipertróficos

De maneira geral, os resultados do presente estudo indicam que os aumentos na expressão e fosforilação de c-Jun atuam como mecanismos sinérgicos para a ativação deste fator de transcrição no miocárdio submetido à sobrecarga pressora. Por outro lado, os fatores de transcrição da família MEF2 emergem como importantes reguladores da ativação de *genes de expressão imediata* e, portanto, de coordenação da expressão de genes regulatórios durante o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Este achado sugere que as proteínas MEF2 podem ser alvos potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas na hipertrofia e remodelamento miocárdicos.

7. SUMMARY

The early expression of *immediate early genes* is a fundamental feature of myocardial hypertrophy. The immediate early gene *c-jun* codifies a transcription factor that has been assigned to be an important regulator of the hypertrophic response in cardiac myocytes.

In the present study we investigated whether pressure overload or phenylephrine treatment stimulated MEF2-dependent transcriptional activation of *c-jun* in cardiac myocytes. Western blotting and immunohistochemistry analysis of rat myocardium demonstrated that MEF2 is highly expressed in the rat heart and is predominantly located at nuclei of cardiac myocytes. Gel shift assays of myocardial nuclear extracts revealed a consistent DNA binding activation of MEF2 after 1 and 2 hours of pressure overload. We further show that pressure overload induced a progressive nuclear translocation and activation of ERK5. Co-immunoprecipitation and *in vitro* kinase assays indicated that the activation of ERK5 was paralleled by increased association ERK5/MEF2 and by enhanced ability of ERK5 to phosphorylate MEF2. Experiments with *in vivo* transfection of left ventricle with *c-jun* promoter reporter gene showed that pressure overload induced a consistent increase of *c-jun* transcriptional activity in the rat myocardium. Rendering the MEF2 site of the *c-jun* plasmid inactive by mutation abolished the load-induced activation of *c-jun* promoter reporter gene. Mutation of MEF2 site also abolished the phenylephrine-induced *c-jun* promoter activation in neonatal rat ventricular myocytes (NRVM). In addition, we demonstrated that NRVM transfection with ERK5 antisense oligodeoxynucleotide inhibited the phenylephrine-induced *c-jun* promoter activation. These findings identify MEF2 as a potential regulator of *c-jun* transactivation and suggest that ERK5 might be an important mediator of MEF2 and *c-jun* promoter activation in response to hypertrophic stimuli in cardiac myocytes.

In addition to studying the regulation of c-Jun expression, we also investigated the activation of this transcription factor in the overloaded myocardium. Immunoblotting of subcellular fractions and immunohistochemistry assays demonstrated that pressure overload induced a parallel increase in c-Jun expression and in serine-63-phosphorylation in nuclei of cardiac myocytes. We also observed that load-induced c-Jun phosphorylation was concomitant to JNK1 phosphorylation and translocation to cardiac myocytes nuclei. Moreover, gel shift assays revealed that pressure overload promoted an increase in c-Jun DNA-binding activity, which correlated with the increase in c-Jun expression. These results show that c-Jun is regulated by a combination of increased expression and phosphorylation and indicate that the synergism of these effects might act as a mechanism to amplify c-Jun activity in the overloaded myocardium.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, J.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, M.; LEE, J.D.; BERK, B.C. - c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. **J Biol Chem.** 272:20389-20394, 1997.
- ADOLPH, E.A.; SUBRAMANIAM, A.; CSERJESI, P.; OLSON, E.N.; ROBBINS, J. - Role of myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) in transcriptional regulation of the alpha-cardiac myosin heavy chain gene. **J Biol Chem.** 268:5349-5352, 1993.
- AMACHER, S.L.; BUSKIN, J.N.; HAUSCHKA, S.D. - Multiple regulatory elements contribute differentially to muscle creatine kinase enhancer activity in skeletal and cardiac muscle. **Mol Cell Biol.** 13:2753-2764, 1993.
- ANDREUCCI, J.J.; GRANT, D.; COX, D.M.; TOMC, L.K.; PRYWES, R.; GOLDHAMER, D.J.; RODRIGUES, N.; BEDARD, P.A.; MCDERMOTT, J.C. - Composition and function of AP-1 transcription complexes during muscle cell differentiation. **J Biol Chem.** 277:16426-16432, 2002.
- ANGEL, P.& KARIN, M. - The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochim Biophys Acta.** 1072:129-157, 1991.
- ANGEL, P.; HATTORI, K.; SMEAL, T.; KARIN, M. - The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. **Cell.** 55:875-885, 1988.

- BISHOPRIC, N.H.; JAYASENA, V.; WEBSTER, K.A. - Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. **J Biol Chem.** 267:25535-25540, 1992.
- BLACK, B.L. & OLSON, E.M. - Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 14:167-196, 1998.
- BLAESER, F.; HO, N.; PRYWES, R.; CHATILA, T.A. - Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. **J Biol Chem.** 275:197-209, 2000.
- BOGOYEVITCH, M.A.; KETTERMAN, A.J.; SUGDEN, P.H. - Cellular stresses activate c-jun N-terminal protein kinases (JNKs) in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. **J Biol Chem.** 270:29710-29717, 1995.
- BOGOYEVITCH, M.A.; GILLESPIE-BROWN, J.; KETTERMAN, A.J.; FULLER, S.J.; BEN-LEVY, R.; ASHWORTH, A.; MARSHALL, C.J.; SUGDEN, P.H. - Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. **Circ Res.** 79:162-173, 1996.
- BRADFORD, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** 72:248-254, 1976.

- BUENO, O.F.; DE WINDT, L.J.; TYMITZ, K.M.; WITT, S.A.; KIMBALL, T.R.; KLEVITSKY, R.; HEWETT, T.E.; JONES, S.P.; LEFER, D.J.; PENG, C.F.; KITSIS, R.N.; MULKENTIN, J.D. - The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. **EMBO J.** 19:6341-50, 2000.
- CASTELLAZZI, M.; DANGY, J.P.; MECHTA, F.; HIRAI, S.; YANIV, M.; SAMARUT, J.; LASSAILLY, A.; BRUN G. - Overexpression of avian or mouse c-jun in primary chick embryo fibroblasts confers a partially transformed phenotype. **Oncogene.** 5:1541-1547, 1990.
- CHEN, S.L.; DOWHAN, D.H.; HOSKING, B.M.; MUSCAT, G.E. - The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. **Genes Dev.** 14:1209-1228, 2000.
- CHIEN, K.R.; KNOWLTON, K.U.; ZHU, H.; CHIEN, S. - Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: Molecular studies of an adaptive physiologic response. **FASEB J.** 5:3037-3046, 1991.
- CHOUKROUN, G.; HAJJAR, R.; FRY, S.; DEL MONTE, F.; HAQ, S.; GUERRERO, J.L.; PICARD, M.; ROSENZWEIG, A.; FORCE, T. - Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases / c-jun-NH2-terminal kinases. **J Clin Invest.** 104:391-398, 1999.

- CHIEN, K.R.; ZHU, H.; KNOWLTON, K.U.; MILLER-HANCE, W.; VAN-BILSEN, M.; O'BRIEN, T.X.; EVANS, S.M. - Transcriptional regulation during cardiac growth and development. **Annu Rev Physiol.** 55:77-95, 1993.
- CLARKE, N.; ARENZANA, N.; HAI, T.; MINDEN, A.; PRYWES, R. - Epidermal growth factor induction of the c-jun promoter by a Rac pathway. **Mol Cell Biol.** 18:1065-1073, 1998.
- CLERK, A.; MICHAEL, A.; SUGDEN, P.H. - Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase subfamilies by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. **Biochem J.** 333:581-589, 1998.
- CLERK, A.; KEMP, T.J.; HARRISON, J.G.; MULLEN, A.J.; BARTON, P.J.; SUGDEN, P.H. - Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein. **Biochem J.** 368:101-110, 2002.
- COBB, M.H. - MAP kinase pathways. **Prog Biophys Mol Biol.** 71:479-500, 1999.
- COHEN, P. - The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. **Trends Cell Biol.** 7:353-361, 1997.

