



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MARIANA FIORAMONTE

**PROTEÔMICA ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS:
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPLEXO PROTEICO
FAK/MIOSINA AO NÍVEL MOLECULAR.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA
NA ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA**

ORIENTADOR: FÁBIO CESAR GOZZO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR MARIANA FIORAMONTE, E ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO CESAR GOZZO.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

F511p Fioramonte, Mariana (1986-).
Proteômica estrutural por espectrometria de massas:
caracterização estrutural do complexo protéico
FAK/Miosina ao nível molecular / Mariana Fioramonte. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Fábio Cesar Gozzo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Espectrometria de massas. 2. Proteômica
estrutural. 3. Ligação cruzada. 4. Proteínas. I. Gozzo,
Fábio Cesar. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Mass spectrometry based structural proteomics: structural characterization of FAK/Myosin complex at molecular level

Palavras-chave em inglês:

Mass spectrometry
Structural proteomics
Cross-linking
Proteins

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Fábio Cesar Gozzo [Orientador]
Emanuel Carrilho
Carlos Henrique Inácio Ramos

Data de defesa: 10/02/2012

Programa de pós-graduação: Química

*Toda nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos.*

Albert Einstein (1879 – 1955)

Dedico esta dissertação aos meus pais,
sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

A Deus, que torna tudo possível.

Ao meu orientador, Prof. Fabio Cesar Gozzo. Pela orientação, ensinamentos, amizade e longas discussões sobre ciência e vida. Por ter tão prontamente me aceitado no grupo (depois de ser entrevistado!) e acreditado no meu trabalho.

Aos meus pais, Fausto e Silvana, pelos ensinamentos mais valiosos e importantes que poderia receber ao longo de minha vida, me tornando o ser humano que sou hoje. Por todo carinho, dedicação e paciência. Por me fazerem acreditar que tudo é possível com dedicação, trabalho e honestidade, além de me apoiarem em todas as decisões que tomo e tomei em minha vida. Amo vocês.

Aos meus avós Maria Aparecida, Maria Benedita, João e Valdemar, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim, ajudando sempre a direcionar meu caminho. Aos meus tios Márcia, Fábio e Neide, por todo incentivo, carinho e apoio.

Aos colegas do grupo Dalton pela amizade, ótimo convívio e momentos de aprendizagem. Aos alunos mais antigos Amadeu, Pilau, Alana e Luiz por construírem o alicerce para esse trabalho e também pela amizade. Alex pelos ensinamentos, paciência e amizade. Gisel pela amizade, companheirismo, discussões científicas e não científicas, tornando meus dias mais alegres no laboratório. Os alunos de IC Gilce, Lucas e Lívia pelos momentos de aprendizagem mútuos e amizade. Héctor pelas discussões científicas e amizade.

Ao Prof. Kleber G. Franchini por esta colaboração fantástica e por muitas vezes ceder espaço em seu laboratório para que eu pudesse aprender e entender um pouco mais sobre biologia molecular contribuindo para minha formação. Aos seus alunos Alisson, Michele, Júlio e em especial Aline pela colaboração, ensinamentos, paciência e amizade.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela infraestrutura e por seus vários funcionários que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. À Rita e José pelo ótimo convívio e amizade. Aos funcionários da CPG por todo suporte durante esse período.

Aos órgãos de fomentos CNPq, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica, Grupo GENOPROT de peptídeos naturais e em especial a FAPESP pela bolsa concedida.

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Mariana Fioramonte

Data de nascimento: 14/09/1986

Endereço eletrônico: marifioramonte@gmail.com

Formação Acadêmica

03/2010 – 02/2012: **Mestrado em Química Orgânica**

Agência Financiadora: FAPESP.

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

03/2006 – 11/2009: **Bacharelado em Química**

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP,

Brasil.

Produção Científica

Artigos Publicados

- Santos, A. M.; Schechtman, D.; Cardoso, A. C. ; Clemente, C. F. M. Z.; Silva, J. C.; **Fioramonte, M.**; Pereira, Michelle B. M.; Marin, T. M.; Oliveira, P. S. L.; Figueira, A. C. M.; Oliveira, S. H. P.; Torriani, Í. L.; Gozzo, F. C.; Neto, J. X.; Franchini, K. G. *FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardio myocyte hypertrophy. Nature Chemical Biology*, 8, 102-110, **2012**.
- Mataveli, L.R.V., **Fioramonte, M.** Gozzo, F.C., Aurelio, M.Z.A. *Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS. Metallomics*. No Prelo.

Artigos Submetidos para Publicação

- **Fioramonte, M.**, Santos, A. M., Franchini, K. G.; Gozzo, F. C. *Use of chemical cross-linking coupled to mass spectrometry for determination of α - helix in protein structure. Proteomics*, **2012**
- Souza, C. E. A.; Rego, J. P. A.; Lobo, C. H.; Oliveira, J. T. A.; Nogueira, F. S.; Domont, G. B.; **Fioramonte, M.**; Gozzo, F. C.; Moura, A. A. *Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from adult tropically-adapted Santa Ines rams. Journal of Proteomics*, **2011**.

Trabalhos Apresentados em Eventos

- **Fioramonte, M.**; Santos, A. M.; Franchini, K. G.; Gozzo, F. C. *Structural Proteomics by Chemical Cross-Linking: Mapping Protein-Protein Interactions at the*

Residue Level. Apresentação oral. Evento: IV Congresso do BrMass, dezembro de 2011. Campinas, SP.

- **Fioramonte, M.**; Santos, A. M.; Franchini, K. G.; Gozzo, F. C. *Chemical Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry applied to the characterization of the Interaction Region in FERM-Myosin Complex*. Painel. 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, junho de 2011. Denver, Co, EUA.

- Souza, C. E. A.; Rego, J. P. A.; Lobo, C. H.; **Fioramonte, M.**; Gozzo, F. C.; Oliveira, J. T. A.; Moura, A. A. *Proteomic Identification of the Cauda Epididymal and Vesicular Gland Fluids of Brazilian Hairy Rams*. Painel. Evento: American Society of Andrology Annual Meeting - 36th Annual Conference, abril de 2011. Montreal, QC, Canadá.

- **Fioramonte, M.**, Soman, L. M.; Filho, E. R. *Investigação do Potencial de Produção de Metabólitos Secundários em Diferentes Meios de Cultura por Microorganismo Endofítico Isolado de Maçã (*Malus domestica*)*. Apresentação oral. Evento: XVII Congresso de Iniciação Científica, UFSCar, outubro de 2009. São Carlos, SP.

- **Fioramonte, M.**, Soman, L. M.; Filho, E. R. *Avaliação do perfil de metabólitos secundários de fungos associados à *Malus domestica* (Maçã)*. Painel. Evento: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, junho de 2009, Fortaleza, CE.

- **Fioramonte, M.**; Torresan, G.; Pozzi, L. V.; Rodrigues, C. Batista, A. A. *Estudos de complexos de Ru(II) contendo ligantes do tipo (O=C-N)*. Painel. Evento: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, junho de 2007, Águas de Lindóia, SP.

Outras Produções

06/2006 – 06/2007: **Iniciação Científica**

Título: *Síntese, caracterização e cinética de substituição no complexo $RuCl_2(P-P)di-(2-piridil)cetona$ / Estudos cinéticos e fotoquímicos de compostos de Ru(II) com a 1,4-bis(difenilfosfina)butano(dppb) e ligante carbonilo-piridínicos de fórmula geral $cis-[RuCl_2(dppb)(O-N)]$.*

Agência Financiadora: PIBIC/CNPq.

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

01/2008 – 12/2009: **Iniciação Científica**

Título: *Análise de Matabólitos Microbianos em *Malus domestica* (Maçã)*.

Agência Financiadora: FAPESP.

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

Resumo

Proteômica Estrutural por Espectrometria de Massas: Caracterização Estrutural do Complexo Proteico FAK/Miosina ao Nível Molecular. Ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas (MS) é uma técnica que permite a caracterização estrutural de proteínas e complexos proteicos, especialmente nos casos em que estes não são passíveis de serem analisadas por técnicas de alta resolução. O experimento baseia-se na reação de uma proteína ou complexo proteico com um reagente bifuncional (agente de ligação cruzada, ALC) seguido de análise proteômica *shotgun* por MS. Isso trás para a técnica todas as vantagens da MS, como alta sensibilidade, rapidez de análise e facilidade de uso. Somente resíduos de aminoácidos espacialmente próximos podem ser ligados covalentemente pelo ALC, de forma que os peptídeos contendo a ligação cruzada, identificadas por MS, servem como restrições de distância entre os aminoácidos na estrutura nativa da proteína ou complexo proteico. O conjunto de peptídeos contendo a ligação cruzada fornece, assim, um conjunto de restrições de distâncias entre os aminoácidos que pode ser utilizado para montar um modelo molecular da proteína ou do complexo. O objetivo principal deste trabalho foi a aplicação da técnica de ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas no mapeamento da interação entre as proteínas quinase de adesão focal (FAK), através de seu domínio FERM, e miosina. Esse complexo proteico está envolvido na sinalização molecular para o processo de hipertrofia cardíaca. A hipertrofia cardíaca é considerada um mecanismo de adaptação do miocárdio em resposta a sobrecargas hemodinâmicas e está associada com risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita. Estímulos mecânicos são considerados os principais ativadores primários das respostas que conduzem às alterações fenotípicas do miocárdio nas várias doenças cardíacas. A caracterização estrutural do complexo FAK/miosina ao nível molecular permitiu a criação de um modelo molecular deste complexo, que foi validado através de mutações na região de interação entre as proteínas. Esse modelo permite que se entenda o processo de sinalização da hipertrofia ao nível molecular.

Abstract

Mass spectrometry based structural proteomics: structural characterization of FAK/Myosin complex at molecular level. Chemical cross-linking coupled with mass spectrometry (MS) is a technique that allows the structural characterization of proteins and protein complexes, especially when these proteins are not amenable to be analyzed by high resolution techniques. The experiment is based on the reaction of a protein or protein complex with a bifunctional reagent (cross-linking agent, ALC) followed by shotgun proteome analysis by MS. This brings to the technique all the advantages of MS, such as high sensitivity, short analysis time and ease of use. Only spatially close amino acid residues can be covalently bound by the reagent, so that the cross-linked peptides, identified by MS, serve as distance constraints between amino acids in the native structure of the protein or protein complex. The set of cross-linked peptides thus provides a set of distance constraints among amino acids that can be used to build a molecular model of the protein or complex. The main objective of this work was to apply the cross-linking technique coupled to MS to map the interaction between the proteins Focal Adhesion Kinase (FAK), through its FERM domain, and myosin. This protein complex is involved in molecular signaling of the cardiac hypertrophy process. Cardiac hypertrophy is considered an adaptive mechanism of the myocardium in response to hemodynamic overload and it is associated with risk of developing heart failure, arrhythmias and sudden death. Mechanical stimuli are considered the main activator of the primary responses that lead to phenotypic changes of the myocardium in many cardiac diseases. The structural characterization of the complex FAK/myosin at the molecular level has allowed the creation of a molecular model of this complex, which was validated by mutations in the region of interaction between the proteins. This model allows the understanding the signaling processes of hypertrophy at the molecular level.

Sumário

Lista de Acrônimos e Abreviaturas	xiii
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas	xviii
1. Introdução	1
1.1. Estrutura, Função e Interação de Proteínas.....	1
1.2. Métodos de Caracterização Estrutural de Proteínas e Suas Interações.....	5
1.3. Espectrometria de Massas Aplicada a Análise de Proteínas.....	10
1.4. Ligação Cruzada Acoplada a Espectrometria de Massas para o Estudo de Estruturas Superiores de Proteínas	12
1.1. O Complexo FERM/Miosina.....	17
2. Objetivos	23
3. Parte Experimental	24
3.1. Reação de Ligação Cruzada	24
3.2. Fracionamento e Análise da Amostra	25
4. Resultados e Discussão	27
4.1. Formação da Ligação Cruzada do Complexo FERM/Miosina	27
4.2. Mapeamentos das Espécies de Ligação Cruzada para o Complexo FERM/Miosina	29
4.3. Dificuldades e Facilidades Apresentadas pela Técnica de Ligação Cruzada	41
5. Conclusões	46
6. Referências Bibliográficas.....	47
7. Anexo.....	52

Lista de Acrônimos e Abreviaturas

ALC	Agente de ligação cruzada
ANP	Peptídeo natriurético atrial
CD	Espectroscopia de dicroísmo circular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar
CRP	Cristalografia de Proteínas
Da	Dalton (1 Da = $1,661 \cdot 10^{-24}$ g)
DDA	Análise dependente de dados
DSG	Glutarato de <i>N,N</i> -disuccinimidila
DSS	Suberato de <i>N,N</i> -disuccinimidila
DSSeb	Sebacato de <i>N,N</i> -disuccinimidila
DTT	1,4-Ditiotreitol
ECD	Dissociação por captura de elétrons
ESI	Ionização por Eletrospray
ETD	Dissociação por transferência de elétrons
FAK	Quinase de adesão focal
FAT	<i>Focal Adhesion Targeting</i>
FERM	4.1, ezrina, radixina e moesina
FRET	Transferência de energia ressonante por fluorescência
FTICR	Analisador de massas do tipo ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier

HDX	Troca de hidrogênio/deutério
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC - MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
LIT	Iontrap linear
MALDI	Ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
PKC	Proteína Quinase C
PDB	Banco de dados de proteínas
Q	Analizador de massas do tipo quadrupolo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SH	Domínio homólogo de Src
S6 K	P70-S6 quinase
TOF	Analizador de massas do tipo tempo de voo
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência

Índice de Figuras

- Figura 1:** a), b) e c) Representação esquemática de parte dos interactomas de *H. sapiens* (referência 15), vírus da *Influenza A* (referência 14) e *D. melanogaster* (referência 13), respectivamente; d) Gráfico de correlação entre o número de proteínas e o tamanho estimado do interactoma (referência 16). **3**
- Figura 2:** a) Representação esquemática do complexo proteico eIF3 (referência 17): em amarelo o complexo em leveduras e em verde o complexo em humanos, sendo que os traços em vermelho interligam as proteínas heterólogas. b) Complexo proteico NADH ubiquinona redutase¹⁸, as diferentes cores representam proteínas que foram se agregando ao complexo ao longo da evolução para organismos mais complexos..... **4**
- Figura 3:** Exemplos de algumas técnicas de caracterização estrutural de proteínas em complexos proteicos (referência 21). **5**
- Figura 5:** Estatísticas do banco de dados PDB (referência 24). a) Gráfico ilustrando o número de estruturas de proteínas depositadas por ano e o total de estruturas depositadas. b) Gráfico ilustrando o número de novos enovelamentos para proteínas depositados todos os anos e o seu total. **9**
- Figura 6:** Estruturas de ALCs derivados de ésteres de N-hidroscinimida (NHS) com diferentes tamanhos na cadeia alifática. Os mais comuns são os com $n = 3, 6$ ou 8 , que recebem as seguintes abreviaturas: DSG, DSS e DSSeb. As distâncias (Å) são baseadas de acordo com o fornecedor de cada ALC..... **14**
- Figura 7:** Representação esquemática de um experimento de ligação cruzada acoplado a espectrometria de massas. (1) Reação da(s) proteína(s) com o agente de ligação cruzada desejado. (2) Formação dos peptídeos modificados e convencionais por digestão enzimática. (3) Análise da mistura de peptídeos por LC-MS/MS. (4) Agrupamento das restrições de distância obtidas pelo experimento e desenho de um mapa de ligações cruzadas. (5) Uso do conjunto de restrições de distância na determinação de modelos estruturais compatíveis com a proteína alvo..... **15**
- Figura 8:** Representação esquemática de espécies *cross-links*. a) Espécie inter-molecular; b) Espécie intra-molecular e c) Espécie hidrolisada (*dead end*)... **16**
- Figura 9:** Esquema da disposição dos domínios da FAK. Os resíduos tirosina envolvidos na ativação da FAK estão indicados na figura. **19**
- Figura 10:** Estrutura tridimensional da conformação auto-inibitória da FAK. A estrutura é composta pelo domínio FERM, linker entre os domínios FERM e quinásico e o domínio quinase..... **20**
- Figura 11:** a) Representação esquemática de uma unidade sarcomérica. b) Microscopia imunoeletrônica de miocárdio utilizando-se o anticorpo anti-FAK,

- os quadros delimitados “A” e “B” representam o miocárdio em estado basal, onde as flecha indicam o anticorpo anti-FAK, mostrando que a FAK encontra-se próxima a região da miosina, os quadros “C”, “D” e “E” representam o miocárdio após 3 min de sobrecarga, onde as flechas mais uma vez indica a posição da FAK, mostrando que que após estresse mecânico a FAK migra região costâmera próximo ao disco Z. c) Ensaio de *pull-down* utilizando os diferentes domínios da FAK imobilizados com GST, utilizando-se ainda estrato de coração de rato, mostrando que a interação entre FAK e miosina ocorre pela porção N-terminal da FAK (o domínio FERM) (referência 95)..... **22**
- Figura 12:** Sequências das proteínas GST-Miosina e His-FERM, com destaque para as lisinas, as sequências destacadas em negrito representam a sequência das proteínas miosina e FERM sem suas respectivas sequências de afinidade. **27**
- Figura 13:** Gel de eletroforese do complexo FAK/Miosina, mostrando a formação do complexo covalente FAK/Miosina após a reação com DSS..... **28**
- Figura 14:** Espectro de ESI-MS/MS de uma espécie do tipo *dead end* de um peptídeo da miosina, o grupamento hidroxila representa o reagente de ligação cruzada hidrolisado. Os asteriscos azuis representam íons fragmentos que sofreram modificação pelo ALC formando uma espécie de *dea end*. **30**
- Figura 15:** Espectro de ESI-MS/MS de uma espécie inter-molecular entre peptídeos da miosina. Os asteriscos em vermelho representam íons fragmentos que possuem uma porção de cada cadeia peptídica ligadas entre si através do ALC, os asteriscos azuis representam íons fragmentos que sofreram modificação pelo ALC formando uma espécie de *dead end*. **31**
- Figura 16:** Espectro de ESI-MS/MS de uma espécie intra-molecular de um peptídeo da miosina. Os asteriscos em vermelho representam íon fragmentos que possuem modificação do ALC..... **33**
- Figura 17:** Espectros de ESI-MS/MS de espécies inter-moleculares entre as proteínas miosina e o domínio FERM da FAK. Os asteriscos em vermelho representam íons fragmentos que possuem uma porção de cada cadeia peptídica ligadas entre si através do ALC. O asterisco em preto na sequência do peptídeo β do primeiro espectro de MS/MS indica a cisteína modificada no processo de alquilação, formando carboamidomtil- cisteína. **34**
- Figura 1:** Representação das espécies de ligação cruzada encontradas para o complexo FERM/Miosina. A sequência de cima representa a sequência proteica da miosina e a de baixo a sequência do domínio FERM da FAK..... **35**
- Figura 2:** a) Modelo da Miosina mostrando as quatro ligações cruzadas intra-proteínas determinadas experimentalmente. b) Modelo da FERM mostrando as quatro ligações intra-proteína determinadas experimentalmente. Em todas as ligações cruzadas, as distâncias entre os grupos aminos da cadeia lateral das

lisinas estão a uma distância menor que 11.5 Å, distância da cadeia espaçadora do ALC DSS.....	37
Figura 30: a) Modelo representando a região de interação entre as proteínas miosina e o domínio FERM da FAK; b) Distância entre os resíduos de lisina que se ligaram pelo reagente de ligação cruzada.....	38
Figura 21: Estrutura do domínio FERM onde é destacada a região de interação com a Miosina, mostrando que a região se trata de uma fenda ao longo da estrutura.....	39
Figura 22: Representação esquemática das regiões complementares propostas pelo modelo baseado nos dados de <i>ligação cruzada</i> , em laranja a região de interação e em azul as lisinas modificadas que estão expostas ao solvente..	39
Figura 23: Representação esquemática dos experimentos de mutação sítio-dirigida. a) Superfície do domínio FERM onde em laranja está representada a região de interação proposta e em rosa os sítios mutados em cada um dos experimentos. b) Experimentos de imunoblotting para ensaios de <i>Pull-Down</i> mostrando os resultados dos experimentos de mutação.	41
Figura 24: a) Histograma das frequências das intensidades dos íons precursores presentes nas análises de ligação cruzada. b) Intensidade relativa dos precursores nas diferentes regiões do histograma do item “a”, normalizadas com relação ao íon precursor destacado no espectro de massas “C”.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resíduos de aminoácidos mutados em cada um dos experimentos de mutação sítio dirigida para o domínio FERM.....	40
---	----

1. Introdução

1.1. Estrutura, Função e Interação de Proteínas

Um dos maiores desafios da era pós genômica é entender como genes, proteínas e pequenas moléculas estão interagindo de maneira a formar o sistema celular. No começo do projeto Genoma acreditava-se que após o mapeamento de todos os genes de um organismo seríamos capazes de entender os mecanismos bioquímicos fundamentais à sobrevivência das células, no entanto, o conhecimento apenas das sequências primárias das proteínas não é capaz de fornecer informações sobre suas funções e a maneira como essas proteínas executam suas funções.¹

Proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, versáteis e complexas, presentes em todas as células e em todas as partes da célula de um organismo. Sua complexidade decorre do fato de que estas podem ser constituídas por diferentes sequências de aminoácidos que podem ou não estar modificados, além de apresentarem uma ampla faixa de tamanho (variando de alguns poucos kDa à alguns MDa) e estruturas². São responsáveis por diversas funções, de motores moleculares à sinalização celular. Proteínas catalisam reações, transportam moléculas, formam canais de regulação, sintetizam e degradam moléculas³, sendo as reais efetoras dos processos bioquímicos dos seres vivos.

Sabe-se ainda, que a função de uma proteína está diretamente ligada à sua estrutura e conformação, e que suas funções não são realizadas individualmente, mas sim na forma de complexos proteicos, que podem variar desde pequenos oligômeros a cadeias formadas por dezenas de cadeias polipeptídicas e com a presença de ácidos nucleicos e cofatores. Isso pode ser resultado tanto de uma determinada mudança conformacional induzida por um ligante e/ou interação com outras proteínas levando a

conformação necessária para que a proteína desempenhe sua função⁴. Desse modo, interações entre proteínas, descritas como *sociologia molecular da célula*, são vitais para a manutenção de qualquer processo biológico e, conseqüentemente, da vida de determinado organismo⁵.

A determinação do modo de interação entre proteínas (composição, cinética, estequiometria, termodinâmica) pode trazer um grande número de informações que auxiliaram na compreensão de inúmeros processos biológicos. Um dos exemplos mais atraentes relacionados à interação entre proteínas pode ser visto na medicina, uma vez que o número de doenças humanas associadas a proteínas é superior ao número de genes no genoma, o que significa que uma única proteína pode causar mais de uma disfunção dependendo das condições necessárias para a formação/dissociação de complexos proteicos; esse fato fez com que interações proteína-proteína tenham se tornado alvos de muitas drogas nos últimos anos^{4,3,6}. Além disso, a compreensão dessas interações pode elucidar algumas questões relacionadas aos projetos genoma, uma vez que o número de genes de um organismo tão complexo quanto o ser humano é próximo do número de genes de um dos eucariotos mais simples (*Caenorhabditis Elegans*, por exemplo) e bem inferior a de alguns vegetais, como soja e arroz, o que indica que em parte a complexidade está relacionada ao modo como esses produtos gênicos interagem entre si para realizar suas funções biológicas⁷. Finalmente, outra grande importância relacionada ao conhecimento do modo de interação entre proteínas está na descoberta da função de outras proteínas. Uma vez que a grande maioria dos processos biológicos é mediada por interações desse tipo, se a função de pelo menos um dos parceiros de interação é conhecida, o assinalamento da função da proteína de interesse pode ser facilitado^{1,8,9}. Estima-se hoje que para os organismos mais simples há entre 8 e 12 interações para cada proteína, em média, e espera-se um número muito maior para os humanos, sendo estimado que a qualquer instante podem ocorrer cerca de 130 mil interações binárias entre proteínas dentro de uma célula humana¹⁰, além das múltiplas interações.

Em virtude dos fatos mencionados acima, os últimos anos presenciaram uma busca incessante pela rede total de interações moleculares em vários seres vivos, denominada interactoma¹¹. Espécies como *Saccharomyces cerevisiae*¹², *Drosophila*

*melanogaster*¹³, vírus da *Influenza A*¹⁴ e *Homo sapiens*¹⁵ tiveram suas redes de interação proteína-proteína publicadas recentemente (em alguns casos parcialmente). A importância dessas redes é tão grande que estudos recentes propõem que a complexidade de um organismo não é dado pelo seu número de proteínas mas pelo tamanho do seu interactoma¹⁶. A Figura 1, ilustra alguns desses exemplos de rede de interação e também um gráfico mostrando o tamanho estimado do interactoma¹⁶ (número de interações de proteínas de um organismo) em função do número de proteínas para alguns organismos.

