

JOÃO CARLOS RIBEIRO DA SILVA

**Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na interface actina-
adesões focais de células musculares lisas aórticas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Krieger

**São Paulo
2022**

JOÃO CARLOS RIBEIRO DA SILVA

**Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na interface actina-
adesões focais de células musculares lisas aórticas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Krieger

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, João Carlos Ribeiro da
Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3
(CRP3) na interface actina-adesões focais de
células musculares lisas aórticas / João Carlos
Ribeiro da Silva. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Aorta 2.Adesões focais
3.Citoesqueleto de actina 4.Músculo liso
5.Mecanotransdução celular 6.Transdução de sinais

USP/FM/DBD-242/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico este trabalho à minha mãe Ana,
que possui o título mais nobre que existe – o de mãe.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço àquele que, através de sua infinita misericórdia, permitiu que eu chegasse até aqui e cuidou de cada detalhe desta etapa, antes mesmo que eu sequer sonhasse com ela. Deus, *I am living for Your name*.

Aos meus pais, Ana e João e às minhas irmãs Ester e Nicole pelo carinho e suporte ao longo dos anos, independente da distância física – este trabalho também é de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Krieger, e à Dra. Ayumi Miyakawa, pelas oportunidades e pelos direcionamentos que nos trouxeram até aqui.

À Renata Carmona, por sempre me ouvir e prover os recursos necessários para que a roda continuasse girando.

À Dra. Miriam Alaniz, que esteve sempre disposta a me ajudar e ouvir ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Adriana Girardi, pelas experiências que contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico (as “novas avenidas”), por me agregar ao seu time e, mais do que isso, por me propiciar o sentimento de pertencimento: muito obrigado!

Ao grupo Renal (membros atuais e antigos), com quem partilhei os momentos de desespero e as alegrias, especialmente Acaris Benetti, Danúbia Santos, Elys Lima, Flávia Martins, Flávio Araújo e Juliano Polidoro. Obrigado por me acolherem.

Aos demais colegas, técnicos, equipe administrativa e equipe de manutenção do LGCM, cuja existência foi primordial ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração – João Wosniak, Leonardo Tanaka, Percilia Oliveira, Tiphany Bessa e Victor Debbas, pela disposição incondicional nos momentos de sufoco.

Às dádivas que a vida me deu - meus amigos: Ana Valdes-Curiel, Andressa Romanel, Ashley Fletcher, Cecília Magalhães, Gabriel Santos, Gabriela Venturini, Giselle Jandoza, Graça Rosas, Irene Yan, Juliana Alvim, Julliana Carvalho, Laís Fukase, Lavinnya Pereira, Lucas Rossetti, Malcolm von Schantz, Marcia Trípodi, Mariana Perez, Murilo Moura, Nathalia Oliveira, Nathalia Valeck, Pamella Malagrino, Patrícia Nolasco, Thais Sobelman, Tania Matsui e Thamila D'Ávila, por me apoiarem e aconselharem sempre que necessário.

À CAPES pelo auxílio financeiro (Processo nº 88887.464006/2019-00) investido para o desenvolvimento desta tese.

A todos aqueles que, mesmo não mencionados, tenham contribuído direta ou indiretamente ao desenvolvimento deste trabalho: muito obrigado.

“A pior filosofia é a do choramigas que se deita à margem do rio para o fim de lastimar o curso incessante das águas. O ofício delas é não parar nunca; acomoda-te com a lei, e trata de aproveitá-la.”

Memórias Póstumas de Brás Cubas
Machado de Assis

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A contração de células musculares lisas vasculares	1
1.1.1. Mecanismos cálcio-dependentes na regulação da contratilidade	1
1.1.2. Mecanismos Ca ²⁺ -independentes na contração de células musculares lisas vasculares	4
1.1.2.1. Integrinas e a organização das adesões focais	6
1.1.2.2. Sinalização por adesões focais e a contração de células musculares lisas vasculares	7
1.2. Proteína rica em cisteína e glicina-3 (CRP3)	13
1.2.1. Os domínios LIM	13
1.2.2. CRP3	14
1.2.2.1. CRP3 e as respostas fisiológicas e patológicas vasculares	16
1.2.2.2. CRP3 e as adesões focais	17
2. OBJETIVO	20
3. MÉTODOS	21
3.1. Obtenção de aortas	21
3.2. Extração de células musculares lisas	21
3.3. Ensaio de espalhamento celular	22
3.4. Análise da secreção de colágeno do tipo I	22
3.5. Western blot	23
3.6. Imunofluorescência	24
3.7. Ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden	27
3.8. Análise de ciclo celular	27
3.9. Ensaio de contração em gel de colágeno	28
3.10. Citometria magnético-óptica de oscilação (OMTC)	29
3.10.1 Preparo dos grânulos ferromagnéticos	30
3.10.2 Cultivo celular para o ensaio de OMTC	30
3.11.3 OMTC	30
3.11.4 Análise dos dados	31
3.11. Análise de contração de anel aórtico	31
3.12. Imunoprecipitação de CRP3 para avaliação de fosfotirosinas	32
3.13. Análise estatística	33
4. DESENHO EXPERIMENTAL	34
5. RESULTADOS	35
5.1. A falta de CRP3 nas adesões focais modifica a mecanopercepção de células musculares lisas aórticas	35
5.2. A ausência de CRP3 compromete a ativação do eixo de sinalização FAK–Paxilina–p130CAS	37

5.3. A dinâmica do citoesqueleto de actina permanece inalterada na ausência de CRP3	40
5.4. Células musculares lisas aórticas selvagens e CRP3 ^{-/-} apresentam níveis similares de ativação de MLC	44
5.5. Os efeitos da ausência de CRP3 se estendem à migração celular	45
5.6. A inibição de FAK reduz a contratilidade de células selvagens, mas não afeta a rigidez celular	47
5.7. Análise in silico da sequência de aminoácidos de CRP3 revela sítios de fosforilação por FAK-Src	48
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS	61
9. ANEXO	95
9.1. Aprovação do comitê de ética	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células musculares lisas e aparato de actomiosina.....	2
Figura 2. Mecanismos cálcio-dependentes na regulação da contratilidade de células musculares lisas vasculares.....	3
Figura 3. Arquitetura hierárquica de adesões focais.....	7
Figura 4. Organização das adesões focais e ativação das vias de sinalização que controlam a contratilidade.....	9
Figura 5. Sequência e topologia dos domínios LIM.....	14
Figura 6. Topologia de CRP3.....	15
Figura 7. Via de sinalização candidata à resposta adaptativa de células musculares lisas de jugular ao estiramento.....	17
Figura 8. CRP3 é uma proteína de adesão focal cuja ausência resulta em aumento no tamanho das adesões focais e redução da contratilidade de células musculares lisas aórticas.....	19
Figura 9. Representação gráfica da contração em gel de colágeno.....	29
Figura 10. Representação gráfica do ensaio de citometria magnético-óptica de oscilação (OMTC).....	31
Figura 11. Desenho experimental.....	34
Figura 12. A ausência de CRP3 altera as propriedades mecanossensoras de células musculares lisas aórticas.....	36
Figura 13. O número de adesões focais permanece inalterado em células CRP3 ^{-/-}	37
Figura 14. Ativação deficiente do eixo FAK-Src-Paxilina-p130CAS em detrimento da ausência de CRP3.....	38

Figura 15. A ativação de ERK 1/2 é conservada na ausência de CRP3.....	39
Figura 16. A fosforilação e os níveis totais de ILK permanecem inalterados.....	40
Figura 17. A dinâmica de actina é comparável entre células selvagens e CRP3-/-.....	42
Figura 18. Expressão dos parálogos de CRP3 (CRP1, CRP2) e de marcadores de célula muscular lisa dependentes do status do citoesqueleto de actina.....	43
Figura 19. A ativação de MLC é mantida na ausência de CRP3.....	44
Figura 20. A contratilidade aguda de anéis aórticos é mantida na ausência de CRP3.....	45
Figura 21. A ausência de CRP3 acarreta dano à capacidade migratória, mas não à proliferação de células musculares lisas aórticas.....	46
Figura 22. A inibição de FAK reduz a contratilidade de células selvagens, mas não afeta a rigidez celular.....	48
Figura 23. Análise da fosforilação de tirosinas em CRP3.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de *western blot*.....25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α -SMA	alfa actina de músculo liso
β -PIX	fator de troca beta da proteína quinase ativada por p21
Abl	Abelson quinase
Akt	proteína quinase B
Ang II	angiotensina II
Arp 2/3	Complexo 2-3 de proteínas relacionadas à actina
CPI-17	inibidor da fosfatase da cadeia regulatória da miosina
CRK-II	regulador de quinase CT10-II
CRP	família de ou proteína rica em cisteína e glicina
CRP3	proteína rica em cisteína e glicina 3
CRP3 ^{-/-}	rato ou célula nocaute para CRP3
CTCF	fluorescência celular total corrigida
DAG	diacilglicerol
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ERK 1/2	quinase regulada por fatores extracelulares 1/2
FAK	quinase de adesão focal
GDI	fator inibidor de dissociação de guanina
GDP	guanosina difosfato
GEF	trocador de nucleotídeo de guanina
GFP	proteína verde fluorescente
GIT-1	ligante 1 da quinase de receptor acoplado à proteína G
GPCR	receptor acoplado à proteína G

GRB2	proteína ligante 2 de receptor de fator de crescimento
GTP	guanosina trifosfato
ILK	quinase ligada às integrinas
IP	iodeto de Propídio
IP ₃	trifosfato de inositol
IP ₃ R	receptor de trifosfato de inositol
LIM	domínio de dedo de zinco
LTCC	canal de cálcio do tipo L
MEC	matriz extracelular
MKL	proteína de leucemia megacarioblástica
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	quinase da cadeia leve de miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve de miosina
MYH11	gene da cadeia pesada de miosina músculo liso-específica
MYPT1	subunidade 1 da miosina fosfatase
NM-II	miosina não-muscular II
N-WASP	proteína neuronal da Síndrome de Wiskott-Aldrich
OMTC	Citometria magnético-óptica de oscilação
p130CAS	substrato associado a CRK-II de 130 kDa
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PDGF-BB	fator de crescimento derivado de plaquetas-BB
PINCH	proteína rica em cisteína e histidina
PKC	proteína quinase C
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PXN	paxilina

RIPA	tampão de radioimunoensaio
ROCK	quinase de Rho
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SH	domínio de homologia à Src
SRF	fator responsivo ao soro
TBS-T	solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20
TRP	canal iônico receptor de potencial transitório
WT	célula selvagem
VASP	fosfoproteína ativada por vasodilatador
YAP	proteína associada a yes

LISTA DE SÍMBOLOS

±	mais ou menos
%	percentagem
°C	grau Celsius
α	letra grega alfa
β	letra grega beta
μg	micrograma
μl	microlitro
μM	micromolar
Ca ⁺²	íon cálcio
cm ²	centímetro quadrado
cm ³	centímetro cúbico
CO ₂	gás carbônico
Cu ⁺	íon cuproso
Cu ⁺²	íon cúprico
g	grama
<i>g</i>	força centrífuga
h	hora
HCl	ácido clorídrico
Hz	hertz
KCl	cloreto de potássio
kDa	unidade de massa atômica kiloDalton
Kg	kilo
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
mg	miligrama

min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
mm ³	milímetro cúbico
ms	milissegundos
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
nm	nanômetro
p	nível descritivo de probabilidade do teste
pH	potencial hidrogenionico
s	segundo
S	resíduo de serina
T	resíduo de treonina
UI	unidade internacional
UV	luz ultravioleta
V	Volt
v/v	volume/volume
Y	resíduo de tirosina

RESUMO

Ribeiro-Silva JC. *Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na interface actina-adesões focais de células musculares lisas aórticas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Células musculares lisas estão em equilíbrio mecânico com o microambiente vascular. As adesões focais são os pontos de ajuste em resposta às deformações ativas e passivas da matriz extracelular. Este fenômeno depende de proteínas de adesões focais que percebem, transmitem e respondem a estímulos físicos. Nosso laboratório demonstrou que a proteína CRP3 atua como mecanossensor em células musculares lisas aórticas, regulando a ativação da quinase de adesão focal (FAK) em resposta ao estiramento. Evidências preliminares sugerem que a ausência da CRP3 previne o remodelamento de adesões focais, prejudicando a contratilidade das células musculares lisas. Este fenótipo se assemelha ao observado em células com prejuízo na sinalização de FAK-Src, enquanto as evidências da literatura apontam também para um papel regulador do CRP3 sobre o citoesqueleto de actina. Logo, postulamos que a CRP3 é crítica para a mecanotransdução de células musculares lisas atuando como ponte molecular entre as adesões focais e o citoesqueleto de actina. Ao estimular células musculares lisas aórticas com angiotensina II (Ang II), verificamos que a ausência de CRP3 prejudica a ativação do eixo FAK-paxilina-p130CAS, via de sinalização fundamental à mecanotransdução. A fim de caracterizar as consequências desta deficiência, analisamos a dinâmica do citoesqueleto de actina, a fosforilação da cadeia regulatória da miosina (MLC) e a quimiotaxia dependente de PDGF-BB. A razão F/G-actina, a fosforilação inibitória de cofilina e os níveis de YAP foram comparáveis em células selvagens (WT) versus CRP3^{-/-} em condições basais e em resposta à angiotensina II. Em concordância, os marcadores de músculo liso dependentes de actina (α -SMA, calponina, MYH11 e smoothelina) assim como os níveis de fosforilação de MLC e a contração em resposta ao KCl não se modificaram entre os genótipos, sugerindo que a ausência de CRP3 não afeta o citoesqueleto de actina. A quimiotaxia dependente de PDGF-BB foi menor em células CRP3^{-/-}, consistente com uma deficiência na sinalização de FAK. Esta deficiência se mostrou desacoplada de alterações na viabilidade celular, já que células selvagens e

CRP3^{-/-} apresentam progressão similar do ciclo celular. A fim de confirmar a dependência dos eventos de sinalização dependentes de FAK, realizamos ensaios de contração em gel de colágeno e de rigidez por citometria magnético-óptica de oscilação (OMTC) na presença de inibidor de FAK (iFAK). Enquanto a contração de células WT foi negativamente impactada por iFAK, não observamos nenhum efeito nas células CRP3^{-/-}. Já o ensaio de OMTC demonstrou que a rigidez celular é independente da ativação de FAK. A análise da estrutura de CRP3 evidenciou a presença de dois resíduos de tirosina passíveis de fosforilação por FAK (Y57 e Y167), responsivos à Ang II em células cardíacas, podendo então explicar a dependência de CRP3 para a ativação de FAK e promoção da contração. Os dados apresentados revelam que a CRP3 é necessária à ativação do eixo FAK-paxilina-p130CAS, sinalização necessária e suficiente à migração e contratilidade. Na ausência de CRP3, há comprometimento das cascatas de sinalização à jusante, comprometendo a percepção do ambiente e a mecanossinalização, componentes-chave da mecanotransdução vascular. Em conjunto, apresentamos evidências de que a CRP3 influencia a mecanotransdução em células musculares lisas aórticas atuando como ponte entre a actina e as adesões focais.

Descritores: Aorta, Adesões focais, Citoesqueleto de actina, Músculo liso, Mecanotransdução celular, Transdução de sinais.

ABSTRACT

Ribeiro-Silva JC. *Role of the cysteine and glycine-rich protein-3 (CRP3) at the actin-focal adhesions interface of aortic smooth muscle cells* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2022.

Smooth muscle cells are in mechanical equilibrium with the vascular microenvironment. Focal adhesions are the set points in response to active and passive deformations of the extracellular matrix. This phenomenon depends on focal adhesion proteins that perceive, transmit and respond to physical stimuli. Our laboratory demonstrated that the CRP3 protein acts as a mechanosensor in aortic smooth muscle cells, regulating the activation of the focal adhesion kinase (FAK) in response to stretch. Preliminary evidence suggests that the absence of CRP3 prevents remodeling of focal adhesions, impairing the contractility of smooth muscle cells. This phenotype is similar to that observed in cells with impaired FAK-Src signaling, while evidence from the literature also points to a regulatory role of CRP3 on the actin cytoskeleton. Therefore, we postulate that CRP3 is critical for smooth muscle cell mechanotransduction acting as a molecular bridge between focal adhesions and the actin cytoskeleton. By stimulating aortic smooth muscle cells with angiotensin II (Ang II), we found that the absence of CRP3 impairs the activation of the FAK-paxillin-p130CAS axis, a fundamental signaling pathway for mechanotransduction. In order to characterize the consequences of this deficiency, we analyzed the dynamics of the actin cytoskeleton, the phosphorylation of the myosin regulatory chain (MLC) and the PDGF-BB-dependent chemotaxis. F/G-actin ratio, inhibitory cofilin phosphorylation, and YAP levels were comparable in wild-type (WT) versus CRP3^{-/-} cells under basal conditions and in response to angiotensin II. In agreement, actin-dependent smooth muscle markers (α -SMA, calponin, MYH11 and smoothelin) as well as levels of MLC phosphorylation and contraction in response to KCl did not change between genotypes, suggesting that the absence of CRP3 does not affect the actin cytoskeleton. PDGF-BB-dependent chemotaxis was lower in CRP3^{-/-} cells, consistent with a deficiency in FAK signaling. This deficiency was shown to be uncoupled from changes in cell viability, as wild-type and CRP3^{-/-} cells show similar cell cycle progression. To confirm the dependence of FAK-dependent signaling events, we performed collagen gel contraction and

optical-magnetic twisting cytometry (OMTC) stiffness assays in the presence of FAK inhibitor (iFAK). While the contraction of WT cells was negatively impacted by iFAK, we did not observe any effect on CRP3^{-/-} cells. The OMTC assay demonstrated that cell rigidity is independent of FAK activation. Analysis of the structure of CRP3 evidenced the presence of two tyrosine residues capable of phosphorylation by FAK (Y57 and Y167), responsive to Ang II in cardiac cells, which may explain the dependence of CRP3 for FAK activation and contraction promotion. The data presented reveal that CRP3 is necessary for the activation of the FAK-paxillin-p130CAS axis, a necessary and sufficient signaling for migration and contractility. In the absence of CRP3, downstream signaling cascades are compromised, impairing environmental perception and mechanosignaling, key components of vascular mechanotransduction. Together, we present evidence that CRP3 influences mechanotransduction in aortic smooth muscle cells by acting as a bridge between actin and focal adhesions.

Descriptors: Aorta; Focal adhesions; Actin cytoskeleton; Muscle, smooth; Mechanotransduction, cellular; Signal transduction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A contração de células musculares lisas vasculares

A cada batimento cardíaco, a aorta é exposta a um aumento na tensão de parede e estiramento como consequência da natureza pulsátil do fluxo sanguíneo [1]. Células musculares lisas embebidas na matriz extracelular detectam estes estímulos físicos e utilizam a resposta contrátil como mecanismo que permite ajustes na secreção e na organização da matriz extracelular de acordo com as necessidades fisiológicas, contribuindo para manutenção do equilíbrio mecânico e integridade tecidual [2,3]. A contratilidade é regulada por fatores neurogênicos, mecânicos e humorais, cujas vias de sinalização controlam a ativação do aparato de actomiosina [4–6]. Este aparato é formado por filamentos finos ou fibras de actina; e filamentos (espessos) de miosina (Figura 1), formados a partir de processos randômicos de polimerização e fragmentação [7–10], cujas unidades básicas consistem em um dímero de cadeias pesada e quatro cadeias leves (duas essenciais [ELC] e duas regulatórias – [RLC/MLC]) [11]. Quando formado, o aparato de actomiosina cruza todo o corpo celular enquanto acoplado às adesões focais (Figura 1), formando uma rede filamentar necessária ao controle da homeostase vascular em resposta às deformações passivas e ativas de células musculares lisas [12].

1.1.1. Mecanismos cálcio-dependentes na regulação da contratilidade

Como em todas as células musculares, a contração de células musculares lisas vasculares é desencadeada por um pico na concentração de cálcio intracelular $[Ca^{+2}]_i$ (Figura 2). A ligação de agentes vasoativos (como a angiotensina II, endotelina e norepinefrina) aos seus receptores acoplados à

proteína G (GPCRs) estimula a hidrólise mediada por PLC de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) [13]. A solubilidade do IP₃ permite seu alcance aos receptores IP₃R, localizados na membrana do retículo endoplasmático e a subsequente liberação de íons Ca²⁺ no citoplasma [14,15].

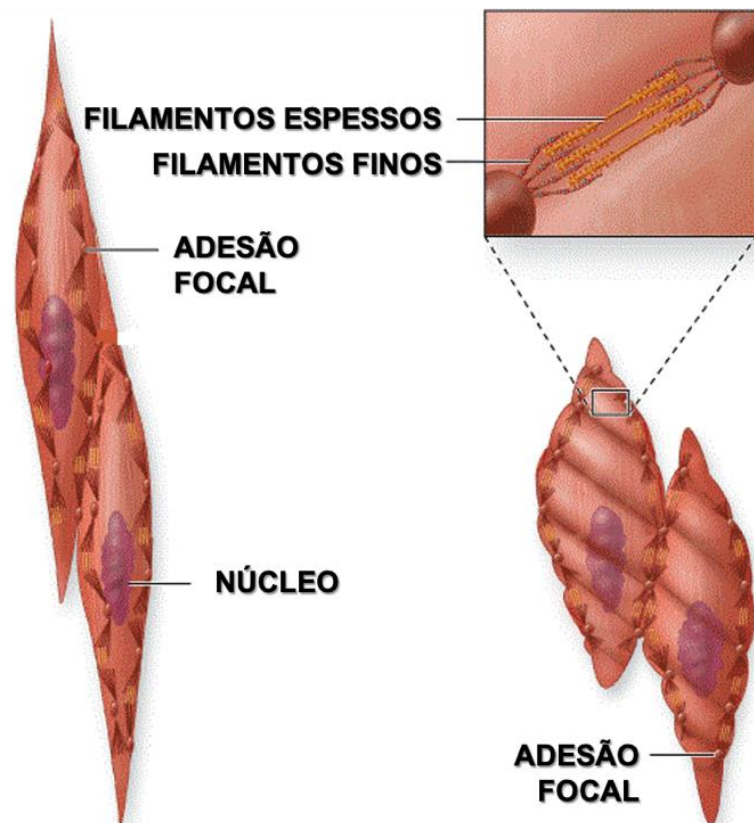


Figura 1. Células musculares lisas e aparato de actomiosina. Filamentos finos e filamentos espessos formam o aparato de actomiosina. Este aparato é ancorado às adesões focais e responsável pelo desenvolvimento de tensão e a contração, caracterizados pelo encurtamento celular. Adaptado de [16].

O resultante aumento da $[Ca^{+2}]_i$ favorece a formação de complexos Ca^{+2} calmodulina (CaM), que se ligam e ativam a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) [17]. Ao fosforilar os resíduos T18/S19 de MLC, a MLCK ativa a função ATPase da miosina [18–21], agora capaz de formar filamentos [22] e de deslizar em filamentos de actina para promover a contração [23–26].

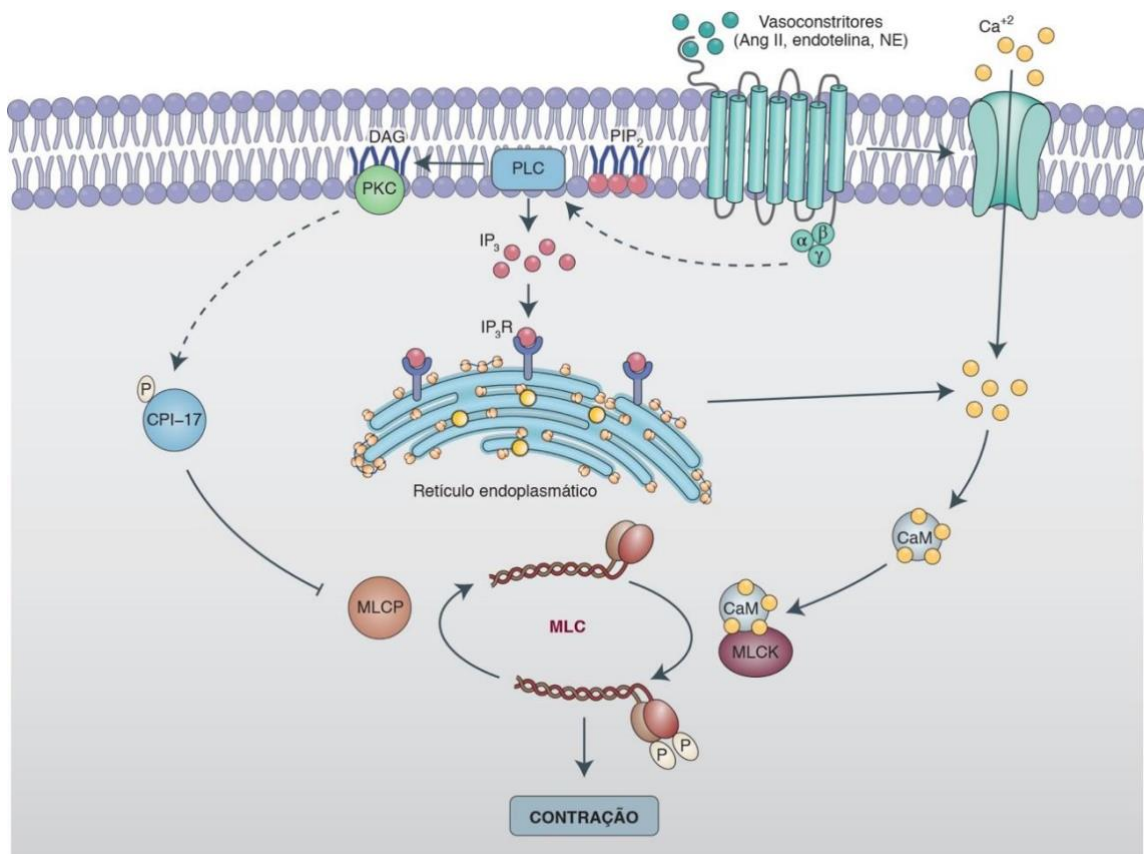


Figura 2. Mecanismos cálcio-dependentes na regulação da contratilidade de células musculares lisas vasculares. Agentes vasoativos (angiotensina II, endotelina e norepinefrina) atuando em seus GPCRs desencadeiam a ativação de PLC, que hidrolisa fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), gerando inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ atua em IP₃R no retículo sarcoplasmático, liberando íons Ca²⁺ no citoplasma e conseqüentemente aumentando a [Ca²⁺]_i. Ca²⁺ se liga a CaM, que ativa MLCK. A MLCK fosforila os resíduos T18/S19 de MLC (cadeia regulatória da miosina), induzindo a mudança de baixa para alta atividade ATPásica, promovendo o encurtamento de filamentos de actina e, portanto, a contração. DAG ativa PKC, que ativa a CPI-17 para inibir a MLCP, favorecendo a sustentação da resposta contrátil. A entrada de Ca²⁺ via canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem ou canais não seletivos também pode contribuir para a concentração intracelular durante após ocupação do receptor [56].

