CAROLINA FERNANDA MANFREDI ZAMBON CLEMENTE

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Carolina Fernanda M.Z. Clemente.**
Campinas, 7 de agosto de 2003.

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

Importância da quinase de adesão focal na diferenciação miogênica de mioblastos C2C12

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

2004028974

CAMPINAS

2003

CAROLINA FERNANDA MANFREDI ZAMBON CLEMENTE

Importância da quinase de adesão focal na diferenciação miogênica de mioblastos C2C12

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Genética Médica.

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

CAMPINAS

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE FC
UNICAMP
C591i
TOMBO BC 57018
PROC. 16-P-127/04
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 27/02/04

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

CM00193826-4
BIB ID 310650

C59i
C591i

Clemente, Carolina Fernanda Manfredi Zambon
Importância da quinase de adesão focal na diferenciação miogênica de mioblastos C2C12 / Carolina Fernanda Manfredi Zambon Clemente. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

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

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

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

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

Membros:

1. Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

2. Prof. Dr. José Barreto Campello Cavalheira

3. Profa. Dra. Christine Hackel

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07/08/03

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

À minha família.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ao Dr. Kleber Gomes Franchini, pela oportunidade de trabalhar com sua equipe, por sua grande dedicação e apoio, pelo grande amadurecimento profissional que me proporcionou e por me ensinar a viver a pesquisa científica.

À Profa. Dra. Christine Hackel, por sua compreensão e apoio durante um momento crítico do meu mestrado.

À Cláudia Furlan Hudorovic, secretária da subcomissão de pós graduação do departamento de Genética Médica/FCM, pela orientação para a defesa de tese.

À Tereza Sales, pela ajuda inicial com a cultura de células C2C12 e sua paciência.

Aos amigos Adriana Torsoni, Cláudia Cantareli, Cláudia Kobarg, Luciano Nogueira, Márcia Story, Marcus Corat, Sábata Constâncio, Valquer Lagosta e Wilson Nadruz Jr., que, da sua maneira, me ajudaram durante a realização do meu projeto e mostraram-se verdadeiros amigos.

Aos professores Mário José Abdala Saad (Laboratório de Biologia Molecular-FCM) e Sara Ollala Saad (Hemocentro) por disponibilizarem reagentes ou equipamentos para o desenvolvimento de algumas etapas do meu projeto.

"A imaginação é mais importante que o conhecimento".

Albert Einstein.

Pág.

RESUMO ..... *xvi*

ABSTRACT ..... *xviii*

1.INTRODUÇÃO 20

1.1- Fatores de regulação miogênica (MRFs): relação hierárquica, sobreposição de funções, ativação e miogênese 21

1.2- Fatores adicionais na miogênese: a função da família MEF2 26

1.3- Outros mecanismos que regulam a atividade dos MRFs 28

1.3.1- Fosforilação do domínio básico 28

1.3.2- As proteínas Id 29

1.3.3- Modificações pós-tradução ou associação a outras proteínas reguladoras 29

1.4- Controle do ciclo celular e diferenciação miogênica 31

1.5- Hormônios e fatores de crescimento na diferenciação miogênica 33

1.6- Linhagem celular C2C12 36

1.7- Papel da matriz extracelular no processo de diferenciação: integrinas 38

1.8- Objetivos 47

2- METODOLOGIA 48

2.1- Cultura de células 49

2.2- Ensaio de diferenciação celular 49

2.3- Transfecção a construção MT-FAK 49

2.3.1- Vetor de expressão da Quinase de Adesão Focal (FAK)..... 49

2.3.2- Transfecção das células C2C12..... 50

2.4- Extrato total de proteínas..... 51

2.5- Coimunoprecipitação..... 52

2.6- Determinação de proteínas pelo método de Lowry..... 53

2.7- Western blotting..... 53

2.7.1- Quantificação e normalização..... 54

2.8- RT-PCR..... 54

2.8.1- Extração de RNA..... 55

2.8.2- Avaliação da integridade do RNA..... 55

2.8.3- Reação de transcrição reversa..... 56

2.8.4- PCR..... 57

2.8.4.1- Miogenina..... 58

2.8.4.2- β-actina..... 58

2.8.4.3- Quantificação e normalização..... 59

2.9- Coloração hematoxilina-eosina..... 59

2.10- Microscopia confocal..... 59

3- RESULTADOS..... 61

3.1- Características fenotípicas das células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação em músculo esquelético induzida por soro..... 62

3.2- Expressão da miogenina durante a diferenciação miogênica de células C2C12..... 64

3.3- Expressão, atividade e localização da FAK em células C2C12 durante a diferenciação miogênica..... 66

3.3.1- Expressão e atividade de FAK..... 66

3.3.2- Localização da FAK e pFAK em células C2C12..... 67

3.4- Efeito da transfecção com MT-FAK (Tyr 397-Ala) na proliferação e diferenciação de células C2C12..... 71

3.4.1- Detecção de MT-FAK..... 71

3.4.2- Efeito da MT-FAK na expressão de miogenina..... 76

3.4.3- Características fenotípicas das células C2C12 transfectadas com MT-FAK..... 77

4- DISCUSSÃO..... 78

5- CONCLUSÃO..... 87

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 89

bHLH	hélice-loop-hélice básico
CDK	quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
CMV	promotor de citomegalovírus
DEPC	solução de ditiopirocarbonato, inibidor de RNAse
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FAK	Quinase de adesão focal
FLB	formaldeído loading buffer
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
HE	coloração hematoxilina-eosina
IB	*immunoblotting*
IGF	fatores de crescimento tipo insulina
IP	imunoprecipitado
KDa	quilodaltons
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos

MEC	matriz extracelular
MHC	miosina de cadeia pesada
MRFs	fatores de regulação miogênica
MT-FAK	FAK mutada no resíduo tirosina 397
OD	densidade ótica
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato + solução salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFAK	quinase de adesão focal fosforilada no resíduo tirosina 397 (forma ativa)
PKC	proteína quinase C
PRb	proteína retinoblastoma
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	reação de transcrição reversa com amplificação por PCR
S	subunidade de RNA
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecilsulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SV-40	promotor de *Simian virus*
TGF-β	fator transformante tipo β
Tyr	tirosina.
UV	ultravioleta

Pág.

Tabela 1- Seqüência dos oligonucleotídeos para miogenina e β-actina utilizados nas reações de PCR..... 57

		Pág.
Figura 1-	MRFs primários e secundários.....	23
Figura 2-	Modelo para a diferenciação miogênica em 4 etapas.....	26
Figura 3-	A atividade da família MyoD é acoplada ao controle do ciclo celular.....	33
Figura 4-	Apoptose durante a diferenciação miogênica.....	37
Figura 5-	Representação esquemática da organização dos domínios de FAK.....	41
Figura 6-	Vias de sinalização celular ativadas por FAK.....	43
Figura 7-	Esquema mostrando a construção MT- FAK.....	50
Figura 8-	Curso temporal do experimento utilizando a construção MT-FAK.....	51
Figura 9-	Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total.....	56
Figura 10-	Exemplos representativos de células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação.....	63
Figura 11A-	Exemplos representativos de produtos de RT-PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para miogenina e β-actina.....	65
Figura 12A-	Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de C2C12 e anticorpos anti-FAK e anti-fosfo-FAK (pFAK).....	67
Figura 13-	Localização de FAK nas células C2C12.....	68
Figura 14-	Localização de pFAK nas células C2C12.....	70

Figura 15- Blot representativo de imunoprecipitação de homogenatos de células C2C12 com anticorpo anti-c-myc e blotadas com anticorpo anti-FAK..... 72

Figura 16- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de C2C12 e anticorpo anti-FAK em células não transfectadas e MT-FAK..... 73

Figura 17- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de células C2C12 não tratadas e transfectadas com MT-FAK com os anticorpos FAK e pFAK..... 74

Figura 18- Exemplo representativo de células C2C12 transfectadas com MT-FAK e marcadas com anticorpo anti-p-FAK..... 75

Figura 19- Exemplo representativo de células C2C12 transfectadas com MT-FAK e marcadas com anticorpo anti-c-myc..... 75

Figura 20A- Exemplos representativos de produtos de RT-PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para miogenina e β-actina realizados com células não transfectadas e transfectadas com MT-FAK..... 76

Figura 21- Exemplos representativos das células C2C12 não transfectadas e transfectadas com MT-FAK em 5 dias de cultura em meio de diferenciação..... 77

Figura 22- Modelo de diferenciação terminal de células C2C12, ilustrando a importância do comportamento bifásico da FAK durante a progressão da miogênese..... 86

Pág.

Figura 11B- Valores percentuais médios obtidos de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para miogenina normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para β-actina para células C2C12 em diferenciação..... 65

Figura 12B- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com pFAK normalizada pela quantidade de FAK em células C2C12 em diferenciação..... 67

Figura 17B- Valores percentuais médios de pFAK normalizado pela quantidade de FAK em células C2C12 não transfectadas e tratadas com MT-FAK..... 74

Figura 20B- Valores percentuais médios obtidos de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para miogenina normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para β-actina em células C2C12 não transfectadas e transfectadas com MT-FAK..... 76

RESUMO

A linhagem celular C2C12 é um modelo bem estabelecido para a diferenciação miogênica *in vitro*. Quando os mitógenos são retirados do meio de cultura (privação de soro fetal bovino), fatores de transcrição específicos são ativados, levando a indução de expressão de miogenina e outros fatores miogênicos. A expressão de miogenina marca o comprometimento dos mioblastos ao processo de diferenciação em músculo esquelético. A interrupção irreversível do ciclo celular é sinalizada pela indução da expressão de p21 seguida pela expressão de marcadores de diferenciação terminal, como MHC e creatina quinase. Finalmente, a fusão dos miócitos diferenciados leva a formação de miotubos multinucleados e do músculo funcional. Estudos demonstraram que interações célula-MEC, via receptores integrinas, são fundamentais na diferenciação de células C2C12. Este estudo teve como objetivo examinar se a quinase de adesão focal (FAK), um elemento crítico na sinalização das adesões focais via integrinas, possui função na diferenciação de mioblastos C2C12 em miotubos. A privação de soro fetal bovino induziu uma redução transiente (cerca de 50% em 10 e 30 min) seguida de um aumento progressivo (cerca de 200% em 5 dias) na fosforilação de FAK na Tyr-397 detectada pelo anticorpo fosfoespecífico anti-FAK-pY^{397}. Não foi observada nenhuma mudança na expressão da proteína FAK durante o período experimental. A redução transiente na fosforilação de FAK na Tyr397 era acompanhada pela redução de FAK e pFAK nos lamelipodes enquanto que o posterior aumento na fosforilação de FAK nas células em diferenciação era acompanhado por uma localização preferencial nas extremidades das fibras de stress de actina bem organizadas. Transfecção de células C2C12 com a construção de FAK mutada inativa em Tyr397 (promotor CMV e FAK sinalizada por uma seqüência de c-myc na região N-terminal) reduziu substancialmente a ativação de FAK nas células em diferenciação. Células transfectadas em proliferação expressavam relativamente altos níveis do marcador de diferenciação miogenina, mas falhavam na formação de miotubos. Assim, estes dados indicam que a quebra na sinalização de FAK induz a expressão de miogenina mas inibe a progressão das células C2C12 na diferenciação terminal. Um modelo é proposto no qual a inibição de FAK contribui para sinalizar o programa genético miogênico mas a redução persistente da sua atividade em células privadas de soro suprime a diferenciação terminal, provavelmente prejudicando a fusão celular.

ABSTRACT

The cellular lineage C2C12 is a well established model of myogenic differentiation *in vitro*. Upon mitogen withdrawal (bovine serum starvation), specific transcription factors are activated, leading to the induction of myogenin and other myogenic factors. Myogenin expression marks the commitment of myoblasts to the differentiation pathway. Irreversible cell cycle arrest is triggered by an increase in p21 and expression of terminal differentiation markers, that include sarcomeric MyHC and muscle creatine kinase. Finally, fusion of the differentiated myocytes leads to the formation of multinucleated myotubes and functional muscle. Studies have demonstrated that interactions cell-ECM, via integrin receptors, are fundamental in C2C12 differentiation. This study was performed to examine whether focal adhesion kinase (FAK), a critical element in cell adhesion signaling via integrin, plays a role in the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. Serum starvation induced a transient reduction (to ~50%, at 10' and 30') followed by progressive increase (to 200% up to 5 days) of Fak phosphorylation at Tyr-397 as detected by anti-Fak-pY^{397} phosphospecific antibody. No change was observed in Fak protein expression along the experimental period. The transient reduction of Fak phosphorylation at Tyr 397 following serum starvation was accompanied by a reduction of Fak and phosphorylated Fak at the edge of lamellipodia, while the later increase in Fak phosphorylation in differentiating cells was accompanied by a preferential location at the tip of well organized actin stress fibers. Transfection of C2C12 with Tyr-397 mutated-inactive FAK construction (CMV promoter and Fak-tagged with a c-terminal c-myc sequence) reduced substantially Fak activation in differentiating C2C12 cells. Transfected cells cultured in growth medium expressed relatively high levels of the differentiation marker myogenin, but failed to progress to terminal differentiation after serum starvation. Thus these data indicate that Fak signaling disruption induces myogenin expression, but inhibits the progression of C2C12 cells into terminal differentiation. A model is proposed in which Fak inhibition contribute to trigger the myogenic genetic program but the persistent reduction of its activity in serum starved cells suppress terminal differentiation, presumably by impairing cellular fusion.

INTRODUÇÃO

O músculo esquelético de mamíferos exibe uma grande capacidade de crescimento e reparo. No embrião, o mioblasto é responsável por este potencial. Durante a miogênese, estas células proliferam, diferenciam e fundem-se para formar miotubos e eventuais fibras musculares. No músculo pós-natal, as células satélite encontram-se entre a lamina basal e a membrana plasmática da fibra muscular e são caracterizadas por um núcleo heterocromático, citoplasma esparso com poucas organelas e ausência de miofilamentos. Embora consideradas quiescentes no músculo esquelético saudável, após um estímulo apropriado, como injúria, aumento de carga de trabalho (SNOW, 1986) ou por estiramento muscular prolongado (SUMMERS, ASHMORE, LEE et al., 1985), as células satélite tornam-se ativas, proliferam e fundem-se com a fibra adjacente, aumentando o número de mionúcleos para o crescimento e reparo da fibra (ALLEN & RANKIN, 1990).

A proliferação e diferenciação das células satélite são processos que podem ser regulados *in vitro* pela concentração de fatores de crescimento específicos. *In vivo*, estes processos são assíncronos: dentro de uma mesma região anatômica, algumas células proliferam enquanto outras diferenciam. Os mecanismos responsáveis por essa assincronia não estão totalmente entendidos, mas baseado em estudos *in vitro*, eles parecem depender da combinação local da concentração de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, interações célula-célula e atributos únicos dos mioblastos que governam a resposta à mitógenos, como receptores de fatores de crescimento na superfície celular e vias de transdução de sinal (ENGEL & FRANZINI-ARMSTRONG, 1994; SASTRY, LAKONISHOK, WU, et al. 1999). Assim, na presença de múltiplos fatores externos, a decisão da célula de proliferar ou diferenciar é uma resposta integrada de seu ambiente adesivo e de fatores de crescimento (SASTRY & HORWITZ, 1996).

1.1- FATORES DE REGULAÇÃO MIOGÊNICA (MRFS): RELAÇÃO HIERÁRQUICA, SOBREPOSIÇÃO DE FUNÇÕES, ATIVAÇÃO E MIOGÊNESE

Em resposta a privação de fatores de crescimento, mioblastos em cultura suprimem o ciclo celular e sofrem um processo de comprometimento à diferenciação

terminal irreversível. O comprometimento dos mioblastos à diferenciação pode ser detectado por 3 mudanças fenotípicas principais: a inabilidade para reentrar no ciclo celular quando fatores de crescimento são repostos (o estado pós-mitótico), a ativação de transcrição de genes músculo-especificos (α-actina, receptor acetilcolina, creatina quinase, miosina de cadeia pesada entre outros) e as mudanças na superfície celular que fazem com que as células musculares sejam capazes de se fundirem com outras células similares ou mioblastos nascentes, formando miotubos multinucleados (ENGEL & FRANZINI-ARMSTRONG, 1994).

O processo de diferenciação celular do músculo esquelético em vertebrados é governado por uma rede de fatores reguladores musculares. Os fatores de regulação miogênica (MRFs) são parte da superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice básico (bHLH), incluindo c-myc. A subfamília MRF consiste de MyoD (Myf-3), Myf-5, miogenina (Myf-1) e MRF4 (Myf-6/Herculina). Eles possuem a propriedade notável de quando expressos num promotor constitutivo, poderem converter um grande número de diferentes tipos celulares, tanto em cultura como em animais trangênicos, em músculo esquelético (WEINTRAUB, 1993; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994; SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

As proteínas MRFs contém um domínio básico conservado necessário para a ligação seqüência-específica ao DNA e ativação transcricional; e um sítio hélice-alça-hélice requerido para heterodimerização. Cada um dos MRFs podem heterodimerizar *in vitro* e *in vivo* com proteínas E capazes de se ligar ao DNA de maneira seqüência-específica em sítios conhecidos como E-box (CANNTG). Este motivo de DNA está presente nos promotores de muitos genes específicos de músculo esquelético (α-actina, receptor acetilcolina, creatina quinase, miosina de cadeia pesada entre outros) e medeia a ativação da transcrição destes genes de maneira dependente de MRF (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

Os genes que codificam os 4 MRFs conhecidos são expressos em padrões temporais distintos. Introdução de mutações "null" nos quatro MRFs na linhagem germinativa de camundongos demonstrou a existência de uma hierarquia entre os MRFs,

definindo-os em dois grupos, como ilustra a figura 1: os MRFs primários, MyoD e Myf-5, são requeridos para o comprometimento das células no somito com a linhagem miogênica; e os MRFs secundários, miogenina e MRF4, requeridos como fatores de diferenciação terminal dos mioblastos em seqüência a MyoD e Myf-5 (SABOURIN & RUDNICKI, 2000). Deste modo, os eventos no desenvolvimento que dão origem ao músculo esquelético podem ser divididos em duas etapas principais: a primeira etapa é a determinação de qual célula mesodermal multipotente torna-se restrita à linhagem miogênica e a segunda é o comprometimento das células determinadas miogenicamente (mioblastos) à diferenciação terminal. A diferenciação terminal envolve a interrupção do ciclo celular, expressão de proteínas estruturais específicas de músculo esquelético e fusão dos mioblastos levando à formação de miotubos (SONG, WANG, GOEBL et al., 1998).

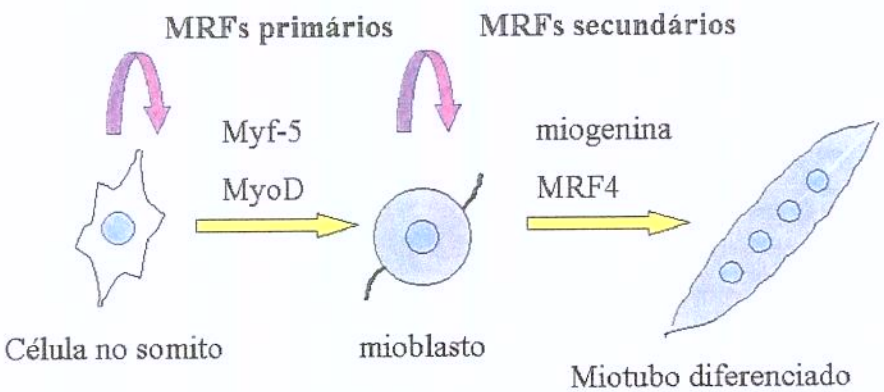


Figura 1- Os MRFs são divididos em 2 grupos: os MRFs primários, MyoD e Myf-5, requeridos na etapa de comprometimento com a linhagem miogênica das células em proliferação dos somitos; e os secundários, miogenina e MRF4, requeridos para a diferenciação dos mioblastos em miotubos (SAUBORIN & RUDNICKI, 2000).

Uma vez que MyoD seja ativado, continua sendo expresso durante todo o desenvolvimento da célula muscular, possivelmente através da habilidade da proteína MyoD ativar sua própria transcrição (SONG, WANG, GOEBL et al., 1998). MyoD e Myf-5 são expressos em células miogênicas em proliferação, indiferenciadas; enquanto que

miogênica e MRF4 é altamente expresso no músculo esquelético maduro (LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

Células satélite quiescentes não possuem níveis detectáveis de qualquer um dos quatro MRFs. Após estímulos (ex.: injúria), MyoD é rapidamente superexpresso, o que ocorre anteriormente à expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de proliferação celular. Após a proliferação se encerrar, miogenina e MRF4 são expressos na célula que entram no programa terminal de diferenciação. A ausência de mRNA de MRFs na células satélite anterior à ativação sugere que as células satélite representam um linhagem celular tronco que é distinta dos mioblastos. Ainda, a indução *de novo* da transcrição de MyoD e Myf-5 implica que sinais indutivos estão envolvidos nesta ativação, análogos àqueles que ocorrem durante a embriogênese (SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

Estudos mostraram que alguns MRFs podem ser substituídos um pelo outro, sugerindo a existência de uma potencial redundância entre os MRFs (SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

Camundongos com apenas uma cópia de *Myf-5* e nenhuma de *MyoD* não são viáveis e produzem cerca de metade ou menos de RNA de *Myf-5* e miogenina; contudo, camundongos com uma cópia de *MyoD* e nenhuma de *Myf-5* são viáveis e produzem quase a quantidade normal de RNA de *MyoD* e miogenina. Embriões sem *MyoD* ou *Myf-5* não desenvolvem células de músculo esquelético detectáveis. Estes resultados sugerem que a determinação e/ou sobrevivência de precursores miogênicos requerem *MyoD* ou *Myf-5* e que MyoD pode autoregular e compensar para a deficiência mas *Myf-5* e miogenina geralmente não devem ser capazes de fazer o mesmo nestes animais (WEINTRAUB, 1993; LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994).