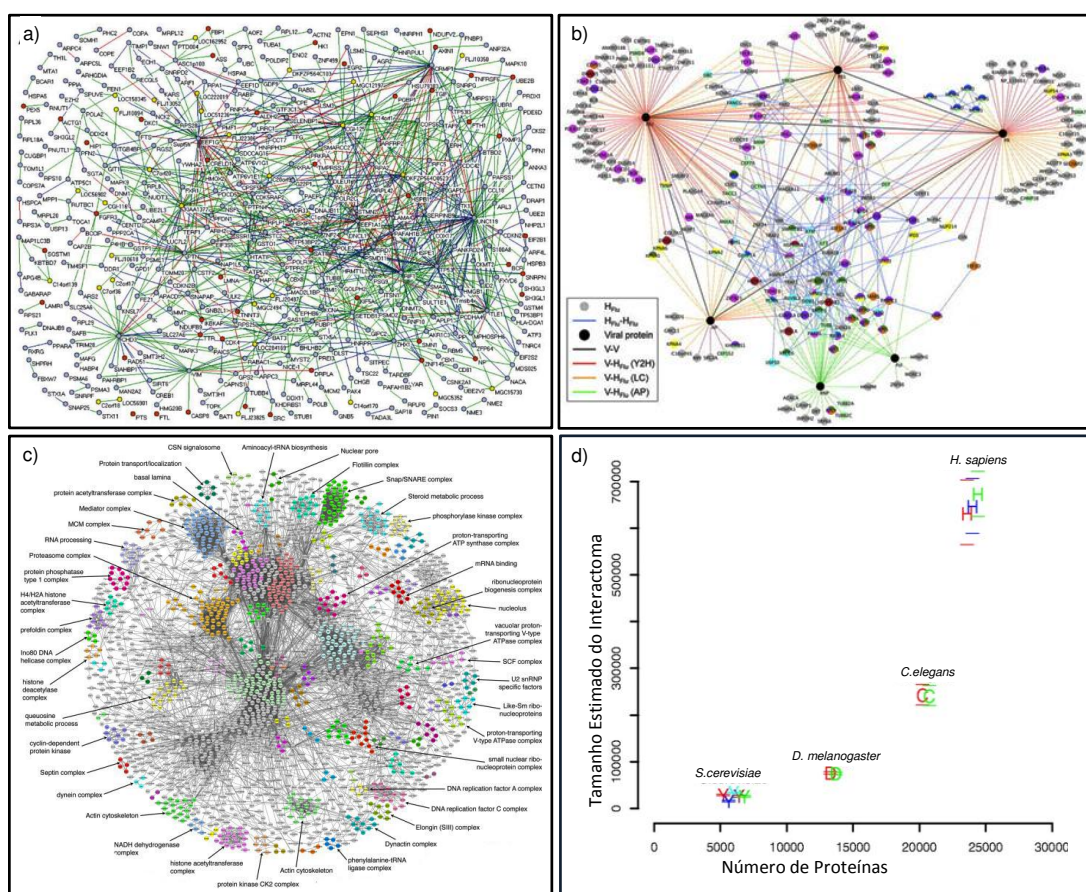


Figura 4: a), b) e c) Representação esquemática de parte dos interactomas de *H. Sapiens* (referência 15), vírus da *Influenza A* (referência 14) e *D. Melanogaster* (referência 13), respectivamente; d) Gráfico de correlação entre o número de proteínas e o tamanho estimado do interactoma (referência 16).

O item “d” da Figura 1 mostra que os seres humanos apresentam genoma somente 50% maior que o de *D. melanogaster*, no entanto, seu interactoma é cerca de 300% maior, evidenciando assim a relação entre complexidade de uma organismo e o

1.2. Métodos de Caracterização Estrutural de Proteínas e Suas Interações

Em virtude da importância das interações proteína-proteína, muito esforço tem sido dedicado ao estudo dessas interações. Entretanto, são muitas as dificuldades na determinação do modo de interação entre essas moléculas, dentre as quais está no grande número de possibilidades. Além disso, muitas dessas interações são transientes, instáveis ou reguladas por modificações pós-traducionais, o que dificulta sua detecção¹⁹.

As técnicas de caracterização de complexos proteicos disponíveis atualmente podem ser divididas nos seguintes grupos: técnicas de caracterização de estrutura primária, de estrutura terciária e quaternária de alta, média, e baixa resolução e técnicas computacionais^{20,21}, algumas delas ilustradas na Figura 3. Técnicas de caracterização de estruturas primárias não fornecem informações estruturais ou espaciais acerca do complexo de interesse, limitando-se a fornecer somente a composição de aminoácidos das proteínas definindo quais são as proteínas constituintes. A espectrometria de massas (MS) é hoje a principal ferramenta para sequenciamento e identificação de proteínas podendo ser utilizada na descoberta de parceiros de interação.

Composition	Stoichiometry	Subunit-subunit interaction	Subunit structure	Assembly topology	Assembly packing	Complex structure
Immunoprecipitation Affinity purification Mass spectrometry	SAXS Mass spectrometry	Yeast two-hybrid FRET Genetic interactions Protein arrays SPR Calorimetry Site directed mutagenesis Chemical cross-linking Computational approaches Mass spectrometry X-ray crystallography NMR Cryo-EM Cryo-ET	X-ray crystallography NMR Homology modelling	Yeast two-hybrid FRET Genetic interactions Protein arrays SPR Calorimetry Cryo-EM Cryo-ET NMR Site directed mutagenesis Chemical cross-linking Computational approaches Mass spectrometry X-ray crystallography	X-ray crystallography NMR AFM Cryo-EM Cryo-ET Ion mobility/MS Computational approaches	X-ray crystallography NMR Computational approaches

Figura 6: Exemplos de algumas técnicas de caracterização estrutural de proteínas em complexos proteicos (referência 21).

As técnicas de baixa resolução ou sonda englobam as espectroscopias, onde a resposta é determinada pela presença de uma certa característica estrutural da proteína. Essa classe engloba as técnicas de Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência no UV, Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência (FRET) dentre outras. Essas técnicas são em geral sensíveis, rápidas, relativamente simples e de fácil acesso, mas a resposta obtida é, em geral, limitada a determinadas partes da proteína. Como técnicas de média resolução, aquelas que fornecem informações acerca da forma geral do complexo tais como posição e orientação dos componentes, destacam-se as microscopias e o Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS). Tais técnicas conseguem fornecer uma informação importante sobre a estrutura dos complexos proteicos que a forma geral da estrutura. Conhecendo-se a estrutura de cada componente individual, pode obter modelos dos complexos. Uma das dificuldades no uso dessas técnicas é o acesso mais restrito às mesmas, tanto pelo seus custos quanto pelo alto grau de dificuldade de interpretação de dados.

Atualmente existem duas técnicas estabelecidas para determinação estrutural de proteínas com alta resolução (resolução atômica): Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cristalografia de Proteínas (CRP). Essas técnicas permitem que se obtenham estruturas de proteínas e complexos proteicos ao nível atômico e são as técnicas de referência para a determinação estrutural de proteínas. Apesar do altíssimo detalhamento estrutural fornecido por essas técnicas, ambas apresentam infelizmente uma aplicabilidade limitada para proteínas em geral devido à algumas restrições experimentais, dentre as quais se destaca a necessidade de uma grande quantidade de amostra (da ordem de vários miligramas) com alto grau de pureza. No caso de RMN, há ainda a necessidade da amostra ser estável em algum dos tampões que não interfiram na análise por um longo intervalo de tempo (dias a semanas) a temperatura ambiente além do fato de que os instrumentos atuais restringem o tamanho máximo da amostra a aproximadamente 50 kDa, o que muitas vezes representa a massa de um único componente de um complexo proteico. A CRP por sua vez requer que a amostra esteja na forma de monocristal²². Essa limitação é ainda mais restritiva quando se pretende caracterizar complexos proteicos devido à maior dificuldade em se obter

complexos puros em grande quantidade, ao maior tamanho do sistema e a maior dificuldade em se obter monocristais de tais espécies.

Nos casos em que proteínas e complexos proteicos não são passíveis de serem analisados por técnicas de alta resolução, torna-se necessária a utilização da abordagem integrativa, em que são utilizadas diversas técnicas de caracterização estrutural como, por exemplo, microscopia imunoeletrônica, FRET, troca de H/D, ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas, dentre outros, aliadas ao conjunto de estruturas de alta resolução já disponíveis nos banco de dados de estruturas de maneira a se obter o maior número possível de informações estruturais acerca das proteínas estudadas²³. A Figura 4 ilustra alguns desses métodos de caracterização e os respectivos níveis de informações que cada um deles pode oferecer. A integração das diversas informações estruturais advindas dessas técnicas pode então levar a um modelo estrutural da proteína ou complexo proteico.





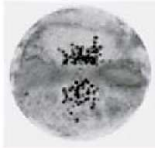
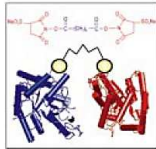

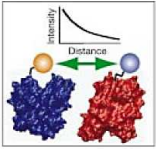
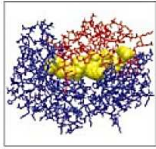
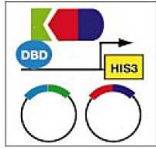
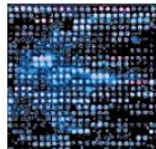

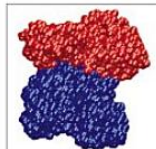
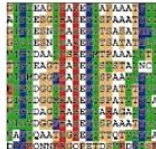
				
X-ray crystallography	NMR spectroscopy	2D and single-particle electron microscopy	Electron tomography	Immuno-electron microscopy
Subunit structure	Subunit structure			
Subunit shape	Subunit shape	Subunit shape	Subunit shape	
Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact	
Subunit proximity	Subunit proximity	Subunit proximity	Subunit proximity	Subunit proximity
Subunit stoichiometry	Subunit stoichiometry			
Assembly symmetry	Assembly symmetry	Assembly symmetry	Assembly symmetry	Assembly symmetry
Assembly shape	Assembly shape	Assembly shape	Assembly shape	
Assembly structure	Assembly structure			
				
Chemical cross-linking	Affinity purification mass spectroscopy	FRET	Site-directed mutagenesis	Yeast two-hybrid system
Subunit structure				
Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact
Subunit proximity	Subunit proximity	Subunit proximity		Subunit proximity
				
Gene/protein arrays	Protein structure prediction	Computational docking	Bioinformatics	
	Subunit structure			
	Subunit shape			
Subunit-subunit contact		Subunit-subunit contact	Subunit-subunit contact	
Subunit proximity				

Figura 7: Métodos experimentais e computacionais de caracterização de proteínas e complexos proteicos e o tipo de informação que cada um deles fornece (referência 23).

A análise das estatísticas do banco de estruturas de proteínas PDB revela algumas informações interessantes²⁴, ilustradas na Figura 5.

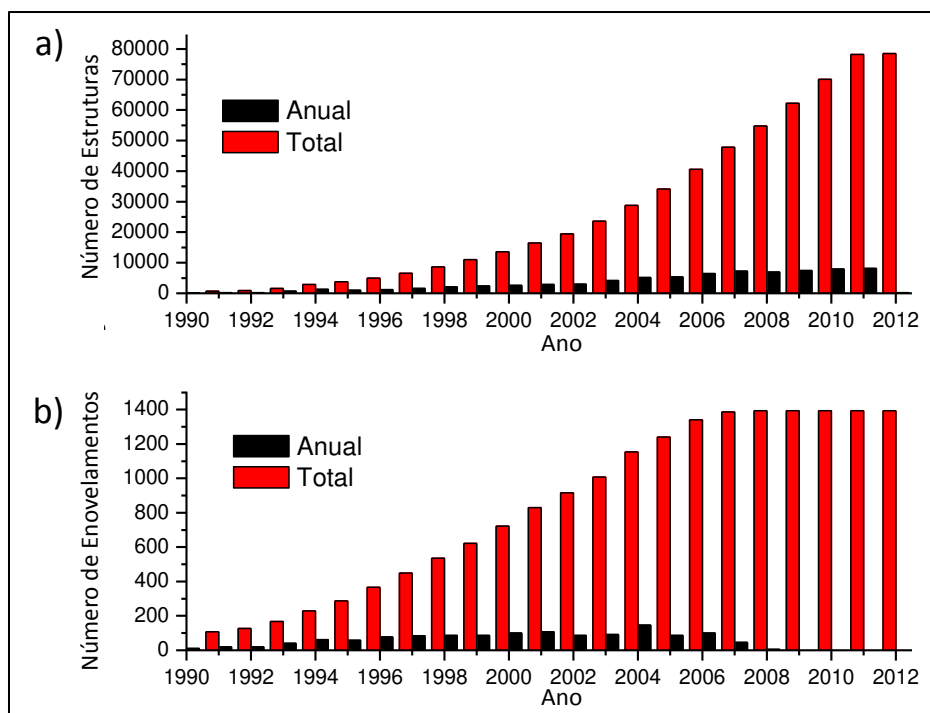


Figura 8: Estatísticas do banco de dados PDB (referência 24). a) Gráfico ilustrando o número de estruturas de proteínas depositadas por ano e o total de estruturas depositadas. b) Gráfico ilustrando o número de novos enovelamentos para proteínas depositadas todos os anos e o seu total.

A Figura 5a mostra que o número de estruturas depositadas tem aumentando exponencialmente nos últimos anos, enquanto que a Figura 5b mostra que nenhum novo tipo de enovelamento foi descoberto nos últimos 5 anos, mostrando que estamos chegando perto do limite do número de enovelamentos possíveis. Esse conjunto de enovelamentos torna-se assim uma poderosa ferramenta para ser utilizada na abordagem integrativa que, juntamente com os métodos computacionais, permitem unir todas as informações experimentais para se construir modelos compatíveis com estes dados.

Dessa forma, há um grande interesse no desenvolvimento e aplicação de métodos alternativos de caracterização de proteínas dentro da abordagem integrativa que tenham grande abrangência e, assim, superem algumas das limitações dos métodos de alta resolução.

1.3. Espectrometria de Massas Aplicada a Análise de Proteínas

A espectrometria de massas (MS) consiste no estudo de íons na fase gasosa, sendo a caracterização estrutural de compostos uma de suas principais aplicações. Já nos anos 70, havia um grande interesse na utilização de MS para a realização de experimentos de caracterização de proteínas e outras biomoléculas. Entretanto, uma das principais limitações nesse sentido envolvia a dificuldade de geração de íons de macromoléculas em fase gasosa pelos métodos de ionização então disponíveis^{25,26}. O advento das técnicas de ionização suaves denominadas ESI (*Eletrospray Ionization*)²⁷, por J. B. Fenn e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)²⁸, por M. Karas e F. Hillenkamp, no final da década de 80, possibilitou uma ampla aplicação da espectrometria de massas (MS) na análise de biomoléculas como peptídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Tais moléculas agora podiam ser eficientemente ionizadas e transferidas para a fase gasosa, sem fragmentação ou necessidade de derivação²⁷. O desenvolvimento dessas novas técnicas de ionização impulsionou uma grande evolução dos analisadores de massas associados nos anos subsequentes, de tal maneira que a partir da década de 90 tornaram-se disponíveis instrumentos comerciais com capacidade de experimentos de MS sequencial (MSⁿ) e diversas geometrias, como quadrupolo - tempo de voo (Q-TOF), tempo de voo – tempo de voo (TOF-TOF), iontrap linear (LIT), ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FTICR) e, mais recentemente, Orbitrap^{29,30}. Desde então, o uso da espectrometria de massas na análise de proteínas evoluiu extensivamente, a ponto de se tornar rotineiro no sequenciamento e identificação de proteínas, determinação da massa molecular de proteínas e complexos proteicos intactos, identificação e localização de modificações pós-traducionais e quantificação absoluta e relativa de proteínas^{31,32,33,34,35,36,37}. Em particular, o desenvolvimento de metodologias envolvendo cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) acoplada a MS para análises de misturas complexas de peptídeos advindos de digestão enzimática, contendo uma enorme diversidade de proteínas, aliada ao crescimento das ferramentas de bioinformática para busca em banco de dados possibilitou estudos de proteômica em larga escala, denominados de proteômica *shotgun*.

O interesse na ampla aplicação de MS para a caracterização de proteínas se deve às vantagens intrínsecas da técnica, como alta sensibilidade, rapidez, versatilidade, facilidade de operação e alta confiabilidade dos resultados. Essas características fazem com surjam novos desenvolvimentos em MS para análise de estruturas superiores (terciárias e quaternárias) de proteínas. Nesse âmbito, destacam-se Troca de Hidrogênio/Deutério (HDX), Mapeamento Radicalar (*Footprinting*) e Ligação Cruzada (*Cross-linking*).

HDX baseia-se no fato de que quando proteínas são solubilizadas em solvente deuterado, os hidrogênios lábeis da proteína trocam com o deutério do solvente³⁸. Os hidrogênios das cadeias laterais dos aminoácidos que possuam os grupos SH, OH e NH trocam muito rapidamente e, portanto, não permitem determinação de sua cinética por MS. Os hidrogênios das ligações peptídicas (amida) da cadeia principal da proteína, por sua vez, apresentam uma faixa de 10^8 ordens de grandeza de velocidade de troca, dependendo do perfil de ligações de hidrogênio e, principalmente, do grau de exposição desses átomos ao solvente^{39,40}. Após o experimento de troca, que deve ser realizado por diferentes intervalos de tempo para permitir o cálculo da cinética, o pH do meio reacional é modificado para uma faixa de 2 a 3 e a temperatura para 0 °C de modo a evitar a troca reversa. Análises por MS podem ser realizadas tanto para proteína ou complexo proteico intacto, com o intuito de determinar o nível de incorporação do deutério, bem como na análise dos peptídeos, após digestão enzimática, com o objetivo de determinar a cinética de troca de cada uma das regiões da proteína. Como descrito anteriormente, para diminuir a taxa de troca reversa, após a reação deve-se baixar o pH e a temperatura. Essas condições são incompatíveis com a grande maioria das enzimas utilizadas para digestão, sendo que atualmente a única utilizada para esse tipo de experimento é a pepsina. Essa enzima apresenta baixa especificidade no pH utilizado, o que dificulta a identificação dos peptídeos obtidos por MS. Apesar das dificuldades apresentadas, HDX tem sido aplicada com sucesso para o estudo de enovelamento e estabilidade de proteínas⁴¹, mudanças conformacionais mediante interação com ligantes^{42,43} e no estudo de interação proteína-proteína⁴⁴.

O termo *footprinting* é o termo que refere a um grupo de técnicas baseadas na determinação do grau de exposição ao solvente de partes de uma macromolécula por

meio de reações de modificação química ou enzimática^{45,46}. Dentro desse grupo vale destacar a importância que radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) vêm recebendo nos últimos anos. Esses radicais apresentam reatividade frente à cadeia lateral dos aminoácidos de uma proteína, levando à modificação dessas cadeias por ligações covalentes. De modo simplificado, um experimento típico de *footprinting* consiste na exposição, tanto de uma proteína isolada quanto de um complexo proteína-proteína, a radicais hidroxilas por diferentes intervalos de tempo. As amostras são então submetidas à digestão enzimática e analisadas então por MS. Análises do tipo LC-MS/MS permitem identificar os sítios de oxidação, enquanto análises de LC-MS são utilizadas para quantificar as oxidações. Métodos computacionais podem ser subsequentemente utilizados para construção de modelos tridimensionais do complexo⁴⁷. O método de *footprinting* com geração de radicais hidroxila por meio de diferentes fontes de radiação tem permitido realizar estudos relacionados à estrutura de proteínas em solução⁴⁸ e o seu desenovelamento⁴⁹.

1.4. Ligação Cruzada Acoplada a Espectrometria de Massas para o Estudo de Estruturas Superiores de Proteínas

O fenômeno da ligação cruzada (*cross-linking*) compreende a união de duas espécies através da formação de uma ligação covalente, muitas vezes realizadas por intermédio de um agente de ligação cruzada (ALC). As espécies envolvidas em experimentos de ligação cruzada podem representar diferentes classes químicas, variando de proteínas e ácidos nucleicos a partículas sólidas, ou ainda diferentes regiões da mesma espécie como, por exemplo, ligação entre resíduos de uma mesma proteína. Um exemplo disso é a ligação cruzada presente em proteínas formando a ligação de dissulfeto entre resíduos de cisteína.

No caso de estudos envolvendo proteínas ou complexos proteicos como alvo, o mais interessante é a realização de experimentos de ligação cruzada mediados por ALCs. Além disso, as interações de complexos não-covalentes podem ser muito fracas e, desse modo, são facilmente dissociadas, o que torna sua análise muito difícil. Assim,

do ponto de vista analítico, é muito interessante a estabilização desses complexos mediante a formação de ligações covalentes, uma vez que isso facilita a posterior purificação e caracterização do mesmo em condições mais adequadas, ao mesmo tempo que conserva as informações espaciais desejadas. As informações obtidas podem ser usadas então como base para a interrogação de um grande número de informações importantes desses complexos.

ALCs são compostos orgânicos multifuncionais, contendo em geral dois grupos reativos, unidos por uma cadeia espaçadora de comprimento variável. No caso de proteínas, os ALCs são capazes de ligar covalentemente as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, de acordo com suas especificidades. Os grupos reativos podem ser idênticos (homobifuncionais) ou distintos (heterobifuncionais), permitindo maior versatilidade na especificidade de cada reagente. Os ALCs reagem com as cadeias laterais de dois resíduos de aminoácidos distintos que estejam espacialmente separados a uma distância máxima imposta pelo comprimento da cadeia espaçadora. Como exemplo de grupos reativos mais empregados em ALCs estão os reativos frente a aminas, álcoois e tióis, como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) e imodésteres; frente a ácidos carboxílicos, como carboiimidazóis; frente a álcoois como isocianatos; e específicos para tióis como maleiimidazóis. Dentre os ALCs disponíveis atualmente, os de maior destaque são aqueles reativos frente a aminas primárias. Isso se deve principalmente a alta ocorrência de grupos amino em proteínas, sejam em resíduos de lisina ou no grupamento N-terminal da proteína. Os derivados de NHS são os reagentes mais utilizados atualmente devido aos rendimentos relativamente altos das reações e, principalmente, à facilidade de sua obtenção, bastando para isso reagir um haleto de ácido carboxílico com um NHS. Na Figura 6 temos a estrutura de alguns dos ALCs derivados de ésteres de NHS comumente utilizados em experimentos de ligação cruzada de proteínas, com as respectivas distâncias máximas que esses ALCs podem alcançar entre os grupos amino das lisinas.

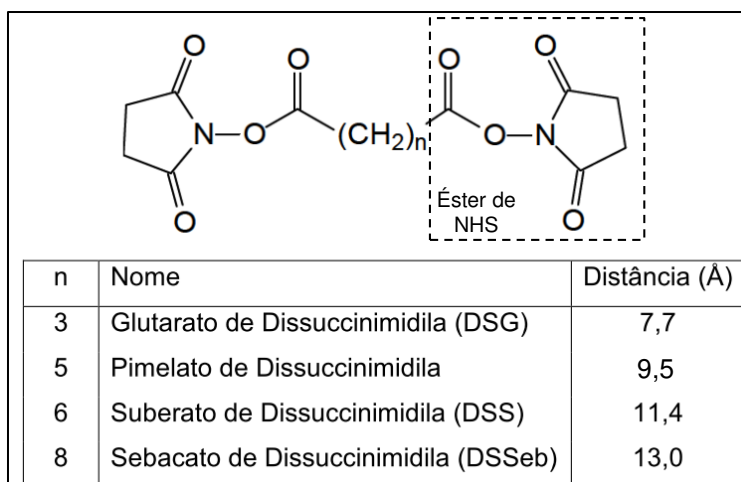


Figura 9: Estruturas de ALCs derivados de ésteres de N-hidroscinimida (NHS) com diferentes tamanhos na cadeia alifática. Os mais comuns são os com $n = 3, 6$ ou 8 , que recebem as seguintes abreviaturas: DSG, DSS e DSSeb. As distâncias (Å) são baseadas de acordo com o fornecedor de cada ALC.

Em 2000, Young e colaboradores propuseram pela primeira vez a utilização conjunta de ligação cruzada e MS para obtenção de informações estruturais de proteínas. Tais informações seriam provenientes do tamanho da cadeia espaçadora do reagente utilizado, onde a distância máxima entre dois resíduos ligados pelo ALC corresponderia ao comprimento do reagente. Caso o número dessas restrições espaciais fosse igual a $N/10$ (onde N é o número de resíduos da proteína), seria possível determinar o tipo de enovelamento por meio de métodos computacionais. Desse modo, foi proposta pela primeira vez a utilização de um método rápido e sensível baseado em ligação cruzada e MS para obtenção de informações estruturais de proteínas⁵⁰.

A Figura 7 mostra uma representação esquemática de como experimentos de ligação cruzada acoplada a MS são geralmente realizados. Primeiramente as proteínas são submetidas a reação com um determinado agente de ligação cruzada (ALC, representado em vermelho na etapa 1), seguido por digestão enzimática (2) e os peptídeos gerados são então analisados pela técnica de espectrometria de massas (3) **Error! Bookmark not defined.**, sendo que a partir dessa etapa as análises realizadas são dependentes do tipo de informação desejada: pode-se simplesmente identificar as proteínas presentes em um complexo ou realizar a identificação exata dos

peptídeos ligados entre si através do ALC localizando então quais aminoácidos estão próximos na estrutura quaternária de uma proteína ou complexo proteico. Além disso, é possível construir um mapa de ligações cruzadas mostrando quais são os resíduos próximos uns dos outros (4); com base nas restrições de distância (dado pelo ALC utilizado) é possível então selecionar modelos estruturais compatíveis com a proteína ou complexo proteico alvo (5).

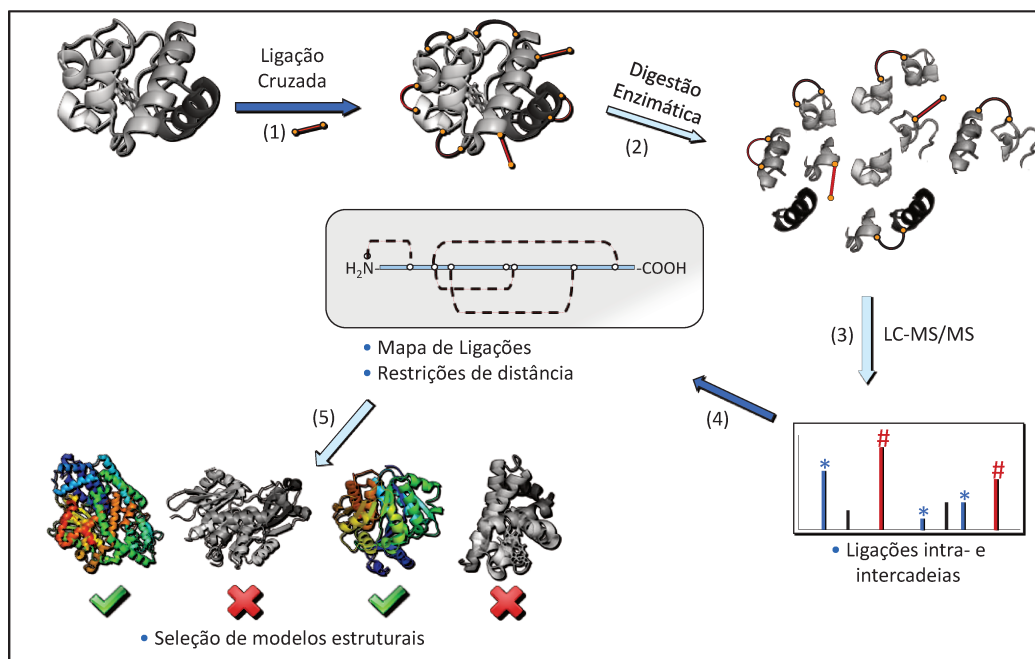


Figura 10: Representação esquemática de um experimento de ligação cruzada acoplado a espectrometria de massas. (1) Reação da(s) proteína(s) com o agente de ligação cruzada desejado. (2) Formação dos peptídeos modificados e convencionais por digestão enzimática. (3) Análise da mistura de peptídeos por LC-MS/MS. (4) Agrupamento das restrições de distância obtidas pelo experimento e desenho de um mapa de ligações cruzadas. (5) Uso do conjunto de restrições de distância na determinação de modelos estruturais compatíveis com a proteína alvo.