A atividade da MLCK é antagonizada pela fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), uma enzima heterotrimérica formada por uma subunidade catalítica (P1cδ), uma subunidade de função desconhecida e a subunidade 1 alvo da miosina (MYPT1) [27]. MYPT1 permite que a miosina se ligue e desfosforile MLC, constituindo assim, um alvo às vias de sinalização que visam sustentar a contratilidade, como o eixo DAG Proteína quinase C (PKC). DAG ativa PKC que fosforila (resíduo T38) CPI-17, um inibidor endógeno de MLCP.

CPI-17 fosforilado se liga à MLCP, impedindo sua atividade de fosfatase e assim, prolonga a sinalização contrátil mediada por MLCK [28–32].

Além da liberação de íons Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático, a $[\text{Ca}^{+2}]_i$ é modulada positivamente pela despolarização da membrana plasmática e subsequente abertura de canais de Ca^{+2} , tipo L (LTCC), promovendo influxo de Ca^{+2} e liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares Ca^{+2} -induzida [33–35]. Por sua alta condutância e expressão, a influência de LTCC predomina na $[\text{Ca}^{+2}]_i$, e, portanto, determina o estado contrátil de células musculares lisas vasculares [4,35]. No entanto, membros da família de canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) ativados por estiramento e canais de Ca^{+2} operados por estoque também induzem aumento na $[\text{Ca}^{+2}]_i$ após esvaziamento dos estoques intracelulares nos estágios precoces da contração [36–39].

1.1.2. Mecanismos Ca^{+2} -independentes na contração de células musculares lisas vasculares

Evidências sugerem que, mesmo com estimulação contínua de agentes vasoativos, o pico na $[\text{Ca}^{+2}]_i$ é breve e, portanto, deve se apoiar em mecanismos adicionais (como aqueles dependentes de PKC) para perpetuar a resposta contrátil [40–42]. No entanto, estes mecanismos apresentam regulação temporal que não coincide com a sustentada resposta contrátil observada quando agentes como endotelina e norepinefrina são utilizados para modular o tônus contrátil, sugerindo que mecanismos moleculares Ca^{+2} -independentes armazenam e perpetuam o sinal contrátil [40,43,44].

Postulou-se que o remodelamento do citoesqueleto de actina explicaria a contração persistente, já que para promover contratilidade, agentes vasoativos

induzem polimerização de actina [45], levando ao aumento na rigidez celular [46,47] que antecede a resposta contrátil. Notadamente, verificou-se que a estabilização de filamentos de actina com jasplakinolide aumenta a contratilidade, enquanto o tratamento com citocalasina D ou latrunculina (drogas que sequestram G-actina, impedindo a polimerização) reduz a contratilidade [48–52]. Estes eventos não afetam a homeostase cálcica, nem a montagem do aparato de actomiosina, sugerindo que as mudanças em actina estão desacopladas da ativação de MLC [42,48]. Entretanto, modelos experimentais em que há aumento na polimerização de actina não demonstram aumento na contração de células musculares lisas vasculares [47,53,54], sugerindo que a polimerização de actina é necessária, mas não suficiente para a sustentação da resposta contrátil.

Os experimentos de inibição da polimerização de actina proveram, no entanto, evidências para a descoberta dos mecanismos responsáveis pela contração sustentada. A aplicação concomitante de agentes vasoativos e citocalasina D previne os eventos de fosforilação de resíduos de tirosinas, um mecanismo regulatório que predomina em proteínas de adesão focal e que precede a polimerização de actina [47,51,55]. Sabendo que o citoesqueleto de actina depende de vinculina (uma proteína de adesão focal) para a regulação positiva da contração [56] e que os eventos de fosforilação de tirosinas culminam em crescimento das adesões focais [57], pode-se postular que adesões focais regulam a tensão baseada em actina, favorecendo a ciclagem adequada do aparato de actomiosina. Neste contexto, torna-se importante entender como adesões focais se formam e se organizam no espaço e tempo.

1.1.2.1. Integrinas e a organização das adesões focais

Tanto para perceber estímulos mecânicos, como para contrair, células musculares lisas vasculares se ancoram à matriz extracelular utilizando proteínas de superfície denominadas integrinas [58–60]. Integrinas se apresentam na forma de 24 heterodímeros α - β que não só se conectam à matriz extracelular, como também se ligam ao citoesqueleto de actina por meio de suas caudas citoplasmáticas [61]. Entretanto, esta ligação não é direta: tanto o reconhecimento da matriz quanto as forças que nela atuam mudam a conformação heterodimérica das integrinas, levando ao recrutamento de cerca de 2400 proteínas (coletivamente chamadas de “adesoma” [62–64]), que conectam as integrinas ao citoesqueleto de actina, originando as âncoras moleculares denominadas adesões focais [63].

A investigação do adesoma levou ao estabelecimento de um cerne estrutural, compostos por 60 proteínas fundamentais ao funcionamento das adesões focais, independentemente do tipo celular [64]. Posteriormente, verificou-se que estas proteínas são requeridas por estabelecerem uma organização hierárquica nas adesões focais (Figura 3), de forma a aperfeiçoar os processos de detecção (mecanopercepção) e resposta a deformações. Verificou-se integrinas engajadas com seus ligantes na matriz extracelular estavam ligadas a FAK e paxilina por suas caudas C-terminais na camada de sinalização; Talina, vinculina e o complexo IPP (ILK, PINCH e parvina) formam a camada de transdução de força, cujos sinais são transmitidos para as proteínas reticuladoras α -actinina, zixina e VASP que se encontram em íntima associação com as fibras de estresse [65,66]. Essa hierarquia foi descrita em diversos tipos

celulares, sugerindo que é dependente da homeostase mecânica entre a célula e seu ambiente, mas não de mecanismos célula ou tecido-específicos.

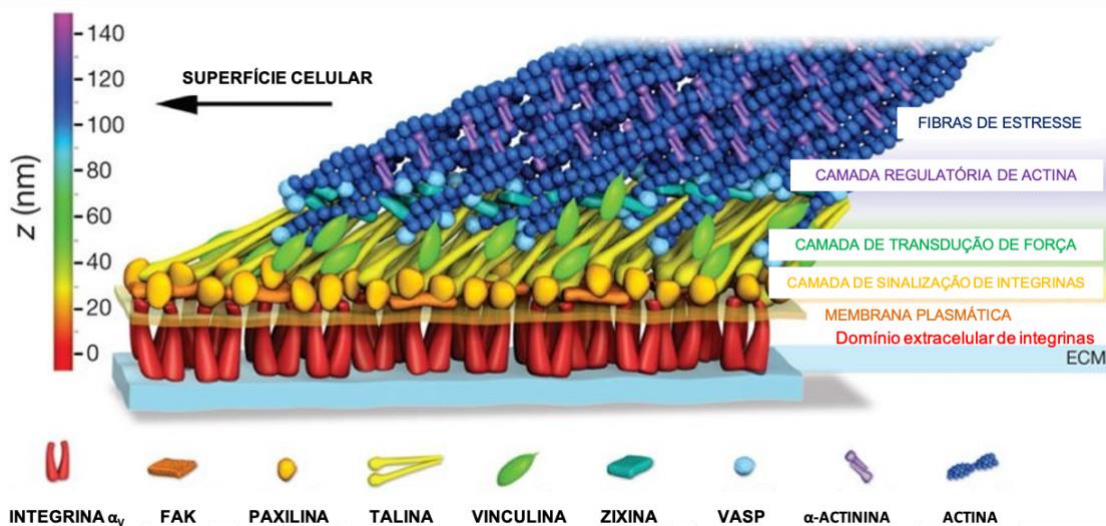


Figura 3. Arquitetura hierárquica de adesões focais. Integrinas na superfície celular se ligam a componentes da matriz extracelular por meio de domínios extracelulares. Na face citoplasmática adjacente à membrana, as caudas das integrinas se ligam a FAK e paxilina, formando a camada de sinalização. Na região intermediária, vinculina e talina compõe a camada de detecção de força, ligando as fibras de actina à cauda C-terminal das integrinas. Distalmente à membrana plasmática, encontram-se zixina, VASP e α -actinina, na camada regulatória de actina. A escala z mostra a distância (em nanômetros) entre as camadas e a membrana plasmática. Adaptado de (52).

1.1.2.2. Sinalização por adesões focais e a contração de células musculares lisas vasculares

Por meio da sinalização por adesões focais, as células são capazes de responder a mudanças na matriz extracelular por meio da resposta contrátil e controle da tensão celular. Em resposta a forças (sejam elas provenientes da matriz extracelular ou do aparato contrátil), há um fortalecimento das ligações matriz extracelular integrinas citoesqueleto de actina que é acompanhado de crescimento das adesões focais (processo denominado maturação), implicando em aumento da percepção (mecanopercepção) e sinalização por estímulos mecânicos. Turner e colaboradores [67] forneceram a base para o entendimento deste fenômeno na contração de células musculares lisas ao demonstrar que a

sinalização e o conseqüente crescimento das adesões focais levam ao remodelamento do citoesqueleto de actina e, portanto, à contração de células musculares lisas em resposta a diversos agentes vasoativos.

Adesões focais se formam após a ligação de integrinas a componentes da matriz extracelular (Figura 4: adesão a MEC). Forças hemodinâmicas (sinalização fora dentro) ou aumento na contratilidade baseada em miosina (sinalização dentro fora) aumentam a tensão no citoesqueleto de actina. Este aumento de tensão é detectado por talina, uma proteína citoplasmática que consiste em um domínio FERM N-terminal, formado por 4 segmentos globulares (F₀-F₃, coletivamente chamados de cabeça), uma região de ligação, 13 feixes α -helicoidais que formam a haste e uma α -hélice que medeia sua dimerização [68]. Durante o estabelecimento das adesões focais, talina utiliza o domínio FERM N-terminal para se ligar à cauda citoplasmática de β -integrinas, enquanto dois sítios em sua haste c-terminal se ligam aos filamentos de actina. Estes eventos culminam na extensão dos domínios extracelulares e separação das caudas citoplasmáticas α - β , levando à ativação de integrinas, que reconhecem e se ligam aos seus ligantes na matriz extracelular. Forças exercidas nestes ligantes ou geradas pelo aparato de actomiosina são percebidas pela haste c-terminal de talina, culminando no recrutamento de vinculina para reforçar as conexões entre integrinas e o aparato de actomiosina [56,68,69]. Coletivamente, estes eventos aumentam a afinidade de integrinas por seus ligantes e diminuem sua difusão na membrana plasmática, culminando na agregação de integrinas [70] (Figura 4: maturação da adesão induzida por força).

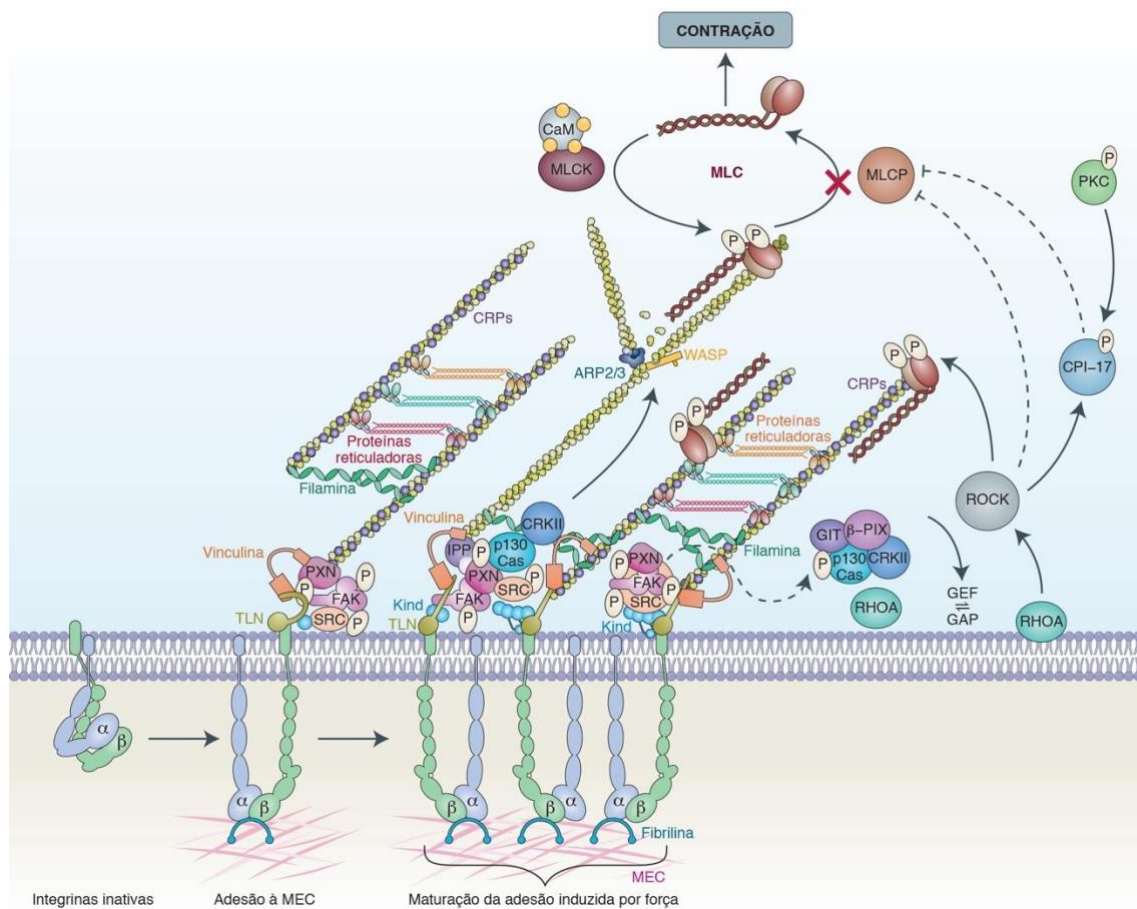


Figura 4. Organização das adesões focais e ativação das vias de sinalização que controlam a contratilidade. Integrinas estão presentes na membrana celular na forma de heterodímeros inativos. Ao reconhecerem seus ligantes na matriz extracelular (MEC; o reconhecimento de lâminas elásticas é auxiliado pela proteína fibrilina), integrinas recrutam proteínas estruturais (talina [TLN], kindlina [Kind] e vinculina), de sinalização (FAK, Src e paxilina [PXN]) e reticuladoras de actina (α -actinina, CRPs, filamina, VASP e zixina), estabelecendo uma estrutura mecanossensora denominada adesão focal (Adesão à MEC). Forças hemodinâmicas e a contratilidade baseada em actomiosina levam ao desdobramento de talina e exposição de sítios crípticos de ligação à vinculina, o que reforça as ligações actina-integrinas (maturação da adesão induzida por força). Forças também são detectadas pela FAK, que sofre autofosforilação, criando um sítio de interação para Src. O complexo FAK-Src então fosforila PXN e p130CAS, que juntas podem ativar N-WASP, promovendo a nucleação, ramificação e polimerização de actina pelo complexo Arp 2/3. A via de p130CAS-CRKII-GIT1- β PIX ou a ativação direta de p190RhoGEF por FAK levam à ativação de RhoA. RhoA ativa ROCK, que então fosforila MLC, MLCP e CPI-17, promovendo a ativação de MLC. Coletivamente, esses eventos restauram o equilíbrio mecânico entre células musculares lisas vasculares e seu microambiente e fornecem a maquinaria para que o ciclo de sondagem do microambiente reinicie. Adaptado de [71].

Em adição à talina, forças são percebidas por proteínas adaptadoras e sinalizadoras, que sofrem fosforilação em suas tirosinas para serem capazes de transformar força em via de sinalização bioquímica (processo denominado

mecanotransdução) [67,72,73]. Rápida fosforilação do resíduo Y397 de FAK é observada na contração de células musculares lisas vasculares, evento temporalmente regulado e que caracteriza FAK como um transdutor precoce de estímulos mecânicos [55,67,82,74–81]. Em células musculares lisas de veia porta, a fosforilação de Y397 em FAK é bifásica, atingindo pico entre cinco e dez minutos após o início do estiramento e aumentando novamente entre 24 e 72h [75]. A fosforilação deste resíduo cria sítio para ligação de Src [83,84], que fosforila FAK em diversos resíduos adicionais, levando à sua completa ativação [74,85]. Complexos FAK-Src coimunoprecipitam com a subunidade α_1 do LTCC [86] e sinalizam através de $\alpha_v\beta_3$ -integrinas para regular as correntes de cálcio responsáveis pela manutenção do tônus vascular e resposta contrátil [87–91]. Inibição de FAK-Src atenua as correntes de cálcio em resposta à ativação de integrinas [89], levando à vasodilatação e resposta vasoconstritora defeituosa [40,92].

As proteínas adaptadoras p130CAS e paxilina constituem os principais alvos à jusante da sinalização FAK-Src [93–95] e sinalizam via Rac e Rho para promover a polimerização de actina. Paxilina pode ser recrutada para as adesões focais por kindlina [96], onde sofre fosforilação nos resíduos de Y31 e Y118 por FAK-Src [97–101] e interage com vinculina, criando uma retroalimentação positiva para a mecanopercepção [102]. Semelhante à talina, p130CAS sofre modificações conformacionais em resposta a força [103], o que propicia sua fosforilação no resíduo Y165 por FAK-Src e Abl em resposta a agentes vasoativos [72]. Silenciamento de p130CAS atrapalha a formação de fibras de actina [104] e geração de forças em aortas de rato, apesar da ativação normal de MLC [105]. Y^{31}/Y^{118} Paxilina e Y^{165} p130CAS interagem com CRKII,

estabelecendo o *hub* de sinalização p130CAS–CRKII–N-WASP–Arp2/3, responsável pela ramificação e polimerização da actina [106–110] (Figura 4). O silenciamento de proteínas à montante nesta cascata de sinalização (por exemplo, Src ou Abl) impede a geração de força e a regulação da pressão sanguínea por células musculares lisas vasculares [72,95].

A polimerização de actina é acompanhada pelo recrutamento das proteínas reticuladoras α -actinina, VASP e zixina. A presença de α -actinina nas fibras de actina corresponde ao potencial contrátil [45,111], enquanto seu parceiro proteico VASP recruta G-actina e favorece a nucleação e ramificação de novos filamentos, além de inibir o capeamento de filamentos em crescimento [112–116]. Estes eventos são revogados quando VASP é silenciada ou fosforilada por PKG no resíduo S239, o que prejudica a contração [117–121]. Zixina é recrutada de forma força-dependente para as adesões focais, onde coopera com α -actinina e VASP [54,122,123]. Em resposta ao estiramento, zixina também se acumula no núcleo para induzir a expressão de mecanossensores, como a integrina α_8 em células musculares lisas vasculares [124]. A depleção de zixina reduz a contratilidade, a capacidade de espalhamento e a estabilização da actina na presença de jasplakinolide em células musculares lisas de cremaster de rato [53,54]. Embora a ausência de zixina seja parcialmente neutralizada pela ativação constitutiva de RhoA e maior polimerização de actina, seu silenciamento impede a adaptação de células musculares lisas vasculares ao estiramento, levando ao colapso das fibras de actina na periferia da célula [54].

As proteínas reticuladoras de actina formam camadas intercaladas com miosina nas fibras de actina [125]. A ativação de FAK-Src desencadeia a

transição de RhoA de inativa (ligada a GDP) para ativa (ligada a GTP) por meio da fosforilação do fator de troca de guanina p190RhoGEF [126–128]. A ativação de Arhgef1 (um ativador RhoA em células musculares lisas vasculares que é independente de FAK) também contribui para essa sinalização [129]. RhoA ativa a rho quinase (ROCK), que então fosforila MLC da miosina muscular e da miosina não-muscular II (NM-II) no resíduo S19 [130–133] e também MYPT1 nos resíduos T696 e T850 [134,135], diminuindo a atividade MLCP [136] e induzindo a dissociação da holoenzima [137], respectivamente. Da mesma forma que PKC, ROCK também fosforila CPI-17 no resíduo T38, levando à fosforilação sustentada de MLC e contração, mesmo na ausência de vasoconstritores [138,139], destacando o papel desta via de sinalização na manutenção do tônus vascular e, portanto, na regulação da pressão arterial por células musculares lisas vasculares [140].

A fosforilação do resíduo S19 de NM-II também desempenha papel importante na maturação das adesões focais, já que seus filamentos adjacentes às adesões focais estabelecem um feedback positivo de força, expondo sítios críticos e induzindo a formação de complexos proteína-proteína [68,100,103,141,142]. A relevância do acúmulo de proteínas nas adesões focais para a resposta contrátil foi recentemente demonstrada pelo uso de blebistatina, um inibidor específico de NM-II. A droga preveniu a geração de força e o aumento de rigidez em anéis aórticos expostos a KCl ou norepinefrina, um fenômeno associado à ausência dos eventos de fosforilação de tirosinas em proteínas de adesão focal [143], em linha com evidências anteriores de contração defeituosa em camundongos mutantes para NM-II [144].

1.2. Proteína rica em cisteína e glicina-3 (CRP3)

1.2.1. Os domínios LIM

A presença de proteínas adaptadoras é essencial à formação de complexos proteína-proteína mediados por NM-II nas adesões focais. Em função da sua capacidade de recrutar proteínas específicas, proteínas adaptadoras são capazes de promover a subcompartimentalização celular de determinadas proteínas, alterando assim a sua atividade e interação com parceiros proteicos. Dentre as inúmeras proteínas adaptadoras eucarióticas, as proteínas que possuem em sua estrutura o domínio LIM são reconhecidas como essenciais à integração de vias de sinalização intracelular [145].

O domínio LIM foi inicialmente observado em 1988 por Way e Chalfie que, ao isolarem o *cDNA* codificador da proteína MEC-3 de *Caenorhabditis elegans*, observaram a presença de uma sequência que não havia similaridade com nenhum domínio descrito à época [146]. Posteriormente, a clonagem dos genes codificantes da proteína de linhagem celular-11 (LIN-11) de *C. elegans* [147] e da proteína ligante do *enhancer* do gene da insulina (Isl1) [148] permitiu a caracterização da sequência rica em cisteínas, denominada domínio LIM em referência aos três protótipos LIN-11, Isl1 e MEC-3 [149].

Domínios LIM individuais possuem ~ 55 aminoácidos, sendo que 8 são resíduos de cisteína ou histidina conservados [149]. A análise estrutural revelou que o número e espaçamento destes resíduos tem por objetivo a coordenação de íons metálicos, estabelecendo então a topologia de dedos de zinco em tandem dos domínios LIM [150–153] (Figura 5), presente em cerca de 135 proteínas do genoma humano [154], abundância similar à de domínios como o domínio de homologia à Src (SH)- 2 e 3 [145]. Inicialmente, acreditava-se que

muitas das proteínas LIM apenas se associavam com o citoesqueleto de actina e estruturas adjacentes. Conforme os estudos evoluíram, notou-se que proteínas como zixina e CRP3 transitavam entre o núcleo o citoplasma [124,155,156], promovendo a integração das vias de sinalização bioquímica aos eventos transcricionais que coordenam o destino celular.

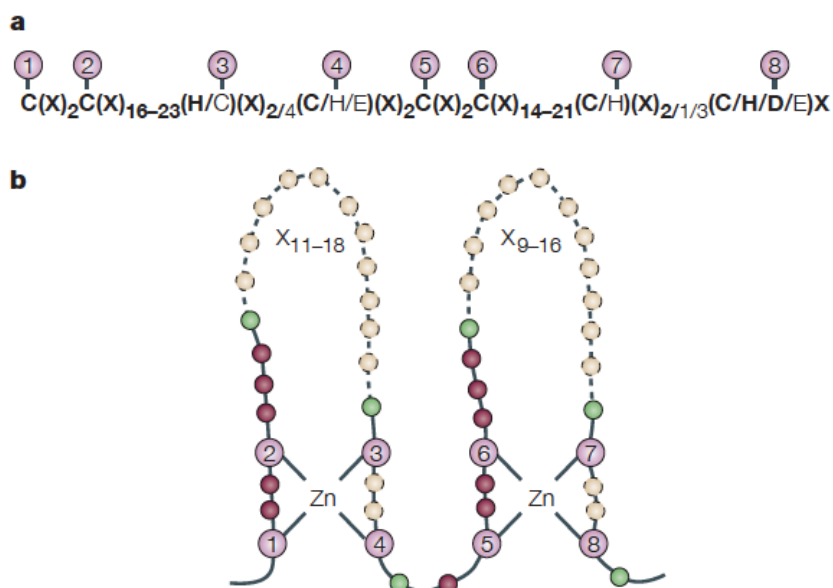


Figura 5. Sequência e topologia dos domínios LIM. a. Sequência consenso do domínio LIM, indicando a localização e identidade dos 8 resíduos coordenadores de zinco. Aminoácidos de maior frequência são representados em negrito, enquanto variações com frequência < 10% são apresentadas sem destaque. C, cisteína; H, histidina; E, ácido aspártico; X, aminoácido variável. b. Topologia da coordenação dos íons de zinco, indicando o espaçamento ótimo por resíduos invariantes (em magenta) e resíduos variantes (em amarelo). Adaptado de [154].

1.2.2. CRP3

CRP3 é pertence à família CRP de proteínas adaptadoras LIM, conservadas evolutiva e funcionalmente. A estrutura de CRP3 consiste em dois domínios LIM, espaçados por uma alça rica em glicina, onde também se encontra um putativo sinal de localização nuclear [157,158] (Figura 6).