Mutação no gene da miogenina em camundongos revelou uma função crucial deste regulador na diferenciação muscular terminal. Embriões de camundongo que não possuem miogenina morrem imediatamente após o nascimento e exibem várias anormalidades do músculo esquelético. Assim, a miogenina parece ser necessária para a completar o programa de diferenciação *in vivo* (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994).

Experimentos em cultura de células mostraram que MyoD pode ativar sua própria transcrição bem como a de miogenina; miogenina pode se autoativar assim como MyoD; Myf-5 pode se autoativar bem como MyoD e miogenina. A ativação da miogenina parece ser mediada, em parte, via "downstream" fator de transcrição muscular, MEF2 (WEINTRAUB, 1993).

Muitos dos dados em relação a ativação, autoativação e ativação cruzada entre os membros da família MyoD sugerem que MyoD e Myf-5 *in vivo* são responsáveis primariamente pela mediação da ativação primária, pela definição do estado mioblástico e pelo posicionamento do número de células adequado nas regiões em formação muscular do corpo e pelo recebimento de sinais inibitórios do meio ambiente; que MyoD deve ser primariamente responsivo pela estabilização do estado de autoativação, e que miogenina, uma vez ativada por MyoD ou Myf-5, é usada para ultrapassar o controle negativo *in vivo* e para ativar a maioria (mas não todos) genes estruturais musculares, como creatina quinase, miosina de cadeia pesada (MHC), receptor acetilcolina entre outros (OSSES & BRANDAN, 2002). MRF4, que possui muitos aspectos em comum com miogenina (isto é, início de expressão tardio), deve também ter parcial sobreposição de função com miogenina, o que pode contribuir à miogênese residual presente em camundongos deficientes em miogenina; e deve possuir função na manutenção ou maturação da fibra muscular esquelética (WEINTRAUB, 1993; LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994).

A base para o antagonismo entre proliferação e diferenciação é a expressão induzida do inibidor do ciclo celular p21 durante a miogênese. A indução de p21 diminui a atividade das quinases dependentes de ciclina (Cdk) envolvidas no controle da transição G1-S do ciclo celular nos miócitos em diferenciação e sua expressão ectópica em mioblastos é suficiente para a interrupção do ciclo celular em meio de cultura rico em mitógeno (ANDRÉS & WALSH, 1996; ZHANG, WONG, LIU et al., 1999).

Foi proposto um modelo para a miogênese, ilustrado na figura 2, um processo altamente ordenado e regulado, separado temporalmente em 4 eventos distintos: primeiro, após a retirada dos mitógenos, MyoD é ativado levando a expressão de miogenina e outros MRFs. A expressão de miogenina marca o comprometimento dos mioblastos à via de diferenciação. Segundo, interrupção irreversível do ciclo celular é sinalizada por um

aumento de p21. Terceiro, a expressão de marcadores de diferenciação terminal, como MHC e creatina quinase, que ocorre nas células em diferenciação. Finalmente, a fusão dos miócitos diferenciados leva à formação de miotubos multinucleados e músculo funcional. A perturbação de qualquer estágio deste programa miogênico resultará em comprometimento do desenvolvimento muscular (ANDRÉS & WALSH, 1996; SQUILLACE, CHENAULT & WANG, 2002).

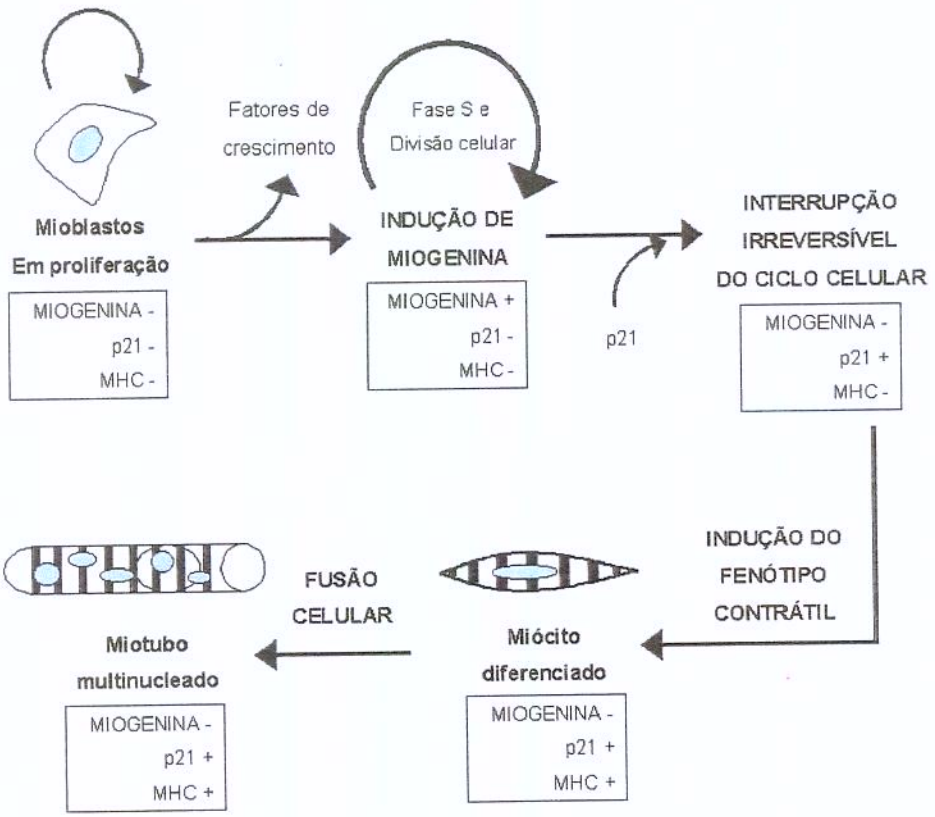


Figura 2- Modelo para a diferenciação miogênica em 4 etapas (ANDRÉS & WALSH, 1996).

1.2- FATORES ADICIONAIS NA MIOGÊNESE: A FUNÇÃO DA FAMÍLIA MEF2

Nos anos recentes, os esforços para identificar os mecanismos de ação de MRFs revelaram uma variedade de proteínas ligantes de MRFs e co-fatores. Estes co-fatores possuem papel importante no remodelamento da cromatina, função da RNA polimerase II ou eles mesmos são fatores de transcrição (SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

A transfecção de qualquer um dos MRFs em fibroblastos 10T1/2 leva à ativação do gene de miogenina endógena e a diferenciação em músculo esquelético. Os detalhes de como a expressão da miogenina é controlada revelou a existência de uma alça de regulação pelo MEF2 na diferenciação. O promotor da miogenina contém um Box E, reconhecido por dímeros MRF-proteína E, e um sítio de ligação para MEF2 localizado muito próximo à seqüência TATA. Mutações em gene-repórter acetiltransferase cloranfenicol (CAT) contendo 84 nucleotídeos do início do sítio de transcrição do gene da miogenina, suficiente para iniciar a expressão músculo esquelética específica desta construção gênica, evidenciaram que a transcrição de miogenina músculo-específica em cultura de células reside primariamente no sítio de ligação a MEF2 presente neste promotor. Em camundongos transgênicos, tanto um Box E intacto como o sítio de ligação de MEF2 próximo ao promotor são necessários para apropriada expressão gênica. Estes estudos indicaram que a diferenciação do músculo esquelético é mantida por uma alça de regulação positiva entre estas duas famílias de fatores de transcrição. Durante a diferenciação do músculo esquelético, MRFs presentes em mioblastos determinados (MyoD e Myf-5) iniciam uma cascata de eventos que levam à ativação de MEF2, principalmente MEF2C. Este, por sua vez, é necessário para ativar a transcrição de miogenina. Como miogenina também pode ativar MEF2, uma regulação mútua assegura que altos níveis de ambos MEF2 e miogenina serão mantidos no músculo esquelético diferenciado (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994).

Além de ativar MEF2C, MRFs também devem indiretamente afetar splicing, tradução e/ou estabilidade de proteína dos membros da família MEF2 (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994).

1.3- OUTROS MECANISMOS QUE REGULAM A ATIVIDADE DOS MRFS

A ativação da diferenciação de músculo esquelético induz a expressão de genes músculo-específicos, acompanhada da interrupção do ciclo celular e fusão das células em miotubos multinucleados. Como dois dos MRFs são expressos em mioblastos em proliferação antes da diferenciação (MyoD e Myf-5), deve haver mecanismos nas células que ciclam garantindo a modulação funcional ou inativação destes reguladores. Em adição, como miotubos terminalmente diferenciados saem do ciclo celular, deve haver uma integração entre MRFs e o bloqueio da progressão do ciclo celular (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

1.3.1- Fosforilação do domínio básico dos MRFs

Análise mutagênica cuidadosa dos MRFs revelou que um resíduo treonina conservado na região básica é essencial para a atividade (Thr 115). Interessantemente, esta treonina é substrato para a fosforilação via proteína quinase C (PKC) *in vitro*. Como os sinais gerados por fatores de crescimento ou oncoproteínas que inibem miogênese são sabidamente ativadores de PKC celular, foi proposto que alguns destes agentes inibitórios direcionam a fosforilação via PKC da região básica dos MRFs. Consistente com este modelo, estudos demonstraram que a fosforilação *in vitro* da miogenina por PKC inibe sua ligação ao DNA. Contudo, outros estudos colocam em dúvida este argumento. O exame do estado de ativação de MRF4 constitutivamente expresso em mioblastos em proliferação, tratados com "fibroblast growth factor" (FGF) ou com veículo de expressão de PKC, não mostrou a presença de fosfo-treonina detectável (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

1.3.2- As proteínas Id

A identificação de uma proteína hélice-alça-hélice dominante negativa, chamada Id, codificada por pelo menos 4 genes diferentes, que pode se ligar e inibir proteínas E e MRFs, levou a propor que a função miogênica dos MRFs era controlada pela quantidade relativa de fatores bHLH agindo positivamente (a família MyoD e proteínas E) e fatores agindo negativamente (a família Id). Membros da família Id contém o motivo bHLH, não possuem um domínio básico e são capazes de seqüestrar ambos proteína E e MRFs em complexos que não se ligam ao DNA e, assim, incapazes de ativar genes músculo-específicos. Recentemente foi demonstrado que Id pode formar complexos heterodiméricos com MyoD, o qual não se liga ao DNA. Como os níveis de Id em mioblastos em proliferação são altos e diminuem na diferenciação, propôs-se que altos níveis de Id previnem a função de MyoD nas células em proliferação. De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que a superexpressão da proteína Id em mioblastos atrasam sua diferenciação. Interessantemente, a proteína Id era desestabilizada sob condições de diferenciação, contudo, a diferenciação era atrasada mas não eliminada em células programadas para expressar constitutivamente Id (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

Similarmente, a atividade de MyoD é inibida *in vitro* pela proteína "twist" murina (mTwist). A proteína mTwist também deve seqüestrar as proteínas E, prevenindo a formação do heterodímero MRF-E. Em adição às proteínas Id e mTwist, foi mostrado que MyoD é negativamente regulada pela dimerização com Mist1, um novo fator bHLH que não possui um domínio de transativação. O heterodímero resultante não se liga ao sítio E Box dos promotores (SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

1.3.3- Modificações pós-tradução ou associação a outras proteínas reguladoras

Modificações pós-tradução ou associação a outras proteínas reguladoras dos MRFs podem modificar sua atividade nas células em proliferação. Estudos recentes sugerem que produtos dos genes de expressão imediata, como c-jun, podem inibir a função

miogênica de MRFs por interação direta ou sequestro de um cofator necessário (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

A atividade de MRFs também é acoplada à atividade do complexo de transcrição AP-1, o qual está intrinsicamente relacionado com proliferação e diferenciação celular. O heterodímero c-Fos/c-jun regula de maneira negativa a diferenciação celular, favorecendo a proliferação. O proto-oncogene c-jun interage fisicamente com MyoD e inibe sua atividade. c-Fos é expresso em altos níveis nos mioblastos em proliferação e durante a diferenciação *in vitro*, o promotor de c-Fos tem sua expressão diminuída por MyoD através de um E-box dentro do promotor de c-Fos (BENGAL, RANSONE et al., 1992; SABOURIN & RUDNICKI, 2000; ANDREUCCI, GRANT, COX et al., 2002).

Em contraste, Andreucci, Grant, Cox, et al. (2002) mostraram que a atividade de AP-1 é mantida e potencializada durante as condições de diferenciação das células miogênicas, tendo um papel positivo neste processo. A composição das subunidades do complexo AP-1 sofre uma transição de "proliferação" para "diferenciação" durante a miogênese, mudando de c-Fos/c-jun para Fra-2 /c-Jun ou JunD, em células C2C12. Os complexos contendo Fra-2 podem ativar a transcrição de MyoD, uma vez que seu promotor contém sítios de ligação a AP-1. Além disso, o aumento no nível de Fra-2 em miotubos correlaciona com a interrupção do ciclo celular e a ativação da expressão de genes musculares. Assim, uma vez que os complexos AP-1 em mioblastos em proliferação são diferentes dos encontrados em miotubos terminalmente diferenciados, mudanças diferenciação-específicas na composição de AP-1 refletem as mudanças dinâmicas na ativação de genes alvos de AP-1 nestas células.

Vários outros oncogenes, como *c-myc, ras, fos, jun* e *erb1* também inibem a diferenciação muscular *in vitro*, sugerindo que fatores promotores de crescimento regulam negativamente MRFs. Assim, a atividade de MyoD é extensivamente regulada por fatores exógenos. Provavelmente, um número de diferentes sinais positivos e negativos convergem em MyoD antes que ele comprometa a célula para a diferenciação terminal (BENGAL, RANSONE et al., 1992; SABOURIN & RUDNICKI, 2000)

1.4- CONTROLE DO CICLO CELULAR E DIFERENCIAÇÃO MIOGÊNICA

A atividade dos MRFs também é altamente acoplada ao ciclo celular. Por exemplo, a indução de diferenciação de mioblastos em cultura resulta na superexpressão de inibidores do ciclo celular como p21 e p16. O gene de p21 foi mostrado possuir um E-box na sua região regulatória "upstream" e ser ativado pela superexpressão de MyoD em ensaios transientes. A expressão forçada de p21 ou p16 bloqueia apoptose durante a diferenciação celular. A conecção ciclo celular-MRFs é aumentada pela observação de que a superexpressão de ciclina D1, um ciclina G1-S e ativadora de Cdk4, leva a hiperfosforilação de MyoD, inibindo sua atividade e subseqüente a transativação de genes repórteres que contém E-box, como p21, e a diferenciação terminal (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994; SONG, WANG, GOEBL & HARRINGTON, 1998; FUJIO, GUO, MANO et al. 1999).

Além disso, a forma desfosforilada da proteína retinoblastoma (pRb) (via p21) associa-se com MyoD e é necessária para a eficiência da transativação dos promotores músculo-específicos que contém E-box, promovendo a expressão dos marcadores tardios da diferenciação. Essa associação MyoD-Rb também interfere de modo negativo nos eventos transcricionais dependentes de E2F relevantes para a progressão do ciclo celular, incluindo a ativação de um número de genes requeridos para a saída de G1 ou replicação de DNA. A proteína Rb também é necessária para manter o fenótipo diferenciado de miotubos em cultura (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; SONG, WANG, GOEBL & HARRINGTON, 1998; FUJIO, GUO, MANO et al. 1999; PORRELLO, CERONE, COEN et al., 2000).

Eventos de fosforilação dependentes de CDK têm sido propostos como controladores da estabilidade de proteínas. Uma vez que MyoD possui sítios de fosforilação para CDK e baseado nas observações acima, é possível que CDK controle a atividade da proteína MyoD, provavelmente através de sua fosforilação direta. Song, Wang, Goebl e Harrington (1998) demonstraram que MyoD pode ser fosforilada no resíduo serina 200, localizado em um sítio de fosforilação consenso CDK, pela Cdc34, um regulador da transição G1-S do ciclo celular. A prevenção da fosforilação neste sítio leva à estabilização da proteína MyoD. Ainda, cicloheximida, um agente que inibe a degradação protéica pela

via dependente de ubiquitina, uma via intimamente ligada à degradação de muitas proteínas reguladoras da progressão do ciclo celular; também causa a estabilização de MyoD (aumento de meia vida). Assim, estes autores propuseram que a fosforilação de MyoD nuclear leva a sua ubiquitinação dependente de Cdc34 sinalizando sua destruição pela via proteossomo 26S. O controle do nível de MyoD através da ubiquitinização dependente de fosforilação por CDK sugere um mecanismo para coordenar os eventos de transcrição durante a progressão da fase G1-S (em mioblastos).

Três modelos têm sido propostos para explicar a interrupção do ciclo celular observada durante o processo de diferenciação: Olwin & Hauschka, 1988, foram os primeiros a demonstrar que os receptores de fatores de crescimento significantemente diminuem em miócitos diferenciados. Contudo, estes pesquisadores descobriram que o início da interrupção do ciclo celular precede a perda dos receptores, sugerindo que a perda dos receptores não era a única responsável pela interrupção do ciclo celular destas células. Recentemente foi sugerido que os MRFs devem inibir a progressão do ciclo celular pela ligação ao promotor de c-fos, impedindo a ocupação por SRF ("serum response factor") e, assim, inibindo a expressão do gene c-fos. Este modelo é questionado pelo fato de células microinjectadas com proteínas MyoD podem ser induzidas a expressar c-fos mas ainda falham em entrar na fase S (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

Outro estudo demonstrou que MyoD e a proteína repressora tumoral pRb podem interagir *in vitro* (GU, SCHNEIDER, CONDORELLI, et al., 1993) e propuseram que uma interação direta entre estas duas proteínas é responsável pela interrupção do ciclo celular. A expressão ectópica de MyoD induz a diferenciação em músculo esquelético mesmo na ausência de pRb. Em contraste com miotubos selvagens que estão retirados terminalmente do ciclo celular, miotubos sem pRb iniciam nova síntese de DNA quando estimulados com mitógenos. Isto sugere que pRb tem função específica na manutenção do músculo esquelético diferenciado na fase G0 que não é preenchida por outras proteínas relacionas estruturalmente (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

Na década de 90, descobriu-se que a região 3' terminal de RNAs músculo-específicos podem inibir a proliferação celular. Este achado interessante levanta a possibilidade que a interrupção do ciclo celular de células terminalmente diferenciadas pode ser mantida por seqüências no témino 3'de RNAs específicos de diferenciação. Ainda não é claro se estas sequências de RNA inibem a proliferação celular ou se sua atividade requer o produto do gene pRb (LASSAR & MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994). A figura 3 ilustra a relação da família MyoD com o controle do ciclo celular.

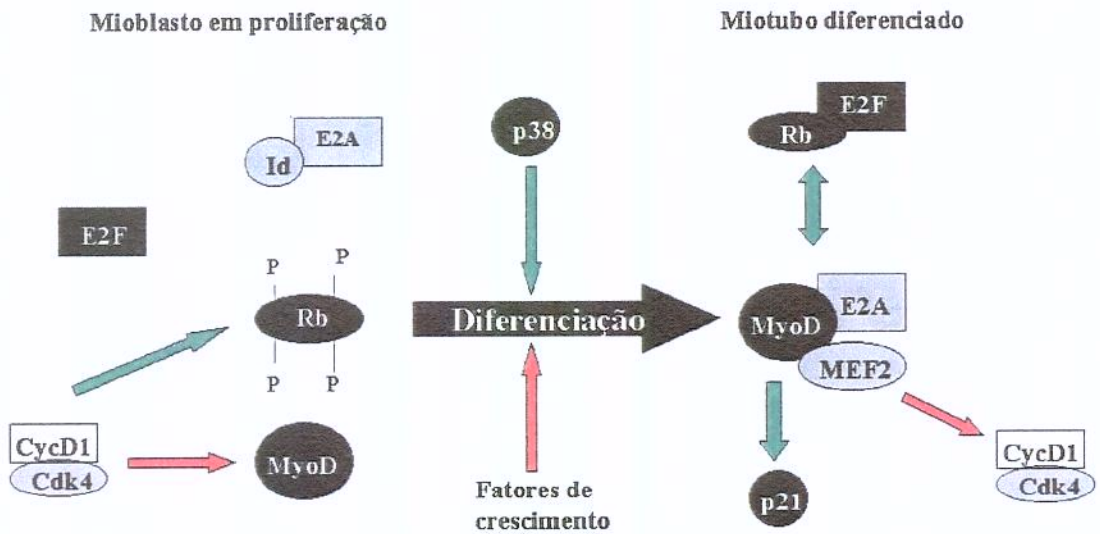


Figura 3- A atividade da família MyoD é acoplada ao controle do ciclo celular. Setas verdes denotam relações regulatórias positivas enquanto que as vermelhas, negativas (SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

1.5- HORMÔNIOS E FATORES DE CRESCIMENTO NA DIFERENCIAÇÃO MIOGÊNICA

A importância dos hormônios e fatores de crescimento na regulação da proliferação e diferenciação das células musculares é amplamente reconhecida (FLORINI, EWTON & MAGRI, 1991).