A união das técnicas de ligação cruzada e MS têm sido utilizada nos últimos anos visando a obtenção de dados como determinação do tipo de enovelamento de proteínas^{51,52,53,54}, identificação de parceiros de interação^{55,56}, monitoramento de mudanças conformacionais mediante interação com ligantes^{57,58}, determinação da superfície de interação de complexos^{59,60,61} e finalmente, na determinação de

acessibilidade ao solvente^{62,63,64}. Em todos esses estudos a detecção e identificação de peptídeos modificados pelo ALC é uma etapa crítica.

Após a reação com ALC e digestão enzimática, diferentes tipos de peptídeos modificados pelo ALC podem ser formados. Na Figura 8 estão ilustradas as diferentes espécies formadas após a reação com ALCs derivados de ésteres de NHS: a) espécies de ligação cruzada inter-moleculares, onde os resíduos ligados encontram-se em cadeias peptídicas distintas; b) espécies de ligação cruzada intra-moleculares, onde os dois resíduos de aminoácidos ligados encontram-se no mesmo peptídeo; e c) espécies hidrolisadas ou *dead end*, onde somente um dos grupos reativos do ALC reagiu com a proteína, enquanto o outro sofreu hidrólise.

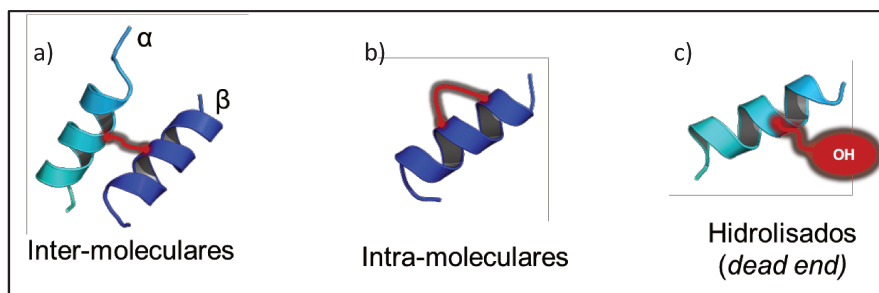


Figura 11: Representação esquemática de espécies *cross-links*. a) Espécie inter-molecular; b) Espécie intra-molecular e c) Espécie hidrolisada (*dead end*).

Cada uma dessas espécies fornece informações úteis sobre a estrutura da proteína (ou complexo), sendo que as espécies do tipo *dead end* trazem a informação de que o sítio reativo está exposto ao solvente, além de que não deve ter nenhum outro sítio reativo próximo àquela região; as espécies do tipo intra-molecular trazem a informação de que dois resíduos próximos na estrutura primária também se localizam dentro da distância do ALC utilizado na estrutura terciária e, finalmente, as espécies inter-moleculares que nos diz quais resíduos estão espacialmente próximos na estrutura terciária de uma proteína mesmo esses resíduos estando distantes na estrutura primária ou, ainda, no caso de complexos proteicos, nos diz que resíduos de duas proteínas distintas estão espacialmente próximos quando estas formam complexo de interesse. Esta última espécie é, sem dúvida, a que fornece informações de maior relevância, seja para uma proteína ou, principalmente, para complexos proteicos, onde

com base nessas espécies, é possível verificar quais regiões de determinadas proteínas estão próximas de regiões das outras proteínas desse complexo.

Embora a metodologia de ligação cruzada com análise por MS se mostre bastante promissora em fornecer informações estruturais de proteínas e complexos, há ainda vários desafios a serem vencidos para que ela se torne uma técnica de uso mais irrestrito tanto com relação ao tamanho do sistema quanto à variedade de proteínas.

Um dos grandes desafios da técnica é a detecção e identificação dos peptídeos modificados no digesto após a reação, uma vez que os mesmos sempre estão presentes em quantidades subestequiométricas na mistura⁶⁵. Algumas estratégias têm sido desenvolvidas visando contornar esse problema, como o uso de ALC isotopicamente marcados,^{66,67,68} ALC modificados com grupos visando purificação por cromatografia de afinidade^{69,70} e ALCs cliváveis^{71,72,73} que após a clivagem, as espécies de ligação cruzada se comportam como modificações convencionais. O uso de marcação isotópica, além de tornar a síntese do ALC cara, ainda duplica a complexidade do experimento. Limitações similares são apresentadas tanto pelos ALC cliváveis (necessidade de MS³) quanto aqueles com grupos de afinidade (perda da amostra por extensa manipulação)

Outra deficiência da técnica de ligação cruzada/MS é que a extensa maioria dos reagentes disponíveis é reativa frente a grupos aminos disponíveis nos resíduos de lisina. Embora lisinas apresentem uma razoável frequência média nas proteínas, sua presença é muitas vezes restrita em proteínas específicas, criando a necessidade de se criar ALC com diferentes especificidades.

1.1. O Complexo FERM/Miosina

Nas doenças do coração, ocorre aumento da massa do miocárdio (hipertrofia) e alterações de forma e dimensão das câmaras cardíacas (remodelamento), consequência da atuação de fatores como redução da capacidade contrátil do miocárdio, aumento da volemia, aumento da resistência ao fluxo de sangue entre compartimentos ou combinações destes fatores.

Apesar de qualquer uma das câmaras cardíacas poderem apresentar hipertrofia e remodelamento, o maior interesse, pela frequência e importância clínica, se concentra na hipertrofia e remodelamento do ventrículo esquerdo, isto porque estas ocorrem independentemente de doença primária que os tenha originado, tendo grande impacto na evolução clínica de pacientes cardiopatas⁷⁴ e representando fatores independentes de risco cardiovascular^{74,75}.

As alterações estruturais do miocárdio são atribuídas à ação complexa de fatores neuro-humorais (angiotensina II, catecolaminas, citocinas e fatores de crescimento) e biomecânicos em miócitos cardíacos e fibroblastos. Porém, estímulos mecânicos gerados em consequência de alterações primárias da capacidade contrátil, aumento da volemia e/ou aumento da resistência ao fluxo de sangue, são necessários para a instalação das alterações estruturais do miocárdio nas várias cardiopatias⁷⁶. Em geral, o desenvolvimento da hipertrofia em miócitos cardíacos é caracterizado pela expressão de genes de resposta imediata, re-expressão de genes fetais, pelo aumento na síntese protéica e pelo aumento no volume celular⁷⁷.

Em miócitos ventriculares de ratos neonatos em cultura, o estiramento mecânico leva à ativação de múltiplos sistemas de segundo mensageiros⁷⁸. Após o estiramento celular observa-se à ativação das fosfolipases C, D e A2; de tirosinoquinases, como a SRC e a quinase de adesão focal (FAK); das quinases ativadas por mitógenos (MAP-quinases) e seus ativadores; da c-Jun *N-terminal protein kinases* (JNK); da proteína quinase C (PKC) e da P70 S6 quinase, entre outras^{78,79,80}. Estas modificações decorrentes do aumento da tensão afetam a regulação do desempenho cardíaco e podem culminar no processo de hipertrofia celular⁸¹.

Estudos prévios sobre mecanismos patogênicos da hipertrofia e insuficiência cardíacas desenvolvidos pelo grupo do Prof. Dr. Kleber G. Franchini^{82,83,84,85}, com foco na sinalização celular ativada por estímulos mecânicos em miócitos cardíacos, demonstraram a importância crítica da sinalização pela quinase de adesão focal (FAK) para as alterações fenotípicas dos miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos. O conjunto dos dados obtidos sugere a FAK como alvo potencial para interferência no processo de transformação fenotípica de miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos

FAK é uma proteína pertencente à família de tirosinas quinases não receptores, expressa na maioria dos tecidos e tipos celulares. Ela é altamente conservada evolutivamente desde os organismos mais simples às diferentes espécies de mamíferos. Foi identificada em 1992 independentemente por Steve Hanks, Jun-Lin Guan e Michael Schaller como um substrato do oncogene Src e, em células normais, como uma proteína altamente fosforilada em tirosina, localizada em sítios de adesão enriquecidos em integrinas, conhecidos como sítios de adesão focal⁸⁶. Desde então, sua função biológica em diversos processos celulares como motilidade, proliferação, diferenciação celular, sobrevivência e invasibilidade vêm sendo demonstrada^{87,88}.

Ela é composta por um domínio N-terminal, um *linker* de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, um domínio catalítico central e um domínio C-terminal. O domínio C-terminal é composto por um sítio rico em prolina (domínio de reconhecimento SH3) e por um domínio C-terminal conhecido como *focal-adhesion targeting* (FAT)⁸⁶. O Domínio FAT é composto por 4 α -hélices, e é crítico para a localização da FAK nos pontos de adesão focal e não parece estar envolvido na regulação catalítica da FAK⁸⁹. O domínio catalítico (resíduos 411-687) apresenta um loop de ativação que contém os resíduos tirosinas 576 e 577, conhecido como alça de ativação. O *linker* que conecta este domínio ao domínio N-terminal, contém o resíduo tirosina 397, importante para a autofosforilação e ativação da FAK e também um sítio de reconhecimento SH3 rico em prolina⁸⁹. O domínio N-terminal possui uma sequência de aminoácidos homóloga ao domínio FERM (band 4.1, ezrina, radixina e moesina) encontrado em proteínas que ligam o citoesqueleto à membrana plasmática, no entanto, a função deste domínio na FAK ainda não está totalmente esclarecida. A Figura 9 mostra uma representação esquemática da FAK.

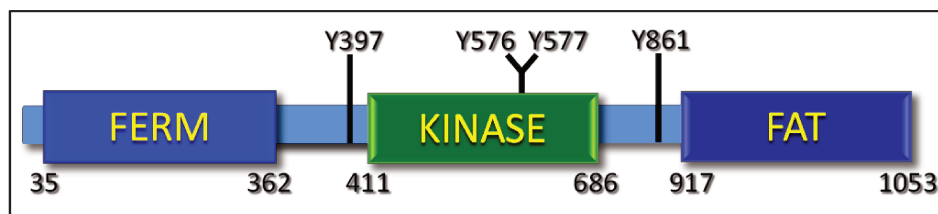


Figura 12: Esquema da disposição dos domínios da FAK. Os resíduos tirosina envolvidos na ativação da FAK estão indicados na figura.

O domínio FERM interage de forma auto-inibitória com o domínio quinase⁸⁹. A forma auto-inibitória da FAK parece ser mantida por diversos mecanismos, entre eles destacam-se a disposição do domínio FERM, que bloqueia a fosforilação dos resíduos tirosina 576 e 577 pela Src; o bloqueio físico da fenda catalítica aos substratos (promovido pela interação do domínio FERM com o quinase); além da inibição da autofosforilação do resíduo tirosina 397 que encontra-se sequestrado do sítio ativo pelo subdomínio F1 do domínio FERM⁸⁹. A Figura 10 representa a estrutura tridimensional da conformação auto-inibitória da FAK.

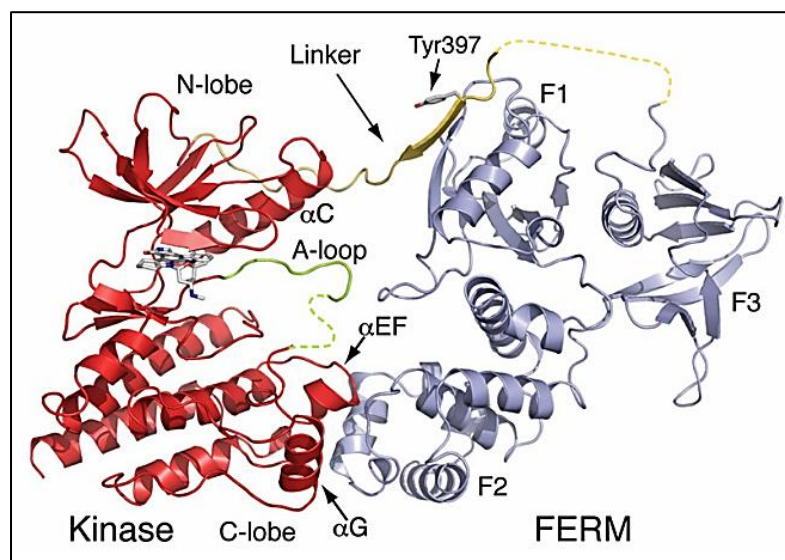


Figura 13: Estrutura tridimensional da conformação auto-inibitória da FAK. A estrutura é composta pelo domínio FERM, linker entre os domínios FERM e quinásico e o domínio quinase.

A autofosforilação da tirosina 397, possivelmente regulada pelo posicionamento deste resíduo no domínio FERM, é um evento chave na ativação da FAK e também para a fosforilação de outros resíduos de tirosina importantes para sua função biológica⁹⁰. A importância deste evento reside no fato de que a fosforilação da tirosina 397 da FAK leva a criação de um sítio de alta afinidade para a ligação de proteínas com domínio SH2, incluindo aquelas da família das Src quinases (c-Src)⁹¹. Após a ligação da c-Src no sítio que contém a tirosina 397 fosforilada, Src fosforila outros

resíduos de tirosina da FAK⁸⁶. A fosforilação das duas tirosinas localizadas na alça de ativação, tirosinas 576 e 577, potencializa sua atividade de quinase⁹².

Estudos anteriores demonstraram que a FAK é rapidamente ativada por sobrecarga pressórica em cultura de células ventriculares de ratos neonatos e no próprio miocárdio^{82,83,84,85,93,94}, sendo que esta ativação acompanha-se pela reprogramação do programa gênico, sendo expressos os genes característicos do período fetal, como a β -MHC e o ANP em células ventriculares⁹⁵.

Além disso, vários estudos têm demonstrado que a FAK contribui para o processo de hipertrofia e remodelamento cardíacos^{82,95}. Em estudos realizados por Fonseca e colaboradores⁹⁴, através de análise de biblioteca de cDNA de coração de rato com o sistema duplo-híbrido em levedura, verificou-se a existência de interação entre a FAK e a região C-terminal da cadeia pesada da miosina tipo II, sendo que o duplo-híbrido foi realizado com a utilização de uma isca que abrangia a região N-terminal e a região catalítica da FAK. Esta interação foi confirmada por experimentos de imunomicroscopia eletrônica, por ensaios de precipitação com proteínas recombinantes e por imunoprecipitação em extratos provenientes de corações de ratos, ilustrados na Figura 11⁹⁴. Neste contexto, sabendo-se que FAK responde à estímulos mecânicos e que, além de interagir com proteínas costaméricas, ela também pode interagir com a miosina sarcomérica, responsável por gerar e regular a tensão intracelular, é plausível sugerir que a ativação da FAK decorrente do estresse mecânico possa também depender da deformação da miosina sarcomérica e, conseqüentemente, que a interação com esta proteína do citoesqueleto sarcomérico possa contribuir para a manutenção da atividade basal da FAK em miócitos cardíacos.

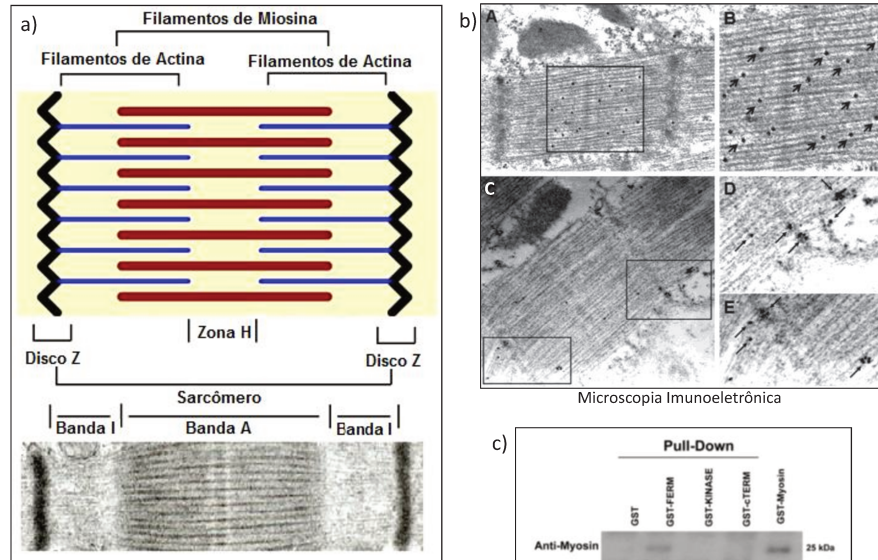


Figura 14: a) Representação esquemática de uma unidade sarcomérica. b) Microscopia imunoeletrônica de miocárdio utilizando-se o anticorpo anti-FAK, os quadros delimitados “A” e “B” representam o miocárdio em estado basal, onde as flechas indicam o anticorpo anti-FAK, mostrando que a FAK encontra-se próxima a região da miosina, os quadros “C”, “D” e “E” representam o miocárdio após 3 min de sobrecarga, onde as flechas mais uma vez indica a posição da FAK, mostrando que após estresse mecânico a FAK migra região costâmera próximo ao disco Z. c) Ensaio de *pull-down* utilizando os diferentes domínios da FAK imobilizados com GST, utilizando-se ainda estrato de coração de rato, mostrando que a interação entre FAK e miosina ocorre pela porção N-terminal da FAK (o domínio FERM) (referência 94).

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho é utilizar ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas para mapear a região de interação entre as proteínas do complexo FAK/Miosina (através do domínio FERM), tendo como objetivos específicos:

- Otimizar as condições dos experimentos de ligação cruzada para o complexo FAK/Miosina;
- Adequar o método de análise dependente de dados para a aquisição de espectros de peptídeos contendo ligação cruzada;
- Identificar as espécies *dead end*, ligação cruzada inter e intra-molecular para cada proteína dos complexos;
- Construir um mapa de ligações cruzadas e de exposição ao solvente;
- Propor um modelo para o complexo FAK/Miosina baseado nos dados dos experimentos de ligação cruzada acoplada à MS.

3. Parte Experimental

3.1. Reação de Ligação Cruzada

O complexo proteico FERM/Miosina foi obtido em colaboração com o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) sob supervisão do Prof. Dr. Kleber G. Franchini. As proteínas foram clonadas e expressas individualmente, e no momento de extração e purificação as colônias de bactérias foram misturadas. A purificação foi realizada através de gel filtração, momento em que já se observa a formação do complexo proteico. O pico cromatográfico referente ao complexo FERM/miosina foi coletado e submetido à reação de ligação cruzada.

O complexo proteico foi copurificado em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, com concentração estimada de 6,5 mg/mL (dosada utilizando NanoDrop 2000, Thermo Scientific). O agente de ligação cruzada suberato de N-hidroxisuccinimidila (DSS, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em DMF anidro de modo a obter uma concentração de 10 mg/ml. Posteriormente uma alíquota desta solução foi adicionada a solução do complexo de modo a obter um excesso molar de 100 vezes de DSS, mantendo-se a concentração de DMF menor que 10%. A reação entre DSS e o complexo foi realizada a temperatura ambiente por duas horas. Retirou-se uma alíquota para análise em gel de eletroforese, o restante da amostra foi submetido à redução e alquilação das cisteínas seguido da digestão enzimática com tripsina (Promega).

A redução das cisteínas foi realizada utilizando-se 100 µL da solução do complexo após a reação de ligação cruzada reagindo-se com 5 µL de uma solução de Ditioteitol (DTT, Sigma-Aldrich) 10 mM preparada em tampão bicarbonato de amônio 100 mM incubado por 30 minutos à 60 °C. Após o tempo reacional foi realizada a

alquilação das cisteínas reduzidas adicionando-se ao meio reacional 5 μ L de solução de Iodoacetamida 50 mM preparada em tampão bicarbonato de amônio 100 mM incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Para a digestão enzimática, utilizou-se proporção de 1:50 (m:m) de tripsina em relação ao complexo FERM/Miosina. A digestão foi realizada em 37°C por 16h.

3.2. Fracionamento e Análise da Amostra

A amostra foi fracionada utilizando-se cartucho Oasis HLB (Waters Co.). A amostra foi eluída em cinco frações utilizando-se como fase móvel acetonitrila e água, com aumento de acetonitrila nas proporções de 5, 10, 15, 20 e 70%.

As amostras foram então analisadas por LC-MS/MS, utilizando-se o sistema cromatográfico nanoAcquity UPLC (Waters Co) com coluna BEH C18 AcquityWaters (100 μ m x 100 mm), acoplado ao espectrômetro de massas Waters Synapt HDMS (Waters Co.). Foram injetados 2 μ L de cada fração (30 pmol de proteína para cada injeção). A aquisição de dados foi realizada pelo modo DDA (Aquisição Dependente de Dados), onde a cada segundo o equipamento adquire um espectro de MS. No caso da presença de espécies multicarregadas, as três espécies mais intensas são fragmentadas na câmara de colisão (energia de colisão definida pela m/z e carga do precursor).

Além do método *default* de DDA foi elaborado também outro método no qual a seleção dos íons para fragmentação era feita apenas para íons com carga acima de +3, isso porque as espécies modificadas pelo ALC apresentam sempre 3 ou mais cargas, fazendo com que o novo método fosse mais específico para as espécies de ligação cruzada, ajudando na identificação dessas espécies.

Para verificar da presença e cobertura das proteínas os dados foram processados no software ProteinLynx Global Server (Waters Co.) e foi realizada busca no banco de dados utilizando-se o programa Mascot (Matrix Science), com os seguintes parâmetros: MSDB (banco de dados), 0,1 Da (erro nos modos MS e MS/MS), tripsina (protease), permitindo peptídeos com até 2 sítio de clivagem não-digeridos,

carbamidometil - cisteína (modificação fixa) e oxidação de metionina (modificação variável).

Além disso, foi adicionada na lista de modificações do Mascot a massa 156,0786 Da para resíduos de lisinas, essa massa é a massa monoisotópica da modificação causada quando o ALC forma uma espécie de *dead end* (adição de $C_8H_{13}O_3$ e perda de um H). Dessa forma é possível utilizar o Mascot para busca de espécies hidrolisadas, utilizando-se uma modificação variável de 156,0786 Da.

Para avaliação da presença de ligação cruzada os dados foram analisados manualmente e com o auxílio do *software Crux for Xlink*⁹⁶. É importante ressaltar que para esse tipo de análise os *softwares* ainda não são muito eficientes, sendo imprescindível a análise manual dos espectros de massas. Para o *software Crux for Xlink* foram utilizados os seguintes parâmetros: modificação que o ALC causa nos peptídeos: 138,06 Da; modificação variável: 156,07 Da referente à espécies hidrolisadas que podem ocorrer junto com as espécies de inter- e intra- molecular; resíduo que sofre reação: lisina (K); enzima de digestão: tripsina; peptídeos com até 2 sítio de clivagem não-digeridos e o banco de dados utilizado é gerado a partir das sequências do domínio FERM e da miosina que fazem parte do arquivo de entrada.

4. Resultados e Discussão

4.1. Formação da Ligação Cruzada do Complexo FERM/Miosina

A análise da sequência da miosina (concatenada com GST) e do domínio FERM (fusionada com cauda de histidina) revela que ambas as proteínas são ricas em lisinas, com 46 e 29 resíduos respectivamente (Figura 12). Isso torna o complexo FERM/Miosina bastante apropriado para a técnica de ligação cruzada/MS utilizando ALC baseados em ésteres de NHS.

- GST-Miosina : 46 resíduos de lisina (K)

MSPILGYW**KIK**GLVQPTRLLEYLEEK**YEEH**LYERDEGD**KWRN****KK**FELGLEFPNLPYYIDGDV**K**LTQSMAI
 IRYIAD**KHN**MLGGCP**K**ERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYS**KDF**ETL**KVDF**LS**KL**PEML**K**MFEDRLCH**K**TYL
 NGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFP**KLV**CF**KK**RIEAIPQID**KYL****KSS**KYIAWPLQGWQATFGGG
 DHPP**K**SDLIEGRGIPGIMAEEL**KKE**QD**TS**AHLER**MKK**NMEQ**TIK**DLQHRLDEAEQIAL**KGG****KK**QL**QK**LE
 ARVRELENELEAEQ**K**RNAESV**K**GMR**K**SERRI**K**ELTYQTEED**KK**NL**VRL**QDLVD**K**L**QL****KV**KAY**K**RQAE
 EAEEQANTNLS**K**FR**K**VQHELDEAEERADIAESQVN**K**LRA**K**SRDIGAK**Q**KMHDEE

- His-FERM: 29 resíduos de lisina (K)

M**K**HHHHHHHSDYDIPTTENLYFQGSHMGAMERVL**K**VFHHFESSSEPTTWASIIRHGDATDVRGII**Q**KIVD
 SH**K**V**K**HVACYGFRLSHLRSEEVHVLHVDMGVSSVRE**K**YELAHPPPEEW**K**YELRIRYLP**K**GFLNQFTED**K**
 PTLNFFYQQV**K**SDYMQEIADQVDQEIAL**K**LGCLEIRRSYWEMRGNAL**EKK**SNYEVLE**K**DVGL**K**RFFPK
 SLLDSV**K**AKTLR**K**LIQQTFRQFANLNREESIL**K**FFEILSPVYRFD**K**EC**F**KALGSSWIISVELAIGPEEGIS
 YLTD**K**GCPNTHLADFNQVQTIQYSNSED**K**DR**K**GMLQL**K**IAGAPEPLTVTAPSLTIAENMADLIDGYCRL
 VNGATQSFIRP**Q**KEGERALPSIP**K**LANSE**K**QGMRTHAVSVSETDDYAEIIDEED

Figura 15: Sequências das proteínas GST-Miosina e His-FERM, com destaque para as lisinas, as sequências destacadas em negrito representam a sequência das proteínas miosina e FERM sem suas respectivas sequências de afinidade.