A identificação e a localização subcelular de parceiros proteicos de CRP3 têm sido utilizadas para entender suas funções, já que estas se baseiam na facilitação de interações proteína-proteína. Por meio da interação com actina

[158,159], α -actinina, zixina [158] e cofilina [160,161] (fator de despolimerização de actina), postula-se que CRP3 seja indispensável à estrutura celular, visto que tanto a ausência de CRP3 em camundongos [162,163], quanto mutações no gene humano de CRP3 [164–167] levam ao fenótipo de cardiomiopatia dilatada, caracterizada por desarranjo estrutural cardíaco.

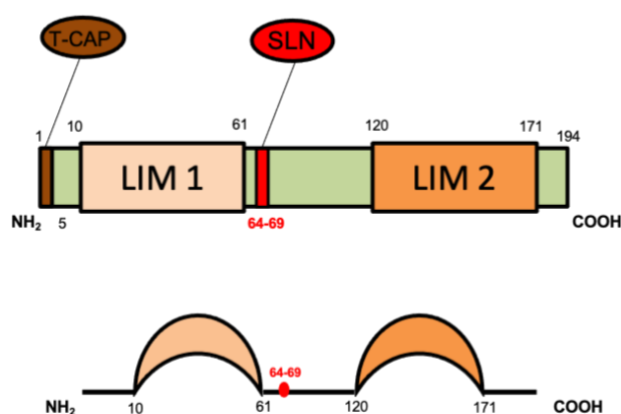


Figura 6. Topologia de CRP3. CRP3 é uma proteína de 194 aminoácidos que constituem o domínio de interação com T-CAP (1-5), domínios LIM (10-61; 120-171) e o sinal de localização nuclear (SLN, 64-69).

Além do papel estrutural de CRP3, evidências apontam para participação na mecanotransdução, já que em resposta a agonistas, CRP3 sofre translocação nuclear em cardiomiócitos [156] e promove a formação de complexos proteicos que ancoram fibras de actina aos discos Z e aos costâmeros [158,162,164,168–170]. Em suporte a esses achados, foi demonstrado que CRP3 interage com o fator de transcrição Miz-1 [171], permitindo a adaptação e sobrevivência de cardiomiócitos na presença de estímulos mecânicos. Notadamente, cardiomiócitos de animais CRP3^{-/-} demonstram incapacidade de adaptação ao estiramento [164,167].

1.2.2.1. CRP3 e as respostas fisiológicas e patológicas vasculares

Em concordância com o putativo papel na mecanotransdução cardíaca, foi demonstrado que CRP3 também pode atuar como um mecanossensor em células musculares lisas vasculares. Em contraste aos estudos iniciais que postulavam que a expressão se restringia às células musculares estriadas [158], nosso grupo demonstrou que CRP3 é expresso constitutivamente em células musculares lisas arteriais, mas ausente em células venosas [172]. Ao submeter uma veia a condições arteriais de pressão e fluxo (de forma a mimetizar a adaptação da veia safena utilizada como ponte na revascularização cardíaca [173]), verificou-se que o estiramento induz a expressão de CRP3 em células musculares lisas [172], sugerindo que CRP3 pode atuar como mecanossensor em células vasculares.

A fim de entender o papel de CRP3 nas respostas vasculares às forças hemodinâmicas, foi utilizada a tecnologia de nuclease de dedo de zinco para gerar um rato CRP3^{-/-} através da deleção dos nucleotídeos CATGC e inserção de um A no éxon 1, levando a mudança na janela de leitura aberta e, portanto, ausência de CRP3, como confirmado por *western blotting*. Ao utilizar estes animais em um modelo de arterialização (anastomose término-término da artéria carótida com a veia jugular [174]), viu-se que o espessamento compensatório (também conhecido como Fenômeno de Glagov [175]) da parede da veia jugular selvagem [176] era exacerbado em animais CRP3^{-/-} [176]. O desequilíbrio na adaptação da veia jugular CRP3^{-/-} foi atribuído à ausência de apoptose de células musculares lisas nos estágios iniciais do processo e não ao estímulo proliferativo de células musculares lisas aórticas. Ao analisar a via candidata integrinas–FAK–Akt, que controla sobrevivência e morte celular, constatou-se que a

apoptose em células musculares lisas de jugular selvagem estava associada à inibição desta via, propiciando o acúmulo de Bax e a consequente liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais (por exemplo, o citocromo c). Em contraste, células CRP3^{-/-} demonstraram ativação sustentada da via integrinas–FAK–Akt e, portanto, não sofriram apoptose [176] (Figura 7). O papel de CRP3 foi atribuído a sua interação com FAK em células musculares lisas de jugular [176], sugerindo que CRP3 pode atuar como regulador desta via de sinalização em condições fisiológicas.

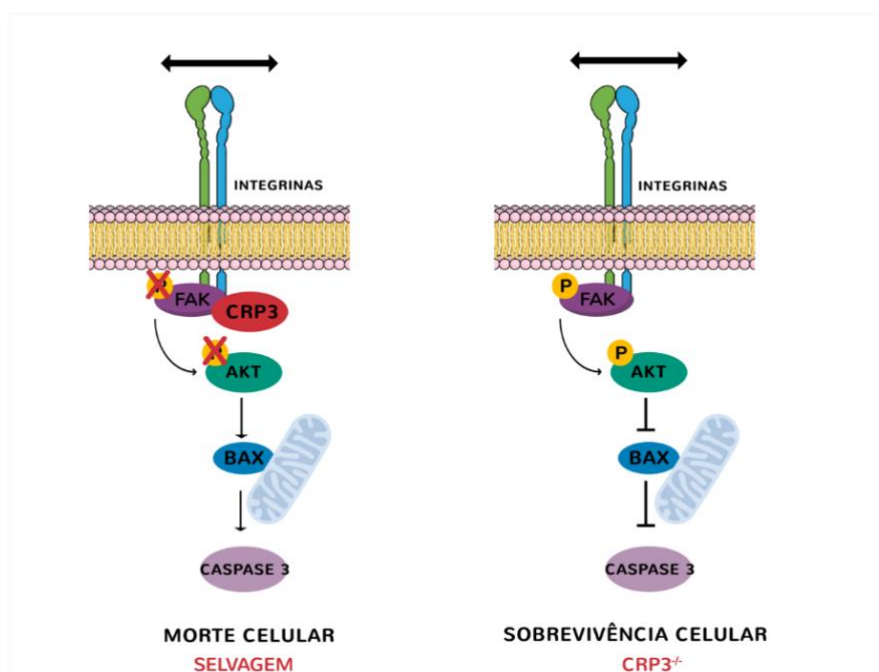


Figura 7. Via de sinalização candidata à resposta adaptativa de células musculares lisas de jugular ao estiramento. Em células selvagens, a exposição ao estiramento em associação à ceramida (indutor de via apoptótica intrínseca) diminuiu a ativação de FAK e Akt (mediada por fosforilação nos resíduos Y397 e S243, respectivamente), permitindo acúmulo de Bax, liberação de fatores apoptóticos mitocondriais e clivagem de caspase 3. Em contrapartida, células CRP3^{-/-} apresentaram ativação sustentada de FAK e Akt, impedindo assim a ativação da via apoptótica.

1.2.2.2. CRP3 e as adesões focais

Considerando as evidências de que a ausência de CRP3 altera a sinalização mediada por FAK, postulamos que CRP3 influenciaria o funcionamento das adesões focais. Utilizando células musculares lisas de aorta

(que expressam CRP3 em condições basais), foi verificado que CRP3 e paxilina (marcador de adesões focais) colocalizam (Figura 8a) e, em concordância com a ativação desbalanceada de FAK em células musculares lisas de jugular CRP3^{-/-}, observou-se que células musculares lisas aórticas CRP3^{-/-} apresentam adesões focais maiores quando comparadas às células selvagens em condições basais. No entanto, após a estimulação com angiotensina II (Ang II), as adesões focais de células CRP3^{-/-} não sofreram aumento do tamanho médio, em contraste com as células selvagens (Figura 8b) [177].

O fenótipo de adesões maiores em condições basais e a incapacidade de remodelamento recapitulam o observado em células onde a sinalização via FAK está prejudicada [178]. Logo, conjecturamos que a ausência de CRP3 promove desacoplamento entre os eventos de sinalização em nível de integrinas/adesão focal e o citoesqueleto de actina. De fato, apesar de apresentarem adesões focais maiores, células musculares lisas aórticas CRP3^{-/-} apresentam contratilidade deficiente (Figura 8 c, d) tanto no basal quanto após exposição à Ang II. No entanto, o envolvimento de CRP3 na sinalização via FAK nas adesões focais e a consequência para a contratilidade baseada em actomiosina em células musculares lisas carecem de elucidação. Em face destas evidências, a nossa hipótese é que CRP3 age como interface actina-adesões focais, necessária a garantir a mecanotransdução adequada de células musculares lisas aórticas.

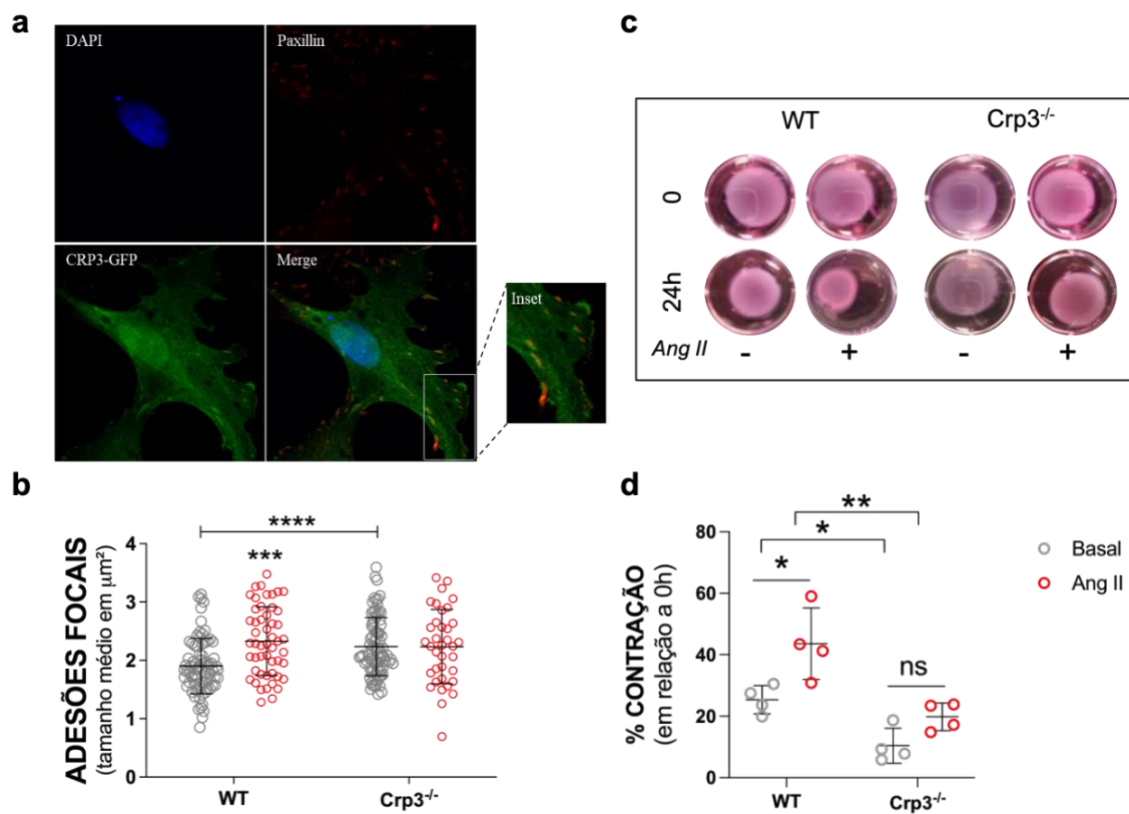


Figura 8. CRP3 está presente nas adesões focais e sua ausência leva ao aumento no tamanho das adesões focais e redução da contratilidade de células musculares lisas aórticas. *a.* Imagem representativa de ensaio de imunofluorescência para paxilina realizada em células musculares lisas selvagens expressando CRP3-GFP, demonstrando a colocalização de CRP3 com paxilina em *merge* e *inset*. Magnificação: 40x e 63x ($n=3$). *b.* gráfico representativo da análise das adesões focais, demonstrando maior tamanho de adesões focais em células CRP3^{-/-} em comparação às células selvagens ($n= 78$ WT e $n=82$ CRP3^{-/-}). *c.* imagens representativas e *d.* quantificação da contração em gel de colágeno, mostrando reduzida capacidade contrátil de células CRP3^{-/-} em comparação com células selvagens após 24h na presença de meio basal. $n=4$. Adaptado de [177]

2. OBJETIVO

O objetivo desta tese foi avaliar a hipótese que CRP3 modula eventos de sinalização nas adesões focais, influenciando a mecanotransdução em células musculares lisas aórticas.

3. MÉTODOS

3.1 Obtenção de aortas

Ratos Wistar selvagens (WT) e CRP3^{-/-} foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Animais de 3 meses de idade, pesando entre 250 e 350 g foram eutanasiados com injeção letal de pentobarbital, seguida da coleta das aortas, mantidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2mM; antibiótico/antimicótico 100 U/ml; pH 7,4). Este procedimento foi aprovado e realizado de acordo com as normas de utilização de animais de laboratório do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Coração (SDC: 5146/20/175; Anexo 1).

3.2. Extração de células musculares lisas

Células musculares lisas de aorta de ratos selvagens e CRP3^{-/-} foram obtidas por *explant*, um método já estabelecido no laboratório [172,176,179]. Para isso, as aortas foram abertas longitudinalmente e tiveram o tecido conjuntivo externo e a camada endotelial removidos com auxílio de uma pinça. O tecido resultante foi cortado em fragmentos de ~ 0,5 cm² e depositado com a face luminal virada para baixo em placas de seis poços tratadas com gelatina porcina a 3 %. Adicionou-se 1 ml de DMEM *high glucose* suplementado com 20 % de soro fetal bovino (FBS) inativado, 100 µl/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina (meio basal) e, após a incubação de 5 min para adesão dos fragmentos, as placas foram mantidas a 37 °C, com atmosfera umedecida e enriquecida com 5 % de CO₂ por uma semana. Após este período, pode-se

observar a migração e proliferação das células em resposta ao soro. O meio de cultura foi então trocado em dias alternados, até que já houvesse células suficientes para a ampliação da cultura e plaqueamento em garrafas de 75 cm². As células foram mantidas em cultura até o preenchimento total da área das garrafas, quando as culturas foram devidamente ampliadas (máximo de 6 passagens) para os ensaios.

3.3. Ensaio de espalhamento celular

Células musculares lisas de aorta foram tripsinizadas e plaqueadas em *culture slides* previamente tratados com solução de gelatina porcina a 3 %. Nos períodos de 2 e 24 h, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4%, coradas com Alexa 555-faloidina e fotografadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Observer Z1 em objetiva de 40 x com óleo de imersão. A área das células nos períodos indicados foi considerada representativa da capacidade de espalhamento nos diferentes fenótipos, como descrito em [180].

3.4. Análise da secreção de colágeno do tipo I

Células musculares lisas aórticas foram plaqueadas à densidade de 4×10^5 em placas de 35 mm. No dia seguinte, o meio basal foi substituído e, 8 h após a troca, uma alíquota do meio de cultura foi coletada e analisada por *western blot*, como descrito no item a seguir para a determinação dos níveis secretados de colágeno I.

3.5. Western blot

Células musculares lisas aórticas (4×10^5 células) foram cultivadas em placas de seis poços pré-tratadas com gelatina porcina a 3 %. No dia seguinte, as células foram privadas de soro (meio DMEM *high glucose* 0,1 % FBS) e, após 24h, foram expostas à angiotensina II (1 μ M; Sigma) por 2,5 min e lisadas com tampão RIPA (NaCl 150 mM; 0,5 % desóxicolato de sódio; 1 % Triton ®; Tris-HCl 50 mM; 0,1 % SDS; inibidores de fosfatases e proteases 1:300 v/v; PMSF 1:1000 v/v; pH 8) para a obtenção das proteínas.

Os lisados foram centrifugados a 14000 RPM por 15 min a 4 °C para remoção de debris. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, a partir do qual a dosagem de proteínas foi realizada, de acordo com o método de Pierce [181]. Neste método, a reação do biureto (redução de Cu^{+2} a Cu^+ na presença de proteínas em meio alcalino) é acoplada à detecção colorimétrica do cátion Cu^+ pelo ácido bicinconínico, gerando um produto roxo de absorção a 562 nm, lido por espectrofotometria (Wallac Victor², Perkin Elmer).

Alíquotas de 20 μ g de proteína ou 10 μ l de meio foram ressuspendidas em tampão de amostra para eletroforese, fervidas por 10 min a 95 °C e separadas em gel de 10 % de poliacrilamida-SDS (1,5 mm de espessura), de acordo com Laemmli [182]. Para determinar o peso molecular aproximado das proteínas, 10 μ l de padrão molecular (Precision Plus Protein KaleidoscopeTM Standards, Bio-Rad) correram em paralelo. As amostras foram aplicadas nos poços do gel submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM pH 7,4; Glicina 192 mM) e a corrida ocorreu a 120 V, sendo interrompida quando as amostras atingiram o limite inferior do gel.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham™Hybond™, GE Healthcare), previamente hidratada com metanol 100 % por 1 min, lavada com tampão TBS-T (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; 0,1 % Tween-20) e equilibrada em tampão de transferência (Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; 20 % metanol). A transferência ocorreu em um sanduíche imerso em tampão de transferência, sobre o qual uma corrente de 90 V foi aplicada por três horas a 4 °C. Após a transferência, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; 0,1 % Tween-20; 5 % albumina sérica bovina) por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. Subsequentemente, a membrana foi incubada com solução de anticorpo primário sob agitação a 4 °C até o dia seguinte (Tabela 1). Ao final desta incubação, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 min com TBS-T e incubada com o anticorpo secundário (1:2000 v/v, Invitrogen) em solução de bloqueio por 1 h à temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada, e exposta por 1 min à solução para detecção quimioluminescente (Tris 1,5 M pH 8,9; luminol 1,25 mM; ácido p-coumárico 200 µM; H₂O₂ 5,4 mM e água), seguida da visualização das bandas (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) e análise densitométrica (Image J).

3.6. Imunofluorescência

3 x 10³ células cultivadas em poços de *culture slides* (BD Falcon; previamente tratados com 3% de gelatina) foram privadas de soro e subsequentemente tratadas com angiotensina II (1 µM; Sigma) por 2,5 min. Após o tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4 % em PBS por 15 min, lavadas com TBS e permeabilizadas em solução de Odyssey® Blocking

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de *western blot*

ANTICORPO PRIMÁRIO	FORNECEDOR E CATÁLOGO	DILUIÇÃO v/v
α-SMA	Abcam (ab7817)	1:1000
Calponina	Millipore (#04-589)	1:1000
Cofilina	Abcam (ab42824)	1:2000
Cofilina^{S3}	Abcam (ab12866)	1:2000
Colágeno I	Abcam (ab34710)	1:1000
CRP1	Abcam (ab175319)	1:1000
CRP2	Abcam (ab229710)	1:1000
ERK 1/2	Cell Signaling (#9102)	1:1000
ERK 1/2^{T202/Y204}	Cell Signaling (#4377)	1:1000
FAK	Cell Signaling (#3285)	1:1000
FAK^{Y397}	Abcam (ab81298)	1:1000
GAPDH	Abcam (ab22555)	1:2000
ILK	Abcam (ab52480)	1:1000
ILK^{S246}	Millipore (AB1076)	1:1000
MYH11	Santa Cruz (sc-6956)	1:1000
Paxilina	Abcam (ab32084)	1:1000
Paxilina^{Y118}	Abcam (ab75740)	1:1000
P130CAS	Abcam (ab31831)	1:1000
P130CAS^{Y145}	Abcam (ab22914)	1:1000
Smoothelina	Santa Cruz (sc-28562)	1:1000
YAP	Abcam (ab52771)	1:1000

Buffer (LI-COR) suplementada com 0,01 % de NP-40. Para a análise dos níveis de fosforilação de MLC, as células foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-MLC (T18/S19, Thermo Fisher PA5-17727) 1:100 v/v. O anticorpo primário foi removido, os poços foram lavados 3x com TBS e incubados com solução de faloidina-Alexa 555 (1:300 v/v Molecular Probes), DAPI (1:500 v/v) e

anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa 488 (1:300 v/v Molecular Probes).

Para a razão F/G-actina, após a permeabilização as células foram incubadas com solução de faloidina-Alexa 555 (1:300 v/v Molecular Probes), Ribonuclease A-Alexa 488 (1:100 v/v Molecular Probes) e DAPI 1:500 (v/v) por 1 h à temperatura ambiente.

Para quantificar o número de adesões focais, após a permeabilização as células foram expostas ao anticorpo anti-paxilina (Abcam ab32084, 1:100 v/v) diluído em Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR) a 4 °C por 16 h. Removeu-se o anticorpo primário, os poços foram lavados 3x com TBS e incubados com solução de DAPI (1:500 v/v) e anticorpo secundário anti-coelho Alexa 555 (1:300 v/v; Molecular Probes).

Após a incubação das marcações, foram realizadas 3 lavagens com TBS e as lâminas foram montadas com Fluoromount™ aqueous mounting media (Sigma) e fotografadas no Zeiss Axio Observer Z1, com objetiva de 40x e óleo de imersão.

A quantificação de fluorescência se deu no programa Image J (National Institutes of Health, EUA). Para os experimentos de p-MLC e razão F/G-actina, foi considerada a área da célula, bem como a fluorescência de regiões adjacentes como normalizadores da intensidade de fluorescência medida, expressa como fluorescência celular total corrigida (CTCF). Já a contagem de adesões focais se deu a partir da função “análise de partículas”. Foram utilizadas células de 3 animais diferentes por genótipo (replicatas biológicas) e, para cada replicata biológica, analisou-se no mínimo 20 células.

3.7. Ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden

A capacidade migratória de células musculares lisas foi determinada pelo ensaio de migração em câmara de Boyden [183]. Esta técnica considera a capacidade celular de migrar em função de fatores de crescimento (quimiotaxia) ou de um gradiente de moléculas de matriz extracelular (haptotaxia). O ensaio consiste em duas câmaras separadas por uma membrana microporosa. As células são plaqueadas na câmara superior e migram em resposta ao agente quimioatrativo presente no meio de cultura da câmara inferior. Essa resposta é avaliada após um determinado período e reflete na capacidade migratória celular.

As condições para o ensaio com células musculares lisas foram determinadas de acordo com o descrito anteriormente [184]. Em resumo, 48 h após privação de soro, 5×10^4 células foram ampliadas e semeadas em membrana de policarbonato (poro de 8 μm ; Whatman) no poço superior de uma câmara de Boyden modificada. No poço inferior, 20 ng/ml de PDGF-BB (Peprotech) foram usadas como estímulo quimiotático e a câmara foi incubada por 4 h a 37 °C. Após o período, o lado superior foi limpo para remover as células que não migraram, enquanto o lado inferior da membrana foi corado com DAPI e fotografado em microscópio invertido para a quantificação de núcleos.

3.8. Análise de ciclo celular

A análise do ciclo celular leva em conta a capacidade do Iodeto de Propídeo (IP) de intercalar sulcos principais de DNA de fita dupla, originando sinal altamente fluorescente quando excitado a 488 nm. Como IP se liga estequiometricamente ao DNA, as subpopulações celulares nas fases G_0/G_1 , S

e G2/M podem facilmente ser identificadas por citometria de fluxo com base na intensidade do sinal de fluorescência. Para isso, células musculares lisas selvagens e CRP3^{-/-} foram plaqueadas à densidade de 4×10^5 em meio basal. A fim de sincronizar o ciclo celular, as células foram privadas de soro por 24 h e estimuladas com meio basal por adicionais 24 h. Ao findar deste período, as células foram fixadas com etanol gelado, marcadas com IP 10 µg/ml (Molecular Probes) e analisadas em citômetro de fluxo Accuri™ C6 (Becton Dickinson). Os perfis do ciclo celular foram posteriormente analisados usando o FCS Express 4 Flow Research Edition e expressos como a porcentagem de eventos (células) em cada população, de acordo com a intensidade de fluorescência detectada.

3.9. Ensaio de contração em gel de colágeno

O ensaio de contração em gel de colágeno consiste na confecção de uma mistura de colágeno do tipo I e células que, ao polimerizar a 37 °C gerará um disco, cuja deformação ao longo do tempo refletirá na capacidade contrátil de uma dada célula em resposta a um determinado estímulo. Para isso, 2×10^5 células foram ressuspensas em meio sem soro e adicionadas à uma mistura de água, colágeno tipo I (BD Biosciences), NaOH 1 M e PBS 10x. A mistura foi colocada em placas de 12 poços e incubada por 1 h a 37 °C. Após a polimerização, os discos foram soltos da placa com auxílio de uma agulha e depositados em placas de 24 poços. Foram obtidas imagens dos diâmetros dos discos no tempo 0 e após 24 h de estimulação com PF-573228/iFAK, (Sigma, 3 µM). A partir do diâmetro dos discos no tempo 0 (100 %), determinou-se a % de redução em 24 h, que consistiu na capacidade contrátil de cada célula.

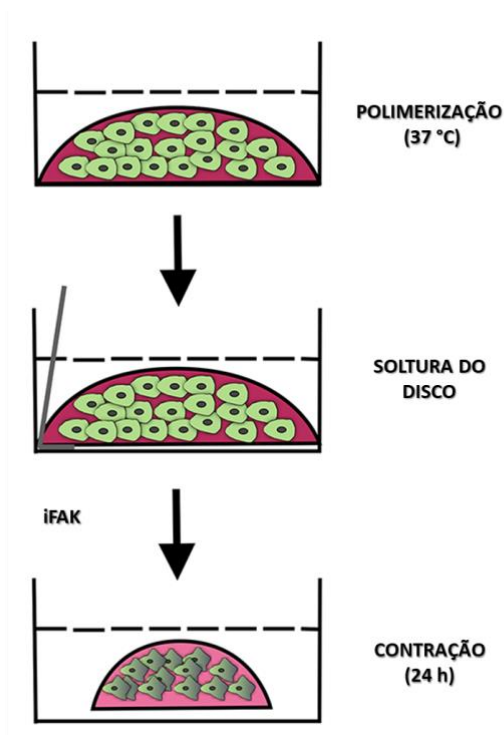


Figura 9. Representação gráfica da contração em gel de colágeno. Uma mistura de colágeno I e células é incubada a 37 °C. Ao polimerizar, esta mistura gera um disco de células embebidas em uma matriz de colágeno. O disco é solto do poço, tem seu diâmetro medido no tempo 0 e 24 h, permitindo avaliar a contratilidade em 24 h. Adaptado de [185].