"Insulin growth factors" (IGF-I, IGF-II) e insulina são os únicos entre os fatores de crescimento que estimulam ao invés de inibir a diferenciação miogênica, tanto em células em cultura como em células satélite de ratos e células musculares de embrião de galinha. Assim, a estimulação da diferenciação pelos IGFs é um fenômeno geral. Em casos de linhagens celulares como as células C2 que secretam grandes quantidades destes hormônios e podem estimular sua própria diferenciação por mecanismos autócrinos/parácrinos quando incubadas em 2% de soro eqüino. (FLORINI, EWTON & MAGRI, 1991).

IGF-II é um fator essencial de sobrevivência durante a transição da proliferação para diferenciação. Quando células C2C12 são transfectadas estavelmente com um cDNA antisense de IGF-II, elas proliferam normalmente em meio de crescimento mas morrem rapidamente quando colocadas em meio de diferenciação (SANDRI & CARRARO, 1999). Interessantemente, "knockouts" genéticos de IGFs e do receptor IGF-I levaram ao desenvolvimento de camundongos com músculo esquelético hipoplástico, sugerindo que IGFs devem ter um papel ou na proliferação ou na diferenciação da população de células tronco de músculo esquelético (LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

O mecanismo mais provável de ação de IGF-I é a indução de miogenina, a mais universalmente expressada dos MRFs. O aumento da expressão de RNAm de miogenina após tratamento com IGF-I requer um tempo longo (30-40 horas), sugerindo que o substrato para o receptor tirosina quinase IGF-I não age diretamente como um fator de transcrição para o gene da miogenina (FLORINI, EWTON & MAGRI, 1991).

Além da função de estimular a diferenciação, IGF-I e IGF-II também estão relacionados com a sobrevivência celular uma vez que são ativadores da via da PI 3-kinase e Akt. (FUJIO, GUO, MANO et al., 1999).

TGF-β bloqueia todos os aspectos da diferenciação miogênica (fusão, elevação da atividade de creatina quinase, aparecimento dos receptores acetilcolina, transição da actina da forma β para γ e expressão de outros RNAms músculo-específicos e proteínas correspondentes) numa maneira dependente de concentração. Ele age numa etapa(s) relativamente inicial(is) na cascata de eventos que levam à diferenciação terminal pois não

possui efeito se adicionado após o tempo necessário para o comprometimento das células. A inibição da diferenciação por TGF-β é reversível, sugerindo que TGF-β induz um sinal transiente que é rapidamente revertido e não causa danos irreversíveis aos mioblastos. TGF-β age provavelmente pela indução da expressão dos oncogenes *jun* e/ou *ras*. (FLORINI, EWTON & MAGRI, 1991).

Em contraste, TGFβ parece ter funções positivas no desenvolvimento do músculo esquelético dependendo da linhagem celular estudada. A diferenciação de células C2C12 é inibida pela expressão de uma forma truncada (dominante negativa) do receptor de TGFβ do tipo II sugere que a sinalização através deste receptor é necessária para promover diferenciação (LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994).

FGF é um potente inibidor da diferenciação miogênica, sendo a forma básica a mais potente (bFGF) (OSSES & BRANDAN, 2002). Ele bloqueia uma etapa inicial (ou etapas) nos eventos envolvidos neste processo e, como TGF-β, não possui efeito na expressão subsequente dos MRFs. Uma possibilidade de ação do FGF é através do aumento da expressão de oncogenes celulares como *c-fos* e *c-myc* em resposta ao FGF. Estudos mostraram que FGF inibe a expressão de MyoD1 e miogenina (FLORINI, EWTON & MAGRI, 1991).

Um aspecto importante do comportamento dos receptores de fatores de crescimento é que o desaparecimento do receptor está associado com a diferenciação terminal, tanto *in vivo* como *in vitro* (ENGEL & FRANZINI-ARMSTRONG,). A demonstração de que a ligação de "epidermal growth factor" (EGF) em mioblastos de camundongo diminuía quando estas células diferenciavam levou a sugerir que a perda dos receptores de fatores de crescimento (FGF, TGF-β) deva contribuir para o estado pós-mitótico dos miotubos. Esta generalização não se estende aos IGFs, que são mitógenos ativos paras as células musculares e aumentam sua ligação às células durante o processo de diferenciação (FLORINI, EWTON & MAGRI, 1991).

1.6- LINHAGEM CELULAR C2C12

Mioblastos C2 e seu subclone C2C12 provenientes de camundongos são as linhagens celulares miogênicas mais caracterizadas e empregadas atualmente como modelos de diferenciação em músculo esquelético (ANDRÉS & WALSH, 1996;YOSHIDA, YOSHIDA, KOISHI et al., 1998; MORAN, LI, ANDREW et al., 2002; YEOW, CABANNE, TURCHI et al., 2002). Na presença de uma alta concentração de soro no meio de cultura, as células proliferam como uma população indiferenciada e expressam MyoD e Myf-5. A diferenciação terminal de C2C12 é tipicamente induzida pela privação de soro, o que leva a uma série de eventos cronologicamente ordenados. Expressão de miogenina é o evento inicial seguido pela interrupção permanente do ciclo celular e expressão de p21, produção de proteínas contráteis e fusão celular resultando na formação de miotubos (YOSHIDA, YOSHIDA, KOISHI et al., 1998).

Quando uma cultura de mioblastos C2C12 em proliferação é induzida a diferenciar com privação de soro no meio de cultura, uma porção significante das células escapa da diferenciação terminal e passa a ter níveis não detectáveis de MyoD ou Myf-5. Essas novas células são referidas como indiferenciadas e quando são retornadas às condições de proliferação, elas passam pelo ciclo celular e retomam a expressão de MyoD, demonstrando-se idênticas à cultura original. Assim, elas são denominadas 'células reserva', lembrando algumas características das células satélite *in vivo* (YOSHIDA, YOSHIDA, KOISHI et al., 1998).

A apoptose é um processo significativo durante a diferenciação miogênica das células C2C12, como mostra a figura 4. Estudos cinéticos indicaram que a privação de soro sinaliza apoptose em células em proliferação. Durante a miogênese, as células que sobrevivem ao estímulo inicial adquirem um fenótipo resistente à apoptose acompanhado pela expressão de p21, essencial para a supressão da morte celular por apoptose; mas não com o aparecimento de miogenina, um marcador inicial da diferenciação miogênica; e posteriormente fundem-se em células sinciciais, um tipo celular mais resistente aos danos subletais que os mioblastos em proliferação (FUJIO, GUO, MANO et al., 1999; SANDRI & CARRARO, 1999).

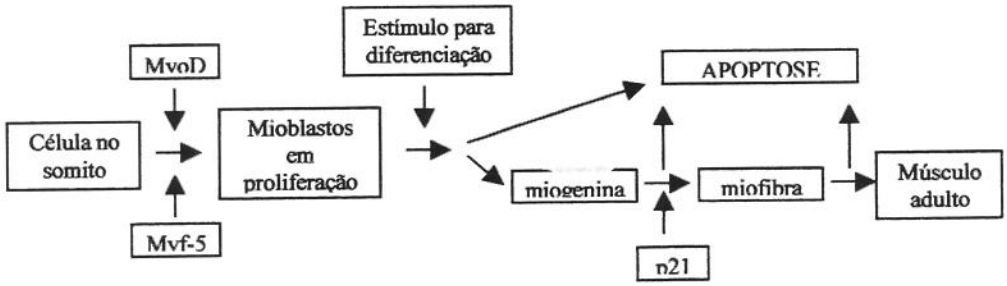


Figura 4- Algumas células C2C12 sofrem apoptose durante a diferenciação miogênica (SANDRI & CARRARO, 1999).

Mioblastos saem irreversivelmente do ciclo celular durante o processo de diferenciação em miotubos. Enquanto a diferenciação progride, as células miogênicas mostram uma propensão reduzida para sofrer apoptose em meio de cultura pobre em mitógenos, provavelmente através da indução de um fator de sobrevivência. Fujio, Guo e Mano (1999) mostraram que a quinase Akt é superexpressa durante a diferenciação miogênica, com conseqüência na sobrevivência do miócito, e, assim, definiram um componente do mecanismo no qual a proliferação e apoptose são coordenados durante a miogênese *in vitro*.

Moran, Li, Hill et al (2002) utilizaram "microarrays" de DNA para caracterizar mudanças no padrão de expressão global de RNAm durante proliferação, interrupção do ciclo celular e diferenciação terminal em mioblastos C2C12. Este estudo revelou 629 sequências reguladas entre mioblastos em proliferação e diferenciação agrupadas em categorias funcionais como contração celular, adesão celular, função da matriz extracelular, metabolismo celular, transporte mitocondrial, replicação do DNA, controle do ciclo celular, transcrição de RNAm e, inesperadamente, regulação imune. A maior parte dos genes regulados exibe marcante mudança de expressão durante as transições de células em proliferação para início de diferenciação e em células no início e final da diferenciação, consistente com a transição mitótica para pós-mitótica e a mudança dramática no fenótipo celular acompanhando a diferenciação miogênica, respectivamente.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1.7- PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR NO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO: INTEGRINAS

Embora muitos fatores de crescimento afetem de maneira negativa a diferenciação muscular *in vitro*, estudos recentes sugerem que a diferenciação pode ser sujeita a regulação positiva por estímulos do microambiente. A matriz extracelular (MEC) possui um papel importante na diferenciação muscular. Por exemplo, laminina-1 tem um papel proeminente na promoção da formação de miotubos, adesão e proliferação de mioblastos, enquanto que fibronectina inibe a diferenciação miogênica (ADAMS & WATT, 1993; LASSAR, SKAPEK & NOVITCH, 1994; SHIBANUMA et al, 2002).

Uma MEC organizada é requisito para a miogênese ocorrer em resposta a estímulos que sinalizam para a diferenciação em músculo esquelético. Aparentemente, as interações de receptores específicos, presentes na membrana plasmática, com a MEC geram os sinais necessários para guiar a diferenciação. Integrinas representam as prováveis candidatas, pois agem como componentes críticos de processos nos quais as células assimilam sinais mecânicos do microambiente e possuem papel importante na migração e posicionamento celular. Além disso, as interações das integrinas também podem regular a expressão gênica e fornecer meios diretos para a sinalização a partir da matriz extracelular influenciar a diferenciação celular (MENKO & BOETTIGER, 1987; OSSES & BRANDAN, 2002).

Integrinas são uma grande família de glicoproteínas composta por subunidades transmembrana α e β, que basicamente ligam a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. (XU & ZHAO, 2001; BOUDREAU & JONES, 1999).

Em células cultivadas, as integrinas estão localizadas em sua superfície ventral, em estruturas denominadas adesões ou contatos focais, regiões nas quais as células estão fisicamente muito próximas ao substrato. As adesões focais consistem de proteínas estruturais (quando associadas ao citoesqueleto: paxilina, tensina, vinculina, actina, distrofina em mioblastos) e regulatórias (quando associadas às integrinas: FAK, Src), e desempenham duas funções estruturais importantes na célula: ligação da membrana ao

substrato e ancoragem/estabilização do citoesqueleto de actina. (HYNES, 1992; ADAMS & WATT, 1993; KONBERG, 1998).

Os eventos de transdução de sinal iniciados pela MEC culminam em mudanças na expressão gênica. A diversidade das integrinas e suas diferentes especificidades para moléculas da MEC sugerem que diferentes integrinas transmitem sinais distintos para regular a proliferação, diferenciação e apoptose (SASTRY & HORWITZ, 1996).

Estudos recentes de adesão e sinalização celular dependentes de integrina mostraram que a ligação celular à MEC é acompanhada pela agregação de integrina e que poderia sinalizar um aumento na fosforilação em tirosina de algumas proteínas intracelulares, emergindo como um potencial transdutor da sinalização gerada pelas integrinas (BOUDREAU & JONES, 1999; HYNES, 1992).

Uma vez que integrinas não exibem atividade enzimática intrínseca e que inibidores da atividade de tirosina quinase podem bloquear a formação de adesões focais, os sinais celulares iniciados pelas integrinas devem ser traduzidos através de uma cascata de eventos de fosforilação, sinalizados por proteínas intermediárias que podem iniciar a formação das adesões focais e os caminhos de sinalização intracelular. A primeira candidata para estas proteínas é a proteína tirosina quinase (PTK) $pp125^{FAK}$ ou quinase de adesão focal (FAK) uma vez que, após o aglomeramento de integrinas, há um rápido aumento de fosforilação em tirosina e da atividade quinase de proteínas de 120-130 kDa (SCHALLER & PARSONS, 1993; CARY, CHANG & GUAN, 1996; BOUDREAU & JONES, 1999).

A FAK foi descrita pela primeira vez em 1992 como uma proteína fosforilada em tirosina em células transformadas Src. Subsequentemente, foi revelado que FAK localiza-se nos sítios de adesão focal celulares junto com a agregação de integrinas (HANKS, RYZHOVA, SHIN et al., 2003). A sequência primária de FAK é bem conservada entre as espécies, com mais de 90% de homologia entre as sequência de aminoácidos de aves, camundongo e humano (JONES, BRUNTON & FRAME, 2000).

O homólogo humano do gene *FAK* foi primeiramente isolado em células embrionárias de sarcoma humano RD (JUDSON, HE, CANCE et al., 1999) e colocaliza-se com o gene *C-MYC* no cromossomo 8q24 (AGOCHIYA, BRUNTON, OWENS et al, 1999).

A FAK é um membro da família de proteínas tirosina quinase em crescimento que inclui Pyk2, FakB, RAFTK e CadTK (ZACHARY, 1997; OWEN, RUEST, FRY et al., 1999). A FAK é uma PTK citosólica incomum, como ilustra a figura 5. Diferente de outras PTKs não-receptoras, a FAK não contém domínios SH2 e SH3 envolvidos em interação proteína-proteína, mas possui vários sítios para ligação de SH2/SH3 proteínas sinalizadoras. Sua arquitetura global é única, pois o sítio catalítico é flanqueado por grandes domínios amino e carboxiterminais. O sítio aminoterminal de FAK contém uma região que interage com a subunidade β1 das integrinas e uma banda 4.1 que é capaz de ligar-se às regiões citoplasmáticas de proteínas transmembrânicas, como os receptores de fatores de crescimento solúveis como EGF e PDGF. O carboxitérmino de FAK medeia interações do tipo proteína-proteína SH3, uma vez que contém duas regiões ricas em prolina, que promovem a ligação de $p130^{CAS}$ ou de Graf, uma proteína ativadora de Rho GTPase; e possui um sítio sinalizador FAT, que direciona FAK para as adesões focais e se sobrepõe à sequência ligante da proteína multiadaptadora paxilina (RODRÍGUES-FERNÁNDEZ,1999; JONES, BRUNTON & FRAME, 2000; HAUCK, KLINGBEIL & SCHLAEPFER, 2000; HANKS, RYZHOVA, SHIN et al, 2003).

"Splicing" alternativo do gene que codifica FAK pode levar à expressão independente da região carboxi-terminal de FAK, uma proteína chamada FRNK ("FAK related non-tyrosine kinase") de 41-43 kDa que, provavelmente, age como um inibidor *in vivo* da função de FAK, competindo pelos sítios de ligação de adesões focais e, assim, impedindo a localização de FAK nestas estruturas, além de reduzir a fosforilação em tirosina de FAK (RODRÍGUES-FERNÁNDEZ, 1999).

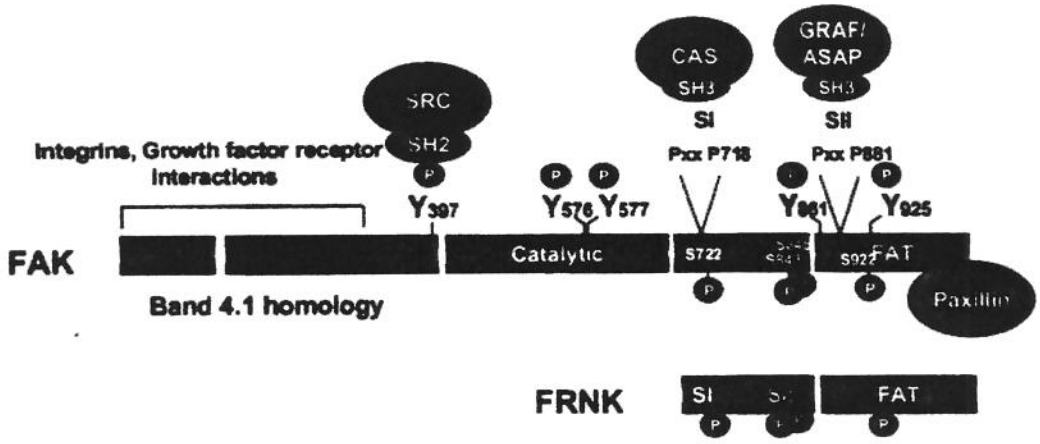


Figura 5- Representação esquemática da organização dos domínios de FAK (PARSONS, MARTIN, SLACK et al., 2000).

FAK é altamente expressada na maioria dos tecidos, está presente em células mesenquimais, células neuronais, plaquetas, linfócitos e monócitos (ZACHARY, 1997).

Quando as células aderem à MEC, através da agregação de integrinas nas adesões focais, FAK oligomeriza- se e torna-se autofosforilada no resíduo tirsosina 397, criando um sítio de alta afinidade de ligação com proteínas sinalizadoras, via domínios SH2, como a família de kinases Src, o que leva a promoção de sua atividade catalítica; a subunidade regulatória p85 de PI 3-quinase e PLC-γ; e proteínas adaptadoras como Shc, Grb7 e Nck-2 (JONES, BRUNTON & FRAME, 2000; HANKS, RYZHOVA et al, 2003). Imagina-se que Src associado a FAK fosforile FAK em sítios adicionais incluindo Tyr-576 e Tyr-577, localizados na alça de ativação do domínio catalítico kinase de FAK, promovendo, assim, máxima atividade catalítica de FAK e, ainda, a fosforilação intermolecular da Tyr-397, levando a amplificação dos sinais gerados nos sítios de adesão celular mediada por integrina (OWEN, RUEST, FRY et al., 1999; SALAZAR & ROZENGURT, 2001).

A associação transitória e altamente regulada de FAK com c-Src faz com que o resíduo tirosina 925 de FAK seja fosforilado, levando à ativação de ambas kinases e fosforilação de proteínas incluindo tensina, paxilina e p130Cas (XU & ZHAO, 2001). A paxilina liga-se diretamente ao domínio citoplasmático das integrinas, assim como à proteína de adesão focal vinculina, portanto deve agir como recrutadora de FAK nas adesões focais (PARSONS, MARTIN, SLACK et al., 2000). FAK ativado no resíduo 925 recruta Grb2, via domínio SH2, o qual se liga a SOS, formando um complexo multicomponente sinalizador, que pode envolver FAK numa série de caminhos de transdução de sinal importantes, como mudanças no citoesqueleto de actina e ativação da cascata de sinalização Ras-MAPK-ERK, importante para a passagem atráves da fase G1 do ciclo celular e promoção da proliferação celular (HANKS, RYZHOVA, SHIN et al, 2003).

Além de Grb2, proteínas adaptadoras como Crk e Nck também medeiam a ativação da rota MAP kinase via FAK. A sinalização de FAK/Src através de Cas pode regular o ciclo celular independente de Erk, sinalizado através de JNK (REISKE, ZHAO, HAN et al., 2000). A fosforilação de FAK também leva à ativação de PI-3 kinase e seus efetores, como Akt, o qual está relacionado com inibição de apoptose induzida por retirada de fatores de crescimento durante a diferenciação miogênica (FUJIO, GUO, MANO et al., 1999).

A via das proteínas quinase mitógeno-ativadas (MAPK) tem sido mostrada ser ativada nas células musculares em diferenciação e ser positivamente regulada pela expressão e atividade da proteína MyoD. Em contraste, Bennet et al. (1997) demonstraram que na retirada de mitógenos de mioblastos C2C12, a MAPK p42ERK2 é inativada concomitantemente com a superexpressão de genes músculo-específicos. Suportando esta idéia, eles mostraram que a superexpressão de fosfatase-1 MAPK, que inibe a atividade de p42Erk2, era suficiente para aliviar os efeitos inibitórios de mitógenos na expressão de genes músculo-específicos. Recentemente, a atividade de proteínas kinase ativadas por stress (SAPK/p38) tem sido mostrada importante na diferenciação terminal de mioblastos C2C12 (SABOURIN & RUDNICKI, 2000). A figura 6 ilustra a diversas vias de sinalização intracelular ativadas por FAK.