Inicialmente, as condições de reação cruzada foram otimizadas utilizando-se excessos molares de DSS de 10, 20 e 100 vezes mais com relação ao complexo proteico e tempos reacionais de 30 minutos, 1 e 2 horas. Os melhores resultados foram obtidos com a razão DSS:Proteína 100:1 e duas horas de reação. Trabalhos prévios do grupo já haviam mostrado de forma geral que a temperatura de 25 °C é a melhor temperatura para a ocorrência da reação de ligação cruzada, pois a 4 °C a reação é muito lenta e acima de 25 °C a hidrólise passa a ser muito competitiva, além de aumentar a possibilidade de degradação do complexo⁹⁷.

Nas condições ótimas de reação, observou-se no gel de SDS a formação do complexo FERM/Miosina covalentemente ligado em grande rendimento (Figura 13), não se observando nenhuma miosina sem estar ligada ao complexo. Pode-se observar, porém, um pouco de FERM não ligada devido provavelmente a um pequeno excesso dessa proteína na mistura. Outra característica do gel de SDS é a formação de uma banda difusa correspondente ao complexo covalentemente ligado. Isso é uma característica muito comum de proteínas que sofreram reações com ALC, pois o produto final corresponde a uma mistura de espécies moleculares contendo uma variada quantidade de ligações cruzadas e de modificações com *dead-end*, resultando em um grande número de espécies com massas ligeiramente diferentes entre si.

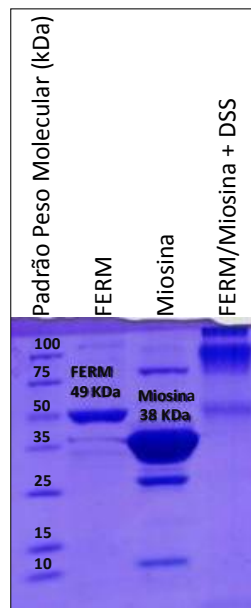


Figura 16: Gel de eletroforese do complexo FAK/Miosina, mostrando a formação do complexo covalente FAK/Miosina após a reação com DSS.

Uma vez formado o complexo covalente em grande rendimento, a amostra foi analisada seguindo uma análise de proteômica *shotgun*, ou seja, a mistura reacional total foi digerida com tripsina para que os peptídeos gerados pela digestão fossem analisados por LC-MS/MS em modo de aquisição dependente de dados (DDA).

4.2. Mapeamentos das Espécies de Ligação Cruzada para o Complexo FERM/Miosina

A análise dos espectros de MS/MS mostrou a presença de várias espécies *dead end* em ambas as proteínas. Essas espécies fornecem informações sobre a exposição ao solvente dos resíduos reativos, neste caso os resíduos de lisina, de forma que se possa saber quais resíduos estão expostos ao solvente. A identificação dos peptídeos modificados com o ALC hidrolisado pode ser feita utilizando-se programas de buscas de banco de dados de proteínas convencionais, já que se tratam de modificações convencionais, para os quais há algoritmos desenvolvidos e implementados nesses programas. Neste trabalho, os peptídeos modificados foram identificados pelo programa Mascot Server licenciado em nosso laboratório. Após a análise, 23 resíduos de lisina foram identificados modificados pelo ALC, mostrando assim que esses resíduos estão expostos ao solvente e esses dados tem que ser levados em consideração na criação do modelo estrutural final do complexo. A Figura 14 mostra um espectro de MS/MS de umas das espécies de *dead end* encontradas, neste caso a modificação ocorreu em um peptídeo da miosina.

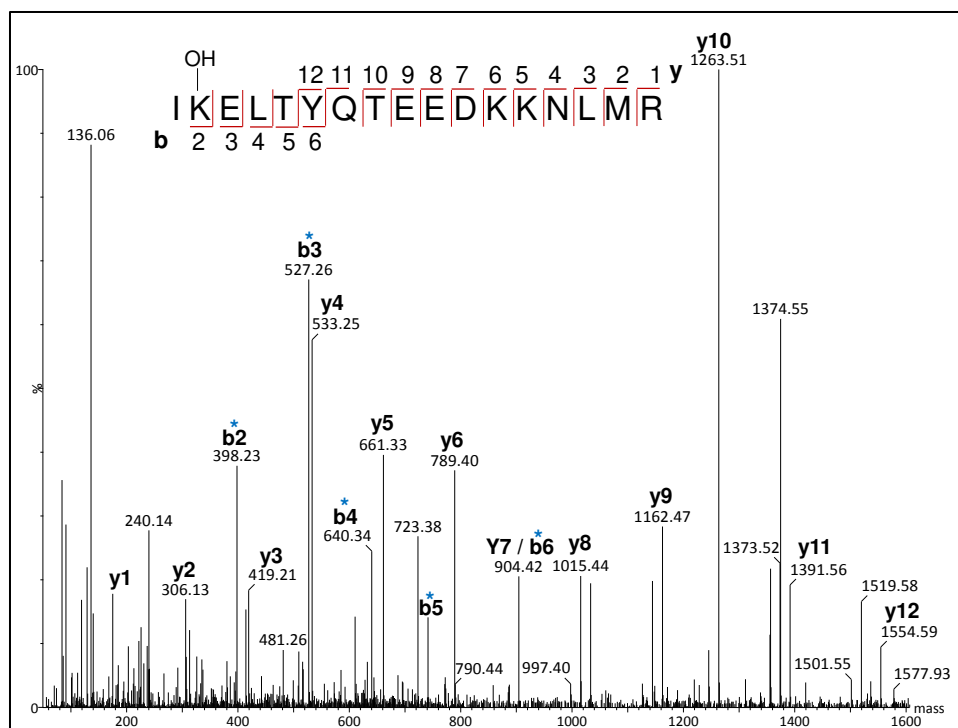


Figura 17: Espectro de ESI-MS/MS de uma espécie do tipo *dead end* de um peptídeo da miosina, o grupamento hidroxila representa o reagente de ligação cruzada hidrolisado. Os asteriscos azuis representam íons fragmentos que sofreram modificação pelo ALC formando uma espécie de *dea end*.

É interessante notar que as espécies de *dead end* apresentam um padrão de fragmentação convencional, onde a modificação permanece intacta e os principais fragmentos são devidos ao rompimento da ligação peptídica (ligação amida). No espectro da Figura 14, os asteriscos em azul representam íons fragmentos que possuem a modificação causada pelo ALC, o que permite localizar o resíduo modificado, neste caso a lisina 2. Cabe salientar também que modificação da lisina impede a clivagem neste resíduo, pois a lisina deixa de ser reconhecida pela tripsina tanto pelo maior tamanho da cadeia lateral quanto pela perda da basicidade do grupo amino da cadeia lateral.

A análise dos espectros de MS/MS mostrou também a presença de várias espécies inter-moleculares intra-proteínas. Essas espécies fornecem informações importantes com relação à distância entre aminoácidos na estrutura terciária de cada uma das proteínas, ou seja, sobre a estrutura terciária de cada componente individual do complexo. Além disso, essas espécies juntamente com espécies intra-moleculares

também nos fornecem informações acerca da acessibilidade do solvente, uma vez que a ligação cruzada só pode ocorrer em resíduos expostos ao solvente. A Figura 15 apresenta um exemplo de um espectro de uma ligação cruzada inter-molecular entre peptídeos da miosina.

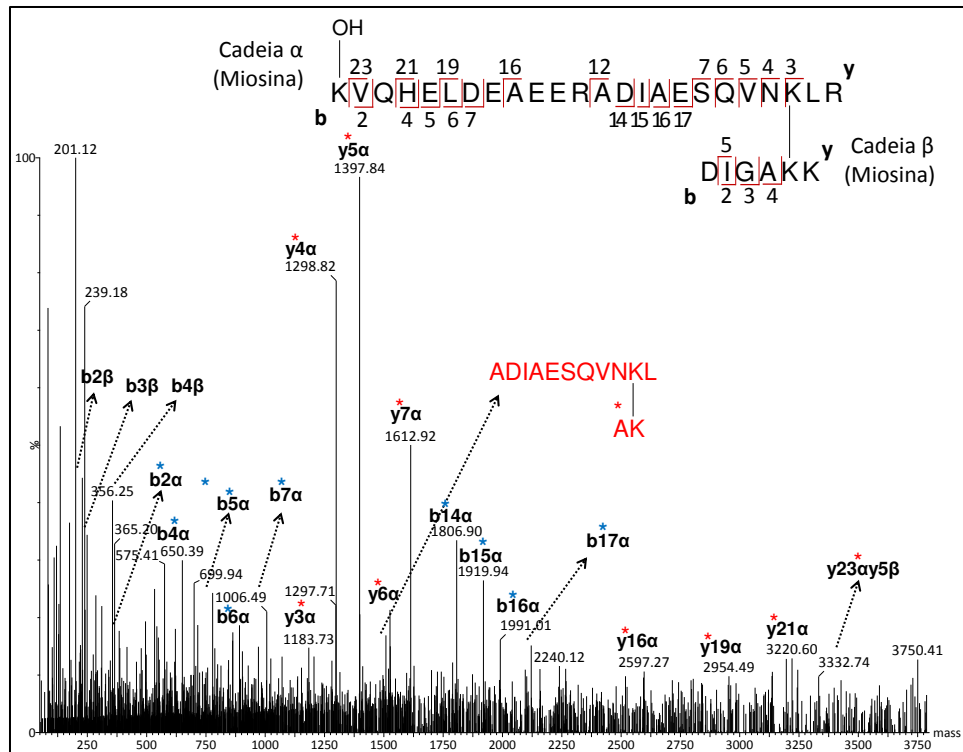


Figura 185: Espectro de ESI-MS/MS de uma espécie inter-molecular entre peptídeos da miosina. Os asteriscos em vermelho representam íons fragmentos que possuem uma porção de cada cadeia peptídica ligadas entre si através do ALC, os asteriscos azuis representam íons fragmentos que sofreram modificação pelo ALC formando uma espécie de *dead end*.

Observando-se a fragmentação dessa espécie nota-se que, além dos íons *b* e *y* regularmente encontrados nos espectros de fragmentação de peptídeos, ocorrem também fragmentações simultâneas das duas cadeias peptídicas, como exemplificado pelo íon fragmento $y_{23}\alpha y_{5}\beta$ de m/z 3332, onde duas fragmentações ocorreram: no resíduo 23 da cadeia alfa e também no resíduo 5 da cadeia beta, ambas formando íons *y*. Na nomenclatura de fragmentação de peptídeos com ligação cruzada, dá-se o nome de cadeia alfa ao maior peptídeo e de cadeia beta ao menor; assim para a espécie da Figura 15, a cadeia alfa é o peptídeo KVQHELDEAEERADIAESQVKNL e o peptídeo beta o DIGAKK.

Além da fragmentação paralela, em alguns casos é observado ainda a formação de fragmentos internos, ou seja, íons com fragmentação em um único peptídeo em ambas as porções N- e C-terminal. Um exemplo desse tipo de íon é o de m/z 1509, que aparece em vermelho na Figura, onde na cadeia alfa ocorreu a fragmentação na porção N-terminal formando o íon $y_{12}\alpha$ e também na porção C-terminal, formando o íon $b_{22}\alpha$. Ainda ligado a esse peptídeo, encontra-se um outro fragmento interno da cadeia beta, o $y_{3b5}\beta$. Dessa forma, podemos chamar esse íon interno de $y_{12}b_{22}\alpha$ - $y_{3b5}\beta$. Íons internos são geralmente observados na fragmentação de peptídeos por MALDI, especialmente utilizando-se experimentos de alta energia de colisão, como nos instrumentos do tipo Q-TOF. Porém para peptídeos contendo ligação cruzada, essas espécies são formadas com uma certa frequência e tem que ser levadas em conta quando se faz a interpretação manual dos espectros^{98,99}. Na Figura 15, os asteriscos em azul mostram ainda fragmentos que possuem a modificação causada pelo ALC formando *dead end*, como a região onde ocorre a reação entre os dois peptídeos está exposta ao solvente, é natural que a maior parte das lisinas dessa região sejam modificadas pelo ALC o que torna esses sítios inativos frente a clivagem da digestão enzimática, gerando uma combinação muito grande de peptídeos modificados e não modificados formando diferentes espécies, aumentando o número de possibilidades de espécies formadas o que dificulta tanto na atribuição quanto na identificação dos espectros de MS/MS. É importante ressaltar que ainda existem poucos *softwares* de identificação e atribuição de espécies de ligação cruzada e ao mesmo tempo os *softwares* ainda precisam de muito desenvolvimento, sendo imprescindível a busca e validação manual dos espectros de MS/MS.

Outras espécies presentes são as ligações cruzadas intra-moleculares. Estas espécies nos fornecem informações acerca da acessibilidade do solvente sendo complementar a região de interação, além disso, nos fornece informações acerca do enovelamento da proteína, visto que para que essas espécies ocorram, os resíduos devem estar espacialmente próximos na sequência terciária. Uma vez que ligações cruzadas intra-moleculares requerem que os resíduos ligados estejam próximos na estrutura primária, a formação dessas espécies revela o enovelamento local daquela região, ou seja, revelam dados sobre a estrutura secundária da proteína. Para uma alfa

hélice, por exemplo, dois resíduos podem estar próximos na estrutura primária, mas diametralmente opostos na estrutura terciária, impedindo assim, a formação da ligação cruzada. A Figura 16 apresenta um exemplo de um espectro de uma ligação cruzada inter-molecular em um peptídeo da miosina.

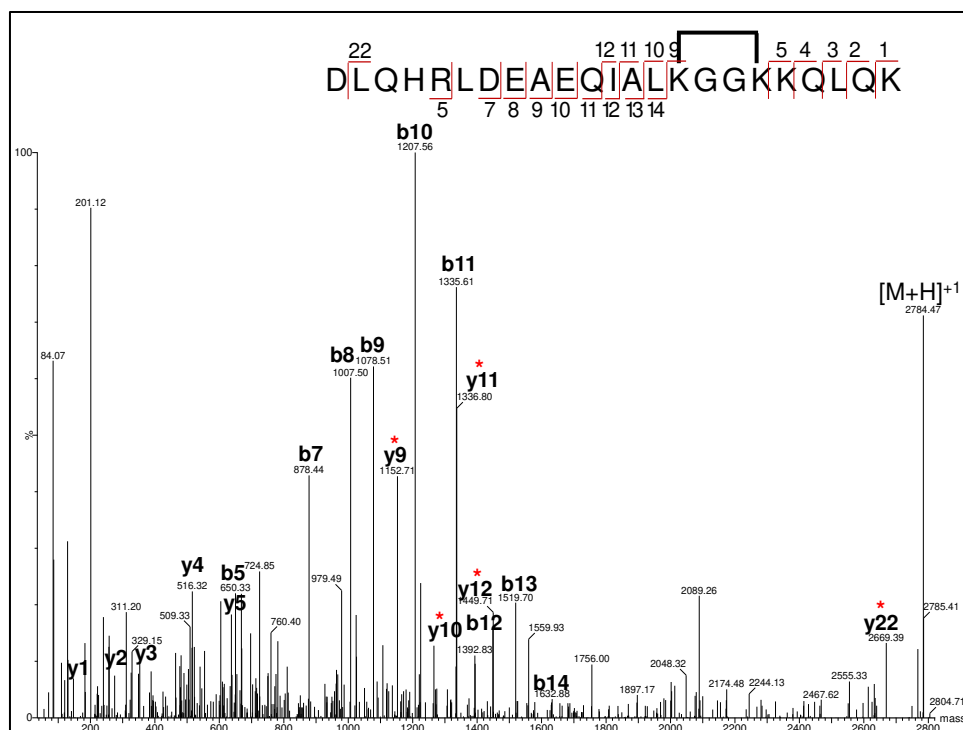


Figura 19: Espectro de ESI-MS/MS de uma espécie intra-molecular de um peptídeo da miosina. Os asteriscos em vermelho representam íon fragmentos que possuem modificação do ALC

Observando-se o perfil de fragmentação apresentado no espectro de MS/MS da Figura 16 nota-se que o peptídeo apresenta uma fragmentação convencional à medida que a série *b* ou *y* aumenta, porém após a modificação deve-se somar à massa dos íons o valor da modificação causada pelo ALC, sendo que na região entre as lisinas modificadas a fragmentação nem sempre é observada.

Por último, os esforços foram concentrados na identificação de espécies inter-moleculares inter-proteínas, espécies estritamente relacionadas com a região de interação entre as duas proteínas. Essas são as espécies de maior conteúdo de informação estrutural do ponto de vista do complexo proteico uma vez que suas identificações permitem o mapeamento do domínio de interação. Foram encontradas

duas espécies inter-moleculares entre a miosina e o domínio FERM da FAK. Os espectros de MS/MS dessas espécies estão representados na Figura 17.

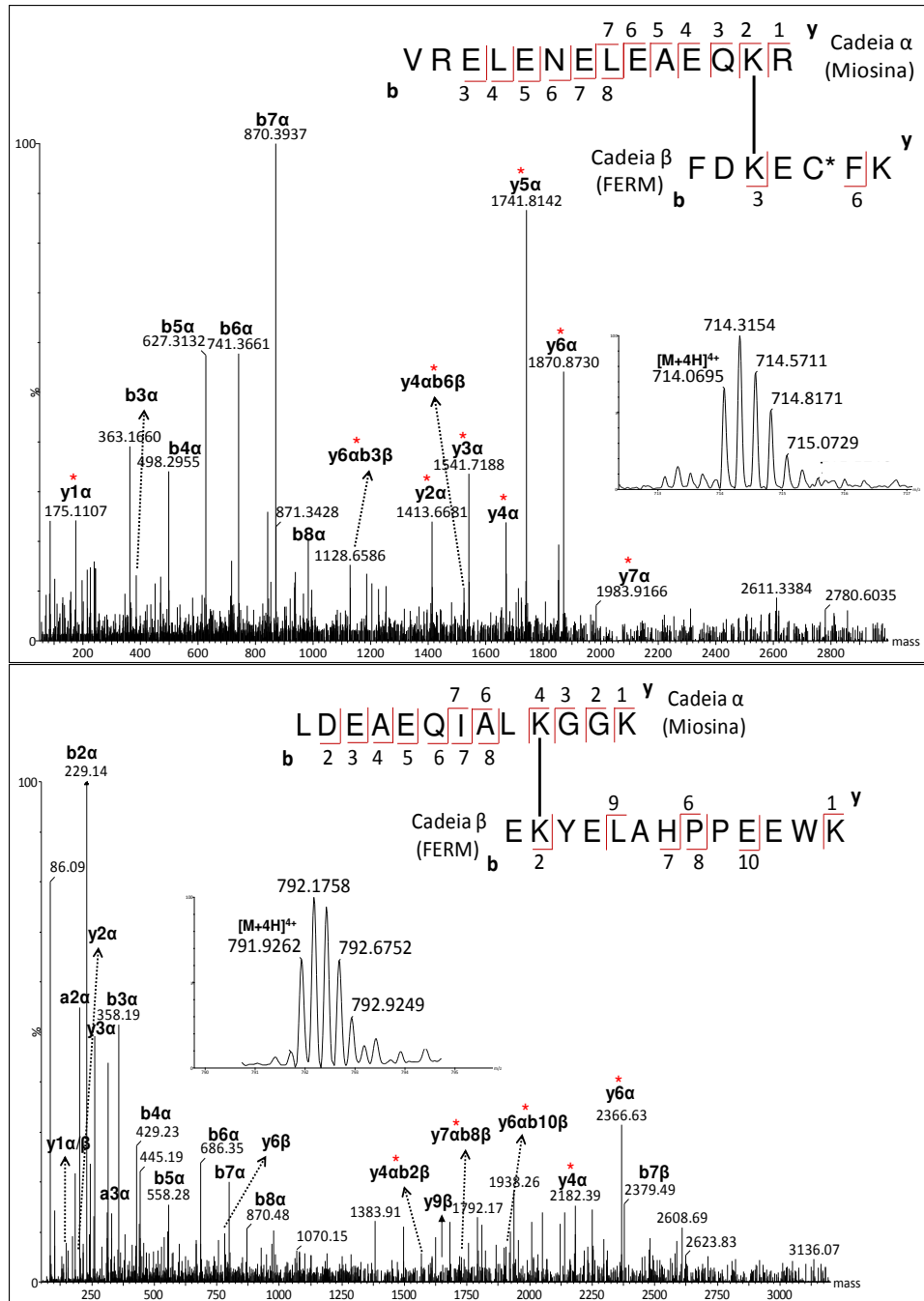


Figura 20: Espectros de ESI-MS/MS de espécies inter-moleculares entre as proteínas miosina e o domínio FERM da FAK. Os asteriscos em vermelho representam íons fragmentos que possuem uma porção de cada cadeia peptídica ligadas entre si através do ALC. O asterisco em preto na sequência do peptídeo β do primeiro espectro de MS/MS indica a cisteína modificada no processo de alquilação, formando carboamidometil- cisteína. Os incertos nas figuras representam o padrão isotópico dos íons precursores antes da deconvolução dos espectros.

Nota-se novamente nos espectros das espécies de ligação cruzada inter-molecular inter-proteína a presença de fragmentos advindos de fragmentação paralela das duas cadeias de peptídeos, tais como os fragmentos $y4ab6\beta$ e $y3ab6\beta$ para o primeiro espectro e $y4ab2\beta$ e $y6ab10\beta$ para o segundo.

A partir de todos os espectros de MS/MS identificados e atribuídos, foi possível construir um mapa de proximidade espacial para o complexo FERM/Miosina. A Figura 18 resume todas as espécies encontradas nos experimentos de LC-MS/MS dos peptídeos formados nos experimentos de *ligação cruzada* para o complexo FERM/Miosina. As lisinas marcadas em vermelho representam espécies do tipo *dead-end*, as linhas azuis representam espécies de ligação cruzada intra-proteína e as laranjas espécies de ligação cruzada inter-proteínas.

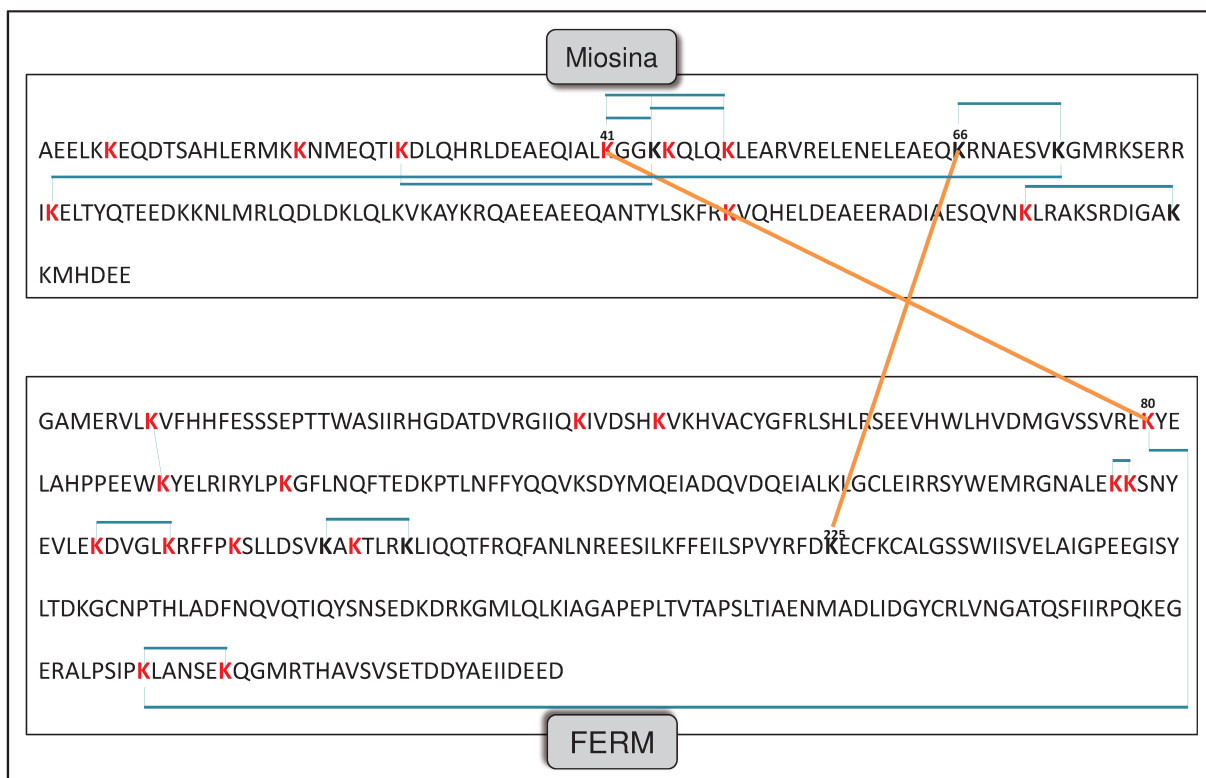


Figura 21: Representação das espécies de ligação cruzada encontradas para o complexo FERM/Miosina. A sequência de cima representa a sequência proteica da miosina e a de baixo a sequência do domínio FERM da FAK.