3.10. Citometria magnético-óptica de oscilação (OMTC)

A citometria magnético-óptica de oscilação (OMTC) consiste na utilização de grânulos ferromagnéticos adsorvidos pelo tripeptídeo sintético RGD (ácido arginilglicilaspártico), que se ligam às integrinas na superfície celular. Como as integrinas estão intimamente ligadas ao citoesqueleto de actina, a oscilação dos grânulos em resposta a um campo magnético pode ser utilizada para definir a rigidez celular.

3.10.1 Preparo dos grânulos ferromagnéticos

Grânulos ferromagnéticos com 4,5 µm de diâmetro foram lavados com PBS, ressuspensos em solução tamponada de carbonato estéril a 1 mg/ml contendo RGD e mantidos sob agitação constante a 4 °C até o uso.

3.10.2 Cultivo celular para o ensaio de OMTc

Placas de 96 poços previamente tratadas com solução de gelatina porcina a 3 % foram utilizadas para o plaqueamento de $1,5 \times 10^4$ células em meio de cultura basal. Após 24 h, as células foram privadas de soro, expostas à solução de grânulos ferromagnéticos e incubadas por 20 min a 37 °C, em atmosfera umedecida e enriquecida com 5 % de CO₂. Após este período, foi realizada uma lavagem com meio de cultura para remoção dos grânulos frouxamente ligados às células e procedeu-se com o tratamento (Ang II, [Sigma] 1 µM; PF-573228/iFAK, [Sigma] 3 µM).

3.11.3 OMTc

Poços isolados das placas de 96 poços foram colocados no centro de bobinas de magnetização, que se encontravam acopladas a um microscópio com câmera de vídeo. Os grânulos foram rapidamente magnetizados horizontalmente (9000 G) e então verticalmente (90 G). A magnetização vertical possui caráter oscilatório, que deforma o citoesqueleto de actina adjacente aos grânulos. A movimentação dos grânulos foi registrada por imagens obtidas pela câmera CCD, no aumento de 10 x.

3.11.4 Análise dos dados

A partir das imagens, pode-se calcular a razão entre o torque aplicado ($T^*\omega$) e o deslocamento dos grânulos ($d^*\omega$) por meio da Transformada de Fourier (Equação 1), resultando no módulo complexo (g^*), que está ligado por um fator geométrico com o módulo complexo de cisalhamento da célula e expresso em Pascal (Pa) por nanômetro:

$$g^* \omega = g'(\omega) + ig''(\omega) = \frac{T^*\omega}{d^*\omega} \quad (1)$$

Do valor gerado, derivou-se o módulo elástico do citoesqueleto adjacente (g'), o módulo dissipativo (resistência, g''), e η (histerese, razão g''/g').

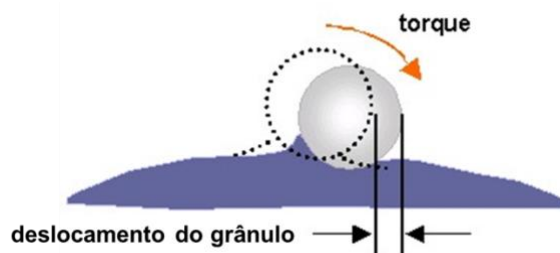


Figura 10. Representação gráfica do ensaio de citometria magnético-óptica de oscilação (OMTC). As células são expostas a grânulos ferromagnéticos recobertos por RGD, que se ligam às integrinas na superfície celular. A aplicação de um campo magnético leva ao deslocamento dos grânulos que, ao ser analisado, permite a determinação da rigidez celular.

3.11. Análise de contração de anel aórtico

A fim de determinar as propriedades contráteis, aortas abdominais de ratos selvagens e $CRP3^{-/-}$ foram segmentadas em anéis, livres de tecido conectivo e endotélio (removido mecanicamente com agulha). Os anéis foram incubados em 5 ml de tampão de Krebs-Hanseleit (NaCl 115 mM; KCl 4,6 mM; $CaCl_2$ 2,5 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1,2 mM; $NaHCO_3$ 25 mM; Glicose 11,1 mM) e mantidos à temperatura constante de 37 °C e continua gaseificação para manutenção do pH a 7.4. Cada anel aórtico foi conectado a

dois fios metálicos conectados a um transdutor de força e então submetidos a uma tensão de repouso de 1 g por 1 h. A contração independente de receptor foi estimulada pela adição de KCl (concentração final de 100 mmol / L no banho), cuja resposta foi observada até o *plateau*. Após isso, os anéis foram lavados 3 x com solução de Krebs-Hanseleit e estabilizados por 30 min. Foi realizada uma curva concentração-resposta cumulativa à angiotensina II ($10^{-9.5}$ - 10^{-5}) para avaliar a resposta contrátil dependente da ativação de receptor.

3.12. Imunoprecipitação de CRP3 para avaliação de fosfotirosinas

Cardiomiócitos neonatais foram obtidos a partir de um processo de digestões sucessivas com colagenase e pancreatina, como previamente estabelecido no laboratório [186]. As células foram mantidas em meio basal (DMEM low glucose + 199 + BrdU + 1 % piruvato + 1 % penicilina/estreptomicina) em placas previamente tratadas com laminina e incubadas a 37 °C, em atmosfera umedecida e enriquecida com 5 % de CO₂ por 48 h. Após este período, o meio de cultura foi substituído e, após 30 min, as células foram expostas a Ang II (1 µM) por 15 min. As células foram lisadas com tampão RIPA, as proteínas quantificadas e utilizadas para a imunoprecipitação.

Na imunoprecipitação, 500 µg de proteína foram diluídos em tampão RIPA e incubados overnight a 4 °C, sob agitação com anticorpo anti-CRP3 (Santa Cruz, sc-98827 1:100). No dia seguinte, foram adicionados 50 µl de *Dynabeads*[®] *Protein G* (Invitrogen) e as amostras foram incubadas por adicionais 16 h a 4 °C, em agitação. Após este período, as amostras foram colocadas em uma estante magnética, permitindo a remoção do sobrenadante e a retenção das microesferas (complexo microesferas-anticorpo anti-CRP3-CRP3). As

microesferas foram lavadas com tampão RIPA e o complexo foi eluído com tampão de amostra (200 mM Tris-HCl; Glicerol 40 %; SDS 2 %; 200 mM DTT; azul de bromofenol 1 %, pH 6.8). As amostras foram então processadas para *Western blot* de acordo com o item 3.5. A membrana foi bloqueada com solução de 5 % de leite em TBS-T e exposta a uma solução mista de anticorpo de coelho anti-CRP3 e de camundongo anti-fosfotirosina (Cell Signaling #9411) em TBS-T a 4 °C, por 16 h, sob agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBS-T antes e depois da incubação com solução mista de anticorpo secundário conjugado com fluorescência (anti-coelho [vermelho] e anti-camundongo [verde] 1:30000 v/v) e revelada no LI-COR, equipamento próprio para a análise de fluorescência. As bandas foram então quantificadas por densitometria no ImageJ. Para ambas as condições, utilizou-se um pool de 3 amostras.

3.13. Análise estatística

Dados representados com média \pm desvio padrão. Comparações genótipo-genótipo foram feitas com o teste *t* de Student. O efeito do genótipo (selvagem versus CRP3^{-/-}) perante os tratamentos foi verificado por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias e pós-teste de Bonferroni. Foram considerados dados significativamente diferentes os que apresentaram valores de $p < 0,05$. O número de experimentos realizados foi indicado por “*n*”.

4. DESENHO EXPERIMENTAL

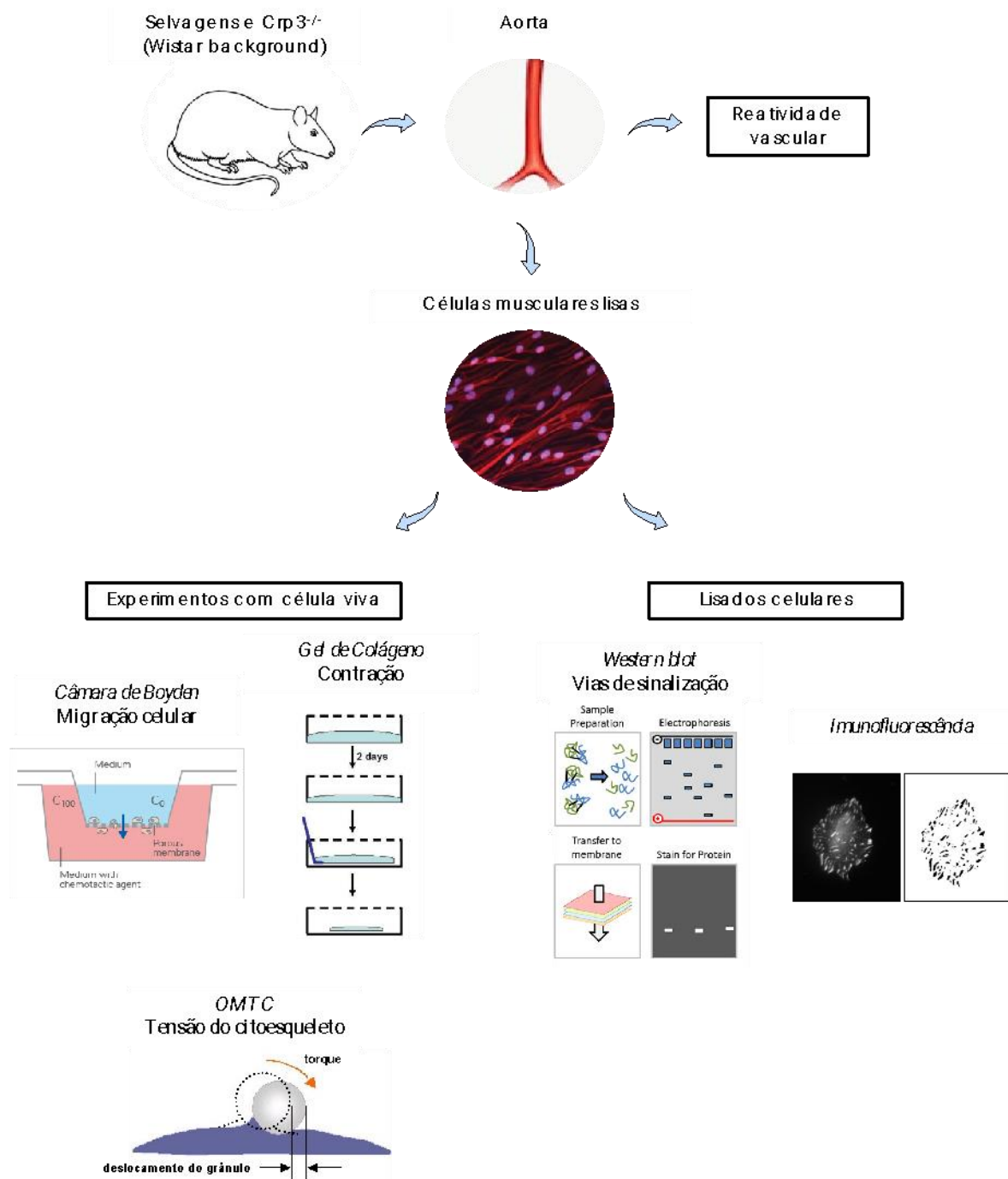


Figura 11. Desenho experimental. Representação gráfica do fluxo de métodos utilizados na obtenção dos resultados deste trabalho.

5. RESULTADOS

5.1. A falta de CRP3 nas adesões focais modifica a mecanopercepção de células musculares lisas aórticas

Anteriormente demonstramos que CRP3 interage com FAK [176] e está presente nas adesões focais de células musculares lisas vasculares (Figura 8a) [177]. Na ausência de CRP3, células musculares lisas aórticas apresentam maior tamanho de adesões focais, sugerindo alterações na mecanopercepção e mecanotransdução (Figura 8). Assim, avaliamos a capacidade de espalhamento, a secreção de colágeno I e o número de adesões focais como indicadores adicionais da mecanopercepção de células musculares lisas aórticas. Verificamos que células CRP3^{-/-} apresentam maior capacidade de espalhamento, denotada pela área celular medida nos períodos de 2 e 24 h após o plaqueamento (Figura 12a, b). Em consonância com este achado, observamos que células musculares lisas aórticas CRP3^{-/-} secretam mais colágeno I quando comparadas às células selvagens (WT) (Figura 12c). Não observamos diferenças no número de adesões focais (Figura 13). Associados aos dados anteriores de maior tamanho de adesão focal, estes dados permitem concluir que a ausência de CRP3 modifica a mecanopercepção de células musculares lisas aórticas.

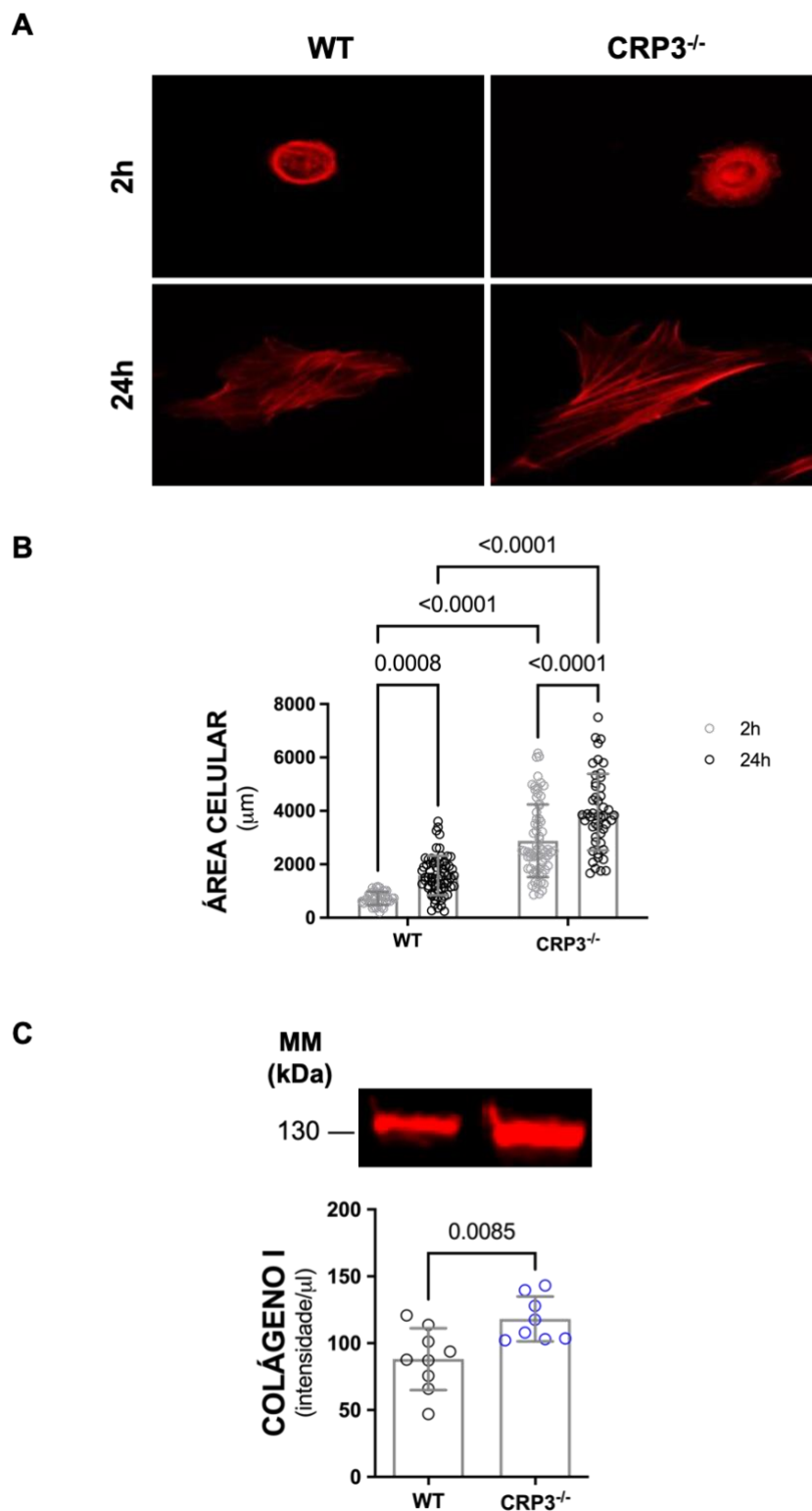


Figura 12. A ausência de CRP3 altera as propriedades mecanossensoras de células musculares lisas aórticas. *a.* imagens representativas e *b.* quantificação do ensaio de espalhamento, demonstrando que na ausência de CRP3, há um aumento na capacidade de espalhamento de células musculares lisas aórticas, presente nos estágios iniciais (2 h) e que se perpetua a períodos posteriores ao espalhamento (24h) [2 h $n=48$ WT $n=68$ CRP3^{-/-}; 24 h $n=64$ WT $n=48$ CRP3^{-/-}]. *c.* quantificação e *blots* representativos da secreção de colágeno I em cultura, evidenciando aumento da secreção por células CRP3^{-/-} [$n=9$ WT $n=8$ CRP3^{-/-}]

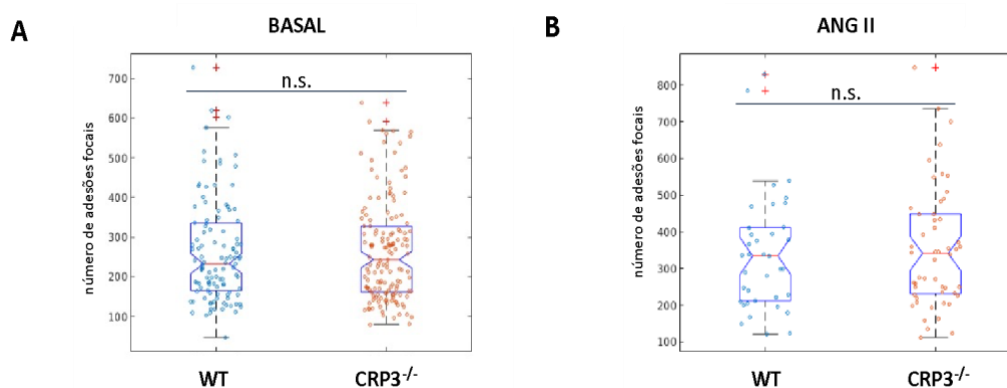


Figura 13. O número de adesões focais permanece inalterado em células CRP3^{-/-}. A contagem do número de adesões focais marcadas com paxilina demonstrou que tanto no basal (A), quanto em resposta à angiotensina II (B), o número de adesões focais permanece comparável entre células WT e CRP3^{-/-} (Basal: $n=85$ WT e $n=88$ CRP3^{-/-}; Ang II WT $n=52$ e CRP3^{-/-} $n=39$) n.s.: não significativo.

5.2. A ausência de CRP3 compromete a ativação do eixo de sinalização

FAK–Paxilina–p130CAS

Para melhor compreender os efeitos da ausência de CRP3 nas adesões focais, a ativação do eixo FAK-Paxilina-p130CAS avaliamos na presença de angiotensina II (Ang II). Em concordância com a literatura, observamos que o tratamento de células selvagens induz ativação de FAK (denotada pela fosforilação do resíduo Y397), que cria sítio de ligação para Src, levando à sua ativação total e subsequente fosforilação de seus parceiros proteicos paxilina e p130CAS (resíduos Y118 e Y145, respectivamente). Em contrapartida, células CRP3^{-/-} apresentaram defeito nesta via de sinalização, que permaneceu inalterada na presença de Ang II (Figura 14). Não foram observadas alterações apreciáveis nos níveis totais de FAK, paxilina ou p130CAS em resposta à estimulação com Ang II.

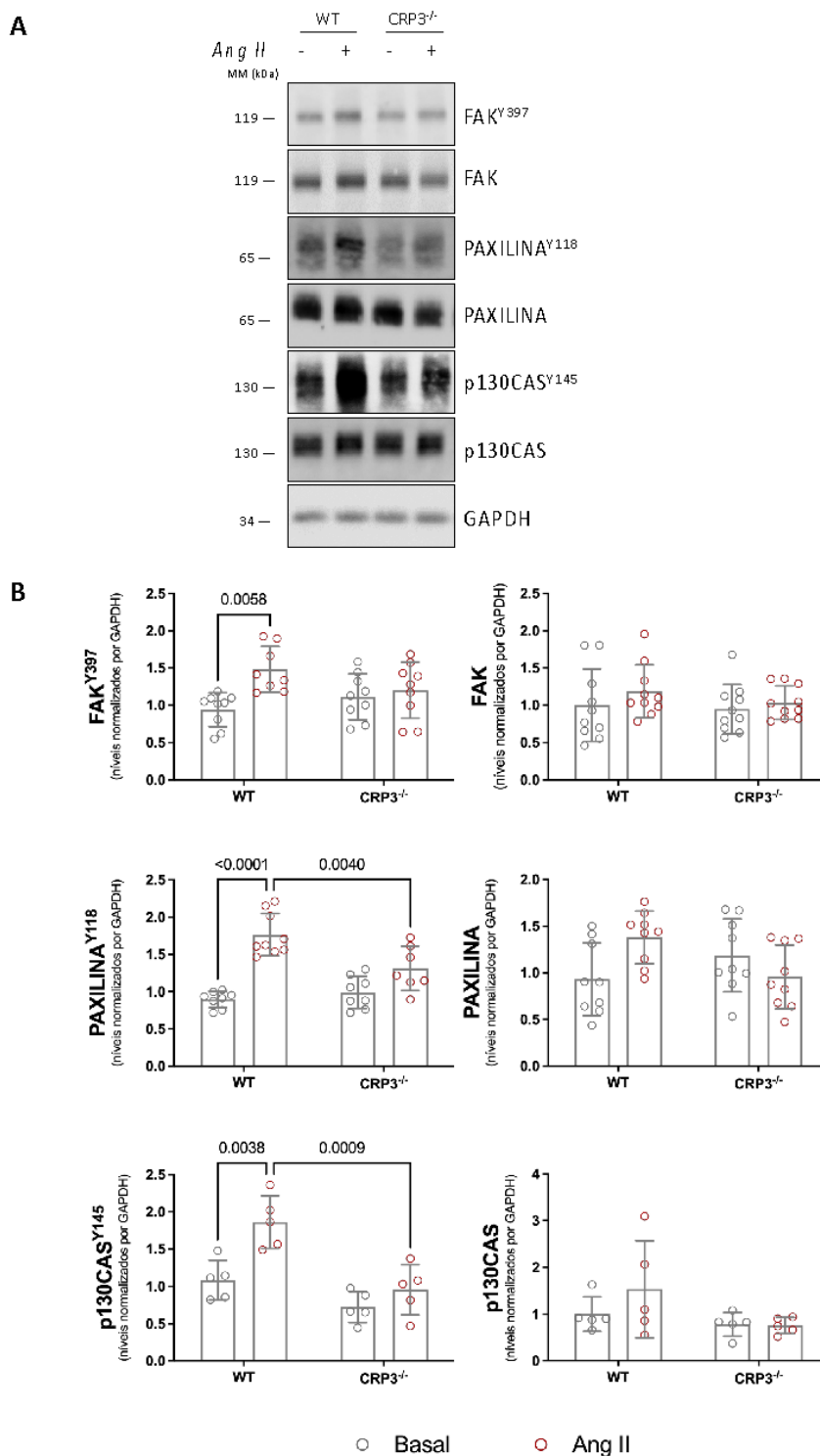


Figura 14. Ativação deficiente do eixo FAK-Src-Paxilina-p130CAS em detrimento da ausência de CRP3. *a.* Blots representativos e *b.* quantificação dos níveis de fosforilação (coluna à esquerda) e dos níveis totais (coluna à esquerda) de FAK, paxilina e p130CAS. Células selvagens apresentam fosforilação de FAK (Y397) e consequente fosforilação dos alvos paxilina (Y118) e p130CAS (Y145) após estimulação com Ang II. Na ausência de CRP3, este tratamento não é capaz de deflagra essa ativação, fazendo com que estimulado e basal se comportem de forma similar. Não houve diferença nos níveis totais das proteínas. FAK: Y397 $n=9$ total $n=10$; paxilina: Y118 (Basal $n=8$ Ang II WT $n=9$ CRP3^{-/-} $n=7$) total $n=9$; p130CAS: Y145 e total $n=5$. ** $p < 0.001$

Um dos possíveis mecanismos para a ausência de ativação de FAK seria a modulação negativa por ERK 1/2 [187]. No entanto, células selvagens e CRP3^{-/-} apresentaram níveis comparáveis de ativação de ERK 1/2 (denotada pela fosforilação nos resíduos T202/Y204) em condições basais, que aumentaram em resposta à Ang II (Figura 15). Não houve diferença nos níveis totais de ERK 1/2 nas condições estudadas.