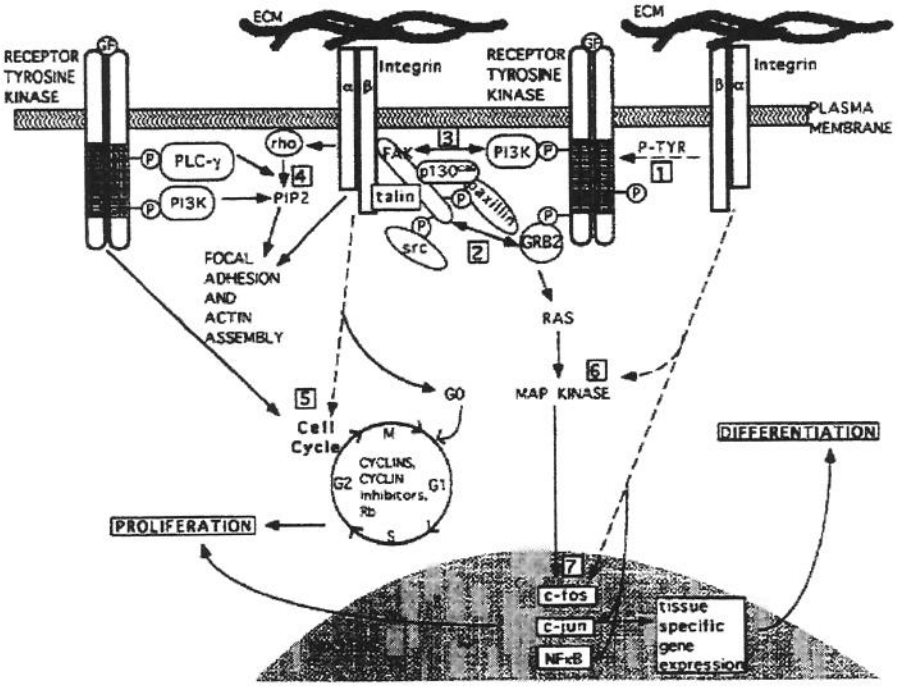


Figura 6- Um grande número de vias de sinalização intracelular são ativadas em resposta à ativação das integrinas, e posteriormente FAK, levando à proliferação ou diferenciação celular (SASTRY & HORWITZ, 1996).

Assim, quando as células aderem à MEC, FAK torna-se autofosforilada em tirosina, agindo como um sensor de adesão e permitindo a interação com proteínas adaptadoras, capazes de recrutar proteínas sinalizadoras "downstream" (KORNBERG, 1998). Além dos receptores de adesão (integrinas), FAK é fosforilada em resposta a vários outros estímulos como neuropeptídeos (bombesina e trombina), citocinas, imunoglobulina, estímulos intracelulares (toxinas bacterianas), fatores de crescimento solúveis (PDFG, bFGF), lipídeos bioativos e oncoproteínas (v-Src, v-crk, bcr-abl), tratamento das células com glicose, ésteres de phorbol entre outros (JUDSON et al., 1999; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, 1999). FAK torna-se desfosforilada em resposta a insulina, destacamento das células da MEC, mutações que prejudicam a função da parte citoplasmática dos receptores integrina β e tratamentos com agentes que quebram os filamentos de F-actina ou bloqueiam Rho GTP "loading" (HANKS & POLTE, 1997; KORNBERG, 1998; BOUDREAU & JONES, 1999; HANKS, RYZHOVA, SHIN et al, 2003).

A convergência destes vários sinais em FAK sugere que FAK é usado numa variedade de vias em células normais e transformadas e deve ser importante na regulação de várias funções celulares como morfologia, proliferação celular e migração assim como controle do ciclo celular e apoptose.

Experimentos em camundongos têm revelado um papel crítico de FAK na mediação do comportamento celular dependente da MEC. O fenótipo de camundongos deficientes em FAK é de letalidade embrionária, caracterizada pelo migração embriônica retardada, organogênese prejudicada e defeitos vasculares (BOUDREAU & JONES, 1999).

Há uma forte evidência de que FAK é um regulador chave da migração celular uma vez que células derivadas de embriões de camundongo FAK -/- exibem um elevado número de adesões focais mas migração reduzida, como resultado do "turnover" prejudicado das adesões (AGOCHIYA, BRUNTON, OWENS et al., 1999). Superexpressão de FAK em linhagem CHO leva ao aumento da migração em fibronectina (RIDYARD & SANDERS, 1999).

Embora estudos de expressão gênica e diferenciação *in vitro* demonstraram que mutantes de *fak* possuíam desenvolvimento vascular extra e intraembriônico gravemente prejudicado, Ilic, Kovacic, McDonagh et al. (2003), mostraram que a diferenciação tecido-específica de células endoteliais $FAK^{-/-}$ era comparável à contraparte selvagem, sugerindo que FAK não era essencial para a diferenciação das células endoteliais e que a deficiência de FAK (FAK-/-) prejudicava a habilidade das células endoteliais migrarem e organizarem-se de uma maneira que conduzisse ao desenvolvimento da vasculatura primitiva.

Estudos recentes têm mostrado que a adesão celular mediada por integrinas pode regular vários componentes envolvidos no controle do ciclo celular embora as vias de sinalização intracelulares sejam ainda desconhecidas. Zhao, Reiske & Guan (1998) mostraram que a ciclina D1 e p21 são os dois alvos principais na via de sinalização de FAK na regulação do ciclo celular pelas integrinas. A superexpressão induzida de FAK em células NIH3T3 elevou a expressão da ciclina D1 e diminui a de p21 e, assim, acelerou a transição das fases G1-S do ciclo celular. Além disso, a microinjeção de um anticorpo anti-FAK bloqueia o ciclo celular na fronteira G1/S (REISKE, ZHAO, HAN et al., 2000).

A disrupção das adesões focais deve ser função de membros da família das caspases normalmente ativada durante o processo apoptótico. Evidências sugerem que a própria FAK é um substrato específico para caspases e que a clivagem de FAK é responsável pela falha da transmissão de sinais de sobrevivência da adesão mediada por integrina (RIDYARD & SANDERS, 1999).

Sendo uma molécula chave na sinalização celular envolvendo intreração célula-MEC, a fosforilação de FAK em tirosina pode ser responsável pela ativação das vias MAP quinase e PI 3 quinase, que por sua vez controlam proliferação celular, adesão e migração. A desfosforilação de FAK presumivelmente causa o término destas vias de sinalização. Em baixas densidades, as células estão proliferando e migrando e a fosforilação em tirosina de FAK deve promover estes processos. Quando as células atingem confluência ou alta densidade, é necessário que elas parem de proliferar ou migrar. Neste contexto, a desfosforilação de FAK deve mediar a inibição pelo contato celular. Estudos mostraram evidências de que a desfosforilação de FAK, induzida por densidade celular, é causada por um fator(es) insolúvel produzido pelas células em alta densidade, que também afeta a localização de FAK e a organização das fibras de actina. Contudo, a desfosforilação de FAK não deve ser vista como uma simples finalização do processo, uma vez que a migração celular requer tanto fosforilação quanto desfosforilação de FAK para que se efetue (XU & ZHAO, 2001).

A função das integrinas na diferenciação e regulação da expressão gênica tem se tornando aparente (SASTRY & HORWITZ, 1996). Menko e Boettiger (1987) mostraram que o tratamento de mioblastos com o anticorpo CSAT, o qual se liga à porção externa da molécula integrina e inibe a ligação de ambas fibronectina e laminina com integrina, bloqueava a diferenciação miogênica, uma vez que as células tratadas eram capazes de proliferar e não produziam miosina músculo-específica detectável e que o bloqueio na diferenciação miogênica ocorria anterior à fusão dos mioblastos. Além disso, o bloqueio da fusão celular pela remoção de cálcio não era afetado pela presença do anticorpo CSAT, demonstrando que não era a própria etapa de fusão afetada. Parece que a interrupção do ciclo celular é que era prevenida pela ligação de CSAT.

Estudos mostraram que o substrato colágeno aumenta a diferenciação de cultura primária de células musculares. Saitoh et al, 1992, mostraram que inibidores da síntese de colágeno, cis-4-Hidroxil-L-Prolina e dihidroxibenzoato, bloqueiam a diferenciação terminal de mioblastos C2C12 e que esta inibição era acompanhada pela deficiência de ativação dos genes reguladores de miogênese, MyoD1 e miogenina; sugerindo que colágeno não é apenas importante para a ligação celular mas também para a ativação de genes regulatórios do comprometimento à diferenciação celular .

A expressão ectópica de integrinas α5 ou α6 em mioblastos produz efeitos contrastantes na diferenciação muscular. Expressão ectópica de α5 inibe a diferenciação e mantém os mioblastos em proliferação enquanto que expressão de α6 inibe a proliferação mas não a diferenciação dos mioblastos. Interessantemente, supressão por antisense da expressão da subunidade α6 endógena em mioblastos inibe a diferenciação e promove a proliferação, sugerindo que a razão da expressão de integrinas pode modular a resposta a fatores decrescimento e, assim, afetar a decisão de uma célula proliferar ou diferenciar (SASTRY & HORWITZ, 1996).

Estudos também mostraram que os proteoglicanos, componentes da MEC, como moduladores da atividade de fatores de crescimento e críticos para o controle da miogênese. Osses & Brandan (2002) mostraram que o tratamento de células C2C12 com inibidores da síntese de proteoglicanos abolia a expressão de creatina quinase, sendo esta inibição totalmente revertida com a adição de MEC exógena; além de afetar o número e comprimento dos miotubos que eram induzidos na diferenciação. Contudo, este tratamento não abolia a expressão de MyoD, MEF2 e miogenina e sua localização nuclear. Ainda, o bloqueio da função das integrinas com anticorpos específicos ou peptídeos RGD mostrou inibir completamente a diferenciação, independente da expressão de miogenina e sua localização. Deste modo, eles mostraram que nem a expressão de miogenina nem sua localização no núcleo eram suficientes para acionar o processo de diferenciação miogênica. A interferência na interação entre integrinas e componentes da MEC pode afetar a diferenciação terminal sem inibir a expressão de miogenina ou afetar sua localização.

No mesmo estudo, Osses & Brandan (2002) mostraram que um decréscimo na atividade da FAK na presença de inibidores de síntese de proteoglicanos que era revertido pela adição MEC exógena, sugerindo que na ausência de organização da MEC, a sinalização das integrinas via FAK era inibida, conseqüentemente impedindo a diferenciação do músculo esquelético.

1.8- OBJETIVOS

A presença de MEC é essencial para a condução da miogênese e pode exercer influência através de interações diretas com as integrinas. Como FAK pode-se associar a um grande número de moléculas de sinalização celular, seus aspectos moleculares sugerem seu envolvimento numa ampla variedade de mudanças fenotípicas das células que estão associadas com a sinalização por integrinas. Assim, é nossa hipótese de que FAK é importante no processo de diferenciação de mioblastos C2C12 em miotubos. Para testar esta hipótese, avaliaremos no presente estudo: 1) a expressão e atividade de FAK durante a diferenciação miogênica de células C2C12 e 2) a capacidade da expressão induzida de FAK inativa inibir a miogênese e, assim, o aparecimento de miotubos C2C12.

OBJETIVO: Avaliar a importância da quinase de adesão focal (FAK) no processo de diferenciação miogênica em cultura de células C2C12.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1- Avaliar a expressão, atividade e localização de FAK durante o processo de diferenciação miogênica em células C2C12.

2- Avaliar o curso temporal da expressão de miogenina durante o processo de diferenciação miogênica em células C2C12.

3- Avaliar o efeito da transformação das células C2C12 com a construção pRcCMV-mycFAK-F397 (FAK mutada no resíduo tirosina 397) durante o processo de diferenciação miogênica, tanto na expressão de miogenina como na estrutura celular.

METODOLOGIA

2.1- CULTURA DE CÉLULAS

Foi utilizada a linhagem celular C2C12 (ATCC#CRL-1772) proveniente de músculo esquelético de camundongo C3H.

As células C2C12 foram cultivadas em meio de cultura composto por DMEM (Nutricell) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Nutricell), em garrafas de cultura mantidas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C.

Ao atingirem 70% de confluência, para não perder a população mioblástica pela confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos a 1.400 rpm. O pellet foi homogeneizado em meio de cultura, as células foram contadas, com o corante de exclusão azul de tripan, em câmara de Newbauer e plaqueadas na densidade de 10^4 céls/mL.

2.2- ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Caracteristicamente as células C2C12 diferenciam-se em miotubos quando cultivadas em meio pobre em fatores de crescimento. No presente estudo, as células C2C12 foram plaqueadas em placas de cultivo de células Bioflex, cuja base é constituída por uma membrana de silicone, na densidade de 10^4 céls/mL. Após 48 horas de plaqueamento, quando os mioblastos atingiram 70% de confluência, o meio de cultura foi aspirado. As células foram lavadas com PBS 0,2M e adicionou-se meio de diferenciação (MD) composto por DMEM (Nutricell) acrescido de 2% soro eqüino (Gibco) e 0,5% de penicilina-steptomicina (Nutricell). As células foram mantidas neste meio de diferenciação por períodos variando de 8 horas a 6 dias, sendo o meio trocado diariamente.

2.3- TRANSFECÇÃO E CONSTRUÇÃO MT-FAK

2.3.1- Vetor de expressão da Quinase de Adesão Focal (FAK)

Para avaliar a importância da quinase de adesão focal na diferenciação dos mioblastos C2C12 em miotubos, foi feita a transfecção com o plasmídeo contendo a construção do genótipo mutado da Fak (Tirosina 397 - fenilalanina): pRcCMV-mycFAK-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

F397 (dominante negativo), cedido pelo Dr. Steven K. Hanks (Vanderbilt University Scholl of Medicine).

A seqüência da FAK foi clonada em vetor pBluescript-II acoplada ao promotor de citomegalovírus (CMV). Para a obtenção da proteína mutada, o códon correspondente à tirosina 397 foi substituído por uma fenilalanina. Além disso, a construção possue um epítopo c-myc, o que permite avaliar a localização celular e o padrão de expressão da enzima nas células transformadas, de forma independente da FAK endógena. O mapa do plasmídeo com a construção da FAK é apresentado na figura 7.

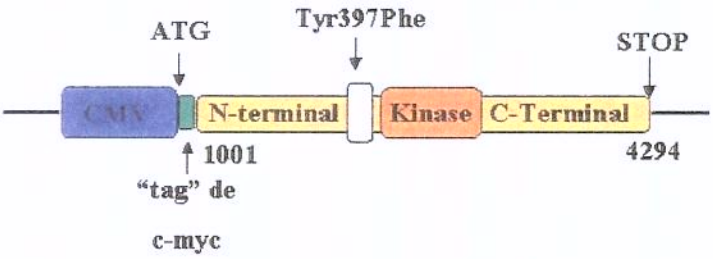


Figura 7- Esquema mostrando a construção com o gene da FAK. ATG indica o sitio de início da transcrição; CMV indica o promotor de Citomegalovírus; N- e C-terminal indicam os domínios correspondentes na proteína; Tyr397Phe indica a mutação no sítio de autofosforilação; Kinase indica o domínio catalítico correspondente na proteína e STOP indica o fim da transcrição.

2.3.2- Transfecção das células C2c12

As células foram plaqueadas em placas de cultivo Bioflex, na densidade de 10^4 céls/mL. Após 24 horas de plaqueamento, os mioblastos foram transfectados. Para cada poço de 35mm, foram incubados 2μg de DNA, 2μL de Lipofectamina (Invitrogen) em 50μL de DMEM sem antibiótico por 45 minutos, em temperatura ambiente, para a formação dos complexos DNA-lipossoma. Durante este período, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 800μL de DMEM sem antibiótico em cada poço da placa. Após a incubação, adicionaram-se 50μL da solução de transfecção em cada poço, diretamente sobre as células, e a transfecção prosseguiu por 2 horas, de acordo com

Dodds, Dunckley, Naujoks et al., 1998; em estufa de CO_2 a 37°C. Para finalizar a transfecção, foram adicionados 1,5mL de DMEM acrescido de 15% SFB e 1,5% de antibióticos em cada poço, sem a remoção da solução de transfecção.

Após 24 horas da transfecção, foi feita a extração das proteínas e RNA controles e a troca do meio de cultura para o meio de diferenciação. As amostras de proteína e RNA foram retiradas num período de até 6 dias de cultura em meio de diferenciação. Para manter o nível de expressão elevado da proteína FAK mutada nas células, a cada 48 horas foi feita uma nova transfecção. A figura 8 mostra o curso temporal do experimento.

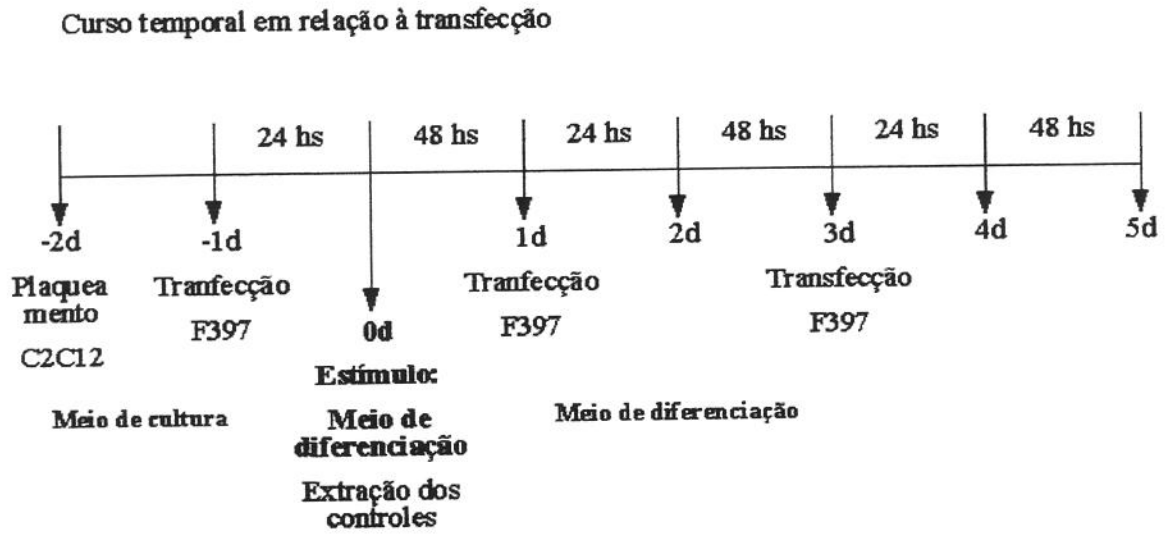


Figura 8- Curso temporal do experimento utilizando a construção MT-FAK.

2.4- EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS

As células foram lavadas com PBS e removidas das placas de cultivo em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) e lisadas pela passagem em agulha ultra fina.

Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry.

Após quantificação das proteínas, 400µL de amostra acrescida de 100µL de tampão de Laemmli (0,0625M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e 0,015g de DTT, foram aquecidos a 100°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

2.5- COIMUNOPRECIPITAÇÃO

As células foram lavadas com PBS e removidas das placas de cultivo em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) e lisadas pela passagem em agulha ultra fina. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para a imunoprecipitação. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry. De acordo com o valor obtido, a mesma quantidade de proteínas das amostras foi utilizada. 15µL do anticorpo monoclonal c-myc (Santa Cruz Biotechnology) foram adicionadas ás amostras estas foram incubadas durante toda a noite a 4°C. Após este período, foram adicionados 30µL de proteína G plus (Oncogene) e as amostras foram incubadas por mais 2 horas a 4°C e logo após centrifugadas a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para sedimentar a agarose. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 3 vezes com 1mL de tampão de lavagem (100mM Tris-HCl pH7.5; 1mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio) e centrifugado a 4°C, 11000 rpm, por 5 minutos.

Após a última lavagem, adicionaram-se 25µL de solução de Laemmli (100µL Laemmli; 0,015g DTT; 50µL água) a cada amostra e estas foram fervidas por 5 minutos

a 100°C. Após spin, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida e as proteínas foram analisadas por western blotting.

2.6- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY

Este método foi escolhido por ser mais sensível e preciso em amostras de baixa concentração protéica e cada amostra foi analisada em triplicata.

Neste método, a cada 1mL de solução C foram adicionados 10µL de amostra e os tubos de ensaio foram incubados por 10 minutos protegidos da luz. Após este período, adicionaram-se 50µL *Folin Cicauteau* e as amostras foram incubadas por mais 30 minutos protegidas da luz. Após esta última incubação, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660nm.

Para o cálculo de concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina bovina (Sigma), variando concentrações de 5,5 µg/µL a 0,5 µg/µL, e os valores de absorbância obtidos das amostras foram comparados para adquirir a concentração de proteínas correspondente.