O conjunto das espécies *dead-end* e ligação cruzada inter- e intra-molecular compõe, assim, um conjunto de informações estruturais que permitem agora fazer um

modelamento, tanto das proteínas individuais quanto do domínio de interação FERM/Miosina, objeto de estudo deste trabalho. Deve-se ressaltar ainda que a identificação de peptídeos com ligação cruzada inter-proteínas representa a primeira evidência experimental direta da interação entre o domínio FERM da FAK e a miosina. Essa interação já havia sido proposta baseada nos experimentos de duplo híbrido e *pull-down*, mas a interação direta entre as duas proteínas não havia sido ainda detectada.

Para a determinação da região de interação e a criação do modelo molecular do complexo, é necessário se obter estruturas ou modelos dos componentes do complexo, o domínio FERM da FAK e da miosina. A estrutura do domínio FERM da FAK de *Mus musculus* foi criada a partir da estrutura de alta resolução da FERM de FAK de *gallusgallus* (PDB 2AL6) utilizando-se o programa *Modeller* (copyright 1989-2010 Andrej Sali). Já a estrutura da miosina de *Mus musculus* foi obtida através da estrutura de alta resolução da porção C-terminal da tropomiosina da *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 2EFR) utilizando-se também do programa *Modeller*. Essas estruturas e modelagens foram realizadas pelo grupo do Prof. Kleber Franchini.

Utilizando-se as restrições de distância intra-proteínas mostradas na Figura 18, as estruturas geradas pelo programa *Modeller* foram validadas, de forma a verificar se as distâncias entre os resíduos ligados pelo ALC estavam dentro da distância permitida pelo DSS, que é de 11,4 Å.

A partir dessas estruturas e de todos dos dados experimentais de ligação cruzada obtidos aqui, foi criado um modelo molecular que satisfizesse as restrições de distância das espécies mostradas na Figura 18.

O primeiro passo foi utilizar as ligações cruzadas intra-proteína para validar os modelos obtidos pelo programa *Modeller*. A Figura 19a mostra a estruturas da FERM e da miosina com as ligações cruzadas intra-proteínas em destaque. Observa-se que todas as ligações cruzadas tem uma distância entre os átomos de nitrogênio dos grupos amino da cadeia lateral das lisinas menor que 11.4 Å, mostrando que o modelo gerado é compatível com todos os dados de ligação cruzada intra-proteína. Da mesma forma, a Figura 19b apresenta a estrutura do domínio FERM destacando as ligações cruzadas intra-proteína, mostrando que todas elas têm uma distância entre os grupos

amino menor que 11.4 Å. Embora a Figura 18 apresente 7 ligações cruzadas para a miosina e 6 para o domínio FERM, as estruturas modeladas não contém toda a sequência das proteínas, de forma que algumas das ligações cruzadas não estão presente nas estruturas da Figura 19.

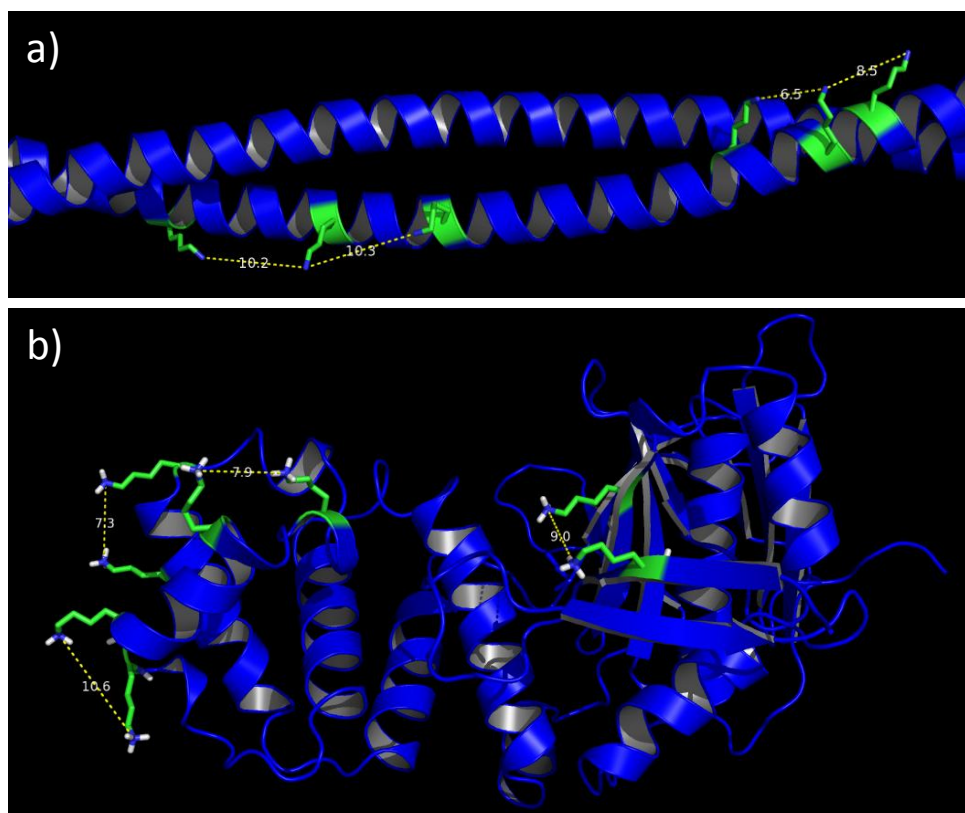


Figura 22:a) Modelo da Miosina mostrando as quatro ligações cruzadas intra-proteínas determinadas experimentalmente. b) Modelo da FERM mostrando as quatro ligações intra-proteína determinadas experimentalmente. Em todas as ligações cruzadas, as distâncias entre os grupos aminos da cadeia lateral das lisinas estão a uma distância menor que 11.5 Å, distância da cadeia espaçadora do ALC DSS.

Uma vez verificada a concordância dos modelos da FERM e da Miosina com as ligações cruzadas inter-proteínas, passou-se a analisar as duas ligações cruzadas inter-proteínas identificadas para criar um modelo molecular do complexo FERM/Miosina que satisfizessem essas duas restrições de distância entre as proteínas. O modelo final para esse complexo está mostrado na Figura 20.

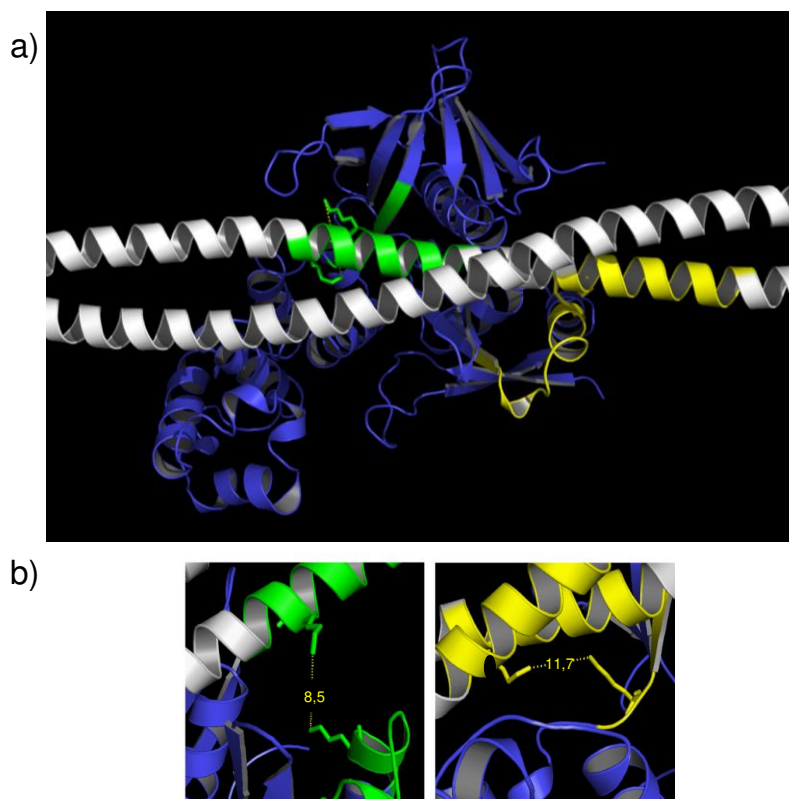


Figura 230: a) Modelo representando a região de interação entre as proteínas miosina e o domínio FERM da FAK; b) Distância entre os resíduos de lisina que se ligam pelo reagente de ligação cruzada.

Como mostrado na Figura 20, as distâncias entre as lisinas das ligações cruzadas encontradas são de 8,5 e 11,7 Å, distâncias compatíveis com o alcance do reagente DSS utilizado. Além disso, no modelo não há nenhuma sobreposição de volume das proteínas constituintes, o que impediria a formação do complexo. Outro fato interessante é que a análise detalhada do complexo revela que a miosina se encaixa no domínio FERM através de uma fenda em sua estrutura, como ressaltado na Figura 21. A inserção da miosina na cavidade aumenta a área de contato entre as duas proteínas, aumentando a possibilidade de interações entre os aminoácidos das duas proteínas, levando a um aumento da força de interação entre as duas cadeias polipeptídicas.

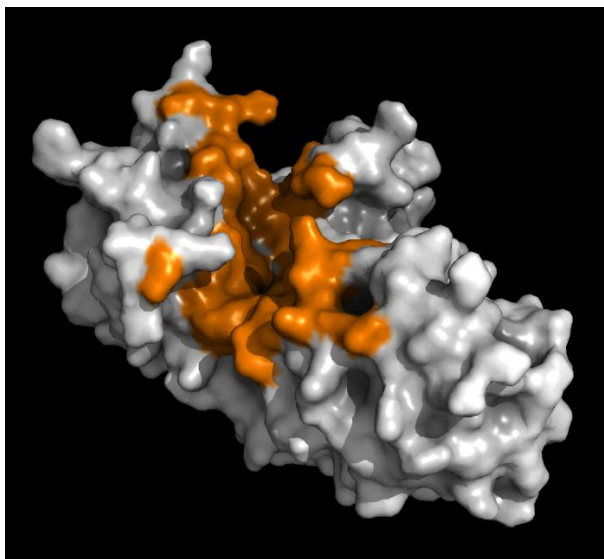


Figura 24: Estrutura do domínio FERM onde é destacada a região de interação com a Miosina, mostrando que a região se trata de uma fenda ao longo da estrutura.

Unindo todas as informações anteriores obtidas, é possível ainda montar um modelo mostrando todos os sítios de lisina que foram modificados, seja pela formação de espécies *dead end* como pela de ligação cruzada intra- e inter-moleculares intra- e inter-proteínas. Todas essas espécies juntas fornecem a informação de acessibilidade ao solvente, uma informação complementar à região de interação do complexo. A Figura 22 ilustra o mapeamento desses resíduos expostos na estrutura do modelo do complexo FERM/Miosina.

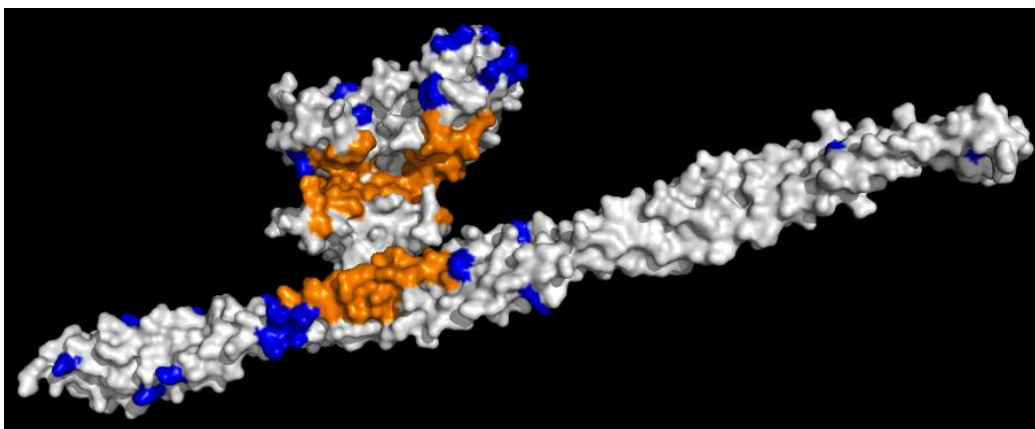


Figura 25: Representação esquemática das regiões complementares propostas pelo modelo baseado nos dados de ligação cruzada, em laranja a região de interação e em azul as lisinas modificadas que estão expostas ao solvente.

Na Figura 22 as duas proteínas do complexo estão apresentadas afastadas uma da outra de forma a se poder visualizar melhor a região de interação (região em laranja). As áreas em azul representam as lisinas que foram modificadas pelo ALC formando *dead end* e espécies de ligação cruzada inter- e intra. É interessante notar que essas regiões são complementares e que nenhuma lisina exposta foi identificada na região de interação que, no complexo, não deve ser acessível ao solvente.

Para confirmar o modelo do complexo FERM/Miosina obtida a partir dos dados de ligação cruzada, foram realizados experimentos de mutações sítio-dirigidas na região de interação proposta pelo modelo. Esses experimentos foram realizados pelo grupo do Prof. Kleber Franchini. A Tabela 1 mostra as mutações realizadas no FERM e a Figura 23 ilustra a localização dos resíduos mutados na estrutura do domínio FERM, assim como os resultados de *pull-down* realizados com esses mutantes.

Tabela 1: Resíduos de aminoácidos mutados em cada um dos experimentos de mutação sítio dirigida para o domínio FERM.

Mutação	Sítio da mutação
FERM-MUT 1	E128A/D131A/Q132A
FERM-MUT 2	E128A/D131A/Q132A/D134A
FERM-MUT 3	E128A/D131A/Q132A/D134A/Q135/E136
FERM-MUT 4	E63A/E64A
FERM-MUT 5	K256A

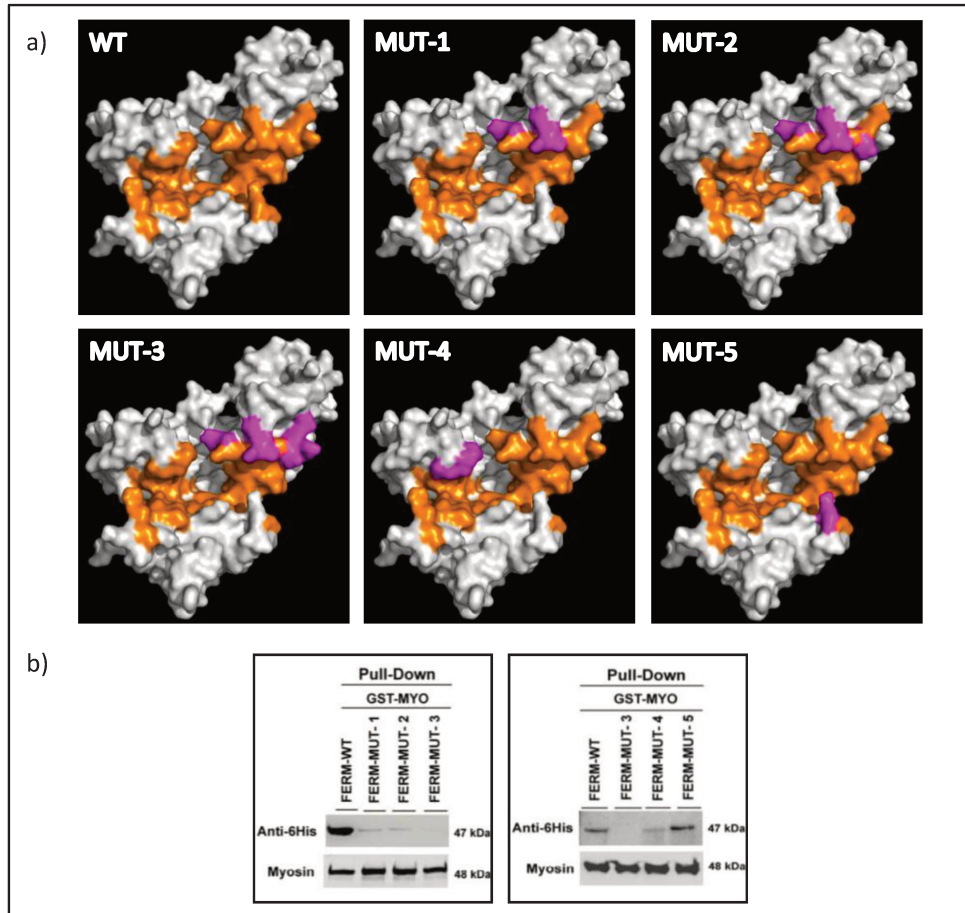


Figura 26: Representação esquemática dos experimentos de mutação sítio-dirigida. a) Superfície do domínio FERM onde em laranja está representada a região de interação proposta e em rosa os sítios mutados em cada um dos experimentos. b) Experimentos de imunoblotting para ensaios de *Pull-Down* mostrando os resultados dos experimentos de mutação.

Os resultados ilustrados na Figura 23b mostram que, com exceção da mutação do experimento MUT-5, todos os mutantes não formam o complexo, ou o formam em uma quantidade muito menor que a selvagem, confirmando que esses aminoácidos estão presentes na região de interação, corroborando assim o modelo gerado pelos experimentos de ligação cruzada.

4.3. Dificuldades e Facilidades Apresentadas pela Técnica de Ligação Cruzada

Apesar do sucesso do uso da metodologia de ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas na caracterização estrutural do complexo FERM/Miosina, há ainda algumas dificuldades que se tornaram aparentes e que precisam ser resolvidas para que a técnica possa ter uma maior abrangência e ser usada de forma mais fácil e automática.

Durante os experimentos de ligação cruzada foram obtidos 7823 espectros de MS/MS, dos quais 38 espectros foram identificados como sendo de espécies de ligação cruzada. Essa informação revela o que é tido hoje como o principal gargalo da técnica de ligação cruzada: a identificação das espécies de ligação cruzada frente a peptídeos regulares presentes na amostra. Isso acontece porque em uma amostra, após a reação com o ALC, a proporção estequiométrica de espécies modificadas pelo reagente com relação aos peptídeos regulares é muito baixa, fazendo com que as espécies contendo ligação cruzada apresentem uma intensidade muito menor quanto comparada aos peptídeos convencionais, como pode ser visualizado na Figura 24.

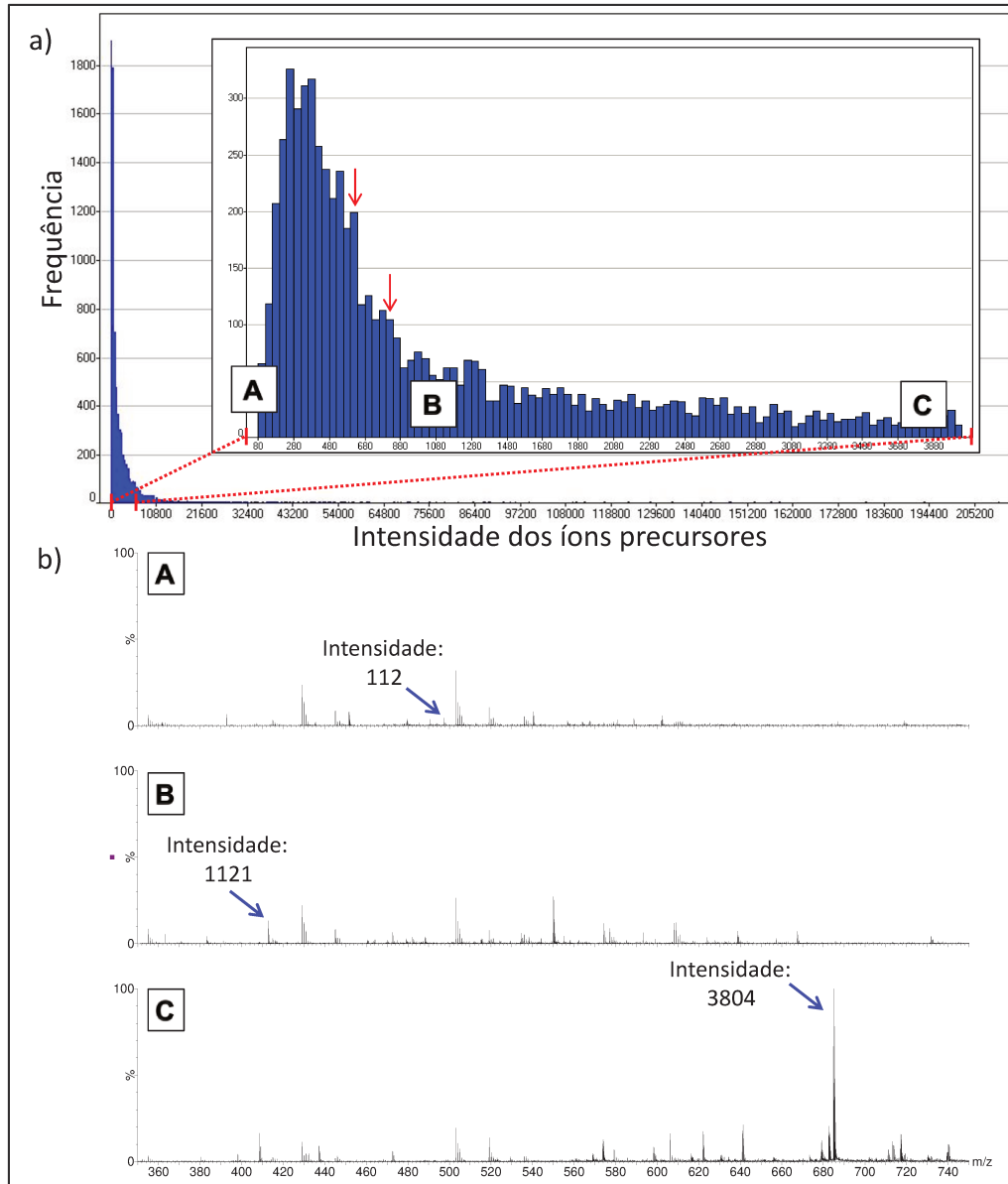


Figura 27: a) Histograma das frequências das intensidades dos íons precursores presentes nas análises de ligação cruzada. b) Intensidade relativa dos precursores nas diferentes regiões do histograma do item “a”, normalizadas com relação ao íon precursor destacado no espectro de massas “C”.

A Figura 24a mostra o histograma das intensidades de todos os íons precursores obtidos durante os experimentos de ligação cruzada, na região ampliada foram destacadas três faixas com diferentes intensidades ao longo do histograma. A Figura 24b representa as intensidades relativas dos precursores nas diferentes regiões do histograma da Figura 24, normalizadas com relação ao íon precursor destacado no espectro de massas 24b-C. O histograma mostra que os íons precursores de peptídeos

convencionais são muito mais abundantes que os íons precursores dos peptídeos com ligação cruzada inter-molecular inter-proteína, identificadas pelas flechas em vermelho no histograma. Dessa forma nota-se que os íons precursores de espécies de ligação cruzada são bem pouco intensos, mostrando que a proporção estequiométrica dessas espécies é bem pequena com relação aos peptídeos regulares. Sob essa, ótica além do problema da detecção dessas espécies em si, há um outro problema associado frequente, como os íons precursores são pouco intensos, os espectros de MS/MS são pouco povoados e com uma relação sinal/ruído ruim, dificultando ainda mais a identificação e atribuição desses espectros.

Além disso, os precursores das espécies de ligação cruzada apresentam uma massa muito maior que a de peptídeos convencionais, associados a uma carga também maior, geralmente entre 4+ e 6+. Neste contexto, a dissociação induzida por colisão é pouco eficiente, levando a espectros de fragmentação com uma cobertura de fragmentação relativamente baixa. Para essas espécies, a fragmentação baseada em elétrons (ECD e, principalmente, ETD) é uma alternativa muito mais interessante¹⁰⁰.

Finalmente, ligação cruzada se situa em uma área que ainda requer análise manual dos espectros e *softwares* que auxiliem na interpretação desses espectros ainda estão em fase inicial de desenvolvimento. O amadurecimento desses *softwares* irá, com certeza, expandir a aplicabilidade da metodologia.

Mesmo com essas dificuldades, a técnica se mostrou bastante atraente em vários sentidos:

- 1) Generalidade: como a análise é feita utilizando-se os protocolos padrões de proteômica *shotgun*, não há em princípio nenhuma limitação quanto ao sistema a ser estudado. O único ponto a ser destacado aqui é que quanto maior o sistema, maior a complexidade da amostra e um fracionamento mais extensivo se torna necessário;
- 2) Consumo de amostra: ao todo, o experimento de proteômica *shotgun* requereu 150 picomols do complexo, mostrando que mesmo amostras com quantidade limitada são passíveis de serem analisadas pela técnica;
- 3) Tempo de análise: com a automação da análise por *softwares*, no modelos dos *softwares* atuais para peptídeos regulares, a análise poderá ser feita em

apenas um dia após a aquisição dos dados. O tempo de aquisição dos dados no espectrômetro de massas também é rápido, em torno de uma hora por fração. Somado ao tempo de reação com o ALC e digestão, todo o procedimento pode ser realizado em poucos dias;

- 4) Facilidade de uso: desde que se tenham *softwares* de qualidade, o grande número de espectrômetros de massas de alta resolução permite um fácil acesso à técnica, requerendo apenas reagentes simples, acesso a um espectrômetro de massas e um *software* de análise.

5. Conclusões

Como mostrado nos resultados, foi possível mapear a região de interação entre as proteínas do complexo FERM/Miosina utilizando-se a técnica de ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas. A identificação das espécies de ligação cruzada, assim como a identificação dos peptídeos modificados pelo reagente DSS, forneceram um conjunto de restrições de distância entre os aminoácidos e de acessibilidade ao solvente que permitiram a criação de um modelo do complexo a partir das estruturas individuais de cada proteína componente do complexo FERM/Miosina. O modelo proposto a partir dos dados de ligação cruzada foi ainda validado através das mutações na região de interação proposta.

Essa abordagem integrativa viabilizou, portanto, o estudo deste complexo que não era passível de ser analisado pelos métodos de alta resolução.

É importante ressaltar ainda que esses dados mostram pela primeira vez a interação direta entre as essas proteínas, localizando a região específica responsável pela interação das duas proteínas, o que é de fundamental importância para o entendimento das vias de sinalização das patologias em que as proteínas estão envolvidas.

