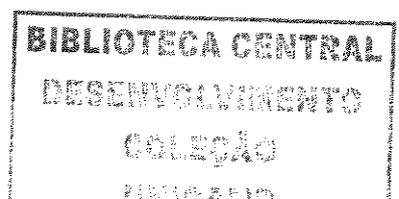


*Interação FAK/SHP-2 influencia na miogênese  
do músculo esquelético*

**ALUNO: Marcus Alexandre Finzi Corat**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini**



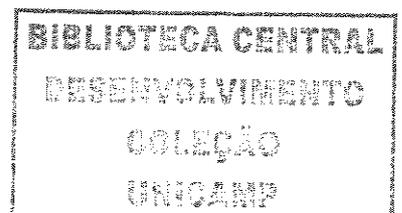
**MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT**

*Interação FAK/SHP-2 influencia na miogênese  
do músculo esquelético*

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini**

Tese apresentada à Universidade Estadual  
de Campinas – Faculdade de Ciências  
Médicas para obtenção do título de Doutor  
em Clínica Médica, área de concentração  
Ciências Básicas.

CAMPINAS  
2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TIUNICAMP C81i
V	EX
TOMBO BC/	05650
PROC.	16-06-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11.000
DATA	14-9-05
Nº CPD	

Bibrid 364801

C81i

Corat, Marcus Alexandre Finzi

Interação FAK/SHP-2 influencia na miogênese do músculo esquelético / Marcus Alexandre Finzi Corat. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Kleber Gomes Franchini

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

1. Miogênese. 2. Músculo esquelético. 3. Músculos - regeneração . 4. Desenvolvimento muscular. 5. Matriz extracelular. 6. Proteína -Tirosina Quinase. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

**Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado**

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

**Membros:**

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

*Kleber Franchini*

2. Prof(a). Dr(a). Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

*Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro*

3. Prof(a). Dr(a). Ana Maria Guaraldo

*Ana Maria Guaraldo*

4. Prof(a). Dr(a). Márcio Alberto Torsoni

*Márcio Alberto Torsoni*

5. Prof(a). Dr(a). Jorg Kobarg

*Jorg Kobarg*

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

**Data: 16/05/2005**

509.025.001.605

**Aos meus pais, à minha esposa e ao meu filho.  
Que me fizeram forte e me fazem feliz  
pelo simples fato de existirem.**

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini por ter me recebido e acolhido com respeito, amizade e segurança. Pela orientação e inestimável dedicação que foram indispensáveis para a minha formação científica e pessoal. Muito obrigado por você ter acreditado em mim e ter proporcionado oportunidades ímpares para o meu aprendizado e crescimento profissional.

À Profa. Dra. Ana Maria Guaraldo e ao Prof. Dr. Luis Augusto Correa Passos pela amizade e apoio na implantação de estruturas para produção de animais geneticamente modificados, por acreditarem no meu trabalho e pela disponibilização de espaço no CEMIB para realizações deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Costa, ao Prof. Dr. Mário Saad, ao Prof. Dr. Jorg Kobarg e à Profa. Dra. Wirla Tamashiro pela colaboração, respeito e disponibilidade de equipamentos para o melhor desenvolvimento da tese e do meu crescimento profissional.

Aos amigos do nosso laboratório por compartilhar momentos de alegria, de tensão, de discussões científicas, além da amizade e descontração em momentos de descanso. Em especial, agradeço à aluna de doutorado Carolina Clemente, aos técnicos Antônio e Jaqueline pelo competente apoio que me forneceram no desenvolvimento experimental.

Ao Departamento de Clínica Médica, a toda sua equipe e à agencia financiadora CAPES, que permitiram que este trabalho tenha se tornado realidade.

Aos amigos de outros laboratórios como CEMIB, GEMOCA, Genética Médica e Hemocentro que compartilharam comigo momentos de trabalho, descontração e amizade.

Aos meus pais Reinaldo e Marina e minhas irmãs Simone e Karen por acompanharem e participarem com cumplicidade, amor e vibração em todos os momentos de minha formação educacional e profissional.

Agradeço amplamente à força, dedicação, compreensão, apoio e amor da minha esposa Patrícia, sem o qual tudo seria mais difícil. E ao meu filho Rafael que participou nos últimos meses desta etapa com toda sua graça e alegria e me enobreceu emocionalmente. Emoções que um filho tem uma enorme facilidade em despertar em nossos corações rotineiros do dia-a-dia nos dando força e para continuar as nossas vidas com muita alegria.

E finalmente, à todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e para a minha formação pessoal e profissional.

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>xxv</b>
<b>1. Resumo.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Introdução.....</b>	<b>31</b>
3.1. Fatores de regulação miogênica (MRFs): relação hierárquica, sobreposição de funções, ativação na miogênese.....	34
3.2. Controle do ciclo celular e diferenciação miogênica.....	39
3.3. Hormônios e fatores de crescimento na diferenciação miogênica.....	41
3.4. Linhagens utilizadas para o estudo da miogênese <i>in vitro</i> .....	44
3.5. Papel da matriz extracelular no programa de diferenciação.....	47
3.6. FAK e sua importância no programa de miogênese.....	50
3.7. SHP-2 e sua importância no programa de miogênese.....	59
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>63</b>
4.1. Objetivos gerais.....	63
4.2. Objetivos específicos.....	63
<b>5. Metodologia.....</b>	<b>64</b>
5.1. Cultura de células.....	64
5.2. Ensaio de diferenciação celular.....	65
5.3. Extrato de proteínas totais.....	65
- Método de Lowry para quantificação de proteínas totais	

5.4. Coimunoprecipitação.....	67
5.5. Western blotting.....	68
5.6. RT-PCR (“Reverse transcription- Polimerase Chain Reaction”).....	69
- Extração de RNA	
- Avaliação da integridade do RNA	
- Reação de transcrição reversa	
- PCR	
5.7. Microscopia confocal.....	75
5.8. Ensaio de atividade de fosfatase.....	76
5.9. Ensaio de atividade de creatina quinase.....	77
5.10. Análises estatísticas.....	78
5.11. Produção e Estabilização da Linhagem Celular C2C12 Fak/Src.....	78
5.12. Curva de crescimento celular.....	80
5.13. Ensaio comparativo desobrevivência proliferação e motilidade das células C2C12 e C2C12 FAK/Src.....	82
<b>6. Resultados.....</b>	<b>84</b>
6.1. Localização da FAK durante a etapa inicial da miogênese.....	84
6.2. Influência do meio de diferenciação na associação FAK/SHP-2.....	86
6.3. Atividade de tirosina-fosfatase em células C2C12 durante a fase inicial da diferenciação.....	88
6.4. Influência da atividade de fosfatase na fosforilação da FAK.....	89
6.5. Linhagem C2C12 FAK/Src.....	91
6.6. Nível de fosforilação da Y-397 da FAK nas células C2C12 FAK/Src.....	92
6.7. Diferenciação celular com a inibição da desfosforilação da Y-397.....	93
6.7.1. Mioigenina.....	94

- RT-PCR
- Western blotting e imunomarcção

6.7.2. Creatina quinase.....	96
6.8. Alterações funcionais das células C2C12 FAK/Src.....	97
<b>7. Discussão.....</b>	<b>107</b>
<b>8. Conclusões.....</b>	<b>110</b>
<b>9. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>111</b>

## Lista de abreviaturas

- bHLH – hélice-loop-hélice básico
- BMP4- bone morfogenic protein 4
- CAF- complexo de adesão focal
- 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
- FRNK- FAK related no kinase
- HE – coloração hematoxilina-eosina
- IB – *immunoblotting*
- IGF – fatores de crescimento tipo insulina
- IP - imunoprecipitado
- KDa – quilodaltons
- MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos
- MC- meio de cultivo
- MD- meio de diferenciação
- MEC – matriz extracelular
- MEF2- Fator amplificador de expressão muscular

MHC – miosina de cadeia pesada

MRFs – fatores de regulação miogênica

OD – densidade ótica

pb – pares de bases

PBS – tampão fosfato + solução salina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PKC – proteína quinase C

PTP- proteína tirosina fosfatase

PTPase- atividade proteína tirosina fosfatase

pRb – proteína retinoblastoma

RNA – ácido ribonucléico

RNA<sub>m</sub>- RNA mensageiro

RPM – rotações por minuto

RT-PCR – reação de transcrição reversa com amplificação por PCR

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecilsulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

SHH- sonic hedgehog

SV-40 – promotor de *Simian virus*

TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformante do tipo  $\beta$

Y – tirosina.

UV - ultravioleta

v-Src- forma viral da Src com características oncogênicas

## Lista de Figuras

<i>Figura 1:</i> Modelo de um corte transversal de um embrião de camundongo entre 7 e 8.5 dias de desenvolvimento.....	19
<i>Figura 2:</i> Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético (miogênese).....	20
<i>Figura 3:</i> Os MRFs são divididos em 2 grupos: os MRFs primários, MyoD e Myf-5 e os secundários, miogenina e MRF4.....	23
<i>Figura 4:</i> Diagrama das mudanças dos receptores de fator do crescimento de células musculares, representando o estado pós-mitótico das células musculares terminalmente diferenciadas.....	31
<i>Figura 5:</i> Representação estrutural da molécula da FAK, mostrando seus domínios e sítios de interação.....	38
<i>Figura 6:</i> Representação da maioria das possíveis interações da FAK no complexo de adesão focal.....	40
<i>Figura 7:</i> Diagrama esquemático dos caminhos de sinalização controlados pela FAK.....	42
<i>Figura 8:</i> Possível mecanismo de inibição da miogênese por <i>stress</i> mecânico.....	44
<i>Figura 9:</i> Modelo de regulação da miogênese pela SHP-2 via desfosforilação da molécula inibidora p190-B Rho GAP e conseqüente ativação da Rho GTPase.....	48
<i>Figura 10:</i> Plasmídeo pRc/CMV Fak/Src.....	66
<i>Figura 11:</i> Distribuição da FAK no período inicial da indução de células C2C12 à diferenciação. ....	72
<i>Figura 12:</i> Representação da expressão de FAK e de SHP-2 e a interação entre estas duas proteínas no período inicial de indução à miogênese.....	74
<i>Figura 13:</i> Representação gráfica da atividade de fosfatase do imunoprecipitado de SHP-2.....	75

<i>Figura 14:</i> Nível de fosforilação da Y-397 da FAK medido pela razão entre os valores densitométricos dos imunoblotting (IB) dos anticorpos anti-p-FAK <sup>397</sup> e anti-FAK no período inicial de indução a diferenciação de células C2C12 tratadas com ortovanadato.....	77
<i>Figura 15:</i> Células C2C12 submetidas a 1 hora em MD com e sem ortovanadato.....	78
<i>Figura 16:</i> Imunoblotting mostrando a presença de expressão da proteína quimérica FAK/Src nas células da linhagem C2C12 FAK/Src. IP: imunoprecipitado; IB: Imunoblotting.....	79
<i>Figura 17:</i> Nível de fosforilação da Y-397 da FAK medido pela razão entre a quantificação densitométrica dos imunoblotting (IB) dos anticorpos anti-p-FAK <sup>397</sup> e anti-FAK no período inicial de indução a diferenciação de células C2C12 FAK/Src.....	80
<i>Figura 18:</i> Imunoblotting (IB) de miogenina nas amostras de C2C12 selvagem e C2C12 FAK/Src cultivadas por 5 dias em meio de diferenciação com e sem ortovanadato.....	81
<i>Figura 19:</i> Imunomarcção da miogenina utilizando anticorpo específico anti-miogenina e anticorpo secundário fluorescente anti-IgG Alexa (vermelho).....	82
<i>Figura 20:</i> Resultado do RT-PCR para miogenina das amostras de C2C12 selvagem e C2C12 FAK/Src cultivadas por 5 dias em meio de diferenciação com e sem ortovanadato.....	83
<i>Figura 21:</i> Dosagem da atividade de creatina quinase de amostras C2C12 selvagem e C2C12 FAK/Src submetidas a 5 dias de diferenciação em meio de diferenciação.....	84
<i>Figura 22:</i> Curva representativa do crescimento celular das linhagens C2C12 e C2C12 FAK/Src.....	85
<i>Figura 23:</i> Curva representativa das funções de tendência do crescimento populacional de cada uma das linhagens C2C12 e C2C12 FAK/Src .....	86
<i>Figura 24:</i> Fotos das células C2C12 e C2C12 FAK/Src submetidas a 35 dias de cultura em meio semi-sólido e coradas com HE.....	88
<i>Figura 25:</i> Ensaio de motilidade celular das células C2C12 e C2C12 FAK/Src .....	89

## **Lista de tabelas**

*Tabela 1:* Seqüência dos oligonucleotídeos para miogenina e  $\beta$ -actina utilizados nas reações de PCR.....**60**

*Tabela 2:* Tempo médio de duplicação celular das populações C2C12 e C2C12 FAK/Src de acordo com a função demonstrada na figura 23.....**86**

*Tabela 3:* Tempo médio de sobrevivência das células C2C12 e C2C12 FAK/Src.....**87**

## Resumo

Miogênese é um processo altamente ordenado que compromete e direciona células indiferenciadas para um programa de células musculares. Este processo envolve a transição de um alto nível de atividade mitótica, motilidade e período de sobrevivência das células para um período que o ciclo celular é interrompido e começa a expressão de genes músculo-específicos, reconhecimento célula-célula, assim como, formação de miofibros multinucleados. Embora estudos prévios tenham definido extensivamente o mecanismo de miogênese no nível transcricional e identificado genes envolvidos neste programa de diferenciação, tais como: MyoD, Myogenin, Myf-5 e MRF4, assim como, genes mais tardios como MHC, MCK, entre outros; o mecanismo intracelular envolvido com o processo inicial da miogênese permanece pouco entendido.

Estudos mostram o envolvimento de proteínas da matriz-extracelular acopladas a receptores integrinas na célula, que quando estimulados, desencadeiam um processo de sinalização através do citoplasma em direção ao núcleo celular. Um papel crítico dessas proteínas sinalizadoras, em sua maioria proteínas tirosina-quinase (PTKs), tem sido evidenciado quanto a sua participação na progressão da miogênese, entre elas podemos destacar MAPKs (ERK1 e ERK2), PI3K, PKB/AKT, Integrin, FAK e CAS. Apesar destas proteínas aparecerem proeminentes no programa de miogênese, quando estas são superexpressadas ou forçadamente ativadas, o programa de miogênese é interrompido. Isto ressalta a importância de atividade regulatória sobre estas proteínas para o desencadeamento normal do programa de miogênese. Estas proteínas sendo tirosina-quinase-dependentes podem vir a ser reguladas por proteínas tirosina-fosfatases (PTPs).

O envolvimento de PTPs no programa de miogênese é ainda pouco explorado. No presente estudo, através da utilização de dois modelos, nós focamos a atenção na etapa de regulação da sinalização da proteína tirosina-quinase FAK através da interação com a PTP SHP-2 no período inicial do programa de miogênese. Foi proposta a interação FAK/SHP-2 como um fator crucial para a regulação da Y397 da FAK no período inicial da miogênese. Além de ter reforçado a importância da regulação da FAK para o progresso do programa de diferenciação mioblástica.

## Abstract

Myogenesis is a highly ordered process that commits and directs undifferentiated cells into a muscle cell program. This process involves the transition of a high level of mitotic activity, motility and survival of the cell to a period when the cell cycle is disrupted and starts the expression of muscle-specific genes, cell-cell recognition as well as multinucleated myotube formation. Although previous studies have defined extensively the mechanisms of myogenesis at the transcription level and identified early-genes involved on this differentiation process such as MyoD, Myogenin, Myf5, MRF4 as well as advanced-genes such as MHC, MCK and others, the intracellular mechanisms engaged on the start of myogenesis remain to this day poorly understood.

Some reports show the involvement of extracellular-matrix proteins engaged at integrins receptors of the cell. When such are stimulated, they start a signaling process through cytoplasm toward nucleus. A critical role those signaling proteins, which mostly are tyrosine kinases proteins (PTKs), have been evident to play on the myogenesis progression, among them, we can stand out MAPKs (ERK1 and ERK2), PI3K, PKB/AKT, Integrin, FAK, CAS. Despite PTKs figuring prominently in myogenesis, when they are overexpressed or pushed up in their activity, the miogenesis program is impaired. This stands up the importance of regulatory role of these proteins to normal miogenesis program. These PTKs may be regulated by proteins tyrosine phosphatase (PTPs). The engagement of PTPs into the myogenesis program has not been highly explored. In this report, by using two approaches, we have focused on the step of

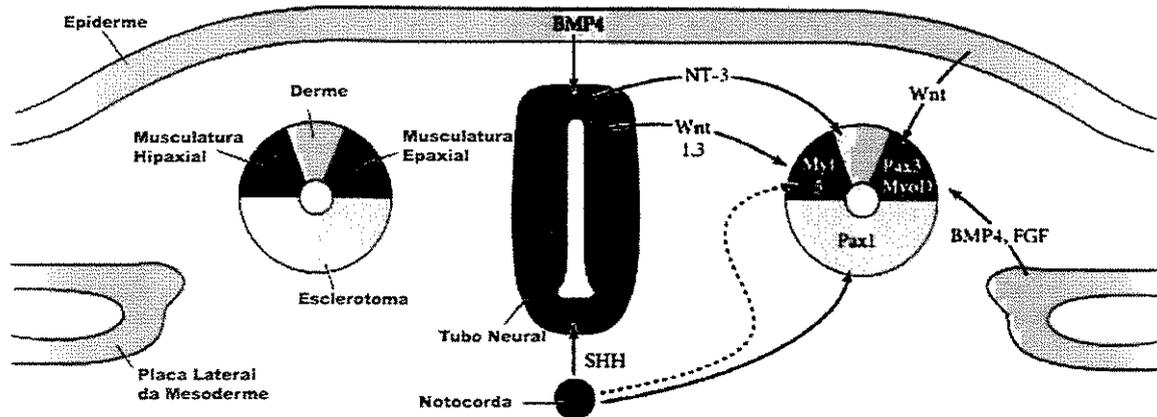
signaling regulation of protein tyrosine-kinase FAK by PTP-SHP-2 on the early stage of myogenesis. We propose the FAK/SHP-2 complex as a crucial factor to regulate the FAK Y397 in this period. Indeed, we corroborated the importance of FAK regulation to the myoblastic differentiation progress.

### 3.Introdução

O músculo esquelético de mamíferos exibe grande capacidade de crescimento e reparo. O processo de diferenciação de mioblastos em células do músculo esquelético é denominado de miogênese que resulta da ativação coordenada de múltiplos mecanismos de sinalização (ENGEL e FRANZINI-ARMSTRONG, 1994). A miogênese é requerida para o crescimento, manutenção e reparo das fibras musculares (PARKER et al., 2003). O conhecimento dos mecanismos de sinalização envolvidos na miogênese evoluiu substancialmente em anos recentes, destacando-se avanços no conhecimento de fatores de regulação miogênica (MRFs – *myogenic regulatory factors*), responsáveis, em última instância, pelo controle da expressão coordenada de genes responsáveis pela diferenciação de mioblastos em miócitos maduros.

As células musculares em vertebrados são oriundas de células mesodérmicas dos somitos dos embriões, que também podem dar origem a células da derme e cartilagem, dependendo da capacitação por estímulos específicos (COSSU et al., 1996). A capacitação depende da influência de proteínas parácrinas produzidas pelo tubo neural, notocorda, epiderme e placa lateral da mesoderme (COSSU et al., 1996). A Figura 1 sumariza o processo de capacitação das células mesodérmicas em mioblastos em embriões de vertebrados. Proteínas como Wnt produzida no tubo neural e epiderme, SHH (*sonic hedgehog*) produzida pela notocorda, BMP4 (*bone morfogenic protein 4*) e FGF (*fibroblast growth factor*) produzida pela placa lateral da mesoderme, estão envolvidas no comprometimento espacial e temporal das células mesodérmicas em mioblastos (COSSU et al., 1996). Os efeitos destas proteínas no comprometimento das

células mesodérmicas indiferenciadas em mioblastos é mediado pela expressão de MRFs como MyoD e Myf5.



*Figura 1:* Modelo de um corte transversal de um embrião de camundongo entre 7 e 8.5 dias de desenvolvimento, mostrando a capacitação das células somáticas em células comprometidas com um determinado tipo celular: miotoma, dermatoma ou esclerotoma; a partir da ação de proteínas parácrinas (COSSU et al., 1996).

Durante a miogênese no embrião, os mioblastos proliferam, migram, diferenciam e fundem-se para formar miotubos e posteriormente fibras musculares (Figura 2). No entanto, alguns mioblastos (células satélite) permanecem relativamente indiferenciados, servindo à função de reposição celular nas situações de perda celular e hipertrofia muscular nos indivíduos adultos (SUMMERS, 1985; SNOW, 1986). É importante salientar que os mioblastos, apesar de serem relativamente indiferenciados e preservarem sua capacidade proliferativa, são células já comprometidas da linhagem miogênica. No músculo pós-natal, as células satélite encontram-se entre a lamina basal e a membrana plasmática da fibra muscular e apresentam como características núcleo heterocromático, citoplasma esparso com poucas organelas e ausência de miofilamentos.