Solução A: 2% Na_2CO_3; 0,1N NaOH

Solução B_1: 1% $CuSO_4$

Solução B_2: 2% NaK tartarato

Solução C: para cada 1 mL de solução A, adicionar 100µL de solução B_1 e100µL de solução B_2.

2.7- WESTERN BLOTTING

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 10%, utilizando-se o aparelho de eletroforese BIO-RAD miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca); em tampão de corrida (4X: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina).

A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V, em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

A membrana foi incubada por 45minutos, a temperatura ambiente, em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos e depois lavadas por 15 minutos em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-FAK (diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) e anti-pFAK 397 (diluição 1:2000, BioSource) em tampão de anticorpo (3% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante toda a noite, a 4°C.

Após serem lavadas por 15 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas com 5µCi de [^{125}I] Proteína A (30µCi/Ug) em 10 ml de tampão de iodo (1% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) por 6 horas, em temperatura ambiente, para a imunodetcção. Após este período, as membranas foram novamente lavadas por 15 minutos em solução basal e postas para secar a temperatura ambiente.

A proteína A [^{125}I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

2.7.1- Quantificação e Normalização.

As bandas dos filmes de western blotting foram quantificadas por densitometria óptica através do software Scion. Na análise da expressão de FAK ativa (pFAK), foi utilizado o valor lido de pFAK normalizado pelo valor de FAK.

2.8- RT-PCR

Para a extração de RNA total das células C2C12 em cultura utilizou-se TRIZOL® (Invitrogen), que é uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato.

2.8.1- Extração de RNA

As células C2C12 foram lisadas nas placas de cultivo utilizando-se 1mL do reagente Trizol e pela passagem em ponteira. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente da amostra, adicionou-se 200µL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente. As amostras foram então centrifugadas a 4°C, 12.000g, por 15 minutos. Após a centrifugação, houve a separação das fases: a mais densa, orgânica, contendo DNA genômico; uma intermediária, contendo proteínas; e a superior aquosa, contendo o RNA. Apenas fase aquosa foi coletada.

À fase aquosa, foram adicionados 500µL de isopropanol, para a precipitação do RNA total, e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 12.000g, por 10 minutos. Após a centrifugação, formou-se um pellet de RNA e o isopropanol foi descartado. Para a lavagem do pellet, o RNA foi ressuspenso em 1mL de etanol 75% e centrifugou-se novamente a 4°C, 12.000g, por 5 minutos. O etanol foi descartado e os pellets postos para secar e posteriormente armazenados em biofreezer.

O RNA foi eluído em 16µL de água RNase-free por 10 minutos a 56°C e quantificado em espectrofotômetro a 260nm.

2.8.2- Avaliação da Integridade do RNA

Após a quantificação, 0,25µg do RNA total foi submetido a eletroforese em gel desnaturante:

- 0,5g de agarose,
- 36mL de água DEPC
- 5mL de MOPS 10X,
- 9mL de formaldeído.

Cada uma das amostras teve seu volume completado até 5µL com água DEPC. Foi adicionado 19,5µL de MFF (MOPS 10X, 12.3M formaldeído e formamida).

As amostras foram incubadas a 55°C por 15 minutos. Foram adicionados 5μL de FLB (formaldeído loading buffer com brometo de etídeo) e as amostras foram aplicadas no gel.

As amostras foram submetidas à eletroforese com voltagem de 5V/cm, durante 3 horas. Após a corrida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado.

A figura 9 mostra um gel representativo de bandas de RNA que, quando íntegro, apresenta bandas de RNA ribossômico: 28S (4,7Kb), 18S (1.9Kb) e 4-5S (0,1-0,15 Kb), sendo a última banda difícil de visualizar.

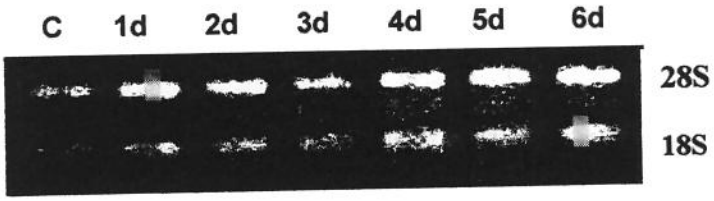


Figura 9- Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total. Células C2C12 submetidas a ensaio de diferenciação por período de 1 a 5 dias. Observa-se as bandas de 18S e 18S.

2.8.3- Reação de Transcrição Reversa

Nesta etapa, foi produzida uma fita molde cDNA ("template") a partir do RNA. O protocolo utilizado envolveu a seleção do mRNA poliA, através do anelamento ao oligonucleotídeo polidT, e o uso da enzima de transcrição reversa SuperSriptII (Invitrogen).

Inicialmente foram adicionados em um eppendorf:

- 1μL de oligo dT 500μg/mL (Gibco)
- 1-5μg de RNA total
- H_2O DEPC para volume total de 12μL.

As amostras foram incubadas em banho seco por 10 minutos a 70°C. Logo após foram rapidamente postas em gelo em foram adicionados:

- 2μL de DTT 0,1M (Invitrogen)
- 4μL de *First strand buffer 5x* (Invitrogen)
- 1μL de dNTP mix 10mM (Invitrogen)

As amostras foram incubadas por 2 minutos a 42°C. Para a síntese da fita de cDNA, foi adicionado 1μL da transcriptase *Superscript II* e as amostras foram incubadas a 42°C por 50 minutos. A atividade da enzima foi inibida ao final da reação pelo aquecimento a 70°C por 15 minutos.

Para eliminar os resíduos de RNA, as amostras foram tratadas com 1μL de RNAse A (2U) por 20 minutos a 37°C.

2.8.4- PCR

O cDNA obtido na reação de RT-PCR foi utilizado em posteriores reações de PCR para miogenina e β-actina. Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos mostrados na tabela 1.

Tabela 1- Seqüência dos oligonucleotídeos para miogenina e β-actina utilizados nas reações de PCR.

Oligonucleotídeo	**Seqüência 5'-3'**
Miogenina antisense	GGA ATT CGA ATA ATA TGA
Miogenina sense	CCT TAA AGC AGA CAT CC
β-actina antisense	TTC TAC AAT GAG CTG AGT GTG GCT
β-actina sense	CGT TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA

Para a reação de PCR foram adicionados:

- 5μL de *PCR buffer 10X* (Promega)
- 3μL $MgCl_2$ 25mM (Promega)
- 1μ dNTP mix 10mM (Invitrogen)
- 1μL oligonucleotídeo sense 10μM (Invitrogen)
- 1μL oligonucleotídeo antisense 10μM (Invitrogen)
- 2μL cDNA
- 0,4μL de Taq polimerase (Promega).
- 36,6μL de H_2O milliQ

2.8.4.1- Miogenina

Para a PCR da miogenina foram realizados 30 ciclos, com temperatura de anelamento de 53°C e tempo de extensão da fita de DNA de 1 minuto. A reação consistiu em desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento com temperatura específica, extensão a 72°C por um minuto e um ciclo adicional a 72°C por cinco minutos para corrigir eventuais falhas na seqüência.

O fragmento resultante foi submetido a gel de eletroforese 2% com brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA; pH 8,5), e visualizados com luz ultra-violeta em 130pb.

2.8.4.2- β-actina

Para a PCR da β-actina foram realizados 30 ciclos, com temperatura de anelamento de 42°C e tempo de extensão da fita de DNA de 2 minutos. A reação consistiu em desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento com temperatura específica, extensão a 72°C por um minuto e um ciclo adicional a 72°C por cinco minutos para corrigir eventuais falhas na seqüência.

O fragmento resultante foi submetido a gel de eletrofores 1% com brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA; pH 8,5), e visualizados com luz ultra-violeta em 400pb.

2.8.4.3- Quantificação e normalização.

As bandas dos géis de PCR foram quantificadas por densitometria óptica através do software Scion. Na análise da expressão de miogenina, foi utilizado o valor lido de miogenina normalizado pelo valor da β-actina (padrão interno).

2.9- COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

Para avaliar a morfologia das células C2C12 nos diferentes estados de proliferação e diferenciação, foi feita a coloração hematoxilina-eosina (HE).

As células C2C12 foram lavadas com PBS 0,2M e fixadas com metanol por 15 minutos a -20°C. Após o período de fixação, foram lavadas rapidamente 2 vezes com água destilada.

Adicionou-se hematoxilina de Harris e a lâmina foi incubada por 3 minutos a temperatura ambiente e logo após lavada 3 vezes e incubada por 10 minutos com água destilada a temperatura ambiente para melhorar o contraste.

Após esta incubação, a lâmina foi incubada em eosina por 5 minutos e então lavada 3 vezes com água destilada.

Para montar a lâmina, segui-se um processo de desidratação pela passagem em bateria de álcoois (70%, 80%, 95%, 2x 100%) e xilol (1 e 2) e utilizou-se entellan.

2.10- MICROSCOPIA CONFOCAL

Para avaliar a localização e distribuição da FAK nas células C2C12 foi realizada a microsopia confocal.

As células C2C12 foram lavadas rapidamente com PBS 0,2M e fixadas diretamente nas placas de cultivo Flexercell com 1mL de solução de paraformaldeído 4% e sacarose 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após o período de fixação, foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M a temperatura ambiente, e as membranas de silicone foram recortadas.

Para o bloqueio das reações inespecíficas e permeabilização das células, as membranas foram incubadas em solução de leite desnatado 3% e triton 0,6% por 1 hora. Logo após foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M a temperatura ambiente.

Para a imunomarcação, as células foram incubadas com anticorpos primários policlonais anti-FAK N-terminal (Santa Cruz Biotechnology), anti-pFAK 397 (Biosource), na diluição 1:75; ou anti-c-myc (Santa Cruz Biotechnology), na diluição 1:50; em solução de leite desnatado 1%, durante toda a noite a 4°C.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M a temperatura ambiente; e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit biotinilado (Amersham), na diluição 1:250; ou anti-mouse biotinilado (Santa Cruz Biotechnology), na diluição 1:400; em solução de leite desnatado 1% por 2 horas. Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M e incubadas com streptoavidina conjugada a Cy2 e faloidina conjugada a rodamina (Sigma), ambos na diluição 1:500 em PBS, por 45 minutos.

As membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,2M e montadas em lâminas de vidro utilizando-se Vectashield (Vecta). As lâminas foram observadas com microscópio confocal a laser modelo Zeiss LSM 510.

RESULTADOS

3.1- CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CÉLULAS C2C12 NOS ESTÁGIOS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO INDUZIDA POR SORO EQÜINO.

Para a análise das características fenotípicas de células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação, mioblastos C2C12 foram plaqueados na densidade de 10^4 céls/mL em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. Após 48 horas, quando atingiram 70% de confluência, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se meio de diferenciação (soro eqüino 2%, sem soro fetal bovino). As células foram mantidas em cultura por 5 dias, sendo o meio de diferenciação trocado diariamente. A partir do terceiro dia, os miotubos já podiam ser observados.

Durante o processo de diferenciação miogênica, os mioblastos retiram-se do ciclo celular e posteriormente fundem-se em miotubos multinucleados. Durante os primeiros dias em cultura, antes do aparecimento dos miotubos, são observadas células com citoplasma e núcleo aumentados em relação às células em proliferação. Na Figura 10 são apresentados exemplos representativos de células C2C12 coradas com HE e com faloidina conjugada a rodamina observadas em microscopia convencional e confocal, respectivamente, nos estágios de proliferação e diferenciação.

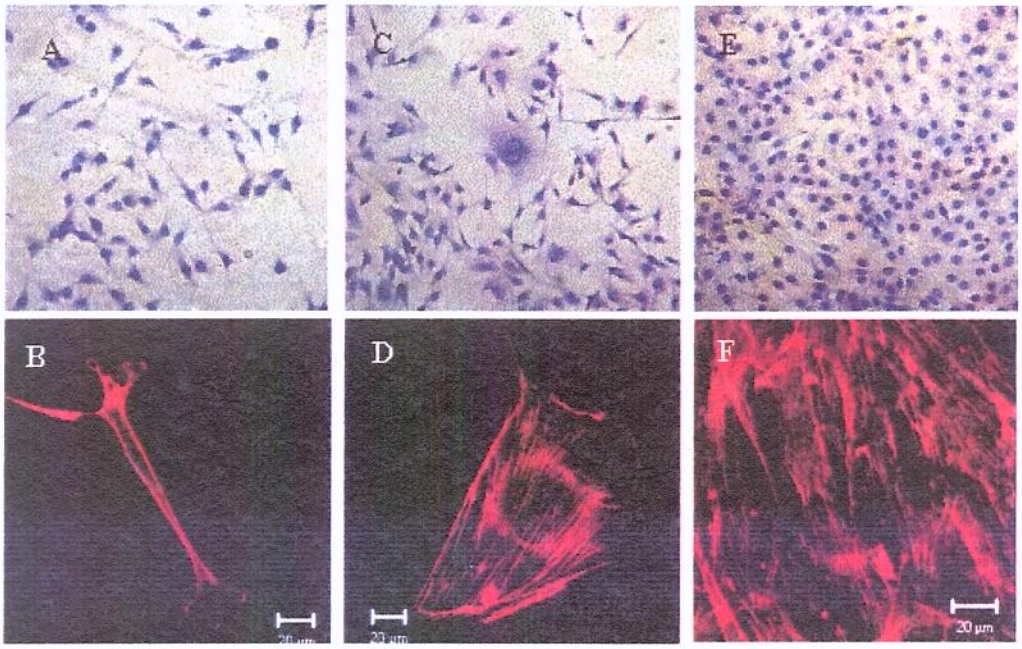


Figura 10- Exemplos representativos de células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação. A, B-proliferação; C, D-8 horas de diferenciação; E, F-5d de diferenciação.

Como demonstrado na figura 10A, os mioblastos são células pequenas, com morfologia semelhante à dos fibroblastos, que em meio de cultura rico em mitógenos mantém-se em proliferação. Quando atigem a confluência, algumas células entram em diferenciação terminal pelo contato célula-célula. Assim, a cultura foi mantida em cerca de 70% de confluência para evitar a perda da população de mioblastos. Assim, foi possível observar que os mioblastos emitem prolongamentos para manter contato com células próximas. Além disso, estas células apresentam características do processo de migração celular, como demonstrado pela presença de lamelipodios (figura 10B).

Após as primeiras horas em meio de diferenciação, as células C2C12 modificam-se, apresentando citoplasma esparso e núcleo aumentado (figura 10C). A presença de lamelipodios já não é mais constante (figura 10D). A análise por microscopia confocal permite observar que, em relação aos mioblastos em proliferação, estas células passam a apresentar fibras de tensão de actina bem organizadas.

Após 3 dias em cultura, os miotubos começam a se formar. Os miotubos caracterizam-se pela presença de núcleos enfileirados, formando sincícios que se organizam de forma semelhante às fibras musculares (figura 10E). A figura 10F ilustra um exemplo representativo dos miotubos corados com faloidina conjugada a rodamina e observados em microscopia confocal. Nota-se que os miotubos possuem mais actina e são células mais alongadas que os mioblastos em proliferação. Além disso, não se observam os prolongamentos característicos de células em migração.

3.2- EXPRESSÃO DA MIOGENINA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO MIOGÊNICA DE CÉLULAS C2C12

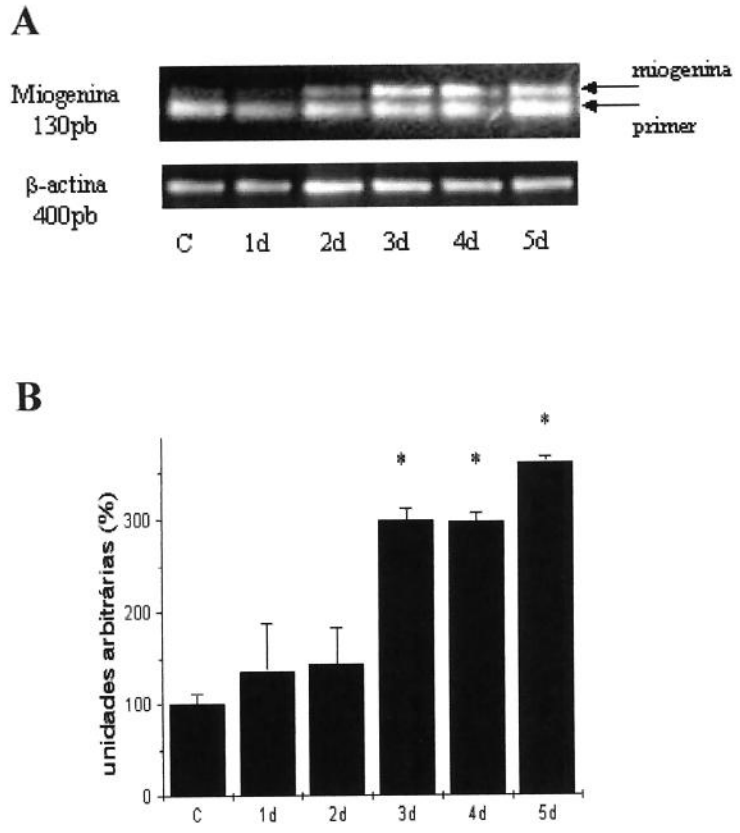
O aparecimento de miogenina em células C2C12 indica o início do processo de diferenciação miogênica. Assim, estudamos o curso temporal de expressão de miogenina no modelo de miogênese de células C2C12 empregado.

Para isso, os mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de cultura Bioflex na densidade de 10^4 céls/mL, em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. Após 48 horas, quando atingiram 70% de confluência, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se meio de diferenciação. As células foram mantidas em cultura por 5 dias, sendo o meio de diferenciação trocado diariamente.

Mioblastos em proliferação que não foram estimulados com soro eqüino, no início do experimento, foram utilizados como controle. Células em diferenciação foram coletadas a cada dia de cultura, até o quinto dia, para extração de RNA. O RNA total foi submetido a eletroforese em gel desnaturante para verificar sua integridade. Em seguida, utilizamos a reação de transcrição reversa e amplificação (RT-PCR) com os oligonucleotídeos específicos para avaliar a expressão de miogenina. Como controle interno utilizamos β-actina, de acordo com Lehtinen, Rahkila, Helenius et al., 1996.

Os resultados das reações de RT-PCR (figura 11), demonstram que a expressão basal de miogenina é discreta nas células em proliferação e aumenta de maneira expressiva

no terceiro dia de diferenciação e permanece aumentada em cerca de 3,6 vezes até o quinto dia, comparada com as células em proliferação.



Figuras 11 A- Exemplos representativos de produtos de RT-PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para miogenina e β-actina realizados com células em proliferação (C) e diferenciação (1d-5d).

B- Valores percentuais médios (n=3) obtidos de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para miogenina normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para β-actina. * $P<0,05$

3.3- EXPRESSÃO, ATIVIDADE E LOCALIZAÇÃO DA FAK EM CÉLULAS C2C12 DURANTE A DIFERENCIAÇÃO MIOGÊNICA

3.3.1- Expressão e atividade de FAK

Para avaliar a importância a importância da FAK no processo de diferenciação de células C2C12 inicialmente examinamos sua expressão e atividade nos estágios de proliferação e diferenciação através de western blotting e microscopia confocal. Mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de cultura Bioflex após 48 horas foi adicionado meio de diferenciação. Os mioblastos em proliferação que não foram estimulados com soro eqüino, no início do experimento, foram utilizados como controle.

Células em proliferação e nos diferentes dias de diferenciação foram extraídas e seus homogenatos separados em SDS-PAGE 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunomarcadas com anticorpo primário anti-FAK (porção N-terminal) ou anti-p-FAK (Tyr 397) e reveladas com I^{125}.

Como demonstrado na figura 12, durante a diferenciação miogênica, a expressão de FAK não varia significativamente. Contudo, a fosforilação no resíduo 397 da FAK e, portanto, sua atividade, mostra um comportamento bifásico: diminui nos primeiros 10 minutos de diferenciação e aumenta discretamente já no primeiro dia de cultura em meio de diferenciação. A análise da atividade da FAK (pFAK) normalizada pela quantidade de total de FAK indicou diminuição de cerca de 50% na atividade durante o período curto inicial (figura 12A) e aumento de 2 vezes na atividade após o terceiro dia de diferenciação (figura 12B).