Finalmente, a técnica de ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas mostrou um grande potencial para caracterização de proteínas e complexos proteicos, devido à série de vantagens apresentadas pela técnica, como baixo consumo de amostra, rapidez nos experimentos, relativa facilidade de uso e amostragem em solução.

6. Referências Bibliográficas

- ¹Zhang, S.; Jin, G.; Zhang, X. S.; Chen, L. *Proteomics*, 7, 2856-2869, **2007**.
- ²Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition. Cambridge, W. H. Freeman, **2004**.
- ³Keskin, O.; Gursoy, A.; Ma, B.; Nussinov, R. *Chem. Rev.*, 108, 1225-1244, **2008**.
- ⁴Boehr D. D.; Wright P. E. *Science*, 320, 1429-1430, **2008**.
- ⁵Robinson, C. V.; Sali, A.; Baumeister, W. *Nature*, 450 (13), 973-982, **2007**.
- ⁶Archakov, A. I.; Govorun, V. M.; Dubanov, A. V.; Ivanov, Y. D.; Veselovsky, A. V.; Lewi, P.; Janssen P. *Proteomics*, 3, 380-391, **2003**.
- ⁷Gavin, A. C.; Böschke, M.; Krause, R.; Grandi, P.; Marzioch, M.; Bauer, A.; Schultz, J.; Rick, J. M.; Michon, A. M.; Cruciat, C. M.; Remor, M.; Höfert, C.; Schelder, M.; Brajenovic, M.; Ruffner, H.; Merino, A.; Klein, K.; Hudak, M.; Dickson, D.; Rudi, T.; Gnau, V.; Bauch, A.; Bastuck, S.; Huhse, B.; Leutwein, C.; Heurtier, M. A.; Copley, R. R.; Edlmann A.; Querfurth, E.; Rybin, V.; Drewes, G.; Raida, M.; Bouwmeester T.; Bork, P.; Seraphin, B.; Kuster, B.; Neubauer, G.; Furga, G. S. *Nature*, 415, 141-147, **2002**.
- ⁸Vazquez, A.; Flammini, A.; Maritan, A.; Vespignani, A. *Nature Biotech.*, 21, 697-700, **2003**.
- ⁹Droit, A.; Poirier, G. G.; Hunter, J. M. J. *Mol. Endocrinol.*, 34, 263-280, **2005**.
- ¹⁰Bonetta, L. *Nature*.468, 851-854, **2010**.
- ¹¹Sanchez, C.; Lachaize, C.; Janody, F.; Bellon, B.; Röder, L.; Euzenat, J.; Rechenmann, F.; Jacq, B. *Nucleic Acid Res.*, 27, 89-94, **1999**.
- ¹²Gavin, A. C.; Aloy, P.; Grandi, P.; Krause, R.; Böschke, M.; Marzioch, M.; Rau, C.; Jensen, L. J.; Bastuck, S.; Dumpelfeld, B.; Edlmann, A.; Heurtier, M. A.; Hoffman, V.; Höfert, C.; Klein, K.; Hudak, M.; Michon, A. M.; Schelder, M.; Schirle, M.; Remor, M.; Rudi, T.; Hooper, S.; Bauer, A.; Bouwmeester, T.; Casari, G.; Drewes, G.; Neubauer, G.; Rick, J. M.; Kuster, B.; Bork, P.; Russell, R. B.; Superti-Furga, G. *Nature*, 440, 631-636, **2006**.
- ¹³Guruharsha, K.G.; Rual, J. F.; Zhai, B.; Mintseris, J.; Vaidya, P.; Vaidya, N.; Beekman, C.; Wong, C.; Rhee, D. Y.; Cenaj, O.; McKillip, M.; Shah, S.; Stapleton, M.; Wan, H. K.; Yu, B.; Parsa, B.; Carlson, J. W.; Chen, X.; Hapadia, B.; Raghavan, K. V.; Gygi, S. P.; Celniker, S. E.; Obar. R. A.; Tsakonas, S. A. *Cell*, 147, 690-703, **2011**.
- ¹⁴Tafforeau, L.; Chantier, T.; Pradezynski, F.; Pellet, J.; Mangeot, P. E.; Vidalain, P. O.; Andre, P.; Combr, C. R.; Lotteau, V. *Journal of Virology*, 85 (24), 13010-13018, **2011**.

- ¹⁵Stelzl, U.; Worm, U.; Lalowski, M.; Haenig, C.; Brembeck, F. H.; Goehler, H.; Stroedicke, M.; Zenkner, M.; Schoenherr, A.; Koeppen, S.; Timm, J.; Mintzlaff, S.; Abraham, C.; Bock, N.; Kietzmann, S.; Goedde, A.; Toksöz, E.; Droege, A.; Krobitsch, S.; Korn, B.; Birchmeier, W.; Lehrach, H.; Wanker, E. E. *Cell*, 122, 957-968, **2005**.
- ¹⁶Stumpf, M. P. H.; Thorne, T.; Silva, E.; Stewart, R.; An, H. J.; Lappe, M.; Wiuf, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 6959-6964, **2008**.
- ¹⁷Dam, T. J. P.; Snel, B. *PLoS Computational Biology*, 4(7), 1-8, **2008**.
- ¹⁸Gabalton, T.; Rainey, D.; Huynen, M. A. *J. Mol. Biol.*, 348, 857-870, **2008**.
- ¹⁹Sprinzak, E.; Sattath, S.; Margalit, H. *J. Mol. Biol.*, 327, 919-923, **2003**.
- ²⁰Alber F.; Förster F.; Korkin D.; Topf M.; Sali A. *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 443-477, **2008**.
- ²¹Sharon, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, 21, 487-500, **2010**.
- ²²Puglise J. D. *Nature*, 450, 1171-1172, 2007.
- ²³Andrej, S.; Glaeser, R; Earnest, T; Baumeister, W. *Nature*, 422 , 216-225, **2003**.
- ²⁴www.pdb.org, acessado em janeiro de 2012.
- ²⁵Davis, R; Frearson, M. *Mass Spectrometry – Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, London **1987**.
- ²⁶Munson, M. S. B; Field, F.H. *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction***1966**.
- ²⁷Fenn, J.B; Mann, M; Meng, C. K; Whitehouse, C.M. *Science*, 246, 64–71, **1989**.
- ²⁸Karas, M; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.*, 60, 2299–2301, **1988**.
- ²⁹Kinter, M; Sherman, N. E. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, New York, John Wiley & Sons, **2000**.
- ³⁰Hu, Q; Noll, R. J; Li, H; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G. *J. Mass Spectrom.*, 40, 430–443, **2005**.
- ³¹Aebersold, R.; Goodlett, D. R. *Chem. Rev.*, 101, 269–296, **2001**.
- ³²Aebersold, R.; Mann, M. *Nature*, 422, 198–207, **2003**.
- ³³Patterson, S. D; Aebersold, R. *Nature Genet.*, 33, 311–323, **2003**.
- ³⁴Steen, H.; Mann, M. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, , 5, 699–711, **2004**.
- ³⁵Yates III, J. R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 297–316, **2004**.
- ³⁶Domon, B.; Aebersold, R. *Science*, , 312, 212–218, **2006**.
- ³⁷Cravatt, B. F; Simon, G. M; Yates III, J. R. *Nature*, , 450, 991–1000, **2007**.
- ³⁸Engen, J.R. *Anal. Chem.*, 81, 7870-7875, **2009**.
- ³⁹Marcisn, S. R.; Engen, J. R. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 967-972, **2010**.
- ⁴⁰Yan, X.; Watson, J.; Ho, P. S.; Dainzer, M. L. *Mol. Cell. Proteomics*, 3, 10-23, **2004**.
- ⁴¹Rand, K. D.; Pringle, S. D.; Murphy III, J. P.; Fadgen, K. E.; Brown, J.; Engen, J. R. *Anal. Chem.*, 81, 10019-10028, **2009**.
- ⁴²Wei, H.; Ahn, J.; Yu, Y. Q.; Tymiak, A.; Engen, J. R.; Chen, G. *J American Soc. For Mass Spectrom.*, noprolo, **2012**.
- ⁴³Iacob, R. E.; Zhang, J.; Gray, N. S.; Engen, J. R. *PLoS One*, 6 (1), e15929, 1-10, **2011**.
- ⁴⁴Chen, S.; O'Reilly, L. P.; Smithgall, T. E.; Engen, J. R. *J. Mo. Biol.*, 383 (7), 414-423, **2008**.
- ⁴⁵Takamoto K.; Chance M. R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35, 251-275, **2006**.
- ⁴⁶Xu G.; Chance M. R. *Chem. Rev.*, 107, 3514-3543, **2007**.
- ⁴⁷Kamal, J. k. A.; Chance, M. R. *Protein Sci.*, 17, 79-94, **2008**.

- ⁴⁸Zheng, X.; Wintrode, P. L.; Chance, M. R. *Structure*, 16, 38-51, **2008**.
- ⁴⁹Maleknia, S. D.; Downard, K. M. *eur.J.Biochem.*,268, 5578-5588, **2001**.
- ⁵⁰ Young, M. M.; Tang, N.; Hempel, J. C.; Oshiro, C. M.; Taylos, E. W.; Kuntz, I. D.; Gibson, B. W.; Dollinger, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5802-5806, **2000**.
- ⁵¹ Hung, B. X.; Kim, H. Y.; Dass, C. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.*,15, 1237-1247, **2004**.
- ⁵²Dihazi, G. H.; Sinz, A. *Rapid Commun.Mass Spectrometry*, 17, 2005-2014, **2003**.
- ⁵³ Lee, Y.J.; Lackner, L. L; Nunnaru, J. M.; Phinney, B. S. *Journal Proteome Res.*, 6, 3908-3917, **2007**.
- ⁵⁴ Chen, Z. A.; Jawhari, A.; Fischer, L.; Buchen, C.; Tahir, S.; Kamenski, T.; Rasmussen, M.; Lariviere, L.; Bukowski-Wils, J. C.; Nilges, M.; Cramer, P.; Rappsilber, J. *EMBO J.*, 29, 7117-726, **2010**.
- ⁵⁵ El-Shafey, A.; Tolic, N.; Young, M. M.; Sale, K.; Smith, R. D.; Kery, V. *Protein Sci.*, 15, 429-440, **2006**.
- ⁵⁶Kitatsuji, C.; Kurogouchi, M.; Nishimura, S. I.; Ishimori, K.; Wakasugi, K. *Journal Mol. Biol.*, 368, 150- 160, **2007**.
- ⁵⁷ Carven, G. J.; Stern, L. J. *Biochemistry*, 44,13625-13637, **2005**.
- ⁵⁸ Huang, B. X.; Kim, H. Y. *Mol. Cell.Proteomics*, 5, 1045-1053, **2006**.
- ⁵⁹Gertz, M.; Seelert, H.; Dencher, N. A.; Poetsch, A. *Biochim.Biophys. Acta*, 1774, 566-574, **2007**.
- ⁶⁰Maiolica, A.; CittaroD.; Borsotti, D. Sennels, L.; Ciferri, C.; Tarricone, C.; Musacchio, A.; Rappsilber, J. *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 2200-2211, **2007**.
- ⁶¹Ahrman, E.; Lambert W.; Aquilina, J. A.; Robinson, C. V.; Emanuelsson, C. S. *Proetein Sci.*, 16, 1464-1478, **2007**.
- ⁶²Gabant, G., Augier, J.; Armengaud, J. *Journal Mass. Spectrom.*,43, 360-370, **2008**.
- ⁶³ Baker, D. L.; Seyfriend, N. T.; Li, H.; Orlando, R.; Terns, R. M.; Terns, M. P. *Biochemistry*, 47, 1500-1510, **2008**.
- ⁶⁴Singh, P.; Panchaud, A.; Goodlett, D. R. *Anal.Chem.*, 82, 2636-2642, **2010**.
- ⁶⁵ Singh, P; Panchaud, A.; Goodlett, D. R. *Anal.Chem.*, , 82, 2636–2642, **2010**.
- ⁶⁶Sinz, A. *Angew. Chem.*, , 46, 660-662, **2007**.
- ⁶⁷Petrotchenko, E. V.; Serpa, J. J.; Borchers, C. H. *Molecular and Cellular Proteomics*.10, **2011**.
- ⁶⁸Petrotchenko, E. V.; Serpa, J. J.; Borchers, C. H. *Analytical Chemistry*, 82(3),817-823, **2010**.
- ⁶⁹Chowdhury, S. M.; Du, X.; Tolic, N.; Wu, S.; Moore, R. J.; Mayer, M. U.; Smith, R. D.; Adkins, J. *Analytical Chemistry*. 81, 5524-5532, **2009**.
- ⁷⁰Hoopmann, M. R.; Weisbrod, C. R.; Bruce, J. E. *Journal of Proteome Reasearch*.9, 6323-6333, **2010**.
- ⁷¹ Yang, L.; Tang, X.; Weisbrod, C. R.; Munske, G. R.; Eng, J. K.; Haller, P. D.; Kaiser, N. K.; Bruce, J. E. *Analytical Chemistry*. 82, 3556-3566, **2010**.
- ⁷² Muller, M. Q.; Dreiocker, F.;Ihling, C. H.; Schafer, M.; Sinz, A. *Analytical Chemistry*, 82, 6958-6968, **2010**.
- ⁷³ Kao, A.; Chiu, C.; Velluccis, D.; Yang, Y.;Patel, V. R.; Guan, S.; Randall, A.; Baldi, P.; Rychnovsky, S. D.; Huang, L. *Molecular and Cellular Proteomics*.10, **2011**.
- ⁷⁴ Levy, D.; Garrison, R. J.; Savage, D. D.; Kannel, W. B.; Castelli, W. P. *N. Engl. J. Med.*,322, 1561-1566, **1990**.

- ⁷⁵ Sutton, J. M.; Ellis, S. G.; Roubin, G. S.; Pinkerton, C. A.; King, S. B. *Circulation*, 89, 1126-1137, **1994**.
- ⁷⁶ Lorell, B. H.; Carabello, B. A. *Circulation*, 102,470-479, **2000**.
- ⁷⁷ Sussman, M. A.; McCulloch, A.; Borg, T. K. *Circ. Res.*, 91,888-898, **2002**.
- ⁷⁸ Sadoshima, J.; Izumi, S. *EMBO J.*, 12, 1681-1692. **1993**.
- ⁷⁹ Sadoshima, J.; Takahashi, T.; Jahn, L.; Izumo, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9905-9909, **1992**.
- ⁸⁰ Yamazaki, T.; Komuro, I. Kudoh, S.; Zou, Y.; Shiojima, I.; Mizuno, T.; Takano, H.; Hiroi, Y.; Ueki, K.; Tobe, K. *J. Clin. Invest.*,96, 438-446, **1995**.
- ⁸¹ Rooij, J.; Kerstens, A.; Danuser, G.; Schwartz, M. A.; Waterman-Storer, C. M. *J. Cell.Biol.*, 171, 153-164, **2005**.
- ⁸² Clemente, C. F.; Corat, M. A.; Saad, S. T.; Franchini, K. G. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol*, 289, R862-870, **2005**.
- ⁸³ Domingos, P. P.; Fonseca, P. M.; Nadruz, W. Jr.; Franchini, K. G. *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, 282, H556-564, **2002**.
- ⁸⁴ Franchini, F. G.; Torsoni, A. S.; Soares, P. H.; Saad, M. J. *Circ. Res.*, 87, 558-565, **2000**.
- ⁸⁵ Kobarg, C. B.; Kobarg, J. Crosara-Alverto, D. P.; Theizen, T. H.; Franchini, K. G. *FEBS Lett.*, 579, 2615-2622, **2005**.
- ⁸⁶ Mitra, S. K., Hanson, D. A. Schlaepfer, D. D. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 6, 56-68, **2005**.
- ⁸⁷ Hauk, C. R.; Sieg, D. J.; Hsia, D. A.; Loftus, J. C.; Gaarde, W. A.; Monia, B. P. Schlaepfer, D. D. *Cancer Res.*, 61, 7079-7090, **2001**.
- ⁸⁸ Wang, H.B., Dembo, M., Hanks, S.K., Wang, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11295-11300, **2001**.
- ⁸⁹ Lietha, D.; Cai, X.; Ceccarelli, D. F.; Li, Y.; Schaller, M. D.; Eck, M. J. *Cell*, 139, 1177-1187, **2007**,
- ⁹⁰ Toutant, M., Costa, A., Studler, J.M., Kadare, G., Carnaud, M., Girault, J.A. *Mol.Cell.Biol.*, 22, 7731-7743, **2002**.
- ⁹¹ Cobb, B.S., Schaller, M.D., Leu, T.H., Parsons, J.T. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 147-155, **1994**.
- ⁹² Calalb, M. B.; Polte, T.r.; Hanks, S. K. *Mol. Cell.Biol.*, 15, 954-963, **1995**.
- ⁹³ Marin, T.M., Clemente, C.F., Santos, A.M., Picardi, P.K., Pascoal, V.D., Lopes-Cendes, I., Saad, M.J., Franchini, K.G. *Circ. Res.*, 103, 813-824, **2008**.
- ⁹⁴ Fonseca, P.M., Inoue, R.Y., Kobarg, C.B., Crosara-Alberto, D.P., Kobarg, J., Franchini, K.G. *Circ. Res.*, 96, 73-81, **2005**.
- ⁹⁵ Torsoni, A.S., Constancio, S.S., Nadruz, W., Jr., Hanks, S.K., Franchini, K.G. *Circ.Res.*93,140-147, **2003**.
- ⁹⁶ McIlwain, S.; Draghicescu, P.; Singh, P.; Goodlett, D. R.; Noble, W. S. *Journal of Proteome Research.*, 9, 2488-2495, **2010**.
- ⁹⁷ Pilau, E. J. Desenvolvimentos Metodológicos em Proteômica Estrutural por Espectrometria de Massas. Campinas-SP. UNICAMP. 2010. 122 pg. Tese de Doutorado, Instituto de Química.
- ⁹⁸ Iglesias, A. H.; Utilização de espectrometria de massas, ligação cruzada (*cross-linking*) e *footprinting* no estudo de interações proteína-proteína. Campinas-SP. UNICAMP. 2009. 170 pg. Tese de Doutorado, Instituto de Química.

⁹⁹ Santos, L. F. A. Uso de espectrometria de massas e mobilidade iônica na caracterização de peptídeos provenientes de experimentos de ligação cruzada. Campinas-SP. UNICAMP. 2011, 151 pg. Tese de doutorado, Instituto de Química.

¹⁰⁰ Santos, F. L.; Eberlin, M. N.; Gozzo, F. C. *J. Mass Spectrom.*,46(3), 262-268, **2011**.

Anexo

Em anexo encontra o artigo onde foi publicado parte desse trabalho.

FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy

Aline M Santos^{1,2}, Deborah Schechtman³, Alisson C Cardoso^{1,2}, Carolina F M Z Clemente², Júlio C Silva², Mariana Fioramonte⁴, Michelle B M Pereira^{1,2}, Talita M Marin^{1,2}, Paulo S L Oliveira², Ana Carolina M Figueira², Saulo H P Oliveira², Íris L Torriani^{2,5}, Fábio C Gozzo⁴, José Xavier Neto² & Kleber G Franchini^{1,2,*}

Focal adhesion kinase (FAK) regulates cellular processes that affect several aspects of development and disease. The FAK N-terminal FERM (4.1 protein-ezrin-radixin-moesin homology) domain, a compact clover-leaf structure, binds partner proteins and mediates intramolecular regulatory interactions. Combined chemical cross-linking coupled to MS, small-angle X-ray scattering, computational docking and mutational analyses showed that the FAK FERM domain has a molecular cleft (-998 Å²) that interacts with sarcomeric myosin, resulting in FAK inhibition. Accordingly, mutations in a unique short amino acid sequence of the FERM myosin cleft, FP-1, impaired the interaction with myosin and enhanced FAK activity in cardiomyocytes. An FP-1 decoy peptide selectively inhibited myosin interaction and increased FAK activity, promoting cardiomyocyte hypertrophy through activation of the AKT-mammalian target of rapamycin pathway. Our findings uncover an inhibitory interaction between the FAK FERM domain and sarcomeric myosin that presents potential opportunities to modulate the cardiac hypertrophic response through changes in FAK activity.

FAK, a broadly expressed non-receptor tyrosine kinase, is a key player in fundamental biological processes and functions including cell adhesion, migration, proliferation and survival^{1,2}. The involvement of FAK in this range of functions supports its role in important aspects of development and disease such as central nervous system and cardiovascular development, cancer, cardiac hypertrophy and tissue fibrosis³⁻⁵. This diverse array of functions underscores the need for precise control over the extent of FAK kinase activity and signaling in several cell lineages.

FAK is composed of N-terminal FERM, kinase and C-terminal focal-adhesion targeting domains⁶. The crystal structure revealed that the FAK FERM domain is arranged in a globular clover-leaf structure formed by three independently folded subdomains F1, F2 and F3 (ref. 10). The F2 subdomain interacts with the kinase C lobe, leading to an autoinhibitory conformation that impedes access of ATP and substrates to the active site¹¹. However, under physiological conditions in living cells, partnering with negative regulators in specific subcellular sites may be needed to further stabilize the autoinhibitory conformation of FAK¹². Consistent with this, FIP200, a FAK family interacting protein, inhibits FAK activity both *in vivo* and *in vitro*¹³ through an interaction mediated by FERM and kinase domains. Because FAK regulates distinct functions in various cell lineages, it is likely that there are multiple tissue-specific inhibitory partners that bind FERM in different cell types and perhaps even in subcellular sites¹². The current model for FAK signaling holds that FAK activation is triggered by integrin-dependent cell adhesion as well as by activation of growth factor receptors or G protein-coupled receptors¹⁴. Activation of FAK seems to require FERM's release from the catalytic domain, which allows enzyme autophosphorylation at Tyr397 and recruitment of Src mediated by SH2 binding^{15,16}. Bound

Src then elicits full FAK catalytic activity by promoting the phosphorylation of Tyr576 and Tyr577 on the FAK activation loop¹⁷. Thus, interactions of FAK-binding proteins with the FERM domain may induce conformational changes that affect the FERM-kinase interaction and modulate FAK activation¹⁸⁻²¹.

Several lines of evidence indicate that FAK functions to promote cardiomyocyte hypertrophy^{17,18,22}, an essential adaptive response to enhanced mechanical load that has critical implications in cardiac physiology and pathophysiology. Indeed, FAK is promptly activated and mediates the hypertrophic responses of cardiomyocytes following stimulation by interventions such as mechanical stretch or neurohumoral factors^{8,23,24}. However, a detailed understanding of how FAK is regulated in cardiomyocytes is still lacking. Both FAK and integrins are concentrated in costameres, the junctions between the Z-discs and the cell membrane²⁵, which are considered the counterparts of focal adhesion sites in cardiomyocytes. Moreover, there is also evidence for a distinct pool of FAK, one that is linked to and may be regulated by the C-terminal tail of myosin heavy chain in the sarcomeric A band of cardiomyocytes²⁶. Therefore, it is important to understand how the interaction with myosin regulates FAK activity and affects the cardiomyocyte responses to hypertrophic stimuli. To resolve these issues, we set out to characterize the key structural elements that determine FAK-myosin interaction.

We performed extensive biochemical studies to demonstrate that sarcomeric myosin inhibits FAK through an interaction with the FAK FERM domain. The structural basis for this interaction was determined by a combination of chemical cross-linking coupled to mass spectrometry (CXMS), small-angle X-ray scattering (SAXS), computational docking and mutational approaches. To address the functional meaning of the interaction between FAK and sarcomeric

¹Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. ²Brazilian National Laboratory for Biosciences, Brazilian Association for Synchrotron Light Technology, Campinas, São Paulo, Brazil. ³Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁴Chemistry Institute, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. ⁵Gleb Wataghin Physics Institute, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. *email: kleber.franchini@lnbio.org.br



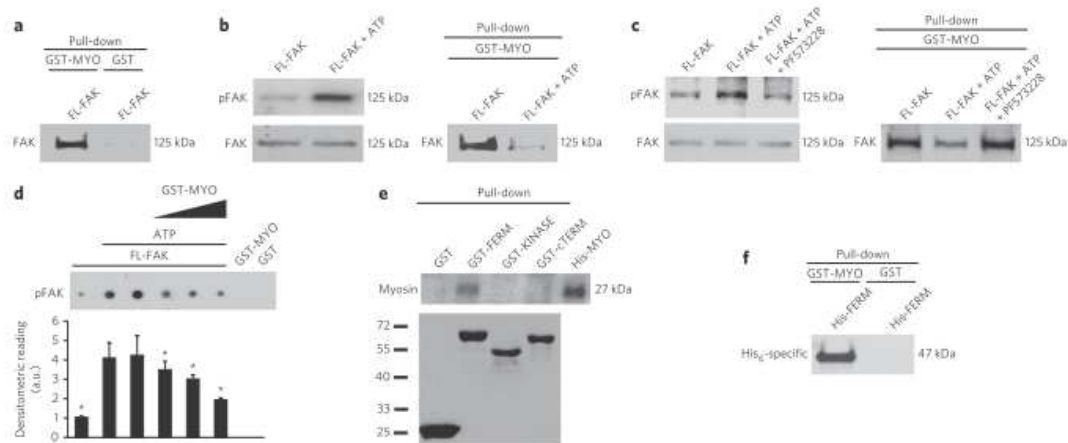


Figure 1 | Interaction and regulation of FAK by cardiac myosin *in vitro*. (a) FAK-specific immunoblot from a pull-down assay of FL-FAK performed with GST-MYO. (b) The FAK-cardiac myosin interaction is reduced by FAK phosphorylation. pY397-FAK (pFAK)- and FAK-specific immunoblots of FL-FAK in the presence or absence of ATP (left). FAK-specific immunoblots from pull-down assay of phosphorylated and nonphosphorylated FAK performed with GST-MYO (right). (c) pY397-FAK- and FAK-specific immunoblots of FL-FAK, FL-FAK + ATP, and FL-FAK + ATP + PF573228 (left). Pull-down assay of FL-FAK, FL-FAK + ATP, and FL-FAK + ATP + PF573228 performed with GST-MYO (right). (d) Kinase assay of recombinant FL-FAK. Representative experiment shows dot blots of FL-FAK recognized by the pY397-FAK-specific antibody (upper panel). The assays were performed with FL-FAK in the absence or presence of ATP, GST or GST-MYO (FL-FAK; FL-FAK + ATP; FL-FAK + GST (1:1 Mol/Mol) + ATP; FL-FAK + GST-MYO (1:0.25, 1:0.5 and 1:1 Mol/Mol) + ATP). GST-MYO and GST were applied on the right membrane board. Data represent mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * $P < 0.0001$ versus the densitometric reading of FL-FAK + ATP (lower panel). (e) Myosin-specific immunoblot from pull-down assay of His-MYO (upper panel) performed with recombinant GST-FAK fragments and GST (lower panel). (f) Pull-down assay of His-FERM performed with GST-MYO. These data represent three independent experiments. Uncropped blots are shown in **Supplementary Figure 13a**. a.u., arbitrary units.

myosin, we designed a decoy peptide corresponding to a short sequence of amino acids in the FAK FERM domain, which we found to inhibit FAK-myosin interaction and enhance FAK activity, promoting cardiomyocyte hypertrophy through the AKT-mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Thus, these findings reveal that FAK's interaction with myosin has an important role in the regulation of FAK functions that have an impact on the control of cardiomyocyte growth.