- CORNELIUS, T.; HOLMER, S.R.; MULLER, F.U.; RIEGGER, G.A.; SCHUNKERT, H. - Regulation of the rat atrial natriuretic peptide gene after acute imposition of left ventricular pressure overload. **Hypertension**. 30:1348-1355, 1997.
- COSO, O.A.; MONTANER, S.; FROMM, C.; LACAL, J.C.; PRYWES, R.; TERAMOTO, H.; GUTKIND, J.S. - Signaling from G protein-coupled receptors to the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor. Evidence for a novel c-jun amino-terminal kinase-independent pathway. **J Biol Chem**. 272:20691-20697, 1997.
- DERIJARD, B.; HIBI, M.; WU, I.H.; BARRETT, T.; SU, B.; DENG, T.; KARIN, M.; DAVIS, R.J. - JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. **Cell**. 76:1025-1037, 1994.
- DEVEREUX, R.B. & ROMAN, M.J. - Hypertensive cardiac hypertrophy: pathophysiologic and clinical characteristics. Em: **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**. 2^a Edição. Eds: Laragh JH, Brenner BM. Raven Press Ltd., New York. 409-432, 1995.
- DOMINGOS, P.P.; FONSECA, P.M.; NADRUZ JR, W.; FRANCHINI, K.G. - Load-induced focal-adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 281:H556-H564, 2002.

- DOUD, S.K.; PAN, L.X.; CARLETON, S.; MARMORSTEIN, S.; SIDDIQUI, M.A. - Adaptational response in transcription factors during development of myocardial hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol.** 27:2359-2372, 1995.
- FERRERI, N.R.; AN, S.J.; MCGIFF, J.C. - Cyclooxygenase-2 expression and function in the medullary thick ascending limb. **Am J Physiol.** 277:F360-F368, 1999.
- FISCHER, T.A.; LUDWIG, S.; FLORY, E.; GAMBARYAN, S.; SINGH, K.; FINN, P.; PFEFFER, M.A.; KELLY, R.A.; PFEFFER, J.M. - Activation of cardiac c-Jun NH(2)-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. **Hypertension.** 37:1222-1228, 2001.
- FRANCHINI, K.G.; TORSONI, A.S.; SOARES, P.H.; SAAD, M.J. - Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ Res.** 87:558-565, 2000.
- FREY, N. & OLSON, E.N. - Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. **Annu Rev Physiol.** 65:45-79, 2003.
- GLENNON, P.E.; KADDOURA, S.; SALE, E.M.; SALE, G.J.; FULLER, S.J.; SUGDEN, P.H. - Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. **Circ Res.** 78:954-961, 1996.

- GOSWAMI, S.K.; SHAFIQ, S.; SIDDIQUI, M.A. - Modulation of MLC-2v gene expression by AP-1: complex regulatory role of Jun in cardiac myocytes. **Mol Cell Biochem.** 217:13-20, 2001.
- GUPTA, M.P.; GUPTA, M.; ZAK, R.; SUKHATME, V.P. - Egr-1, a serum-inducible zinc finger protein, regulates transcription of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. **J Biol Chem.** 266:12813-12816, 1991.
- HAN, J.; JIANG, Y.; KRAVCHENKO, V.V.; ULEVITCH, R.J. - Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP Kinase p38 in inflammation. **Nature.** 386:296-299, 1997.
- HAN, J. & MOLKENTIN, J.D.- Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. **Trends Cardiovasc Med.** 10:19-22, 2000.
- HAN, T.H. & PRYWES, R. - Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-jun promoter. **Mol Cell Biol.** 15:2907-2915, 1995.
- HEFTI, M. A.; HARDER, B. A.; EPPENBERGER, H. M.; SCHAUB, M. C. - Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol.** 29:2873-2892, 1997.
- HUNTER, J.J. & CHIEN, K.R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. **N Engl J Med.** 341:1276-1283, 1999.

IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. - Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. **Proc Natl Acad Sci USA.** 85:339-343, 1988.

KARIN, M. - The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. **J Biol Chem.** 270:16483-16486, 1995.

KARIN, M.; LIU, Z.; ZANDI, E. - AP-1 function and regulation. **Curr Opin Cell Biol.** 9:240-246, 1997.

KASLER, H.G.; VICTORIA, J.; DURAMAD, O.; WINOTO, A. - ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. **Mol Cell Biol.** 20:8382-8389, 2000.

KATO, Y.; KRAVCHENKO, V.V.; TAPPING, R.I.; HAN, J.; ULEVITCH, R.J.; LEE, J.D. - BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. **EMBO J.** 16:7054-66, 1997.

KATO, Y.; ZHAO, M.; MORIKAWA, A.; SUGIYAMA, T.; CHAKRAVORTTY, D.; KOIDE, N.; YOSHIDA, T.; TAPPING, R.I.; YANG, Y.; YOKOCHI, T.; LEE, J.D. - Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. **J Biol Chem.** 275:18534-18540, 2000.

- KIM, L.; LEE, T.; FU, J.; RITCHIE, M.E. - Characterization of MAP kinase and PKC isoform and effect of ACE inhibition in hypertrophy in vivo. **Am J Physiol.** 277:H1808-1816, 1999.
- KOŁODZIEJCZYK, S.M.; WANG, L.; BALAZSI, K.; DEREPIENTIGNY, Y.; KOTHARY, R.; MEGENEY, L.A. - MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. **Curr Biol.** 9:1203-1206, 1999.
- KOMURO, I.; KURABAYASHI, M.; TAKAKU, F.; YAZAKI, Y. - Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. **Circ Res.** 62:1075-1079, 1988.
- KOMURO, I. & YAZAKI, Y. - Control of cardiac gene expression by mechanical stress. **Annu Rev Physiol.** 55:55-75, 1993.
- KOMURO, I.; KUDOH, S.; YAMAZAKI, T.; ZOU, Y.; SHIOJIMA, I.; YAZAKI, Y. - Mechanical stress activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. **FASEB J.** 10:631-636, 1996.
- LADEROUTE, K.R. & WEBSTER, K.A. - Hypoxia/reoxygenation stimulates c-jun kinase activity through redox signaling in cardiac myocytes. **Circ Res.** 80:336-344, 1997.

- LAWLER, S.; FLEMING, Y.; GOEDERT, M.; COHEN, P. - Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. **Curr Biol.** 8:1387-1390, 1998.
- LIN, Q.; SCHWARZ, J.; BUCANA, C.; OLSON, E.N. - Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. **Science.** 276:1404-1407, 1997.
- LORELL, B.H. & CARABELLO, B.A. - Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation.** 102:470-479, 2000.
- LU, J.; MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N. - Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. **Mol Cell.** 6:233-244, 2000.
- MARINISSEN, M.J.; CHIARIELLO, M.; PALLANTE, M.; GUTKIND, J.S. - A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the *c-jun* promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. **Mol Cell Biol.** 19:4289-4301, 1999.
- MARINISSEN, M.J. & GUTKIND, J.S. - G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. **Trends Pharmacol Sci.** 22:368-376, 2001.

- MARTIN, J.F.; SCHWARZ, J.J.; OLSON, E.M. - Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. **Proc Natl Acad Sci USA**. 90:5282-5286, 1993.
- MARTIN, J.F.; MIANO, J.M.; HUSTAD, C.M.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; OLSON, E.N. - A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing. **Mol Cell Biol**. 14:1647-1656, 1994.
- MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N. - Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. **Proc Natl Acad Sci USA**. 97:14400-14405, 2000.
- MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N. - MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. **Trends Biochem Sci**. 27:40-47, 2002.
- MIZUKAMI, Y.; YOSHIOKA, K.; MORIMOTO, S.; YOSHIDA, K. - A novel mechanism of JNK1 activation (Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion). **J Biol Chem**. 272:16657-16662, 1997.
- MOLKENTIN, J.D.; MARKHAM, B.E.- Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. **J Biol Chem**. 268:19512-19520, 1993.