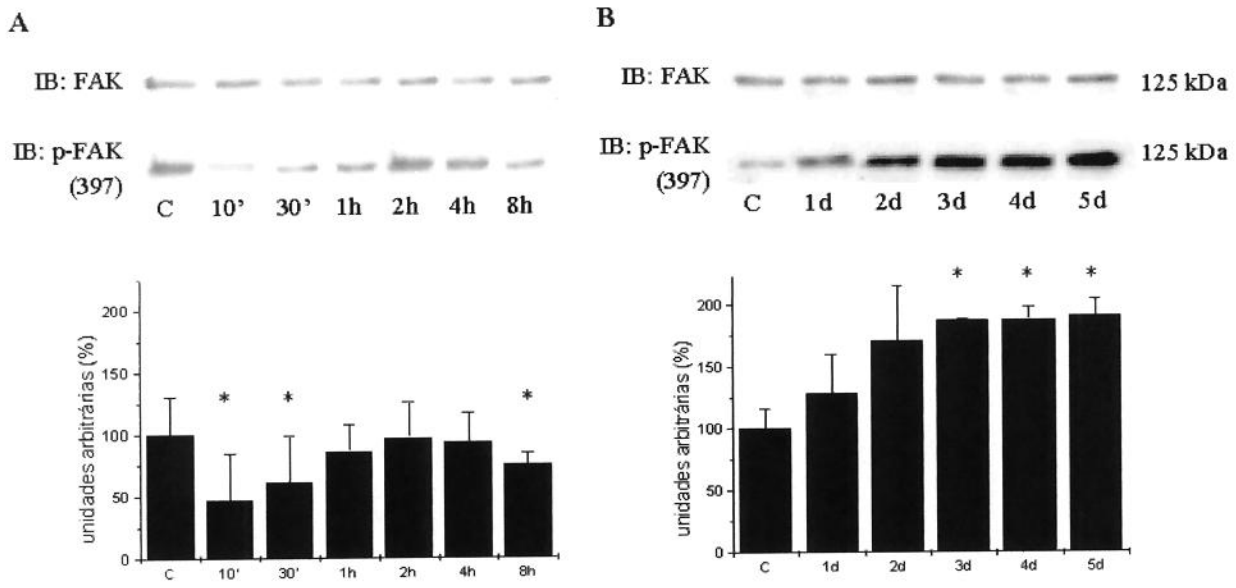


Figura 12A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de C2C12 e anticorpos anti-FAK e anti-fosfo-FAK (pFAK).

B- Valores percentuais médios (n=4) da quantidade de proteínas marcadas com pFAK normalizada pela quantidade de FAK em células C2C12 em proliferação (C) e diferenciação (1d-5d). * P<0,05

3.3.2- Localização da FAK e pFAK em células C2C12

Para avaliar a localização da FAK nas células C2C12 foi empregada a microscopia confocal. Células C2C12 foram marcadas com anticorpo primário anti-FAK direcionado à porção N-terminal, revelado com Cy2 e faloidina conjugada a rodamina. A faloidina tem afinidade pela actina celular, definindo os filamentos e permitindo avaliar a localização subcelular da FAK. A figura 13 ilustra exemplos representativos das células C2C12 em proliferação, 30 minutos, 8 horas e 5 dias de diferenciação. Controles negativo não apresentaram fluorescência significativa no comprimento de onda de leitura do fluoróforo Cy2 (figura não mostrada).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

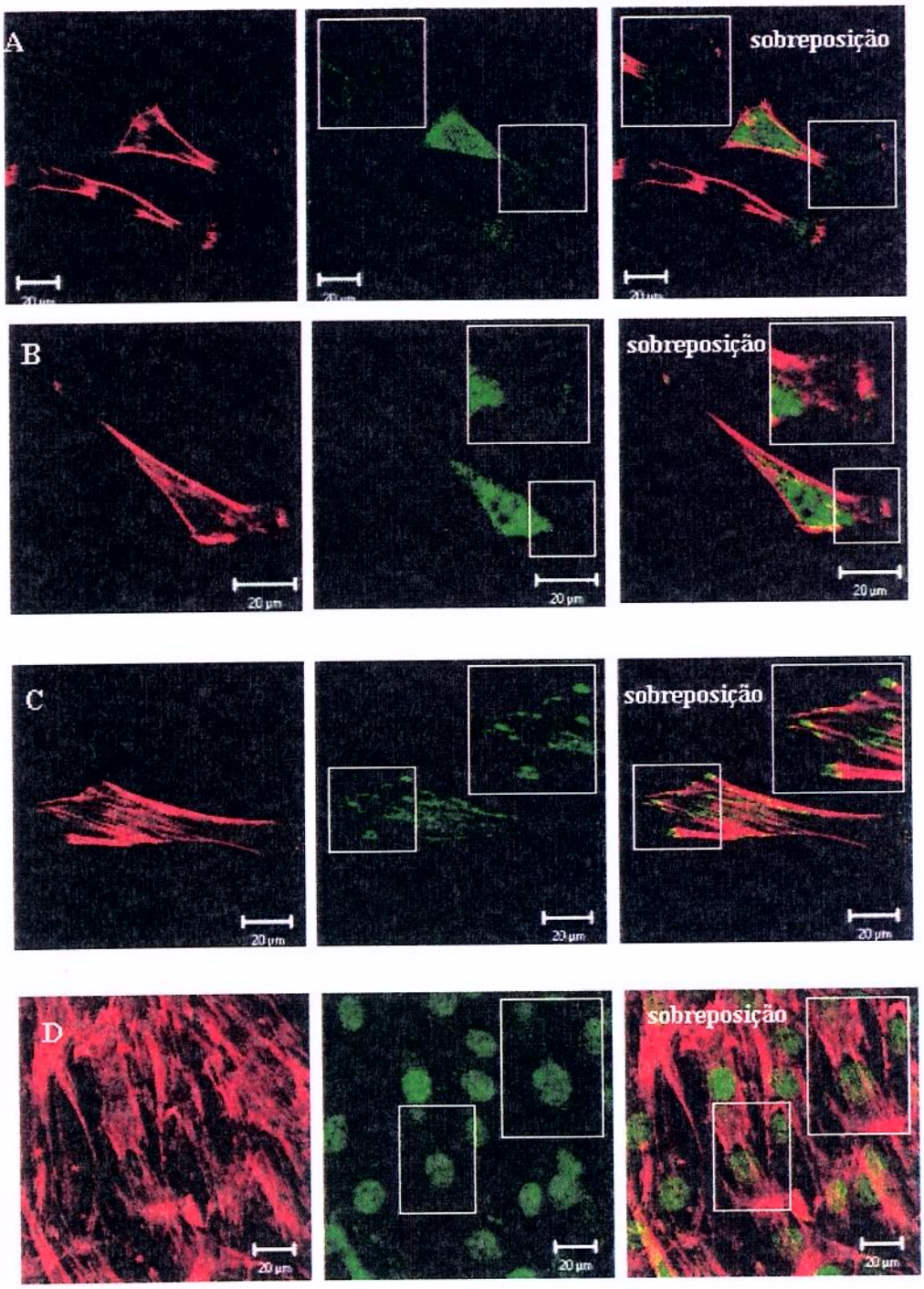


Figura 13- Localização de FAK nas células C2C12. As células foram marcadas com anticorpo primário anti-FAK direcionado à porção N-terminal e faloidina conjugada a rodamina. As áreas em amarelo correspondem a regiões de colocalização de FAK e faloidina. A- proliferação, B- 30 minutos de diferenciação, C- 8 horas de diferenciação, D- 5 dias de diferenciação.

Como indicado na figura 13A, nas células em proliferação, a FAK encontrava-se distribuída mais densamente na região perinuclear e na periferia celular, especialmente nos lamelipodios, como adesões em forma de pontos presentes nas extremidades destas estruturas. Após 30 minutos em meio de diferenciação (figura 13B), tanto a morfologia quanto a distribuição de FAK nas células C2C12 não apresentavam mudanças significativas quando comparadas às células em proliferação. FAK ainda era expressa amplamente nestas células, contudo, havia uma diminuição na marcação com o anticorpo anti-FAK nos lamelipodios. Após 8 horas em meio de diferenciação (figura 13C), as células C2C12 apresentavam citoplasma e núcleo aumentados, sem lamelipodios detectáveis. FAK apresentava-se predominantemente na região perinuclear, sendo ausente no núcleo. É notável a marcação com anticorpo anti-FAK nas extremidades das fibras de tensão de actina. No quinto dia de diferenciação (figura 13D), a FAK localizada homogeneamente por todo o citoplasma, mas também no núcleo celular. Em análise mais detalhada, pode-se observar também a distribuição da marcação em pontos específicos da periferia, compatíveis com a marcação em complexos de adesão focal. É interessante notar que algumas células que permanecem indiferenciadas, não apresentam marcação nuclear de FAK (figura não mostrada).

Sabe-se que a FAK é ativada em associação com a agregação das integrinas e localiza-se nos complexos de adesão focal das células em cultura (HYNES, 1992). Para avaliar a localização da FAK ativada, células C2C12 foram tratadas do modo já descrito anteriormente e marcadas com anticorpo anti-p-FAK específico para o resíduo tirosina 397, principal sítio de autofosforilação da FAK, e também com faloidina conjugada a rodamina. Na figura 14 são apresentados exemplos representativos destas células em proliferação, 8 horas e 5 dias de diferenciação.

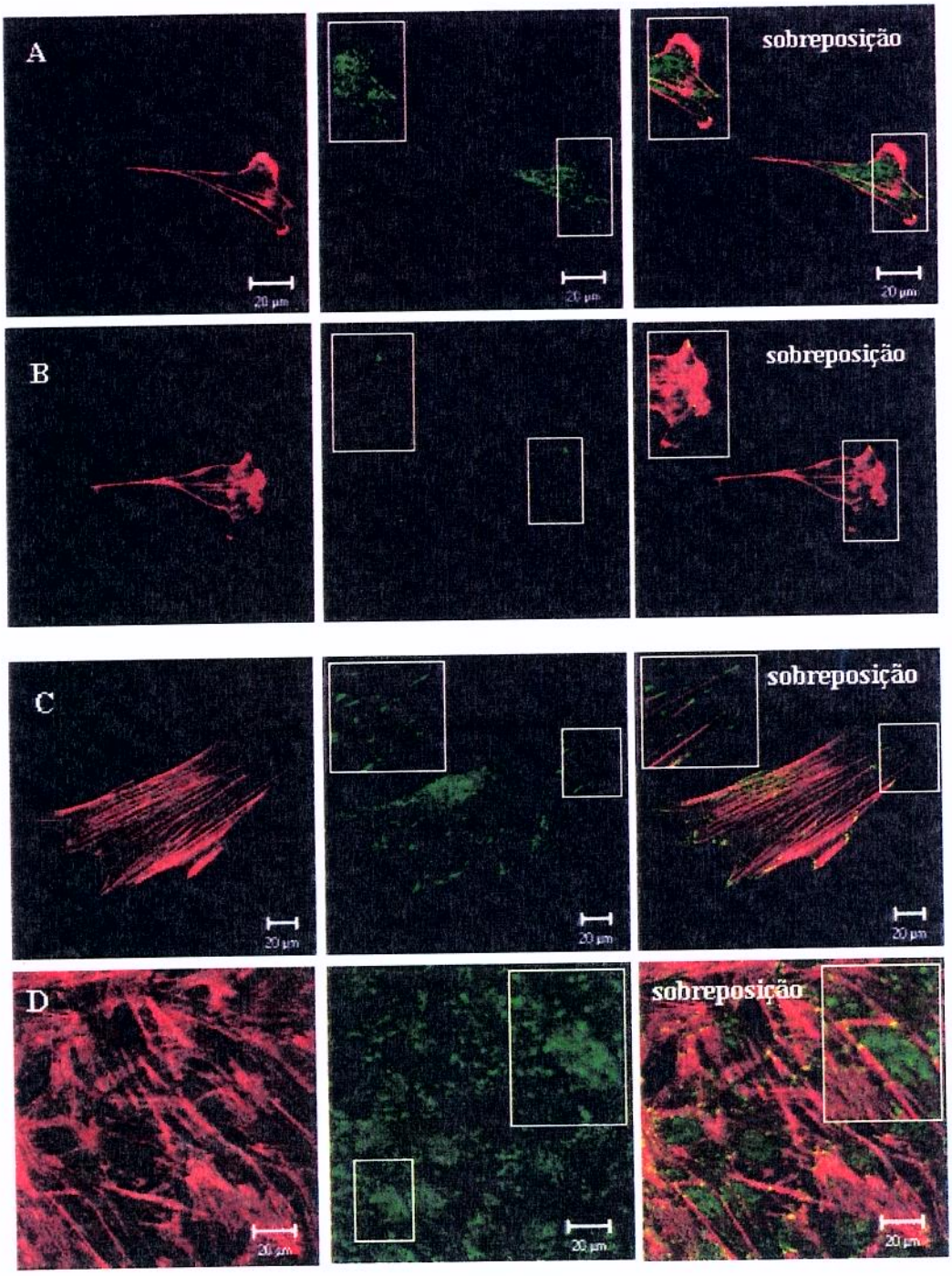


Figura 14- Localização de p-FAK nas células C2C12. As células foram marcadas com anticorpo primário anti-p-FAK (Tyr-397) direcionado à porção N-terminal e faloidina conjugada a rodamina. As áreas em amarelo correspondem a regiões de colocalização de FAK e faloidina. A- proliferação, B- 30 minutos de diferenciação, C- 8 horas de diferenciação, D- 5 dias de diferenciação.

Nos mioblastos em proliferação (figura 14A), a marcação com anticorpo anti-p-FAK era coincidente com as áreas de distribuição de FAK, localizando-se na região perinuclear e nos lamelipodios. Após 30 minutos em meio de diferenciação, havia uma redução significativa na localização de pFAK nos lamelipodios das células C2C12 (figura 14B). Após 8 horas em meio de diferenciação (figura 14C), a marcação também foi coincidente com a marcação de FAK nas extremidades dos fibras de tensão de actina. Nos miotubos (figura 14D), após 5 dias de diferenciação, houve marcação expressiva do anticorpo anti-p-FAK em regiões com aparência de adesão focal, ao longo dos filamentos de actina e no núcleo celular.

3.4- EFEITO DA TRANSFECÇÃO COM MT-FAK (TYR 397-ALA) NA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS C2C12

3.4.1- Detecção de MT-FAK

Para avaliar o papel da FAK na diferenciação de mioblastos em miotubos, células C2C12 foram transfectadas com o vetor de expressão contendo construção de mutante de FAK obtido pela troca da seqüência codificadora do resíduo de tirosina 397 por seqüência codificadora de fenilalanina. A proteína codificada por esta construção é inativa por causa desta mutação.

Para a transfecção da construção MT-FAK nas células C2C12, 24 horas após o plaqueamento, as células foram transfectadas com o plasmídeo pRcCMV-mycFAK-F397, que contém a construção MT-FAK. Após 24 horas da transfecção, as células foram estimuladas a se diferenciar. Para detectar a transfecção das células C2C12, foram extraídos homogenatos das células transfectadas e não-transfectadas (controle) em 1 de cultura em meio de diferenciação. Os homogenatos foram imunoprecipitados com o anticorpo c-myc uma vez que a proteína MT-FAK possui um marcador de c-myc na região N-terminal permitindo a detecção de sua expressão apenas nas células transfectadas com expressão efetiva de MT-FAK. Após a separação das protéinas por SDS-PAGE 10% e transferência para membrana de nitrocelulose; as membranas foram marcadas com anticorpo anti-FAK

direcionado à porção C-terminal, uma vez que o "tag" de c-myc está localizado na região N-terminal e poderia prejudicar a especificidade do anticorpo, e reveladas com I^{125}, como demonstra a figura 15.

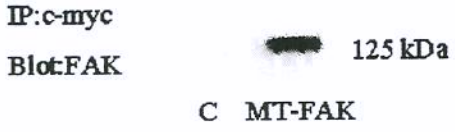


Figura 15- Blot representativo de imunoprecipitação de homogenatos de células C2C12 com anticorpo anti-c-myc e blotadas com anticorpo anti-FAK (C-terminal). C- células controle (não transfectadas), MT-FAK-células transfectadas com a construção de MT-FAK.

Como indicado no exemplo da figura 15, em células transfectadas é possível recuperar quantidade considerável de FAK pela imunoprecipitação com anticorpo anti-c-myc indicando não apenas a eficiência da transfecção mas também a capacidade do plasmídeo expressar a proteína.

Além disso, foram realizados western blotting com anticorpo anti-FAK. As células foram mantidas em cultura por 3 dias para avaliar os períodos de efetividade no aumento da expressão de FAK. Extrato de proteínas foram obtidos em diferentes tempos até o terceiro dia de diferenciação. As proteínas foram então separadas por SDS-PAGE 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunomarcadas com anticorpo primário anti-FAK e reveladas com I^{125}.

Como demonstra a figura 16, após 48 horas da transfecção (1 dia em meio de diferenciação), a expressão de FAK estava aumentada cerca de 3 vezes em relação às células controle não transfectadas. Porém, esta expressão não se mantém após este período. Assim, optamos por realizar nova transfecção das células a cada 48 horas em cultura (detalhado em materiais e métodos).

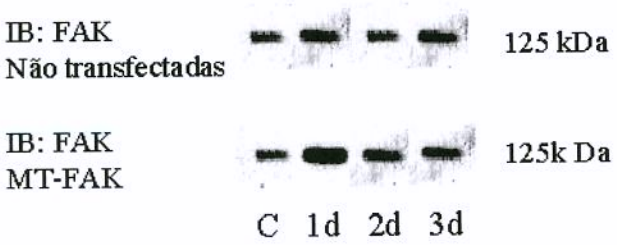
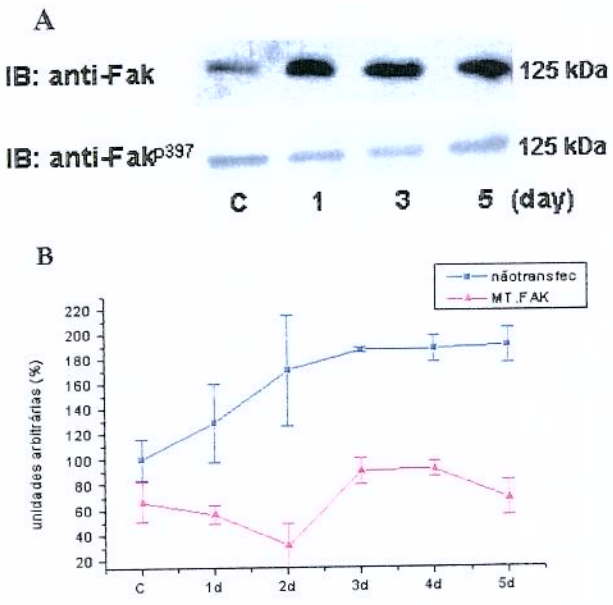


Figura 16- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de C2C12 e anticorpo anti-FAK. C- controle (células em proliferação), MT-FAK-células transfectadas com a construção MT-FAK, d-dias de diferenciação.

A figura 17 ilustra essa abordagem. A expressão de FAK nas células transfectadas com a construção de MT-FAK aumenta cerca de 6 vezes em relação ás células não transfectadas em meio de diferenciação. Porém esta diferença de expressão diminui gradativamente. A análise da atividade de p-FAK (397) normalizada pela quantidade de FAK total mostra que há um decréscimo de cerca de 3 vezes na atividade de FAK, evidenciando a eficiência da expressão de MT-FAK em reduzir a ativação de FAK ao longo do período de diferenciação.



Figuras 17A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de células C2C12 não tratadas e transfectadas com os anticorpos anti-FAK e anti-fosfo-FAK (pFAK).

B- Valores percentuais médios (n=2) de pFAK normalizado pela quantidade de FAK em células C2C12 em proliferação (C) e diferenciação (1d-5d). MT-FAK-dominante negativo da FAK.

Foi realizada microscopia confocal em células C2C12 transfectadas com MT-FAK, como descrito anteriormente, e diferenciadas por 1 dia (48horas de transfecção). As células foram marcadas com anticorpo anti-pFAK (397) conjugado a Cy2 e faloidina conjugada a rodamina. Na figura 18 é apresentado exemplo representativo destas células, confirmando a eficiência da redução da ativação de FAK através da expressão induzida de MT-FAK.

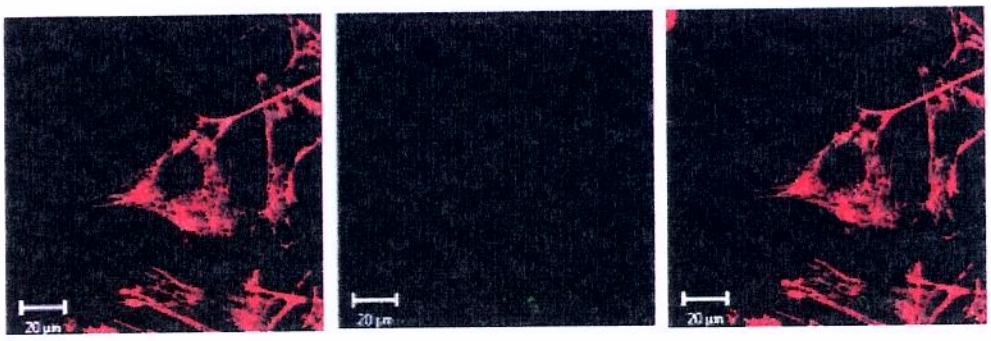


Figura 18- Exemplo representativo de células C2C12 transfectadas com MT-FAK e cultivadas por 1 dia em meio de diferenciação. A células foram marcadas com anticorpo anti-pFAK (397) e faloidina conjugada a rodamina.