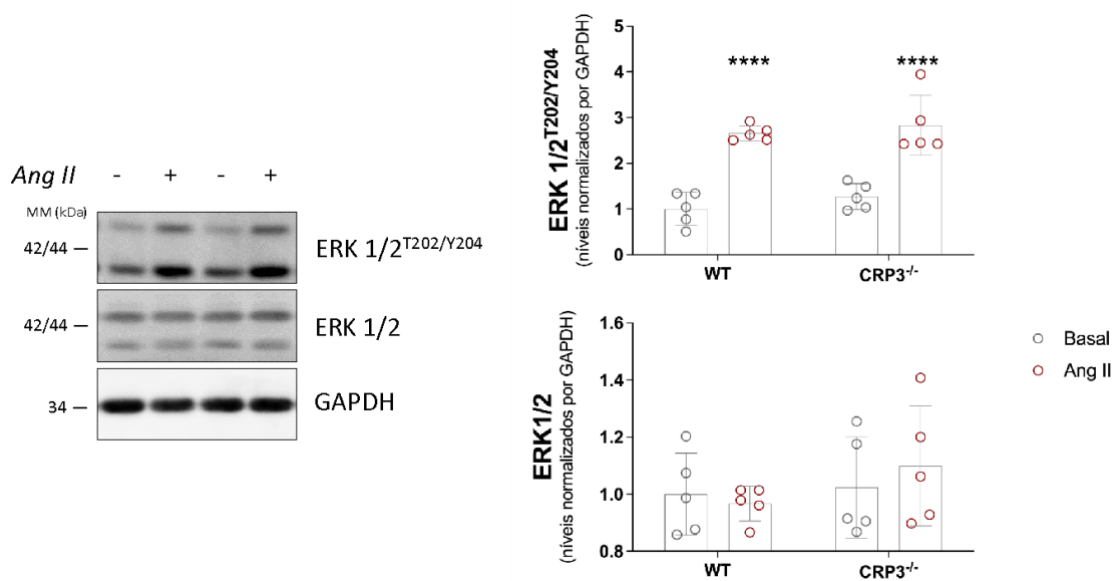


Figura 15. A ativação de ERK 1/2 é conservada na ausência de CRP3. Blots representativos e quantificação dos níveis de fosforilação e dos níveis totais de ERK 1/2. Em condições basais, observou-se baixo nível de fosforilação (T202/Y204) de ERK 1/2 em ambos os genótipos. Em resposta à Ang II, WT e CRP3^{-/-} apresentaram aumento comparável nos níveis de fosforilação. Os níveis totais permaneceram inalterados. $n=5$. **** $p < 0.0001$

Outro mecanismo envolvido na regulação de FAK envolve a quinase ligada à integrina (ILK), cuja ativação está associada à inibição de FAK [188]. Todavia, não se observou mudanças nos níveis totais, nem na fosforilação (S246) em resposta à ausência de CRP3 ou à estimulação com Ang II (Figura 16).

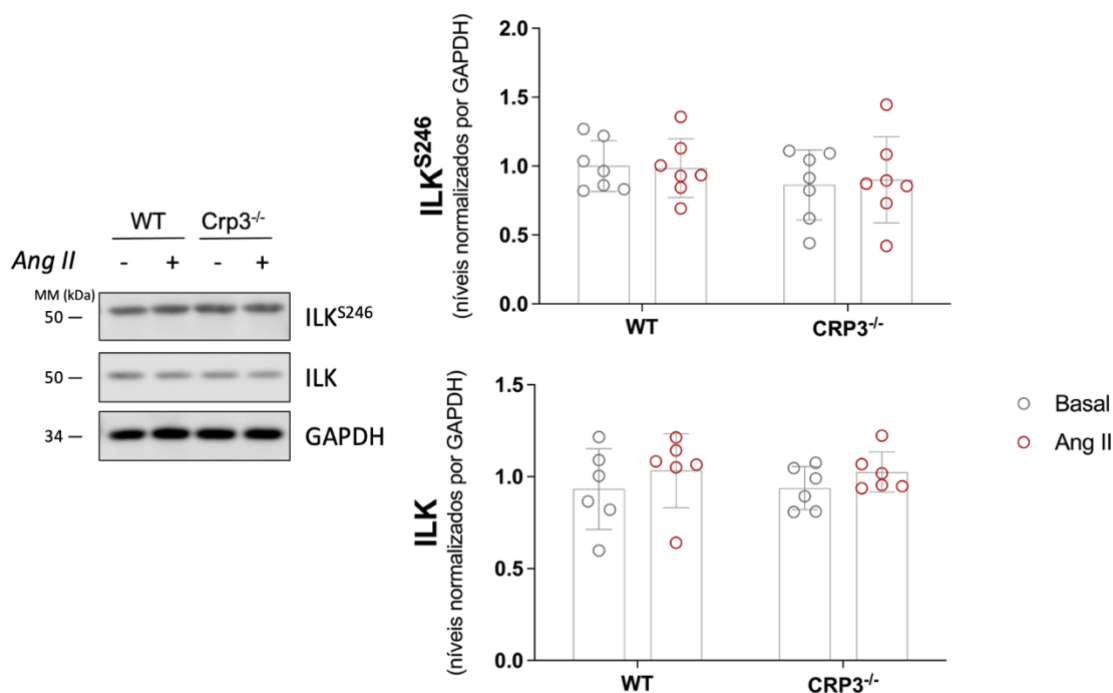


Figura 16. A fosforilação e os níveis totais de ILK permanecem inalterados. Blots representativos e quantificação dos níveis de fosforilação e dos níveis totais de ILK, que não sofreram mudanças em resposta à ausência de CRP3 ou à estimulação com Ang II em ambos os genótipos. $n=6$.

5.3. A dinâmica do citoesqueleto de actina permanece inalterada na ausência de CRP3

Uma das principais consequências da mecanotransdução por adesões focais é o remodelamento do citoesqueleto de actina, avaliado em termos da razão F/G-actina, da regulação de cofilina, da expressão de marcadores de músculo liso e da expressão de YAP. Em condições basais de cultivo, não se observou diferença na razão F/G-actina em células selvagens e CRP3^{-/-}. Após a estimulação com angiotensina II, há aumento na razão F/G-actina, independente do genótipo (Figura 17a).

A dinâmica de actina pode ser regulada pela enzima cofilina, que promove a reciclagem das fibras, permitindo novos eventos de polimerização.

Observamos que os níveis totais de cofilina não sofreram alteração em detrimento da ausência de CRP3 (Figura 17b). Ao avaliar os níveis de fosforilação inibitória no resíduo S3, verificamos que células selvagens e CRP3^{-/-} são comparáveis em condições basais e em resposta à Ang II, cujo tratamento induziu redução nos níveis de fosforilação (Figura 17c). Em consonância com esses resultados, os níveis da proteína associada a yes (YAP) permaneceram inalterados em células selvagens e CRP3^{-/-} em condições basais ou frente à estimulação com Ang II (Figura 17d).

A razão F/G-actina e os níveis de ativação de cofilina impactam diretamente a atividade dos fatores de transcrição relacionados à miocardina (MKLs), principais envolvidos na expressão de marcadores de músculo liso. Estes fatores se ligam a G-actina, CRP1/CRP2 e ao fator de resposta ao soro (SRF) para promover a expressão de genes como α -SMA, calponina, MYH11 e smoothelina. Logo, o padrão de expressão desses genes pode ser utilizado como indicativo de mudanças em actina. Os níveis de CRP1 são comparáveis entre células selvagens e CRP3^{-/-}, enquanto os níveis de CRP2 se mostraram ligeiramente reduzidos em células CRP3^{-/-} (Figura 18a). No entanto, em linha com as evidências de F/G-actina, células selvagens e CRP3^{-/-} apresentaram níveis similares de expressão de calponina, α -SMA, MYH11 e smoothelina (Figura 18b).

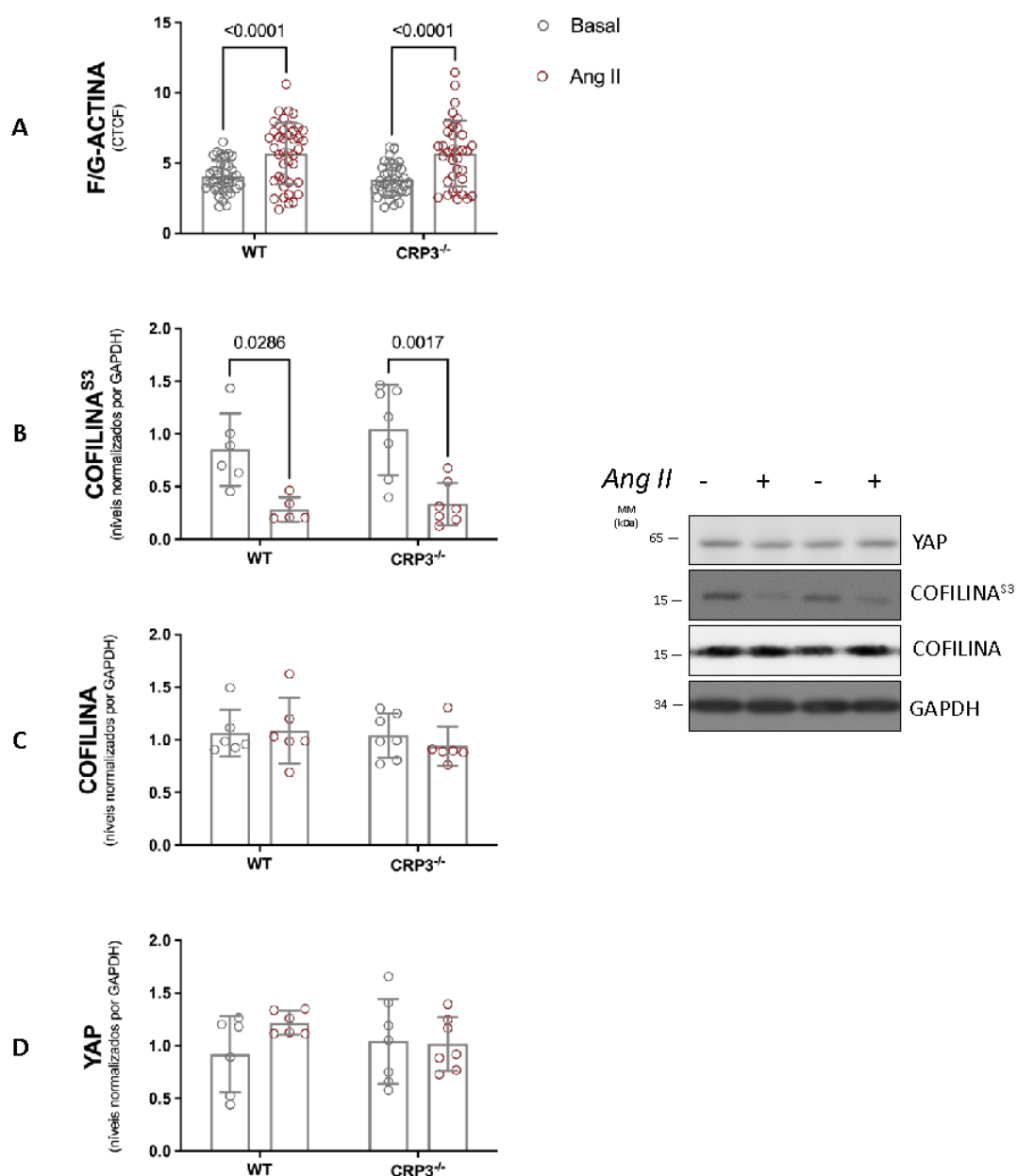


Figura 17. A dinâmica de actina é comparável entre células selvagens e CRP3^{-/-}. a. representação gráfica da razão F/G-actina, realizada a partir da marcação por imunofluorescência das fibras de actina (faloidina) e de G-actina (Ribonuclease A), demonstrando que a polimerização de actina se comporta de forma semelhante em células selvagens e CRP3^{-/-} (WT $n=41$ CRP3^{-/-} $n=39$). b. quantificação dos níveis totais de cofilina, avaliados por *western blot*, sem diferença em função de genótipo ou tratamento. c. análise da fosforilação inibitória de cofilina, demonstrando modulação em resposta à angiotensina de forma similar em ambos os genótipos (WT $n=6$ basal $n=5$ Ang II; CRP3^{-/-} $n=7$). d. quantificação dos níveis totais de YAP, avaliados por *western blot*, sem diferença em função de genótipo ou tratamento (WT $n=6$ CRP3^{-/-} $n=7$).

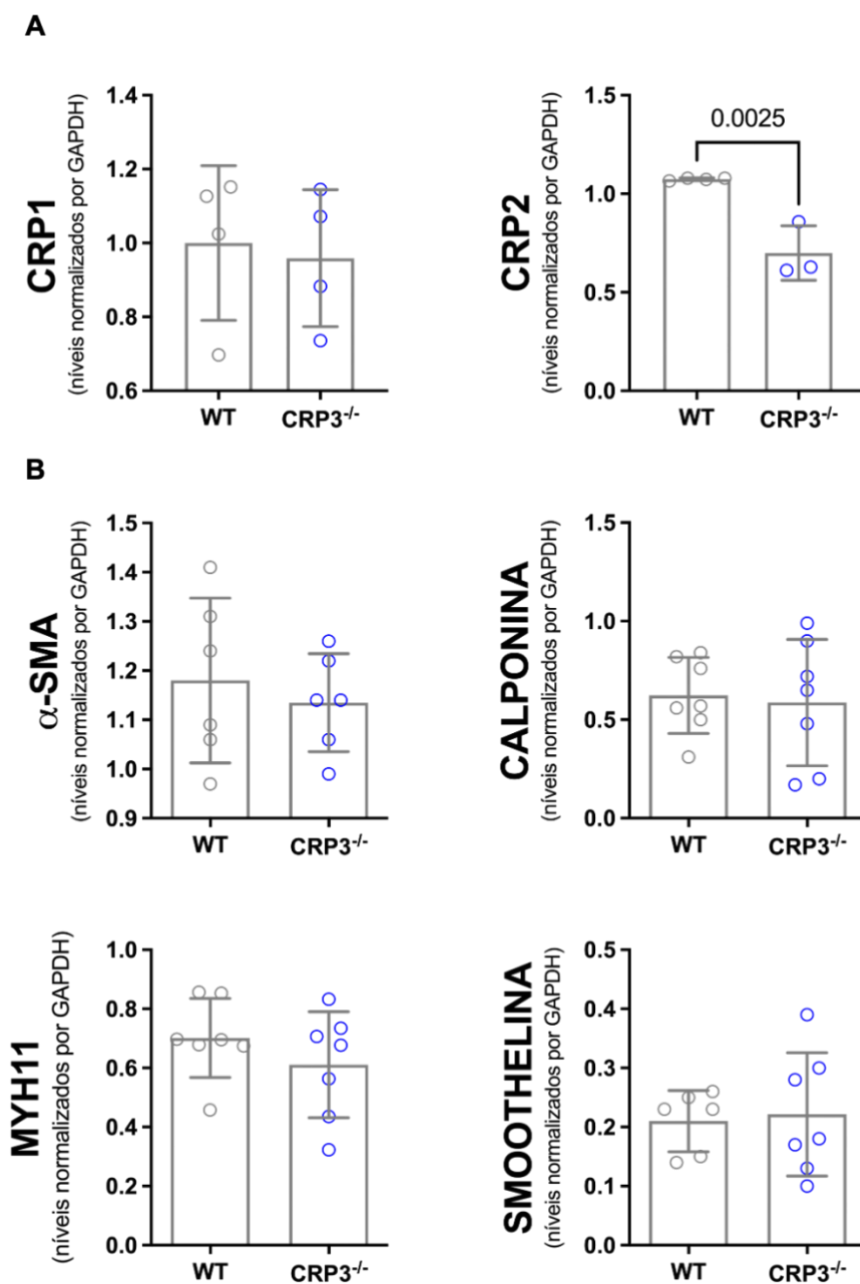


Figura 18. Expressão dos parálogos de CRP3 (CRP1, CRP2) e de marcadores de célula muscular lisa dependentes do status do citoesqueleto de actina. a. quantificação dos níveis totais de CRP1 e CRP2, avaliados por *western blot*. Enquanto os níveis de CRP1 não apresentaram alteração na ausência de CRP3, os níveis de CRP2 apresentaram ligeira redução ($n=4$). b. quantificação dos níveis totais de α -SMA, calponina, MYH11 e smoothelina, genes cuja expressão está intrinsecamente ligada à polimerização de actina e que não apresentaram perturbação na ausência de CRP3 ($n=6-7$).

5.4. Células musculares lisas aórticas selvagens e CRP3^{-/-} apresentam níveis similares de ativação de MLC

Outro componente modulado por adesões focais e crucial à contratilidade é a fosforilação dos resíduos T18/S19 da cadeia regulatória da miosina (MLC), que culmina em sua ativação. Verificamos que em condições basais de cultivo, células selvagens e CRP3^{-/-} apresentam níveis similares de fosforilação de MLC. A estimulação com Ang II por 2,5 min aumentou a fosforilação dos resíduos T18/S19, mas não houve diferença entre os genótipos (Figura 19).

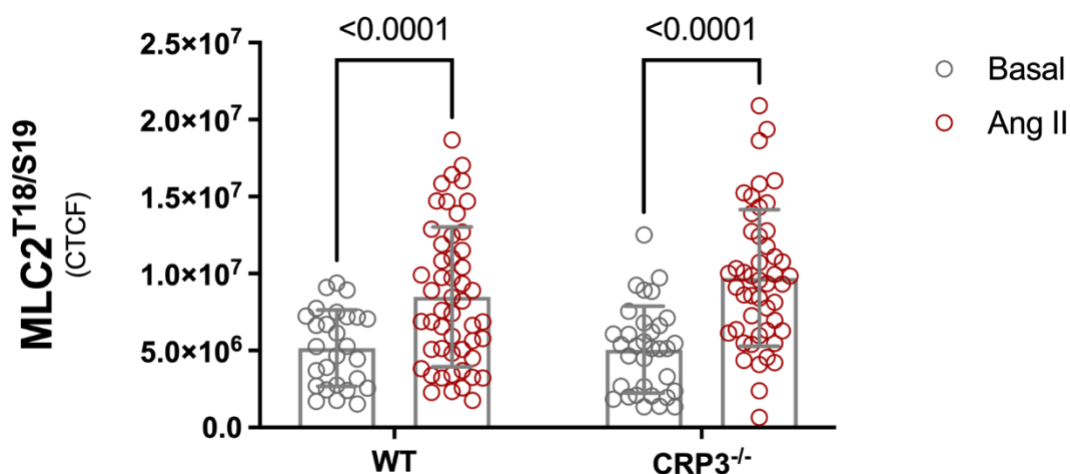


Figura 19. A ativação de MLC é mantida na ausência de CRP3. Quantificação da fosforilação ativadora de MLC nos resíduos T18/S19, analisada por imunofluorescência, demonstrando que tanto em condições basais, quanto em resposta à Ang II (que induz aumento da fosforilação), células selvagens e CRP3^{-/-} são semelhantes (Basal WT $n=26$ CRP3^{-/-} $n=33$ Ang II WT $n=51$ CRP3^{-/-} $n=48$).

Em conjunto, as evidências da dinâmica de actina e da ativação da miosina permitem concluir que o aparato de actomiosina está inalterado em células CRP3^{-/-}. De fato, ao analisar a contratilidade aguda de anéis aórticos usando métodos de fisiologia padrão que delineiam geração de força máxima, não se observou diferença entre aortas selvagens e CRP3^{-/-} na presença de cloreto de potássio (KCl) (Figura 20).

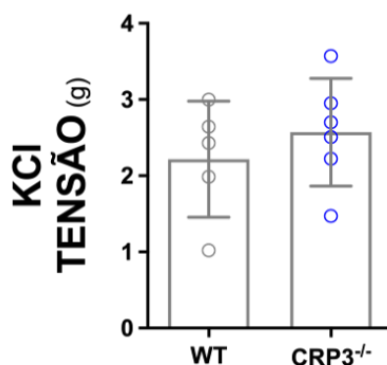


Figura 20. A contratilidade aguda de anéis aórticos é mantida na ausência de CRP3. análise da força máxima gerada em anéis aórticos expostos a 100 mM de KCl, demonstrando resposta similar entre selvagem e CRP3^{-/-}. $n=5$

5.5. Os efeitos da ausência de CRP3 se estendem à migração celular

Assim como na resposta à angiotensina II que induz a contração, a migração celular utiliza a sinalização mediada por FAK para promover a contratilidade necessária para impulsionar o corpo celular [189]. Observou-se que enquanto o agente quimiotático PDGF-BB induziu a migração de células selvagens, células CRP3^{-/-} foram incapazes de migrar no período de 4h (Figura 21a). Como evidência de que a não-responsividade de células CRP3^{-/-} é independente de alterações na viabilidade celular, verificamos que a progressão no ciclo celular em células selvagens e CRP3^{-/-} é semelhante (Figura 21b).

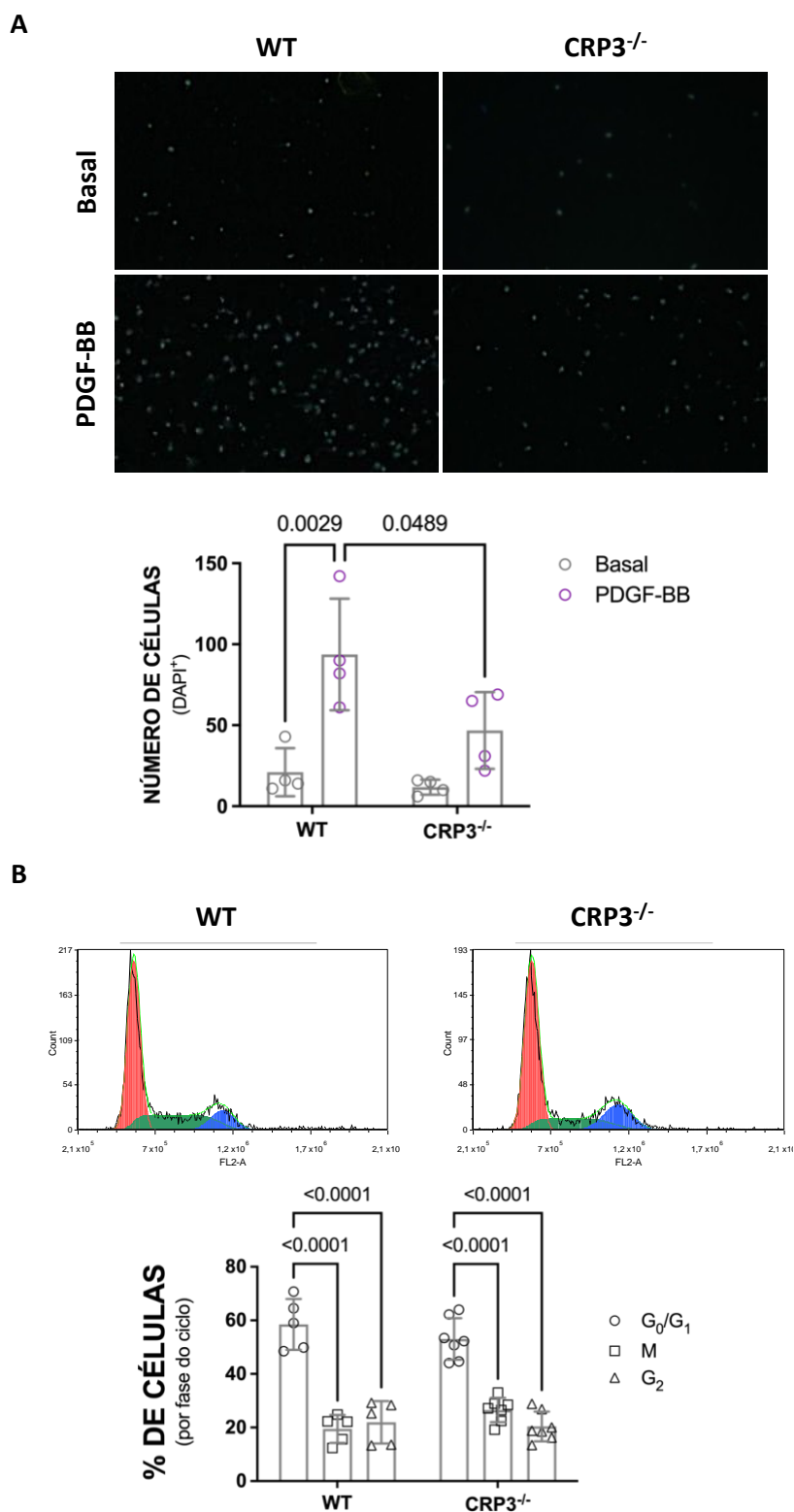


Figura 21. A ausência de CRP3 acarreta dano à capacidade migratória, mas não à proliferação de células musculares lisas aórticas. *a.* fotos representativas e quantificação do ensaio de migração (câmara de Boyden) realizado após 4 h de exposição ao PDGF-BB, evento notório em células selvagens, porém tênue em células CRP3^{-/-} (*n*=4). *B.* histogramas representativos e quantificação da análise do ciclo celular, onde verificou-se que a progressão do ciclo em resposta ao soro – medida pela quantidade de células em cada fase – é semelhante em células selvagens (*n*=5) e CRP3^{-/-} (*n*=7).

5.6. A inibição de FAK reduz a contratilidade de células selvagens, mas não afeta a rigidez celular

Anteriormente demonstramos que a ausência de CRP3 reduz a contratilidade (Figura 8d) e aumenta a rigidez de células musculares lisas aórticas, tanto em condições basais de cultivo, quanto em resposta à angiotensina II. Em face destes resultados e considerando os eventos de sinalização dependentes de FAK aqui observados, testamos a hipótese de que a inibição de FAK com a droga PF-573228 (iFAK) recapitula em células selvagens os fenótipos observados em células CRP3^{-/-}. Ao analisar a contratilidade em gel de colágeno, verificamos que enquanto a inibição de FAK reduz a contratilidade em células selvagens, nenhum efeito é observado em células CRP3^{-/-} (Figura 22a).

Células CRP3^{-/-} são mais rígidas que células selvagens em condições basais. Após a adição de angiotensina II (1 μ M), há um aumento na rigidez celular, que é discreto em células selvagens e pronunciado em células CRP3^{-/-} (Figura 22b). Em contraste, a adição de iFAK (3 μ M) não exerceu efeito na rigidez celular, indicando que a rigidez celular é independente das propriedades enzimáticas de FAK.