- MOLKENTIN, J.D.; BROGAN, R.S.; JOBE, S.M.; MARKHAM, B.E. - Expression of the alpha-myosin heavy chain gene in the heart is regulated in part by an E-box-dependent mechanism **J Biol Chem.** 268:2602-2609, 1993.
- MOLKENTIN, J.D.; LI, L.; OLSON, E.M. - Phosphorylation of the MADS-box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity. **J Biol Chem.** 271:17199-17204, 1996.
- MORELLO, D.; LAVENU, A.; BABINET, C. - Differential regulation and expression of jun, c-fos and c-myc proto-oncogenes during mouse liver regeneration and after inhibition of protein synthesis. **Oncogene.** 5:1511-1519, 1990.
- MUSTI, A.M.; TREIER, M.; BOHMANN, D. - Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAPKs. **Science.** 275:400-402, 1997.
- NAVANKASATTUSAS, S.; ZHU, H.; GARCIA, A.V.; EVANS, S.M.; CHIEN, K.R. - A ubiquitous factor (HF-1a) and a distinct muscle factor (HF-1b/MEF-2) form an E-box-independent pathway for cardiac muscle gene expression. **Mol.Cell.Biol.** 12:1469-1479, 1992.
- NAYA, F.J.; BLACK, B.L.; WU, H.; BASSEL-DUBY, R.; RICHARDSON, J.A.; HILL, J.A.; OLSON, E.N. - Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. **Nat Med.** 8:1303-1309, 2002.

- NICOL, R.L.; FREY, N.; PEARSON, G.; COBB, M.; RICHARDSON, J.; OLSON, E.N. - Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. **EMBO J.** 20:2757-2767, 2001.
- OLSON, E.N.; PERRY, M.; SCHULZ, A. - Regulation of muscle differentiation by MEF2 family of MADS-box transcription factors. **Dev Biol.** 172:2-14, 1995.
- OMURA, T.; YOSHIYAMA, M.; YOSHIDA, K.; NAKAMURA, Y.; KIM, S.; IWAO, H.; TAKEUCHI, K.; YOSHIKAWA, J. -.Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. **Hypertension.** 39:81-86, 2002.
- ORNATSKY, O.I.; COX, D.M.; TANGIRALA, P.; ANDREUCCI, J.J.; QUINN, Z.A.; WRANA, J.L.; PRYWES, R.; YU, Y.T.; MCDERMOTT, J.C. - Post translational control of the MEF2A transcriptional regulatory protein. **Nucleic Acids Res.** 27:2646-2654, 1999.
- PASSIER, R.; ZENG, H.; FREY, N.; NAYA, F.J.; NICOL, R.L.; MCKINSEY, T.A.; OVERBEEK, P; RICHARDSON, J.A.; GRANT, S.R.; OLSON, E.N. - CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. **J Clin Invest.** 105:1395-1406, 2000.
- POLLOCK, R. & TREISMAN, R. - Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. **Genes Dev.** 5:2327-2341, 1991.

ROCKMAN, H.A.; ROSS, R.S.; HARRIS, A.N.; KNOWLTON, K.U.; STEINHELPER, M.E.; FIELD, L.J.; ROSS JR, J.; CHIEN, K.R. - Segregation of atrial specific and inducible expression of ANF transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci USA**. 88:8277-8281, 1991.

RODRIGUEZ-BARBERO, A.; MARTINEZ-SALGADO, C.; RODRIGUEZ-LOPEZ, A.M.; RICOTE, M.; SANCHO, J.; LOPEZ-NOVOA, J.M. - Effect of hypothalamic-hypophysary inhibitory factor on mesangial cell activation. **Hypertension**. 26:905-911, 1995.

RUWHOF, C.; & VAN DER LAARSE, A. - Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. **Cardiovasc Res**. 47:23-37, 2000.

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

SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. - The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. **Annu Rev Physiol**. 59:551-571, 1997.

SEKO, Y.; TAKAHASHI, N.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; YAZAKI, Y. - Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal

- adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 259:8-14, 1999.
- SENBONMATSU, T.; ICHIHARA, S.; PRICE JR., E.; GAFFNEY, F.A.; INAGAMI, T. - Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. **J Clin Invest.** 105:R9-R14, 2000.
- SHERMAN, M.L.; STONE, R.M.; DATTA, R.; BERNSTEIN, S.H.; KUFÉ, D.W. - Transcriptional and post-transcriptional regulation of c-jun expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemic cells. **J Biol Chem.** 265:3320-3323, 1990.
- SHIN, H.M. & HAN, T.H. - CD28-mediated regulation of the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor in Jurkat T cells. **Mol Immunol.** 36:197-203, 1999.
- SCHUNKERT, H.; JAHN, L.; IZUMO, S.; APSTEIN, C.S.; LORELL, B.H. - Localization and regulation of c-fos and c-jun protooncogene induction by systolic wall stress in normal and hypertrophied rat hearts. **Proc Natl Acad Sci USA.** 88:11480-11484, 1991.
- SMEAL, T.; HIBI, M.; KARIN, M. - Altering the specificity of signal transducing cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. **EMBO J.** 13:6006-6010, 1994.
- SUGDEN, P.H. & CLERK, A. - Regulation of the ERK subgroup of MAP Kinase cascades through G protein-coupled receptors. **Cell.Signal.** 9:337-351, 1997.

SUGDEN, P.H. & CLERK, A. – “Stress-responsive” mitogen-activated protein kinases (c-jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. **Circ Res.** 83:345-352, 1998.

SUGDEN, P. H. - Signaling in Myocardial Hypertrophy (Life after Calcineurin?) **Circ Res.** 84:633-646, 1999.

SUSSMAN, M.A.; MCCULLOCH, A.; BORG, T.K. - Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. **Circ Res.** 91:888-898, 2002.

SUZUKI, E.; NISHIMATSU, H.; SATONAKA, H.; WALSH, K.; GOTO, A.; OMATA, M.; FUJITA, T.; NAGAI, R.; HIRATA, Y. - Angiotensin II induces myocyte enhancer factor 2- and calcineurin/nuclear factor of activated T cell-dependent transcriptional activation in vascular myocytes. **Circ Res.** 90:1004-1011, 2002.

TAKEISHI, Y.; ABE, J.; LEE, J.D.; KAWAKATSU, H.; WALSH, R.A.; BERK, B.C. - Differential regulation of p90 ribosomal S6 kinase and big mitogen-activated protein kinase 1 by ischemia/reperfusion and oxidative stress in perfused guinea pig hearts. **Circ Res.** 85:1164-1172, 1999.

TAKEISHI, Y.; HUANG, Q.; ABE, J.; GLASSMAN, M.; CHE, W.; LEE, J.D.; KAWAKATSU, H.; LAWRENCE, E.G.; HOIT, B.D.; BERK, B.C.; WALSH, R.A. - Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart

- failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. **J Mol Cell Cardiol.** 33:1637-1648, 2001.
- THAI, M.V.; GURUSWAMY, S.; CAO, K.T.; PESSIN, J.E.; OLSON, A.L. - Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. **J Biol Chem.** 273:14285-14292, 1998.
- THOMSON, S.; MAHADEVAN, L.C.; CLAYTON, A.L. - MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. **Semin Cell Dev Biol.** 10:205-214, 1999.
- VAKILI, B.A.; OKIN, P.M.; DEVEREUX, R.B. - Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. **Am Heart J.** 141:334-41, 2001.
- WANG, N.; VERNA, L.; HARDY, S.; FORSAYETH, J.; ZHU, Y.; STEMERMAN, M.B. - Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 19:2078-2084, 1999.
- WANG, Y.; HUANG, S.; SAH, V.P.; ROSS JR, J.; BROWN, J.H.; HAN, J.; CHIEN, K.R. - Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. **J Biol Chem.** 273:2161-2168, 1998.