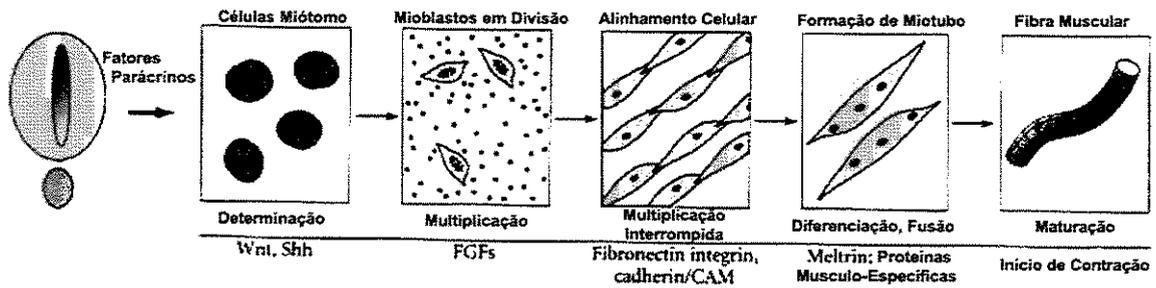


Figura 2: Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético (miogênese) (GILBERT, 2000).

As células satélites podem ser mantidas em cultura, permitindo a existência de linhagens de mioblastos que são utilizadas em estudos *in vitro*. Em mioblastos cultivados, a proliferação e diferenciação podem ser reguladas *in vitro* pela concentração de fatores de crescimento específicos. No entanto, *in vivo*, observa-se assincronia na proliferação e diferenciação de grupos de mioblastos de uma mesma região anatômica, sendo que alguns grupos celulares proliferam enquanto outras se diferenciam. Os mecanismos responsáveis por essa assincronia não são ainda conhecidos, mas com base em estudos *in vitro*, postula-se que este fenômeno seja dependente da variabilidade da concentração local de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, interações célula-célula e atributos únicos dos mioblastos que governam a resposta a mitógenos, como receptores de fatores de crescimento na superfície celular e vias de sinalização intracelular (ENGEL e FRANZINI-ARMSTRONG, 1994; SASTRY, 1999). Assim, na presença de múltiplos fatores externos, a decisão da célula de proliferar ou diferenciar é uma resposta integrada ao seu micro-ambiente (i.e adesão e fatores de crescimento) (SASTRY, 1996).

### **3.1. Fatores de regulação miogênica (MRFs): relação hierárquica, sobreposição de funções, ativação na miogênese.**

Os mioblastos apresentam expressão de pelo menos um dos MRFs (i.e. Myo D, Myf-5, miogenina e MRF-4). Pinney et al., em 1988, após o descobrimento do MRF MyoD (DAVIS, 1987), sugeriu a existência de um gene hipotético, então denominado *myd*, que pudesse regular todos os outros genes de MRFs e todo o programa de miogênese caso fosse ativado. Perseguindo este gene hipotético *myd*, descobriram-se outros fatores que são importantes para determinação do progresso da miogênese de músculo esquelético como Myf-5 (WRIGHT et al., 1989), miogenina (BRAUN et al., 1989) e MRF-4 (RHODES et al., 1989). A hipótese vigente presume que, em verdade, o fator hipotético *myd* representa um grande número de fatores acessórios que regulam a expressão e função, e interagem com os MRFs.

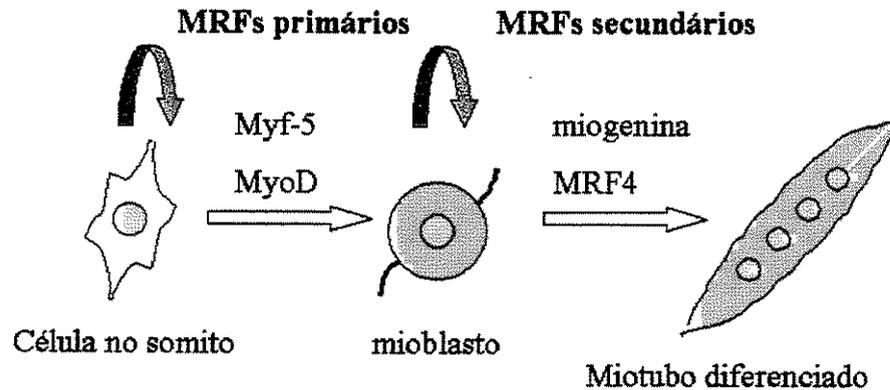
Os quatro principais MRFs fazem parte da superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice básicos (bHLH). Estes fatores quando expressos em construções com promotor constitutivo podem converter um grande número de diferentes tipos celulares, tanto em cultura como em animais transgênicos, em músculo esquelético (WEINTRAUB, 1993; LASSAR et al., 1994; SABOURIN e RUDNICKI, 2000).

Os MRFs contêm um domínio básico conservado necessário para a ligação seqüência-específica ao DNA e ativação transcricional, e um sítio hélice-alça-hélice necessário para a heterodimerização. Cada um dos MRFs pode heterodimerizar *in vitro* ou *in vivo* com proteínas E capazes de se ligar ao DNA de maneira seqüência-específica em sítios conhecidos como E-box (CANNTG) (MURRE et al., 1989a; MURRE et al.,

1989b). Este motivo de DNA está presente nos promotores de muitos genes específicos de músculo esquelético ( $\alpha$ -actina, receptor acetilcolina, creatina quinase, cadeia pesada da miosina entre outros) e medeia a ativação da transcrição destes genes de maneira dependente dos MRFs (LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994; SABOURIN e RUDNICKI, 2000). Posteriormente descobriu-se também a importância regulatória destes complexos MRF/proteína-E acoplados a co-fatores como as proteínas amplificadoras músculo-específicas (MEFs). A maioria dos genes músculo-específicos apresenta sítios de reconhecimento, principalmente pelo MEF2, em suas regiões regulatórias (LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994).

Os genes que codificam os 4 MRFs conhecidos são expressos em padrões temporais distintos. Estudos que utilizaram mutações deletérias (*knockout*) dos MRFs na linhagem germinativa de camundongos demonstraram a existência de uma hierarquia entre os MRFs, sendo definidos dois grupos. A Figura 3 ilustra esta hierarquia, sendo que os MRFs primários, MyoD e Myf-5, são necessários para o comprometimento das células no somito em linhagem miogênica (determinação celular), e os MRFs secundários, miogenina e MRF4, essenciais para a diferenciação terminal dos mioblastos (diferenciação celular) (SABOURIN e 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 na qual a célula mesodérmica 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 et al., 1998).



*Figura 3:* 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 (SABOURIN e RUDNICKI, 2000).

Uma vez ativado, o MyoD continua sendo expresso durante todo o desenvolvimento da célula muscular, possivelmente, devido ao fato do fator MyoD poder ativar sua própria transcrição (SONG et al., 1998). Por outro lado, a miogenina é induzida apenas durante a diferenciação miogênica e o MRF4 é expresso mais tardiamente sendo encontrado principalmente no músculo esquelético maduro (LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994).

Células satélite quiescentes não possuem níveis detectáveis de qualquer um dos quatro MRFs. Após estímulos apropriados, o MyoD é rapidamente expresso, na fase G1 do ciclo celular, sendo este fenômeno anterior à expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de proliferação celular. Após a proliferação se encerrar, miogenina e MRF4 são expressos nas células que expressam o 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 da transcrição de MyoD e Myf-5 nestas células implica que sinais indutivos estão envolvidos nesta ativação, análogos àqueles que ocorrem durante a embriogênese (SABOURIN e RUDNICKI, 2000).

Há evidências que indicam que os MRFs podem ser redundantes em suas funções. Camundongos com deleção do gene MyoD apresentam fenótipos normais (LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994). Por outro lado, houve aumento considerável da expressão do Myf-5 nas células miogênicas destes animais, sugerindo que a proteína Myf-5 substituiu a carência de MyoD. No entanto, animais “knockout” para ambas as formas de MRFs primários (MyoD e Myf-5) não são viáveis (LASSAR e 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 completar o programa de diferenciação *in vivo* (HASTY et al., 1993).

Muitos dos dados em relação a ativação, auto-ativação e ativação cruzada entre os membros da família MyoD sugerem que MyoD e Myf-5 *in vivo* são responsáveis pela ativação primária, pela definição do estado mioblástico e pelo posicionamento do número de células adequado nas regiões em formação muscular do corpo, além do recebimento de sinais inibitórios do meio ambiente (WEINTRAUB, 1993). A miogenina, uma vez ativada por MyoD ou Myf-5, suplanta o controle negativo *in vivo* e ativa a maioria (mas não todos) genes estruturais musculares, como creatina quinase, miosina de cadeia pesada (MHC), receptor acetilcolina entre outros (OSSES e BRANDAN, 2002). O fator MRF4,

que possui muitos aspectos em comum com miogenina (isto é, início de expressão tardio), também se sobrepõe à função da miogenina o que, provavelmente, contribui para a miogênese residual presente em camundongos deficientes em miogenina (WEINTRAUB, 1993; LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994).

Um dos mecanismos que pode regular a atividade dos MRFs é exercido pelas proteínas Id. A hipótese é de que estas proteínas podem regular a expressão de genes estruturais musculares via efeito competitivo na interação do complexo MRF/proteína-E. Membros da família Id apresentam o motivo HLH (helix-loop-helix) e são capazes de sequestrar tanto proteína-E como MRFs, formando complexos não-ligantes ao DNA e, portanto, incapazes de ativar os genes músculo específicos (BENEZRA et al., 1990; ; JEN et al., 1992; LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994; SABOURIN e RUDNICKI, 2000).

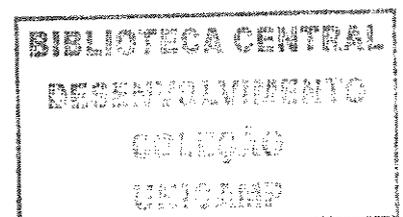
Outro mecanismo de controle proposto relaciona a afinidade de vários MRF/proteína-E e fosforilação e desfosforilação via proteína quinase C (PKC) (OLSON, 1992; KIN et al., 1992). A análise mutagênica cuidadosa dos MRFs revelou que um resíduo treonina (Thr 115) conservado na região básica é essencial para a sua atividade. Esta treonina é substrato para a fosforilação via PKC *in vitro*. Como os sinais gerados por fatores de crescimento ou oncoproteínas que inibem miogênese são sabidamente ativadores da PKC, 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 FGF (*fibroblast growth factor*) ou com veículo de expressão de PKC, não mostrou a presença de fosfo-treonina detectável (LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR et al., 1994).

### 3.2. Controle do ciclo celular e diferenciação miogênica

A atividade dos MRFs também é 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 possui um E-box na sua região regulatória *upstream* e é ativado pela superexpressão de MyoD (LASSAR et al., 1994). A expressão forçada de p21 ou p16 bloqueia a apoptose durante a diferenciação celular. A conexão ciclo celular-MRFs é reforçada pela observação de que a superexpressão de ciclina D1 (ciclina G1-S e ativadora de Cdk4) leva a hiperfosforilação de MyoD, inibindo sua atividade e subsequente a transativação de genes repórteres que contêm E-box, como p21, e a diferenciação terminal (LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994; LASSAR et al., 1994; SONG et al., 1998; FUJIO 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 contêm E-box, promovendo a expressão dos marcadores tardios da diferenciação. A 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 genes requeridos para a saída da fase G1 do ciclo celular ou replicação de DNA. A proteína Rb também é necessária para manter o fenótipo



diferenciado de miotubos em cultura (LASSAR e MÜNSTERBERG, 1994; SONG et al., 1998; FUJIO et al., 1999; PORRELLO et al., 2000).

Eventos de fosforilação dependentes de quinase-dependente de ciclina (CDK) têm sido propostos como controladores da estabilidade de proteínas reguladoras de transcrição. Com base nestas observações, é possível que CDK controle a atividade da proteína MyoD, provavelmente através de sua fosforilação direta. Song et al. (1998), demonstraram que MyoD pode ser fosforilada no resíduo serina 200, localizado em um sítio de fosforilação consenso para CDK, pela Cdc34, um regulador da transição G1-S do ciclo celular. A prevenção da fosforilação neste sítio leva à estabilização da proteína MyoD (aumento de meia vida). Ainda, cicloheximida, um agente que inibe a degradação protéica pela via dependente de ubiquitina, uma via intimamente ligada à degradação de proteínas reguladoras do ciclo celular; também causa a estabilização de MyoD. Assim, estes autores propuseram que a fosforilação de MyoD leva a sua ubiquitinação dependente de Cdc34, sinalizando sua destruição pela via proteossoma 26S. O controle do nível de MyoD através da ubiquitinação dependente de fosforilação por CDK sugere um mecanismo para coordenar os eventos de transcrição durante a progressão da fase G1-S (em mioblastos), pois a presença de MyoD ativaria a diferenciação e interrupção do ciclo celular.

Em 1987, Olwin & Hauschka, demonstraram que os receptores de fatores de crescimento diminuem em miócitos diferenciados. Além disso, 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.

### 3.3. Hormônios e fatores de crescimento na diferenciação miogênica

Em resposta à privação de fatores de crescimento, os mioblastos sofrem comprometimento irreversível para diferenciação terminal em células do músculo esquelético. (Figura 4). A importância dos hormônios e fatores de crescimento na regulação da proliferação e diferenciação das células musculares é amplamente reconhecida (FLORINI et al., 1991a).

Análises de como fatores de crescimento mitogênicos controlam o crescimento de células musculares e sua diferenciação têm sido centralizadas primariamente nos FGFs (LATHROP et al., 1985; SPIZZ et al., 1986; SPIZZ et al., 1987; LINKHART et al., 1981; KARDAMI et al., 1985; KARDAMI e FANDRICH, 1989), insulina e IGF (*insulin-like growth factor*) (EWTON e FLORINI, 1980; FLORINI et al., 1986a; FLORINI et al., 1991b), PDGFs (*platelet-derived growth factor*) (YABLONKA-REUVENI et al., 1990a; YABLONKA-REUVENI et al., 1990b; YABLONKA-REUVENI e SEIFERT, 1993; JIN et al., 1990; JIN et al., 1991) e na família TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) (SPIZZ et al., 1987; OLSON et al., 1986; FLORINI et al., 1986b). Outros mitógenos que parecem estimular o crescimento e inibir a diferenciação são os EGFs (*epidermal growth factor*) (LIN e HAUSCHKA, 1984a; HAN et al., 1988) e os LIF (*leukemia inhibitory factor*) (AUSTIN e BURGESS, 1991).

FGFs são inibidores potentes da diferenciação miogênica, sendo a forma básica a mais potente (bFGF) (OSSES e BRANDAN, 2002). Esses fatores bloqueiam uma etapa inicial (ou etapas) nos eventos envolvidos na diferenciação miogênica e, como o TGF- $\beta$ , não possui efeito na expressão subsequente dos MRFs. Uma possibilidade de ação dos

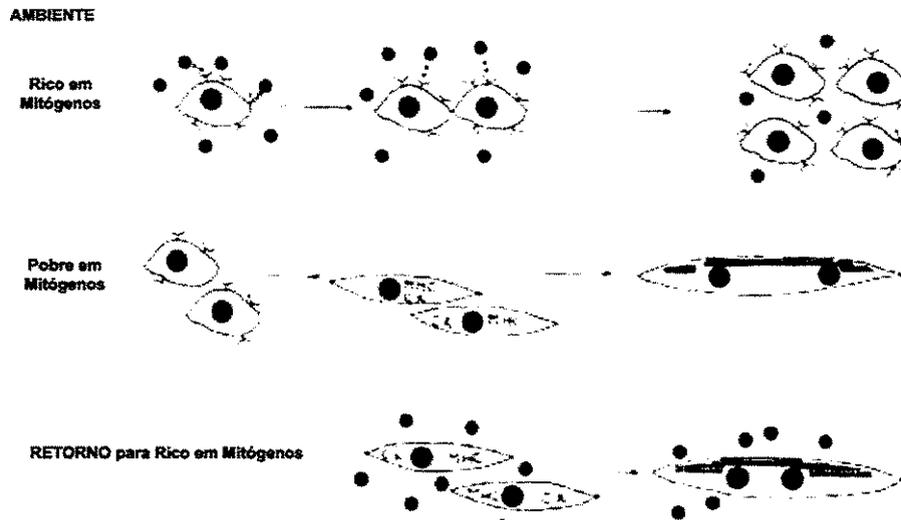
FGFs é através do aumento da expressão de oncogenes como *c-fos* e *c-myc*. Estudos mostraram que FGFs inibem a expressão de MyoD1 e miogenina (FLORINI et al., 1991a). Mioblastos em fase-G1 do ciclo celular quando privados de FGFs por apenas 3 horas passam por um processo irreversível de diferenciação, o qual pode ser detectado por: incapacidade de reentrar no ciclo celular quando os fatores de crescimento são restaurados; ativação de transcrição de genes musculares estruturais; e mudança da superfície celular, fazendo com que as células comprometidas com o programa de diferenciação sejam capazes de se fundirem com células em estágios de diferenciação similares ou nascentes miotubos (CLEGG et al., 1987; ADAMS e WATT, 1993).

IGFs e insulina são os únicos entre os fatores de crescimento que estimulam ao invés de inibir a diferenciação miogênica, tanto em células mantidas em cultura como em células satélite de ratos e células musculares de embrião de galinha (FLORINI et al., 1991b). Assim, a estimulação da diferenciação pelos IGFs é um fenômeno geral. Células C2 que secretam grandes quantidades de IGF podem estimular sua própria diferenciação por mecanismos autócrinos/parácrinos quando incubadas em 2% de soro equino (FLORINI et al., 1991a), um soro mais pobre em agentes mitóticos, muito utilizado em experimentos de diferenciação mioblástica. 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-quinase e Akt (FUJIO et al., 1999).

TGF- $\beta$  bloqueia todos os aspectos da diferenciação miogênica: fusão, elevação da atividade de creatina quinase, aparecimento dos receptores de acetilcolina, transição da actina da forma  $\beta$  para  $\gamma$  e expressão de outros mRNAs músculo-específicos e proteínas correspondentes; de maneira dependente de concentração. Ele age em 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- $\beta$  é reversível, sugerindo que TGF- $\beta$  induz um sinal transitório que é rapidamente revertido e não causa danos irreversíveis aos mioblastos. TGF- $\beta$  age provavelmente pela indução da expressão dos oncogenes *jun* e/ou *ras* (FLORINI et al., 1991a).

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 e FRANZINI-ARMSTRONG, 1994) (Figura 4). A demonstração de que a ligação de EGFs em mioblastos de camundongo diminuí quando estas células se diferenciam sugere que a perda dos receptores de fatores de crescimento (FGF, TGF- $\beta$ ) pode contribuir para o estado pós-mitótico dos miotubos. Esta generalização não se estende aos IGFs, que são mitógenos ativos para as células musculares e aumentam sua ligação às células durante o programa de diferenciação (FLORINI et al., 1991a).



*Figura 4:* Diagrama das mudanças dos receptores de fator do crescimento de células musculares, representando o estado pós-mitótico das células musculares terminalmente diferenciadas. Na presença de apropriados mitógenos, as células musculares crescem exponencialmente e mantém alto nível de receptores em sua superfície. Quando os mitógenos são retirados, as células em proliferação tornam-se terminalmente diferenciadas, expressam genes estruturais músculo-específicos como creatina quinase (CK) e “myosin heavy chain”(MHC) e reprime a expressão de genes dos receptores de fatores do crescimento, que causa o desaparecimento destes receptores na superfície celular. Se os mitógenos são recolocados no ambiente, células musculares diferenciadas apresentam um fenótipo pós-mitótico porque elas não apresentam receptores de fatores de crescimento em sua superfície (LIN and HAUSCHKA, 1984b).

### 3.4. Linhagens utilizadas para o estudo da miogênese *in vitro*

A cultura de células mioblásticas tem sido usadas extensivamente no estudo do desenvolvimento do músculo esquelético. Curiosamente uma das primeiras linhagens utilizadas na determinação de MRFs, foi uma linhagem de fibroblastos embrionários murinos denominada 10T $\frac{1}{2}$ . A expressão forçada de MRFs nestas células, leva a sua diferenciação em células com características contráteis (KONIECZNY e EMERSON, 1984; KONIECZNY e EMERSON, 1985).

A maioria das linhagens utilizadas em estudos de miogênese é derivada de células satélites de músculo esquelético maduro. A mais antiga destas linhagens mioblásticas é a

linhagem derivada de tecido muscular de ratos recém-nascidos, denominada L6 (YAFFE, 1969). É uma linhagem com características muito semelhantes à linhagem amplamente utilizada C2C12, derivada de camundongos, bem caracterizada e empregada atualmente como modelo de diferenciação em músculo esquelético (ANDRÉS e WALSH, 1996; YOSHIDA et al., 1998; MORAN et al., 2002; YEOW et al., 2002; LANSEN et al., 2003). As células C2C12 apresentam facilidade em entrar no programa de diferenciação miogênica. Na presença de alta concentração de soro no meio de cultura, as células C2C12 proliferam como uma população indiferenciada e expressam MyoD e/ou 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 et al., 1998).

Quando uma cultura de mioblastos C2C12 em proliferação é induzida a diferenciar pela privação de soro no meio de cultura, uma porção significativa 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 colocadas em condições de proliferação novamente entram novamente no ciclo celular e retomam a expressão de MyoD, demonstrando-se idênticas à cultura original. Estas células são denominadas 'células reserva', lembrando algumas características das células satélites *in vivo* (YOSHIDA et al., 1998).