RESULTS

Myosin interacts with the FAK FERM domain

Pull-down assays carried out with purified full-length FAK (FL-FAK) and a glutathione-*S*-transferase (GST)-tagged C-terminal myosin fragment (GST-MYO) indicated that GST-MYO, unlike the GST control, interacts with FAK (Fig. 1a). To test whether binding of FAK to myosin is affected by FAK activation, we examined whether FAK phosphorylated at Tyr397 also interacts with GST-MYO. Addition of ATP to FL-FAK markedly increased the amount of Tyr397-phosphorylated FAK, which interacts rather poorly with GST-MYO (Fig. 1b). Consistent with this observation, the ATP-competitive FAK inhibitor PF573228 markedly reduced FAK autophosphorylation *in vitro* and restored the amount of FAK precipitated by GST-MYO to that observed with FL-FAK (Fig. 1c). To test the hypothesis that the association with myosin heavy chain inhibits FAK activity, we performed *in vitro* FAK autophosphorylation assays in the presence of increasing amounts of GST-MYO. FAK autophosphorylation at Tyr397 was reduced in a dose-dependent fashion by the addition of GST-MYO but not GST (Fig. 1d). Thus, the interaction with myosin inhibits FAK activation, whereas, conversely, FAK activation reduces its interaction with myosin. To determine the FAK domains involved in the interaction with myosin, the GST-tagged N-terminal FERM, kinase

and C-terminal domains of FAK were assayed with His-tagged myosin (His-MYO). GST-FERM was the only construct that interacted with His-MYO, indicating that the FAK FERM domain is sufficient for the interaction of FAK with cardiac myosin (Fig. 1e). The identical results produced by control assays performed with His-FERM and GST-MYO confirmed the FERM-myosin interaction (Fig. 1f).

Structural basis of FERM-myosin interaction

To gather information on the binding interface between the FAK FERM domain and the myosin fragment, we made use of CXMS on the FAK FERM-myosin complex. His-FERM and His-MYO were expressed and copurified by affinity and size-exclusion chromatography (Supplementary Results, Supplementary Fig. 1a-c). Disuccinimidyl suberate (DSS)-crosslinked FERM-myosin complexes were identified as shifted bands in SDS-PAGE (Supplementary Fig. 1d). MS/MS analyses of DSS-crosslinked FERM-myosin complexes indicated that the myosin tryptic peptides ¹⁷⁹⁹LDEAEQIALKGGK¹⁸¹¹ and ¹⁸²¹VRELENELEAEQKR¹⁸³⁴ were anchored by residues Lys110 and Lys255 in the sequences ¹⁰⁹EKYELAHPPPEEK¹²¹ and ²⁵⁹FDKECFK²⁵⁹ in the FAK FERM domain, respectively (Supplementary Fig. 1e,f). The topology of the tryptic peptides and Lys110 and Lys255 in the FERM domain are indicated in Supplementary Figure 2a,b. To identify potential modes of FERM-myosin interaction, we analyzed the molecular shapes and electrostatic potentials of an *in silico* complex derived from the crystal structure of the FAK FERM domain (PDB code 2AL6) and from a model of double-stranded myosin derived from the tropomyosin crystal structure (PDB code 2EFR). Docking analyses (GRAMM-X Protein-Protein Docking) were performed with no restrictions on the possible docking modes. The docking search was run twice with the same input structures, recovering 300

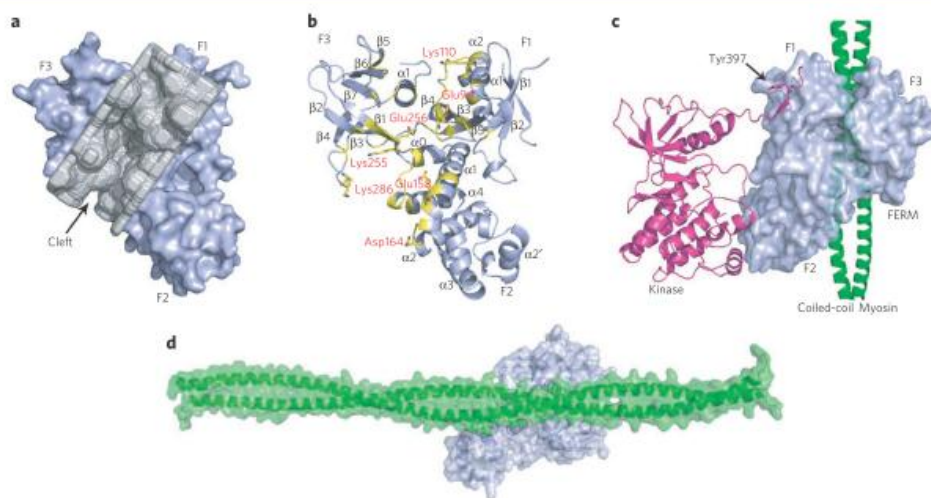


Figure 2 | FAK-myosin interacting surface determined by CXMS and SAXS. (a) Representation of the myosin-binding cleft on the surface of the FERM domain model. (b) The substructure of the FERM myosin-binding cleft, indicated in yellow. The exposed amino acids at the interface predicted by the SHARP² server are represented by sticks. (c) The autoinhibited structure of the FERM (surface; light blue) and kinase (ribbon; magenta) domains docking with the coiled-coil myosin (ribbon; green). The arrow indicates Tyr397 in FAK. (d) Rigid-body model of the complex formed between FERM and the C terminus of sarcomeric myosin, obtained from the SAXS data using the program SASREF.

solutions in each submission. The peptide proximity information provided by the CXMS data was used to filter the best docking solutions (r.m.s. deviation of ~ 0.5 Å over all atoms), and their theoretical scattering profiles were fitted with the SAXS data (described below) (Supplementary Fig. 3a–c). On the basis of the docking models, we mapped the FAK FERM–myosin interacting surface to a cleft of ~ 998 Å² delimited by the three subdomains of the FAK FERM domain (Fig. 2a). This cleft has multiple charged amino acids that are exposed and distributed along its borders (Fig. 2b). A second model (Fig. 2c), based on the crystal structure of the FAK FERM–kinase domain (PDB code 2J0J)¹¹, indicates that the FAK myosin cleft occupies a FERM surface that does not contact the sites previously reported as critical for the intramolecular interactions between the FERM and the kinase domain¹¹, namely, the autoinhibitory interaction between the C-lobe of the kinase domain.

Validation of the FERM–myosin molecular model by SAXS

We used SAXS to experimentally assess the overall size and shape of the FAK FERM–myosin complex and to validate the docking models. We collected and analyzed SAXS data from solutions of the FERM–myosin complex according to previously reported methods²⁷. The SAXS curve for this complex and the distance distribution function $p(r)$ are shown in Supplementary Figure 3a,b. The radius of gyration (R_g) of the complex in solution, calculated from the $p(r)$ function, is 31.7 ± 0.6 Å. This radius agreed with that derived from the Guinier approximation. The maximum dimension provided by the $p(r)$ function was ~ 175 Å. Models of the complex were obtained by rigid body modeling (20 independent runs), and normalized spatial discrepancy (NSD) values ranged from 0.53 to 0.90 (average 0.65). A model of SAXS data is shown in Figure 2d. The fitting of the calculated scattering from the model to the experimental data is also presented in Supplementary Figure 3b. In summary, the fits of the theoretical scattering profiles from the best docking models to the experimental scattering pattern were evaluated and were shown to be in agreement with the experimental SAXS data (the three best models are shown in Supplementary Fig. 3c).

Determining key residues in the FERM–myosin interface

To define the residues that contribute to the interaction of FERM with myosin, we introduced mutations in the FERM cleft and in the corresponding binding sites of myosin. We used our computational modeling studies (Fig. 2d) to identify residues of the FERM domain

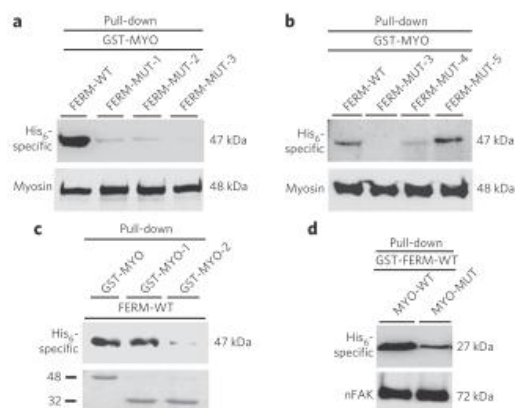


Figure 3 | Mutagenesis of the FERM–myosin complex interface. (a) His₆-specific and myosin-specific immunoblots from pull-down assay of His-FERM-WT, His-FERM-MUT-1, His-FERM-MUT-2 and His-FERM-MUT-3 performed with GST-MYO. (b) His₆- and myosin-specific immunoblots from pull-down assay of His-FERM-WT, His-FERM-MUT-3, His-FERM-MUT-4 and His-FERM-MUT-5 performed with GST-MYO. (c) His₆-specific immunoblot from pull-down assay of His-FERM-WT performed with GST-MYO, GST-MYO-1 and GST-MYO-2. (d) His₆- and FAK-A17-specific immunoblots from pull-down assay of His-MYO-WT and His-MYO-MUT performed with GST-FERM-WT. Data represent six independent experiments. Uncropped blots are shown in Supplementary Figure 13b. nFAK, N-terminal FAK.

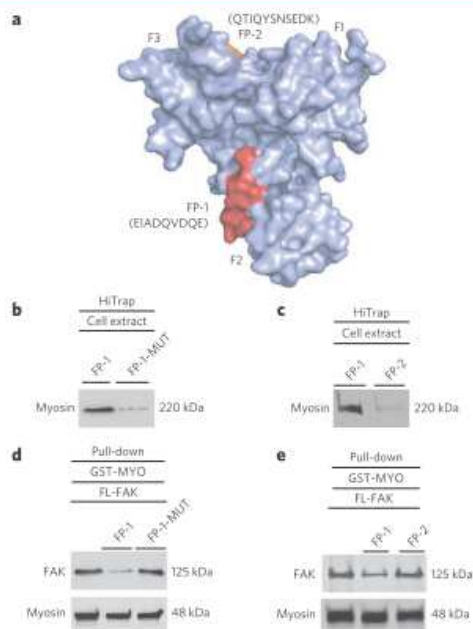


Figure 4 | FP-1 interacts with sarcomeric myosin and negatively regulates the FAK-myosin interaction *in vitro*. (a) Overall structure of the FERM domain (PDB code 2AL6). The FP-1 peptide is labeled in red, and the control FP-2 peptide is labeled in orange. (b,c) Cytosolic extracts from rat left ventricles bound to columns coupled to FP-1, FP-1-MUT or FP-2. The proteins that remained attached were immunoblotted with myosin-specific antibody. (d,e) FP-1, but not FP-1-MUT or FP-2, competes with FL-FAK in pull-down assays performed with the recombinant GST-MYO (1:1 Mol/Mol). Uncropped blots are shown in **Supplementary Figure 13c**.

predicted to interact with myosin helices. For example, the acidic sequence ¹⁵⁸EIADQVDQE¹⁶⁶, evolutionarily conserved in FAK but not in other FERM domain-containing proteins (**Supplementary Fig. 4a,b**), was predicted to form salt-bridge contacts with basic residues in myosin. FERM variants containing mutations in this sequence (FERM-MUT-1: E158A D161A Q162A; FERM-MUT-2: E158A D161A Q162A D164A; FERM-MUT-3: E158A D161A Q162A D164A Q165A E166A) (**Supplementary Fig. 4c**) were generated. These mutations greatly impaired binding of FAK FERM to myosin (**Fig. 3a**). In addition, we generated variants with the mutations E93A E94A (FERM-MUT-4) and K286A (FERM-MUT-5) on the basis of the locations of the residues in the myosin cleft (**Supplementary Fig. 4c**). Interaction between the myosin fragment and FERM-MUT-4 was markedly reduced, but FERM-MUT-5 retained the ability to interact with the myosin fragment (**Fig. 3b**). This is consistent with the observation that the positively charged Lys286 makes only weak interactions with myosin.

To confirm the specificity of myosin interaction sites, we used truncated myosin fragments encompassing residues 1767–1861 (GST-MYO-1) and 1862–1938 (GST-MYO-2). As predicted by the *in silico* model (**Fig. 2d**), the MYO-1 but not the MYO-2 fragment interacted with the FAK FERM domain (**Fig. 3c**). To further test the specificity of the myosin interaction site, we generated the double myosin mutant containing mutations R1843A K1844A (MYO-MUT) on the basis of the prediction that these basic amino acids participate in the interaction with amino acids within FAK residues

158–166 (**Supplementary Fig. 4d**). These mutations impaired the interaction of myosin to FAK FERM relative to the parental myosin fragment (**Fig. 3d**).

FP-1 decoy peptide blocks the FERM-myosin interaction

A rationally designed decoy peptide corresponding to the FAK sequence spanning residues 158–166 of the FERM domain (FP-1, ¹⁵⁸EIADQVDQE¹⁶⁶) was generated and tested for its ability to bind myosin and disrupt the interaction between FAK FERM and myosin. FP-1, an FP-1 mutant (FP-1-MUT; E158A D161A D164A E166A), and an unrelated peptide (FP-2) that mimics a FAK FERM sequence at the $\beta 6$ strand of the F3 subdomain outside the myosin binding cleft (¹⁰⁰QTIQYSNSEDK¹¹⁰ from FAK) (**Fig. 4a**) were synthesized, and each peptide was either covalently coupled to HiTrap *N*-hydroxysuccinimide-activated Sepharose High Performance columns or used directly in pull-down assays. The FP-1 affinity column bound myosin from extracts of adult rat left ventricle, whereas the FP-1-MUT and FP-2 affinity columns did not (**Fig. 4b,c**). Moreover, the FP-1 peptide but neither the FP-1-MUT nor the FP-2 peptides impaired the *in vitro* association between FAK and GST-MYO (**Fig. 4d,e**). To confirm the interactions of FP-1 with myosin using another methodology, we used fluorescence polarization to measure the dissociation constant (K_d) of the parental FP-1 and the myosin fragment. Titration of myosin into a fixed concentration of fluorescein-labeled FP-1 (200 nM) yields a K_d of $6.2 \pm 1 \mu\text{M}$. No interaction was detected between the control peptide FP-1-MUT and the myosin fragment at the concentrations tested (**Supplementary Fig. 4e,f**).

FAK associates with native sarcomeric myosin

To determine whether FAK interacts with endogenous cardiac myosin, the distinct GST-FAK domains were incubated with extracts of neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs). Only GST-FERM pulled down cardiac myosin from NRVM extracts (**Fig. 5a**). This was confirmed by dot-blot assays performed with FAK-domain constructs and purified immunoblotting with FAK- or GST-specific antibodies (**Fig. 5b** and **Supplementary Fig. 5a**). The interaction of the FERM domain with native myosin was further confirmed in extracts of adult rat hearts by histidine pull-down assays performed with His-FERM followed by identification with LC-MS/MS (**Supplementary Fig. 5b**). Consistent with the colocalization of FAK and sarcomeric myosin, confocal immunofluorescence microscopy imaging of nonstretched NRVMs revealed a clear overlap between the striated pattern of myosin and FAK staining (**Fig. 5c**).

To test whether FAK interacts with myosin *in vivo*, we generated FAK expression constructs; one harboring myc-tagged wild-type FAK (myc-FAK) and a triple-mutant version (myc-FAK-MUT-1) in which the FERM cleft was mutated as in the FERM-MUT-1 construct (E158A D161A Q162A). Data confirming the expression of these constructs in cardiomyocytes are shown in **Figure 5d**. Lysates of transfected cardiomyocytes were immunoprecipitated with antibody targeted to the myc tag, whereas myosin was detected by western blotting. Myc-specific antibody precipitates of myc-FAK-MUT-1 transfected cardiomyocytes contained markedly less myosin than those of myc-FAK transfected cardiomyocytes, supporting the notion that the FERM myosin cleft has a crucial role in the *in vivo* interaction between FAK and sarcomeric myosin (**Fig. 5e**). In addition, NRVMs overexpressing myc-FAK-MUT-1 showed enhanced amounts of Tyr397-phosphorylated FAK in myc immunoprecipitates (**Fig. 5e**), an observation consistent with the notion that disruption of the FAK-myosin interaction increases FAK activity. To further test the hypothesis that the interaction with sarcomeric myosin has a role in maintaining FAK's inactivity *in vivo*, we depleted cardiomyocyte sarcomeric myosin using an RNA interference (RNAi) approach (**Supplementary Fig. 6a,b**). Notably, the



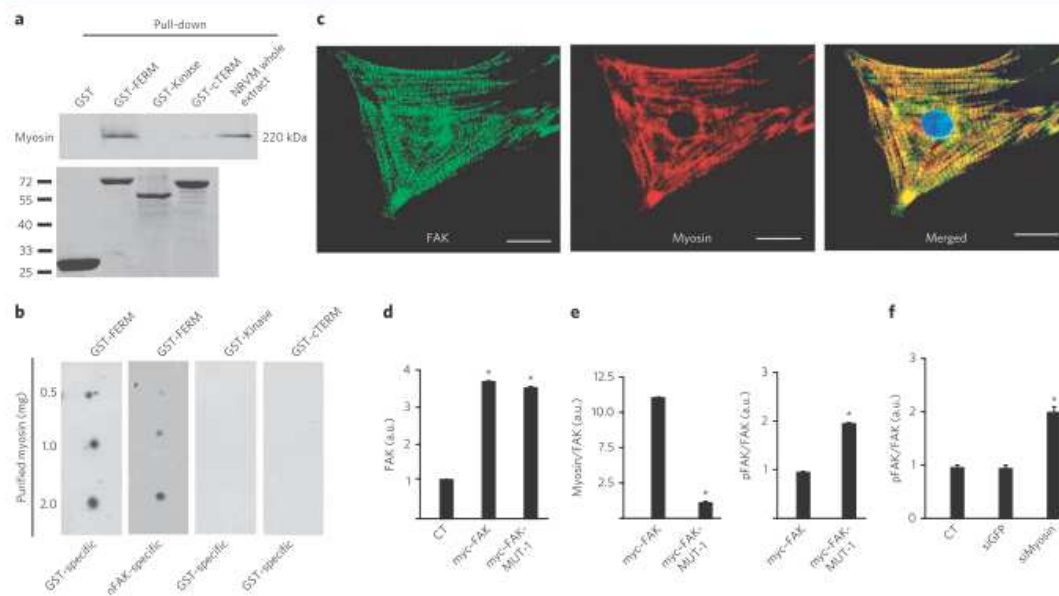


Figure 5 | FAK interacts with native myosin in cardiomyocytes. (a) Myosin-specific immunoblot of proteins precipitated from nonstretched NRVMs in pull-down assays (upper panel) performed with the FAK constructions (GST-FAERM, GST-Kinase or GST-cTERM) and GST alone as control (lower panel). (b) Dot blots of purified myosin were incubated with recombinant FAK fragments and immunoblotted as indicated. (c) Confocal analyses of nonstretched NRVMs double stained with FAK-specific (green) and myosin-specific (red) antibodies. Scale bars, 10 μm . (d) Bar graph showing the densitometric readings of FAK-specific immunoblots of extracts from NRVMs nontransfected (CT) or transfected with wild-type myc-FAK or myc-FAK-MUT-1. * $P < 0.0001$ versus control NRVMs (CT). (e) Graphical representation of myosin-specific (left) and pY397-FAK-specific (right) immunoblots of myc-specific immunoprecipitates of extracts from NRVMs transfected with myc-FAK or myc-FAK-MUT-1. The densitometry readings of the immunoblots were normalized to FAK values. * $P < 0.0001$ versus NRVMs transfected with myc-FAK. (f) Bar graph shows the densitometric readings of pY397-FAK-specific immunoblots normalized to FAK of extracts from nonstretched NRVMs treated with RNAi against the indicated targets. * $P < 0.0001$ versus siGFP. Data represent mean \pm s.e.m. of six independent experiments. Representative blots are shown in **Supplementary Figure 5c-f**, and uncropped blots are shown in **Supplementary Figure 13d**. a.u., arbitrary units.

amount of phosphorylated FAK was increased, whereas the amount of FAK expressed remained unchanged in cardiomyocytes depleted of sarcomeric myosin (Fig. 5f).

Cyclic stretch reduces FAK-myosin association *in vivo*

On the basis of the results of the *in vitro* and *in vivo* assays, we reasoned that the interaction of FAK with sarcomeric myosin was likely to be physiologically relevant to the regulation of FAK in the context of mechanical stress in cardiomyocytes. To begin exploring this issue, we examined whether FAK association to sarcomeric myosin is regulated by mechanical stress in spontaneously beating (40–50 beats min^{-1}) NRVMs subjected to rapid (10 min) and sustained (up to 60 min) cyclic stretch (up to 110%, 1 Hz). FAK phosphorylation at Tyr397 was increased roughly in parallel with the duration of the stimulus, but no change was observed in the expression of FAK protein (Fig. 6a). Coimmunoprecipitation assays with FAK- and myosin-specific antibodies indicated that the amount of endogenous myosin recovered from the FAK-specific immune complex was reduced in stretched cardiomyocytes (Fig. 6a), supporting the notion that mechanical stimuli regulate FAK-myosin interaction and FAK activation in cardiomyocytes.

Integrins have been implicated as upstream regulators of FAK activity in mechanically stimulated cells^{1,2}. Therefore, we next sought to evaluate whether FAK activation and the concurrent reduction in its association with myosin in stretched cells are related to integrin

signaling. Neither the integrin peptide blocker RGD nor the inactive peptide RGE altered the activation or the reduction of FAK association with sarcomeric myosin in response to cyclic stretch (Fig. 6b). These data indicate that signaling by integrins is not involved in the dissociation of FAK from myosin in mechanically stimulated cardiomyocytes in culture.

FAK is also a major player in mediating cardiomyocyte hypertrophic signaling initiated by activated G protein-coupled receptors such as the α_1 -adrenergic receptor^{23,24}. Thus, we next examined whether FAK phosphorylation induced by phenylephrine would affect the association between FAK and myosin in cultured cardiomyocytes. Treatment of cardiomyocytes with phenylephrine (10 μM) induced FAK phosphorylation at Tyr397 but did not change the amount of FAK associated with myosin (Supplementary Fig. 7a,b). This indicates that phenylephrine activates a FAK pool that is both distinct from the pool activated by cell stretch and linked to sarcomeric myosin.

FP-1 decoy peptide activates FAK in cardiomyocytes

Considering FP-1's *in vitro* effect on the interaction of FAK with myosin, we predicted that it would disrupt the intermolecular interaction between FAK and myosin and, consequently, activate FAK in cardiomyocytes. To test this hypothesis, we conjugated FP-1, FP-1-MUT and the control FP-2 peptide to a TAT₁₂₋₅₇ (³⁵YGRKKRRQRRR³⁷) carrier peptide through a dissociable disulfide bond. Conjugation

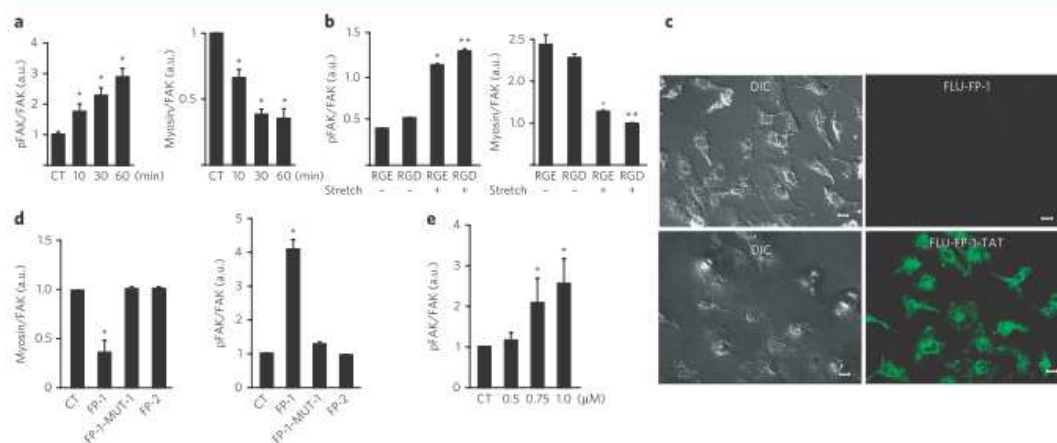


Figure 6 | Stretch or treatment with FP-1-TAT inhibits FAK-myosin interaction and induces FAK phosphorylation in NRVMs. (a) Bar graphs showing the densitometric readings of pY397-FAK-specific immunoblots (left) and the densitometric readings of myosin-specific immunoblots of FAK-specific immunoprecipitates (right) from nonstretched or stretched (10–60 min) NRVM extracts. * $P < 0.0001$ versus nonstretched NRVMs (Control). **(b)** Bar graphs show the densitometric readings of pY397-FAK-specific immunoblots (left) and myosin-specific immunoblots of FAK-specific immunoprecipitates (right) of extracts from nonstretched or stretched (60 min) NRVMs treated with RGE (10 μ M) or RGD (10 μ M). * $P < 0.001$ versus nonstretched NRVMs treated with RGE. ** $P < 0.001$ versus nonstretched NRVMs treated with RGD. **(c)** Images representing differential interference contrast and fluorescence microscopy of NRVMs treated with 5- and 6-carboxyfluorescein-FP-1 (FLU-FP-1) and 5- and 6-carboxyfluorescein-FP-1-TAT (FLU-FP-1-TAT). Scale bars, 10 μ m. **(d)** Bar graphs showing the densitometric readings of myosin-specific immunoblots of FAK-specific immunoprecipitates (left) and the densitometric readings of pY397-FAK-specific immunoblots (right) of extracts from control NRVMs (CT) or NRVMs treated with FP-1-TAT (1 μ M), FP-1-MUT-TAT (1 μ M) or FP-2-TAT (1 μ M) peptides for 2 h. * $P < 0.001$ versus control NRVMs (CT). **(e)** Bar graph showing the densitometric readings of pY397-FAK-specific immunoblots of control NRVMs (CT) or those treated with increasing concentrations of FP-1-TAT (0.5 μ M, 0.75 μ M and 1.0 μ M). * $P < 0.001$ versus control NRVMs (CT). The densitometry readings of the immunoblots were normalized to FAK. Data represent mean \pm s.e.m. of six independent experiments. Representative blots are in **Supplementary Figure 9**, and uncropped blots are in **Supplementary Figure 13e**.

to TAT_{47–57} enables the intracellular delivery of the peptide across biological membranes, and the subsequent hydrolysis of the disulfide bond upon exposure to the reducing intracellular milieu allows peptide sequestration within the cytoplasm^{26,29}. The uptake of FP-1-TAT by cultured cardiomyocytes was detected by imaging analysis of NRVMs treated with fluorescein-labeled peptide (FLU-FP-1-TAT or FLU-FP-1). Cardiomyocytes treated with FLU-FP-1-TAT were diffusely labeled, but those treated with FLU-FP-1 were not (**Fig. 6c**). TAT-mediated peptide uptake was further confirmed by MS/MS analyses in the extracts of NRVMs (**Supplementary Fig. 8**).