Além disso, para confirmar a transfecção, foi realizada microscopia confocal em células C2C12 transfectadas com MT-FAK, como descrito acima, e cultivadas por 5 dias em meio de diferenciação. As células foram marcadas com anticorpo primário anti-c-myc, revelado com Cy2, e faloidina conjugada a rodamina. A proteína MT-FAK possui um "tag" de c-myc que permite avaliar sua localização celular. Como indicado na figura 19, há uma predominância na distribuição de MT-FAK na região perinuclear e não há marcação nuclear. Pode-se observar que a expressão induzida de FAK inativa impediu o aparecimento de miotubos.

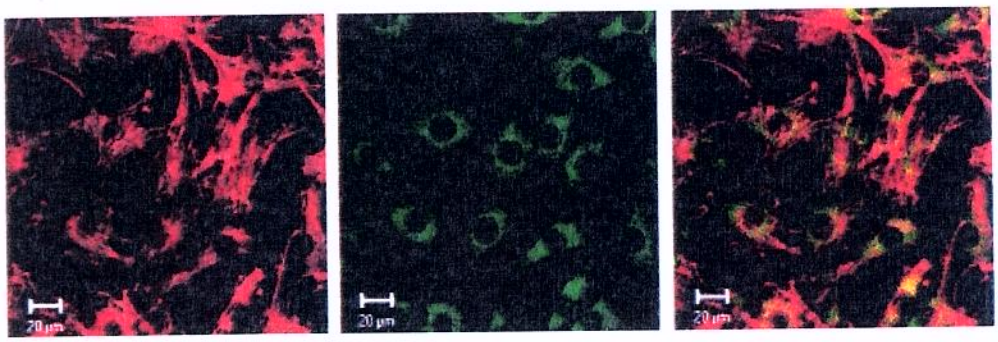
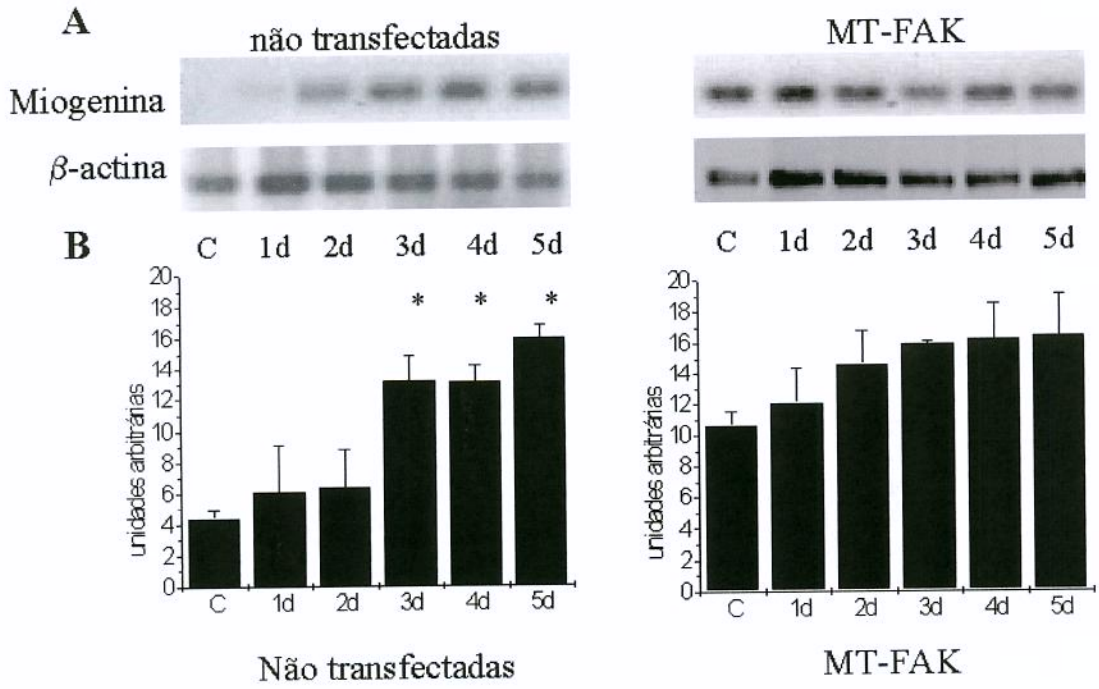


Figura 19- Exemplo representativo de células C2C12 transfectadas com MT-FAK e cultivadas por 5 dias em meio de diferenciação. As células foram marcadas com anticorpo anti c-myc e faloidina conjugada a rodamina. As áreas em amarelo correspondem a regiões de colocalização de MT-FAK e faloidina.

3.4.2- Efeito da MT-FAK na expressão de miogenina

Em seguida, avaliamos o efeito da expressão de MT-FAK na expressão de miogenina durante a diferenciação miogênica das células C2C12. Para tanto, utilizamos o mesmo protocolo anterior e amostras de RNA foram extraídas nos vários estágios e submetidas a RT-PCR com oligonucleotídeos para miogenina e β-actina.



Figuras 20A- Exemplos representativos de produtos de RT-PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para miogenina e β-actina realizados com células não transfectadas e transfectadas com MT-FAK.

B- Valores percentuais médios (n=2) obtidos de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para miogenina normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para β-actina em células C2C12 não transfectadas e transfectadas com MT-FAK. C- controle (células em proliferação), MT-FAK- células transfectadas com a construção MT-FAK, d-dias de diferenciação.

A análise das amplificações (figura 20) revela que nas células em proliferação transfectadas com MT-FAK, o nível de RNAm da miogenina, normalizada por β-actina, apresentava-se elevado cerca de 3 vezes em relação às não transfectadas. Contudo, miogenina falhava em aumentar sua expressão durante a progressão da diferenciação.

3.4.3- Características fenotípicas das células C2C12 transfectadas com MT-FAK

Para avaliar o efeito da transfecção com MT-FAK sobre as alterações estruturais das células C2C12 foi realizada coloração hematoxilina-eosina (HE), analisada por microscopia convencional. Para controle, foi utilizada uma cultura de células C2C12 diferenciadas por 5 dias não transfectadas.

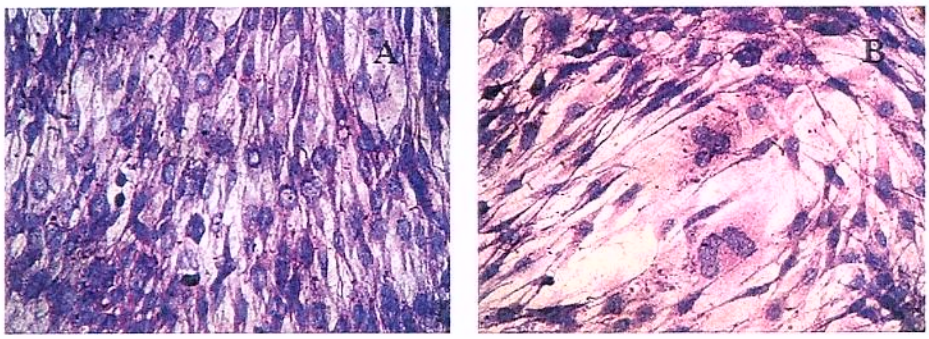


Figura 21- Exemplos representativos das células C2C12 não transfectadas e transfectadas com MT-FAK em 5 dias de cultura em meio de diferenciação. As células foram coradas com HE e analisadas por microscopia convencional. A- células não transfectadas; B- células transfectadas com MT-FAK.

Como mostrado na figura 21, a transfecção com MT-FAK não impediu a organização direcional das células porém poucos miotubos estão presentes além de serem menores que o controle. Observa-se a presença de células com citoplasma e núcleo maiores.

DISCUSSÃO

Em anos recentes ocorreu grande progresso no nosso entendimento dos mecanismos de controle envolvidos na regulação do complexo fenômeno da miogênese. Esta regulação ocorre através de múltiplas etapas de sinalização que regulam, em última instância, a atividade de fatores de transcrição reguladores da miogênese (MRFs) primários e secundários. Os fatores primários Myf5 e MyoD – são necessários para o comprometimento, proliferação e sobrevivência dos mioblastos, enquanto os fatores secundários – Miogenina e MRF4 – controlam o programa de diferenciação terminal dos mioblastos em miotubos (YUN & WOLD, 1996). Além de um melhor entendimento da seqüência de eventos de sinalização e controle da expressão gênica, está também bem estabelecido que a presença de fatores de crescimento (e.g. FGF, IGF e TGF-β) é fundamental para a proliferação e sobrevivência de células em estágio de mioblastos, sendo sua ausência determinante crítico para a diferenciação celular (BUCKINGHAM, 2001). Por outro lado, são inúmeras as evidências de que contato com a matriz extracelular tem importância tanto para a proliferação e sobrevivência celulares como para a miogênese e trofismo de células diferenciadas em miotubos e músculo esquelético (BUCK & HORWITZ, 1987; MELO, CAREY & BRANDAN, 1996; OSSES & BRANDAN, 2002; MAYER, 2003). Neste contexto, várias são as demonstrações de que membros da família das Integrinas, os principais efetores do contato célula-matriz extracelular, têm papel fundamental tanto na proliferação de mioblastos como na miogênese (SASTRY, LAKONISHOK, WU et al., 1999; MAYER, 2003). No entanto, os mecanismos de sinalização que medeiam estes efeitos são ainda pouco conhecidos.

No presente estudo, avaliamos a importância da ativação da quinase de adesão focal (FAK), o principal efetor da sinalização mediada por integrinas (HANKS, CALALB, HARPER et al., 1992; BURRIDGE & CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999), no processo de miogênese de mioblastos de camundongo da linhagem celular C2C12. Nossos resultados indicam que a ativação da quinase de adesão focal tem papel crítico para a regulação do processo de miogênese destas células. Três achados principais sustentam esta conclusão: 1) o comportamento bifásico da fosforilação do resíduo de tirosina 397 da quinase de adesão focal em células C2C12

submetidas a tratamento com meio de diferenciação pobre em fatores de crescimento, caracterizado por um período curto inicial (primeiras 8 horas) de redução na fosforilação no resíduo de tirosina 397, seguido de aumento sustentado (até 5 dias) na fosforilação deste resíduo na células em diferenciação terminal; 2) expressão elevada do fator de transcrição miogenina, o principal articulador da expressão do programa de diferenciação terminal, nas células C2C12 em proliferação com expressão induzida do mutante de FAK inativo pela substituição do resíduo de tirosina 397 por fenilalanina e, 3) a atenuação marcada da fusão celular e formação de miotubos das células C2C12 com expressão induzida do mutante inativo da FAK.

De maneira geral, estes resultados estão de acordo com observações anteriores de que a atividade da FAK, indicada pelo nível de fosforilação do resíduo de tirosina 397, apresenta comportamento bifásico durante o processo de diferenciação (GOEL & DEY, 2002a, 2002b, 2002c), sendo caracterizado por inibição nas primeiras horas seguido de ativação sustentada nos dias seguintes. No entanto, nem os estudos anteriores ou o atual elucidam a causa deste comportamento para o processo de diferenciação dos mioblastos em miotubos.

Pode-se especular que a inibição inicial da atividade da FAK decorre da retirada súbita dos fatores de crescimento quando o meio de cultura é substituído por meio próprio para a diferenciação. Sabe-se que a atividade da FAK é regulada por sinais do ambiente através da adesão celular e por fatores de crescimento e agonistas (e.g. angiotensina II e endotelina) de receptores acoplados à proteína G (GPCR – G protein coupled receptors), sendo lhe atribuída a função de coordenação de respostas celulares a sinais de natureza mecânica e humoral (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; JULIANO, 2002).

Dados disponíveis indicam que a ativação transiente da FAK seja pela adesão, seja pela ação de fatores crescimento, estimula vias de sinalização celular que controlam as ciclinas responsáveis pela manutenção das células em proliferação (GILMORE & ROMER, 1996; SCHWARTZ & ASSOIAN, 2002). Por outro lado, evidências experimentais também indicam que a ativação da FAK ativa vias de sinalização responsáveis pela sobrevivência

celular e inibição de mecanismos de ativação das vias celulares que culminam com a apoptose (GERVAIS, THORNBERRY, RUFFOLO et al., 1998; ALAHARI, REDDIG & JULIANO, 2002; HANKS, RYZHOVA, SHIN et al., 2003).

Em mioblastos C2C12, Sastry, Lakonishok, Wu et al. (1999), demonstraram que a expressão ectópica da forma ativada da FAK - CD2-FAK (construção híbrida de FAK e domínio transmembrana da CD2) promove a proliferação e inibe a diferenciação. Da mesma forma, estudos em que se transfectaram construções contendo os domínios citoplasmáticos de integrina α_5 e β_1 reproduziram estes resultados, demonstrando a importância da conexão matriz-integrina e complexo de adesão focal para a proliferação e sobrevivência de mioblastos. Por outro lado, a hiper-expressão da isoforma α_{6A} da integrina reduz a fosforilação da FAK e promove a retirada de células C2C12 do ciclo celular (SASTRY, LAKONISHOK, WU et al., 1999). Da mesma forma, a transformação de mioblastos com a construção inativa CD2-FAKY397F, inibe a proliferação e promove a diferenciação miogênica. Estes resultados são compatíveis com a idéia de que a atividade basal da FAK é relativamente elevada em mioblastos em proliferação e que sua inibição está associada à retirada das células do ciclo celular e diferenciação terminal.

De maneira geral, esta conclusão é conflitante com os resultados do presente estudo que indicam que a inibição da ativação da FAK em células tratadas com meio de diferenciação, através da expressão de MT-FAK, acompanha-se de inibição da diferenciação terminal de mioblastos em miotubos. De acordo com dados anteriores de nosso laboratório (TORSONI, CONSTÂNCIO, NADRUZ JÚNIOR, 2003), a proteína FAK mutada no resíduo tirosina 397 expressa de maneira induzida em células em cultura pode agir como um dominante negativo, uma vez que MT-FAK deve competir nos sítios de adesão focal com a FAK ativa endógena. No entanto, não foi possível em nossa abordagem experimental verificar se a inibição da atividade da FAK endógena de células C2C12 interferiu ou não na proliferação e sobrevivência das células C2C12.

A causa para a discrepância entre os resultados do presente estudo aqueles de Sastry, Lakonishok, Wu et al. não é aparente. No entanto, deve-se observar que a

construção CD2-FAKY397F não eliminou completamente a proliferação celular. Além disso, a proteína híbrida codificada pela construção CD2-FAKY397F permanece ligada à membrana celular o que, provavelmente, interfere com sinais de adesão provocando efeitos diferentes e não previsíveis na sinalização celular quando comparados com os da FAK nativa que é uma proteína citosólica por natureza. Da mesma forma, este argumento poderia ser aplicado aos resultados obtidos com a construção CD2-FAK, que é constitutivamente ativa e localiza-se na membrana das células transformadas. Assim, mesmo a supressão dos fatores de crescimento, não deve provocar a diminuição da sua atividade, explicando a manutenção das células C2C12 transformadas com CD2-FAK no ciclo proliferativo.

Por outro lado, evidências mais recentes estão de acordo com a ativação da FAK em períodos mais tardios da diferenciação e sugerem que a FAK pode ter papel importante no processo de diferenciação miogênica (GOEL & DEY, 2002c, 2002b). Estudos de Wei, Zhou, Wang et al. (2000), demonstraram que a diferenciação de células C2C12 induzidas por construção ativa da RhoA e β1-Integrina acompanha-se de ativação da FAK e que o bloqueio desta ativação pelo fragmento c-terminal da FAK (FRNK) elimina a ativação RhoA-dependente do promotor da α-actina do músculo esquelético em células C2C12 em diferenciação.

Além disso, Osses & Bradan (2002) demonstraram que a ruptura da integridade da matriz extracelular pela inibição da síntese de proteoglicanos, através de tratamento com cloreto de sódio ou β-D-xilosídeo, diminui a autofosforilação da FAK no resíduo tirosina 397 em células C2C12, sem alterar a expressão da FAK. Da mesma forma a ruptura da matriz extracelular impediu a diferenciação de mioblastos em miotubos, apesar de não interferir com a expressão de miogenina. A reconstituição da matriz extracelular reverteu a ativação da FAK e a diferenciação dos mioblastos em miotubos. Nossos resultados mostraram que a expressão induzida de MT-FAK em células C2C12 induziu a expressão elevada de miogenina ainda nas células em proliferação, durante o processo de diferenciação miogênica, e aboliu substancialmente a fusão das células em miotubos. Estes resultados apesar de circunstanciais sugerem a importância da ativação da FAK mediada pela adesão celular para o processo de diferenciação de mioblastos em miotubos.

Mais recentemente, Goel & Dey (2002a) demonstraram que a diminuição da atividade da PKC resulta em aumento da expressão da miogenina e da creatina quinase em células C2C12 em diferenciação, efeito este associado a aumento na atividade da FAK, fosforilação da Cas e paxilina e aumento da atividade da via Cas-CrkII, que por sua vez é responsável pela ativação da JNK2, uma MAP quinase de reconhecida importância no processo de diferenciação em miotubos. Curiosamente, estes autores também demonstraram que nas células em proliferação a inibição da PKC, resultou em desfosforilação da FAK e Cas, resultando em diferenciação em miotubos, o que confirma a idéia de que a FAK apresenta comportamento bifásico durante o processo de diferenciação, com inibição inicial e ativação mais tardia.

Os mecanismos envolvidos na ativação tardia da FAK e a maneira pela qual esta ativação influencia a diferenciação são ainda desconhecidos. No entanto, pode-se especular que esta ativação tardia pode estar relacionada às forças mecânicas geradas pela adesão dos miotubos diferenciados à matriz extracelular. Esta idéia é corroborada pelos nossos achados obtidos com microscopia confocal que indicaram a presença de FAK fosforilada na tirosina 397 em regiões condizentes com a localização de complexos de adesão focal. Neste contexto, é interessante notar que resultados de estudos realizados em diferentes tipos celulares, incluindo miócitos cardíacos indicam a importância da FAK na tradução de estímulos mecânicos do ambiente para a célula (FRANCHINI, TORSONI, SOARES et al., 2000; WANG, DEMBO, HANKS et al., 2001; LI, BUTLER, WANG et al., 2002; DOMINGOS, FONSECA, NADRUZ JÚNIOR et al., 2002; SUSSMAN, MCCULLOCH & BORG 2002; TORSONI, CONSTÂNCIO, NADRUZ JÚNIOR et al., 2003). Neste contexto, estudos anteriores de nosso laboratório (FRANCHINI, TORSONI, SOARES et al., 2000; DOMINGOS, FONSECA, NADRUZ JÚNIOR et al., 2002; TORSONI, CONSTÂNCIO, NADRUZ JÚNIOR et al., 2003) demonstraram a importância da ativação da FAK para o crescimento hipertrófico de cardiomiócitos terminalmente diferenciados submetidos a estímulos mecânicos. Da mesma forma evidências experimentais obtidas em cardiomiócitos de ratos neonatos indicam a importância da FAK para a sobrevivência e crescimento hipertrófico induzido por fatores de crescimento (KOVACIC-MILIVOJEVIC, ROEDIGER, ALMEIDA et al., 2001;

HEIDKAMP, BAYER, KALINA et al., 2002). Estudos futuros, com abordagens específicas deverão esclarecer o possível papel da FAK para o processo de diferenciação terminal e manutenção trófica dos miotubos.

Apesar de nossos resultados indicarem que a ativação da FAK é importante para a diferenciação de mioblastos em miotubos, os mecanismos de sinalização regulados pela FAK e envolvidos neste processo não foram explorados no presente estudo. No entanto, evidências de diversas fontes indicam que a FAK pode ativar mecanismos de sinalização mediados por múltiplas MAP quinases (e.g. ERK1/2 e JNK) (HANKS, RYZHOVA, SHIN et al., 2003). Efeitos tróficos ativados por estas quinases poderiam ser os responsáveis pela manutenção da estrutura e diferenciação celulares dos miotubos. No entanto, são necessários estudos adicionais para verificar a importância destes mecanismos no contexto do presente estudo.

Ainda no contexto dos mecanismos pelos quais a FAK regula a diferenciação terminal das células C2C12 foi interessante o fato de que nas células diferenciadas a FAK foi encontrada no núcleo dos miotubos. A importância da localização da FAK para que sua função seja efetiva pode ser ainda inferida dos resultados obtidos por microscopia confocal de células C2C12 marcadas com anticorpo anti-FAK que revelaram a localização nuclear da FAK nos miotubos, mas não nas células nos estágios iniciais de diferenciação ou em proliferação. Apesar de não estar esclarecida a importância funcional desta localização pode-se concluir que a localização da FAK em locais outros que não o complexo de adesão focal e membrana celular pode contribuir para os efeitos da FAK em células diferenciadas.

A possível relação desta localização com o processo de diferenciação miogênica foi reforçada pelo achado de que células ainda não fundidas localizadas em meio aos miotubos não apresentavam marcação nuclear. Este fato elimina a possibilidade de se tratar de artefato provocado por inespecificidade do anticorpo e sugere que a migração da FAK ou um fragmento seu para o núcleo tenha função no controle da transcrição nos miotubos.