- WU, H.; NAYA, F.J.; MCKINSEY, T.A.; MERCER, B.; SHELTON, J.M.; CHIN, E.R.; SIMARD, A.R.; MICHEL, R.N.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N.; WILLIAMS, E.S. - MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. **EMBO J.** 19:1963–1973, 2000.
- XIAO, G.; MAO, S.; BAUMGARTEN, G.; SERRANO, J.; JORDAN, M.C.; ROOS, K.P.; FISHBEIN, M.C.; MACLELLAN, W.R. - Inducible activation of c-myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis. **Circ Res.** 89:1122-1129, 2001.
- YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; YAZAKI, Y. - Signaling pathways for cardiac hypertrophy. **Cell Signal.** 10:693-698, 1998.
- YANG, C.C.; ORNATSKY, O.I.; MCDERMOTT, J.C.; CRUZ, T.F.; PRODY, C.A. - Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. **Nucleic Acids Res.** 26:4771-4777, 1998.
- YANG, S.H.; GALANIS, A.; SHARROCKS, A.D. - Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. **Mol Cell Biol.** 19:4028-4038, 1999.
- YU, Y.T.; BREITBART, R.E.; SMOOT, L.B.; LEE, Y.; MAHDAVI, V.; NADALGINARD, B. - Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue restricted MADS-box transcription factors. **Genes Dev.** 6:1783-1798, 1992.

ZETSER, A.; GREDINGER, E.; BENGAL, E. - p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. **J Biol Chem.** 274:5193-5200, 1999.

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

ZHAO, M.; NEW, L.; KRAVCHENKO, V.V.; KATO, Y.; GRAM, H.; PADOVA, F.; OLSON, E.M.; ULEVITCH, R.J.; HAN, J. - Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. **Mol Cell Biol.** 19:21-30, 1999.

ZHOU, G.; BAO, Z.Q.; DIXON, J.E. - Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. **J Biol Chem.** 270:12665-12669, 1995.

9. ANEXOS

Em anexo, encontram-se:

- Manuscrito contendo dados da tese de doutoramento.

Nadruz Jr., W.; Kobarg, C.B.; Constancio, S.S.; Corat, P.D.; Franchini, K.G. - Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. **Circ Res.** 92:243-251, 2003.

- Manuscrito relacionado a atividades paralelas desenvolvidas pelo aluno durante o período da tese.

Domingos, P.P.; Fonseca, P.M.; **Nadruz Jr., W.;** Franchini, K.G. - Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 282:H556-H564, 2002.

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

Regulation by Myocyte Enhancer Factor 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

© 2003 American Heart Association, Inc.

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

DOI: 10.1161/01.RES.0000053184.94618.97

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

Materials and Methods

Experimental Models

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

Immunoblotting

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

ERK5 Kinase Activity and In Vitro Assay

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

Tissue Preparation for Immunohistochemistry

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

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

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

Preparation of Nuclear Extracts and EMSAs

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

Plasmid Transfection and Dual Reporter Gene Assays

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

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

ERK5-Antisense ODN Transfection

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

Laser Confocal Analysis

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

Statistical Analysis

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

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

Results

Effect of Aortic Constriction on Blood Pressure

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

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

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

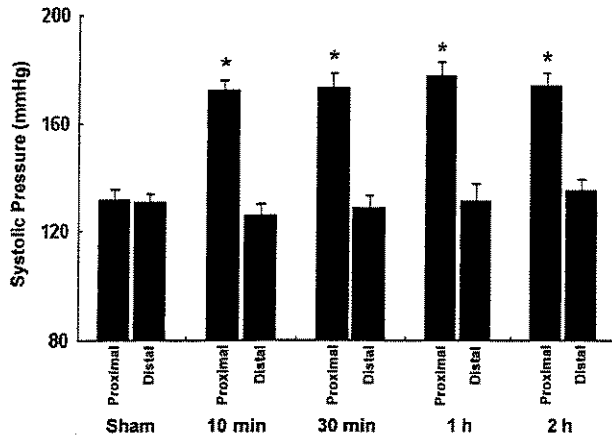


Figure 1. Hemodynamics. Systolic blood pressure measured proximally and distally to aortic constriction ($n=10$) along the experimental period. * $P<0.05$.

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

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

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

Effect of Pressure Overload on MAPK-MEF2 Pathway

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

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

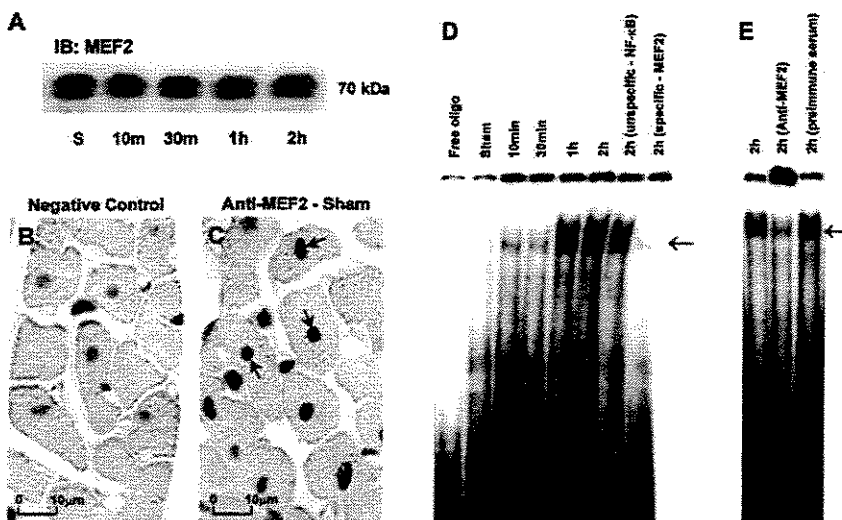


Figure 2. MEF2 expression and activation. A, Representative blot (from 6 experiments) of anti-MEF2 blotting from sham and overloaded heart extracts. IB indicates immunoblotting; S, sham. B and C, Immunohistochemical studies showing negative control (B) and localization of p70^{MEF2} in the myocardium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

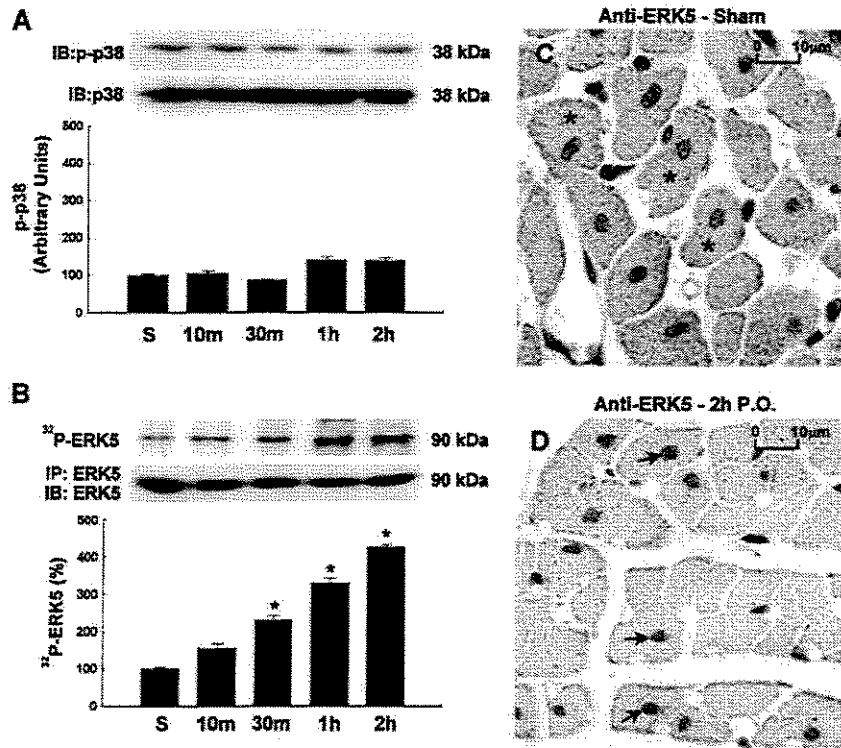


Figure 3. p38 and ERK5 activation. A, Representative blots of myocardial p38-MAPK detected by phosphospecific (top) and regular (bottom) antibodies against p38 and average values (6 experiments) of p38 activity. B, Representative blots showing ERK5 kinase activity (top) and ERK5 protein levels (bottom) and the average values (5 experiments) of densitometric analysis of ERK5 kinase activity. IP indicates immunoprecipitation. * $P < 0.05$ compared with unloaded hearts.