The association between FAK and myosin was substantially reduced, whereas the amount of Tyr397-phosphorylated FAK was enhanced in cardiomyocytes treated with FP-1-TAT but not those treated with FP-1-MUT-TAT or FP-2-TAT (**Fig. 6d**). This phosphorylation occurs in a dose-dependent manner in NRVMs (**Fig. 6e**). These effects occurred at concentrations similar to those of other biologically active peptides that inhibit protein-protein interactions²⁹.

Because interactions of the FAK FERM domain with integrins and growth factor receptors can also regulate FAK activity in cells³¹, we next examined whether such interactions would likewise be affected by treatment with FP-1-TAT. To do so, we examined the association of FAK with β -integrin and the growth factor receptors EGFR and c-Met in cardiomyocytes treated with FP-1-TAT or FP1-MUT-TAT. Notably, we confirmed that treatment of cardiomyocytes with FP-1-TAT or FP-1-MUT-TAT has no effect on the association of FAK with β -integrin, EGFR or c-Met receptors relative to controls (**Supplementary Fig. 10**). This observation indicates that the FAK-activating effect of FP-1-TAT treatment does not involve FAK signaling mediated by integrins or growth factor receptors.

FP-1 decoy peptide induces hypertrophy via mTOR pathway

Next, we investigated whether activation of FAK by FP-1-TAT might result in cardiomyocyte hypertrophy. Treatment with FP-1-TAT for 12 and 24 h increased cell-surface area (~1.5- and 2-fold, respectively) and enhanced the transcript level of the hypertrophic marker atrial natriuretic peptide (ANP) in NRVMs (**Fig. 7a** and **Supplementary Fig. 11a**). The depletion of FAK by siRNA provided additional evidence for the role of FAK in hypertrophy driven by FP-1-TAT. Cells transfected with siRNA targeted to FAK markedly reduced FAK transcript level and the amount of protein compared with cells treated with siRNA targeted to GFP (**Fig. 7b**). FAK depletion by siRNA abolished the increase in cell size induced by FP-1-TAT (**Fig. 7c** and **Supplementary Fig. 11b**), indicating that this effect is dependent on FAK-mediated signaling. To validate these results, we then tested whether the enhanced FAK signaling would be sufficient to induce the hypertrophic growth of cardiomyocytes. This test involved the overexpression of a myc-tagged FAK construct in cardiomyocytes and the monitoring of cell growth and expression of ANP. Accordingly, overexpression of FAK increased the total amount of phosphorylated FAK, induced hypertrophic growth and enhanced the expression of ANP in cardiomyocytes (**Fig. 7d** and **Supplementary Fig. 11c**).

Signaling via the AKT and mTOR pathways has been previously shown to be involved in FAK-induced hypertrophy⁹. As FP-1-TAT drives FAK-mediated hypertrophy, we investigated whether treatment with this peptide might result in activation of the AKT and mTOR pathways. Treatment of NRVMs with FP-1-TAT stimulated the phosphorylation of AKT at Ser473, TSC2 (the upstream regulator of mTOR) at Thr1462, and S6K (the downstream effector of mTOR) at Thr389 as well as hypertrophy (**Fig. 7c**). To assess the importance of mTOR upregulation in FP-1-TAT-induced hypertrophy, we treated

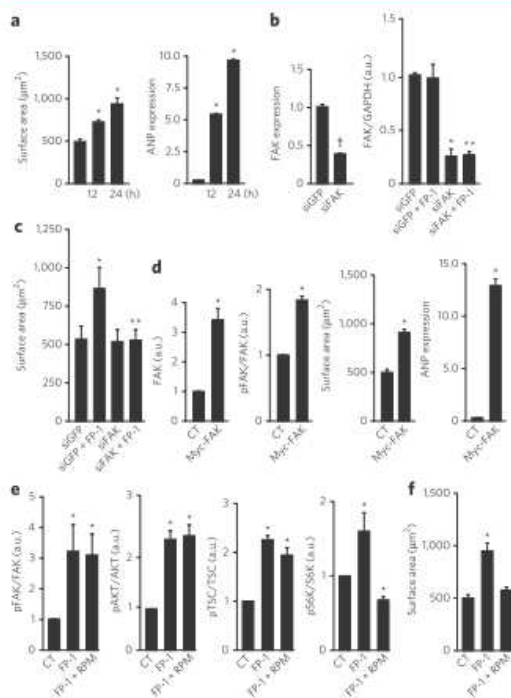


Figure 7 | Activation of FAK by treatment with FP-1-TAT induces hypertrophy in NRVMs via the AKT-mTOR signaling pathway.

(a) Bar graphs represent the surface area (left) and the amount of ANP expression (right) of cells treated with FP-1-TAT peptide (1 µM; 12 and 24 h). * $P < 0.001$ versus CT. (b) Bar graphs representing the quantitative analyses of FAK gene expression in nonstretched NRVMs treated with RNAi against GFP or FAK (left) and the densitometric readings of FAK-specific immunoblots of extracts from nonstretched NRVMs treated with RNAi against the indicated targets and FP-1-TAT (right). * $P < 0.001$ versus siRNA for GFP; ** $P < 0.001$ versus siGFP + FP-1. (c) Bar graph representing the surface area of cells transfected with siRNA against GFP or FAK and/or treated with FP-1-TAT peptide. * $P < 0.0001$ versus siGFP; ** $P < 0.0001$ versus siGFP + FP-1. (d) From left to right, bar graphs show the densitometric readings of FAK-specific immunoblots; * $P = 0.0066$ versus CT, pY397-FAK-specific immunoblots normalized to FAK; * $P = 0.0191$ versus CT, the surface area and the amount of ANP expression of control and transfected NRVMs with Myc-FAK; * $P = 0.00008$ versus CT. (e) Bar graphs show the densitometric readings of pY397-FAK-specific immunoblots normalized to FAK, pAKT-specific (Ser473) normalized to AKT, pTSC-specific (Thr1462) normalized to TSC and pS6K-specific (Thr389) normalized to S6K of extracts from control NRVMs (CT) or treated with FP-1-TAT or FP-1-TAT and rapamycin (RPM). * $P < 0.0001$ versus CT. (f) Treatment with RPM abolished NRVM hypertrophy induced by prolonged treatment with FP-1-TAT; * $P < 0.05$ versus CT. Data represent mean \pm s.e.m. of six independent experiments. Representative blots are shown in **Supplementary Figure 12**, and uncropped blots are shown in **Supplementary Figure 13f**.

NRVMs with the mTOR inhibitor rapamycin. Rapamycin did not affect the phosphorylation of FAK at Tyr397, AKT at Ser473 or TSC at Thr1462, but it reduced the amount of Thr389 phosphorylation in S6K (Fig. 7e) and abolished FP-1-TAT-induced hypertrophy (Fig. 7f and **Supplementary Fig. 11d**), confirming the role of the downstream mTOR pathway in cardiomyocyte hypertrophy induced by FAK activation in response to FP-1-TAT treatment.

DISCUSSION

The FAK FERM domain has a central role in determining FAK function and cellular localization¹². The present study provides evidence for a previously uncharacterized interaction of the FAK FERM domain with the C-terminal region of sarcomeric myosin. This interaction maintains FAK within the sarcomere and prevents its activation. A combination of CXMS, SAXS and computational docking revealed a binding site for myosin on a wide cleft that sits beneath the three FERM subdomains of FAK. The role of this FERM-myosin cleft in the interaction of FAK with myosin was validated through two distinct, but complementary, approaches. First, we systematically mutated FERM residues at the myosin cleft and myosin fragment. Second, we combined mutation data with structural modeling to design a decoy peptide corresponding to the FP-1 sequence of the FERM F2 subdomain. Consistent with structural and biochemical predictions, this decoy peptide competed with FAK for myosin binding *in vitro*. Furthermore, FP-1 markedly reduced the association between FAK and sarcomeric myosin when it was delivered into cardiomyocytes. FP-1 peptide did not interfere with the association of FAK with β -integrin, EGFR or c-Met, which also regulate FAK activity through interactions with the FERM domain, supporting the specificity of this decoy peptide. Importantly, treatment with the FP-1-TAT peptide was sufficient to drive FAK activation and FAK-dependent hypertrophy, supporting the physiological relevance of the interaction of FAK with sarcomeric myosin for the control of FAK activity and function in cardiomyocytes.

FERM binding to the catalytic domain causes FAK to adopt an autoinhibitory conformation¹¹. Moreover, FAK FERM mediates protein-protein interactions that are necessary for FAK function¹². The FERM-myosin-binding cleft reported in this study is a new and apparently unique interaction site among the FERM domains with known structure. For instance, there are substantial differences in both structure and amino acid composition within the corresponding region of the canonical FERM domain of ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins. These differences may support specific partnering and function of the FERM domains of FAK and ERM proteins. Notably, differences in the region between the F1 and F3 subdomains of the myosin cleft seem to be critical for ERM, but not for FAK FERM, to bind regulatory phosphoinositol phosphates¹⁰. Here we demonstrated that mutation of Glu93 and Glu94 in the loop between the β 3 and β 4 strand of F1 subdomain, which is unique to FAK, is critical for the interaction of FAK FERM with myosin. Moreover, the FP-1 sequence, which is also critical for the interaction of FAK with myosin, is not conserved in ERM FERM.

The model that emerges from this study supports the notion that the interaction of FAK FERM with sarcomeric myosin has an important role in the regulation of FAK in cardiomyocytes. Accordingly, sarcomeric myosin depletion by RNAi enhanced basal FAK activity in cardiomyocytes. Similarly, mutational and peptide-based inhibitory strategies designed to selectively disrupt FAK-myosin interaction resulted in enhanced FAK activity *in vivo*. Consistent with its low activity in resting conditions, FAK is mostly associated with myosin at sarcomeric A bands in nonstretched cardiomyocytes^{8,26}. Moreover, experiments performed with recombinant proteins independently confirm the negative regulation of FAK by myosin. The interaction with myosin markedly reduced the ability of FAK to be activated via Tyr397 phosphorylation. Conversely, the preferential binding of myosin to nonphosphorylated FAK suggests that the conformational changes accompanying FAK activation may somehow impair its proper binding to myosin. In this context, it is notable that myosin binding to the FAK FERM domain does not directly involve intramolecular interactions between the FERM and catalytic domains, suggesting that downregulation of FAK by myosin presumably stabilizes the FERM-kinase linker in a way that prevents autophosphorylation of Tyr397. However, the present data does not



exclude the possibility that in cells, the interaction with myosin downregulates FAK by preventing the binding of an activator.

Previous studies reported FAK regulation by integrin as well as by membrane receptors in a number of contexts^{1,4}. However, rather little is known about FAK regulation by these mechanisms in cardiomyocytes, although there have been some situations in which FAK activation correlates with activation of integrins, growth factors or G protein-coupled receptors^{22–24,31}. Here we provide evidence that FAK regulation by myosin is independent of signaling mediated by integrin and membrane receptors such as EGFR, c-Met or the α 1-adrenergic receptor. In fact, the FP-1 peptide, which inhibits the interaction between FAK and myosin, does not influence the association between FAK and integrin or growth factor receptors such as EGFR or c-Met. Blockade of integrin activation with RGD affects neither FAK activity nor its dissociation from myosin in response to mechanical stimuli. Moreover, activation of the α 1-adrenergic receptor, which cooperates with integrin to activate FAK, does not interfere with FAK association with myosin. Thus, our results, together with those of others, support a model in which FAK dissociation from myosin, subsequent to mechanical stimulation, may set in motion its catalytic activation, followed by its relocation and accumulation at Z-discs and costameres.

Disruption of the FAK-myosin interaction by the FP-1 peptide induced cardiomyocyte hypertrophy through FAK signaling and was suppressed by the simultaneous depletion of FAK by RNAi. This effect of FP-1 is reminiscent of the hypertrophy induced by FAK overexpression, supporting the inference that FAK quiescence sustained by the FAK-myosin interaction negatively regulates pathways involved in cell-size control and that signaling mediated by active FAK is sufficient to induce the hypertrophic growth of cardiomyocytes. In this regard, we show that FAK, AKT and mTOR work together to stimulate the hypertrophic growth of cardiomyocytes after treatment with FP-1. Indeed, pretreatment with the mTOR inhibitor rapamycin markedly attenuates the hypertrophic response of cardiomyocytes to FP-1. These data substantiate the previous demonstration that the mTOR-S6K pathway mediates the prohypertrophic effects of FAK in cardiomyocytes³⁰.

In summary, the results of the present study shed light on the interaction of FAK with sarcomeric myosin and indicate that this interaction is critically involved in the regulation of basal FAK activity in cardiomyocytes. The FERM-myosin interaction may provide a structural basis for the well-known involvement of FAK in the transduction of mechanical stimuli in cardiomyocytes, with implications in the context of cardiac hypertrophy.

METHODS

Protein cloning and purification. The pGEX2T constructs encoding GST-FERM (~76 kDa), GST-Kinase (~55 kDa) and GST-FAK C terminus (GST-cTERM; ~72 kDa) fusion proteins have been described previously³². The GST-MYO construct (~48 kDa) encoding the C-terminal region of the α -myosin heavy chain cloned in pGEX5x2 (Amersham Pharmacia Biotech) has been previously reported³³. The FERM domain of FAK was subcloned into the pQTEV vector (Entelechon) in the BamHI site (His-FERM, residues 35–410, ~47 kDa). The C-terminal region of myosin heavy chain was subcloned into the pQTEV vector between the BamHI and HindIII sites (His-MYO; ~24 kDa). Fragments 1 and 2 (GST-MYO-1, ~32 kDa and GST-MYO-2, ~31 kDa) of the C-terminal region of myosin heavy chain were subcloned into the pET28a-GST vector between the BamHI and HindIII sites. The constructions were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography (HisTrap HP 5 ml, GE Healthcare) and by size exclusion chromatography (HiLoad 26/60 Superdex 200 pg, GE Healthcare). The primers used for cloning are listed in **Supplementary Table 1**. The FERM domain and C-terminal region of myosin heavy chain mutants were expressed and purified as described above for wild-type constructs.

Site-directed mutagenesis. Mutations in the FAK FERM domain and myosin fragment were introduced by using the Stratagene QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit in combination with the mutagenic primers listed in **Supplementary Table 1**. DNA from the plasmids pRc/CMV-FAKwt³ and MYO-pQTEV were used as templates. Mutations were confirmed by DNA sequencing. The mutants of FAK FERM domain were subcloned into the pET28a vector by PCR amplification with the primers FERM_S and FERM_AS (**Supplementary Table 1**).

CXMS. Cross-linking reactions were performed as previously described³⁵. Briefly, the copurified complex FERM-myosin was incubated in phosphate buffer 50 mM pH 7.5 with DSS (disuccinimidyl suberate, also known as suberic acid bis; Sigma-Aldrich) in a 1:150 ratio for 2 h, followed by quenching with Tris buffer pH 7.6 and trypsin digestion for 3 h. LC-MS/MS analyses were performed using a Synapt mass spectrometer (Waters Co.).

Molecular modeling and docking. The structure of the FAK FERM domain of *Gallus gallus* (PDB code 2AL6) was used as a template for the molecular modeling of the *Mus musculus* FERM FAK domain using Modeller (<http://salilab.org/modeller/>). The C terminus of myosin was modeled on the basis of the crystal structure of the C terminus of tropomyosin (PDB code 2EFR) with Modeller. Molecular docking was conducted using the GRAMM-X web server³⁶. To select the most appropriate solution from the resulting conformations, a discrimination procedure based on the CXMS data was applied, and the best solution was tested against the SAXS data using the program CRYSOLO³⁷.

SAXS analyses and model building. SAXS experiments were performed at the D02A-SAXS2 beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS) in Campinas, Brazil. Data treatment and analyses followed standard procedures³⁸ (additional details are available in **Supplementary Methods**). The models of the FERM-myosin complex were restored from the SAXS intensity curve using the rigid-body modeling approach implemented in the program SASREF³⁹. We would like to stress the point that no unique solution can be obtained from the rigid-body calculations, but the cross-linking data provided contacts that helped us to refine the models. To test the reliability and stability of the calculations, ten independent calculations were run and the multiple solutions were analyzed. A pairwise comparison and the NSD evaluation were performed using the DAMAVER program suite⁴⁰ complemented by the SUPCOMB⁴¹ routine. Analyzing the NSD values (which describe the dissimilarity between pairs of models of the several calculations), the models with common features (lowest NSD value) were selected as a representative model for the complex between the FERM domain and the myosin C terminus.

NRVMs treatment. To determine the role of the integrin pathway in the regulation of FAK in cardiomyocytes, cultured cells were incubated in serum-free medium. Subsequently, they were treated with 10 μ M RGD or RGE peptides (purity >95%, GRGESP from Proteimax Biotechnology Ltda.) and stretched for 1 h. To test whether FAK phosphorylation induced by phenylephrine affects FAK-myosin association, the NRVMs were treated with 10 μ M of phenylephrine (purity >98%, Sigma-Aldrich). To test whether FAK can interact with myosin in NRVMs, cells were transfected with 2 μ g of myc-tagged wild-type FAK (pRc/CMV-FAK)³ or with the FP-1 mutant of FAK (pRc/CMV-FAK, E158A/D161A/Q162A) for 48 h using lipofectamine 2000 (Invitrogen). The effects of peptides FP-1, FP-1-MUT or FP-2 on the regulation of FAK in cardiomyocytes were tested in serum-starved cells treated with 1 μ M of peptide-TAT_{1–27} conjugate (**Supplementary Fig. 14**). The uptake of FP-1 by cultured cardiomyocytes was detected by imaging analyses of NRVM treated with fluorescein-labeled FP-1-TAT (FLU-FP-1-TAT). The role of the mTOR pathway in NRVMs morphology was tested by treating the cells (in serum-free medium) with the mTOR inhibitor rapamycin (20 nM for 24 h, purity >95%; Sigma-Aldrich).

Statistical analyses. ANOVA and Bonferroni's *post hoc* comparison were used to compare the actual densitometric data of immunoblottings and the cardiomyocyte surface area in the respective experimental groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data are presented as mean \pm s.e.m. for the indicated number of experiments. To facilitate presentation of immunoblotting data, we normalized the densitometric values, defining the mean for the control group as 1. Fluorescence anisotropy data were fitted using SigmaPlot 2006 Software (version 10.0, Jandel Scientific Co.), and statistical analyses of these data used ANOVA and the Student's *t* test. $P < 0.001$ was considered statistically significant, and the data was presented as mean \pm s.e.m.

Accession codes. Protein Data Bank: The previously published crystal structures of tropomyosin, the FAK FERM kinase domain and the FERM domain are deposited under accession codes 2EFR, 2J0J and 2AL6, respectively.

Received 12 July 2011; accepted 15 September 2011;
published online 20 November 2011

References

- Mitra, S.K., Hanson, D.A. & Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 56–68 (2005).
- Schaller, M.D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J. Cell Sci.* **123**, 1007–1013 (2010).
- Golubovskaya, V.M., Kweh, F.A. & Cance, W.G. Focal adhesion kinase and cancer. *Histol. Histopathol.* **24**, 503–510 (2009).
- Peng, X. *et al.* Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 6638–6643 (2008).

5. Clemente, C.F. *et al.* Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ. Res.* **101**, 1339–1348 (2007).
6. Luo, M. & Guan, J.L. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett.* **289**, 127–139 (2010).
7. DiMichele, L.A. *et al.* Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ. Res.* **99**, 636–645 (2006).
8. Torsoni, A.S., Constancio, S.S., Nadruz, W. Jr., Hanks, S.K. & Franchini, K.G. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **93**, 140–147 (2003).
9. Dunty, J.M. & Schaller, M.D. The N termini of focal adhesion kinase family members regulate substrate phosphorylation, localization, and cell morphology. *J. Biol. Chem.* **277**, 45644–45654 (2002).
10. Ceccarelli, D.F., Song, H.K., Poy, F., Schaller, M.D. & Eck, M.J. Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **281**, 252–259 (2006).
11. Lietha, D. *et al.* Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* **129**, 1177–1187 (2007).
12. Frame, M.C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D. & Eck, M.J. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 802–814 (2010).
13. Abbl, S. *et al.* Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3178–3191 (2002).
14. Parsons, J.T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* **116**, 1409–1416 (2003).
15. Schaller, M.D. *et al.* Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1680–1688 (1994).
16. Xing, Z. *et al.* Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol. Biol. Cell* **5**, 413–421 (1994).
17. Calalb, M.B., Polte, T.R. & Hanks, S.K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell Biol.* **15**, 954–963 (1995).
18. Kadare, G. *et al.* PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 47434–47440 (2003).
19. Medley, Q.G. *et al.* Signaling between focal adhesion kinase and trio. *J. Biol. Chem.* **278**, 13265–13270 (2003).
20. Chen, S.Y. & Chen, H.C. Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Mol. Cell Biol.* **26**, 5155–5167 (2006).
21. Serrels, B. *et al.* Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1046–1056 (2007).
22. Pham, C.G. *et al.* *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H2916–H2926 (2000).
23. Taylor, J.M., Rovin, J.D. & Parsons, J.T. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 19250–19257 (2000).
24. Eble, D.M. *et al.* Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H1695–H1707 (2000).
25. Samarel, A.M. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H2291–H2301 (2005).
26. Fonseca, P.M. *et al.* Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **96**, 73–81 (2005).
27. Koch, M.H., Vachette, P. & Svergun, D.I. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q. Rev. Biophys.* **36**, 147–227 (2003).
28. Inagaki, K., Hahn, H.S., Dorn, G.W. II. & Mochly-Rosen, D. Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. *Circulation* **108**, 869–875 (2003).
29. Chen, L. *et al.* Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11114–11119 (2001).
30. Marin, T.M. *et al.* Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ. Res.* **103**, 813–824 (2008).
31. Laser, M. *et al.* Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **275**, 35624–35630 (2000).
32. Schaller, M.D., Otey, C.A., Hildebrand, J.D. & Parsons, J.T. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.* **130**, 1181–1187 (1995).
33. Iglesias, A.H., Santos, L.E. & Gozzo, E.C. Identification of cross-linked peptides by high-resolution precursor ion scan. *Anal. Chem.* **82**, 909–916 (2010).
34. Tovchigrechko, A. & Vakser, I.A. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* **34**, W310–W314 (2006).
35. Svergun, D.I., Barberato, C. & Koch, M.H.J. CRYSOLO—a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecule from atomic coordinate. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768–773 (1995).
36. Lanza, D.C. *et al.* Human FEZ1 has characteristics of a natively unfolded protein and dimerizes in solution. *Proteins* **74**, 104–121 (2009).
37. Petoukhov, M.V. & Svergun, D.I. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* **89**, 1237–1250 (2005).
38. Volkov, V.V. & Svergun, D.I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 860–864 (2003).
39. Kozin, P.V. & Svergun, D.I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr.* **34**, 33–41 (2001).

Acknowledgments

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Grants 2006/54878-3, 2007/55930-1, 2007/59442-1, 2008/53519-5, 2008/57805-2, 2010/02628-9) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq; Grants 304366/2009-9, 475158/2010-5, 573672/2008-3, 559698/2009-7).

Author contributions

A.M.S., D.S. and K.G.F. conceived the research and designed experiments. A.M.S., D.S., A.C.C., M.B.M.P. and T.M.M. conducted experiments. A.M.S. and C.F.M.Z.C. designed and performed mutational experiments. A.M.S. and A.C.M.F. performed affinity experiments. A.M.S., J.C.S. and L.L.T. performed and analyzed SAXS experiments. A.M.S., M.F. and E.C.G. performed crosslinking and MS experiments and analysis. A.M.S., P.S.L.O. and S.H.P.O. performed molecular modeling and docking. A.M.S., D.S., J.X.N. and K.G.F. wrote the paper.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Supplementary information is available online at <http://www.nature.com/naturechemicalbiology/>. Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.G.F.