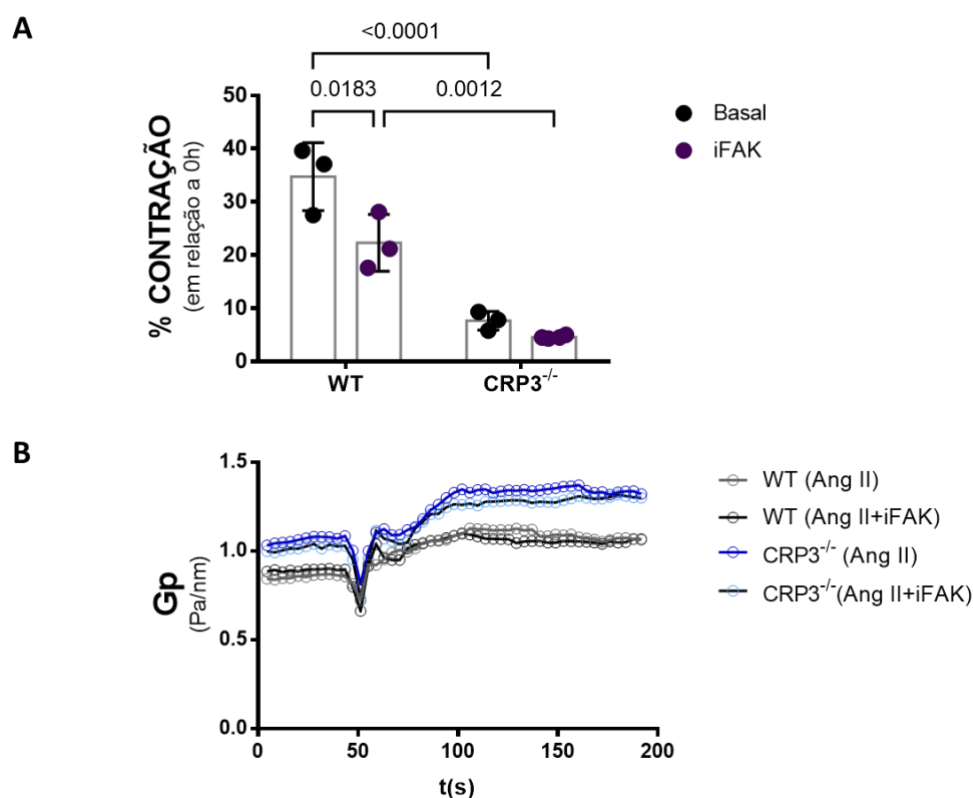


Figura 22. A inibição de FAK reduz a contratilidade de células selvagens, mas não afeta a rigidez celular. *a.* Gráfico de quantificação do ensaio de contração basal e na presença do inibidor de FAK (iFAK; 3 μ M) em 24 h ($n=3$). No basal, células CRP3^{-/-} apresentam contratilidade reduzida em comparação às células selvagens (WT). Em resposta ao iFAK, há decréscimo na capacidade contrátil de células WT, mas não em células CRP3^{-/-}. *B.* Gráfico representativo da análise de rigidez celular pela técnica de OMTc. No basal, células CRP3^{-/-} são mais rígidas que células selvagens (WT), um fenômeno que se pronuncia na presença de Ang II. O tratamento concomitante com inibidor de FAK (iFAK) não foi capaz de impedir os efeitos da Ang II, sugerindo que mecanismos distintos participam deste processo ($n=1948$ grânulos WT basal/Ang II; $n=1804$ WT Ang II+iFAK; $n=1259$ grânulos CRP3^{-/-} basal/Ang II; $n=1424$ CRP3^{-/-} Ang II+iFAK).

5.7. Análise *in silico* da sequência de aminoácidos de CRP3 revela sítios de fosforilação por FAK-Src

CRP3 é uma proteína adaptadora, que não exibe atividade catalítica e, portanto, exerce seus efeitos através da formação de complexos proteína-proteína. A fim de entender a sua participação na sinalização mediada por FAK, realizou-se uma análise *in silico* da estrutura primária de CRP3 em busca de resíduos de tirosina passíveis de fosforilação por FAK. Foram identificados dois sítios passíveis de fosforilação (Y57 e Y167), cujos escores de predição do

NetPhos 3.1 [190,191] são ϵ 0,8 (níveis similares aos observados para proteínas que sabidamente são fosforiladas por FAK, como paxilina) e que estão posicionados nos domínios LIM (Figura 23a). Notadamente, a imunoprecipitação de CRP3 em extratos proteicos de cardiomiócitos (que demonstram expressão altíssima de CRP3) demonstrou que CRP3 apresenta fosfotirosinas em condições basais e que essa modificação aumenta em resposta à estimulação com 1 μ M de angiotensina II (Figura 23b). Estes dados confirmam a ideia de que CRP3 pode ser fosforilado por FAK.

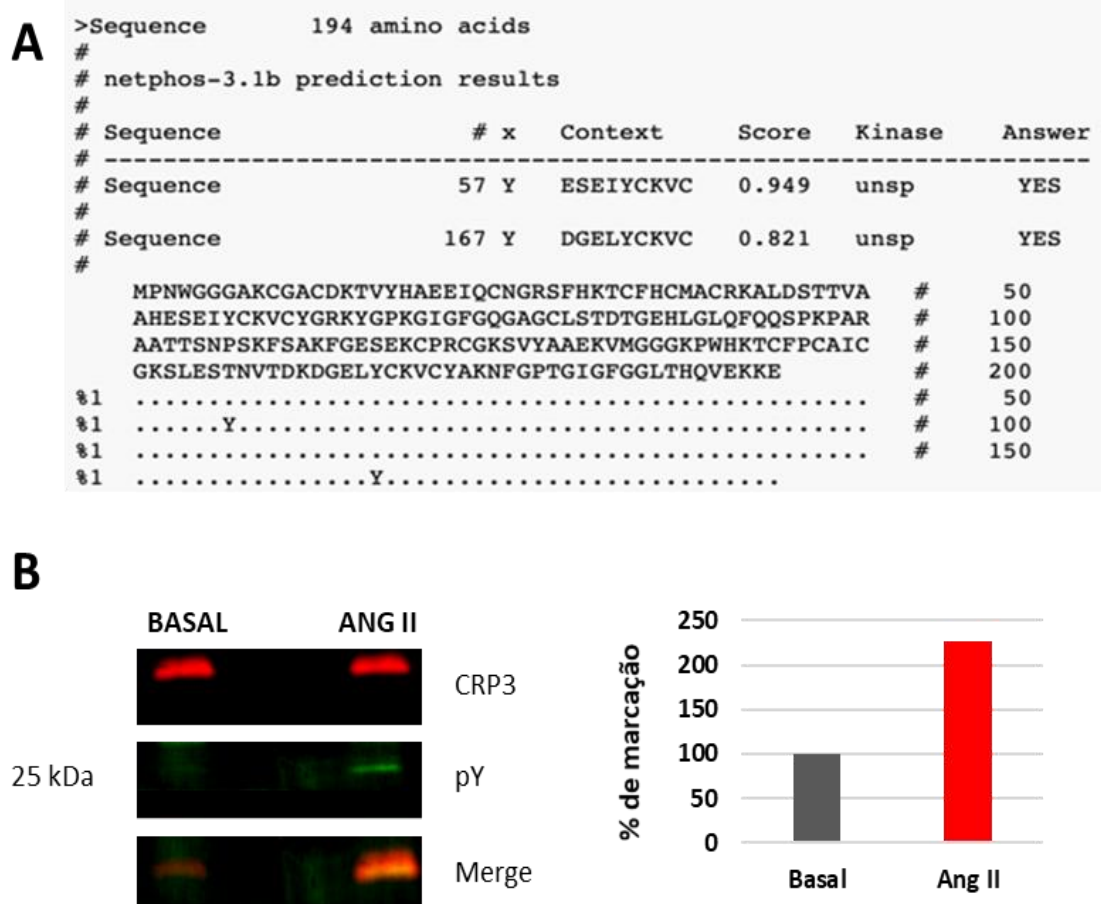


Figura 23. Análise da fosforilação de tirosinas em CRP3. A. A análise realizada na ferramenta NetPhos 3.1 demonstrou a presença de dois sítios de fosforilação com escores de predição acima de 0,8, localizados nos resíduos Y57 e Y167 dos domínios LIM de CRP3. B. blot representativo da imunoprecipitação de CRP3, seguida da incubação com anticorpo anti-fosfotirosina em extrato proteico de cardiomiócitos em cultura, demonstrando a fosforilação basal e estimulada por angiotensina II.

6. DISCUSSÃO

A formação de complexos proteicos mediada por proteínas LIM é essencial à mecanotransdução por adesões focais. Apesar da elucidação de um core essencial, pouco se sabe sobre os mecanismos vascular específicos na sinalização por adesões focais. Este trabalho explorou, pela primeira vez, o papel de CRP3 na sinalização de adesões focais, cuja ausência comprometeu a ativação do eixo FAK-Src-Paxilina-p130CAS a contratilidade e a migração celular, independente de mudanças em actomiosina.

Em adição às evidências da literatura que demonstram a localização de CRP3 nas fibras de actina, demonstramos sua localização nas adesões focais. A relação de CRP3 com o citoesqueleto de actina foi alvo de extensa investigação no contexto de células musculares estriadas. Em semelhança à α -actinina, CRP3 se liga às fibras de actina [159], onde se oligomeriza [156] para promover a fasciculação e a proteção das fibras de actina contra a despolimerização medida por cofilina [159]. A ausência de CRP3 não interfere nas taxas de polimerização, mas promove o afinamento das fibras, podendo impactar negativamente a resistência mecânica do citoesqueleto de actina [159]. Em concordância, Clark e Kadrmas demonstraram que a proteína Mlp84b (equivalente de CRP3 em *Drosophila melanogaster*) contribui diretamente para a integridade muscular por meio da estabilização das fibras de actina nos sítios de ancoragem [192]. A relevância destes achados é ilustrada pelas alterações na estrutura e função cardíacas observadas em camundongos que não expressam CRP3 [162] ou que carregam a mutação missense (10T \rightarrow C; W4R), identificada em pacientes com cardiomiopatia dilatada [167]. Além de desarranjo

estrutural (incluindo desorganização das miofibrilas e formato irregular dos cardiomiócitos), estas amostras apresentam complacência aumentada e resistência prejudicada ao estresse mecânico, reminiscentes da ausência dos mecanismos CRP3-dependentes no citoesqueleto de actina.

De forma a promover a correta organização e manutenção do aparato contrátil, CRP3 promove a formação de complexos associados à actina nos costâmeros [158,162,164,168–170]. Estas estruturas conectam o sarcolema ao aparato de actomiosina e, portanto, são responsáveis pela transmissão de força [193]. Nestes sítios, acredita-se que CRP3 atua em um complexo ternário com β 1-espectrina e α -actinina, promovendo o acoplamento do aparato contrátil aos complexos dependentes de β 1-espectrina na membrana [194]. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que apesar do desarranjo de miofibrilas, o aparato contrátil permanece intacto na ausência de CRP3, permitindo concluir que a ablação de CRP3 causa prejuízo à função costamérica [162], o que pode ser ilustrado pela perda do padrão de distribuição de vinculina (também presente nos costâmeros) [162]. Considerando as evidências de nosso grupo de que CRP3 localiza-se nas fibras de actina e nas adesões focais (análogas aos costâmeros de células musculares lisas estriadas), postulamos que CRP3 age como mecanossensor também em células musculares lisas. Esta hipótese é suportada pelos estudos de proteoma que demonstraram o recrutamento força-dependente de proteínas da família CRP [63,195] e pelas características de zixina e α -actinina, parceiros proteicos de CRP3 [158,194], que ocupam a camada regulatória de actina nas adesões focais.

A camada regulatória de actina é particularmente importante para a homeostase mecânica, pois é por meio dela que os sítios de ruptura de fibras (resultantes da exaustão mecânica associada aos constantes ciclos de extensão e encurtamento) são reparados, restaurando a capacidade de transmissão de força [196]. O entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta de reparo é baseado na função de zixina, uma proteína responsiva a forças, formada por um domínio de interação com α -actinina, por repetições ActA ricas em prolina, duas sequências de exportação nuclear e três domínios LIM. Forças exercidas nas adesões focais recrutam zixina para a camada regulatória de actina [197–199]. Conforme os sinais são transmitidos para o citoesqueleto de actina (induzindo sua polimerização), zixina se desloca em sincronia com as novas fibras formadas, onde recruta seu parceiro proteico VASP, que estabelece retroalimentação positiva para a polimerização de actina, tanto por recrutar mais complexos G-actina-profilina, quanto por impedir o capeamento de filamentos recém-formados [112,113,115]. Os mesmos mecanismos são responsáveis pelo reparo de fibras rompidas durante a transmissão de força [196]. Verificou-se que a capacidade de recrutamento dependente de força de zixina se baseia nos seus três domínios LIM em tandem, que apresentam em sua estrutura um resíduo conservado de fenilalanina e um espaçamento ótimo entre si, permitindo que atuem em cooperatividade [125,198,200]. A ausência de zixina reduz a contratilidade, um evento associado a alteração na capacidade de espalhamento e no perfil secretor de células musculares lisas [54,124].

Em contraste com zixina, CRP3 não é capaz de promover o reparo de sítios de deformação das fibras de estresse, já que apresenta apenas 2 domínios

LIM que, além de não apresentarem o espaçamento ótimo requerido, não apresentam o resíduo invariável de fenilalanina. No entanto, postula-se que CRP3 seja um ancestral das proteínas de reparo [200], sugerindo que possa ainda desempenhar papéis similares ao de zixina na mecanotransdução. De fato, similarmente à zixina [53], CRP3 sofre translocação nuclear, onde participa dos mecanismos que promovem a expressão de genes de adaptação mecânica celular [171,201]. Na ausência de CRP3, células musculares lisas apresentam contratilidade deficiente, aumento do espalhamento e da secreção de colágeno I. Estas alterações são também acompanhadas de aumento no tamanho médio das adesões focais, mas sem mudanças no número de adesões, permitindo concluir que a mecanorresponsividade de células musculares lisas está comprometida na ausência de CRP3 em detrimento de suas propriedades mecanossensoras.

Para melhor compreender a participação de CRP3 na mecanotransdução via adesões focais, a mecanossinalização de células musculares lisas aórticas selvagens e CRP3^{-/-} foi avaliada em condições basais de cultivo e em resposta à Ang II. Verificou-se que células selvagens e CRP3^{-/-} são comparáveis em termos de expressão e fosforilação das proteínas em condições basais. Em resposta à Ang II, células selvagens apresentaram um aumento na fosforilação de FAK (resíduo Y397) que estava associado à fosforilação das proteínas paxilina (resíduo Y118) e p130CAS (resíduo Y145). Em contraste, os níveis de fosforilação de FAK, paxilina e p130CAS permaneceram inalterados após a exposição de células CRP3^{-/-} à Ang II. Estes eventos explicam a ausência de mudança no tamanho médio das adesões focais e indicam que essas alterações

sejam responsáveis pela contratilidade deficiente, confirmando a participação de CRP3 na mecanorresponsividade de músculo liso aórtico.

Ativação da função quinásica de FAK em resposta à Ang II é central a diversos eventos na mecanotransdução, como polimerização de actina, fosforilação de MLC e fluidificação do citoesqueleto. Ao analisar a razão F/G-actina, verificamos que células selvagens e CRP3^{-/-} são comparáveis tanto em condições basais, quanto na polimerização de actina induzida por Ang II, o que está de acordo com as evidências de Hoffmann et al [159]. Foi demonstrado que CRP3 influencia a atividade de cofilina, uma das principais enzimas envolvidas na despolimerização de actina [160]. No entanto, os níveis de F/G-actina e as evidências de que células selvagens e CRP3^{-/-} se comportam de maneira similar em termos de fosforilação de cofilina, demonstram que essa regulação não se estende a células musculares lisas aórticas.

Outra variável influenciada pelo momento do citoesqueleto de actina são os níveis da proteína YAP, principal envolvida na regulação dos eventos transcricionais dependentes de pistas ambientais [202] e que não apresentou variação em função do genótipo, nem da exposição com Ang II. Em adição a estes dados, foi analisada a expressão de genes dependentes da atividade de SRF-MLK. MLKs interagem com G-actina, o que as mantém inativas e retidas no citoplasma. A polimerização de actina em resposta a sinais extracelulares libera MKL de G-actina, permitindo o acúmulo nuclear de MKL e ativação de SRF [203]. Portanto, a sinalização MKL-SRF é um caminho-chave que conecta a reorganização dinâmica do citoesqueleto de actina ao controle da expressão gênica. Em conjunto com CRP1 e CRP2, MKL-SRF promovem a expressão de

componentes estruturais e regulatórios do citoesqueleto de actina, como α -SMA, calponina, MYH11 e smoothelina. Observamos que a ausência de CRP3 não impacta a expressão destes genes, provendo evidências adicionais de que o status de actina permanece inalterado na ausência de CRP3.

FAK foi implicada na ativação de p190RhoGEF [126], que impacta diretamente a fosforilação de MLC pelo eixo RhoA-ROCK. Sabendo que a fosforilação de MLC é o evento central à contratilidade de células musculares lisas, os níveis desta fosforilação foram analisados. Verificamos que em condições basais, células selvagens e CRP3^{-/-} apresentam níveis similares de fosforilação nos resíduos T18/S19 de MLC. Em resposta à Ang II, ambos os genótipos demonstram aumento na fosforilação, sem diferença entre si. Estes dados dialogam com evidências anteriores da literatura, que apontam para efeito da ausência de CRP3 nas estruturas de ancoramento (costâmeros e, de acordo com este trabalho, adesões focais), e não no funcionamento do aparato de actomiosina [159,162]. Em concordância, verificamos que a geração de força máxima por anéis aórticos em resposta ao KCl é mantida na ausência de CRP3.

A migração celular constitui um ótimo modelo para avaliação de mecanismos FAK-dependentes, considerando o papel central de FAK neste processo. O ciclo migratório envolve a formação de adesões nascentes mediadas por integrinas perto da borda dianteira da célula, que se desmontam rapidamente ou se conectam ao citoesqueleto de actina. As forças de tração mediadas pela actomiosina permitem que um subconjunto dessas adesões cresça e amadureça, fornecendo a forças de tração necessária para impulsionar o corpo celular para frente [204,205]. Anteriormente demonstramos que células

CRP3^{-/-} apresentam prejuízo tanto no crescimento de adesões focais, quanto na contratilidade. Em concordância com esses achados, células CRP3^{-/-} apresentam capacidade quimiotática deficiente quando comparadas às células selvagens, demonstrando que a ausência de CRP3 afeta um mecanismo comum às respostas de migração e contração e que a deficiência na ativação de FAK é um mecanismo que independe do receptor ativado em células CRP3^{-/-}.

Nossos achados estão em consonância com os estudos em fibroblastos FAK^{-/-}, onde observa-se adesões focais maiores e redução da capacidade migratória [206–208]. A reintrodução de FAK selvagem em células FAK^{-/-} restaura a migração celular, enquanto a introdução de FAK mutantes (sem atividade quinase ou sem a capacidade de se ligar às quinases da família Src [mutação no resíduo Y397] ou p130CAS [mutação no sítio I]), falha em restaurar a migração celular [209,210], demonstrando que tanto as funções de FAK como quinase, quanto como proteína adaptadora são requeridas à migração celular. Estas evidências também demonstram que além de FAK, proteínas à jusante na sinalização também desempenham papel importante na sinalização via adesão focal que coordena a migração. Notadamente, células que não expressam quinases da família Src, paxilina ou p130CAS também apresentam redução da migração [211,212].

Dissecar a sinalização mediada por FAK e seus parceiros proteicos é essencial ao entendimento dos mecanismos pelos quais FAK promove seus efeitos. A fosforilação de FAK Y397 promove a ligação de Src, o que leva à ativação conformacional de Src e resulta no complexo duplo de sinalização FAK-Src [213]. Neste complexo, Src fosforila FAK em Y861, o que está associado a

um aumento na ligação mediada pelo domínio SH3 de p130CAS às regiões ricas em prolina da porção C-terminal de FAK [214]. Src ativada também fosforila FAK em Y925, criando um sítio para ligação de GRB2. A interação de GRB2 com FAK é uma das várias conexões que levam à ativação de Ras e de ERK 1/2 [213]. A fosforilação de ERK 1/2 e a ativação subsequente de MLCK podem modular tanto a dinâmica das adesões focais quanto a proliferação celular [85,215]. No entanto, não observamos diferença na proliferação de células musculares lisas e nem nos níveis de ativação de ERK 1/2, sugerindo que tanto o turnover de adesões focais, quanto a ativação de MLCK estão preservados em células CRP3^{-/-}.

FAK está associada a uma fluidificação do citoesqueleto de actina, enquanto células FAK^{-/-} apresentam aumento na rigidez celular [216,217]. O citoesqueleto de actina apresenta um estado gelatinoso (ou semissólido) devido ao alto grau de reticulação das fibras de actina (que são ancoradas e exercem tensão nas adesões focais) promovido por proteínas como filamina e α -actinina. De forma a aumentar a fluidez do citoesqueleto, FAK fosforila o resíduo de Y12 de α -actinina, reduzindo sua afinidade por actina e, portanto, reduzindo o grau de reticulação [216,218]. Logo, alterações na sinalização FAK- α -actinina podem impedir a fluidificação do citoesqueleto, culminando em um fenótipo de maior tensão (como observado em células FAK^{-/-} [219]), reduzindo o potencial contrátil. Considerando que α -actinina e FAK são parceiros proteicos de CRP3, pode-se especular que o CRP3 esteja envolvido na ativação desta via, coordenando então rigidez celular e contratilidade. De fato, células CRP3^{-/-} apresentam reduzida contratilidade, um evento que é recapitulado parcialmente pela inibição

de FAK com PF-573228 (iFAK). Em contrapartida, a tensão do citoesqueleto se mostrou inalterada na presença de iFAK, sugerindo a participação de mecanismos distintos.

A fim de entender como CRP3 poderia participar da sinalização mediada por FAK, postulamos que ele agiria como um substrato que, ao ser fosforilado, promoveria a formação de complexos proteicos contendo FAK, facilitando assim a mecanotransdução. Realizamos então uma triagem *in silico* para identificar tirosinas fosforiláveis por FAK em CRP3, onde foram identificados dois sítios passíveis de fosforilação (Y57 e Y167), cujos escores de predição do NetPhos 3.1 [190,191] eram de 0,8 ou mais (níveis similares aos observados para proteínas que sabidamente são fosforiladas por FAK, como paxilina) e que estão posicionados nos domínios LIM, utilizados por CRP3 para interagir com o citoesqueleto de actina [159]. Utilizando cardiomiócitos em cultura (que apresentam os mais altos níveis de expressão de CRP3), verificamos que CRP3 apresenta tirosinas fosforiladas após a estimulação com Ang II, corroborando a hipótese de que CRP3 é alvo de fosforilação durante a mecanotransdução. Análises experimentais futuras são necessárias para validar esses dados em células de músculo liso aórtico.

Em resumo, as evidências desta tese revelam que a proteína CRP3 é necessária à ativação do eixo FAK-Src-paxilina-p130CAS, eventos de sinalização necessários e suficientes à migração e contratilidade. Na ausência de CRP3, há comprometimento das cascatas de sinalização à jusante, comprometendo a percepção do ambiente a mecanossinalização, componentes-chave da mecanotransdução vascular. Coletivamente, os dados suportam a

hipótese de que CRP3 age como ponte molecular na interface actina-adesões focais de células musculares lisas aórticas.