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

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

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

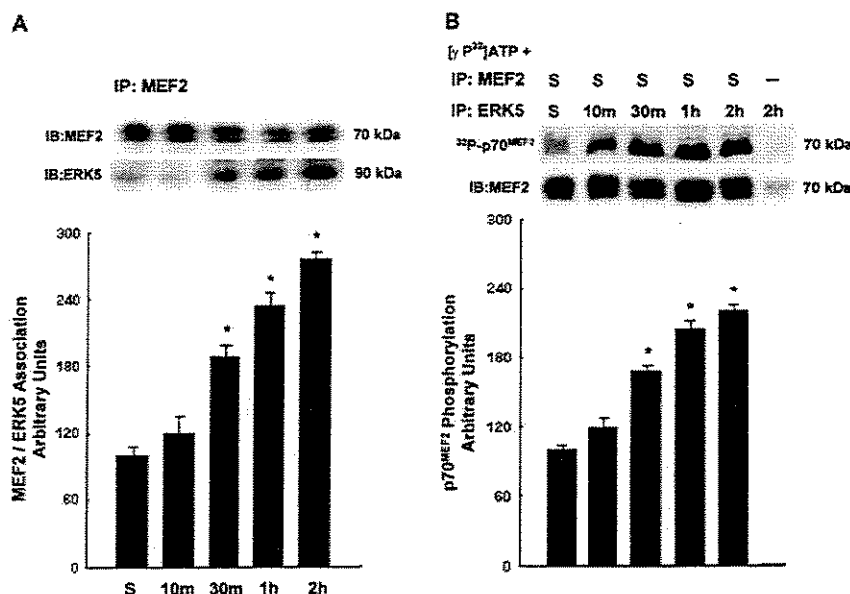


Figure 4. ERK5-MEF2 interaction. A, Representative blot and average values (5 experiments) showing the results of MEF2-ERK5 coimmunoprecipitation experiments. B, Representative blot and average values ($n=5$) of $p70^{\text{MEF2}}$ in vitro phosphorylation mediated by ERK5 in overloaded hearts. Immunoprecipitated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

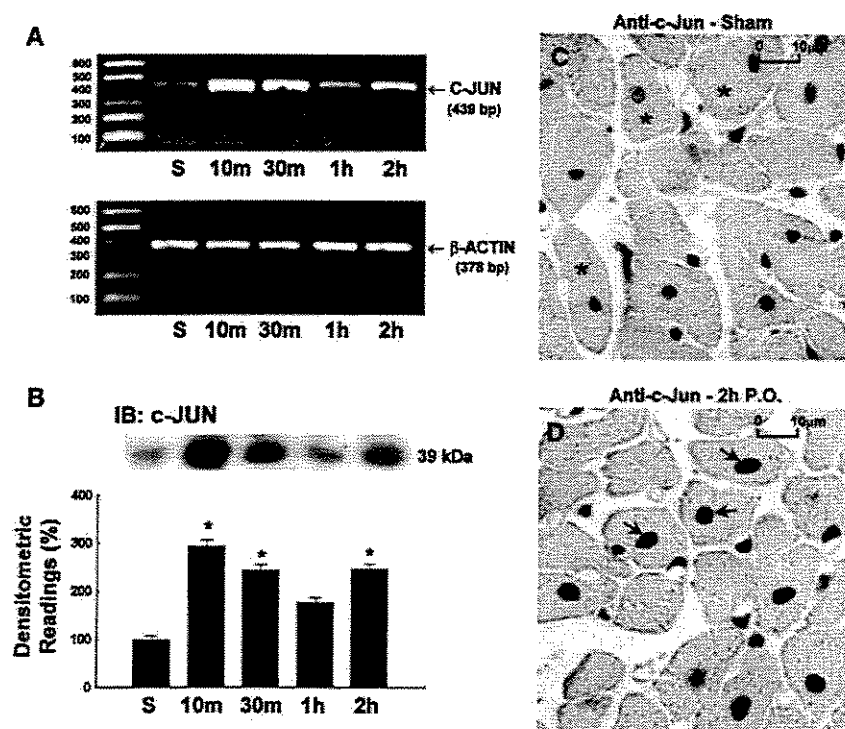


Figure 5. Regulation of *c-jun* expression by pressure overload. **A**, RT-PCR of *c-jun* and β -actin mRNA in rat myocardium. Representative gels from 3 experiments are shown. **B**, Representative blot and average values of densitometric readings ($n=6$) of the immunoblotting of anti-*c-Jun* from sham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

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

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

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

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

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

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

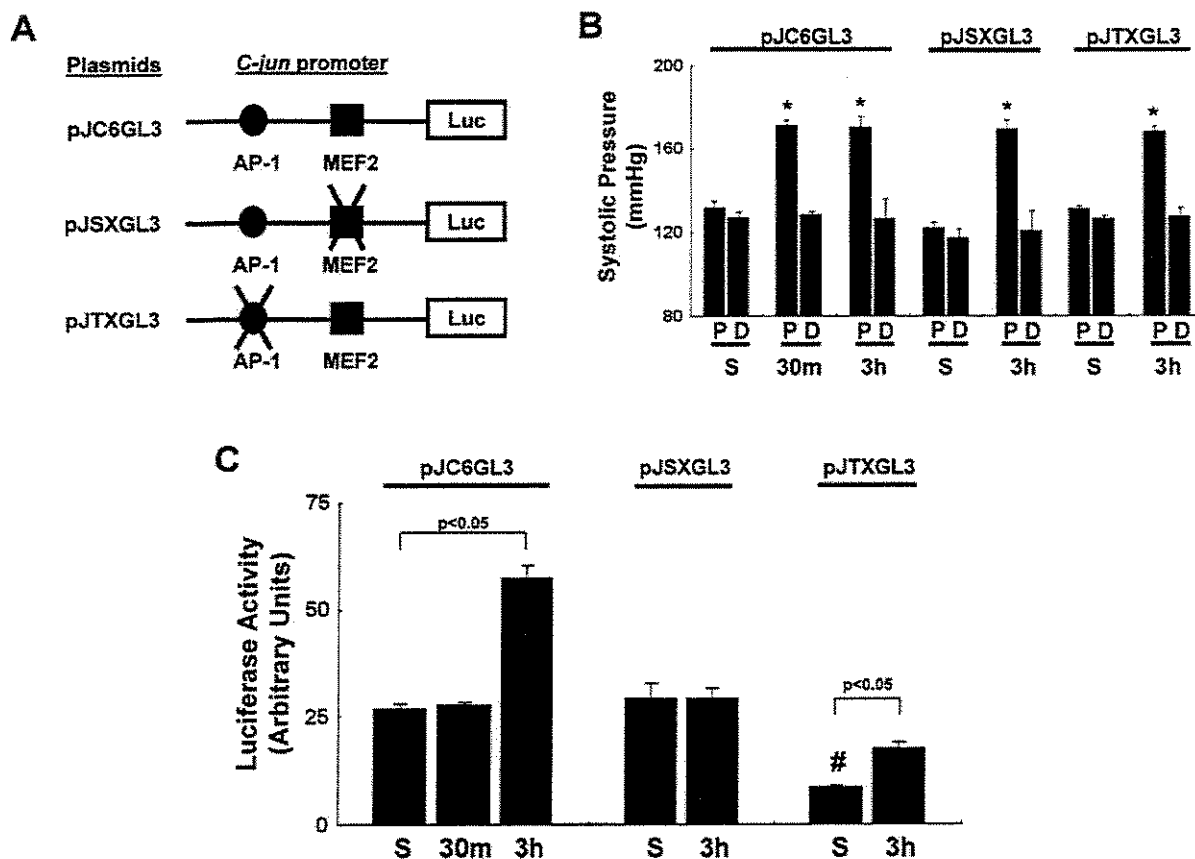


Figure 6. *c-jun* promoter regulation by pressure overload. **A**, Schematic representation of the wild-type murine *c-jun* promoter (pJC6GL3) and its derivatives mutated at MEF2 (pJSXGL3) and AP-1 (pJTXGL3) regulatory elements. **B**, Systolic blood pressure measured proximally and distally to the aortic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

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

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

Discussion

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

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

Transcriptional Regulation of *c-jun* by MEF2

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

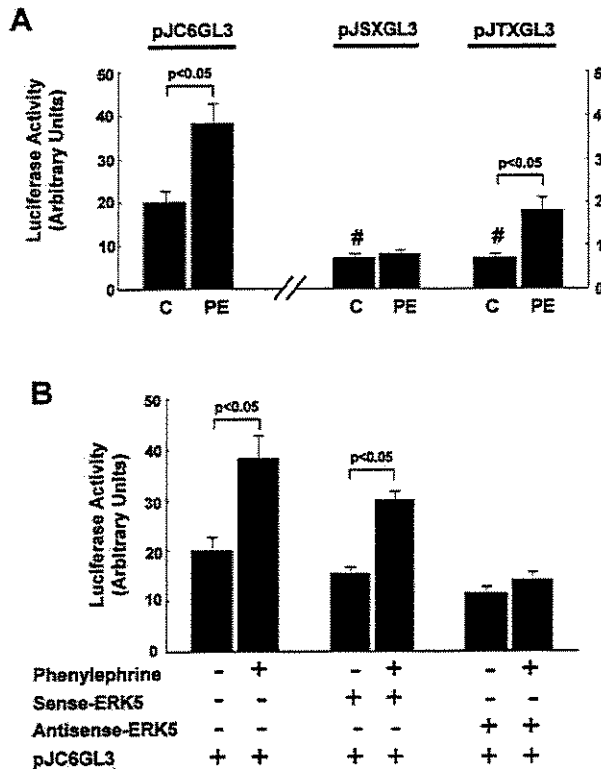


Figure 7. *c-jun* promoter regulation by phenylephrine (PE). A, Graphic representing the average values (n=4) of luciferase activity in NRVMs stimulated with PE. C indicates control. #P<0.05 compared with control-pJC6GL3. B, Average values (n=4) of luciferase activity in pJC6GL3-transfected NRVMs stimulated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

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

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

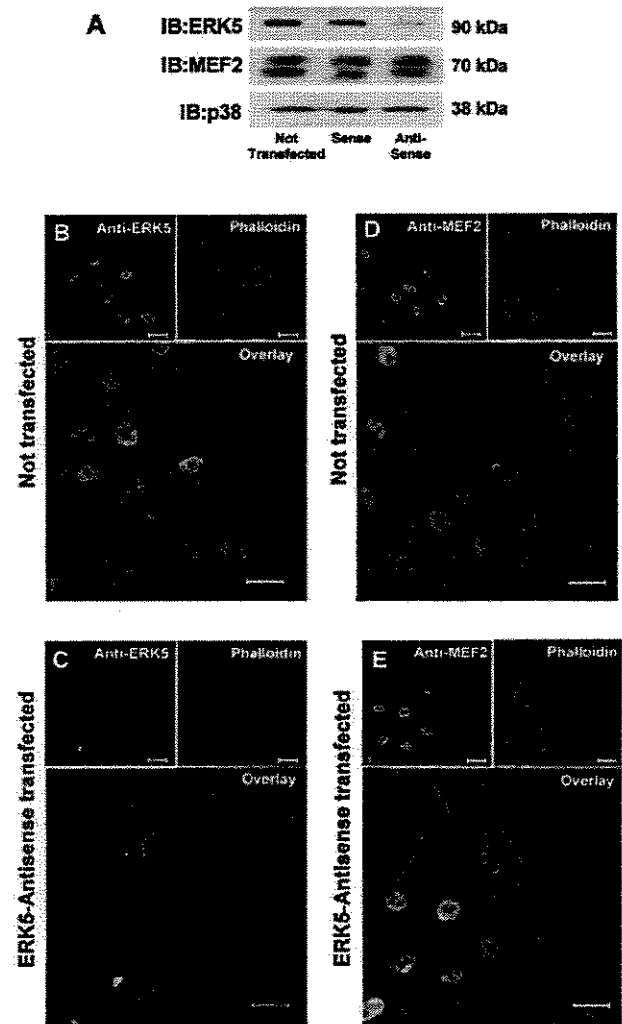


Figure 8. Effect of ERK5 ODNs on NRVMs. A, Representative immunoblotting (from 3 experiments) of extracts from NRVMs transfected or not with ERK5 ODNs performed with anti-ERK5, -MEF2, and -p38 antibodies. B through E, Laser confocal analysis of control and antisense-transfected NRVMs double-labeled with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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

References

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

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

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

PRISCILA P. DOMINGOS, PRISCILA M. FONSECA,
WILSON NADRUZ, JR., AND KLEBER G. FRANCHINI
*Department of Internal Medicine, School of Medicine,
State University of Campinas, Campinas, São Paulo 13081-970, Brazil*

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

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

cytoskeleton; cell signaling; rat heart

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

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

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

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

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

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

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

METHODS

Antibodies and Chemicals

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

Isolated Perfused Heart Preparation

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

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

Tissue Homogenization

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

Protein Analysis by Immunoblotting

Aliquots of whole extracts or immunoprecipitated proteins with specific antibodies and protein A-Sepharose were treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 4 min, after which they were subjected to SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature gel apparatus (Mini-Protean). Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose membrane was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean). Non-specific protein binding to the nitrocellulose membrane was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose membrane blot was incubated with anti-FAK, anti-Src, anti-phosphotyrosine, anti-Grb2, anti-ERK1/2, or anti-phosphorylated ERK1/2 antibodies diluted in 10 ml of blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4°C and then washed for 60 min in blocking buffer without milk or BSA. The blots were subsequently incubated with 2 μ Ci [¹²⁵I]protein A (30 μ Ci/ μ g) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at room temperature and then washed again for 30 min as described above. [¹²⁵I]protein A bound to the specific antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak; Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screens (DuPont; Wilmington, DE) at -80°C for 24 h. Band intensities were quantified by optical densitometry (model GS 300 densitometer, Hoefer Scientific Instruments; San Francisco, CA) of the developed autoradiographs.

Tissue Preparation for Morphometry and Immunohistochemistry

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

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

Experimental Design

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

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

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

Statistical Analysis

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

RESULTS

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

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

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

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

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

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

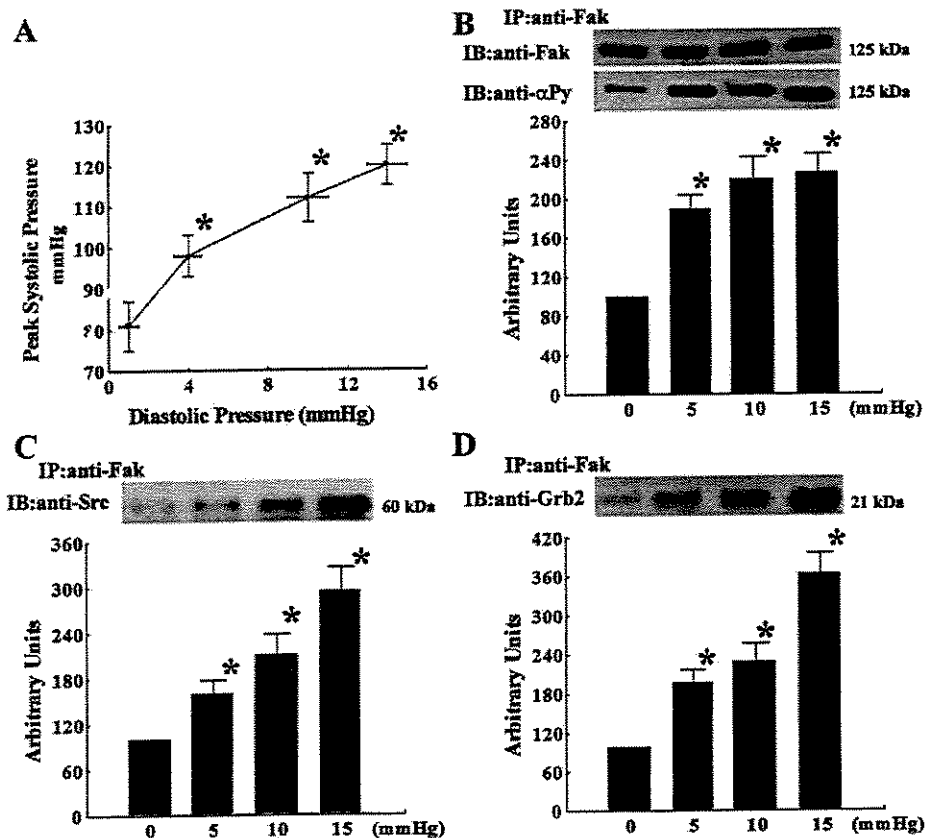


Fig. 1. Load-induced activation of the focal adhesion kinase (FAK) multicomponent signaling complex in the isolated perfused rat heart. **A**: graphic showing the diastolic/peak systolic pressure relationship of isolated perfused rat hearts ($n = 7$). **B**: representative blots (top) of immunoprecipitated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

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

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

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

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

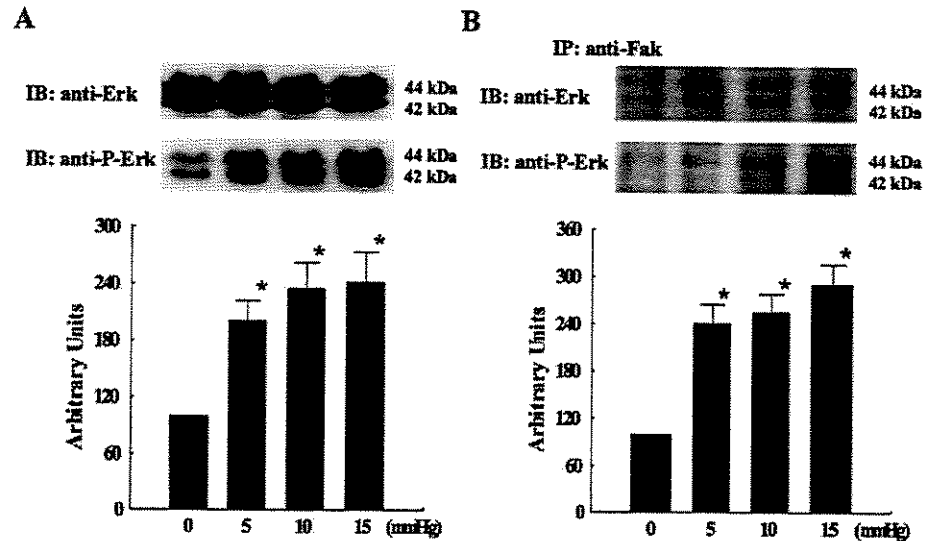
To examine whether increases in myocardial contractile activity alone are able to activate myocardial FAK and ERK1/2, experiments were performed in which the isolated hearts were perfused with different Ca_0 in the perfusate buffer. As shown in Fig. 6A, increases in the perfusate Ca_0 from 0.5 to 5 mM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

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

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

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

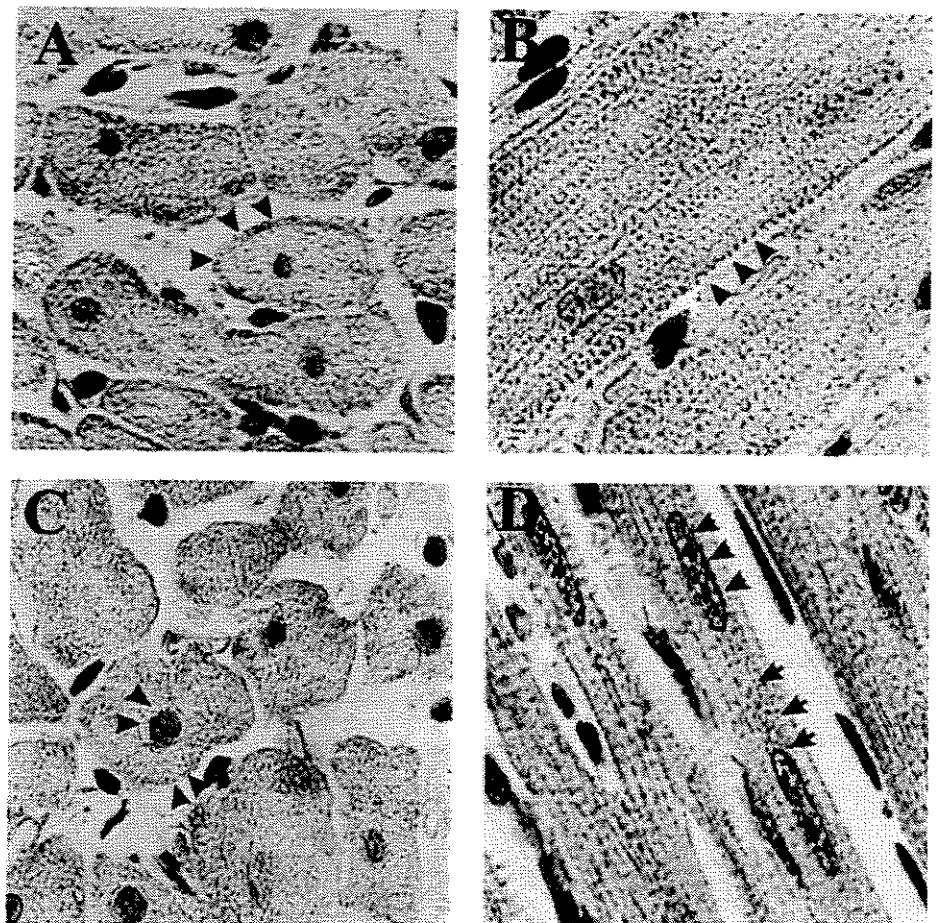
Fig. 2. Load-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 activation in isolated perfused rat hearts. **A:** representative blots (*top*) of the amount of ERK1/2 and activated ERK1/2 detected by anti-ERK1/2 and anti-phosphorylated (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)-ERK1/2 (P-ERK) in the homogenates of hearts subjected to increasing workload. The graphic (*bottom*) represents the average values of the increases in P-ERK1/2 as percent changes compared with baseline values (100%) obtained by densitometric readings of blots ($n = 6$). **B:** representative blots (*top*) of ERK1/2 and P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of rat hearts subjected to increasing workload. The graphic (*bottom*) represents the average values ($n = 6$) of experiments of the increases in P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK. * $P < 0.05$ compared with control values.



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

immunoprecipitated FAK in the homogenates of hearts perfused with different Ca_0 . Besides the lack of FAK multicomponent signaling complex activation, increases in contractile activity alone could not activate ERK1/2, as indicated by the absence of changes in the

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



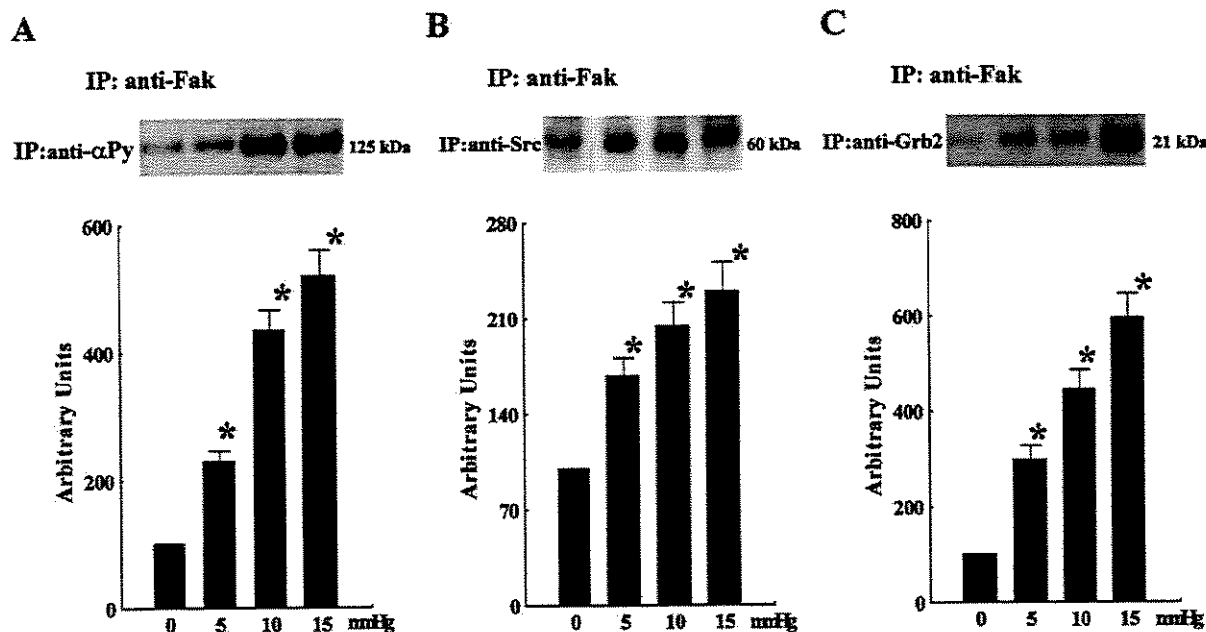


Fig. 4. Effect of increases in left ventricular pressure in isolated rat hearts perfused with a cardioplegic solution in the activation of the FAK multicomponent signaling complex. *A*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of FAK tyrosine phosphorylation detected with anti-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

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

DISCUSSION

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

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

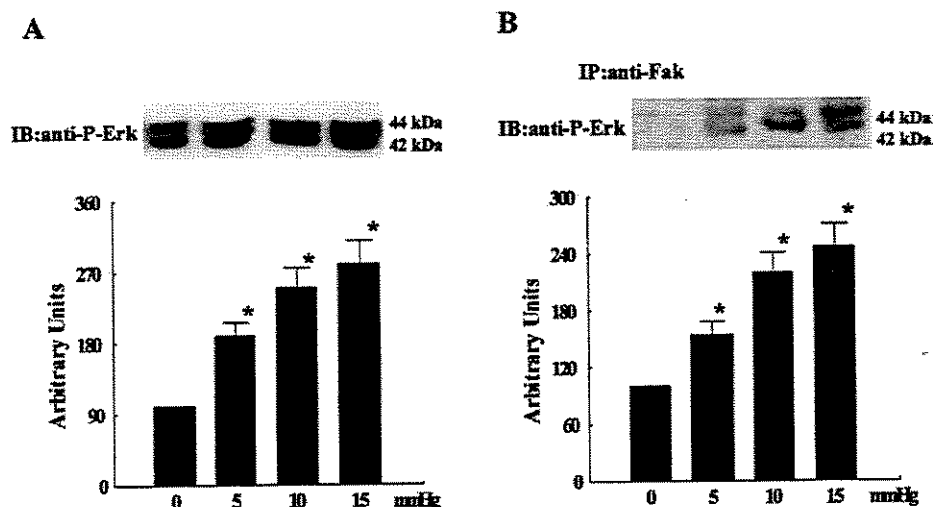


Fig. 5. Effect of increases in left ventricular pressure in isolated rat hearts perfused with a cardioplegic solution in the activation of ERK1/2. *A*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of the amount of activated ERK1/2 detected by anti-P-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) in the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

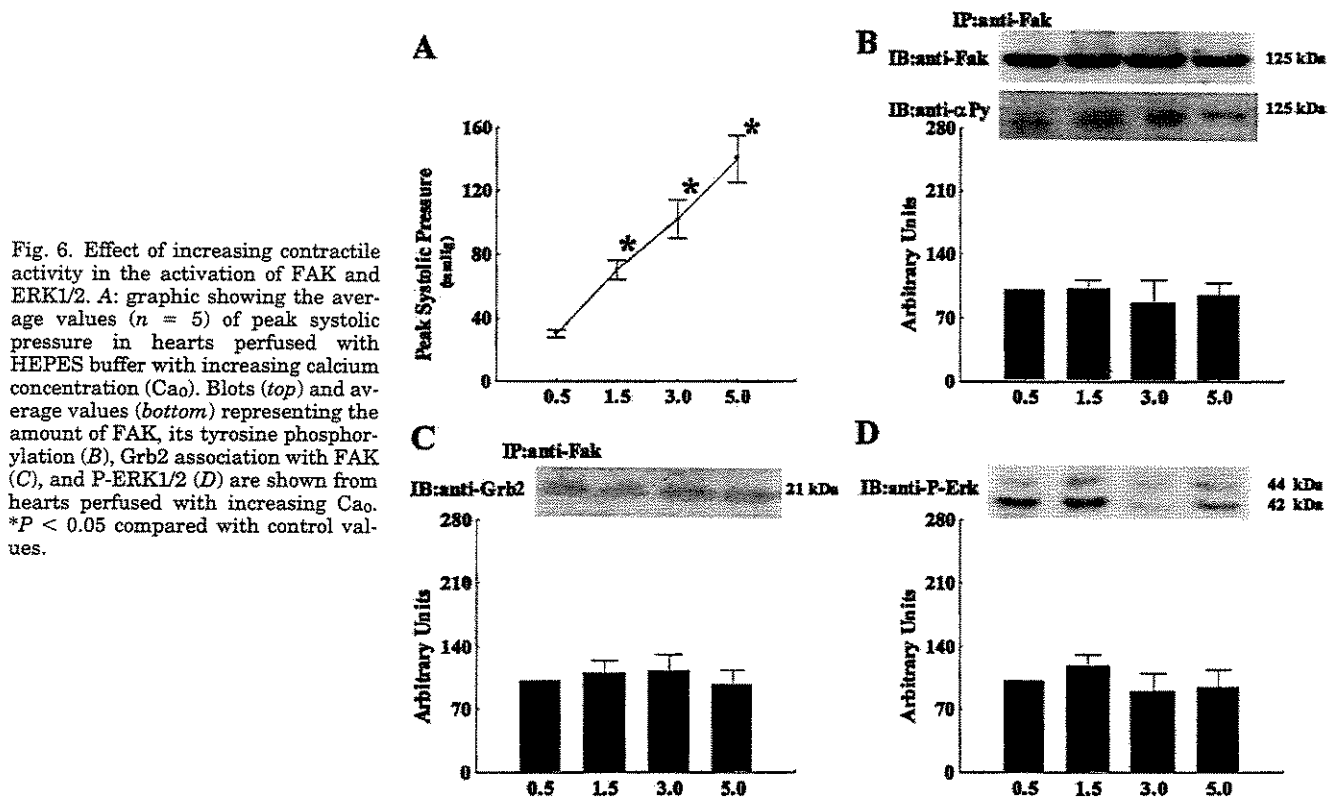


Fig. 6. Effect of increasing contractile activity in the activation of FAK and ERK1/2. A: graphic showing the average values ($n = 5$) of peak systolic pressure in hearts perfused with HEPES buffer with increasing calcium concentration (Ca_0). Blots (top) and average values (bottom) representing the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

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

Mechanical Stress and FAK Activation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCES

1. Aplin AE, Stewart AS, Assoian RK, and Juliano RL. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 153: 273–281, 2001.
2. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, and Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 79: 162–173, 1996.
3. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, and Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 269: 1110–1119, 1994.
4. Borg TK, Goldsmith EC, Price R, Carver W, Terracio L, and Samarel AM. Specialization at the Z line of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 46: 277–285, 2000.
5. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevisky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, and Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19: 6341–6350, 2000.
6. Burridge K and Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463–519, 1996.

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