Outros tipos celulares com características mioblásticas como MM14 e BC3H1 são menos utilizadas, mas não menos importantes. A linhagem MM14 é também derivada de

células satélites de músculo esquelético de camundongos e apresentam características semelhantes à linhagem C2C12, mas para manter a linhagem em proliferação é necessária a adição de FGF e não apenas soro, uma vez que a maioria dos soros não apresenta quantidade significativa de FGF em sua composição (LINKHART et al., 1981; CLEGG et al., 1987). A linhagem BC3H1 é uma linhagem surgida à partir de tumor de cérebro induzido quimicamente em camundongos e consiste de linhagem permanente de células musculares (SCHUBERT et al., 1974). Estas células não apresentam expressão de MyoD e não se fundem quando diferenciadas. A diferenciação também ocorre com a privação de fatores de crescimento, mas é uma diferenciação reversível, produzida pela adição de fatores de crescimento novamente ao ambiente (LATHROP et al., 1985; SPIZZ et al., 1986).

Mioblastos, como C2C12, saem irreversivelmente do ciclo celular durante o programa de diferenciação em miotubos. Enquanto a diferenciação progride, as células miogênicas ficam menos propensas a sofrer apoptose em meio de cultura pobre em mitógenos, provavelmente, por causa da indução de um fator de sobrevivência. Fujio et al. (1999) mostraram que a quinase Akt é superexpressa durante a diferenciação miogênica, o que determina a sobrevivência do miócito, e assim, definiram um componente do mecanismo no qual a proliferação e apoptose são coordenados durante a miogênese *in vitro*.

Moran et al. (2002) utilizaram “microarrays” de DNA para caracterizar mudanças no padrão de expressão global de mRNA durante proliferação, interrupção do ciclo celular e diferenciação terminal em mioblastos C2C12. Este estudo revelou 629 sequências de genes regulados entre mioblastos em proliferação e diferenciação. As

seqüências foram 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 mRNA e regulação imune. A maior parte dos genes regulados exibe mudança acentuada 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.

### **3.5. Papel da matriz extracelular no programa de diferenciação**

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

Em 2003, Lancen e colegas cultivaram células C2C12 sobre matrigel (KLEINMAN et al., 1986), que contém laminina, colágeno IV, entactina e proteoglicanos. A cultura em matrigel induziu a diferenciação celular (LANSEN et al., 2003).

Estudos mais recentes mostraram que o estímulo mecânico por estiramento de células C2C12 em cultivo, foi suficiente para inibir o programa de miogênese (KUMAR et al.,

2004). Nestes estudos, o estiramento celular ativou tirosina-quinase e induziu a superexpressão do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o que manteve as células induzidas com fenótipo de proliferação e não diferenciação. Isto sugere e reforça a importância da matriz extracelular na regulação da miogênese.

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, anexados a MEC geram sinais necessários para guiar a diferenciação. Integrinas representam as prováveis candidatas a receptores de superfície celular para exercer esse papel porque 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 influenciando a diferenciação celular (OSSES e BRANDAN, 2002; MENKO e BOETTIGER, 1987).

Integrinas são uma grande família de glicoproteínas compostas por subunidades transmembrana  $\alpha$  e  $\beta$ , importantes na conexão da matriz extracelular aos filamentos intracelulares de actina (XU e ZHAO, 2001; BOUDREAU e JONES, 1999). Em células cultivadas, as integrinas estão localizadas na superfície de contato com a placa, em estruturas denominadas complexo de adesão focal, regiões nas quais as células estão fisicamente muito próximas ao substrato. Os complexos de adesão focal consistem de proteínas estruturais (paxilina, tensina, vinculina, actina, distrofina em mioblastos) e regulatórias (FAK, Src, Cas entre outras), e desempenham duas funções estruturais

importantes na célula: ligação da membrana ao substrato e ancoragem/estabilização dos filamentos de actina (ADAMS e WATT, 1993; HYNES, 1992; KORNBERG, 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 e 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 aumento na fosforilação em tirosina de algumas proteínas intracelulares podem estar envolvidas na transdução dos sinais gerados pelas integrinas (BOUDREAU e 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 principal candidata é a proteína tirosina quinase (PTK) pp125<sup>FAK</sup> ou quinase de adesão focal (FAK). Após a aglomeração de integrinas, há um rápido aumento de fosforilação em tirosina e da atividade quinase desta enzima em vários tipos celulares (CARY et al., 1996; BOUDREAU e JONES, 1999; SCHALLER e PARSONS, 1993).

### 3.6. FAK e sua importância no programa de miogênese

A FAK foi descrita pela primeira vez em 1992 como uma proteína de alta fosforilação em tirosina associada a v-Src oncogene e localizada nos complexos de adesão focal de células normais (HANKS et al., 1992; SCHALLER et al., 1992). Subsequentemente, foi revelado que FAK localiza-se nos sítios de adesão focal celulares junto com a agregação de integrinas (KORNBERG et al., 1992; HANKS et al., 2003).

A FAK é um membro da família de proteínas tirosina quinase (PTKs) que inclui Pyk2, FakB, RAFTK e CadTK (ZACHARY, 1997; OWEN et al., 1999). A FAK é uma PTK citosólica, não receptora, incomum, como ilustra a figura 5. Ela não contém domínios SH2 e SH3 envolvidos em interação proteína-proteína, mas possui vários sítios para ligação de SH2/SH3 de proteínas sinalizadoras, podendo se envolver em múltiplas vias de sinalização dependendo do seu contexto de ativação (PARSONS, 2003). Sua importância biológica tem sido demonstrada em grande número de estudos que indicam sua função em processos celulares como motilidade, proliferação, invasibilidade e sobrevivência celular.

A FAK localiza-se no complexo de adesão focal via seu domínio FAT (focal adhesion targeting) C-terminal. Esta localização é crucial para sua função de sinalização, uma vez que mutantes C-terminal da FAK não se localizam na adesão focal, não se autofosforilam e são incapazes de fosforilar seus substratos.

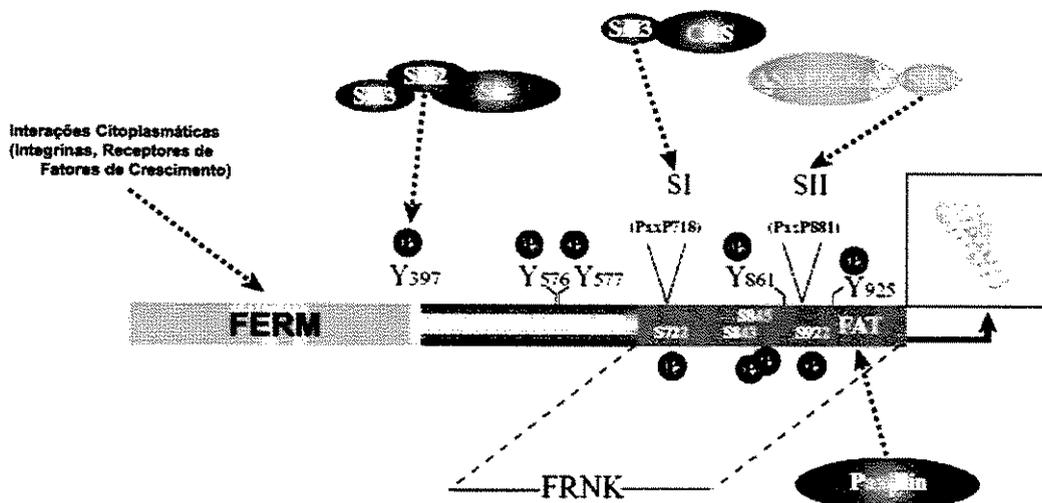


Figura 5: Representação estrutural da molécula da FAK, mostrando seus domínios e sítios de interação (PARSONS, 2003).

A ativação da FAK em resposta a estimulação da integrina promove a formação de sítios de acoplamento em fosfotirosinas para várias moléculas de sinalização celular e pode ser importante para a indução e mudanças conformacionais de proteínas ligantes nas regiões N- e C- terminal não catalíticas. A FAK é ativada via autofosforilação na tirosina 397 (Y397) que é iniciado pelo engajamento da integrina à ela. A fosforilação da Y397 cria um sítio ligante de alta afinidade para o domínio SH2 de quinases da família Src, provoca o recrutamento e ativação da Src e a formação do complexo FAK/Src (SCHALLER et al., 1994; XING et al., 1994). A ativação da FAK dependente da fosforilação da Y397 e o recrutamento da Src têm sido implicado na eficiência da fosforilação das tirosinas de sítios adicionais encontrados na molécula da FAK, assim como a ligação de proteínas como Cas e paxilina (OWEN et al., 1999; SCHALLER et al., 1999). A fosforilação da Y397 também parece ser importante para o recrutamento de outras proteínas que contém o domínio SH2, incluindo a subunidade da fosfoinositidina 3-quinase” (PI3-kinase), fosfolipase C (PLC)- $\gamma$  e a proteína adaptadora Grb7 (AKAGI et al., 2002; CHEN et al., 1996; HAN e GUAN, 1999; CHEN e GUAN, 1994). A formação

do complexo FAK/Src permite a fosforilação de outras tirosinas Y576, Y577, Y925 e Y861 ao longo da molécula da FAK. As Y576 e Y577 estão relacionadas com o aumento da atividade de quinase da FAK (WOZNIAK et al., 2004). A Y925 cria um sítio de ligação para o complexo Grb2-SOS, o que liga à FAK a ativação de RAS e MAPKs (CHEN et al., 1994; SCHLAEPFER et al., 1994; SCHLAEPFER e HUNTER, 1996). A Y861 é muito pouco estudada, mas estudos recentes indicam que pode aumentar o nível de fosforilação da Y397 via transativação (LEU e MA, 2002).

No seu domínio C-terminal, a FAK contém 4 sítios para fosforilação de serina (Ser722, Ser843, Ser846 e Ser910). A função da fosforilação das serinas em regulação da FAK é pouco entendida; embora a proximidade destas serinas com os sítios de interação proteína-proteína sugira uma função de modulação e estabilização da ligação de proteínas de sinalização “downstream” (MA et al., 2001).

A FAK também tem um domínio N-terminal FERM e dois motivos ricos em prolina, os quais permitem a interação com múltiplos parceiros de sinalização. O domínio FERM pode exercer um papel autoinibitório da FAK pela interação com a cauda citoplasmática  $\beta 1$  da integrina ( COOPER et al., 2003). Também existem estudos de interação do domínio FERM com receptores de fatores de crescimento EGF e PDGF ativados, que junto com a fosforilação da Y397, parece ser um fator importante para a motilidade celular (SIEG et al., 2000; SCHLAEPFER et al., 2004). Através dos motivos ricos em prolina (SI e SII figura 5) a FAK se liga ao domínio SH3 da Cas e e ao domínio LD2 da paxilina (SCHLAEPFER et al., 2004). Ambas, Cas e paxilina, são altamente fosforiladas sob estimulação da integrina e isto, em parte, foi atribuído à FAK (SCHLAEPFER et al., 2004). Embora aparentemente a FAK seja importante para a



A regulação da atividade da FAK é também modulada por proteínas inibitórias ligantes ao domínio quinase da FAK e por ação de proteínas tirosina-fosfatase em ambos positivo e negativo enfoques (SCHLAEPFER et al., 2004).

Apesar de se conhecer os sítios de fosforilação, os alvos e os eventos de sinalização associados à FAK, o preciso mecanismo de ativação dessa proteína permanece elusivo. Isto é devido ao fato da FAK poder ser ativada por múltiplos fatores e de diferentes maneiras. A interação da FAK com múltiplas proteínas de ligação (exemplificada esquematicamente na figura 7) aguça a curiosidade permitindo levantar uma série de questões interessantes, por exemplo: quando e como diferentes efetores ligam-se à FAK? Qual o papel das proteínas ligantes contendo domínios SH2 e SH3 na cascata de sinalização que se inicia a partir da ativação da FAK?

Em resposta à primeira questão, parece que a ativação temporal e espacial da FAK em diferentes contextos no metabolismo celular, pode favorecer a mudança de perfil de ativação da FAK, permitindo-a sinalizar para diferentes caminhos de transdução. Tal ativação seletiva poderia resultar em diferentes respostas fisiológicas.

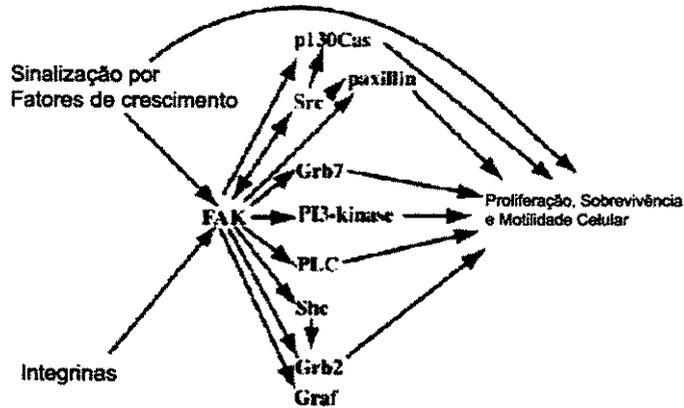


Figura 7: Diagrama esquemático dos caminhos de sinalização controlados pela FAK (GABARRA-NIECKO et al., 2003).

Existem alguns indícios de que a atividade da FAK esteja estreitamente relacionada com o programa de diferenciação celular, particularmente no programa de diferenciação miogênica, um assunto que trataremos no presente trabalho. Experimentos em camundongos têm revelado um papel crítico da FAK na mediação do comportamento celular dependente da MEC. O fenótipo de camundongos deficientes em FAK é de letalidade embrionária, caracterizada pela migração embriônica retardada, organogênese prejudicada e defeitos vasculares (BOUDREAU e JONES, 1999).

Nesse sentido, Ilic et al. (2003) mostraram que a diferenciação tecido-específica de células endoteliais FAK<sup>-/-</sup> era comparável à contraparte selvagem, sugerindo que FAK não era essencial para a diferenciação das células endoteliais. A deficiência de FAK (FAK<sup>-/-</sup>) prejudicava a habilidade das células endoteliais de 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 et al. (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 diminuiu a de p21 e, assim, acelerou a transição das fases G1-S do ciclo celular.

A função das integrinas na diferenciação e regulação da expressão gênica tem se tornando aparente (veja item 3.5). Menko e Boettiger (1987) mostraram que o tratamento de mioblastos com o anticorpo CSAT, o qual se liga à porção externa da molécula integrina, inibindo sua ligação a fibronectina e laminina, bloquearam a diferenciação miogênica. As células tratadas com esse anticorpo eram capazes de proliferar e não produziam quantidade detectável de miosina músculo-específica.

Trabalhos recentes permitem inferir a importância da FAK no programa de diferenciação muscular. O primeiro corresponde à inibição do programa de miogênese devido a expressão da molécula oncogênica constitutivamente ativa v-Src. A expressão de v-Src interferiu no processo regulatório de ativadores transcricionais músculo-específicos em células C2C12, mas os mecanismos envolvidos nessa interferência não foram estudados. A literatura mostra que a expressão de v-Src resulta em ativação de diferentes proteínas sinalizadoras, via fosforilação de sítios de tirosina, inclusive na transativação da FAK e sua cascata de sinalização, independente de estimulação de integrinas (ROY et al., 2002). Por outro lado, a expressão de FRNK, o dominante negativo da FAK, bloqueou efeitos de invasibilidade e metastase experimental nas células v-Src transformadas (HAUK et al., 2002), indicando que a FAK é uma forte candidata a

substrato da ação quinase da Src, a qual pode modificar o comportamento celular via transativação da FAK (ROY et al., 2002; HAUK et al., 2002).

Sastry 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 celular. Recentemente, KUMAR et al., (2004), mostraram que o *stress* mecânico de células C2C12 leva à ativação da FAK, Rac-1 GTPase e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, resultando em proliferação celular e em inibição do programa de miogênese destas células (figura 8).

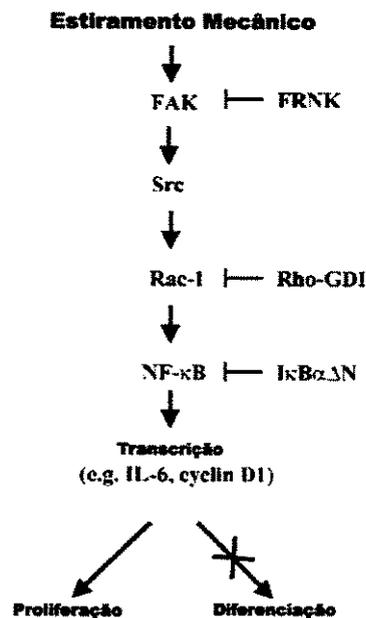


Figura 8: Possível mecanismo de inibição da miogênese por *stress* mecânico (KUMAR et al., 2004).

Trabalho realizado em nosso laboratório por Clemente et al. (2005) mostrou que a expressão transiente de FAK mutada na Y397, tendo a característica de um dominante negativo da FAK (TORSONI et al., 2003), levou a redução da quantidade de marcadores de diferenciação muscular como miogenina e creatina quinase muscular (MCK) em

células C2C12 submetidas a privação de fatores de crescimento. Mostrou-se também um comportamento bifásico da ativação da FAK, isto é, a desfosforilação da Y397 da FAK na primeira hora após a indução da diferenciação dos mioblastos C2C12 e a ativação crescente desta proteína, caracterizada pela fosforilação da Y397, ao longo dos próximos 5 dias de diferenciação. Esse comportamento bifásico da FAK parece ser um fator crítico para a entrada da célula no programa de diferenciação. Esses resultados corroboram os trabalhos de Goel e Dey (2002) mostrando um aumento da fosforilação da FAK no decorrer do período de miogênese. Além disso, Clemente e colaboradores (2005) verificaram que a superexpressão transiente de FAK selvagem impediu a supressão da expressão da ciclina D1 quando as células foram submetidas a indução em meio de diferenciação, favorecendo a proliferação celular.

Estas evidências indicam que a redução transitória da atividade FAK tem papel permissivo na ativação do programa de miogênese em mioblastos C2C12. Portanto, torna-se importante avaliar os mecanismos responsáveis pelo controle da fosforilação e ativação da FAK durante o processo de transição da fase de proliferação para a fase de diferenciação, bem como durante a fase de diferenciação e sua influência no fenótipo resultante. Como ocorre redução transitória do nível de fosforilação da FAK na Y-397, é possível que esta redução na fosforilação seja mediada pela ação de tirosino-fosfatases.

Existem evidências na literatura que o nível de fosforilação em tirosina da FAK é controlado pela tirosino-fosfatase SHP-2 (YU et al., 1998; MANES et al., 1999; VADLAMUDI et al., 2002). Portanto, nossa hipótese presume que a redução transitória na fosforilação da FAK em células C2C12 em meio de diferenciação seja decorrente da ação da SHP2.

### 3.7. SHP-2 e sua importância no programa de miogênese

SHP-2 é uma proteína tirosino-fosfatase (PTP) citoplasmática, que contém dois domínios SH2 em sequência na porção N-terminal de sua molécula e um domínio PTP na porção C-terminal. A SHP-2 pode tornar-se fosforilada em dois resíduos de tirosina Y542 e Y580, localizados na sua porção C-terminal, em resposta a ativação de receptores de fatores de crescimento (KONTARIDIS et al., 2002; BENNETT et al., 1996; FENG et al., 1993). Resultados da análise da estrutura da SHP-2 revelaram o mecanismo molecular ao qual o engajamento do domínio N-SH2 com um peptídeo tirosina-fosforilado promove a atividade da PTP (HOF, 1998). Além disso, a ligação de peptídeos tirosina-fosforilados ao domínio N-SH2 da SHP-2 foi relatado como necessário para a ativação do domínio PTP (LECHLEIDER et al., 1993).

A atividade catalítica da SHP-2 é requerida em duas situações antagônicas no processo de sinalização celular. Ela pode ser requerida em uma resposta positiva, pela desfosforilação de proteínas que contém resíduos de tirosina-fosforilados que mantém sua molécula inativa. Ou em uma resposta negativa, onde a sua ação fosfatase inativa moléculas que são normalmente ativas quando os resíduos de tirosina estão fosforilados (NEEL et al., 2003).

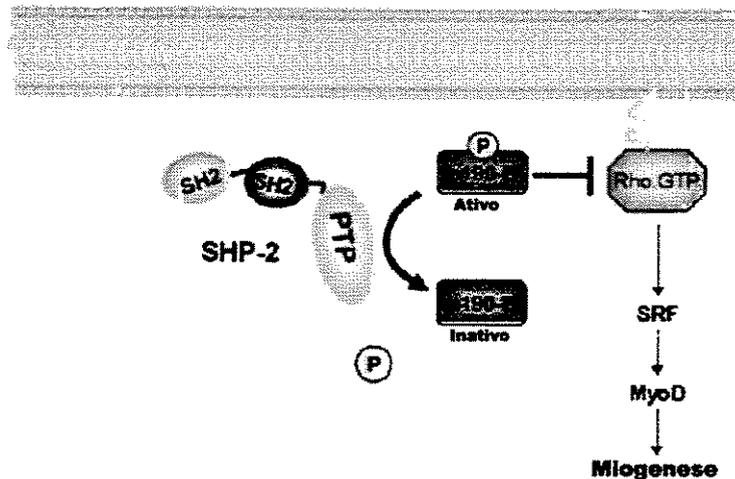
Estudos bioquímicos em células de mamíferos sugeriram que a SHP-2 pode participar na transmissão de sinais iniciados pelos receptores de fatores de crescimento (KONTARIDIS et al., 2002; BENNETT et al., 1996; FENG et al., 1993). A PTP interage fisicamente via seu domínio SH2 com um número de PTKs ligantes e ativadas por receptores, assim como, proteínas citoplasmáticas de sinalização e presumivelmente com

funções de promover sinais mitogênicos (XIAO et al., 1994; NOGUCHI et al., 1994; MILARSKY et al., 1994; YU et al., 1998). Para definir a biológica função da SHP-2, uma mutação deletéria foi introduzida no locus do gene da SHP-2 em células tronco embrionárias, que resultou na deleção do exon 3, que codificam os resíduos 46-110 correspondente ao domínio N-SH2 da molécula protéica da SHP-2 (SAXTON et al., 1997). Camundongos mutantes homozigotos, com padrão SHP-2(-/-) morreram ao redor dos dias 8.5-10.5 de gestação, com múltiplos defeitos na mesoderme. Notavelmente, as anormalidades no padrão de organização do mesoderma em embriões SHP-2 (-/-) são similares ao fenótipo de embriões com deficiência em fibronectina e FAK (FURUTA et al., 1995; GEORGE et al., 1993), sugerindo que SHP-2 e FAK pertencem a uma via comum de sinalização de controle da motilidade celular. Assim como a FAK, a SHP-2 exerce papel crítico em vias de sinalização da integrina e em processo celulares como motilidade celular e organização de citoesqueleto, incluindo a regulação do complexo de adesão focal (YU et al., 1998; WICHERT et al., 2003; TSUDA et al., 1998).

Existem evidências de que a SHP-2 e a FAK agem concomitantemente na regulação de vias de sinalização celular. Estudos indicam que o “turnover” da FAK, a capacidade de agrupar e desagrupar estruturas dos contatos de adesão, importante fenômeno para o mecanismo de migração celular, é regulado via ação da SHP-2 (MANES et al., 1999). Adicionalmente, mostrou-se que a ação da SHP-2 na desfosforilação da Y925 e Y577 da FAK foi importante para a regulação do complexo de adesão de células de câncer de mama humano (VADLAMUDI et al., 2002). Além disso, fibroblastos SHP-2 (-/-) apresentavam a FAK hiperfosforilada, resultando em

modificações da motilidade celular. Estes resultados sugerem que a fosfatase SHP-2 pode funcionar como um fator regulador da atividade da FAK (YU et al., 1998).

Estudos recentes indicam a participação da SHP-2 na regulação da miogênese. Primeiramente, foi evidenciado que durante a miogênese a SHP-2 apresentava-se superexpressada e formando complexo com o “SHP-2 substrate-1”(SHPS-1), indicando a importância da SHP-2 no programa de miogênese (KONTARIDIS et al., 2001). Também foi verificada a regulação positiva da miogênese pela ação da SHP-2 acoplada a via de sinalização da Rho GTPase, por ação da desfosforilação da molécula inibidora de Rho GTPase, p-190-B Rho GAP (KONTARIDS et al., 2004). A figura 9 esquematiza o mecanismo proposto pelo autor da regulação positiva da SHP-2 via ativação da Rho GTPase.



*Figura 9:* Modelo de regulação da miogênese pela SHP-2 via desfosforilação da molécula inibidora p190-B Rho GAP e consequente ativação da Rho GTPase (KONTARIDS et al., 2004).

Contraditoriamente, existem evidências de que a expressão de uma proteína modificada de SHP-2, constitutivamente ativa e destituída de fatores de regulação, é

suficiente para prevenir a miogênese, indicando uma via negativa de regulação da miogênese via SHP-2 (KONTARIDIS et al., 2002).

Embora todo o programa de miogênese ainda não esteja completamente entendido, existem evidências que sugerem que a privação de mitógenos está ligada à ativação de genes musculares via receptores de fatores de crescimento mediado por uma cascata de sinalização de proteínas quinase. O alvo final desta cascata são os MRFs, proteínas bHLH e proteínas E de interação, que formam complexos que interagem com sítios regulatórios específicos nos genes estruturais de músculo esquelético.

No presente estudo, avaliamos a regulação da sinalização da proteína quinase FAK através da interação com a PTP SHP-2 no período inicial do programa de miogênese. Foi proposto a interação FAK/SHP-2 como um fator crucial para a regulação da FAK no período inicial da miogênese.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivos gerais**

- Analisar a importância da ação PTPase no programa de miogênese
- Verificar a importância da PTP SHP-2 no processo de desfosforilação da Y397 da FAK, no período inicial da miogênese

### **4.2. Objetivos específicos**

- Verificar a interação da SHP-2 e a FAK no período inicial da miogênese
- Verificar a atividade de fosfatase da SHP-2 neste mesmo período
- Interferir na ação de proteína tirosina-fosfatase na inibição da fosforilação Y397 da FAK com os modelos:
  - utilização do inibidor de PTPase ortovanadato
  - produção da linhagem C2C12 FAK/Src
- Submeter os modelos acima citados à indução do programa de miogênese .

## 5. Metodologia

### 5.1. Cultura de células

Foi utilizada a linhagem celular C2C12 (ATCC#CRL-1772) derivada da linhagem C2 proveniente de células do somito embrionário de camundongo C3H que são precursoras de músculo esquelético.

As células C2C12 foram cultivadas em 20 ml de meio de cultivo 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<sub>2</sub> a 37°C.

Para não perder a população mioblástica pela confluência, ao atingirem 70% de confluência as células passaram por um processo de repique. Elas foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos a 1.400 rpm. O pellet formado foi homogeneizado em meio de cultura de cultivo, as células foram contadas com o auxílio do corante de exclusão azul de tripan, que seleciona as células viáveis (incolores) das células inviáveis (azuis), na câmara de Neubauer em microscópio invertido e plaqueadas na densidade de 10<sup>4</sup> céls/mL na mesma ou numa nova garrafa esterilizada por calor úmido contendo 20 ml de meio de cultivo. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias para manter seu valor nutritivo até confluência de 70% das células e novo repique.

## **5.2. Ensaio de diferenciação celular**

Para o ensaio de diferenciação das células C2C12, como é amplamente descrito em literatura, foi utilizado o protocolo de restrição de nutrientes do meio de cultivo induzindo as células à miogênese. Estas células cultivadas em meio pobre de agentes mitogênicos e outros fatores de crescimento têm a característica de se diferenciar em miotubos. No presente estudo, as células C2C12 foram plaqueadas em placas de vidro de 90mm de diâmetro com  $5 \times 10^5$  céls. Após 24 horas de plaqueamento, com as células apresentando 70% de confluência, o meio de cultura foi trocado pelo meio de diferenciação (MD) constituído de DMEM (Nutricell) com 2% de soro eqüino (Gibco) e 1% de penicilina-streptomomicina (Nutricell). As células foram mantidas em MD por períodos variando entre 1 hora e 5 dias, sendo trocado a cada 2 dias nos períodos correspondentes a 5 dias, quando já atingiram certo grau de diferenciação com expressão de genes tardios que são utilizados como marcadores de diferenciação.

## **5.3. Extrato de proteínas totais**

As placas contendo as células para o estudo foram lavadas com PBS 0,1M e removidas das placas de cultivo com 30  $\mu$ L 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 (as amostras correspondiam a um pool de 3 placas de cultivo de 90mm de diâmetro). Após 30 minutos de incubação em gelo os homogenatos

foram centrifugados a 11000 rpm, 4°C, por 20 minutos para remover o material insolúvel. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios. Para determinação e normalização da concentração de proteínas totais das amostras foi utilizado o método de Lowry.

➤ **Método de Lowry para quantificação de proteínas totais:**

O método de Lowry foi escolhido para a quantificação das proteínas devido a sua alta sensibilidade e precisão com amostras de baixa concentração protéica.

Para realização do método foram recém preparadas três soluções iniciais: solução A (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,1N NaOH), solução B<sub>1</sub> (1% CuSO<sub>4</sub>) e solução B<sub>2</sub> (2% NaK tartarato). A partir destas soluções iniciais foi produzida a solução C para uso (para cada 1 mL de solução A, adicionar 100µL de solução B<sub>1</sub> e 100µL de solução B<sub>2</sub>). 10µL de amostra foram adicionados em tubos de ensaio contendo 1ml de solução C, os tubos então foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, protegidos da luz (cada amostra foi realizada em triplicata). Após este período de incubação, adicionou-se em cada tubo 50µL de *Folin Cicauteau* e as amostras foram então novamente incubadas por mais 30 minutos a 50°C, também protegidas da luz. Após esta última incubação, foi feita a leitura com o auxílio de cubetas, em espectrofotômetro a 660nm.

Para o cálculo de concentração de proteínas, foi realizada 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 através de calculos e proporção para adquirir a concentração de proteínas das amostras.

Após quantificação e normalização da concenração das proteínas, o volume das amostra foi corrigido para 400µL com tampão de extrração e acrescida de 100µL de

tampão de Laemmli (0,0625M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 5%  $\beta$ -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.

#### **5.4.Coimunoprecipitação**

O procedimento inicial da extração de proteínas para o ensaio de coimunoprecipitação foi realizado da mesma forma como descrito anteriormente no ítem de extração de proteínas totais. Após a quantificação das proteínas pelo método de Lowry foi aliquotado em tubos diferentes e devidamente identificados o volume correspondente de cada amostra que representava a mesma quantidade de proteínas totais entre elas, tendo como base o valor da amostra de menor concentração, da qual foi utilizado o volume total. Então, adicionou-se 10 $\mu$ L do anticorpo primário contra a proteína de interesse às alíquotas e incubou-se a mistura durante toda a noite a 4°C. Após este período, 30 $\mu$ L de proteína A ou G plus (Oncogene) foram adicionados de acordo com a natureza do anticorpo primário e as amostras foram incubadas por mais 2 horas a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 11000 rpm, 4°C, 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 11000 rpm, 4°C, por 5 minutos.

Após a última lavagem, adicionou-se 30 $\mu$ L de tampão de corrida (100 $\mu$ L Laemmli; 0,015g DTT; 50 $\mu$ L água) a cada amostra e estas foram fervidas por 5 minutos a

100°C. Colocou-se 25µL destas amostras em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação das proteínas em eletroforese como descrito no item “western blotting”.

Para este ensaio foram utilizados os anticorpos primários anti-FAK (# sc-558- Santa Cruz), anti-SHP-2 (# sc-7384- Santa Cruz), anti-c-MYC (# sc-40- Santa Cruz) todos provenientes da empresa Santa Cruz Biotechnology.

### **5.5. 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 pequeno (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 45 minutos 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 primários policlonais anti-FAK (diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-pFAK 397 (diluição 1:2000, BioSource), anti-SHP-2 (# sc-7384- Santa Cruz) 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 [<sup>125</sup>I] Proteína A (30µCi/Ug; Pharmacia) 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 imunodeteção. Após este período, as membranas foram novamente lavadas por 15 minutos em solução basal e postas para secar a temperatura ambiente.

A proteína A [<sup>125</sup>I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). As imagens obtidas das membranas foram então quantificadas no programa Scion Image Beta 4.0.2.

### **5.6.RT-PCR (“Reverse transcription- Polimerase Chain Reaction”)**

Esta técnica consiste em uma extração do RNA total das células, uma reação de transcrição reversa transformando o RNA, molécula muito instável de fácil degradação, em uma molécula de DNA complementar (cDNA), molécula menos instável, e uma reação de amplificação em cadeia da sequência gênica de interesse com o auxílio de uma DNA polimerase resistente a altas temperaturas.

#### **➤ Extração de RNA**

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

tem uma grande eficiência no isolamento do RNA das células em estudo, mantendo o RNA isolado e livre das ações de RNAses.

As células C2C12 ( $\approx 10^7$  células) foram lisadas nas placas de cultivo utilizando-se 1mL do reagente Trizol e homogeneizando seu material por seguidas pipetagens. Para a extração seguiu-se as orientações da bula do reagente. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 200 $\mu$ L de clorofórmio (PA) às amostras e agitou-se vigorosamente. Estas foram então centrifugadas a 12.000g, 4°C, por 15 minutos. Após a centrifugação, houve a separação das fases: a mais densa (fase orgânica) de coloração rósea, contendo DNA genômico; uma intermediária, contendo proteínas; e uma superior aquosa, contendo o RNA. Apenas a fase aquosa foi coletada, o restante das amostras foi descartado em frascos adequados para o descarte de solventes orgânicos.

À fase aquosa foram adicionados 500 $\mu$ L de isopropanol para a precipitação do RNA total e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000g, 4°C, por 10 minutos. Após a centrifugação, formou-se um pellet de RNA e a solução sobrenadante com isopropanol foi descartada. O pellet de RNA então foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugou-se novamente a 12.000g, 4°C, por 5 minutos. O etanol foi descartado e o pellet seco naturalmente a temperatura ambiente. As amostras de RNA foram armazenadas em biofreezer a -80°C para posterior utilização ou foram diretamente submetidas a quantificação e às reações de RT-PCR.

### ➤ **Avaliação da integridade do RNA**

O RNA foi eluído em 20µL de água RNase-free, tratada com DEPC, por 10 minutos a 56°C e quantificado em espectrofotômetro com luz ultravioleta incidente em comprimentos de onda 260nm, 280nm e 320nm.

A medida em 260nm corresponde a concentração de ácidos nucleicos contidos na amostra. O cálculo foi realizado de acordo com a seguinte fórmula: fator 40 (para RNA) x fator de diluição x absorbância medida. O resultado corresponde à concentração de RNA em µg/ml. A medida em 280nm corresponde à presença de proteínas na amostra. Para verificarmos o grau de pureza do RNA foi realizado o cálculo da razão entre as absorbâncias de 260nm/280nm. Esta razão deveria estar entre 1.8 e 2.0 o que caracteriza alto grau de pureza da amostra. Caso a amostra estivesse com alto nível de proteínas contaminantes o valor da absorbância em 280nm ficaria mais alto e conseqüentemente a razão teria valores mais baixos, o que indicaria a necessidade de uma nova purificação. A medida em 320nm corresponde à presença de solventes orgânicos como álcool e fenol que podem interferir em reações enzimáticas posteriores as quais serão submetidas as amostras de RNA. A medida esperada para este comprimento de onda seria zero para uma amostra livre de contaminação por solventes orgânicos.

Após a quantificação das amostras foi realizado um teste de integridade do RNA. Para isso 0,25µg do RNA total foi submetido a eletroforese em gel desnaturante de 1% de agarose (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 e submetidas à eletroforese com voltagem de 5V/cm, durante 3 horas. Após a corrida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado. Foi então constatada a integridade do RNA pela presença de duas bandas fluorescentes correspondentes às sequências de RNA ribossomal determinados 28S (4,7Kb) e 18S (1,9Kb).

### ➤ **Reação de transcrição reversa**

Nesta etapa foi produzida uma fita complementar de DNA (cDNA) a partir do molde do RNA mensageiro (mRNA). O protocolo utilizado envolveu a seleção do mRNA poliA através do anelamento de oligonucleotídeo polidT e a transcrição do RNA em DNA a partir do uso da enzima de transcrição reversa SuperScriptII (Invitrogen).

O protocolo de reação consistiu das seguintes etapas:

-Inicialmente foram adicionados em um eppendorf:

- 1µL de oligo dT 500µg/mL (Gibco)
- 1-5µg de RNA total
- H<sub>2</sub>O DEPC para volume total de 12µL.

-As amostras foram então incubadas em banho seco por 10 minutos a 70°C e após este período foram colocadas imediatamente em gelo. Esta etapa tem como finalidade a desnaturação completa do RNA e facilitar o anelamento dos oligos dT quando as amostras foram resfriadas em gelo. Foram então adicionados os seguintes reagentes:

- 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.

### ➤ PCR

O cDNA obtido na reação de RT-PCR foi utilizado em posteriores reações de PCR para miogenina e  $\beta$ -actina utilizando os oligonucleotídeos específicos mostrados na tabela 1.

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

*Tabela 1:* Seqüência dos oligonucleotídeos para miogenina e  $\beta$ -actina utilizados nas reações de PCR.

Para a reação de PCR foi utilizada a seguinte reação:

- 5µL de *PCR buffer 10X* (Promega)
- 3µL  $MgCl_2$  25mM (Promega)
- 1µL dNTP mix 10mM (Invitrogen)
- 1µL oligonucleotídeo sense 10µM (Invitrogen)

- 1 $\mu$ L oligonucleotídeo antisense 10 $\mu$ M (Invitrogen)
- 2 $\mu$ L cDNA
- 0,4 $\mu$ L de Taq polimerase (Promega).
- 36,6 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milliQ

Para o PCR da miogenina foram realizados 25 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 de 130pb foi submetido a gel de eletroforese 2% com brometo de etídeo em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA; pH 8,5) e visualizado em luz ultra-violeta.

Para a PCR da  $\beta$ -actina foram realizados 25 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 de 400pb foi submetido a gel de eletroforese 2% com brometo de etídeo em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA; pH 8,5) e visualizado com luz ultra-violeta.

## 5.7. Microscopia confocal

Para avaliar a localização e distribuição de proteínas de interesse nas células C2C12 foi realizada a microscopia confocal.

As células C2C12 foram cultivadas em lâminas até 70% de confluência e então foram realizados os tratamentos desejados. Para manter suas estruturas morfológicas as células passaram pelo processo de fixação, elas foram lavadas rapidamente com PBS 0,1M e fixadas com 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 0,1M a temperatura ambiente.

Para evitar reações inespecíficas e facilitar a entrada do anticorpo nas células foi realizado bloqueio e permeabilização destas células com solução de leite desnatado 3% e triton 0,6% por 1 hora. Logo após foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,1M a temperatura ambiente.

Para a imunomarcação as células foram incubadas com anticorpos primários na diluição 1:75, 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 0,1M a temperatura ambiente e incubadas com anticorpo secundário Alexa fluor (Molecular Probes) conjugado com fluorocromo na diluição 1:200 em solução de leite desnatado 1% por 2 horas no escuro. A partir deste momento sempre houve a preocupação de manter as células no escuro para que não se perdesse a fluorescência do fluorocromo do anticorpo secundário. Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com

PBS 0,1M e montadas em lâminas de vidro utilizando-se Vectashield (Vecta). As lâminas foram observadas com microscópio confocal a laser modelo Zeiss LSM 510.

### **5.8. Ensaio de atividade de fosfatase**

Para medir o nível de atividade de fosfatase da SHP-2 e das fosfatases associadas à Fak, foi realizado ensaios de coimunoprecipitação como descrito anteriormente no item 4.4 com algumas modificações nos tampões de extração e lavagem, pois não deve haver inibidores de fosfatase nos tampões. Os tampões utilizados para este ensaio foram:

- para extração: EDTA 5mM; Tris-HCL 20mM; PMSF 2mM; EGTA 1mM; NaCl 130mM e Aprotinina 0,1mg/ml.

- para lavagem do imunoprecipitado: Hepes 100mM, pH7,6; NaCl 150mM; EDTA 2mM; BSA 0,5mg/ml e DTT 1mM.

Após a obtenção do pellet de agarose contendo as proteínas imunoprecipitadas lavadas, ressuspendeu-se o pellet em 40 $\mu$ L do tampão de lavagem, adicionou-se um peptídeo fosforilado (pp60 c-Src, c-terminal fosfolipídeo regulatório, Biomol Research) na concentração final de 200 $\mu$ M (10 $\mu$ L da solução estoque 1mM) e incubou-se por 1 hora a 30°C para que ocorresse a ação da fosfatase.

Após o período de incubação foram transferidos 40 $\mu$ L de cada amostra para diferentes poços da placa de 96 poços (Glisa), adicionou-se mais 100 $\mu$ L de reagente Bromol Green a cada poço e a mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Este período de tempo é importante para que o reagente Bromol Green reaja

com o fosfato liberado pela ação da fosfatase e dê uma coloração esverdeada ou não da reação de acordo com a concentração de fosfato livre presente.

As amostras foram então lidas e registradas pelo espectrofotômetro de ELISA no comprimento de onda a 595nm e expressos em absorbância.

### **5.9. Ensaio de atividade de creatina quinase**

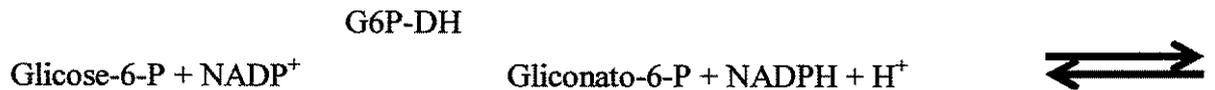
As células submetidas a períodos avançados (5 dias) de indução de diferenciação com ou sem tratamento de inibidores foram analisadas quanto ao nível de atividade de creatina quinase para verificação do processo de diferenciação.

As amostras a serem analisadas foram obtidas a partir do cultivo das células C2C12 com 70% de confluência para o controle e 5 dias de indução a diferenciação com ou sem inibidores para as amostras.

A extração de proteínas foi realizada como descrito no item de extração de proteínas totais, mas utilizando apenas PBS 0,1M + 2mM PMSF + Aprotinina 0,1mg/ml como tampão de extração. As amostras extraídas foram enviadas ao laboratório de análises clínicas do Hospital da Unicamp para a medida dos níveis de creatina quinase.

Esta medida foi obtida a partir da utilização do Kit CK da Roche Diagnostics. A medida se consiste na análise fotométrica do produto da reação NADPH cuja a razão é proporcional à atividade da creatina kinase.

\* reação realizada pelo uso do Kit CK:



Os resultados de atividade de creatina quinase foram então normalizados pela concentração de proteínas contidas na amostra. Esta concentração foi obtida pelo método de Lowry como descrito no item 4.3.



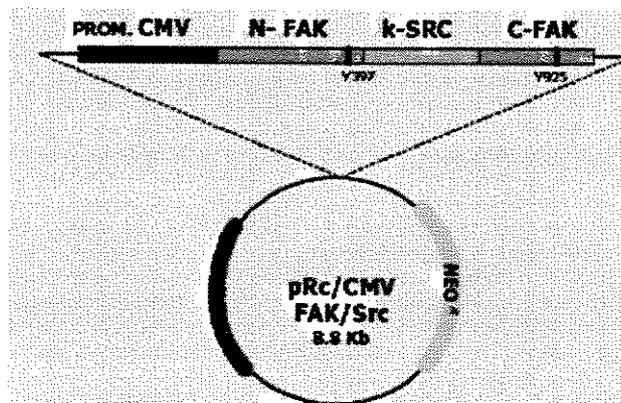
### 5.10. Análises estatísticas

Quando necessário os dados passaram por análises estatísticas ~~que foram~~ realizadas no programa Excel da Microsoft, utilizando o teste “ANOVA: Single Factor”.

### 5.11. Produção e Estabilização da Linhagem Celular C2C12 Fak/Src

Para se obter a linhagem celular C2C12 Fak/Src, foi utilizada uma construção doada pelo pesquisador Steve Hanks da Universidade de Varderbilt, Tenesse, EUA, contendo um gene de uma proteína quimérica Fak/Src sob o domínio de um promotor

viral CMV, que permite a expressão contínua do gene em células de mamíferos. Nesta construção também se encontrava um gene reporter de resistência a neomicina, que foi importante para a seleção das células positivamente transfectadas (figura 10). Esta proteína quimérica Fak/Src corresponde à estrutura da proteína Fak onde sua porção kinase foi trocada pela porção kinase da proteína Src. Devido a atividade kinase da Src ser mais forte, era esperado que esta proteína funcionasse como uma proteína Fak constitutivamente ativa.



*Figura 10:* Plasmídeo pRc/CMV Fak/Src correspondente à construção utilizada para a produção da linhagem C2C12 Fak/Src.

A linhagem C2C12 Fak/Src foi originada a partir de um protocolo de eletroporação para células de mamíferos, o que permitiu a introdução e a integração da construção da proteína Fak/Src no genoma de células C2C12.

Uma cultura não confluenta, em crescimento exponencial, de células C2C12 foi lavada em PBS 0,1M e as células removidas com solução de tripsina 0,25%. Para inativar a tripsina foi adicionada o mesmo volume de meio DMEM contendo 10% de SFB e a solução foi pipetada para cima e para baixo repetidas vezes para produzir uma solução de células isoladas. Estas células foram então centrifugadas e ressuspensas em PBS 0,1M

estéril na densidade de  $1 \times 10^7$  céls./ml. Para a eletroporação, 0,8ml de células foram transferidos para cuvetas de eletroporação estéreis e adicionou-se 25 $\mu$ g de DNA linearizado com enzima de restrição Not I e purificado; misturou-se bem e manteve-se em temperatura ambiente por 5 minutos. Foi então aplicado um pulso elétrico de 240V e 500 $\mu$ F à mistura de DNA e células C2C12. Após o pulso as células foram mantidas em gelo por 5 minutos e então plaqueadas em placas de vidro contendo MC por 24 horas. Após este período as células foram submetidas a seleção com MC contendo antibiótico neomicina a 800 $\mu$ g/ml. O meio de seleção foi trocado a cada 2 dias e as células foram mantidas em seleção no período de 1 mês. Toda vez que atingiam à confluência de 70 % as células foram removidas e replaqueadas. Após este período a cultura foi mantida com 200 $\mu$ g/ml de neomicina presente no MC. Após 100 passagens por replaqueamento (ano) a linhagem celular foi estabelecida e usada nos experimentos deste trabalho.

### **5.12. Curva de Crescimento Celular**

As curvas de crescimento das células C2C12 e C2C12 Fak/Src foram realizadas a partir de uma cultura mãe 70% confluenta em garrafas grandes para cada uma destas células. As culturas foram tripsinizadas e divididas em uma placa de 24 poços (6 colunas e 4 linhas). Cada tipo celular foi dividido em 12 poços, as duas primeiras linhas para o tipo C2C12 e as 2 últimas linhas para o tipo C2C12 Fak/Src.

As células começaram a ser contadas no dia seguinte, quando todas já estavam aderidas. A contagem ocorreu de 12 em 12 horas até um total de 60 horas. Cada coluna correspondia a uma amostragem de 12 horas, a primeira coluna foi considerado o tempo

zero, a segunda 12 horas, a terceira 24 horas e assim por diante até 60 horas. Considerando cada poço uma amostra, cada tipo celular continha duas amostras para cada amostragem de tempo.

As células foram tripisinizadas, cada poço no horário determinado, e as amostras foram submetidas a contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante de exclusão azul de tripan. Cada amostra foi contada em quatro quadrantes da câmara de Neubauer e o valor total foi dividido por quatro obtendo a média do número de células em um quadrante. Esta contagem foi realizada em triplicata para cada amostra e foi calculada a média das três contagens. Por último foi calculada a média do valor médio das duas amostras correspondentes ao mesmo período de tempo.

Este valor final do número de células de cada intervalo de tempo foi utilizado para plotar as curvas de crescimento. Foram produzidas duas curvas, uma logarítmica e uma de crescimento tendencioso. A curva logarítmica foi produzida para verificar quais amostras estavam em ascendência e seriam utilizadas para a segunda curva. A segunda curva foi produzida a partir das amostras escolhidas na curva logarítmica (até 48 horas) utilizando o comando Growth do programa Excell da Microsoft. O qual permite a construção de uma curva que mostra a tendência de crescimento da população, que é regida pela seguinte fórmula:  $Y=b.m^x$ , onde Y corresponde ao número de células; b o número de células que corta o eixo y; m constante de crescimento e x número de horas. Substituindo os valores da curva na fórmula conseguimos calcular quanto tempo cada célula demora para se duplicar, que é o mesmo tempo que a população inicial leva para se duplicar. A confiabilidade da função foi verificada estatisticamente através do seu coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

### **5.13. Ensaio comparativo de sobrevivência, proliferação e motilidade das células C2C12 e C2C12 Fak/Src**

#### **➤ Sobrevivência celular**

O primeiro ensaio foi para verificar a sobrevivência celular em cultura. Para isso, as células C2C12 e C2C12 Fak/Src foram mantidas em cultura em meio de cultivo (DMEM 10% SFB; 1% antibiótico) até confluência de 70% e a partir deste instante foi checado dia a dia a sobrevivência celular, contando o número de dias que as células se mantinham aderidas na placa de cultura até começarem a se soltar e morrer. O meio foi trocado a cada 2 dias para manter suas características nutricionais.

#### **➤ Proliferação e sobrevivência celular dependente de ancoragem**

O segundo ensaio foi para verificar a proliferação e a sobrevivência celular dependente de ancoragem das células C2C12 e C2C12 Fak/Src. Para este ensaio as células foram submetidas a cultivo em meio semi-sólido de 0,5% de agarose em DMEM 10% SFB e 1% antibiótico, em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e 85% de umidade. As células foram mantidas em cultivo no período de 30 dias, depois fixadas em formol 10% e coradas com Hematoxilina e Eosina para verificar a integridade das células. Após a coloração as placas foram observadas em microscópio invertido e fotografadas em câmera digital.

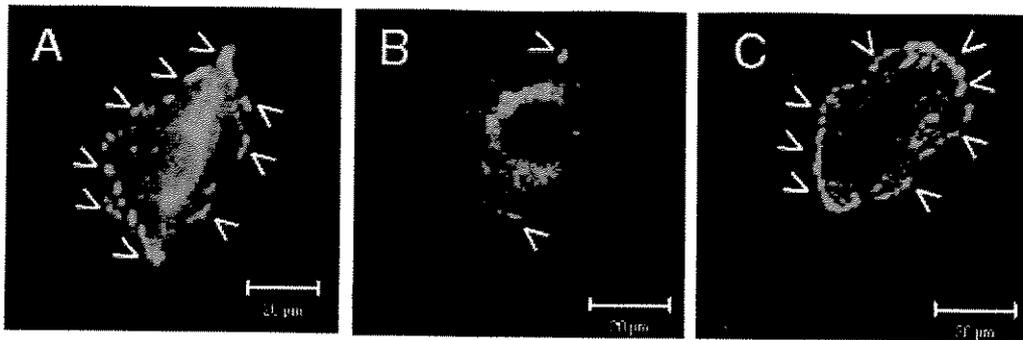
➤ **Motilidade celular**

O terceiro ensaio foi para verificar a motilidade (migração) das células C2C12 e C2C12 Fak/Src. As células foram mantidas em meio de cultivo até 70 % de confluência em placas de 60mm de diâmetro. Então, passou-se um rodo de extração celular estéril no meio da placa retirando uma faixa central de células, dividindo as células cultivadas em duas partes. A cultura foi verificada dia a dia até que as células dos dois lados migrassem até se encontrarem. O tempo que foi necessário para este encontro foi quantificado e comparado entre os dois tipos celulares. As células também foram diariamente fotografadas em câmera digital acoplada a um microscópio invertido para a documentação do crescimento celular.

## **6. Resultados**

### **6.1. Localização da FAK durante a etapa inicial da miogênese**

Como foi descrito anteriormente por Clemente et al. (2005), a FAK apresenta um papel crítico no processo inicial da miogênese. Isto foi evidenciado principalmente na primeira hora após a indução da diferenciação de mioblastos em miotubos, quando ocorre uma abrupta diminuição da fosforilação da tirosina 397 (Y-397) da FAK. A fosforilação no resíduo Y-397 correlaciona-se com sua atividade (Calalb e Hanks, 1995) e também é essencial para a diferenciação dos mioblastos. Para avaliar os possíveis mecanismos responsáveis pela redução transitória da fosforilação da FAK na Y-397 avaliamos inicialmente a distribuição e localização sub-celular da FAK nas células C2C12 através de imunomarcção com anticorpo anti-FAK de células controle (i.e. cultivadas em meio de proliferação) e células cultivadas durante 1 e 4 horas em meio de diferenciação (MD). Os tempos de 1 hora e 4 horas foram escolhido por se tratar, respectivamente, do período onde ocorre a redução da fosforilação da Y-397 e seu retorno ao nível inicial (controle).



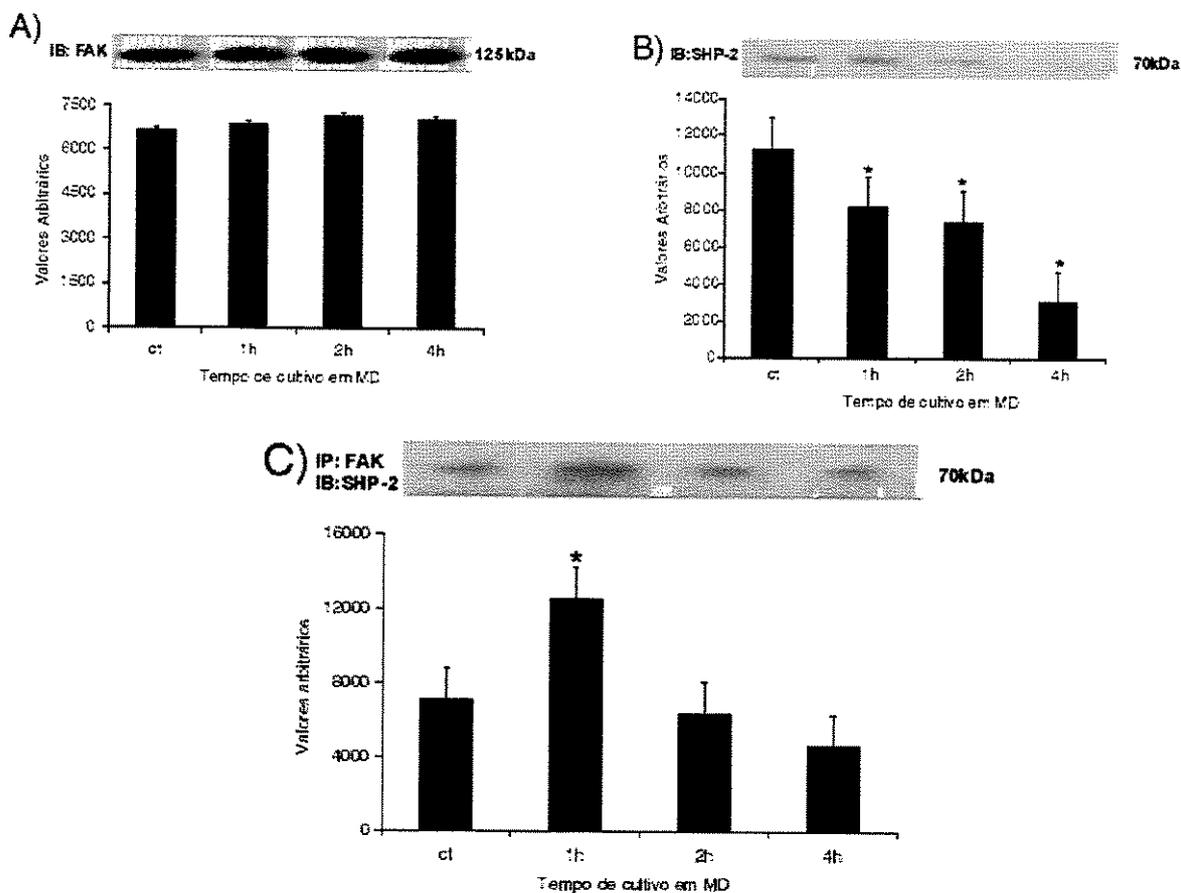
*Figura 11:* Distribuição da FAK no período inicial da indução de células C2C12 à diferenciação. As células a partir de 24 horas em meio de cultivo (A) foram submetidas a diferenciação com MD nos períodos de 1 hora (B) e 4 horas (C). As imagens correspondem à imunomarcação em verde da proteína FAK utilizando anticorpo anti-FAK (c-20). As cabeças de setas indicam as possíveis localizações do CAF evidenciadas pela marcação em verde da FAK. Aumento 1200x.

Na figura 11 podemos observar que a proteína FAK nas células em proliferação, como já era esperado, além de aparecer no citoplasma, apresenta-se principalmente na extremidade de filamentos e prolongamentos celulares, presumivelmente, em correspondência com a localização do complexo de adesão focal (CAF). Estas estruturas são observadas na figura 11 indicada por pontos de coloração verde intensa que contornam a periferia da célula. No período de 1 hora em MD, ocorreu redução expressiva da localização da FAK na periferia das células, após 4 horas em meio de diferenciação, houve reestabelecimento da localização periférica da FAK.

Estes dados se correlacionam com as observações de Clemente e seus colaboradores (2005) quanto à desfosforilação da Y397 da FAK no período de 1 hora e retomada da sua fosforilação no período de 4 horas.

## **6.2. Influência do meio de diferenciação na associação FAK/SHP-2**

A ativação de tirosino-fosfatases seria um dos mecanismos que potencialmente poderiam contribuir para a redução transitória da fosforilação da FAK na transição entre o estado de proliferação e o início da diferenciação em células C2C12, assim como a concomitante redução da presença da FAK na região periférica da célula, como observado na figura 11. Evidências experimentais anteriores indicam que o nível de fosforilação da FAK pode ser regulado pela tirosina-fosfatase SHP2 (Manes et al., 1999). Esta hipótese foi avaliada inicialmente através da avaliação de associação entre FAK e SHP2 em ensaios de co-imunoprecipitação com anticorpos anti-FAK e anti-SHP2. Os resultados destes ensaios estão sumarizados na Figura 12. Observa-se que SHP2 pode ser recuperada de imunoprecipitados com anticorpo anti-FAK tanto em células em proliferação como em células em diferenciação. Células C2C12 cultivadas em MD por 1 hora apresentaram elevação significativa da quantidade de FAK associada a SHP-2. Após 2 e 4 horas em MD, a associação FAK/SHP2 voltou aos níveis apresentados pelas células em proliferação (C). Nota-se ainda, que a expressão de FAK neste período de diferenciação não se alterou, mas houve diminuição significativa da expressão de SHP-2.



**Figura 12:** (A) Representação da expressão de FAK no cultivo de C2C12 em MD no período inicial de indução à miogênese. (B) Representação da expressão de SHP-2 nas mesmas condições de "A". (C) Representação gráfica da interação da proteína tirosino-fosfatase SHP-2 com a FAK em células C2C12 induzidas à miogênese do ensaio de coimunoprecipitação do anticorpo específico anti-FAK e blot com anti-SHP-2 das amostras de proteínas controle (ct), 1 hora (1h), 2 horas (2h) e 4 horas (4h) de indução a diferenciação de células C2C12 em meio de diferenciação (MD). IP=imunoprecipitado; IB=imunoblotting; n=3; (\* ) P<0,05.

Como demonstrado na figura 12, o nível de interação da FAK com a SHP-2 mostrou um aumento exatamente no período de 1 hora, que corresponde ao período de desfosforilação da Y-397 da FAK observado por Clemente et al. (2005).

### 6.3. Atividade de tirosina-fosfatase em células C2C12 durante a fase inicial da diferenciação.

Com base nos resultados de co-imunoprecipitação, decidimos avaliar a atividade de fosfatase em imunoprecipitados de anticorpos anti-SHP2 obtidos de extratos de células C2C12 em proliferação e após 1 e 4 horas em MD. Como demonstrado no gráfico da figura 13 observamos um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da atividade de fosfatase em imunoprecipitados de anticorpos anti-SHP2 em células cultivadas por 1 hora em MD. Os valores da atividade de fosfatase associada a imunoprecipitados com anticorpo anti-SHP2 em células cultivadas por 4 horas em MD voltaram aos níveis observados em células em proliferação.

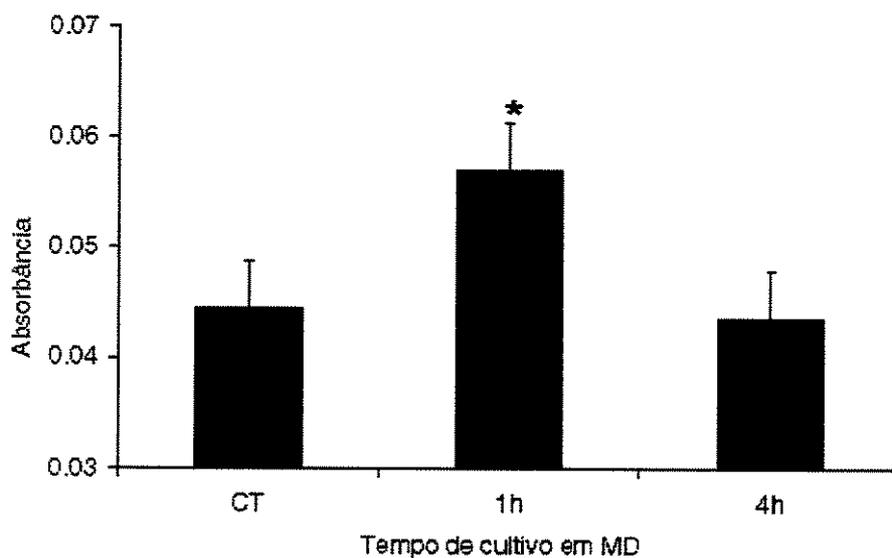
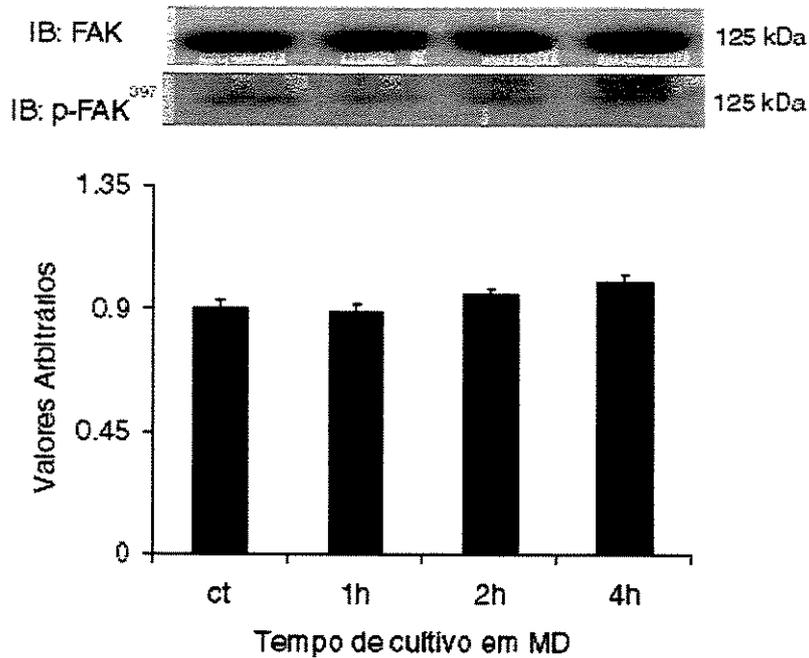


Figura 13: Representação gráfica da atividade de fosfatase do imunoprecipitado de SHP-2, no período controle (ct), 1 hora (1h) e 4 horas(4h) de indução à diferenciação das células C2C12. P=imunoprecipitado; n=2; (\* )  $P < 0,01$ .

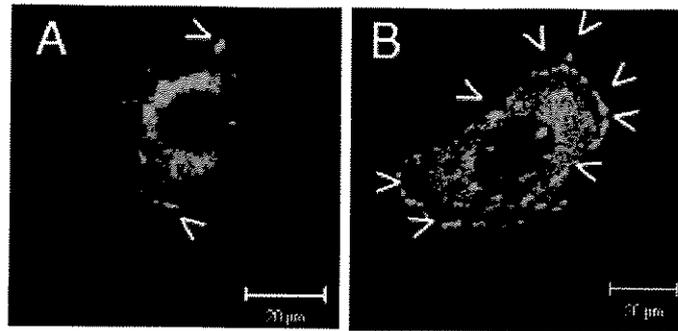
#### **6.4. Influência da atividade de fosfatase na fosforilação da FAK.**

Para avaliar a importância da atividade de fosfatases na fosforilação da FAK, bem como no processo de diferenciação das células C2C12 em miotubos, algumas culturas foram conduzidas na presença do inibidor inespecífico de tirosina-fosfatase, o ortovanadato de sódio (5 $\mu$ M). A fosforilação da FAK foi avaliada através da razão entre a quantidade de FAK detectada com anticorpo anti-fosfo-FAK (Y-397) e a quantidade detectada com o anticorpo anti-FAK. Células tratadas com ortovanadato não apresentaram a redução transitória da quantidade de FAK fosforilada observada após 1 hora em MD (figura 14), indicando que a redução transitória na fosforilação da FAK depende da atividade de fosfatases. Podemos concluir com estes resultados que o uso do ortovanadato nos permite inferir sobre a importância da atividade fosfatase no progresso da diferenciação das células C2C12 em miotubo.



*Figura 14:* Nível de fosforilação da Y-397 da FAK medido pela razão entre os valores densitométricos dos imunoblotting (IB) dos anticorpos anti-p-FAK<sup>397</sup> e anti-FAK das amostras de proteínas controle (ct), 1 hora (1h), 2 horas (2h) e 4 horas (4h) de indução a diferenciação de células C2C12 com ortovanadato. (n=3).

Em seguida avaliamos a relação entre o estado de fosforilação na Y-397, a atividade de tirosino-fosfatases e a localização subcelular da FAK em células em MD. Assim, células C2C12 tratadas com ortovanadato, foram avaliadas através de imunofluorescência com anticorpo anti-FAK. Na figura 15 observamos que na presença do inibidor de fosfatase, as células no período de 1 hora de cultivo em MD apresentaram FAK nas regiões de CAF (painel B), ou seja, não houve a redução da marcação na periferia das células vista em células não-tratadas com ortovanadato (painel A).



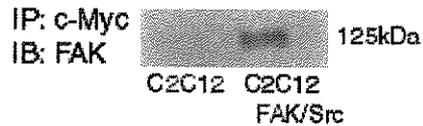
*Figura 15:* Células C2C12 submetidas a 1 hora em MD sem ortovanadato (A) e com 5 $\mu$ M de ortovanadato (B). As imagens correspondem à imunomarcação em verde da proteína FAK utilizando anticorpo anti-FAK (c-20). Possível CAF (cabeça de seta). Aumento 1200x.

### 6.5. Linhagem C2C12 FAK/Src

Células C2C12 foram transformadas com construção FAK/Src, a qual permitiria que as células estivessem com a via de sinalização da FAK constitutivamente ativa, com a finalidade de obter uma linhagem e permitir a avaliação da influência da hiperatividade da FAK no fenótipo deste tipo celular. Esta construção continha um gene de seleção de resistência a neomicina, o que foi útil para separar as células transfectadas das células não transfectadas. Durante um mês estas células foram mantidas com alto nível de neomicina (800 $\mu$ g/ml). Células selvagens eram também tratadas com meio seletivo contendo neomicina para checar o seu poder seletivo. Todas as 4 placas (1 por semana) de células selvagem apresentaram morte de 100% das células, enquanto as células transfectadas, que se mantinham em proliferação, foram repicadas e mantidas em cultivo.

Para a confirmação da expressão da proteína recombinante nas células transformadas utilizamos ensaios de imunoprecipitação com anticorpo anti-c-myc que reconhece a cauda de c-myc construída em fusão com a proteína recombinante FAK/Src.

Na figura 16 podemos observar o resultado da imunoprecipitação com o uso do anticorpo monoclonal específico para o C-myc e o imunoblotting com FAK. Este resultado mostra a presença de expressão da proteína FAK/Src nas células C2C12 FAK/Src e ausência de banda nos imunoprecipitados de células não transformadas.



*Figura 16:* Imunoblotting mostrando a presença de expressão da proteína quimérica FAK/Src nas células da linhagem C2C12 FAK/Src. IP: imunoprecipitado; IB: Imunoblotting.

#### **6.6. Nível de fosforilação da Y-397 da FAK nas células C2C12 FAK/Src**

Para estimarmos o nível de atividade da construção FAK/Src em células C2C12 transformadas avaliamos a quantidade de proteína reconhecida pelo anticorpo anti-fosfoespecífico que reconhece a Y-397 da FAK. Foram avaliadas células em meio de proliferação e MD.

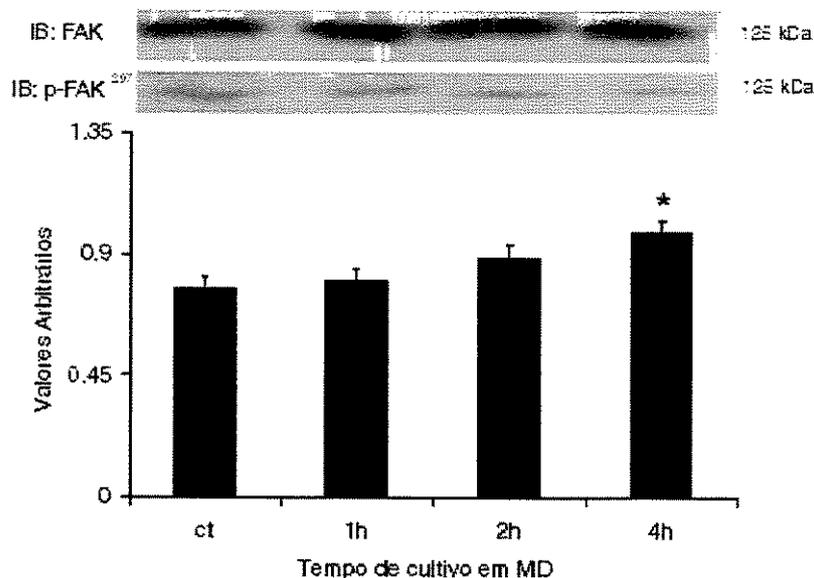


Figura 17: Nível de fosforilação da Y-397 da FAK medido pela razão entre a quantificação densitométrica dos imunoblotting (IB) dos anticorpos anti-p-FAK<sup>397</sup> e anti-FAK das amostras de proteínas controle (ct), 1 hora (1h), 2 horas (2h) e 4 horas (4h) de indução a diferenciação de células C2C12 FAK/Src. (n=3). (\* ) P<0,05.

Na figura 17 estão representados os valores do nível de fosforilação da Y-397 presente nas células C2C12 FAK/Src. Como mostrado no gráfico, a transformação das células C2C12 com a construção FAK/Src impediu a redução transitória da fosforilação da FAK induzida pela mudança do meio de cultura. Pode-se concluir destes resultados que as células transformadas FAK/Src são um bom modelo para se avaliar a importância na FAK na diferenciação de mioblastos C2C12.

### 6.7. Diferenciação celular com a inibição da desfosforilação da Y-397

Para verificar a influência da redução transitória da fosforilação da FAK na Y-397 na diferenciação dos mioblastos avaliamos a expressão de marcadores de diferenciação

em células C2C12 tratadas com ortovanadato e células C2C12 transformadas com a construção FAK/Src.

### 6.7.1. Miogenina

#### ➤ Western blotting e imunomarcção

Verificamos através de western blotting e imunomarcção a expressão da miogenina, um reconhecido marcador bioquímico de diferenciação de mioblastos. Células C2C12 mantidas por 5 dias em MD apresentam expressão de miogenina (figura 18). Nas amostras obtidas de culturas em meio de proliferação (MC), de células tratadas com ortovanadato ou de células C2C12 transformadas com FAK/Src não foi observada expressão de miogenina, indicando inibição da diferenciação.

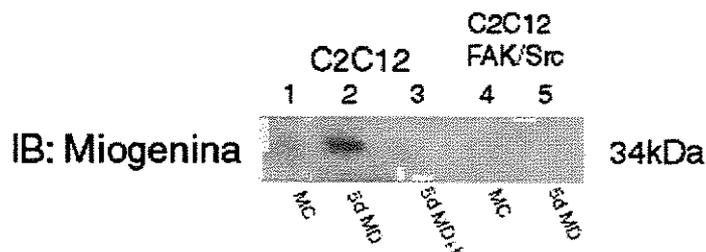
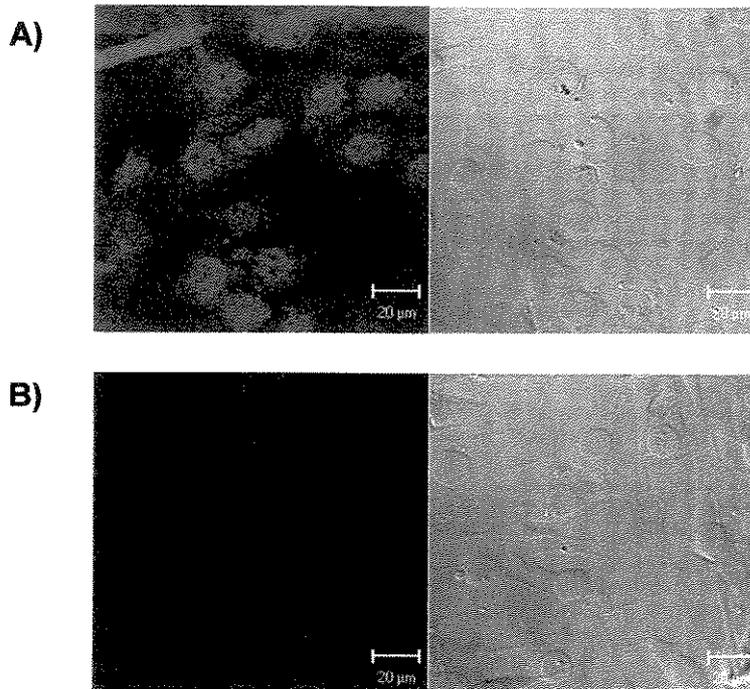


Figura 18: Imunoblotting (IB) de miogenina nas amostras de C2C12 selvagem (1, 2 e 3) e C2C12 FAK/Src (4 e 5) cultivadas por 5 dias em meio de diferenciação sem ortovanadato (5d MD) e com o ortovanadato (5d MD+I) e ainda amostras controles de C2C12 (1) e C2C12 FAK/SRC (4) em meio de cultivo (MC).

Na análise de imunomarcção (figura 19), foi confirmada a presença de miogenina nas células C2C12 cultivadas em MD por 5 dias e sua ausência quando as células C2C12 foram cultivadas por 5 dias em MD com ortovanadato, mostrando mais uma vez a inibição da progressão da miogênese pela utilização de ortovanadato no MD.



*Figura 19:* Imunomarcção da miogenina utilizando anticorpo específico anti-miogenina e anticorpo secundário fluorescente anti-IgG Alexa (vermelho). O posicionamento celular é observado pela imagem em contraste de fase. As imagens foram realizadas em microscópio confocal, aumento 600x. (A) C2C12 cultivadas 5 dias em MD; (B) C2C12 cultivadas 5 dias em MD + 5  $\mu$ M ortovanadato.

### ➤ RT-PCR

Além da imunomarcção da miogenina, resolvemos utilizar a técnica de transcrição reversa acoplada à PCR para checar a presença de RNA mensageiro (mRNA) para miogenina, reforçando os dados da imunomarcção. Através da reação de transcrição reversa (RT), produzimos o DNA complementar (cDNA) derivados de amostras de RNA total de células mantidas por 5 dias de cultivo em meio de diferenciação. Após a transcrição reversa, submetemos o cDNA à reação de polimerase em cadeia (PCR) para verificar a presença de transcritos da miogenina. A figura 20 mostra, como esperado, que células C2C12 cultivadas em MD por 5 dias apresentaram expressão de transcritos de

miogenina, enquanto nas amostras obtidas de células tratadas com ortovanadato ou células C2C12 transformadas, não foi possível verificar a expressão de transcrito de miogenina.

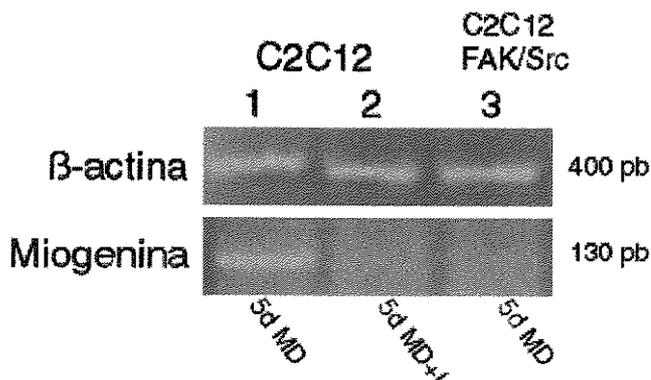
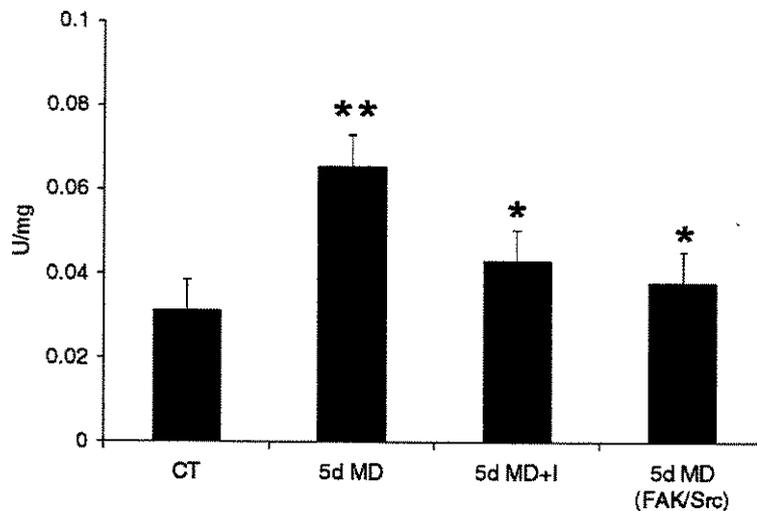


Figura 20: Resultado do RT-PCR para miogenina das amostras de C2C12 selvagem (1 e 2) e C2C12 FAK/Src (3) cultivadas por 5 dias em meio de diferenciação sem ortovanadato (5d MD) e com o ortovanadato (5d MD+I).

### 6.7.2. Creatina quinase

Além da miogenina, um outro marcador amplamente utilizado para a verificação de diferenciação de mioblastos é a creatina quinase. Ao longo do processo de diferenciação mioblástica existe a expressão de creatina quinase músculo-específica. Como indicado na figura 21, as amostras correspondentes à linhagem C2C12 tratada com ortovanadato e à linhagem transformada com FAK/Src cultivada em MD por 5 dias apresentaram atividade de creatinina menor que aquela de células controle cultivadas em MD. Esta diminuição indica uma interrupção do processo de diferenciação destas células, devido ao baixo índice de atividade de creatina quinase apresentado.



*Figura 21:* Dosagem da atividade de creatina quinase de amostras submetidas a 5 dias de diferenciação em meio de diferenciação (5d MD). Os dados estão expressos em unidade de CK por miligramas de proteína total (U/mg). A amostra 5d MD corresponde ao controle positivo para diferenciação C2C12 com 5 dias em MD; a 5d MD+I corresponde à amostra de C2C12 com 5 dias em MD na presença de 5  $\mu$ M de ortovanadato (inibidor de tirosina-fosfatase); a amostra 5d MD (FAK/Src) corresponde à linhagem C2C12 FAK/Src em 5 dias MD, CT corresponde às células controle em proliferação. (n=3). ( \*\* ) P<0,05 comparado ao CT; ( \* ) P<0,05 comparado à 5d MD.

## 6.8. Alterações funcionais das células C2C12 FAK/Src

### ➤ Curva do crescimento celular

As curvas de crescimento foram obtidas de valores de contagens de células cultivadas em meio de proliferação, sendo os resultados apresentados em escala logarítmica. A curva de crescimento das células transformadas foi avaliada comparativamente com aquela das células não transformadas (Figura 22). Houve crescimento exponencial de ambos os tipos celulares nas primeiras 48 horas de cultivo, sendo que após este período houve estabilização do número de células na cultura de C2c12 FAK/Src.

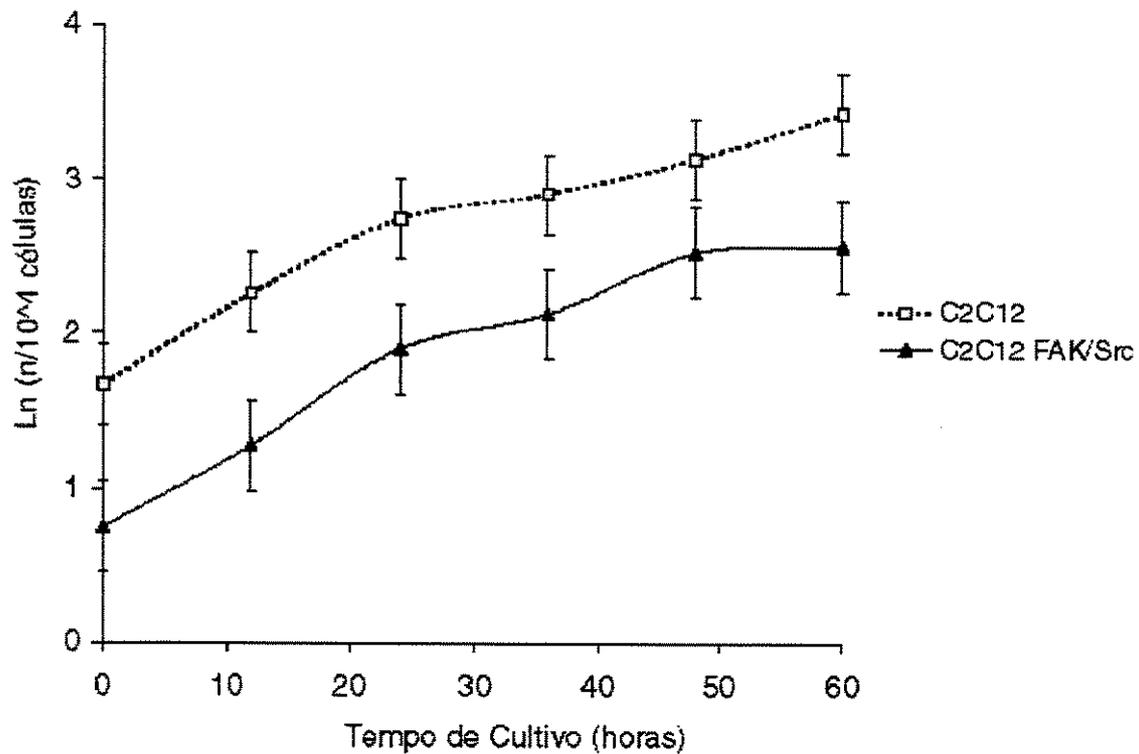


Figura 22: Curva representativa do crescimento celular das linhagens C2C12 e C2C12 FAK/Src obtidas pelo cálculo do logaritmo natural (Ln) do número de células dividido por  $10^4$  contadas no período determinado pelo eixo X.

Com base nesta análise de crescimento das células, escolhemos o período de 0 a 60 horas de cultivo para as células C2C12 não transformadas e o período de 0 a 48 horas para as células C2C12 FAK/Src, para a obtenção da curva de tendência do crescimento de cada população de células e assim obter a o número médio de horas necessárias para duplicação celular para cada linhagem. Na figura 23 podemos observar o gráfico da função  $Y=b.m^x$ , onde Y corresponde ao número de células; b o número de células no tempo 0; m constante de crescimento e x número de horas de cultivo.

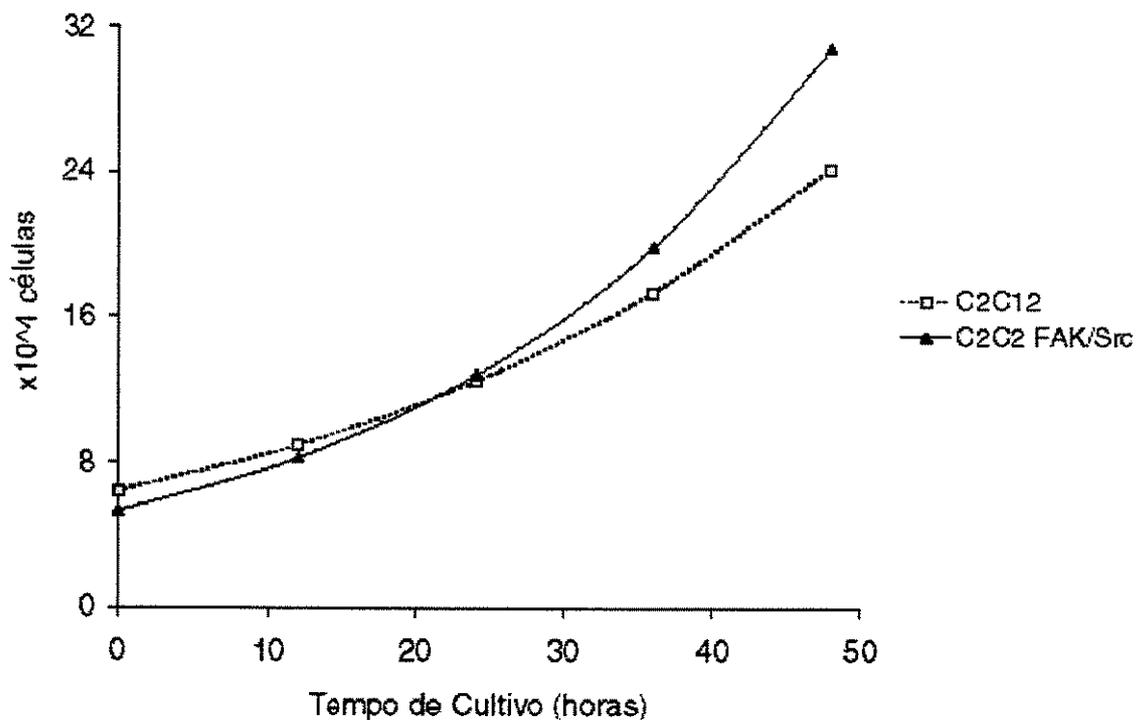


Figura 23: Curva representativa das funções de tendência do crescimento populacional de cada uma das linhagens C2C12 ( $r^2 = 0.95$ ) e C2C12 FAK/Src ( $r^2 = 0.98$ ). A função da C2C12 FAK/Src foi multiplicada pelo fator 2.3 para aproximação das curvas e melhor comparação entre elas.  $r^2$  = coeficiente de confiabilidade da curva estatisticamente obtido, onde 1 corresponde a 100% de confiabilidade.

Neste gráfico verificamos uma tendência maior de crescimento na população de células C2C12 FAK/Src, quando comparada à população de células C2C12. Com estas curvas foi possível calcular o tempo de duplicação celular de cada população o que foi representado na tabela 2.

População de células	Horas para duplicação
C2C12	25,15± 1,5
C2C12 FAK/Src	18,95± 0,38

Tabela 2: Tempo médio de duplicação celular das populações C2C12 e C2C12 FAK/Src de acordo com a função demonstrada na figura 23.

As células C2C12 originais apresentaram uma taxa de duplicação de 25,15 horas, enquanto as células C2C12 FAK/Src apresentaram uma taxa de duplicação de 18,95 horas, mostrando que a linhagem transformada tem uma velocidade de crescimento maior que a original.

➤ **Sobrevivência celular**

Para verificar a diferença na sobrevivência avaliamos o período, em dias, que as células se mantinham em cultura após a confluência. Como indicado na tabela 6.2 as células C2C12 tiveram um período de sobrevivência de aproximadamente 7 dias após confluência. Já as células C2C12 FAK/Src permaneceram aderidas após 30 dias de cultivo, indicando a longevidade deste tipo celular.

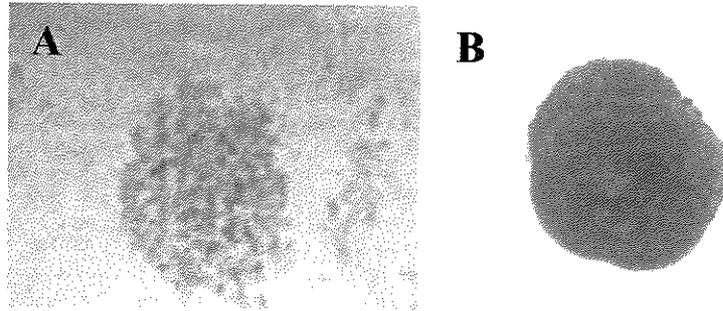
População de células	Sobrevivência pós confluência
C2C12	7 dias
C2C12 FAK/Src	> 30 dias

*Tabela 3:* Tempo médio de sobrevivência das células C2C12 e C2C12 FAK/Src.

➤ **Proliferação e sobrevivência celular não-dependente de ancoragem**

As duas populações celulares C2C12 e C2C12 FAK/Src foram cultivadas em meio semi-sólido com 0,5% agarose, o que simula o desenvolvimento celular em suspensão. Este meio foi escolhido para verificar características do desenvolvimento celular como sobrevivência e proliferação, que são dependentes da ancoragem das células ao substrato. Como demonstrado no exemplo representativo da figura 24, verificamos que as células C2C12 não transformadas mantidas em meio semi-sólido apresentam-se degeneradas. Por outro lado, as células C2C12 FAK/Src apresentavam sinais de

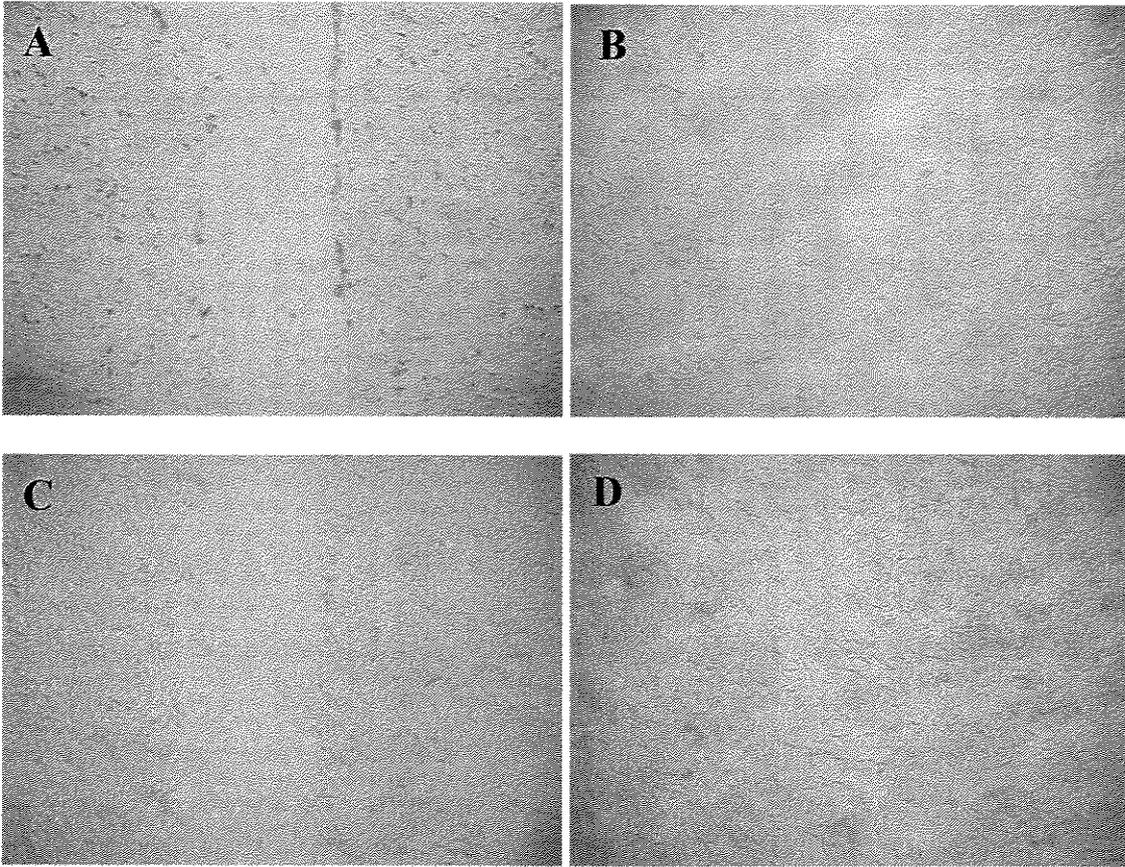
vitalidade celular indicados pela presença de núcleos claros e heterocromatina visível. Além disso, as células apresentavam-se em colônias ( $\pm 8$  células), indicando proliferação. Indicando uma não dependência de ancoragem destas células transformadas.



*Figura 24:* Fotos das células C2C12 (A) e C2C12 FAK/Src (B) submetidas a 35 dias de cultura em meio semi-sólido e coradas com HE. Aumento 600x.

#### ➤ **Motilidade celular**

A FAK é uma proteína que reconhecidamente está envolvida em funções motoras e de migração celular. Cultivamos então, as linhagens C2C12 e C2C12 FAK/Src para obtermos uma resposta comparativa destas duas linhagens quanto a sua motilidade celular. Para avaliação do efeito da transformação celular com a construção FAK/Src, realizamos ensaio de migração celular *in vitro*. Para isso, as células foram cultivadas até sua confluência e retirou-se uma faixa de células da cultura. Em seguida, verificamos o repovoamento da região de escarificação. Como indicado na figura 25, após 24 horas as células transformadas com FAK/Src haviam repovoado completamente a região de escarificação da cultura, enquanto as células não transformadas não repovoaram completamente a região de escarificação. Estes resultados indicam maior capacidade de migração das células transformadas.



*Figura 25:* Cultura de células C2C12 (A e B) e C2C12 FAK/Src (C e D). Logo após a retirada de uma faixa de células da cultura confluyente (A e C) e 24 horas depois (B e D) em MC. Aumento 50x em contraste de fase.

## 7. Discussão

Avanços no conhecimento da biologia celular e molecular das células de músculo esquelético permitiram progressos significativos no entendimento dos mecanismos básicos da miogênese. Hoje estão esclarecidos os mecanismos responsáveis pela regulação e expressão de proteínas reguladoras conhecidas como MRFs, responsáveis, em última instância pela regulação da expressão do programa gênico envolvido na diferenciação de células mesenquimais em mioblastos e destes em miócitos diferenciados. Este conhecimento tem grande importância prática já que, esclarece mecanismos básicos responsáveis pelo reparo e crescimento do tecido muscular.

Além do melhor entendimento do controle da expressão gênica no programa de miogênese, também está bem estabelecido que a ausência de fatores de crescimento é determinante para a mudança do perfil celular de um programa de proliferação para um programa de diferenciação terminal de mioblastos em miotubos (YUN e WOLD, 1996). Além disso, são inúmeras as evidências de que o contato de mioblastos com a matriz extracelular tem importância tanto na proliferação e sobrevivência como na miogênese e trofismo de células diferenciadas em miotubos e músculo esquelético (OSSES e BRANDAN, 2002; BUCK e HORWITZ, 1987; MELO et al., 1996; MAYER, 2003). As integrinas, principais efetores do contato célula-matriz extracelular, desempenham um papel fundamental na proliferação de mioblastos, assim como na sua miogênese (MAYER, 2003; SASTRY et al., 1999). No entanto, os mecanismos de sinalização que medeiam estes efeitos são ainda pouco conhecidos.

A estimulação extracelular de integrinas promove sinalização citoplasmática que resulta na mobilização de diferentes processos celulares (OSSES e BRANDAN, 2002; MENKO e BOETTIGER, 1987). Esta sinalização é decorrente da ativação em série de proteínas que interagem entre si, resultando em mensagem para o núcleo celular, modificando drasticamente o comportamento e o fenótipo celulares, como é o caso da miogênese. A FAK é conhecida como um elemento sinalizador operacionalmente vinculado às integrinas e a estímulos extracelulares mediados pela matriz extracelular e por receptores celulares específicos (SCHALLER et al., 1994; XING et al., 1994). Também existem evidências de que a FAK participa no programa de diferenciação mioblástica (ROY et al., 2002; Sastry et al., 1999; KUMAR et al., 2004).

Estudos prévios em nosso laboratório indicaram um comportamento bifásico da fosforilação da Y397 da FAK, logo nas primeiras horas de indução de células C2C12 com meio de diferenciação (Clemente et al., 2005). A ativação (SASTRY et al., 1999) ou a inativação (Clemente et al., 2005) forçada da FAK em células em proliferação colaboram para a inibição da miogênese. Estes resultados indicam que a regulação da atividade da FAK no período inicial da miogênese é um importante regulador da mudança de um fenótipo proliferativo para um fenótipo diferenciado de célula muscular.

No presente estudo, examinamos de forma mais detalhada os mecanismos responsáveis pela redução transitória da fosforilação da FAK, bem como a importância da supressão da redução transitória da fosforilação da FAK no período inicial da diferenciação miogênica através da superexpressão de FAK transformada com sítio ativo da Src. Os resultados mostraram que a redução transitória da fosforilação da FAK em células C2C12 no início do processo de diferenciação celular deve-se à ação da tirosino-

fosfatase SHP-2. Estudos deletérios tanto da FAK (FUTURA et al., 1995), quanto da SHP-2 (SAXTON et al., 1997) mostraram problemas de desenvolvimento embrionário em períodos entre 7.5 e 8.5 correspondentes ao término da gastrulação e início da miogênese, indicando fenótipos de desestruturação tecidual semelhante. Isto pode nos levar a crer, que ambas as proteínas possam ser importantes neste mesmo processo inicial da miogênese *in vivo*, reforçando nosso achados. Por outro lado, nossos resultados também indicaram que a superexpressão de FAK/Src estabelece resistência à diferenciação de mioblastos em miócitos cultivados em meio de diferenciação.

A importância da PTP-SHP-2 para a redução transitória da fosforilação da FAK em tirosina foi inicialmente sugerida pelo aumento, também transitório, da associação entre PTP SHP-2 e FAK em células cultivadas em meio de diferenciação (figura 12C). Por outro lado, observamos que houve aumento concomitante da atividade PTPase de imunoprecipitados obtidos com anticorpos anti- SHP-2 (figura 13). Estes fenômenos ocorreram em paralelo com a redução transitória da fosforilação da FAK em tirosina, indicando que a SHP-2 está envolvida no processo de desfosforilação da Y397 da FAK no período inicial da miogênese.

Curiosamente verificamos que o aumento de associação FAK/SHP-2 se deve mesmo com a diminuição da expressão de SHP-2 nestes períodos iniciais da miogênese, este fenômeno pode estar envolvido com a regulação da atividade da SHP-2. Apesar de não sabermos exatamente como funciona a ativação e desativação da SHP-2, estudos de Feng et al. (1993) indicam duas tirosinas (Y542 e Y580) com possível função de ativação desta proteína fosfatase, mas até hoje nenhum estudo na literatura indica como ocorre sua desativação. Analisando nossos resultados podemos verificar que houve aumento de

atividade de fosfatase da SHP-2 comparado ao seu nível de expressão no período de 1 hora das células induzidas à miogênese. Através destas observações, podemos ainda sugerir que sua desativação possa ocorrer via eliminação de sua molécula do citoplasma. Isto explicaria sua diminuição de expressão após o início da miogênese, uma vez que após o período de queda acentuada da expressão da SHP-2, por volta de 4 horas de indução (figura 12-B), foi verificado por Clemente et al. (2005) um aumento progressivo da fosforilação da Y397 da FAK ao longo dos primeiros 5 dias de indução de mioblastos à diferenciação, reforçando a ligação da SHP-2 com a regulação da atividade da FAK.

No presente estudo, também observamos, através de imunofluorescência que, no período de 1 hora após a indução de células C2C12 com meio de diferenciação, houve diminuição na intensidade da marcação da FAK nos complexos de adesão focal no período coincidente com a redução transitória da fosforilação em tirosina. Este resultado sugere translocação da FAK para outros sítios celulares diversos das adesões focais quando da inativação transitória causada pela mudança do meio de proliferação para o meio de diferenciação celular. Este fenômeno também foi observado em estudos de mecanismos de motilidade celular (WICHERT et al., 2003; MANES et al., 1999), que mostraram que a formação e dissolução do complexo de adesão focal modificam pontos de tensão da célula, provocando a adesão e a perda de adesão celular. Este comportamento é importante para a migração celular e acontece de forma assíncrona entre os vários pontos de adesão focal. Apesar de não termos avaliado o comportamento de outras proteínas estruturais ou sinalizadoras integrantes do complexo de adesão focal, nossos dados sugerem que a diminuição da quantidade de FAK no complexo de adesão focal e, presumivelmente, do complexo de adesão focal como um todo é passo importante

para o início do processo de diferenciação celular. Além disso, a importância da desfosforilação da FAK para a perda dos complexos de adesão focal é evidenciada por dados anteriores (SASTRY et al., 1999; Clemente et al., 2005) indicando que a perda de atividade da FAK tem papel crítico neste processo.

Assim como em estudos anteriores sobre os mecanismos de motilidade celular (WICHERT et al., 2003; MANES et al., 1999), nossos resultados indicaram que a proteína PTP SHP-2 pode ser responsável pela dissolução do complexo de adesão focal via desfosforilação da FAK. Corroborando com essa hipótese, observamos que o tratamento das células com ortovanadato, um composto muito utilizado como um eficiente inibidor de ação PTPase (GORDON, 1991), inibiu a translocação da FAK da periferia celular (figura 15).

Em contraste com nossos resultados, estudos em outros tipos celulares mostraram evidências de desfosforilação via SHP-2 da Y925 e Y577 da FAK, mas não da Y397 na regulação do complexo de adesão focal em células de câncer de mama humano (VADLAMUDI et al., 2002). Estes resultados sugerem que a regulação seletiva das tirosinas fosforiladas da FAK via SHP-2 podem variar de acordo com o tipo celular ou com o programa de controle a que as células estão submetidas. Embora esta hipótese não tenha sido avaliada no presente estudo.

Para mostrar a importância da ação de proteínas tirosina-fosfatase e reforçar a importância da regulação inicial da FAK para o progresso da miogênese, produzimos dois modelos experimentais. Um que interfere na atividade de PTPase e outro que estimula a ativação da via de sinalização da FAK em células submetidas ao programa de miogênese. Em ambos, tivemos a preocupação de manter o nível de fosforilação da Y397

da FAK inalterado nas primeiras horas de miogênese, evitando a ação regulatória de fosfatases na variação da fosforilação da Y397 neste período inicial do programa de diferenciação. Dados de Clemente et al. (2005) mostraram a atividade da FAK envolvida positivamente com a expressão de ciclina-D1, uma proteína fortemente relacionada com a manutenção do ciclo celular. Esses dados reforçam a hipótese de que o impedimento da regulação da FAK por atividade de fosfatase no período inicial da miogênese favorece o mioblasto a se manter em proliferação, impedindo a sua diferenciação.

Um dos modelos experimentais caracterizou-se pelo uso do protocolo de diferenciação com o uso de ortovanadato no meio de diferenciação (MD). Concentrações diferentes de ortovanadato foram testadas (dados não mostrados) e a concentração de 5 $\mu$ M foi escolhida por ter sido suficiente para manter ível de fosforilação da FAK inalterado nas primeiras horas de miogênese e manter as células vivas e aderidas por até 5 dias em meio de diferenciação sob ação inibidora do ortovanadato.

O segundo modelo foi caracterizado pela construção de uma linhagem celular transgênica derivada da linhagem C2C12 selvagem, com expressão ubíqua de uma proteína quimérica denominada FAK/Src. Apesar de não entendermos perfeitamente o funcionamento desta quimera, temos indícios que as células C2C12 FAK/Src utilizadas no presente estudo apresentam a via de sinalização da FAK constitutivamente ativada. Analisando o nível de fosforilação da Y397 no período inicial do programa de miogênese nestas células transgênicas, verificou-se, que nas primeiras horas o nível de fosforilação manteve-se inalterado, tendo apenas um aumento significativo a partir de 4 horas de diferenciação, cumprindo então nossas exigências quanto a falta de regulação da Y397 da FAK no período de 1 hora de indução das células à diferenciação.

As alterações na motilidade, na sobrevivência e no crescimento celular, obtidas com a transformação das C2C12 com a construção FAK/Src são ainda pouco compreendidas. Embora as características da C2C12 FAK/Src possam indicar que a cascata de sinalização da FAK esteja constitutivamente ativa, Roy e colaboradores (2002) observaram modificações semelhantes as nossa, de motilidade e sobrevivência, com a simples expressão do oncogene v-Src em células FAK (-/-). Por outro lado, neste mesmo trabalho houve evidências de que v-Src poderia transativar a FAK. Estudos elusivos são ainda requeridos para o melhor entendimento deste comportamento celular das células FAK/Src.

Os dois modelos foram então submetidos ao programa de diferenciação miogênica e testados quanto a expressão de genes marcadores do progresso do programa de miogênese, como: miogenina e creatina quinase.

Ambos os modelos foram suficientes para inibir o progresso da miogênese. Nem a miogenina ou a atividade de creatina quinase atingiram níveis de expressão ou atividade que indicassem diferenciação muscular. A miogenina foi estudada em níveis de expressão e de transcrição, através da detecção de mRNA com RT-PCR. A creatina quinase não atingiu níveis de atividade comparados às células diferenciadas de 5 dias em processo de diferenciação.

De maneira geral, nossos resultados indicam que a inibição da atividade de proteínas fosfatase ou a ativação permanente da sinalização pela FAK podem inibir o progresso da miogênese. Sendo a FAK uma proteína envolvida em diferentes vias de sinalização, este controle da FAK pela SHP-2 é um mecanismo sugerido por nós para o

melhor entendimento de como ocorre a regulação espaço-temporal da FAK, que permite a ativação de uma determinada via de sinalização ao invés de uma outra.

## **8. Conclusões**

De maneira geral, nossos resultados indicam que a atividade de proteínas tirosina-fosfatase regulando a atividade de proteínas tirosina-quinase é essencial para o progresso de diferenciação da célula muscular. Se essa regulação for prejudicada, o progresso da miogênese será interrompido em sua etapa inicial. Além disso, mostrou-se que no período inicial da miogênese em células C2C12 houve uma redução da FAK na periferia da célula o que pode estar envolvido à desfosforilação da Y397 no período de 1 hora de indução à diferenciação das células C2C12. Nossos resultados ainda indicam, através do uso de ortovanadato, que esta redução de FAK se deve à regulação de atividade fosfatase. Através do aumento da interação FAK/SHP-2 e do aumento da atividade fosfatase do imunoprecipitado com o anticorpo anti-SHP-2 sugerimos que a regulação da desfosforilação da Y397 da FAK no período de 1 hora no processo de diferenciação mioblástica é devido a ação PTPase da SHP-2. Este trabalho ainda reforça a importância da regulação precoce (dentro de 1 hora após a indução) da desfosforilação da Y397 da FAK para a progressão da miogênese e insere a SHP-2 como importante reguladora desta etapa inicial da miogênese.

## Referências Bibliográficas

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

AKAGI, T.; MURATA, K.; SHISHIDO, T. AND HANAFUSA, H.. "v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras". **Mol. Cell Biol.** 22:7015-7023, 2002.

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.

AUSTIN, L.; BURGESS, A.W.. "Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukemia inhibitor factor and other cytokines. **J. Neurol. Sci.** 101: 193, 1991.

BENNETT, A.M.; HAUSDORFF, S.F.; O'REILLY, A.M.; FREEMAN, R.M.; and NELL, B.G.. "Multiple requirements for SHPTP2 in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression". **Mol. Cell Biol.** 16: 1189-1202, 1996.

BENEZRA, R.; DAVIS, R.L.; LASSAR, A. et al.. "Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins: Control of terminal myogenic differentiation". **Ann. NY Acad. Sci.** 599: 1, 1990

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

BRAUN, T.; BUSCHHAUSEN DENKER, G. et al.. "A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts". **EMBO J.** 8: 701, 1989.

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

CALALB, M.B.; POLTE, T.R.; and HANKS, S.K.. "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases". **Mol. Cell Biol.** 15: 954-963, 1995.

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.

CHEN, H. C. AND GUAN, J. L.. "Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 10148-10152, 1994.

CHEN, Q.; KINCH, M. S.; LIN, T. H.; BURRIDGE, K. AND JULIANO, R. L.. "Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases". **J. Biol. Chem.** 269: 26602-26605, 1994.

CHEN, H. C.; APPEDDU, P. A.; ISODA, H. AND GUAN, J. L.. "Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase". **J. Biol. Chem.** 271: 26329-26334, 1996.

CLEGG, C.H.; LINKHART, T.A.; OLWIN, B.B.; HAUSCHKA, S.D.. "Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor". **J. Cell Biol.** 105: 949, 1987.

- CLEMENTE, C.F.M.Z.; CORAT, M.A.F.; SAAD S.T.O.; FRANCHINI, K.G.. "Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by Fak signaling". *Am. J. Physiol.* , 2005.(in press).
- COOPER, L.A.; SHEN, T.-L.; GUAN, J.-L.. "Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction". *Mol. Cell Biol.* 23: 8030-8041, 2003.
- COSSU, G.; TAJBAKHSI, S.; and BUCKINGHAM, M.. "How is myogenesis initiated in the embryo?". *Trends Genet.* 12: 218-223, 1996.
- DAVIS, R.L.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A.B.. "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts". *Cell* 51: 987, 1987.
- ENGEL, A.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.. *Myology*. 2a. edição. New York: Ed. Mc Graw-Hill, 1994. p.3-118, v.1.
- EWTON, D.Z.; FLORINI, J.R.. "Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity, and growth hormone on myoblasts and myotubes in culture". *Endocrinology* 106: 583, 1980.
- FENG, G.-S.; HUI, C.-C.; and PAWSON, T.. "SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259: 1607-1611, 1993.
- FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z.; FALEN, S.L.; VAN WYK, J.J.. "Biphasic concentration dependency of stimulation of myoblast differentiation by somatomedins". *Am. J. Physiol.* 250: C78, 1986a.
- FLORINI, J.R.; ROBERTS, A.B.; EWTON, D.Z. et al.. "Transforming growth factor-beta: A very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the differentiation inhibitor secreted by buffalo rat liver cells. *J. Biol. Chem.* 261: 16509, 1986b.
- FLORINI, J.; EWTON, D.; MAGRI, K.. "Hormones, growth factors, and myogenic differentiation". *Annu Rev Physiol*, 53: 201-16, 1991a.
- FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z.; ROOF, S.L.. "Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenic gene expression. *Mol. Endocrinol.* 5: 718, 1991b.
- 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.
- FURUTA, Y.; ILIC, D.; KANAZAWA, S.; TAKEDA, N.; YAMAMOTO, T.; and AIZAWA, S. *ONCOGENE* 11: 1989-1995, 1995.
- GABARRA-NIECKO, V.; SCHALLER, M.D.; and DUNTY, J.M.. "FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer". *Cancer and Metastasis Reviews* 22: 359-374, 2003.
- GEORGE, E.L.; GEORGES-LABOUESSE, E.N.; PATEL-KING, R.S.; RAYBURN, H.; and HYNES, R.O. *DEVELOPMENT (Camb.)* 119: 1079-1091, 1993.
- GILBERT, S.F.. *Developmental Biology*- sexta edição. Sinauer Association, Inc., Publisher. Sunderland, Massachusetts. 453-454, 2000.
- GOEL, H.L.; DEY, C.S.. "Focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation is associated with myogenesis and modulated by insulin". *Cell Prolif*, 35: 131-42, 2002.

- GOEL, H.L.; DEY, C.S.. "PKC-regulated miogenesis is associated with increased tyrosine phosphorylation of FAK, CAS, and paxillin, formation of Cas-CRK complex, and JNK activation". **Differentiation** 70: 257-271, 2002.
- GORDON, J.A.. "Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor". **Methods in Enzymology** 201: 477-482, 1991.
- HAN, R.G.; St CLAIR, J.A.; WEBSTER, C.; BLAU, H.M.. "Improved media for normal human muscle satellite cells: Serum-free clonal growth and enhanced growth with low serum". **In Vitro Cell Dev. Biol.** 24: 833, 1988.
- HAN, D. C. AND GUAN, J. L.. "Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration". **J. Biol. Chem.** 274: 24425-24430, 1999.
- 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.
- HASTY, P.; BRADLEY, A.; MORRIS, J.H. et al.. "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene". **Nature** 364(6437):501-6, 1993.
- HAUK, C.R.; HSIA, D.; PUENTE X.S.; CHERESH, D.A. and SCHLAEPFER, D.D.. "FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth". **The EMBO Journal** 21: 6289-6302, 2002.
- HOF, P.; PLUSKEY, S.; DHE-PAGGANON, S.; ECK, M.J.; and SHOELSON, S.E.. "Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2". **Cell** 92: 441-450, 1998.
- 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.
- JEN, Y.; WEINTRAUB, H.; BENEZRA, R.. "Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation gene MyoD1". **Genes Dev.** 6: 1488, 1992.
- JIN, P.; RAHM, M.; CLAEISSON-WELSH, L.; HELDIN, C.H.; SEJERSEN, T.. "Expression of PDGF alpha-chain and beta-receptor genes during rat myoblast differentiation". **J. Cell Biol.** 110: 1665, 1990.
- JIN, P.; SEJERSEN, T.; RINGERTZ, N.R.. "Recombinant platelet-derived growth factor-BB stimulates growth and inhibits differentiation of rat L6 myoblasts". **J. Biol. Chem.** 266: 1245, 1991.
- KARDAMI, E.; SPECTOR, D.; STROHMAN, R.C.. "Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82: 8044, 1985.
- KARDAMI, E.; FANDRICH, R.R.. "Basic fibroblast growth factor in atrial and ventricles of the vertebrate heart". **J. Cell Biol.** 109: 1865, 1989.
- KIN, S.J.; KIN, K.Y.; TAPSCOTT, S.J. et al.. "Inhibition of protein phosphatases blocks myogenesis by first altering MyoD binding activity". **J. Biol. Chem.** 267: 15140, 1992.
- KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; HASSEL, J.R. et al.. "Basement membrane complexes with biological activity". **Biochemistry** 25: 312-318, 1986.

- KONTARIDIS, M.I.; LIU, X.; ZHANG, L.; and BENNETT, A.M.. "SHP-2 complex formation with the SHP-2 substrate-1 during C2C12 myogenesis". **J. Cell Sci.** 114: 2187-2198, 2001.
- KONTARIDIS, M.I.; LIU, X.; ZHANG, L.; and BENNETT, A.M.. "Role of SHP-2 in fibroblast growth factor receptor-mediated suppression of myogenesis in C2C12 myoblasts". **Mol. Cell. Biol.** 22: 3875-3891, 2002.
- KONTARIDS, M.I.; EMINAGA, S.; FORNARO, M.; ZITO, C.I.; SORDELLA, R; SETTLEMAN, J.; and BENNETT, A.M.. "SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling Pathway". **Mol. Cell. Biol.** 24: 5340-5352, 2004.
- KORNBERG, L.; EARP, H. S.; PARSONS, J. T.; SCHALLER, M. AND JULIANO, R. L.. "Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase". **J. Biol. Chem.** 267: 23439-23442, 1992.
- KORNBERG, L. J.. "Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis". **Head & Neck**, 20: 745-52, 1998.
- KONIECZNY, S.F.; EMERSON, C.P.Jr.. "5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: Evidence for regulatory genes controlling determination". **Cell** 38: 791, 1984.
- KONIECZNY, S.F.; EMERSON, C.P.Jr.. "Differentiation, not determination, regulates muscle gene activation: transfection of troponin I genes into multipotential and muscle lineages of 10T1/2 cells". **Mol. Cell Biol.** 5: 2423, 1985.
- KUMAR, A.; MURPHY, R.; ROBISON, P.; WEI, L.; and BORIEK, A.M.. "Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, Rac-1 GTPase, and NF-kB transcription factor". **The FASEB Journal**, 18: 1524-1535, 2004.
- LANSEN, R.C.J.; SCHOLS, A.M.W.J.; KELDERS, M.C.J.; WOUTERS, E.F.M.; and JANSSEN-HEININGER, Y.M.W.. "Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stage of myogenesis". **In Vitro Cell Dev. Biol.- Animal** 39: 163-169, 2003.
- 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.
- LATHROP, B; OLSON, E.; GLASER, L.. "Control by fibroblast growth factor of differentiation in the BC3H1 muscle cell line". **J Cell Biol.** 100: 1540, 1985.
- LECHLEIDER, R.J.; SUGIMOTO, S.; BENNETT, A.M.; KASHISHIAN, A.; COOPER, J.A.; SHOELSON, S.E.; WALSH C.T.; and NELL, B.G.. "Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ ". **J. Biol. Chem.** 268: 21478-21481, 1993.
- LEU, T. H. AND MAA, M. C.. "Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397". **Oncogene** 21: 6992-7000, 2002.
- LIN, R.W.; HAUSCHKA, S.D.. "EGF responsiveness and receptor regulation in normal and differentiation-defective mouse myoblasts". **Dev. Biol.** 105: 48, 1984a.

- LIN, R.W.; HAUSCHKA, S.D.. "A rapid decrease in epidermal growth factor-binding capacity accompanies the terminal differentiation of mouse myoblast in vitro. **J. Cell Biol.** 98: 739, 1984b.
- LINKHART, T.A.; CLEGG, C.H.; HAUSCHKA, S.D.. "Myogenic differentiation in permanent clonal myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in culture medium. **Dev. Biol.** 86: 19, 1981.
- MA, A.; RICHARDSON, A.; SCHAEFER, E. M. AND PARSONS, J. T.. "Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas)". **Mol. Biol. Cell** 12: 1-12, 2001.
- MANES, S.; MIRA, E.; GOMEZ-MOUTON, C.; ZHAO, Z.J.; LACALLE, R.A.; MARTINEZ, A.. "Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility". **Mol. Cell Biol.** 19: 3125-3135, 1999.
- 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.. "Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation". **Cell**, 51:51-7, 1987.
- MILARSKY, K.L.; and SALTIEL, A.R.. "Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin". **J. Biol. Chem.** 269: 21239-21243, 1994.
- 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.
- MURRE, C.; McCAW, P.S.; BALTIMORE, D.. "A new DNA binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. **Cell** 56: 777, 1989a.
- MURRE, C.; McCAW, P.S.; VAESSIN, H. et al.. "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence". **Cell** 58: 537, 1989b.
- NEEL, B.G.; GU, H.; and PAO, L.. "The 'SHP'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling". **Trends Biochem. Sci.** 28: 284-293, 2003.
- NOGUCHI, T.; MATOZAKI, T.; HORITA, K.; FUJIOKA, Y.; and KASUGA, M.. "Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with src homology 2 domains, in insulin-stimulated ras activation. **Mol.Cell. Biol.** 14: 6674-6682,1994.
- OLSON, E.N.; STERNBERG, E.; HU, J.S. et al.. "Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor". **J. Cell Biol.** 103: 1799:1986.
- OLSON, E.N.. "Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage". **Dev. Biol.** 154: 261, 1992.
- 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.
- PARKER, M.H.; SCALE, P.; and RUDNICKI, M.A.. "Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis". **Nat. Rev. Genet.** 4:497-507, 2003.
- PARSONS, J.T.. "Focal adhesion kinase: the first ten years". **Journal of Cell Science** 116: 1409-1416, 2003.
- PINNEY, D.F.; PEARSON-WHITE, S.H.; KONIECZNY, S.F. et al. "Myogenic lineage determination and differentiation: evidence for a regulatory gene pathway". **Cell** 53: 781, 1988.
- 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.
- RHODES, S.J.; KONIECZNY, S.F.. "Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family". **Genes Dev.** 3: 2050, 1989.
- RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. L.. "Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK?". **Bioessays**, 21: 1069-75, 1999.
- ROY, S.; RUEST, P.J.; HANKS, S.K.. "FAK Regulates Tyrosine Phosphorylation of CAS, Paxillin, and PYK2 in Cells Expressing v-Src, But Is Not a Critical Determinant of v-Src Transformation". **J. Cell Biochem.** 83: 377-388, 2002.
- SABOURIN, L.; RUDNICKI, M.. "Development biology: frontiers for clinical genetics". **Clin Genet**, 57:16-25, 2000.
- SASTRY, S.; HORWITZ, A.. "Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response". **Dev Biol**, 180:455-67, 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.
- SAXTON, T.M.; HENKEMEYER, M.; GASCA, S.; SHEN, R.; ROSSI, D.J.; SHALABY, F.; FENG, G.S.; and PAWSON, T.. "Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase SHP-2. **EMBO J.** 16: 2352-2364, 1997.
- SCHALLER, M. D.; BORGMAN, C. A.; COBB, B. S.; VINES, R. R.; REYNOLDS, A. B. and PARSONS, J. T.. "pp125FAK a structurally distinctive protein tyrosine kinase associated with focal adhesions". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 5192-5196, 1992.
- 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.; HILDEBRAND, J. D.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W.; VINES, R. R.; AND PARSONS, J. T.. "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src". **Mol. Cell Biol.** 14: 1680-1688, 1994.
- SCHALLER, M. D.; HILDEBRAND, J. D. AND PARSONS, J. T.. "Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases". **Mol. Biol. Cell** 10: 3489-3505, 1999.

- SCHLAEPFER, D. D.; HANKS, S. K.; HUNTER, T. AND VAN DER GEER, P.. "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase". **Nature** 372: 786-791, 1994.
- SCHLAEPFER, D. D. AND HUNTER, T.. "Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases". **Mol. Cell. Biol.** 16: 5623-5633, 1996.
- SCHLAEPFER, D.D.; MITRA, S.K.; ILIC, D.. "Control of motility and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase". **Bioch. Bioph. Acta** 1692: 77-102, 2004.
- SCHUBERT, D.; HARRIS, J.; DEVINE, C.E.; HEINEMAN, S.. "Characterization of a unique muscle cell line". **J. Cell Biol.** 61: 398, 1974.
- SHEN, Y.; SCHALLER, M.D.. "Focal adhesion targeting: the critical determination of FAK regulation and substrate phosphorylation". **Mol. Biol. Cell** 10: 2507-2518, 1999.
- SHIBANUMA M, IWABUCHI Y, NOSE K.. "Possible involvement of hic-5, a focal adhesion protein, in the differentiation of C2C12 myoblasts". **Cell Struct. Funct.** 27(1):21-7, 2002.
- SIEG, D.J.; HAUCK, C.R.; ILIC, D.; KLINGBEIL, C.K.; SCHAEFER, E.; DAMSKY, C.H.; SCHLAEPFER, D.D.. "FAK integrates growth-factor and integrin signal to promote cell migration". **Nat. Cell Biol.** 2: 249-256, 2000.
- 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 Cell Biol**, 18(9): 4994-9, 1998.
- SPIZZ, G.; ROMAN, D.; STRAUSS, A.; OLSON, E.N.. "Serum and fibroblast growth factor inhibit myogenic differentiation through a mechanism dependent on protein synthesis and independent of cell proliferation". **J. Biol. Chem.** 261: 9483, 1986.
- SPIZZ, G.; HU, J.S.; OLSON, E.N.. "Inhibition of myogenesis differentiation by fibroblast growth factor or type beta transforming growth factor does not require persistent c-myc expression". **Dev. Biol.** 123: 500, 1987.
- 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.
- TORSONI, A.; CONSTÂNCIO, S.; NADRUZ JÚNIOR, W.; HANKS, S.; FRANCHINI, K.. "Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes". **Circ Res**, 93: in press, 2003.
- TSUDA, M.; MATOZAKI, T.; FUKUNAGA, K.; FUJIOKA, Y.; IMAMOTO, A; NOGUCHI, T.; TAKADA, T.; YAMAO, T.; TAKEDA, H.; OCHI, F.; YAMAMOTO, T.; and KASUGA, M. "Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2". **J. Biol. Chem.** 273: 13223-13229, 1998.
- VADLAMUDI, R.K.; ADAM, L.; NGUYEN, D.; SANTOS, M.; and KUMAR, R.. "Differential regulation of components of the focal adhesion complex by heregulin: role of phosphatase SHP-2". **J. Cell Phys.** 190: 189-199, 2002.
- WEINTRAUB, H.. "The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds". **Cell**, 75: 1241-4, 1993.

- WICHERT, G.V.; HAIMOVICH, B.; FENG, G.S.; and SHEETZ, M.P.. "Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2". **The EMBO J.** 22: 5023-5035, 2003.
- WOZNIAK, M.A.; MODZELEWSKA, K.; KWONG, L.; KEELY, P.J.. "Focal adhesion regulation of cell behavior". **Bioch. Bioph. Acta** 1692: 103-119, 2004.
- WRIGHT, W.E.; SASSON, D.A.; LIN, V.K.. "Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD". **Cell** 56: 607, 1989.
- XIAO,S.; ROSE, D.W.; SASAOKA, T.; MAEGAWA, H.; BURKE, T.Jr.; ROLLER, P.P.; SHOELSON, S.E.; and OLEFSKY, J.M.. **J. Biol. Chem.** 269: 21244-21248, 1994.
- XING, Z.; CHEN, H. C.; NOWLEN, J. K.; TAYLOR, S. J.; SHALLOWAY, D. AND GUAN, J.L.. "Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain". **Mol. Biol. Cell** 5: 413-421, 1994.
- XU, F.; ZHAO, Z. J.. "Cell density regulates tyrosine phosphorylation and localization of focal adhesion kinase". **Exp Cell Res**, 262: 49-58, 2001.
- YABLONKA-REUVENI, Z.; BALESTRERI, T.M.; BOWEN-POPE, D.F.. "Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoform of PDGF". **J. Cell Biol.** 111: 1623, 1990a.
- YABLONKA-REUVENI, Z.; BOWEN-POPE, D.F.; HARTLY, R.S.. "Proliferation and differentiation of myoblast: the role of platelet-derived growth factor and the basement membrane", in Pette D (ed): **The dynamic state of muscle fibers**, Berlin, de Gruyter, pp. 693-706,1990b.
- YABLONKA-REUVENI, Z.; SEIFERT, R.A.. "Proliferation of chicken myoblasts is regulated by specific isoforms of platelet-derived growth factor: Evidence for differences between myoblasts from mid and late stage of embryogenesis". **Dev. Biol.** 156: 307, 1993.
- YAFFE, D.. "Cellular aspects of myogenesis in vitro". **Curr. Top. Dev. Biol.** 4:37, 1969.
- 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.
- 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.
- YU, D.H.; QU, C.K.; HENEGARIU, O.; LU, X.; and FENG, G.S.. "Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion". **J. Biol. Chem.** 273: 21125-21131, 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.
- ZHAO, J.; REISKE, H.; GUAN, J.. "Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase". **J Cell Biol**, 143(7): 1997-2008, 1998.