Este dado está de acordo com o resultado de estudos anteriores que demonstraram a presença de FAK no núcleo de células endoteliais da veia umbilical

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

e células de glioblastomas de humanos (LOBO & ZACHARY, 2000; ABU-GHAZALEH, KABIR, JIA et al., 2001; JONES, MACHADO & MERLO, 2001; STEWART, HAM & ZACHARY, 2002). De maneira geral, estes estudos demonstraram a localização nuclear de FAK e de um fragmento NH(2)-terminal de 50kDa expressos no núcleo de células transfectadas com construções codificadoras para as duas seqüências. No entanto, não conseguiram detectar no núcleo e sim no citoplasma, o fragmento de 55 kDa da porção C-terminal da molécula transfectado no mesmo tipo celular, indicando que a localização nuclear da FAK e do fragmento NH(2) terminal é dependente de resíduos desta porção e não da porção C-Terminal.

Apesar de ser surpreendente a localização da FAK no núcleo de miotubos, deve-se salientar que várias proteínas tradicionalmente descritas como proteínas de superfície e da matriz extracelular, como por exemplo o FGF e o heparan sulfato foram demonstradas localizar-se também em núcleos de células em atividade (RICHARD, YU, BLUMER et al., 1995; RICHARDSON, TRINKAUS-RANDALL & NUGENT; 2001). Neste contexto, é interessante notar, que não foi possível ainda detectar sequência de localização nuclear na FAK. Neste caso, a translocação da FAK para o núcleo poderia se dar através da ligação com outras proteínas portadoras de seqüência de localização nuclear e migrar para o núcleo. Uma possibilidade seria através da ligação com a Src. A proteína nuclear Sam68 interage com a Src que, por sua vez liga-se à FAK (RICHARDSON, TRINKAUS-RANDALL & NUGENT; 2001).

De maneira geral, estes resultados sugerem que não apenas a comunicação, mas também a interação direta entre as moléculas dos complexos de adesão focal pode ter papel crucial na regulação da expressão gênica durante a diferenciação celular. Nossos achados indicam que a quebra na sinalização de FAK induz a expressão de miogenina mas inibe a progressão das células C2C12 na diferenciação terminal. Um modelo é proposto, ilustrado na figura 21, no qual a inibição de FAK contribui para sinalizar o programa genético miogênico mas a redução persistente da sua atividade em células privadas de soro suprime a diferenciação terminal, provavelmente prejudicando a fusão celular.

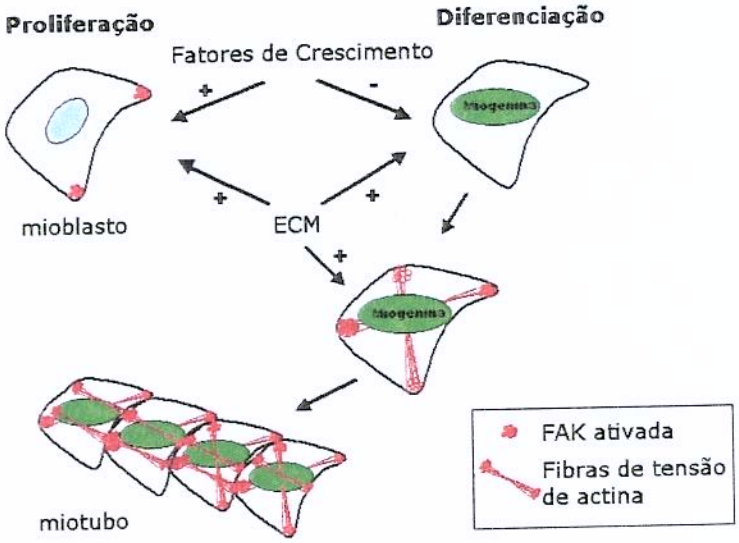


Figura 22- Modelo de diferenciação terminal de células C2C12, ilustrando a importância do comportamento bifásico da FAK durante a progressão da miogênese. + indica regulação positiva e – indica regulação negativa.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a quinase de adesão focal sofre regulação bifásica em células C2C12 submetidas a tratamento em meio indutor de diferenciação, sendo inicialmente desfosforilada no resíduo de tirosina 397 e posteriormente fosforilada neste resíduo, que presumivelmente acompanham-se de inibição e ativação desta enzima, respectivamente. A inibição da ativação da FAK através da expressão induzida da proteína FAK inativa no resíduo tirosina 397, acompanhou-se pela expressão elevada do fator secundário de transcrição, a miogenina, durante a fase inicial da diferenciação, bem como da abolição das alterações morfológicas características da diferenciação dos mioblastos em miotubos. O conjunto dos dados permite-nos concluir que a inibição na sinalização de FAK induz a expressão de miogenina mas inibe a progressão das células C2C12 na diferenciação terminal, indicando a importância crítica desta enzima no controle dos mecanismos que regulam o programa gênico de diferenciação nos mioblastos C2C12.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-GHAZALEH, R.; KABIR, J.; JIA, H.; LOBO, M.; ZACHARY, I.. "Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells". **Biochem J**, 360(Pt 1):255-64, 2001.

ADAMS, J.; WATT, F.. "Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix". **Development,** 117: 1183-98, 1993.

AGOCHIYA, M.; BRUNTON, V. G.; OWENS, D. W.; PARKINSON, E. K.; PARASKEVA, C.; KEITH, W. N.; FRAME, M. C.. "Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells". **Oncogene,** 18: 5646-53, 1999.

ALAHARI, S.; REDDIG, P.; JULIANO, R.. "Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors". **Int Rev Cytol**, 220:145-84, 2002.

ALLEN, R.; RANKIN, L.. "Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development". **P S E B M,** 194: 81-6, 1990.

ANDRÉS, V.; WALSH, K.. "Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis". **J Cell Biol**, 132 (4): 657-66, 1996.

ANDREUCCI, J.; GRANT, D.; COX, D.; TOMC, L.; PRYWES, R.; GOLDHAMER, D.; RODRIGUES, N.; et al. "Composition and function of AP-1 transcription complexes during muscle cell differentiation". **J Biol Chem**, 277(19): 16426-32, 2002.

BENGAL, E.; RANSONE, L.; SCHARFMANN, R.; DWARKI, V.; TAPSCOTT, S.; WEINTRAUB, H.;VERMA, I.. "Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association". **Cell**, 68: 507-19, 1992.

BORRADORI, L.; SONNENBERG, A.. "Hemidesmosomes: roles in adhesion, signalling and human diseases". **Curr Opin Cell Biol**, 8: 647-56, 1996.

BOUDREAU, N. J; JONES, P. L.. "Extracelular matrix and integrin signaling: the shape of things to come". **Biochem J,** 339: 481-8, 1999.

BUCK, C.; HORWITZ, A.. "Cell surface receptors for extracellular matrix molecules". **Annu Rev Cell Biol,** 3: 179-205, 1987.

BUCKINGHAM, M.. "Skeletal muscle formation in vertebrates". **Curr Opin Genet Dev,** 11: 440–8, 2001.

BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M.. "Focal adhesions, contractility, and signaling". **Annu Rev Cell Dev Biol**, 12: 463–519, 1996.

CARY, L. A.; CHANG, J. F.; GUAN, J-L.. "Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn". **J Cell Sci,** 109: 1787-94, 1996.

DODDS, E.; DUNCKLEY, M.; NAUJOKS, N.; MICHAELIS, U.; DICKSON, G.. "Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of lipofectamine and DOSPER". **Gene Therapy**, 5: 542-51, 1998.

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

ENGEL, A.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.. **Myology.** 2a. edição. New York: Ed. Mc Graw-Hill, 1994. p.3-118, v.1.

FLORINI, J.; EWTON, D.; MAGRI, K.. "Hormones, growth factors, and myogenic differentiation". **Annu Rev Physiol**, 53: 201-16, 1991.

FRANCHINI, K.; TORSONI, A.; SOARES, P.; SAAD, M.. "Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart". **Circ Res**, 87: 558-65, 2000.

FUJIO, Y.; GUO, K.; MANO, T.; MITSUUCHI, Y.; TESTA, J.; WALSH, K.. "Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival". **Mol Cell Biol**, 19(7): 5073-82, 1999.

GERVAIS, F.; THORNBERRY, N.; RUFFOLO, S.; NICHOLSON, D.; ROY, S.. "Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide". **J Biol Chem**, 273(27): 17102-8, 1998.

GIANCOTTI, F.; RUOSLAHTI, E.. "Integrin signaling". **Science,** 285: 1028–32, 1999.

GILMORE, A., ROMER, L.. "Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation". **Mol Biol Cell**, 7: 1209-24, 1996.

GOEL, H.; DEY, C.. "PKC-regulated myogenesis is associated with increased tyrosine phosphorylation of FAK, Cas, and paxillin, formation of Cas-CRK complex, and JNK activation". **Differentiation**, 70: 257-71, 2002a.

GOEL, H.; DEY, C.. "Focal ahesion kinase tyrosine phosphorylation is asssociated wiyh myogenesis and modulated by insulin". **Cell Prolif**, 35: 131-42, 2002b.

GOEL, H.; DEY, C.. "Insulin stimulates spreading of skeletal muscle cells involving the activation of focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal regulated kinases". **J Cell Physiol**, 193: 187-98, 2002c.

GU, W.; SCHENEIDER, J.; CONODORELLI, G.; KAUSHAL, S.; MANDAVI, V.; NADAL-GINARD, B.. "Interactions of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation". **Cell**, 72: 309-24, 1993.

HANKS, S.; CALALB, M.; HARPER, M.; PATEL, S.. "Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin". **Proc Natl Acad Sci, 89: 8487-91, 1992.**

HANKS, S.; RYZHOVA, L.; SHIN, N.; BRABEK, J.. "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility". **Front Biosci,** 8: D982-96, 2003.

HAUCK, C.; KLINGBEIL, C.; SCHLAEPFER, D.. "Focal adhesion kinase functions as a receptor-proximal signaling component required for direct cell migration". **Immunol Res,** 21(2-3): 293-303, 2000.

HEIDKAMP, M.; BAYER, A.; KALINA, J.; EBLE, D.;SAMAREL, A.. "GFP-FRNK disrupts focal adhesions and induces anoikis in neonatal rat ventricular myocytes". **Circ Res,** 90: 1282-9, 2002.

HOLLY, S.; LARSON, M.; PARISE, L.. "Multiple role of integrins in cell motility". **Exp Cell Res**, 261: 69-74, 2000.

HYNES, R. O.. "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion". **Cell,** 69: 11-25, 1992.

ILIC, D; KOVACIC, B.; MCDONAGH, S.; JIN, F.; BAUMBUSCH, C.; GARDNER, D.; DAMSKY, C.. "Focal adhesion kinase is required for blood vessel morphogenesis". **Circ Res,** 92: 300-7, 2003.

JONES, G.; MACHADO, J. JR; MERLO, A.. "Loss of focal adhesion kinase (FAK) inhibits epidermal growth factor receptor-dependent migration and induces aggregation of nh(2)-terminal FAK in the nuclei of apoptotic glioblastoma cells".**Cancer Res,** 61(13): 4978-81, 2001.

JONES, R. J.; BRUNTON, V. G.; FRAME, M. C.. "Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase". **Eur J Cancer,** 36: 1595-606, 2000.

JUDSON, P. I.; HE, X.; CANCE, W. G.; LE, L. VAN. "Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma". **Am Cancer Soc,** 86(6): 1551-6, 1999.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

JULIANO, R.. "Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members". **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 42: 283-323, 2002.

KORNBERG, L. J.. "Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis". **Head & Neck,** 20: 745-52, 1998.

KOVACIC-MILIVOJEVIC, B.; ROEDIGER, F.; ALMEIDA, E.; DAMSKY, C.; GARDNER, D.; ILIC, D.. "Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac and myocyte hypertrophy". **Mol Biol Cell**, 12: 2290–307, 2001.

LASSAR, A.; MÜNSTERBERG, A.. "Miring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis". **Curr Opin Cell Biol**, 6: 432-42, 1994.

LASSAR, A.; SKAPEK, S.; NOVITCH, B.. "Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal". **Curr Opin Cell Biol,** 6: 788-94, 1994.

LEHTINEN, S.; RAHKILA, P.; HELENIUS, M.; KORKONEN,P.; SALMINEN, A.. "Down-regulation of transcription factors AP-1, Sp-1, and NF-κB precedes myocite differentiation". **Biochem Biophys Res Commun,** 229: 36-43, 1996.

LI, S.; BUTLER, P.; WANG, Y.; HU, Y.; HAN, D.; USAMI, S.; GUAN, J-L.; CHIEN, S.. "The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells". **Proc Natl Acad Sci**, 99: 3546 – 51, 2002.

LOBO, M.; ZACHARY, I.. "Nuclear localization and apoptotic regulation of an amino-terminal domain focal adhesion kinase fragment in endothelial cells". **Biochem Biophys Res Commun**, 276:1068-74, 2000.

MAYER, U.. "Integrins: Redundant or Important Players in Skeletal Muscle?" **J Biol Chem,** 278: 14587-90, 2003.

MELO, F.; CAREY, D.; BRANDAN, E.. "Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression". **J Cell Biochem**, 62:227-39, 1996.

MENKO, S.; BOETTIGER, D.. "Ocuppation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation". **Cell**, 51:51-7, 1987.

MORAN, J.; LI, Y.; HILL, A.; MOUNTS, W.; MILLER. C.. "Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling". **Physiol Genomics**, 10: 103-11, 2002.

MURPHY-ULRICH, J.. "The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?". **J Clin Invest**, 107: 785-90, 2001.

NADAL-GINARD, B.. "Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA syntesis". **Cell**, 15: 855-64, 1978.

OSSES, N.; BRANDAN, E.. "ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression". **Am J Physiol Cell Physiol**, 282: C383-94, 2002.

OWEN, J.; RUEST, P.; FRY, D.; HANKS, S.. "Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2". **Mol Cell Biol**, 19(7): 4806-18, 1999.

PARSONS, J. T.; MARTIN, K. H.; SLACK, J. K.; TAYLOR, J. M.; WEED, S. A.. "Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement". **Oncogene**, 19: 5606-13, 2000.

PORRELLO, A.; CERONE, M.; COEN, S.; GURTNER, A.; FONTEMAGGI, G.; CIMINO, L.; PIAGGIO, G.; et al.. "p53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of pRb". **J Cell Biol**, 151(6): 1295-303, 2000.

REISKE, H. R.; ZHAO, J.; HAN, D. C.; COOPER, L. A.; GUAN, J.. "Analysis of FAK-associated signaling pathways in the regulation of cell cycle progression". **FEBS letters,** 486: 275-80, 2000.

RICHARD, S.; YU, D.; BLUMER, K.; HAUSLADEN, D.; OLSZOWY, M.; CONNELLY, P.; SHAW, A.. "Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C γ_1". **Mol Cell Biol,** 15: 186–97, 1995.

RICHARDSON, T.; TRINKAUS-RANDALL, V.; NUGENT, M.. "Regulation of heparan sulfate proteoglycan nuclear localization by fibronectin". **J Cell Sci,** 114: 1613–23, 2001.

RIDYARD, M. S.; SANDERS, E. J.. "Potential roles for focal adhesion kinase in development". **Anat Embryol,** 199: 1-7, 1999.

RODRÍGUES-FERNÁNDEZ, J. L.. "Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK?". **Bioessays**, 21: 1069-75, 1999.

SABOURIN, L.; RUDNICKI, M.. "Development biology: frontiers for clinical genetics". **Clin Genet**, 57:16-25, 2000.

SAITOH, O.; PERIASAMY, M.; KAN, M.; MATSUDA, R.. "Cis-4-hydroxil-L-proline and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate prevent myogenesis of C2C12 muscle cells and block MyoD1 and myogenin expression". **Exp Cell Res**, 200: 70-6, 1992.

SALAZAR, E.; ROZENGURT, E.. "Src family quinases are required for integrin-mediated but not for G-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autiphosphorylation at Tyr-397". **J Biol Chem**, 276(21): 17788-95, 2001.

SANDRI, M.; CARRARO, U.. " Apoptosis of skeletal muscle during development and disease". **Int J Biochem Cell Biol**, 31: 1373-90, 1999.

SASTRY,S.; HORWITZ, A.. "Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response". **Dev Biol**, 180:455-67, 1996.

SASTRY, S.; LAKONISHOK, M.; THOMAS, D.; MUSCHLER, J.; HORWITZ, A.. "Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation". **J Cell Biol**, 133:169-84, 1996.

SASTRY, S.; LAKONISHOK, M.; WU, S.; TRUONG, Q.; HUTTENLOCHER, A.; TURNER, C.; HORWITZ, A.. "Quantitative changes in integrin and focal adhesion signaling regulate myoblast cell cycle withdrawal". **J Cell Biol**, 144 (6): 1295-309, 1999.

SCHALLER, M. D.; PARSONS, J. T.. "Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase". **Trends Cell Biol**, 3: 258-62, 1993.

SCHALLER, M. D.; PARSONS, J. T.. "Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase". **Trends Cell Biol**, 3: 258-62, 1993.

SCHWARTZ, M.; ASSOIAN, R.. "Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways". **J Cell Sci**, 114: 2553 – 60, 2002.

SMITH, C.; KLAASMEYER, J.; WOODS, T.; JONES, S.. " Effects of IGF-I, IGF-II, bFGF and PDGF on the initiation of mRNA translation in C2C12 myoblasts and differentiating myotubes". **Tissue & Cell**, 31(4): 403-12, 1999.

SNOW, S.. "Satellite cell activity during hypertrophy of the rat soleus muscle following surgical ablation of the soleus synergists". **Anat Rec**, 214: 125A, 1986.

SONG, A.; WANG, Q.; GOEBL, M.; HARRINGTON, M.. "Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation". **Mol Cel Biol**, 18(9): 4994-9, 1998.

SQUILLACE, R.; CHENAULT, D.; WANG, E.. " Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR". **Dev boil**, 250: 218-30, 2002.

STEWART, A.; HAM, C.; ZACHARY, I.. "The focal adhesion kinase amino-terminal domain localises to nuclei and intercellular junctions in HEK 293 and MDCK cells independently of tyrosine 397 and the carboxy-terminal domain". **Biochem Biophys Res Commun**, 299(1): 62-73, 2002.

SUMMERS, P.; ASHMORE, C.; LEE, Y.; ELLIS, S.. "Stretch-induced growth in chicken wing muscles: role of soluble growth-promoting factors". **J Cell Physiol**, 125: 288-94, 1985.

SUSSMAN, M.; MCCULLOCH, A.; BORG, T.. "Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy". **Circ Res**, 91: 888-98, 2002.

TORSONI, A.; CONSTÂNCIO, S.; NADRUZ JÚNIOR, W.; HANKS, S.; FRANCHINI, K.. "Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrofic response to stretch in cardiac myocytes". **Circ Res**, 93: in press, 2003.

VAN DE WATER, B.; NAGELKERKE, J.; STEVENS, J.. "Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells". **J Biol Chem**, 274(19): 13328-37, 1999.

WANG, H-B.; DEMBO, M.; HANKS, S.; WANG, Y-L.. "Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration". **Proc Natl Acad Sci**, 98: 11295-300, 2001.

WEI, L.; ZHOU, W.; WANG, L.; SCHWARTZ, R.. "β1-Integrin and PI 3-kinase regulate RhoA-dependent activation of skeletal a-actin promoter in myoblasts". **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 278: H1736–43, 2000.

WEINTRAUB, H.. "The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds". **Cell**, 75: 1241-4, 1993.

XU, F.; ZHAO, Z. J.. "Cell density regulates tyrosine phosphorylation and localization of focal adhesion kinase". **Exp Cell Res**, 262: 49-58, 2001.

YEOW, K.; CABANE, C.; TURCHI, L.; PONZIO, G.; DÉRIJARD, B.. "Increased MAPK signaling during in vitro muscle wounding". **Biochem Biophys Res Commun**, 293: 122-9, 2002.

YI, X.; WANG, X.; GERDES, A.; LI, F.. "Subcellular Redistribution of Focal Adhesion Kinase and Its Related Nonkinase in Hypertrophic Myocardium". **Hypertension**, 41: 1317-23, 2003.

YOSHIDA, N.; YOSHIDA, S.; KOISHI, K.; MASUDA, K.; NABESHIMA, Y.. "Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'". **J Cell Sci**, 111: 769-79, 1998.

YUN, K.; WOLD, B.. "Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context". **Curr Opin Cell Biol**, 8: 877-89, 1996.

ZACHARY, I. "Focal Adhesion Kinase". **Int J Biochem Cell Biol**, 29(7): 929-34, 1997.

ZHANG, P.; WONG, C.; LIU, D.; FINEGOLD, M.; HARPER, J.; ELLEDGE, S.. "$p21^{CIP1}$ and $p57^{KIP2}$ control muscle differentiation at the myogenin step". **Genes Dev**, 13(2): 213-24, 1999.

ZHAO, J.; REISKE, H.; GUAN, J.. "Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase". **J Cell Biol**, 143(7): 1997-2008, 1998.