7. CONCLUSÕES

- a. Na ausência de CRP3, células musculares lisas aórticas apresentam percepção do ambiente alterada, como observado pela capacidade de espalhamento e secreção de colágeno I, evidências que corroboram dados anteriores de maior tamanho médio de adesões focais em condições basais;
 - b. A localização de CRP3 nas adesões focais e nas fibras de actina impacta a mecanotransdução, já que em resposta à angiotensina II, há ausência de ativação de FAK-Src-paxilina-p130CAS, o que é consistente com dados anteriores de que células CRP3^{-/-} são incapazes de remodelar as adesões focais e de contrair *in vitro*;
 - c. Como consequência, células CRP3^{-/-} apresentam funcionamento normal do aparato de actomiosina, mas não da sinalização via FAK nas adesões focais, já que são incapazes de migrar e de remodelar adesões focais em resposta a estímulos;
 - d. A inibição de FAK recapitula parcialmente os efeitos da ausência de CRP3 na contratilidade em condições basais;
 - e. A rigidez celular se mostrou inalterada na presença de iFAK;
 - f. Análise *in silico* demonstrou que CRP3 pode ser um alvo de fosforilação por FAK, uma evidência suportada pela presença de fosfotirosinas em CRP3 após a estimulação de células cardíacas com Ang II.
-

8. REFERÊNCIAS

1. Webb, R.C. Smooth Muscle Contraction and Relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* **2003**, 27, 201–206, doi:10.1152/advances.2003.27.4.201.
 2. P, L.; V, R.; P, S.; S, L.; Lacolley, P.; Regnault, V.; Segers, P.; Laurent, S. Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol. Rev.* **2017**, 97, 1555–1617, doi:10.1152/physrev.00003.2017.
 3. Humphrey, J.D.; Milewicz, D.M.; Tellides, G.; Schwartz, M.A. Dysfunctional Mechanosensing in Aneurysms. *Science (80-.)*. **2014**, 344, 477–479, doi:10.1126/science.1253026.
 4. Brozovich, F.V.; Nicholson, C.J.; Degen, C.V.; Gao, Y.Z.; Aggarwal, M.; Morgan, K.G. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol. Rev.* **2016**, 68, 476–532, doi:10.1124/pr.115.010652.
 5. APTER, J.T.; MARQUEZ, E. Correlation of Visco-Elastic Properties of Large Arteries with Microscopic Structure. *Circ. Res.* **1968**, 22, 393–404, doi:10.1161/01.RES.22.3.393.
 6. Bia, D.; Zócalo, Y.; Cabrera-Fischer, E.I.; Wray, S.; Armentano, R.L. Quantitative Analysis of the Relationship between Blood Vessel Wall Constituents and Viscoelastic Properties: Dynamic Biomechanical and Structural In Vitro Studies in Aorta and Carotid Arteries. *Physiol. J.* **2014**, 2014, 1–9, doi:10.1155/2014/142421.
 7. Liu, J.C.Y.; Rottler, J.; Wang, L.; Zhang, J.; Pascoe, C.D.; Lan, B.; Norris, B.A.; Herrera, A.M.; Paré, P.D.; Seow, C.Y. Myosin filaments in smooth
-

-
- muscle cells do not have a constant length. *J. Physiol.* **2013**, *591*, 5867–5878, doi:10.1113/jphysiol.2013.264168.
8. Craig, R.; Megerman, J. Assembly of smooth muscle myosin into side-polar filaments. *J. Cell Biol.* **1977**, *75*, 990–996, doi:10.1083/jcb.75.3.990.
 9. Cooke, P.H.; Fay, F.S.; Craig, R. Myosin filaments isolated from skinned amphibian smooth muscle cells are side-polar. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1989**, *10*, 206–220, doi:10.1007/BF01739811.
 10. Xu, J.Q.; Harder, B.A.; Uman, P.; Craig, R. Myosin filament structure in vertebrate smooth muscle. *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 53–66, doi:10.1083/jcb.134.1.53.
 11. Squire, J.M. Muscle filament structure and muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1975**, *4*, 137–163, doi:10.1146/annurev.bb.04.060175.001033.
 12. Ingber, D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* **2006**, *20*, 811–827, doi:10.1096/fj.05-5424rev.
 13. Wynne, B.M.; Chiao, C.-W.; Webb, R.C. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *J. Am. Soc. Hypertens.* **2009**, *3*, 84–95, doi:10.1016/j.jash.2008.09.002.
 14. Michell, R.H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1975**, *415*, 81–147, doi:10.1016/0304-4157(75)90017-9.
 15. Mignery, G.A.; Südhof, T.C. The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *EMBO J.* **1990**, *9*, 3893–3898, doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07609.x.
-

-
16. Mescher, L.A. Junqueira's Basic Histology. Text and Atlas 14th edition. *Junqueira's Basic Histol. Text Atlas* **2016**, 53, 483–484.
 17. Malencik, D.A.; Anderson, S.R.; Bohnert, J.L.; Shalitin, Y. Functional interactions between smooth muscle myosin light chain kinase and calmodulin. *Biochemistry* **1982**, 21, 4031–4039, doi:10.1021/bi00260a019.
 18. ADELSTEIN, R.S.; ANNE CONTI, M. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature* **1975**, 256, 597–598, doi:10.1038/256597a0.
 19. Ikebe, M. Regulation of the function of mammalian myosin and its conformational change. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 369, 157–164, doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.057.
 20. Jung, H.S.; Billington, N.; Thirumurugan, K.; Salzameda, B.; Cremo, C.R.; Chalovich, J.M.; Chantler, P.D.; Knight, P.J. Role of the Tail in the Regulated State of Myosin 2. *J. Mol. Biol.* **2011**, 408, 863–878, doi:10.1016/j.jmb.2011.03.019.
 21. Salzameda, B.; Facemyer, K.C.; Beck, B.W.; Cremo, C.R. The N-terminal Lobes of Both Regulatory Light Chains Interact with the Tail Domain in the 10 S-inhibited Conformation of Smooth Muscle Myosin. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 38801–38811, doi:10.1074/jbc.M606555200.
 22. Applegate, D.; Pardee, J.D.J. Actin-facilitated assembly of smooth muscle myosin induces formation of actomyosin fibrils. *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 1223–1230, doi:10.1083/jcb.117.6.1223.
 23. Górecka, A.; Aksoy, M.O.; Hartshorne, D.J. The effect of phosphorylation of gizzard myosin on actin activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 71, 325–331, doi:10.1016/0006-291X(76)90286-2.
-

-
24. Vicente-Manzanares, M.; Ma, X.; Adelstein, R.S.; Horwitz, A.R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 778–790, doi:10.1038/nrm2786.
 25. SOBIESZEK, A. Ca-Linked Phosphorylation of a Light Chain of Vertebrate Smooth-Muscle Myosin. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *73*, 477–483, doi:10.1111/j.1432-1033.1977.tb11340.x.
 26. Ikebe, M.; Onishi, H.; Watanabe, S. Phosphorylation and dephosphorylation of a light chain of the chicken gizzard myosin molecule. *J. Biochem.* **1977**, *82*, 299–302, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131684.
 27. Hartshorne, D.J.; Ito, M.; Erdödi, F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1998**, *19*, 325–41, doi:10.1023/a:1005385302064.
 28. Woodsome, T.P.; Eto, M.; Everett, A.; Brautigan, D.L.; Kitazawa, T. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca²⁺ sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* **2001**, *535*, 553–564, doi:10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00553.x.
 29. Eto, M.; Ohmori, T.; Suzuki, M.; Furuya, K.; Morita, F. A Novel Protein Phosphatase-1 Inhibitory Protein Potentiated by Protein Kinase C. Isolation from Porcine Aorta Media and Characterization¹. *J. Biochem.* **1995**, *118*, 1104–1107, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124993.
 30. Eto, M.; Kitazawa, T.; Matsuzawa, F.; Aikawa, S.; Kirkbride, J.A.; Isozumi, N.; Nishimura, Y.; Brautigan, D.L.; Ohki, S. Phosphorylation-Induced Conformational Switching of CPI-17 Produces a Potent Myosin
-

-
- Phosphatase Inhibitor. *Structure* **2007**, *15*, 1591–1602, doi:10.1016/j.str.2007.10.014.
31. Kitazawa, T.; Masuo, M.; Somlyo, A.P. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 9307–9310, doi:10.1073/pnas.88.20.9307.
32. Kitazawa, T.; Eto, M.; Woodsome, T.P.; Brautigan, D.L. Agonists Trigger G Protein-mediated Activation of the CPI-17 Inhibitor Phosphoprotein of Myosin Light Chain Phosphatase to Enhance Vascular Smooth Muscle Contractility. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9897–9900, doi:10.1074/jbc.275.14.9897.
33. Benham, C.D.; Hess, P.; Tsien, R.W. Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ. Res.* **1987**, *61*, I10-6.
34. Collier, M.L.; Ji, G.; Wang, Y.-X.; Kotlikoff, M.I. Calcium-Induced Calcium Release in Smooth Muscle. *J. Gen. Physiol.* **2000**, *115*, 653–662, doi:10.1085/jgp.115.5.653.
35. Knot, H.J.; Nelson, M.T. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J. Physiol.* **1998**, *508*, 199–209, doi:10.1111/j.1469-7793.1998.199br.x.
36. Prakriya, M.; Lewis, R.S. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1383–1436, doi:10.1152/physrev.00020.2014.
37. Albert, A.P. Gating mechanisms of canonical transient receptor potential channel proteins: role of phosphoinositols and diacylglycerol. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *704*, 391–411, doi:10.1007/978-94-007-0265-3_22.
38. Earley, S.; Brayden, J.E. Transient Receptor Potential Channels in the
-

-
- Vasculature. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 645–690, doi:10.1152/physrev.00026.2014.
39. Martinsen, A.; Dessy, C.; Morel, N. Regulation of calcium channels in smooth muscle: New insights into the role of myosin light chain kinase. *Channels* **2014**, *8*, 402–413, doi:10.4161/19336950.2014.950537.
40. Hill, M.A.; Potocnik, S.J.; Martinez-Lemus, L.A.; Meininger, G.A. Delayed arteriolar relaxation after prolonged agonist exposure: functional remodeling involving tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2003**, *285*, H849–H856, doi:10.1152/ajpheart.00986.2002.
41. Rasmussen, H.; Takuwa, Y.; Park, S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J.* **1987**, *1*, 177–185, doi:10.1096/fasebj.1.3.3040504.
42. Rembold, C.M. Force suppression and the crossbridge cycle in swine carotid artery. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2007**, *293*, C1003–C1009, doi:10.1152/ajpcell.00091.2007.
43. Martinez-Lemus, L.A. Persistent Agonist-Induced Vasoconstriction Is Not Required for Angiotensin II to Mediate Inward Remodeling of Isolated Arterioles with Myogenic Tone. *J. Vasc. Res.* **2008**, *45*, 211–221, doi:10.1159/000112513.
44. A. Martinez-Lemus, L.; A. Hill, M.; S. Bolz, S.; Pohl, U.; A. Meininger*, G. Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *FASEB J.* **2004**, *18*, 708–710, doi:10.1096/fj.03-0634fje.
45. Fultz, M.E.; Li, C.; Geng, W.; Wright, G.L. Remodeling of the actin cytoskeleton in the contracting A7r5 smooth muscle cell. *J. Muscle Res.*
-

-
- Cell Motil.* **2000**, *21*, 775–787, doi:10.1023/A:1010396429297.
46. Chen, X.; Pavlish, K.; Zhang, H.-Y.; Benoit, J.N. Effects of chronic portal hypertension on agonist-induced actin polymerization in small mesenteric arteries. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2006**, *290*, H1915–H1921, doi:10.1152/ajpheart.00643.2005.
47. Anfinogenova, Y.; Wang, R.; Li, Q.; Spinelli, A.M.; Tang, D.D. Abl Silencing Inhibits CAS-Mediated Process and Constriction in Resistance Arteries. *Circ. Res.* **2007**, *101*, 420–428, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.156463.
48. Shaw, L.; Ahmed, S.; Austin, C.; Taggart, M.J. Inhibitors of Actin Filament Polymerisation Attenuate Force but Not Global Intracellular Calcium in Isolated Pressurised Resistance Arteries. *J. Vasc. Res.* **2003**, *40*, 1–10, doi:10.1159/000068940.
49. Cipolla, M.J.; Osol, G. Vascular smooth muscle actin cytoskeleton in cerebral artery forced dilatation. *Stroke* **1998**, *29*, 1223–1228, doi:10.1161/01.STR.29.6.1223.
50. Cipolla, M.J.; Gokina, N.I.; Osol, G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J.* **2002**, *16*, 72–76, doi:10.1096/cj.01-0104hyp.
51. Adler, K.B.; Krill, J.; Alberghini, T. V.; Evans, J.N. Effect of cytochalasin D on smooth muscle contraction. *Cell Motil.* **1983**, *3*, 545–551, doi:10.1002/cm.970030521.
52. Wright, G.; Hurn, E. Cytochalasin inhibition of slow tension increase in rat aortic rings. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1994**, *267*, H1437–H1446, doi:10.1152/ajpheart.1994.267.4.H1437.
53. Ghosh, S.; Kollar, B.; Nahar, T.; Suresh Babu, S.; Wojtowicz, A.; Sticht, C.;
-

-
- Gretz, N.; Wagner, A.H.; Korff, T.; Hecker, M. Loss of the Mechanotransducer Zyxin Promotes a Synthetic Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, e001712, doi:10.1161/JAHA.114.001712.
54. Sun, Z.; Huang, S.; Li, Z.; Meininger, G.A. Zyxin is involved in regulation of mechanotransduction in arteriole smooth muscle cells. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, doi:10.3389/fphys.2012.00472.
55. Ohanian, V.; Gatfield, K.; Ohanian, J. Role of the Actin Cytoskeleton in G-Protein–Coupled Receptor Activation of PYK2 and Paxillin in Vascular Smooth Muscle. *Hypertension* **2005**, *46*, 93–99, doi:10.1161/01.HYP.0000167990.82235.3c.
56. Atherton, P.; Stutchbury, B.; Wang, D.-Y.; Jethwa, D.; Tsang, R.; Meiler-Rodriguez, E.; Wang, P.; Bate, N.; Zent, R.; Barsukov, I.L.; et al. Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10038, doi:10.1038/ncomms10038.
57. Ballestrem, C. Molecular mapping of tyrosine-phosphorylated proteins in focal adhesions using fluorescence resonance energy transfer. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 866–875, doi:10.1242/jcs.02794.
58. Moiseeva, E.P. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc. Res.* **2001**, *52*, 372–386.
59. Zargham, R.; Touyz, R.M.; Thibault, G. $\alpha 8$ Integrin overexpression in de-differentiated vascular smooth muscle cells attenuates migratory activity and restores the characteristics of the differentiated phenotype. *Atherosclerosis* **2007**, *195*, 303–312, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.01.005.
-

-
60. Stouffer, G.A.; Hu, Z.; Sajid, M.; Li, H.; Jin, G.; Nakada, M.T.; Hanson, S.R.; Runge, M.S. β 1 Integrins are upregulated after vascular injury and modulate thrombospondin- and thrombin-induced proliferation of cultured smooth muscle cells. *Circulation* **1998**, *97*, 907–915, doi:10.1161/01.CIR.97.9.907.
 61. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110*, 673–87, doi:10.1016/s0092-8674(02)00971-6.
 62. Zaidel-Bar, R.; Itzkovitz, S.; Ma'ayan, A.; Iyengar, R.; Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 858–867, doi:10.1038/ncb0807-858.
 63. Schiller, H.B.; Friedel, C.C.; Boulegue, C.; Fässler, R.; Fäsingssler, R. Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep.* **2011**, *12*, 259–266, doi:10.1038/embor.2011.5.
 64. Horton, E.R.; Byron, A.; Askari, J.A.; Ng, D.H.J.; Millon-Frémillon, A.; Robertson, J.; Koper, E.J.; Paul, N.R.; Warwood, S.; Knight, D.; et al. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1577–1587, doi:10.1038/ncb3257.
 65. Kanchanawong, P.; Shtengel, G.; Pasapera, A.M.; Ramko, E.B.; Davidson, M.W.; Hess, H.F.; Waterman, C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **2010**, *468*, 580–584, doi:10.1038/nature09621.
 66. Liu, J.; Wang, Y.; Goh, W.I.; Goh, H.; Baird, M.A.; Ruehland, S.; Teo, S.; Bate, N.; Critchley, D.R.; Davidson, M.W.; et al. Talin determines the
-

-
- nanoscale architecture of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, E4864–E4873, doi:10.1073/pnas.1512025112.
67. Turner, C.E.; Pietras, K.M.; Taylor, D.S.; Molloy, C.J. Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells. *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 333–342.
68. del Rio, A.; Perez-Jimenez, R.; Liu, R.; Roca-Cusachs, P.; Fernandez, J.M.; Sheetz, M.P. Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science* (80-.). **2009**, *323*, 638–641, doi:10.1126/science.1162912.
69. Giannone, G.; Jiang, G.; Sutton, D.H.; Critchley, D.R.; Sheetz, M.P. Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 409–419, doi:10.1083/jcb.200302001.
70. Cluzel, C.; Saltel, F.; Lussi, J.; Paulhe, F.; Imhof, B.A.; Wehrle-Haller, B. The mechanisms and dynamics of $\alpha\beta 3$ integrin clustering in living cells. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 383–392, doi:10.1083/jcb.200503017.
71. Ribeiro-Silva, J.C.; Miyakawa, A.A.; Krieger, J.E. Focal adhesion signaling: vascular smooth muscle cell contractility beyond calcium mechanisms. *Clin. Sci.* **2021**, *135*, 1189–1207, doi:10.1042/cs20201528.
72. Min, J.; Reznichenko, M.; Poythress, R.H.; Gallant, C.M.; Vetterkind, S.; Li, Y.; Morgan, K.G. Src modulates contractile vascular smooth muscle function via regulation of focal adhesions. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3585–3592, doi:10.1002/jcp.24062.
73. Gao, Y.Z.; Saphirstein, R.J.; Yamin, R.; Suki, B.; Morgan, K.G. Aging
-

-
- impairs smooth muscle-mediated regulation of aortic stiffness: a defect in shock absorption function? *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2014**, *307*, H1252–H1261, doi:10.1152/ajpheart.00392.2014.
74. Lehoux, S.; Esposito, B.; Merval, R.; Tedgui, A. Differential Regulation of Vascular Focal Adhesion Kinase by Steady Stretch and Pulsatility. *Circulation* **2005**, *111*, 643–649, doi:10.1161/01.CIR.0000154548.16191.2F.
75. Albinsson, S.; Nordström, I.; Hellstrand, P. Stretch of the Vascular Wall Induces Smooth Muscle Differentiation by Promoting Actin Polymerization. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34849–34855, doi:10.1074/jbc.M403370200.
76. Saphirstein, R.J.; Gao, Y.Z.; Jensen, M.H.; Gallant, C.M.; Vetterkind, S.; Moore, J.R.; Morgan, K.G. The Focal Adhesion: A Regulated Component of Aortic Stiffness. *PLoS One* **2013**, *8*, e62461, doi:10.1371/journal.pone.0062461.
77. George, E.L.; Baldwin, H.S.; Hynes, R.O. Fibronectins Are Essential for Heart and Blood Vessel Morphogenesis But Are Dispensable for Initial Specification of Precursor Cells. *Blood* **1997**, *90*, 3073–3081, doi:10.1182/blood.V90.8.3073.
78. Hong, Z.; Sun, Z.; Li, M.; Li, Z.; Bunyak, F.; Ersoy, I.; Trzeciakowski, J.P.; Staiculescu, M.C.; Jin, M.; Martinez-Lemus, L.; et al. Vasoactive agonists exert dynamic and coordinated effects on vascular smooth muscle cell elasticity, cytoskeletal remodelling and adhesion. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 1249–1266, doi:10.1113/jphysiol.2013.264929.
79. Hong, Z.; Sun, Z.; Li, Z.; Mesquitta, W.-T.; Trzeciakowski, J.P.; Meininger, G.A. Coordination of fibronectin adhesion with contraction and relaxation in
-

-
- microvascular smooth muscle. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *96*, 73–80, doi:10.1093/cvr/cvs239.
80. Moraes, J.A.; Frony, A.C.; Dias, A.M.; Renovato-Martins, M.; Rodrigues, G.; Marcinkiewicz, C.; Assreuy, J.; Barja-Fidalgo, C. Alpha1beta1 and integrin-linked kinase interact and modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **2015**, *243*, 477–485, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.026.
81. Moraes, J.A.; Frony, A.C.; Dias, A.M.; Renovato-Martins, M.; Rodrigues, G.; Marcinkiewicz, C.; Assreuy, J.; Barja-Fidalgo, C. Data in support of alpha1beta1 and integrin-linked kinase interact and modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells. *Data Br.* **2016**, *6*, 330–340, doi:10.1016/j.dib.2015.11.053.
82. Tamura, K.; Okazaki, M.; Tamura, M.; Kanegae, K.; Okuda, H.; Abe, H.; Nakashima, Y. Synergistic Interaction of Integrin and Angiotensin II in Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2001**, *38*, S59–S62, doi:10.1097/00005344-200110001-00013.
83. Chen, L.; Vicente-Manzanares, M.; Potvin-Trottier, L.; Wiseman, P.W.; Horwitz, A.R. The Integrin-Ligand Interaction Regulates Adhesion and Migration through a Molecular Clutch. *PLoS One* **2012**, *7*, e40202, doi:10.1371/journal.pone.0040202.
84. Seong, J.; Tajik, A.; Sun, J.; Guan, J.-L.; Humphries, M.J.; Craig, S.E.; Shekaran, A.; Garcia, A.J.; Lu, S.; Lin, M.Z.; et al. Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 19372–
-

-
- 19377, doi:10.1073/pnas.1307405110.
85. Hanks, S.K. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front. Biosci.* **2003**, *8*, 1114, doi:10.2741/1114.
86. Hu, X.-Q.; Singh, N.; Mukhopadhyay, D.; Akbarali, H.I. Modulation of Voltage-dependent Ca²⁺ Channels in Rabbit Colonic Smooth Muscle Cells by c-Src and Focal Adhesion Kinase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5337–5342, doi:10.1074/jbc.273.9.5337.
87. Mogford, J.E.; Davis, G.E.; Platts, S.H.; Meininger, G.A. Vascular Smooth Muscle α v β 3 Integrin Mediates Arteriolar Vasodilation in Response to RGD Peptides. *Circ. Res.* **1996**, *79*, 821–826, doi:10.1161/01.RES.79.4.821.
88. D'Angelo, G.; Mogford, J.E.; Davis, G.E.; Davis, M.J.; Meininger, G.A. Integrin-mediated reduction in vascular smooth muscle [Ca²⁺]_i induced by RGD-containing peptide. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1997**, *272*, H2065–H2070, doi:10.1152/ajpheart.1997.272.4.H2065.
89. Wu, X.; Davis, G.E.; Meininger, G.A.; Wilson, E.; Davis, M.J. Regulation of the L-type Calcium Channel by α 5 β 1 Integrin Requires Signaling between Focal Adhesion Proteins. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30285–30292, doi:10.1074/jbc.M102436200.
90. Callera, G.E.; Antunes, T.T.; He, Y.; Montezano, A.C.; Yogi, A.; Savoia, C.; Touyz, R.M. c-Src Inhibition Improves Cardiovascular Function but not Remodeling or Fibrosis in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension* **2016**, *68*, 1179–1190, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07699.
-

-
91. Touyz, R.M.; Wu, X.-H.H.; He, G.; Park, J.B.; Chen, X.; Vacher, J.; Rajapurohitam, V.; Schiffrin, E.L. Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* **2001**, *19*, 441–449, doi:10.1097/00004872-200103000-00012.
92. Heerkens, E.H.J.; Shaw, L.; Ryding, A.; Brooker, G.; Mullins, J.J.; Austin, C.; Ohanian, V.; Heagerty, A.M. V Integrins Are Necessary for Eutrophic Inward Remodeling of Small Arteries in Hypertension. **2006**, doi:10.1161/01.HYP.0000198428.45132.02.
93. Jia, L.; Tang, D.D. Abl activation regulates the dissociation of CAS from cytoskeletal vimentin by modulating CAS phosphorylation in smooth muscle. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2010**, *299*, C630–C637, doi:10.1152/ajpcell.00095.2010.
94. Ushio-Fukai, M.; Zuo, L.; Ikeda, S.; Tojo, T.; Patrushev, N.A.; Alexander, R.W. cAbl Tyrosine Kinase Mediates Reactive Oxygen Species– and Caveolin-Dependent AT 1 Receptor Signaling in Vascular Smooth Muscle. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 829–836, doi:10.1161/01.RES.0000185322.46009.F5.
95. Chen, S.; Wang, R.; Li, Q.-F.; Tang, D.D. Abl knockout differentially affects p130 Crk-associated substrate, vinculin, and paxillin in blood vessels of mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H533–H539, doi:10.1152/ajpheart.00237.2009.
96. Böttcher, R.T.; Veelders, M.; Rombaut, P.; Faix, J.; Theodosiou, M.; Stradal, T.E.; Rottner, K.; Zent, R.; Herzog, F.; Fässler, R. Kindlin-2 recruits paxillin and Arp2/3 to promote membrane protrusions during initial cell
-

-
- spreading. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 3785–3798, doi:10.1083/jcb.201701176.
97. Pasapera, A.M.; Schneider, I.C.; Rericha, E.; Schlaepfer, D.D.; Waterman, C.M. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J. Cell Biol.* **2010**, *188*, 877–890, doi:10.1083/jcb.200906012.
98. Schneider, I.C.; Hays, C.K.; Waterman, C.M. Epidermal Growth Factor–induced Contraction Regulates Paxillin Phosphorylation to Temporally Separate Traction Generation from De-adhesion. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3155–3167, doi:10.1091/mbc.e09-03-0219.
99. Zaidel-Bar, R.; Milo, R.; Kam, Z.; Geiger, B. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **2006**, *120*, 137–148, doi:10.1242/jcs.03314.
100. Friedland, J.C.; Lee, M.H.; Boettiger, D. Mechanically activated integrin switch controls $\alpha 5 \beta 1$ function. *Science* **2009**, *323*, 642–4, doi:10.1126/science.1168441.
101. Strohmeyer, N.; Bharadwaj, M.; Costell, M.; Fässler, R.; Müller, D.J. Fibronectin-bound $\alpha 5 \beta 1$ integrins sense load and signal to reinforce adhesion in less than a second. *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 1262–1270, doi:10.1038/nmat5023.
102. Plotnikov, S. V.; Pasapera, A.M.; Sabass, B.; Waterman, C.M. Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration. *Cell* **2012**, *151*, 1513–1527, doi:10.1016/j.cell.2012.11.034.
103. Sawada, Y.; Tamada, M.; Dubin-Thaler, B.J.; Cherniavskaya, O.; Sakai, R.; Tanaka, S.; Sheetz, M.P. Force Sensing by Mechanical Extension of the
-

-
- Src Family Kinase Substrate p130Cas. *Cell* **2006**, *127*, 1015–1026, doi:10.1016/j.cell.2006.09.044.
104. Tang, D.D.; Tan, J. Role of Crk-Associated Substrate in the Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction. *Hypertension* **2003**, *42*, 858–863, doi:10.1161/01.HYP.0000085333.76141.33.
105. Ogden, K.; Thompson, J.M.; Hickner, Z.; Huang, T.; Tang, D.D.; Watts, S.W. A new signaling paradigm for serotonin: use of Crk-associated substrate in arterial contraction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H2857–H2863, doi:10.1152/ajpheart.00229.2006.
106. Tang, D.D.; Zhang, W.; Gunst, S.J. The Adapter Protein CrkII Regulates Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, Actin Polymerization, and Tension Development during Contractile Stimulation of Smooth Muscle. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23380–23389, doi:10.1074/jbc.M413390200.
107. Pollard, T.D.; Blanchoin, L.; Mullins, R.D. Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 545–576, doi:10.1146/annurev.biophys.29.1.545.
108. Takahashi, T.; Kawahara, Y.; Taniguchi, T.; Yokoyama, M. Tyrosine phosphorylation and association of p130 Cas and c-Crk II by ANG II in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1998**, *274*, H1059–H1065, doi:10.1152/ajpheart.1998.274.4.H1059.
109. Rohatgi, R.; Nollau, P.; Ho, H.-Y.H.; Kirschner, M.W.; Mayer, B.J. Nck and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synergistically Activate Actin Polymerization through the N-WASP-Arp2/3 Pathway. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26448–26452, doi:10.1074/jbc.M103856200.
-

-
110. Tang, D.D.; Gunst, S.J. The Small GTPase Cdc42 Regulates Actin Polymerization and Tension Development during Contractile Stimulation of Smooth Muscle. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51722–51728, doi:10.1074/jbc.M408351200.
 111. Roca-Cusachs, P.; del Rio, A.; Puklin-Faucher, E.; Gauthier, N.C.; Biais, N.; Sheetz, M.P. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, E1361–E1370, doi:10.1073/pnas.1220723110.
 112. Chereau, D.; Dominguez, R. Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *J. Struct. Biol.* **2006**, *155*, 195–201, doi:10.1016/j.jsb.2006.01.012.
 113. Schirenbeck, A.; Arasada, R.; Bretschneider, T.; Stradal, T.E.B.; Schleicher, M.; Faix, J. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 7694–7699, doi:10.1073/pnas.0511243103.
 114. Hüttelmaier, S.; Harbeck, B.; Steffens, N.O.; Meßerschmidt, T.; Illenberger, S.; Jockusch, B.M. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* **1999**, *451*, 68–74, doi:10.1016/S0014-5793(99)00546-3.
 115. Bear, J.E.; Svitkina, T.M.; Krause, M.; Schafer, D.A.; Loureiro, J.J.; Strasser, G.A.; Maly, I. V.; Chaga, O.Y.; Cooper, J.A.; Borisy, G.G.; et al. Antagonism between Ena/VASP Proteins and Actin Filament Capping Regulates Fibroblast Motility. *Cell* **2002**, *109*, 509–521, doi:10.1016/S0092-8674(02)00731-6.
 116. Barzik, M.; Kotova, T.I.; Higgs, H.N.; Hazelwood, L.; Hanein, D.; Gertler,
-

-
- F.B.; Schafer, D.A. Ena/VASP Proteins Enhance Actin Polymerization in the Presence of Barbed End Capping Proteins. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28653–28662, doi:10.1074/jbc.M503957200.
117. Bundschu, K.; Walter, U.; Schuh, K. The VASP-Spred-Sprouty Domain Puzzle. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36477–36481, doi:10.1074/jbc.R600023200.
118. Zhuang, S.; Nguyen, G.T.; Chen, Y.; Gudi, T.; Eigenthaler, M.; Jarchau, T.; Walter, U.; Boss, G.R.; Pilz, R.B. Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Activation of Serum-response Element-dependent Transcription Occurs Downstream of RhoA and Is Inhibited by cGMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10397–10407, doi:10.1074/jbc.M313048200.
119. Blume, C.; Benz, P.M.; Walter, U.; Ha, J.; Kemp, B.E.; Renné, T. AMP-activated Protein Kinase Impairs Endothelial Actin Cytoskeleton Assembly by Phosphorylating Vasodilator-stimulated Phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4601–4612, doi:10.1074/jbc.M608866200.
120. Defawe, O.D.; Kim, S.; Chen, L.; Huang, D.; Kenagy, R.D.; Renné, T.; Walter, U.; Daum, G.; Clowes, A.W. VASP phosphorylation at serine239 regulates the effects of NO on smooth muscle cell invasion and contraction of collagen. *J. Cell. Physiol.* **2010**, *222*, 230–237, doi:10.1002/jcp.21942.
121. Kim, H.R.; Graceffa, P.; Ferron, F.; Gallant, C.; Boczkowska, M.; Dominguez, R.; Morgan, K.G. Actin polymerization in differentiated vascular smooth muscle cells requires vasodilator-stimulated phosphoprotein. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2010**, *298*, C559–C571, doi:10.1152/ajpcell.00431.2009.
-

-
122. Crawford, A.W.; Michelsen, J.W.; Beckerle, M.C. An interaction between zyxin and alpha-actinin. *J. Cell Biol.* **1992**, *116*, 1381–1393, doi:10.1083/jcb.116.6.1381.
123. Hoffman, L.M.; Jensen, C.C.; Kloeker, S.; Wang, C.-L.A.; Yoshigi, M.; Beckerle, M.C. Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling. *J. Cell Biol.* **2006**, *172*, 771–782, doi:10.1083/jcb.200512115.
124. Cattaruzza, M.; Latruch, C.; Hecker, M. Focal Adhesion Protein Zyxin Is a Mechanosensitive Modulator of Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* **2004**, *43*, 726–730, doi:10.1161/01.HYP.0000119189.82659.52.
125. Sun, X.; Phua, D.Y.Z.; Axiotakis, L.; Smith, M.A.; Blankman, E.; Gong, R.; Cail, R.C.; Espinosa de los Reyes, S.; Beckerle, M.C.; Waterman, C.M.; et al. Mechanosensing through Direct Binding of Tensed F-Actin by LIM Domains. *Dev. Cell* **2020**, *55*, 468–482.e7, doi:10.1016/j.devcel.2020.09.022.
126. Zhai, J.; Lin, H.; Nie, Z.; Wu, J.; Cañete-Soler, R.; Schlaepfer, W.W.; Schlaepfer, D.D. Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase with p190RhoGEF. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24865–24873, doi:10.1074/jbc.M302381200.
127. Rico, B.; Beggs, H.E.; Schahin-Reed, D.; Kimes, N.; Schmidt, A.; Reichardt, L.F. Control of axonal branching and synapse formation by focal adhesion kinase. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1059–1069, doi:10.1038/nn1317.
128. Sreenivasappa, H.; Chaki, S.P.; Lim, S.-M.; Trzeciakowski, J.P.; Davidson, M.W.; Rivera, G.M.; Trache, A. Selective regulation of cytoskeletal tension
-

-
- and cell–matrix adhesion by RhoA and Src. *Integr. Biol.* **2014**, *6*, 743, doi:10.1039/C4IB00019F.
129. Guilluy, C.; Brégeon, J.; Toumaniantz, G.; Rolli-Derkinderen, M.; Retailleau, K.; Loufrani, L.; Henrion, D.; Scalbert, E.; Bril, A.; Torres, R.M.; et al. The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat. Med.* **2010**, doi:10.1038/nm.2079.
130. Swärd, K.; Dreja, K.; Susnjar, M.; Hellstrand, P.; Hartshorne, D.J.; Walsh, M.P. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J. Physiol.* **2000**, doi:10.1111/j.1469-7793.2000.0033m.x.
131. Iizuka, K.; Yoshii, A.; Samizo, K.; Tsukagoshi, H.; Ishizuka, T.; Dobashi, K.; Nakazawa, T.; Mori, M. A major role for the Rho-associated coiled coil forming protein kinase in G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization through inhibition of myosin phosphatase in rabbit trachea. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, doi:10.1038/sj.bjp.0702864.
132. Totsukawa, G.; Yamakita, Y.; Yamashiro, S.; Hartshorne, D.J.; Sasaki, Y.; Matsumura, F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 797–806, doi:10.1083/jcb.150.4.797.
133. Amano, M.; Ito, M.; Kimura, K.; Fukata, Y.; Chihara, K.; Nakano, T.; Matsuura, Y.; Kaibuchi, K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20246–20249, doi:10.1074/jbc.271.34.20246.
-

-
134. Trinkle-Mulcahy, L.; Ichikawa, K.; Hartshorne, D.J.; Siegman, M.J.; Butler, T.M. Thiophosphorylation of the 130-kDa Subunit Is Associated with a Decreased Activity of Myosin Light Chain Phosphatase in α -Toxin-permeabilized Smooth Muscle. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18191–18194, doi:10.1074/jbc.270.31.18191.
135. Murányi, A.; Derkach, D.; Erdődi, F.; Kiss, A.; Ito, M.; Hartshorne, D.J. Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: Inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6611–6615, doi:10.1016/j.febslet.2005.10.055.
136. Kitazawa, T.; Gaylinn, B.D.; Denney, G.H.; Somlyo, A.P. G-protein-mediated Ca^{2+} sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1708–1715, doi:10.1016/S0021-9258(18)52353-X.
137. Velasco, G.; Armstrong, C.; Morrice, N.; Frame, S.; Cohen, P. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett.* **2002**, *527*, 101–104, doi:10.1016/S0014-5793(02)03175-7.
138. Weber, L.P.; Van Lierop, J.E.; Walsh, M.P. Ca^{2+} -independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J. Physiol.* **1999**, *516*, 805–824, doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0805u.x.
139. Lim, S.-M.; Trzeciakowski, J.P.; Sreenivasappa, H.; Dangott, L.J.; Trache, A. RhoA-induced cytoskeletal tension controls adaptive cellular remodeling to mechanical signaling. *Integr. Biol.* **2012**, *4*, 615–627, doi:10.1039/c2ib20008b.
-

-
140. Uehata, M.; Ishizaki, T.; Satoh, H.; Ono, T.; Kawahara, T.; Morishita, T.; Tamakawa, H.; Yamagami, K.; Inui, J.; Maekawa, M.; et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **1997**, *389*, 990–994, doi:10.1038/40187.
141. Choi, C.K.; Vicente-Manzanares, M.; Zareno, J.; Whitmore, L.A.; Mogilner, A.; Horwitz, A.R. Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1039–1050, doi:10.1038/ncb1763.
142. Humphries, J.D.; Wang, P.; Streuli, C.; Geiger, B.; Humphries, M.J.; Ballestrem, C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 1043–1057, doi:10.1083/jcb.200703036.
143. Singh, K.; Kim, A.B.; Morgan, K.G. Non-muscle myosin II regulates aortic stiffness through effects on specific focal adhesion proteins and the non-muscle cortical cytoskeleton. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25*, 2471–2483, doi:10.1111/jcmm.16170.
144. Yuen, S.L.; Ogut, O.; Brozovich, F. V. Nonmuscle myosin is regulated during smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H191-9, doi:10.1152/ajpheart.00132.2009.
145. Pawson, T. Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science* (80-.). **2003**, *300*, 445–452, doi:10.1126/science.1083653.
146. Way, J.C.; Chalfie, M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* **1988**, *54*, 5–16, doi:10.1016/0092-8674(88)90174-2.
-

-
147. Freyd, G.; Kim, S.K.; Horvitz, H.R. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-II*. *Nature* **1990**, *344*, 876–879, doi:10.1038/344876a0.
148. Karlsson, O.; Thor, S.; Norberg, T.; Ohlsson, H.; Edlund, T. Insulin gene enhancer binding protein *Isl-1* is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **1990**, *344*, 879–882, doi:10.1038/344879a0.
149. Schmeichel, K.L.; Beckerle, M.C. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* **1994**, *79*, 211–219, doi:10.1016/0092-8674(94)90191-0.
150. Li, P.M.; Reichert, J.; Freyd, G.; Horvitz, H.R.; Walsh, C.T. The LIM region of a presumptive *Caenorhabditis elegans* transcription factor is an iron-sulfur- and zinc-containing metallodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 9210–9213, doi:10.1073/pnas.88.20.9210.
151. Michelsen, J.W.; Sewell, A.K.; Louis, H.A.; Olsen, J.I.; Davis, D.R.; Winge, D.R.; Beckerle, M.C. Mutational analysis of the metal sites in an LIM domain. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11108–11113, doi:10.1016/s0021-9258(19)78098-3.
152. Michelsen, J.W.; Schmeichel, K.L.; Beckerle, M.C.; Winge, D.R. The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 4404–4408, doi:10.1073/pnas.90.10.4404.
153. Schmeichel, K.L.; Beckerle, M.C. Molecular dissection of a LIM domain. *Mol. Biol. Cell* **1997**, *8*, 219–230, doi:10.1091/mbc.8.2.219.
154. Kadrmas, J.L.; Beckerle, M.C. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 920–931,
-

-
- doi:10.1038/nrm1499.
155. Chang, D.F.; Belaguli, N.S.; Iyer, D.; Roberts, W.B.; Wu, S.-P.; Dong, X.-R.; Marx, J.G.; Moore, M.S.; Beckerle, M.C.; Majesky, M.W.; et al. Cysteine-Rich LIM-Only Proteins CRP1 and CRP2 Are Potent Smooth Muscle Differentiation Cofactors. *Dev. Cell* **2003**, *4*, 107–118, doi:10.1016/S1534-5807(02)00396-9.
156. Boateng, S.Y.; Senyo, S.E.; Qi, L.; Goldspink, P.H.; Russell, B. Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, *47*, 426–435, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.04.006.
157. Arber, S.; Caroni, P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* **1996**, *10*, 289–300, doi:10.1101/gad.10.3.289.
158. Louis, H.A.; Pino, J.D.; Schmeichel, K.L.; Pomiès, P.; Beckerle, M.C. Comparison of Three Members of the Cysteine-rich Protein Family Reveals Functional Conservation and Divergent Patterns of Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27484–27491, doi:10.1074/jbc.272.43.27484.
159. Hoffmann, C.; Moreau, F.; Moes, M.; Luthold, C.; Dieterle, M.; Goretti, E.; Neumann, K.; Steinmetz, A.; Thomas, C. Human Muscle LIM Protein Dimerizes along the Actin Cytoskeleton and Cross-Links Actin Filaments. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 3053–3065, doi:10.1128/MCB.00651-14.
160. Papalouka, V.; Arvanitis, D.A.; Vafiadaki, E.; Mavroidis, M.; Papadodima, S.A.; Spiliopoulou, C.A.; Kremastinos, D.T.; Kranias, E.G.; Sanoudou, D. Muscle Lim Protein Interacts with Cofilin 2 and Regulates F-Actin Dynamics in Cardiac and Skeletal Muscle. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 6046–6058,
-

-
- doi:10.1128/mcb.00654-09.
161. Vafiadaki, E.; Arvanitis, D.A.; Papalouka, V.; Terzis, G.; Roumeliotis, T.I.; Spengos, K.; Garbis, S.D.; Manta, P.; Kranias, E.G.; Sanoudou, D. Muscle lim protein isoform negatively regulates striated muscle actin dynamics and differentiation. *FEBS J.* **2014**, *281*, 3261–3279, doi:10.1111/febs.12859.
162. Arber, S.; Hunter, J.J.; Ross, J.; Hongo, M.; Sansig, G.; Borg, J.; Perriard, J.C.; Chien, K.R.; Caroni, P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* **1997**, *88*, 393–403, doi:10.1016/S0092-8674(00)81878-4.
163. Ehler, E.; Horowitz, R.; Zuppinger, C.; Price, R.L.; Perriard, E.; Leu, M.; Caroni, P.; Sussman, M.; Eppenberger, H.M.; Perriard, J.C. Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 763–772, doi:10.1083/jcb.153.4.763.
164. Knöll, R.; Hoshijima, M.; Hoffman, H.M.; Person, V.; Lorenzen-Schmidt, I.; Bang, M.L.; Hayashi, T.; Shiga, N.; Yasukawa, H.; Schaper, W.; et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* **2002**, *111*, 943–955, doi:10.1016/S0092-8674(02)01226-6.
165. Ehsan, M.; Kelly, M.; Hooper, C.; Yavari, A.; Beglov, J.; Bellahcene, M.; Ghataorhe, K.; Poloni, G.; Goel, A.; Kyriakou, T.; et al. Mutant Muscle LIM Protein C58G causes cardiomyopathy through protein depletion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2018**, *121*, 287–296, doi:10.1016/j.jmcc.2018.07.248.
166. Bos, J.M.; Poley, R.N.; Ny, M.; Tester, D.J.; Xu, X.; Vatta, M.; Towbin, J.A.; Gersh, B.J.; Ommen, S.R.; Ackerman, M.J. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations
-

-
- in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol. Genet. Metab.* **2006**, *88*, 78–85, doi:10.1016/j.ymgme.2005.10.008.
167. Knoll, R.; Kostin, S.; Klede, S.; Savvatis, K.; Klinge, L.; Stehle, I.; Gunkel, S.; Kötter, S.; Babicz, K.; Sohns, M.; et al. A common MLP (Muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 695–704, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206243.
168. Heineke, J.; Ruetten, H.; Willenbockel, C.; Gross, S.C.; Naguib, M.; Schaefer, A.; Kempf, T.; Hilfiker-Kleiner, D.; Caroni, P.; Kraft, T.; et al. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 1655–1660, doi:10.1073/pnas.0405488102.
169. Gupta, M.P.; Samant, S.A.; Smith, S.H.; Shroff, S.G. HDAC4 and PCAF bind to cardiac sarcomeres and play a role in regulating myofilament contractile activity. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10135–10146, doi:10.1074/jbc.M710277200.
170. Boateng, S.Y.; Belin, R.J.; Geenen, D.L.; Margulies, K.B.; Martin, J.L.; Hoshijima, M.; De Tombe, P.P.; Russell, B. Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **2007**, *292*, doi:10.1152/ajpheart.00766.2006.
171. Buyandelger, B.; Mansfield, C.; Kostin, S.; Choi, O.; Roberts, A.M.; Ware, J.S.; Mazzarotto, F.; Pesce, F.; Buchan, R.; Isaacson, R.L.; et al. ZBTB17 (MIZ1) Is Important for the Cardiac Stress Response and a Novel Candidate Gene for Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2015**, *8*, 643–652, doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000690.
-

-
172. Campos, L.C.G.; Miyakawa, A.A.; Barauna, V.G.; Cardoso, L.; Borin, T.F.; Dallan, L.A.D.O.; Krieger, J.E. Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *83*, 140–147, doi:10.1093/cvr/cvp108.
173. de Vries, M.R.; Simons, K.H.; Jukema, J.W.; Braun, J.; Quax, P.H.A. Vein graft failure: from pathophysiology to clinical outcomes. *Nat. Rev. Cardiol.* **2016**, *13*, 451–470, doi:10.1038/nrcardio.2016.76.
174. Borin, T.F.; Miyakawa, A.A.; Cardoso, L.; De Figueiredo Borges, L.; Gonçalves, G.A.; Krieger, J.E. Apoptosis, cell proliferation and modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21cip1 in vascular remodelling during vein arterialization in the rat. *Int. J. Exp. Pathol.* **2009**, *90*, 328–337, doi:10.1111/j.1365-2613.2009.00648.x.
175. Glagov, S.; Weisenberg, E.; Zarins, C.K.; Stankunavicius, R.; Kolettis, G.J. Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 1371–1375, doi:10.1056/nejm198705283162204.
176. Campos, L.C.G.; Ribeiro-Silva, J.C.; Menegon, A.S.; Barauna, V.G.; Miyakawa, A.A.; Krieger, J.E. Cyclic stretch-induced Crp3 sensitizes vascular smooth muscle cells to apoptosis during vein arterialization remodeling. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 449–459, doi:10.1042/CS20171601.
177. Ribeiro-Silva, J.C. Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na mecanotransdução de células musculares lisas aórticas, Universidade de São Paulo: São Paulo, 2019.
178. Stutchbury, B.; Atherton, P.; Tsang, R.; Wang, D.-Y.; Ballestrem, C. Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of
-

-
- mechanotransduction. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 1612–1624, doi:10.1242/jcs.195362.
179. Dinardo, C.L.; Venturini, G.; Zhou, E.H.; Watanabe, I.S.; Campos, L.C.G.; Dariolli, R.; da Motta-Leal-Filho, J.M.; Carvalho, V.M.; Cardozo, K.H.M.; Krieger, J.E.; et al. Variation of mechanical properties and quantitative proteomics of VSMC along the arterial tree. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2014**, *306*, H505–H516, doi:10.1152/ajpheart.00655.2013.
180. Chen, C.-H.; Ho, Y.-C.; Ho, H.-H.; Chang, I.-C.; Kirsch, K.H.; Chuang, Y.-J.; Layne, M.D.; Yet, S.-F. Cysteine-rich protein 2 alters p130Cas localization and inhibits vascular smooth muscle cell migration. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *100*, 461–471, doi:10.1093/cvr/cvt207.
181. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
182. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685, doi:10.1038/227680a0.
183. BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **1962**, *115*, 453–66, doi:10.1084/jem.115.3.453.
184. Pescatore, L.A.; Bonatto, D.; Forti, F.L.; Sadok, A.; Kovacic, H.; Laurindo, F.R.M. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*,
-

-
- 29290–29300, doi:10.1074/jbc.M112.394551.
185. Gutiérrez, J.; Droppelmann, C.A.; Contreras, O.; Takahashi, C.; Brandan, E. RECK-Mediated β 1-Integrin Regulation by TGF- β 1 Is Critical for Wound Contraction in Mice. *PLoS One* **2015**, *10*, e0135005, doi:10.1371/journal.pone.0135005.
186. Zogbi, C.; Oliveira, N.C.; Levy, D.; Bydlowski, S.P.; Bassaneze, V.; Neri, E.A.; Krieger, J.E. Beneficial effects of IL-4 and IL-6 on rat neonatal target cardiac cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12350, doi:10.1038/s41598-020-69413-0.
187. Zheng, Y.; Xia, Y.; Hawke, D.; Halle, M.; Tremblay, M.L.; Gao, X.; Zhou, X.Z.; Aldape, K.; Cobb, M.H.; Xie, K.; et al. FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 11–25, doi:10.1016/j.molcel.2009.06.013.
188. Li, J.J.; Han, M.; Wen, J.K.; Li, A.Y. Osteopontin stimulates vascular smooth muscle cell migration by inducing FAK phosphorylation and ILK dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *356*, 13–19, doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.092.
189. Gerthoffer, W.T. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 607–621, doi:10.1161/01.RES.0000258492.96097.47.
190. Blom, N.; Sicheritz-Pontén, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **2004**, *4*, 1633–1649, doi:10.1002/pmic.200300771.
-

-
191. Blom, N.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1351–1362, doi:10.1006/jmbi.1999.3310.
192. Clark, K.A.; Kadrmas, J.L. Drosophila melanogaster muscle LIM protein and alpha-actinin function together to stabilize muscle cytoarchitecture: A potential role for Mlp84B in actin-crosslinking. *Cytoskeleton* **2013**, *70*, 304–316, doi:10.1002/cm.21106.
193. Danowski, B.A.; Imanaka-Yoshida, K.; Sanger, J.M.; Sanger, J.W. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 1411–1419, doi:10.1083/jcb.118.6.1411.
194. Flick, M.J.; Konieczny, S.F. The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta1-spectrin. *J. Cell Sci.* **2000**, *113* (Pt 9, 1553–64.
195. Kuo, J.C.; Han, X.; Hsiao, C. Te; Yates, J.R.; Waterman, C.M. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 383–395, doi:10.1038/ncb2216.
196. Smith, M.A.; Blankman, E.; Gardel, M.L.; Luettjohann, L.; Waterman, C.M.; Beckerle, M.C. A Zyxin-Mediated Mechanism for Actin Stress Fiber Maintenance and Repair. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 365–376, doi:10.1016/j.devcel.2010.08.008.
197. Burridge, K.; Wittchen, E.S. The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 9–19.
198. Smith, M.A.; Blankman, E.; Deakin, N.O.; Hoffman, L.M.; Jensen, C.C.;
-

-
- Turner, C.E.; Beckerle, M.C. LIM Domains Target Actin Regulators Paxillin and Zyxin to Sites of Stress Fiber Strain. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0069378.
199. Colombelli, J.; Besser, A.; Kress, H.; Reynaud, E.G.; Girard, P.; Caussinus, E.; Haselmann, U.; Small, J. V.; Schwarz, U.S.; Stelzer, E.H.K. Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1665–1679, doi:10.1242/jcs.042986.
200. Winkelman, J.D.; Anderson, C.A.; Suarez, C.; Kovar, D.R.; Gardel, M.L. Evolutionarily diverse LIM domain-containing proteins bind stressed actin filaments through a conserved mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 25532–25542, doi:10.1073/pnas.2004656117.
201. Kong, Y.; Flick, M.J.; Kudla, A.J.; Konieczny, S.F. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 4750–4760, doi:10.1128/mcb.17.8.4750.
202. Halder, G.; Dupont, S.; Piccolo, S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 591–600.
203. Miralles, F.; Posern, G.; Zaromytidou, A.I.; Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **2003**, *113*, 329–342, doi:10.1016/S0092-8674(03)00278-2.
204. Stehbens, S.; Wittmann, T. Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. *J. Cell Biol.* **2012**, *198*, 481–9, doi:10.1083/jcb.201206050.
205. Parsons, J.T.; Horwitz, A.R.; Schwartz, M.A. Cell adhesion: integrating
-

-
- cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 633–643, doi:10.1038/nrm2957.
206. Ilić, D.; Furuta, Y.; Kanazawa, S.; Takeda, N.; Sobue, K.; Nakatsuji, N.; Nomura, S.; Fujimoto, J.; Okada, M.; Yamamoto, T.; et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* **1995**, *377*, 539–544, doi:10.1038/377539a0.
207. Ren, X.D.; Kiosses, W.B.; Sieg, D.J.; Otey, C.A.; Schlaepfer, D.D.; Schwartz, M.A. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 3673–3678, doi:10.1242/jcs.113.20.3673.
208. Richardson, A.; Malik, R.K.; Hildebrand, J.D.; Parsons, J.T. Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 6906–6914, doi:10.1128/MCB.17.12.6906.
209. Sieg, D.J.; Hauck, C.R.; Schlaepfer, D.D. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 2677–2691, doi:10.1242/jcs.112.16.2677.
210. Owen, J.D.; Ruest, P.J.; Fry, D.W.; Hanks, S.K. Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Expression in FAK-Null Cells Enhances Cell Spreading and Migration Requiring Both Auto- and Activation Loop Phosphorylation Sites and Inhibits Adhesion-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Pyk2. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 4806–4818, doi:10.1128/MCB.19.7.4806.
211. Klinghoffer, R.A.; Sachsenmaier, C.; Cooper, J.A.; Soriano, P. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO*
-

-
- J.* **1999**, *18*, 2459–2471, doi:10.1093/emboj/18.9.2459.
212. Webb, D.J.; Donais, K.; Whitmore, L.A.; Thomas, S.M.; Turner, C.E.; Parsons, J.T.; Horwitz, A.F. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 154–161, doi:10.1038/ncb1094.
213. Schlaepfer, D.D.; Mitra, S.K.; Ilic, D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2004**, *1692*, 77–102, doi:10.1016/j.bbamcr.2004.04.008.
214. Lim, Y.; Han, I.; Jeon, J.; Park, H.; Bahk, Y.Y.; Oh, E.S. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for ras transformation of fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29060–29065, doi:10.1074/jbc.M401183200.
215. Ridley, A.J. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science (80-.)*. **2003**, *302*, 1704–1709, doi:10.1126/science.1092053.
216. Mitra, S.K.; Hanson, D.A.; Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 56–68, doi:10.1038/nrm1549.
217. Fabry, B.; Klemm, A.H.; Kienle, S.; Schäffer, T.E.; Goldmann, W.H. Focal adhesion kinase stabilizes the cytoskeleton. *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2131–2138, doi:10.1016/j.bpj.2011.09.043.
218. Izaguirre, G.; Aguirre, L.; Hu, Y.P.; Lee, H.Y.; Schlaepfer, D.D.; Aneskievich, B.J.; Haimovich, B. The Cytoskeletal/Non-muscle Isoform of α -Actinin Is Phosphorylated on Its Actin-binding Domain by the Focal Adhesion Kinase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28676–28685, doi:10.1074/jbc.M101678200.
-

219. Fabry, B.; Klemm, A.H.; Kienle, S.; Schäffer, T.E.; Goldmann, W.H. Focal adhesion kinase stabilizes the cytoskeleton. *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2131–2138, doi:10.1016/j.bpj.2011.09.043.
-

9. ANEXO

9.1. Aprovação do comitê de ética



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Amalido, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA RICA EM CISTEÍNA E GLICINA-3 (CRP3) NA INTERFACE ACTINA–ADESÕES FOCAIS DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS AÓRTICAS” registrada com o nº 1563/2020, sob a responsabilidade de José Eduardo Krieger e João Carlos Ribeiro da Silva, apresentada pela Comissão Científica do InCor - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 17/11/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 24-09-2020 Término: 22-12-2023
Espécie/linhagem/raça	Rato Knockout ws.ws CSR3.m1
Nº de animais	40
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério Central da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 17 de novembro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais