JOSÉ ANTONIO TAVARES DE ALBUQUERQUE

Papel da Arg¹²⁷ na conformação estrutural e secreção de Fator H,
importante proteína reguladora da Via Alternativa do sistema
complemento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

JOSÉ ANTONIO TAVARES DE ALBUQUERQUE

Papel da Arg¹²⁷ na conformação estrutural e secreção de Fator H,
importante proteína reguladora da Via Alternativa do sistema
complemento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Albuquerque, José Antonio Tavares de.

Papel da Arg¹²⁷ na conformação estrutural e secreção de Fator H, importante proteína reguladora da Via Alternativa do sistema complemento / José Antonio Tavares de Albuquerque. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Lourdes Isaac.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunodeficiências.

Versão do título para o inglês: Role of Arg¹²⁷ for complement regulatory Factor H structural conformation and secretion.

Descritores: 1. Imunologia médica 2. Imunologia celular 3. Imunogenética I. Isaac, Lourdes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB0146/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): José Antonio Tavares de Albuquerque.

Título da Tese: Papel da Arg¹²⁷ na conformação estrutural e secreção de Fator H, importante proteína reguladora da Via Alternativa do sistema complemento.

Orientador(a): Lourdes Isaac.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 13 de junho de 2007.

PARECER 785/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 76ª reunião, realizada em 13.06.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Papel da Arg127 na conformação estrutural e secreção de Fator H, importante proteína reguladora da via alternativa do Sistema Complemento"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, condicionada a regularização da teca, conforme Resolução 347/05, modelo anexo.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **13 de junho de 2008**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
JOSÉ ANTONIO TAVARES DE ALBUQUERQUE
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP

Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

*Aos meus pais Gerson e Isis Albuquerque
Pelo amor e apoio incondicional.*

Agradecimentos

Todo trabalho bem-sucedido é resultado de muita fé, vontade e persistência e nunca é feito com a força de apenas uma pessoa. Por isso, agradeço

À Deus por ter me dado saúde e força para fazer este doutorado.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Lourdes Isaac, pela paciência (muita) e confiança que investiu em mim, essenciais para o meu amadurecimento científico, por sempre ter acreditado no meu potencial e por ter me presenteado com este projeto e sua orientação.

À minha família pelo amor, incentivo e apoio.

Aos professores do departamento de Imunologia, em especial ao Momtchilo, Anderson, Niels e Condino, pelos valiosos conselhos que foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos do departamento, Lucas, Pedro, Hernández (Morena), Marina, Jean, Luizão, Paolo, Éric, Otávio, Paulo, Jack, Josias, Rafinha, Érica, Gabi, Ceci, Maisa, Joílson, Francisco, Matheus, Esther, Carina, Julia, Alexandra, Lucas da Alê, Silvana e todos os outros pela participação direta e indireta neste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Lorena, I.C. (Renan), Ângela, Marlene, Taty, Dani, Adriana, Mônica, Íris, Leandro, Carina, Paula, e outros que passaram por este laboratório.

Aos meus amigos da república do Márcio, Márcio astro, Márcio astrinho, Marcelo espiga, José Piranha, Zero, Rodrigo Louco, Daniel Beíço, Thiago Pig, Rafael Maconha, Daniel psicopata, Ceci, Érica, Sheila, Mara Rúbia, Dani, Elisângela e Cibele pelos ótimos momentos e pela ajuda na minha adaptação.

Aos meus amigos de Pernambuco, Fernando, Geralmy, Bruno, Celinho, Eriberto, Arlindo, João e todos os outros que me ajudaram e me apoiaram nos momentos difíceis.

À Profa. Marínílce dos Santos e ao Prof. Chuck Farah e seus laboratórios, pela colaboração e por ter me presenteado com suas amizades.

Aos Professores: Gerhard Wunderlich, Francisco Laurindo, Emer Ferro, Antonio Sesso por gentilmente ter cedido auxílios a este projeto.

Aos Professores: Dr. Santiago R. de Córdoba, Centro de Investigaciones Biológicas, Espanha, Dra. Pilar Sánchez do Hospital Universitário de La Paz, Espanha, Dr. Peter Zippel da International Leibniz Research School, Jena, Alemanha, Dr. Mohamed R. Daia da universidade de Leiden, Leiden, Holanda, pelos auxílios, conselhos e colaborações.

Ao Bar e Restaurante Boturoca pela amizade de todos que o frequentam.

À FAPESP pelo apoio financeiro e por nos dar a oportunidade de desenvolver este projeto.

E, principalmente, ao CORINTHIANS por ter dado o título da copa do Brasil de 2008 para meu SPORT CLUB RECIFE. Sem ele na final o título não teria a mesma graça.

Quem tem amigo na guerra não morre sozinho...
(Autor: Nem o Google sabe, escutei num pé sujo aqui perto)

Resumo

Albuquerque JAT. Papel da Arg¹²⁷ na conformação estrutural e secreção de Fator H, importante proteína reguladora da Via Alternativa do sistema complemento [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A Via Alternativa é a principal via de ativação do sistema complemento (SC), sendo o Fator H (FH) um de seus principais reguladores. Os pacientes deficientes de FH apresentam maior risco de desenvolver infecções e/ou doenças renais devido ao descontrole na ativação da via e consumo excessivo de C3. No presente estudo, nós investigamos os mecanismos moleculares pelo qual o paciente com a mutação Arg¹²⁷His no FH possui deficiência do SC. Para isto, utilizamos fibroblastos de paciente e indivíduo normal estimulados com IFN- γ e verificamos que as células do paciente eram capazes de produzir FH, contudo a maior parte das proteínas estava retida no retículo endoplasmático (RE). Mais ainda, a retenção de FH é capaz de causar alteração de cisterna de RE nas células estimuladas com IFN- γ por 48 h, porém não interfere na expressão dos reguladores de membrana CD59, DAF e MCP, quando comparados com os fibroblastos de indivíduo normal. Em paralelo, transfectamos células Cos-7 com plasmídeos contendo a mutação CG⁴⁵³T→CA⁴⁵³T e observamos que esta simples troca de aminoácidos Arg¹²⁷His também foi responsável pelo retardo na secreção de FH. Apesar da mutação reduzir a secreção de FH, observamos que a capacidade de FH atuar como co-factor de Fator I na clivagem de C3b não foi afetada. Assim, avaliamos se o uso de chaperonas químicas poderia induzir a secreção da proteína e observamos que houve aumento na secreção de FH nos fibroblastos do paciente tratadas com ácido 4-fenilbutírico ou curcumina. Além disso, observamos que o efeito das drogas dura aproximadamente 6 h e que decorrido este o período outra dose deve ser administrada para melhor efeito do tratamento. Desta forma, já que a proteína sintetizada pelo paciente é funcional, propomos o uso desses fármacos como alternativa de tratamento para melhorar a resposta imune e, portanto, a sobrevida do paciente.

Palavras-chave: Sistema complemento. Deficiência de Fator H. Chaperonas químicas

Abstract

Albuquerque JAT. Role of Arg¹²⁷ for complement regulatory Factor H structural conformation and secretion [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Factor H (FH) is one of the most important regulatory proteins of the alternative pathway of the complement system (CS). Patients with FH deficiency have higher risk of developing infections and kidney diseases due to the uncontrolled activation of the C3 that leads to low levels of this important component of CS. In this study, we investigated the consequences of FH Arg¹²⁷His mutation to the secretion ratio of this protein by skin fibroblasts *in vitro*. We stimulated the FH synthesis from patient and normal control with IFN γ when we observed that the patient cells were able to synthesize FH Arg¹²⁷His, however this mutant protein was mainly retained at the endoplasmic reticulum. Moreover, the FH retention caused modification at the ER cistern cells after treatment with IFN γ for 48 h, but did not affect the expression of the membrane complement regulatory proteins CD59, DAF and MCP, once compared with fibroblasts from normal control. In parallel, we transfected Cos-7 cells with plasmids containing CG⁴⁵³T $\rightarrow$ CA⁴⁵³T mutation and observed that the consequent simple amino acid substitution Arg¹²⁷His was responsible for the delay in the FH secretion. Although the mutation reduced the FH secretion ratio, we observed that the FH ability to function as co-factor for Factor I cleavage of C3b was not affected. Thus, we evaluated whether the treatment with chemical chaperones could release FH to the culture supernatant. We observed that patient's fibroblasts treated with 4-phenylbutiric acid or curcumin increased the secretion of FH. In addition, we noted that the effect of these chaperones remains up to 6 h post-treatment. After that another dose of these chaperones should be added to keep FH secretion. In conclusion, since the FH Arg¹²⁷His mutant protein is functional, we suggest the use of these chemical chaperones as a potential alternative therapeutic to increase FH plasma levels and improve the patient's immune system and survival.

Keywords: Complement system. H Factor deficiency. Chemistry chaperones.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema de ativação e regulação das Vias Clássica, Alternativa e das Lectinas.....	19
Figura 2 - Alinhamento vertical dos domínios SCR das proteínas da família do FH.....	24
Figura 3 - Esquema de síntese e degradação de proteínas.....	31
Figura 4 - Esquema de ativação do mecanismo <i>unfolded protein response</i> (UPR).....	33
Figura 5 - Via convencional de secreção de proteínas.....	34
Figura 6 - Vias não-convencionais de secreção de proteínas que contém peptídeo de sinalização.....	35
Figura 7 - Esquema do domínio “sushi” do SCR4.....	37
Figura 8 - Esquema do vetor usado para mutagênese sítio-dirigida.....	42
Figura 9 - Esquema de mutagênese sítio-dirigida.....	44
Figura 10 - Sequenciamento do cDNA de FH do paciente, mãe e pai, a partir de cultura de fibroblastos de pele.....	54
Figura 11 - <i>Western blotting</i> para detecção de FH em concentrados dos sobrenadantes e lisados celulares de fibroblastos do paciente, mãe e indivíduo normal.....	55
Figura 12 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para simples marcação de FH.....	56
Figura 13 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e β -COPI (Marcador de RE, CG e vesículas de origem do CG).....	57
Figura 14 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e α -manosidase (marcador de CG)	57
Figura 15 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e anti-Golgina97 (marcador da porção Trans-CG).....	58
Figura 16 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e GM130 (Marcador da porção Cis-CG)	59
Figura 17 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e calnexina (Marcador de Retículo endoplasmático).....	59
Figura 18 - Sequenciamento do plasmídeo pIC-Neo mutado.....	60
Figura 19 - Concentração de FH nos sobrenadantes de clones Cos-7 transfectados com plasmídeo pIC-Neo-FH selvagem ou mutante, e incubados em DMEM sem SFBi por 48h....	61
Figura 20 - Microscopia confocal para detecção de FH das células Cos-7 transfectadas com pIC-Neo-FH selvagem ou mutante incubadas em DMEM sem SFBi por 24h.....	61
Figura 21 - Análise por <i>Western blotting</i> para detecção de FH nos concentrados de sobrenadantes e nos lisados celulares de Cos-7 transfectadas com pICNeo-FH mutante ou selvagem.....	62
Figura 22 - Microscopia confocal de fibroblastos Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His ¹²⁷ (mutante) ou Arg ¹²⁷ (selvagem)	63
Figura 23 - Microscopia confocal de fibroblastos linhagem Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His ¹²⁷ (mutante) ou Arg ¹²⁷ (selvagem) empregando anti-FH e anti- β -COPI (Marcador de RE, CG e vesículas de origem do CG)	63
Figura 24 - Microscopia confocal de fibroblastos Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His ¹²⁷ (mutante) e Arg ¹²⁷ (selvagem) incubados com anti-FH e anti-calnexina (Marcador de Retículo endoplasmático)	64
Figura 25 - Microscopia confocal de fibroblastos Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His ¹²⁷ (mutante) ou Arg ¹²⁷ (selvagem) incubados com anti-FH e anti-Golgina97 (Marcador da porção Trans do CG)	64
Figura 26 - Análise por microscopia eletrônica de fibroblastos de indivíduo normal e paciente.....	65

Figura 27 - Fibroblastos de indivíduo normal e paciente. Marcação com anti-FH em verde para o indivíduo normal e em vermelho para o paciente.....	66
Figura 28 - Microscopia confocal de fibroblastos de indivíduo normal e paciente para marcação dupla de Fator H e β -tubulina.....	66
Figura 29 - Análise por citometria de fluxo da média de fluorescência da expressão de CD59 e DAF em fibroblastos de indivíduo normal ou paciente estimulados ou não com IFN- γ por 24 h.....	67
Figura 30 - Análise da média de fluorescência da expressão das proteínas reguladoras do sistema complemento por citometria de fluxo.....	68
Figura 31 - Análise da capacidade de FH atuar como co-factor de FI na clivagem de C3b gerando iC3b.....	69
Figura 32 - Análise por <i>Western blotting</i> para detecção de FH de sobrenadante de culturas de fibroblastos do paciente incubadas com 1 μ M de tapsigargina.....	70
Figura 33 - Análise por <i>Western blotting</i> para detecção de FH nos concentrados de sobrenadantes e nos lisados celulares de fibroblastos do paciente tratados com curcumina e PBA por 24 h.....	70
Figura 34 - Cinética de secreção de FH dos fibroblastos do paciente tratados com curcumina e PBA.....	71

Lista de Quadros

Quadro 1 - Iniciadores utilizados na mutação sítio dirigida (5'→3') de pIC-Neo-FH.....	43
Quadro 2 - Iniciadores <i>Forward</i> (5'→3') utilizados no seqüenciamento do pIC-Neo-FH mutado.....	46
Quadro 3 - Anticorpos utilizados na microscopia confocal.....	50
Quadro 4 - Alinhamento do domínio SCR2 da proteína FH entre diversas espécies.....	73

Sumário

1 Introdução.....	17
1.1 Sistema complemento.....	17
1.2 Família de proteínas de FH.....	23
1.3 Deficiência de Fator H.....	25
1.3.1 Doenças relacionadas à Deficiência de Fator H.....	25
1.3.1.1 Suscetibilidade a infecções.....	25
1.3.1.2 Glomerulonefrite membranoproliferativa tipo II.....	26
1.3.1.3 Síndrome hemolítico-urêmica.....	27
1.3.1.3 Degeneração da mácula relacionada à idade.....	28
1.4 Síntese protéica.....	29
1.5 Estresse do Retículo Endoplasmático.....	32
1.6 Vias de secreção.....	33
1.7 Probando.....	35
2 Objetivos.....	39
2.1 Objetivos específicos.....	39
3 Material e métodos.....	40
3.1 Cultura de células.....	40
3.2 Determinação da concentração protéica de lisados e sobrenadantes de cultura de fibroblastos.....	40
3.3 Western blotting.....	41
3.4 Vetor e mutação sítio-dirigida dos plasmídeos pIC-Neo-FH.....	42
3.5 Extração de RNA total de culturas de fibroblastos.....	44
3.6 Síntese da primeira fita de cDNA.....	44
3.7 Reação de amplificação em cadeia empregando DNA polimerase para transcrição reversa (RT-PCR).....	45
3.8 Sequenciamento de nucleotídeos.....	46
3.9 Transfecção de Cos-7 com pIC-Neo-FH selvagem e mutante.....	47
3.10 ELISA para quantificação de FH nos lisados e sobrenadantes das culturas de Cos-7 transfectadas.....	48
3.11 Padronização da microscopia confocal.....	48
3.12 Fixação e processamento para microscopia eletrônica de transmissão.....	50
3.13 Análise celular por citometria de fluxo.....	51

3.14 Purificação da proteína FH do sobrenadante das culturas de fibroblastos de indivíduo normal e paciente.....	52
3.15 Ensaio de atividade de co-fator de FH.....	52
3.16 Padronização das concentrações dos fármacos.....	53
4 Resultados	54
4.1 Sequenciamento do cDNA de FH do paciente, mãe e pai, a partir de cultura de fibroblastos de pele.....	54
4.2 Análise da secreção de FH das culturas de fibroblastos de pele do paciente, mãe e indivíduo normal.....	55
4.3 Determinação do compartimento intracelular de retenção da proteína FH do paciente.....	55
4.4 Sequenciamento do plasmídeo pIC-Neo-FH e seleção dos clones mutantes e selvagens.....	59
4.5 Análise da secreção de FH das culturas de fibroblastos Cos-7 transfectados com o pIC-Neo-FH selvagem ou pIC-Neo-FH mutante.....	61
4.6 Determinação do compartimento intracelular de retenção da proteína FH mutante.....	62
4.7 Análise morfológica do retículo endoplasmático por microscopia eletrônica de transmissão.....	64
4.8 Análise da interação de Fator H e citoesqueleto dos fibroblastos do paciente e controle normal.....	65
4.9 Determinação da expressão de moléculas reguladoras do sistema complemento.....	67
4.10 Determinação da expressão de CD59, DAF e MCP frente a estresse do RE.....	67
4.11 Avaliação da atividade de co-fator de FH.....	68
4.12 Avaliação da secreção de FH por fibroblastos do paciente tratados com chaperonas químicas.....	69
4.13 Cinética de secreção de FH por fibroblastos de paciente tratados com chaperonas químicas.....	71
5 Discussão	72
6 Conclusão	80
Referências	81

1 Introdução

1.1 Sistema complemento

Tendo surgido a 600-700 milhões de anos, o sistema complemento é um dos mais antigos participantes da defesa contra microrganismos, atuando também na resposta imune inata e adquirida em vertebrados. Este sistema envolve um amplo número de proteínas solúveis e moléculas associadas à membrana celular e pode ser ativado por três vias: Clássica, Alternativa e das Lectinas. Estas vias iniciam uma cascata de eventos que geram vários fragmentos e proteínas ativadas capazes de eliminar microrganismos e células alteradas, e produzem produtos ativos que participam da inflamação, resposta adaptativa e remoção de imunocomplexos da circulação (Kohl, 2006; Gros et al., 2008; Daha, 2008; Ricklin et al., 2010).

A primeira via a ser descrita foi a Clássica. Esta via é observada desde vertebrados com mandíbula e é ativada principalmente a partir da interação de C1q com anticorpos ligados a antígenos. Isto se deve pela alteração da conformação estrutural de C1q, uma vez ligado à porção Fc de IgG (CH₂) e IgM (CH₃). Cada região Fc possui um sítio de ligação para C1q, por sua vez, C1q necessita de dois sítios de ligação para sua ativação. Desta forma, esta molécula interagem com anticorpos específicos ligados a antígenos, e não livres na circulação, devido à proximidade entre as porções Fc da cadeia pesada (Potlukova et al., 2008; Leshner et al., 2010).

A molécula de C1q apresenta-se associada a duas serino proteases que formam entre si uma estrutura tetramérica C1r₂C1s₂. A interação de C1q-anticorpo resulta em uma alteração conformacional que acaba ativando C1r o qual atua, por sua vez, clivando C1s, e este atua enzimaticamente como serino protease sobre C4 e C2, clivando-os e gerando a C3-convertase (C4bC2a) da Via Clássica responsável pela clivagem de C3, formando os fragmentos C3a e C3b. A partir deste ponto é formada a C5-convertase (C4bC2aC3b) pela interação de C4bC2a com fragmentos C3b. Esta última convertase é responsável pela quebra de C5 em C5a e C5b, onde C5b irá interagir com C6 e C7 formando um complexo hidrofóbico capaz de se inserir entre os lipídeos da membrana. Após inserção, ocorre o recrutamento de C8 e múltiplas unidades de C9 irão se agregar ao complexo C5b-C7 formando um poro transmembrânico conhecido como complexo de

ataque à membrana [MAC (C5b-9n)], responsável pela lise celular após perda da integridade da membrana (**Figura 1**) (Potlukova et al., 2008; Ricklin et al., 2010).

A Via Alternativa é a principal via de ativação do sistema complemento. Correspondendo a cerca de 80% da atividade total do complemento, esta via é ativada de forma espontânea a partir da hidrólise de C3 produzindo C3(H₂O) e expondo um sítio de ligação para Fator B (FB). Uma vez ligado a C3(H₂O), o FB sofre clivagem pelo Fator D (FD), gerando o fragmento Bb, que, juntamente com o C3(H₂O), forma a primeira C3-convertase da Via Alternativa [C3(H₂O)Bb]. Esta C3-convertase irá clivar moléculas de C3, gerando fragmentos C3a e C3b. Estes últimos fragmentos, quando complexados ao Bb, formarão a segunda C3-convertase da Via Alternativa (C3bBb) capaz de clivar novas moléculas de C3, e, assim, amplificar a ativação da Via Alternativa. Novos fragmentos C3b formados pela ação da C3-convertase poderão, ainda, se ligar à molécula C3bBb, formando a C5-convertase da Via Alternativa (C3bBbC3b). Assim como em outras vias, esta C5-convertase é capaz de clivar C5 e iniciar a formação do MAC (**Figura 1**) (Ricklin et al., 2007; Daha, 2008; Leshner et al., 2010).

A Via das Lectinas é iniciada pelo reconhecimento e ligação de lectinas, como *Mannose-Binding Lectin* (MBL) e ficolina, a carboidratos na superfície de microrganismos. Associadas à MBL encontram-se serino proteases (MASPs) I, II e III. As MASPs II e III formam um complexo tetramérico semelhante ao de C1r e C1s. Quando ativada, a MASPII promove a clivagem de C4 gerando C4b que irá se ligar a C2 gerando a C3-convertase C4bC2a. Depois da clivagem de C3, esta via se comporta de forma semelhante à Via Clássica (**Figura 1**) (Runza et al., 2008; Garred, 2008; Endo et al., 2011).

Figura 1 – Esquema de ativação e regulação das Vias Clássica, Alternativa e das Lectinas
Fonte: Leshner e Song, 2010.

As vias de ativação do sistema complemento dependem do componente central C3, que uma vez ativado, exerce várias funções biológicas, entre elas: formação de C3- e C5-convertases, ambas essenciais para ativação completa deste sistema; produção de opsoninas que facilitam a fagocitose de microrganismos; desgranulação de mastócitos e basófilos; solubilização e remoção de imunocomplexos; atuação como adjuvante; remoção de células apoptóticas, etc (Reis et al., 2006; Ricklin et al., 2007).

Estudos realizados por Reis e colaboradores em 2008 mostraram um importante papel de C3 na diferenciação e maturação de células dendríticas por atuar na expressão de MHC-II, moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas. Outros estudos indicam que a deficiência de C3 está associada a menor ativação de linfócitos B, sugerindo um papel importante do sistema complemento e seus receptores linfócitos no processo de produção de anticorpos (Roozendaal et al., 2007).

Em tumores, o sistema complemento é visto como uma importante arma terapêutica devido à produção de moléculas solúveis capazes de localizar e se difundir facilmente dentro do tumor. A morte direta de células cancerosas pelo MAC representa um dos mecanismos de controle do crescimento do tumor. Além disso, podemos citar a produção de C3b e iC3b que facilitam a destruição tumoral por fagócitos e células *natural killer* (NK). Mais ainda, a aderência de fagócitos e células NK a células tumorais que apresentam fragmentos iC3b depositados em sua membrana também causa a lise destas células por citotoxicidade dependente do complemento, na presença um segundo sinal dado por anticorpo anti-tumoral (Macor e Tedesco, 2007).

Já na sepse, o complemento possui um papel controverso. Os fragmentos de C3b e iC3b facilitam a fagocitose, e C3a e C5a atuam como moléculas pró-inflamatórias, controlando processos infecciosos, de um modo geral. Contudo, C5a quando produzido em grande quantidade durante a fase precoce da sepse exerce um papel central na modulação da coagulação, da resposta mediada por TLR-4, dos níveis intracelulares de Ca^{+2} e da liberação de citocinas, tal como fator de inibição de macrófagos (MIF). Desta forma, C5a induz menor contractibilidade dos cardiomiócitos, coagulopatia e perda das funções de células polimorfonucleares após internalização do complexo C5a/C5aR (Rittirsch et al., 2008; Ward, 2010).

Além disso, o sistema complemento está relacionado ao aparecimento de várias doenças auto-imunes causadas por auto-anticorpos, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES). O LES é uma doença que acomete mais mulheres que homens na razão 9:1 afetando pele e rins com manifestações clínicas que podem variar de intensidade entre os pacientes. Esta doença pode ser desencadeada por diversos fatores ambientais como: virose, exposição ao sol e certas drogas e tem como principal característica imunológica o descontrole na formação de auto-anticorpos, levando à formação de complexos imunes que depositam em diversos tecidos, causando inflamação e dano tecidual. A deficiência de proteínas da Via Clássica está associada a esta doença pela falha na remoção de imunocomplexos, pacientes com deficientes de C1q, C1r, C1s, C2 e C4 apresentam um alto risco de desenvolver LES, sendo os pacientes deficientes de C1q com maior predisposição, cerca de 90% dos pacientes, seguido por C4 e C2, com 70% e 10% respectivamente (Castro et al., 2008).

Devido aos componentes do sistema complemento não possuírem a capacidade de reconhecer o próprio, é necessária que este sistema seja regulado para que não

ocorra uma atividade exacerbada e ativação sobre as nossas células e, com isso, manter o organismo em condições controladas. Para que isto ocorra, o sistema complemento possui várias proteínas reguladoras, tanto associadas à membrana como: fator de aceleração de decaimento (DAF ou CD55), proteína co-fator de membrana (MCP ou CD46), receptor do complemento 1 (CR1 ou CD35) e CD59, quanto solúveis (inibidor de C1, C4b-binding protein (C4BP), Fator H (FH) e Properdina).

As proteínas reguladoras associadas à membrana impedem a ação do complemento sobre as próprias células do indivíduo. O DAF é um amplo regulador do complemento que atua sobre a atividade de C3- e C5-convertase prevenindo a clivagem de novas moléculas de C3 e C5 bem como diminui a formação de C3- e C5-convertases, acelerando o decaimento da atividade destas enzimas. A MCP é expressa na membrana da maioria das células nucleadas. A MCP protege as células do hospedeiro da ação proteolítica da deposição de C3b e C4b com a função de regulador intrínseco do complemento servindo como co-fator de Fator I (FI) e por competir pela ligação à C3b e C4b inibindo a formação das C3-convertases da Via Alternativa e Clássica. Outra molécula reguladora encontrada na membrana é o CR1, na superfície de eritrócitos, leucocitose e outras células, esta molécula tem a capacidade de ligar-se a C3b/C4b sendo responsável por inibir as vias do sistema complemento de forma semelhante a FH e MCP. Finalmente, o CD59 atua no passo final da cascata bloqueando a formação completa do MAC na membrana (Kim et al., 2006; Kavanagh et al., 2008).

Já as proteínas solúveis são responsáveis por inibir as vias de ativação, de forma precoce ou durante as clivagens das proteínas, ou na deposição de alguns produtos ativos sobre a membrana das células. O inibidor de C1 é responsável por ligar-se tanto ao complexo C1 como às MASPs-1 e -2, porém regula melhor a Via Clássica bloqueando a atividade do complexo C1. A C4BP tem a capacidade de regular as Vias Clássica e das Lectinas pela inibição da formação de C3- e C5-convertases (Beinrohr et al., 2008). Assim como C4BP, o FH regula a Via Alternativa atuando sobre as convertases. Contudo, estas moléculas possuem uma maior eficiência no bloqueio da deposição de C3b na superfície das células (Sjöberg et al., 2009). Diferente das outras moléculas reguladoras, a properdina regula positivamente a Via Alternativa, pois ao se associar ao complexo C3bBb, e C3bBbC3b, torna-os mais estáveis e com maior tempo de atividade enzimática, essencial para a amplificação da Via Alternativa (Kemper et al., 2010).

O FH atua como co-fator para o FI na clivagem de C3b para formar iC3b. Assim, o FH é responsável pela regulação de C3-convertase (C3bBb), e compete com o Fator B pela ligação no C3b (Saunders et al., 2006). Presente no plasma de indivíduos adultos saudáveis na concentração de $443 \mu\text{g/mL} \pm 106 \mu\text{g/mL}$ (Ferreira de Paula et al., 2003), esta proteína exerce um papel crítico na regulação e proteção das células contra danos por ativação do sistema complemento. Vários estudos demonstram que mutações nesta proteína estão associadas ao desenvolvimento de síndrome hemolítico-urêmica atípica, degeneração da mácula relacionada à idade e, no caso de deficiência de FH, glomerulonefrite membrano-proliferativa do tipo II e a sucessivas infecções bacterianas (Reis et al., 2006; Córdoba e Jorge, 2008; Leshner et al., 2010).

O FH é uma glicoproteína de 150 kDa, contendo 1231 aa, é encontrada no plasma e em vários fluidos corporais, composta por 20 domínios conhecidos por *Short Consensus Repeat* (SCR), cada um com cerca de 60 aa. Parte dos aminoácidos que compõem os SCRs é bastante conservada, especialmente os 4 resíduos de Cys e um de Trp. Os quatro resíduos de Cys formam duas ligações dissulfeto intra-domínio, responsáveis por manter a estrutura do SCR, sempre ligadas Cys1-Cys3 e Cys2-Cys4 (Schmidt et al., 2008).

O FH é principalmente produzido pelo fígado e tem múltiplas regiões de ligação com C3b, localizadas entre SCRs 1-4, SCRs 12-15 e SCRs 19-20, e com heparina, localizadas no SCR7, SCR9, SCRs 12-14 e SCRs 19-20 (Józsi et al., 2007) (**Figura 2**). Entretanto, na sua conformação nativa, o domínio C-terminal tem regiões preferenciais de interação para ambos C3b/C3d e heparina/glicosaminoglicanas, enquanto a região N-terminal da molécula (SCRs 1-4) é responsável pela atividade reguladora do complemento por conta das interações NH₂-terminais essenciais para a atividade de cofator (Józsi et al., 2007; Ricklin et al., 2010).

Outras proteínas relacionadas estrutural e antigenicamente ao FH, também compõem a chamada “família do FH”. São conhecidas por *Factor H-related protein* (FHR) tipos 1 a 5, codificadas por genes separados, encontrados no mesmo cromossomo 1q32 em humanos, são produtos de genes pertencentes ao “cluster” *Regulators of Complement Activation* (RCA) localizados proximamente ao FH. Estruturalmente são também compostas por SCRs (Józsi et al., 2008). Até o momento, pouco se sabe sobre suas propriedades reguladoras dessas proteínas.

1.2 Família de proteínas de FH

A identificação de mais de um tipo de RNAm com seqüências semelhantes ao gene de *Hf* em células hepáticas humanas, iniciou a busca por novas proteínas que apresentassem homologia com FH (Zipfel e Skerka, 1994). Schwaeble e colaboradores em 1987 observaram a presença de dois RNAm de FH com tamanhos distintos expressos em células hepáticas, sendo o maior deles (4,4Kb) com tamanho equivalente e adequado para codificar a proteína FH de 150kDa. O segundo RNAm (1,8Kb) derivado de um *splicing* alternativo do gene *Hf* é responsável pela tradução de uma proteína de 43kDa, hoje conhecida como *Factor H-like protein* (FHL1) (Estaller et al., 1991).

O FHL1 está presente na circulação na concentração de 10 a 50 µg/mL. Este produto é formado apenas pelos 7 primeiros SCRs da região N-terminal de FH e uma região C-terminal com 4 aminoácidos de extensão. Por consequência, o FHL1 regula a ativação do complemento ao ligar-se a C3b, heparina e proteína C reativa (Córdoba et al., 2008; Józsi et al., 2008).

Diferentemente da FHL1, as proteínas FHR1-5 são produzidas por genes distintos de *Hf* (Schwaehle et al., 1987). Contudo, a homologia entre certos domínios SCRs de FHR e de FH implica na capacidade de ligação destas estruturas. O alinhamento homólogo dos SCRs entre a família de proteínas FH apresenta duas regiões conservadas, a região N-terminal e a C-terminal comuns às 5 FHRs, além da ausência dos domínios SCR1-4, e a região dos SCR6-9 para a FHR5. Este último domínio é responsável pela ligação do FH à heparina, à proteína C reativa e a vários microrganismos. Cada um destes domínios possui de 37-100% de identidade com os SCRs de FH (**Figura 2**) (Józsi et al., 2008). Algumas dessas proteínas possuem capacidade de se ligar a C3b e C3d, uma fraca atividade de co-fator para FI e ausência de atividade de decaimento de C3 convertase da Via Alternativa (Hellwage et al., 1999; McRae et al., 2005; Hebecker et al., 2010). Outras, possuem a capacidade de ligar em receptores CR3, aumentando a atividade microbicidas dos neutrófilos (Losse et al., 2010).

Devido à alta similaridade entre as proteínas e os DNAs das FHRs, FH e FHL1, não há sonda para DNA ou anticorpos capazes de identificarem as FHRs com exclusividade. Por isso, pouco se sabe sobre sua expressão nos tecidos, distribuição, concentração nos fluidos corporais e mecanismos destas proteínas. Baseado em características comuns e distintas entre FH e FHRs, sabe-se que estas proteínas possuem a capacidade de ligar-se

em lipoproteínas e podem participar do transporte e homeostase de lipídeos (Józsi et al., 2008).

Figura 2 - Alinhamento vertical dos domínios SCR das proteínas da família do FH. O número acima de cada SCR das proteínas FHR é referente ao grau de homologia à proteína FH. Todos os FHRs apresentam parte da região C-terminal (azul) e da medial (verde) e ausência da região N-terminal (amarelo) da proteína FH. As barras indicam regiões de ligação de C3b, C3c, C3d, proteína C reativa e heparina. Fonte: Zipfel et al., 2009.

1.3 Deficiência de Fator H

Vários estudos mostraram que alterações polimórficas e deleções no “cluster” dos genes *Hf*, que codificam a família de FH, estão associadas com doenças como glomerulonefrite membranoproliferativa do tipo II, síndrome hemolítica urêmica e degeneração da mácula relacionada à idade, além de uma maior suscetibilidade a infecção por alguns microrganismos. Estas mutações formam códons de parada prematura ou alterações na estrutura protéica causando bloqueio na síntese da proteína, falha na função ou retardo da secreção de FH (Ault et al., 1997; Córbo et al., 2008; Zipfel et al., 2009).

Assim como os pacientes com deficiência de FI, os pacientes deficientes de FH apresentam um descontrole da Via Alternativa, com baixos níveis de C3 e FB no plasma e acúmulo de produtos da degradação de C3 devido ao seu consumo excessivo. Isto ocorre quando há ausência de regulação sobre a superfície das células ou sobre seus principais ligantes pelo FH causando descontrole do complemento e danos teciduais (Reis et al., 2006). Como observado em pacientes deficientes de C3 ou de FI, pacientes deficientes de FH são bastante suscetíveis a graves infecções recorrentes.

1.3.1 Doenças relacionadas à Deficiência de Fator H

1.3.1.1 Suscetibilidade a infecções

A deficiência de FH aumenta o risco de desenvolver doenças renais e/ou infecções. Há um grande número de patógenos Gram-negativos (*Borrelia burgdoferi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Neisseiria gonorrhoeae* e *N. meningiditis*), Gram-positivos (*Streptococcus pyogenes* e *S. pneumoniae*), fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*), além de vírus e organismos multicelulares, que possuem mecanismos de evasão do sistema complemento. Cada um desses patógenos possui proteínas, na sua superfície ou secretadas, que se ligam a reguladores do complemento, como FH, FHL1, FHR1, entre outras. Além disso, bactérias capsuladas são mais resistentes à lise pelo complemento, *E. coli* e *Shigella flexneri* morrem depois de 1 h *in*

vitro na presença de 5% de soro enquanto *N. meningitidis* necessita de 25 e 50% de soro humano para obter o mesmo índice de morte (Józsi et al., 2008).

Tais microorganismos podem ser responsáveis por meningite, otite, sepse, bacteremia, doenças de pele e do trato respiratório. Bactérias como o *Streptococcus pyogenes* possuem proteínas, como a Proteína M, Fba e ScpA, que são capazes de ligar-se a FH, FHL1, FHR3, fibronectina, entre outras. Por outro lado, *S. pneumoniae* apresenta a família da PspC na sua superfície capaz de se ligar ao FH (Józsi et al., 2008). As proteínas CRASPs de *B. burgdoferi* ligam-se a FH e FHL1, principalmente. As proteínas de *P. aeruginosa* foram recentemente descritas e ligam-se a FH. Já *Neisseria* possui maior resistência a lise mediada pelo complemento devido ao LPS e por ser capsulada, contudo várias moléculas do complemento são capazes de ligar-se a este patógeno, sendo assim, esta bactéria oportunista necessita da deficiência do complemento para causar doenças no hospedeiro. Pacientes deficientes de FH têm risco de infecção por esta bactéria aumentado de 1000 a 10000 vezes (Schneider et al., 2007; Józsi et al., 2008).

1.3.1.2 Glomerulonefrite membranoproliferativa tipo II

A glomerulonefrite membranoproliferativa tipo II (GNMP II) é uma doença que acomete os rins causando nefrite crônica caracterizada pela proliferação das células mesangiais e endoteliais e espessamento da membrana basal glomerular com duplo contorno observados por microscopia de luz, devido a depósitos densos subendoteliais imunes e/ou intramembranosos, que podem ser observados por microscopia eletrônica. Diferentemente das outras GNMPs, a GNMP II é observada sem a participação de imunocomplexos (Córdoba et al., 2008).

De modo geral, a GNMP II é uma rara doença sistêmica causada pelo desequilíbrio do sistema complemento e afeta predominantemente crianças. A deficiência de FH é observada na maioria dos pacientes que desenvolvem esta doença. A troca de aminoácidos na estrutura desta proteína, principalmente nos SCR2, SCR4, SCR7, SCR11 e SCR16, pode causar truncamento ou má formação da proteína. Estas mutações acarretam diminuição da secreção de FH, pela sua retenção no citoplasma, e disfunção do complemento pela sua ausência na circulação. Em 50% dos casos esta doença progride para falha renal dentro de 10 anos (Córdoba et al., 2008; Benz et al., 2009).

A GNMPHII está associada a anomalias do complemento sendo que 8 dos 14 pacientes descritos na literatura apresentam deficiência de FH em homozigose ou heterozigose. Tais pacientes apresentaram mutações em diferentes pontos da proteína como na Δ Lis²²⁴, Arg¹²⁷Leu, Pro¹³⁹Ser, Cys⁴³¹Ser, Cys⁴³¹Tyr, Cys⁵⁷³Ser e Cys⁹⁵⁹Tyr (Dragon-Durey et al., 2004; Licht et al., 2006; Córdoba et al., 2008; Schejbel et al., 2011). Em quase todos estes casos, pôde-se observar que a mutação resultou em truncamento ou substituição de aminoácido que causou retardo na secreção de FH, sendo o paciente com deleção Lis²²⁴ a única exceção. A Lis²²⁴ está situada no SCR4 e é responsável pela atividade reguladora de FH. A deleção desta lisina causou menor atividade de ligação de FH com C3b, menor atividade como co-fator com FI e redução na atividade de decaimento de C3-convertase da Via Alternativa. Contudo, a região C-terminal apresentou atividade normal de ligação a C3, heparina e células endoteliais (Licht et al., 2007).

1.3.1.3 Síndrome hemolítico-urêmica

A síndrome hemolítico-urêmica atípica é uma doença renal rara, descrita por Gasser e colaboradores em 1955. Caracterizada pela presença de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e falha renal aguda, esta doença está dividida em duas categorias. A síndrome hemolítico-urêmica associada com diarreia sanguinolenta, conhecida como síndrome hemolítica típica (SHU) é causada por um sorotipo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC O157:H7) que produz verotoxinas. Este sorotipo é mais freqüente em jovens e é responsável por 70-90% dos casos de síndrome hemolítica urêmica. Este tipo de síndrome hemolítico-urêmica apresenta boa evolução com recuperação de todas as funções renais (Skerka et al., 2009).

A síndrome hemolítico-urêmica atípica (SHUa) não está associada com diarreia. Esta doença foi primeiro descrito por Thompson e Winterborn em 1981. Mais tarde, em 1994, Pichette e colaboradores mostraram uma relação entre a SHUa e FH em um paciente portador da deficiência de FH. Atualmente, sabe-se que a SHUa está relacionada com a deficiência de componentes ou proteínas reguladoras do sistema complemento, onde a diminuição e polimorfismo de FH, FI e MCP são o principal fator que predispõe ao desenvolvimento de SHUa (Dragon-Durey et al., 2004). Entre 15 e 30% dos casos de SHUa é formado por portadores de mutações no gene de *Hf*, sendo que 75% destes

pacientes possuem alterações localizadas na região C-terminal responsável pela ligação do FH com a superfície das células e, em sua maioria, apresentam padrão de heterozigose (Józsi et al., 2008; Skerka et al., 2009).

Ao contrário das mutações associadas à GNMPH, os pacientes com mutações associadas à SHUa raramente apresentam hipocomplementenemia e diminuição dos níveis séricos de FH. Estudos bioquímicos mostraram que tanto FH purificado do plasma de paciente como a proteína recombinante têm menor capacidade de se ligarem a C3b e C3d, heparina e células endoteliais. Assim, em condições de ativação exacerbada do complemento, a baixa concentração de FH na superfície de células endoteliais pode resultar em maior dano tecidual e será um fator de risco para o desenvolvimento da SHUa (Córdoba et al., 2008; Józsi et al., 2008; Skerka et al., 2009).

Estudos com pacientes deficientes de FH mostraram que mutações no exon 23, correspondentes à deleção da sequência AAG entre os nucleotídeos 3562 a 3563, são responsáveis pela remoção da Lis¹¹⁸⁸. Na estrutura protéica de FH, a Lis¹¹⁸⁸ encontra-se em uma alça hipervariável do SCR20 entre os filamentos $\beta 2$ e $\beta 3$. Esta estrutura parece estar associada à SHUa, pois pacientes com mutações nesta lisina ou em aminoácidos próximos a ela (Lys¹¹⁸⁶, Arg¹¹⁸² e Arg¹¹⁹²) desenvolveram esta doença (Edey et al., 2008).

1.3.1.4 Degeneração da mácula relacionada à idade

A degeneração da mácula relacionada à idade (DMRI) afeta milhões de pessoas em todo o mundo. É uma doença complexa, cuja progressão pode resultar em cegueira irreversível dependendo de múltiplos fatores genéticos e ambientais, como a falta de exercício, o fumo, a hipertensão, a obesidade, diminuição dos níveis de FH no soro, aumento dos níveis de proteína C reativa no soro e predisposição genética (Edwards et al., 2005).

Esta doença está associada a depósitos de lipoproteínas (drusas) formados entre as células do epitélio da retina e a membrana de Bruch. A DMRI é classificada em duas formas clínicas, a forma “seca”, que apresenta atrofia geográfica caracterizada por perda das células epiteliais da retina e outras células neurosensoriais, e a forma “úmida”, que desenvolve uma neovascularização coloidal, sendo esta última observada em 10-15% dos casos de DMRI e é responsável por 80% da perda de visão dos pacientes (Scholl et al., 2008; Gu et al., 2009).

Embora o mecanismo molecular de desenvolvimento da doença não seja bem conhecido, a análise das drusas mostrou a presença de proteínas e produtos ativos do complemento. Mais tarde, pôde-se observar que tanto a proteção como a doença estão relacionadas a mutações em componentes do sistema complemento como C3 e FH. Em particular, indivíduos com a mutação Tyr⁴⁰²His no SCR7 de FH, onde ocorre a troca de um aminoácido hidrofóbico não carregado por um aminoácido carregado positivamente, têm maior risco de desenvolver esta doença. Esta substituição de aminoácidos acarreta redução de ligação de heparina e proteína C-reativa da proteína e maior risco de desenvolver a DMRI (Edwards et al., 2005; Józsi et al., 2008; Teixeira et al., 2010).

1.4 Síntese protéica

Mais de um terço da síntese protéica é realizada dentro do RE. Este compartimento possui um alto fluxo de proteína que devem ser enoveladas corretamente. Em alguns momentos, o dobramento de multi-domínios das proteínas pode ser ineficiente. Isto ocorre quando há algum erro genético, estresse celular, entre outros eventos que podem causar alterações na estrutura da proteína. Por isso, o retículo endoplasmático (RE) possui uma alta concentração de chaperonas que mantêm a solubilidade desses polipeptídeos, enzimas capazes de formar ligações pós-transcricionais e fatores que facilitam o enovelamento de polipeptídeos recém-sintetizados (Nakatsukasa et al., 2008).

Contudo, todo este maquinário não é suficiente para proteínas com modificações estruturais mais bruscas devido a substituições de aminoácidos como cisteínas, triptofanos ou aminoácidos mais conservados entre as espécies e que alteram a conformação da proteína e, com isso, sua interação com outras moléculas. Desta forma, estas proteínas mal-formadas podem causar problemas para as células, por isso, o RE possui um sistema de proteínas capazes de identificar e reter os polipeptídeos defeituosos em um sistema conhecido como controle de qualidade do RE (ERQC). Além disso, o RE possui um mecanismo de destruição de proteínas defeituosas conhecido como degradação associada ao RE (ERAD) que direciona estas proteínas para degradação no proteassoma (Lavoie et al., 2008).

Para que a proteína seja secretada, ela necessita ter sido enovelada corretamente. A própria seqüência de aminoácidos que compõe a proteína determina o seu

dobramento. Contudo, este enovelamento deve ser feito de forma rápida para que não ocorram interações com outras proteínas, causando dano à célula. Para evitar isto, o RE possui um arsenal de proteínas que catalisam o enovelamento protéico, impedindo que haja interações inespecíficas com outras proteínas e reconhecem proteínas mal-formadas e as armazenam no RE (Vembar et al., 2008).

A síntese de proteína e seu enovelamento ocorrem praticamente de forma simultânea dentro do RE. Isto é necessário devido à existência de resíduos hidrofóbicos na superfície, capazes de formar ligações inespecíficas com outras proteínas. Estes resíduos devem estar enterrados no núcleo do polipeptídeo, minimizando rapidamente a energia livre na superfície da proteína responsável por estas interações. Desta forma, à medida que o peptídeo é sintetizado, várias proteínas interagem, catalisam e reconhecem sítios de ligação de pontes dissulfeto e pontes de sais que irão determinar o número de estágios de dobramento protéico (Nakatsukasa et al., 2008).

À medida que o polipeptídeo é sintetizado, os resíduos hidrofóbicos são reconhecidos pela *Binding-protein* (BiP) que impede a formação de agregados protéicos ao se ligar a esses resíduos. Após ligação desta proteína, ocorre a glicosilação de asparaginas específicas por meio da adição de um N-oligossacarídeo que acaba por alterar a conformação desses aminoácidos. Esta mudança conformacional é reconhecida por lectinas chaperonas que interagem com os resíduos de glicana e as extensões hidrofílicas volumosas. A partir deste momento, ocorre a ligação e remoção de chaperonas em cada fase do dobramento (**Figura 3**) (Hebert et al., 2007).

Logo após a adição do N-oligossacarídeo, este composto é desglicosilado pelas enzimas glicosidase I e II, gerando uma cadeia monoglicosilada que é reconhecida pela calnexina e calreticulina, levando ao dobramento da proteína nativa. Após liberação da proteína pela calnexina, a glicosidase II remove o último resíduo de glicose, gerando um substrato não-glicosilado, o qual por sua vez inibe a ligação das lectinas chaperonas, liberando a proteína na sua forma nativa. A partir deste ponto, a proteína é direcionada para vesículas deixando o RE a caminho do complexo de Golgi e deste para o ambiente extracelular (**Figura 3**) (Cybulsky et al., 2010).

Caso haja falha no dobramento da proteína, a calnexina, a *UDP-Glucose: glycoprotein glucosyl transferase* (UGGT) e a manosidase irão interagir com o polipeptídeo nascente na tentativa de adotar a correta estrutura conformacional. Entretanto, a retenção prolongada da proteína não-dobrada no RE é reconhecida pelo

sistema de degradação associada ao RE (ERAD). No início a proteína é reconhecida pela *ER* α 1,2mannosidase-I (ERManI) e *ER degradation-enhancing alpha-mannosidase like protein* (EDEM) que se liga ao N-oligossacarídeo, liberando a calnexina e retirando os resíduos de manose. Desta forma, a proteína é marcada com um resíduo de glicana que será reconhecido por uma ubiquitina ligase ancorada na membrana do RE, direcionando a proteína rumo ao citosol, onde será ubiquitinizada e degradada pelo proteassoma (**Figura 3**) (Hirsch et al., 2009).

Figura 03 – Esquema de síntese e degradação de proteínas: 1-reconhecimento das BiPs e adição de N-oligossacarídeo, desglucosilação e reconhecimento da conformação da proteína pela calnexina e calreticulina; 2-Proteína dobrada; 2a-Proteína parcialmente dobrada; 3bVias de degradação -reconhecimento da proteína mal-formada pela BiP e desmanosilação pelas ERManI e EDEMs; 4-Saída do polipeptídeo do RE; 3a e 4a-Ciclo das chaperonas; 4b-Direcionamento da proteína para degradação
Fonte: Hebert e Molinari, 2007.

1.5 Estresse do Retículo Endoplasmático

O estresse do retículo endoplasmático acontece quando ocorre um acúmulo anormal de proteínas no RE e o sistema ERAD não consegue degradar estas proteínas em tempo hábil. Isto ocorre, devido a alterações das condições fisiológicas ou por patologia. Este acúmulo protéico, induz um consumo excessivo de BiP e isto ativa um mecanismo de compensação conhecido como *unfolded protein response* (UPR). Este mecanismo é uma resposta coordenada ao estresse, aumentando a capacidade de regulação do RE através de sinalizações pró-adaptativas ou pró-apoptóticas (Santos et al., 2009).

Geralmente, proteínas com alterações conformacionais são retidas no RE e ficam complexadas à BiP. À medida que ocorre a síntese protéica, mais moléculas BiPs são recrutadas para retenção destas proteínas (Rasheva et al., 2009). Este alto recrutamento de BiP acaba liberando a proteína *activating transcription factor-6* (ATF6) que é exportada para fora do RE, processada no complexo de Golgi e transportada ao núcleo para ativar fatores de transcrição de chaperonas e BiP (GRP94, GRP78, calnexina e calreticulina), enzimas que promovem o dobramento protéico, maturação, secreção e ERAD ou ativa o fator transcricional *C/EBP-homologous protein* (CHOP) induzindo a morte celular (Dickhout et al., 2009).

Em paralelo, ocorrerá a auto-fosforilação de *Inositol-requiring protein-1* (IRE1) que irá atuar sobre fatores de transcrição *X-box-binding protein-1* (XBP1) que atua em paralelo com a ATF6 na síntese de proteínas pró-adaptativas ou ativa a JNK, que está envolvida com o citoesqueleto celular, e as caspases 3, 9 e 12 induzindo apoptose (Cybulsky et al., 2010).

Outra proteína fosforilada é a *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase* (PERK). Com a liberação das BiPs, ocorre a formação de dímero de PERK e sua transfosforilação para ser ativada. A partir disto, a PERK fosforila o fator 2 alfa iniciador de tradução eucariótica (eIF2 α), inibindo o reconhecimento de códons AUG e diminuindo a tradução de várias proteínas ou ativa em paralelo a CHOP pela ATF4 (**Figura 4**) (Pallet et al., 2009).

Figura 4 – Esquema de ativação do mecanismo *unfolded protein response* (UPR). Ativação de IRE1, ATF6 e PERK pelo estresse no RE resultando em uma resposta pró-adaptativa ou pró-apoptótica
 Fonte: Santos et al., 2009.

1.6 Vias de secreção protéica

Para que a regulação do sistema complemento ocorra, as proteínas necessitam ser produzidas e transportadas até a membrana celular para serem secretadas ou expressadas na superfície. A maioria das proteínas secretadas contém peptídeos amino-terminais ou peptídeos de sinalização que direcionam seu transporte pelo retículo endoplasmático (RE), onde podem ser transportadas para o espaço extracelular ou para a membrana pelo complexo de Golgi (CG). A saída do RE é feita por vesículas formadas pelo complexo protéico capsidial tipo II (COPII) que é responsável pelo transporte de proteínas do RE para CG (**Figura 5**). Esta via é conhecida como via convencional de secreção e é comumente empregada por várias proteínas (Nickel et al., 2009).

Figura 5 – Via convencional de secreção de proteínas. A maioria das proteínas que possuem peptídeos de sinalização utilizam esta via. As proteínas são sintetizadas no RE e direcionadas para o CG em vesículas formadas por COPII. A partir deste compartimento, as proteínas são transportadas até a membrana plasmática ou secretadas no espaço extracelular em vesículas formadas por COPI
 Fonte: Nickel et al., 2009.

Contudo, proteínas citoplasmáticas e nucleares também podem sair do RE por vias independentes de COPII, denominadas não-convencionais de transporte de proteínas. Estas vias podem utilizar vesículas que contém ou não COPII. As vesículas que contém COPII podem fazer um transporte direto para a membrana celular ou se fundir com endossomo ou lisossomo antes de chegar à membrana. As vesículas sem COPII podem continuar o transporte do RE diretamente até a membrana ou se fundir com o CG e continuar o transporte normalmente pela via convencional (**Figura 6**) (Nickel et al., 2009).

Figura 6 – Vias não-convencionais de secreção de proteínas que contém peptídeo de sinalização. Via dependente de vesículas que são formadas por COPII que podem ser transportadas diretamente para a membrana (1) ou se fundirem com endossomo ou lisossomo (2) antes de serem transportadas para a membrana. Via independente de vesículas que são formadas por COPII que podem ser transportadas diretamente para a membrana (3) ou se fundirem com o complexo de Golgi (2) antes de serem transportadas para a membrana.
Fonte: Nickel e Rabouille, 2009.

1.7 Probando

A deficiência completa de FH (homozigota) é um fenômeno raro, com apenas 23 casos em 13 famílias diferentes descritos na literatura. A população afetada por esta deficiência apresentou-se de forma distinta, incluindo brancos, africanos, asiáticos, beduínos, americanos, entre outras populações (Reis et al., 2006).

Nosso grupo estudou um paciente com deficiência de Fator H acompanhada por baixo nível sérico de C9, identificada em um paciente (EYS), proveniente de família japonesa e de pais consangüíneos. O paciente apresentou alguns quadros de infecções graves sendo necessário o internamento em Unidade de Terapia Intensiva. Ao analisar o soro do probando, não se observou uma atividade hemolítica detectável mediada seja pela Via Clássica ou Alternativa. Ao estudar a concentração plasmática de várias proteínas do sistema complemento do paciente, observamos níveis normais de FI e

properdina, contudo baixos níveis de FH e FB no soro, associados com a conseqüente redução de C3, sugerindo desregulação da Via Alternativa acompanhada por baixos níveis de C9 devido ao consumo excessivo (**Tabela 1**). Ao observar os soros de seus familiares, pôde-se verificar que o pai apresentou níveis baixos de FH, mas com atividade hemolítica dependente de complemento normal. A mãe apresentou 50% da concentração de FH normal no soro e baixos níveis de C3, FI e FB, sendo esta redução a provável causa da diminuição da atividade hemolítica para a Via Alternativa encontrada no seu soro (**Tabela 1**). Além disso, sua irmã também apresentou redução de 50% da concentração de FH no soro com atividade hemolítica dependente de complemento normal. O perfil das proteínas do complemento para a família do probando indicou um padrão de herança autossômica recessiva (Falcão et al., 2008).

Tabela 1 - Níveis protéicos e atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento no paciente e em seus familiares

	Patient	Father	Mother	Sister	Normal range
CPH (%)	0	127.59	77.25	119.67	56–192
APH (%)	0	117.5	49.21	82.2	71–171
C3 (µg/ml)	<<	963.5	382.6	1271.1	3–4 years old: 905 (range: 610–1410) [49] 5–6 years old: 1075 (range: 770–1390) [49] Adults: 800–1900 [50]
C4 (µg/ml)	467.7	807.3	514.4	615.5	3–4 years old: 164 (range: 95–302) [49] 5–6 years old: 177 (range: 101–309) [49] Adults: 450–600 [50]
Factor H (µg/ml)*	16.8	190.9	140.5	143.6	1–5 years old: 606 (range: 233–1319) [10] 6–12 years old: 684 (range: 225–1636) [10] Adults: 443 (range: 242–759) [10]
Factor I (µg/ml)	51.6	52.2	23.6	ND	1–5 years old: 58 (range: 30–104) [10] 6–12 years old: 57 (range: 34–91) [10] Adults: 64 (range: 39–100) [10]
Factor B (µg/ml)	<<	105.9	62.4	ND	3–4 years old: 34 (range: 20–59) [49] 5–6 years old: 40 (range: 25–60) [49] Adults: 74–286 [51]
Properdin (µg/ml)	12	ND	ND	ND	1–5 years old: 23 (range: 13–38) [10]
C9 (µg/ml)*	5.6	38.5	33.5	30	2–18 years old: 59 [52] Adults: 22–35

Fonte: Falcão et al., 2008.

Esses soros foram analisados por *Western blotting* tanto para a proteína total como para a região específica para o SCR1-4 do FH e FHL1. Esta análise confirmou níveis muito baixos de FH no soro no probando e presença nos demais soros da família.

O RNAm do paciente foi seqüenciado e uma mutação de simples troca de nucleotídeo **CG⁴⁵³T→CA⁴⁵³T** foi encontrada, responsável pela troca de códon de Arg¹²⁷His na molécula de FH deste paciente, seguindo um padrão de herança autossômica recessiva confirmado pela heterozigose dos pais para tal mutação. Além disso, foi confirmado o retardo na secreção de FH do paciente pela análise do perfil de

secreção da proteína por *Western blotting* para sobrenadantes e lisados celulares e microscopia confocal de culturas de fibroblastos do paciente (Falcão et al., 2008).

A Arg¹²⁷, localizada no SCR2 de FH, pode potencialmente desempenhar um importante papel para o FH, pois é bem conservada nesta proteína em diversas espécies animais. Resíduos de arginina (Arg) são frequentemente encontrados nas proximidades de pelo menos 1 das 4 citeínas (Cys) que formam os domínios SCR desta proteína (**Figura 7**). A mesma Arg¹²⁷, quando substituída por Leu¹²⁷, também foi associada à completa deficiência de FH encontrada em outro paciente estudado por um grupo francês (Dragon-Durey et al., 2004).

Figura 7 – Esquema do domínio “sushi” do SCR4. As setas indicam as cisteínas do domínio. A estrutura de cada domínio é composta por 4 cisteínas formando pontes dissulfeto entre as cisteínas 1-3 e 2-4. Cada domínio possui aproximadamente 60-70 aa.
Fonte: Modificado de Licht et al., 2006.

Mais ainda, segundo comunicado pessoal da pesquisadora Dra. Marie-Agnès Dragon-Durey do *Hopital Europeen Georges Pompidou* (Paris, France) foram seqüenciados 400 cromossomos para investigar se a mutação nesta região poderia ser um reflexo de polimorfismo, contudo a mutação (Arg¹²⁷Leu) não foi encontrada em nenhum dos 200 indivíduos normais estudados.

Além disso, Hocking e colaboradores em 2008 analisaram a estrutura da proteína FH com o auxílio do software STRIDE para observar a conformação secundária da proteína entre seus três primeiros domínios SCR. Estes domínios foram alinhados com outras proteínas da mesma família: como C4BP, DAF, CR1 e MCP. Apesar das funções distintas destas proteínas, as bases estruturais apresentam-se semelhantes e as regiões com completa ou parcial funcionalidade são correspondentes. Desta forma, pôde-se verificar aminoácidos e estruturas secundárias conservadas entre as proteínas. A partir do alinhamento destas proteínas, foi proposta uma estrutura tridimensional composta

por oito estruturas contendo filamentos β , cada uma formada por quatro ou mais estruturas β -folhas (Hocking et al., 2008).

A partir desta construção, foi observado que a mutação (Arg¹²⁷His) estudada está localizada dentro de um filamento β no aminoácido conservado entre espécies distintas (Falcão et al., 2008; Hocking et al., 2008). Assim, a localização desta mutação sugere uma importância da Arg¹²⁷ em eventos pós-translacionais desta proteína, possivelmente relacionados com sua secreção.

Além disso, existem poucos dados publicados sobre retardamento de secreção de FH. Em uma das publicações, mutações de troca de aminoácido foram geradas na Cys⁵¹⁸Arg e Cys⁹⁴¹Tyr. Estas mutações nas cisteínas causaram uma retenção da proteína no retículo endoplasmático e retardo da secreção de FH comprovadas por microscopia de imunofluorescência e *Western blotting*, respectivamente (Ault et al., 1997). Em 1999, Schmidt e colaboradores mostraram a importância da integridade da estrutura dos SCRs ao induzir a quebra das pontes dissulfetos dessas moléculas, por mutações pontais nas cisteínas. Os clones foram transfectados em células Cos-1 e o padrão de retenção no retículo endoplasmático foi semelhante ao encontrado em pacientes com mutações de troca de aminoácido nestas cisteínas (Schmidt et al., 1999).

Desta forma, tornou-se interessante esclarecer o mecanismo de secreção de FH e se a mutação Arg¹²⁷ estaria associada com o retardo na secreção da proteína. Desejamos também localizar o compartimento intra-celular onde a proteína mutante é retida no fibroblasto do paciente deficiente de FH. Outro ponto que nos interessa é verificar se a retenção protéica é capaz de causar alteração celular devido ao estresse no RE. Considerando que o FH mutante possa ser funcional, tornou-se importante considerar a possibilidade de empregarmos tratamentos que facilitasse o dobramento protéico e, com isso, a secreção de FH.

2 Objetivos

Investigar a importância da Arg¹²⁷ para secreção e atividade da proteína FH.

Investigar as consequências da retenção da proteína mutante para a célula do paciente deficiente de FH.

2.1 Objetivos específicos

Analisar se a mutação Arg¹²⁷His alterou a capacidade de síntese e secreção de FH.

Confirmar se a mutação é responsável pela retenção de FH.

Determinar qual compartimento intracelular está envolvido na retenção da proteína FH e suas consequências para a célula.

Observar se a retenção de FH poderia induzir estresse no retículo endoplasmático diminuindo a expressão de reguladores de membrana do sistema complemento.

Avaliar se a mutação Arg¹²⁷His afetou a capacidade de FH atuar como co-fator de FI na clivagem de C3b.

Induzir a secreção *in vitro* de FH Arg¹²⁷His pelos fibroblastos do paciente após tratamento com curcumina e ácido 4-fenilbútrico.

3 Material e métodos

3.1 Cultura de células

Os fibroblastos utilizados foram provenientes de fragmentos de biópsia de pele retirados do paciente e de indivíduos normais e por nós cultivados de acordo com a literatura (Vyse et al., 1996; Reis et al., 2002), após consentimento informado. Estas células já vinham sido mantidas em N₂ líquido antes mesmo do início deste projeto e só foram utilizadas após aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Essas células foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² em DMEM pH 7,2 contendo 25 mM de HEPES, 24 mM de bicarbonato de sódio e 25 mM de glicose em água Milli-Q, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) previamente a 56 °C por 1 h e 2 mM de glutamina, e mantidas a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂. Ao atingir aproximadamente 80% de confluência, os fibroblastos foram removidos com solução de tripsina 0,08%, pH 7,4, em 1,6 mM de fosfato de sódio monobásico; 15 mM de fosfato de sódio bibásico; 140 mM de cloreto de sódio em água Milli-Q (PBS), centrifugados, contados e ressuspensos novamente em DMEM contendo 10% e SFBi.

3.2 Determinação da concentração protéica de lisados e sobrenadantes de cultura de fibroblastos

As células foram lavadas 2x com PBS e mantidas em DMEM sem SFBi, contendo 100 U/mL de Interferon- γ (IFN- γ) (R&D Systems, Mineapolis, Minesota, Estados Unidos) por 24 h. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi recolhido e as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, resuspensas em tampão de lise (10 mM de EDTA, 2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 1 mM de iodoacetamida diluído em PBS a 1% de Triton X-100 e 0,5% de deoxicolato de sódio) e rompidas por lise mecânica com o auxílio do pipetador. As amostras de sobrenadantes foram separadamente concentradas com o auxílio de *SpeedVac Concentrator Savant SPD131DDA* (Thermo Electron Corporation, Marietta, Ohio, Estados Unidos). A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se o reagente (Biorad, Hercules, Califórnia, Estados

Unidos) diluído em água (1:5). Para o estabelecimento de uma curva padrão, empregamos as seguintes concentrações de albumina de soro bovino (BSA): 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 87,5 µg/mL e 100 µg/mL. As amostras do lisado e sobrenadante foram diluídas a 1:50 e 1:10, respectivamente, antes da determinação da concentração protéica. Equivalentes concentrações protéicas de culturas de fibroblastos humanos de indivíduo controle e de paciente deficiente de FH foram submetidas à eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%. O mesmo foi obedecido, quando empregamos culturas de fibroblastos de rim de macaco (Cos-7) transfectadas com pIC-NeoFH selvagem ou pIC-NeoFH mutante. As amostras de lisado celular e sobrenadante foram aplicadas nas concentrações de 12 µg e 2 µg de proteínas totais, respectivamente.

3.3 Western blotting

Culturas celulares contendo 10^6 fibroblastos foram incubadas em DMEM sem SFBi e com 100 U/mL de IFN- γ a 37 °C por 6, 12, 24 e 48 h. As amostras de células Cos-7 (gentilmente cedidas pelo Prof. Gerhard Wunderlich do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP) transfectadas com o plasmídeo pIC-NeoFH selvagem (gentilmente cedido pelo Dr. Santiago R. de Córdoba, Centro de Investigaciones Biológicas, Espanha) e pIC-NeoFH mutante foram processadas da mesma forma, contudo não foram estimuladas com IFN- γ , uma vez que o plasmídeo possui um sítio responsável pela expressão constitutiva de FH. Após normalização da concentração protéica das amostras, procedemos com separação protéica em SDS-PAGE a 10%. Ao término da corrida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência [48 mM de Tris-HCl pH 7,5, 39 mM de glicina, 0,037% de SDS (p/v)]. Com auxílio da placa de transferência *Hoefor Semiphor* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, Estados Unidos), a preparação foi submetida a uma corrente de 50 mA por 1 h. A membrana foi lavada com 20 mM de Tris-base, 0,1% de Tween20, 140 mM de NaCl (TBST) sob agitação por 10 min à temperatura ambiente (TA), seguida por bloqueio com tampão TBST contendo 5% de leite em pó desnatado, a 4 °C por 18 h. Feito isto, a membrana foi lavada 3x com tampão TBST, sob agitação, à TA por 5 min e incubada com anti-FH humano policlonal feito em coelho, gentilmente cedido pela Dra.

Pilar Sánchez do Hospital Universitário de La Paz (Madrid, Espanha), ou anticorpo policlonal anti-FH feito em cabra (Quidel, San Diego, Califórnia, Estados Unidos), ambos diluídos em TBST contendo 5% de leite em pó desnatado (1:10000) por 4 h à TA. Ao término da incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST e incubada com anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase de raiz forte (GE Healthcare, Nightingales Lane, Chalfont St Giles, Reino Unido) diluídos em TBST a 5% de leite em pó desnatado (1:10000 e 1:40000, respectivamente) por 1 h à TA. A membrana foi novamente lavada com TBST e incubada por 1 min com solução de substrato *ECL plus* fornecida pelo fabricante do kit Amersham *ECL plus Western blotting detection system* (GE Healthcare, Reino Unido). A membrana foi exposta a filme de alta sensibilidade *Hyperfilm* (GE Healthcare, Reino Unido) até atingir a intensidade desejada, empregando-se revelador e fixador da KODAK ou com o auxílio do *GBox Chemi* (Syngene, Frederick, Maryland, Estados Unidos).

3.4 Vetor e mutação sítio-dirigida dos plasmídeos pIC-Neo-FH

O vetor pIC-Neo contendo o inserto íntegro de cDNA de FH selvagem. Este plasmídeo gera alto número de cópias, possui um promotor de citomegalovírus humano para expressão constitutiva da proteína FH em células de mamíferos, principalmente fibroblastos Cos-1 e Cos-7, e um gene de resistência à neomicina que foi utilizado para posterior seleção de células (Manual *mammalian expression vector*, Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) (**Figura 8**).

Figura 8 - Esquema do vetor usado para mutagenese sítio-dirigida. Plasmídeo pIC-Neo (*Manual mammalian expression vector*) (Promega, Estados Unidos).

O vetor pIC-Neo-FH íntegro normal foi mutado para conterem a mesma substituição do códon (CAT→CGT) encontrada no *Hf* do paciente, empregando-se o *QuickChange XL II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Santa calra, Califórnia, Estados Unidos). Cada reação contendo tampão de reação 1x fornecido pelo fabricante, 25 ng de plasmídeo, 400 ng de iniciador com a mutação desejada (**Quadro 1**), 1 µL dNTP mix, 3 µL Quick-Solution, 2,5 U de DNA polimerase *PfuUltra high fidelity* e água Milli-Q para volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Alemanha) programado para iniciar com 95 °C por 3 min para uma completa desnaturação, seguindo-se 18 ciclos de 95°C por 50 s, 60 °C por 50 s e a 68 °C por 10 min e 30 s. Para uma extensão completa dos produtos amplificados, foi acrescentada uma etapa final de incubação de 7 min a 68 °C. Após término deste período, a reação foi incubada a 37 °C com 10 U de *Dnpi* por 8 h para digestão do DNA parental (**Figura 9**). No dia seguinte, foram adicionados 10 µL desta reação em 100 µL de células competentes XL1-BLUE para obtenção de clones, segundo recomendações do fabricante. Esta reação foi incubada a 0 °C por 30 min, seguida por incubações a 42 °C por 2 min e novamente a 0 °C por 10 min. Em seguida, após adição de 1mL de Luria Broth (LB) líquido sem antibiótico, as células foram incubadas a 37 °C por 1 h para crescimento das bactérias. Após incubação, as células foram centrifugadas a 3000 *g* por 10 min, plaqueadas em ágar LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C até o dia seguinte. As colônias selecionadas foram crescidas em LB líquido a 37 °C por 12-16 h para extração do plasmídeo, empregando-se o kit *Wizard® plus SV Miniprep* (Promega, Estados Unidos), segundo recomendação do fabricante. Após extração, os plasmídeos foram sequenciados para confirmação da mutação.

Quadro 1 - Iniciadores utilizados na mutação sítio dirigida (5'→3') de pIC-Neo-FH. Nucleotídeos sublinhados indicam o local de inserção da mutação.

Seqüência Selvagem	5'GGTGAGATTAATTAC <u>CGT</u> GAAATGTGACACAGATG3'
Seqüência mutada (<i>Forward</i>)	5'GCTAGGTGAGATTAATTAC <u>C</u> TGAATGTGACACAGATGGATG3'
Seqüência mutada <i>Reverse</i>	3'CATCCATCTGTGTCACTTCA <u>T</u> GGTAATTAATCTCACCTAGC5'

Figura 9 - Esquema de mutagenese sítio-dirigida. As setas indicam os iniciadores contendo a mutação. Plasmídeo em verde e amarelo indica o plasmídeo original sem mutação. Plasmídeo em vermelho e azul indica aquele que contém a mutação [Figura retirada do manual do kit *QuickChange XL II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, Estados Unidos)].

3.5 Extração de RNA total de culturas de fibroblastos

Para tal procedimento, aproximadamente 2×10^6 fibroblastos de indivíduos normais e paciente, estimulados por 24 h com 100 U/mL de IFN- γ , foram lavados em PBS gelado e lisados com solução de desnaturação (Promega, Estados Unidos). Em seguida, os ácidos nucleicos foram obtidos empregando-se NaOAc 2 M e solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1). Após 15 min em gelo, a preparação foi centrifugada e o sobrenadante transferido para um outro tubo, e diluído v/v em isopropanol. Esta preparação foi então precipitada a -20°C para que o RNA pudesse ser separado dos demais componentes. Após precipitação, foi realizada nova centrifugação e o sobrenadante desprezado. O precipitado por sua vez foi lavado com 1 mL de EtOH 75% gelado e ressuspenso em água livre de nucleases.

3.6 Síntese da primeira fita de cDNA de FH

Após quantificação do RNA total por absorbância a 260 nm, foi sintetizada a primeira fita de cDNA codificadora da região SCR1-3 de FH utilizando-se enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (MMLVRT) (Invitrogen, Carlsbad,

Califórnia, Estados Unidos). Cada reação contendo 500 µg/mL de oligo (dT), 10 mM de dNTPs mix, 900 ng de RNA e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para completar o volume final de 12 µL foi incubada a 65 °C durante 5 min e logo após, resfriada por, pelo menos, 1 min a 4 °C. Uma segunda mistura foi adicionada à reação contendo tampão (5x), 0,1 M de ditioneitol e 40 U de *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (RNaseOUT) (Invitrogen, Estados Unidos). A reação foi incubada a 37 °C por 2 min e então, 200 U de MMLV-RT foram adicionadas à reação, mantendo-a sucessivamente a 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min e a 70 °C por 15 min. As amostras foram estocadas a -20 °C até o uso.

3.7 Reação de amplificação em cadeia empregando DNA polimerase para transcrição reversa (RT-PCR)

Uma vez sintetizada a primeira fita de cDNA, a amplificação foi feita por PCR, utilizando-se *Taq* DNA polimerase, tampão de reação, dNTPs e iniciadores específicos. Para um volume final de 25 µL, adicionamos tampão (1x), 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,4 µM de cada iniciador, 2,0 U de *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare, UK), 135-250 ng de cDNA e água para completar o volume final de 25 µL da reação. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf, Alemanha) programado para um ciclo de 92 °C por 10 min para desnaturação dos iniciadores (esta fase sem *Taq* DNA polimerase). Após o término deste ciclo, a *Taq* DNA polimerase foi adicionada seguida por incubação a 94 °C por 3 min para uma completa desnaturação, e 40 ciclos de 94 °C por 1 min 10 s, 53 °C por 50 s e a 72 °C por 2 min. Para uma extensão completa dos produtos amplificados, adicionou-se um passo final de 7 min a 72 °C. Para produtos maiores de 1 kb, o cDNA foi amplificado por PCR, utilizando-se Platinum *Taq* DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen, Estados Unidos), tampão (1x), 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,4 µM de cada iniciador, 2,0 U de *Taq* DNA polimerase de alta fidelidade, 135-250 ng de cDNA e água para completar o volume final de 25 µL da reação. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1%, utilizando TBE (0,1 M de Trisma-base, 0,09 M de ácido bórico e 1 mM de EDTA) como tampão de corrida. As amostras foram coradas em brometo de etídio (10 µg/mL) e visualizadas sob luz ultravioleta.

3.8 Sequenciamento de nucleotídeos

O sequenciamento de nucleotídeos foi feito empregando-se ABIPRISM *Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer Applied Biosystems). As condições da reação de seqüenciamento foram padronizadas em tubos contendo tampão (220 mM de Tris-HCl pH9, 5 mM de MgCl₂), 8 µmols de iniciador do promotor T7, 1x Big Dye e H₂O milliQ até o volume final de 20 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) programado para 40 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 s. Ao término da amplificação, as reações foram precipitadas com 80 µL de isopropanol a 75%, incubadas por 15 min à TA, centrifugadas a 10000 *g* por 20 min e o sobrenadante descartado. Um volume de 200 µL de isopropanol a 75% foi empregado para lavar o precipitado, seguido por centrifugação. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram secadas e armazenadas a -20 °C até o dia seguinte, quando foram encaminhadas para o Instituto de Química para finalização do sequenciamento. As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com a seqüência depositada no *Gen Bank* número MN_001014975.2 (www.ncbi.nlm.nih.gov). Todos os iniciadores utilizados no sequenciamento foram iniciadores *Forward* (5'-3') das regiões do cDNA de FH (**Quadro 2**).

Quadro 2 - Iniciadores *Forward* (5'→3') utilizados no seqüenciamento do pIC-Neo-FH mutado. Os números à esquerda referem-se à posição dos iniciadores no cDNA de FH.

T7 polimerase	TAATACGACTCACTATAGG
168FH	TTCTGACAGGTTCTGGTCTG
753FH	ATAAGGAGAATGAACGATTTC
1303FH	ATCTATAGACGTTGCCTGCC
1969FH	ACCTCCTGAACTCCTCAATG
2650FH	GTCAATACCACTCTGTGTTG
3167FH	TGCATTAATAGCAGATGGAC
3411FH	CACCTATTGACAATGGGGAC

3.9 Transfecção de Cos-7 com pIC-Neo-FH selvagem e mutante

Antes do início da transfecção das células Cos-7 (Gentilmente cedida pelo Prof. Gerhard Wunderlich, Departamento de Parasitologia do ICB da USP), placas de 6 poços foram semeadas com $1,5 \times 10^5$ células Cos-7/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em DMEM sem SFBi. No dia seguinte, adicionamos 600-800 ng de DNA plasmidial em poços distintos em um volume final de 125 µL de DMEM contendo 10% de SFBi sem antibiótico em um primeiro tubo (1,5 mL). Em um segundo tubo diluímos 3 µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Estados Unidos) em 122 µL de DMEM contendo 10% de SFBi sem antibiótico. Os tubos foram incubados à TA por 5 min, quando então as preparações foram reunidas em um único tubo, e a reação foi novamente incubada à TA, agora por 20 min. Esta preparação foi adicionada às células previamente lavadas com PBS estéril, o volume foi completado para 2 mL de DMEM contendo 10% de SFBi sem antibiótico e as culturas incubadas por 24 h a 36 h a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂. Um controle negativo sem DNA foi incluído para se avaliar a eficácia da seleção pelo antibiótico neomicina. Um controle positivo da transfecção foi incluído também, utilizando-se 600 µg de pCL-GFP, gentilmente cedido pela Profa. Marinilce dos Santos, Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, nas mesmas condições das amostras, contudo o antibiótico seletor não foi utilizado neste controle positivo. Após incubação, as células foram lavadas e mantidas em meio de cultura fresco sem antibiótico, incubando-se por mais um dia antes do antibiótico seletor ser adicionado. No dia seguinte, o meio foi substituído por DMEM contendo 10% de SFBi, 50 U/mL de estreptomicina, 50 µg/mL de penicilina e 950 µg/mL de neomicina. Este meio foi trocado a cada 2 dias por um período de 6 dias ou até 2 dias se a morte de todas as células do controle negativo fosse precocemente observada. A partir disso, o antibiótico seletor foi retirado e as células foram cultivadas com DMEM contendo 10% de SFBi, 50 U/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de penicilina. Parte das células foi armazenada a -80 °C e depois em nitrogênio líquido para uso futuro.

3.10 ELISA para quantificação de FH nos lisados e sobrenadantes das culturas de Cos-7 transfectadas

O anticorpo policlonal anti-FH Humano feito em coelho (13,6 mg/mL) foi diluído em 0,1 M de bicarbonato/carbonato de sódio, pH 9,6, na concentração final de 3,4 µg/ml e adicionado à placa de ELISA (96 poços 100 µL/poço) (Costar, New York, New York, Estados Unidos) por 18 h a 4 °C. Após cinco lavagens com 200 µL/poço de 1,6 mM de fosfato de sódio monobásico; 15 mM de fosfato de sódio bibásico; 140 mM de cloreto de sódio; 0,05% Tween 20 (PBS-Tween) o bloqueio foi feito com leite desnatado a 5% (200 µL/poço) em PBS-Tween por 2 h a 37 °C. A partir desta etapa, todos os anticorpos e amostras foram diluídos em PBS-Tween, contendo 5% de leite desnatado em volume final de 100 µL. Terminado o bloqueio e mais um ciclo de lavagens, as diluições das amostras ou da proteína FH purificada (Calbiochem-Novachem, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha) foram adicionadas em diferentes concentrações (1,5 µg/ml a 50 µg/ml). Após incubação por 1 h a 37 °C e lavagens com PBS-Tween, o anticorpo policlonal anti-FH feito em cabra (Calbiochem-Novachem, Alemanha) diluído a 1:2000 em PBS-Tween foi adicionado, incubando-se por 2 h a 37 °C. Finda a incubação e novo ciclo de lavagens, incubou-se a reação com o anticorpo terciário, anti-IgG de cabra policlonal conjugado com fosfatase alcalina (Calbiochem-Novachem, Alemanha), diluído a 1:2000 em PBS-Tween.

Após novo ciclo de lavagens com PBS-Tween a reação foi revelada com 200 µL/poço de uma solução de para-nitrofenil fosfato (p_NPP) (1mg/ml) em tampão para fosfatase alcalina (0,1 M de dietanolamina; azida sódica a 0,02%; 0,5 mM de cloreto de magnésio, pH 9,8). A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de ELISA Biotrack II (Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos) a 405 nm após 15 min, 20 min e 25 min de incubação à temperatura ambiente, sob o abrigo da luz. A curva padrão com a proteína purificada foi construída e o valor de R² obtido foi sempre ≥ 0,99.

3.11 Padronização da microscopia confocal

A presença de FH intracelular foi também acompanhada por microscopia confocal. Para tanto, fibroblastos do paciente ou controle normal (aproximadamente 10⁵) foram cultivados inicialmente em lamínulas de vidro por 18 h a 37 °C e

posteriormente estimulados por 24 h com 100 U/mL de IFN- γ em DMEM, contendo 1% de glutamina e sem SFBi. Paralelamente, avaliamos a presença de FH em culturas de fibroblastos Cos7 transfectados com pIC-Neo-FH, sem adição de IFN- γ .

Devido à rápida degradação de filamentos do citoesqueleto, a fixação das proteínas foi feita imediatamente após a retirada da cultura da estufa com solução fixadora contendo 4% de formaldeído, 10 mM de Pipes, 5 mM de EGTA, 2 mM de MgCl₂ a 0,2% de Triton X-100 em H₂O MilliQ, por 10 min à TA. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi recolhido e substituído uma nova solução fixadora sem Triton X-100, seguido de incubação por 20 min à TA. Já para marcação dos compartimentos intracelulares das culturas de fibroblastos, as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com 4% de formaldeído por 5min e lavadas novamente 2x com PBS. As células fixadas foram permeabilizadas com 0,2% Triton X-100 em PBS por 5 min.

Após a etapa de fixação e permeabilização, as lamínulas foram lavadas 2x e incubadas por 40 min com PBS contendo 10% SFBi. O sobrenadante foi aspirado e anticorpos primários foram empregados para marcação de estruturas e proteínas (**Quadro 3**). Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 1% de BSA e incubados a 4 °C por no mínimo 16 h. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS contendo SFBi, antes da incubação com anticorpos secundários anti-IgG conjugados à TA no escuro por 1 h (**Quadro 3**). As lamínulas foram lavadas novamente por 3x com PBS contendo SFBi para retirada do excesso de anticorpos e então incubadas com 10 μ g/mL de *4'6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) por 30 min à TA no escuro. Finalmente, as lamínulas foram lavadas com PBS pela última vez e montadas com o auxílio de Gel Mount (Vectashield). Este material foi estocado a 4 °C e analisado no dia seguinte após a montagem em microscópio confocal.

Quadro 3 – Anticorpos utilizados na microscopia confocal. Na ordem por coluna: anticorpo, concentração, estrutura alvo do anticorpo (marcação) e doador ou fabricante.

Anticorpo	Concentração	Marcação	Doador ou fabricante
Policlonal primário anti-FH SCR 1-4 feito em coelho	1:25	FH humano	Dr. Peter Zipfel
Policlonal primário anti-FH feito em coelho	1:100	FH humano	Dra. Pilar Sánchez do Hospital Universitario de La Paz, Espanha
Monoclonal primário anti- β -COP1 feito em camundongo	1:100	RE, Complexo de Golgi e vesículas de origem destes compartimentos	Prof. Sesso da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo
Monoclonal primário anti- α -manosidase feito em camundongo	1:100	Complexo de Golgi	Prof. Sesso da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo
Monoclonal primário anti-Golgina97 feito em camundongo	1:50	Porção trans do complexo de Golgi	Prof. Emer Ferro Departamento de Biologia Celular e desenvolvimento, ICB, USP, São Paulo
Monoclonal anti-GM130 feito em camundongo	1:100	Porção cis do complexo de Golgi	BD Biosciences, USA
Monoclonal anti-calnexina feito em camundongo	1:25	RE	BD Biosciences, USA
Monoclonal anti-calnexina feito em camundongo	1:100	RE	ABCam, Reino Unido
Monoclonal primário anti- β -tubulina feito em camundongo	1:100	Microtúbulos do citoesqueleto	Profa. Marinilce dos Santos do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, ICB, USP, São Paulo
Monoclonal secundário anti-IgG de coelho isotiocianato de tetraiodamina (TRITC)	1:100	Anticorpo primário feito em coelho	Sigma-Aldrich, USA
Monoclonal secundário anti-IgG de camundongo isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	1:100	Anticorpo primário feito em camundongo	Sigma-Aldrich, USA

3.12 Fixação e processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Para o estudo ultra-estrutural dos fibroblastos do indivíduo normal e paciente, foram cultivados 5×10^5 fibroblastos por garrafa de cultura celular de 75 cm^2 . As células foram lavadas com PBS estéril e estimuladas por 48 h com 100 U/mL de IFN- γ em DMEM contendo 10% SFBi. A fixação foi realizada com solução gelada de formaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M de pH 7,2 a 4 °C em preparados contendo cerca de 5×10^5 fibroblastos previamente tripsinizados, contados e lavados com PBS. A seguir, o material foi incubado por 24 h a 4 °C. A etapa de pós-fixação foi

realizada com tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato com sacarose por 2 h a 4 °C. Em seguida, os fragmentos foram colocados por 24 h em solução de acetato de uranila a 0,5% em água destilada com sacarose a 10% a 4 °C. Depois da desidratação em soluções alcoólicas crescentes de 70% a 100%, seguiram-se duas passagens em óxido de propileno puro durante 20 min cada, infiltração com óxido de propileno mais resina básica (Araldite) em partes iguais, por 12 h, com agitação em TA. Na sequência, as peças receberam resina pura a 37 °C, depositadas em moldes e levadas à estufa a 70 °C, durante 5 dias. Para a microtomia de corte semifino, da ordem de 0,5 µm de espessura, empregamos o ultramicrotomo LKB Porter Blum MT1. Para cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm, utilizamos o ultramicrotomo LKB Porter Blum MT 2, cujos cortes foram coletados em telas de cobre, corados com acetato de uranila a 2% em água destilada durante 1 h e lavados em água destilada durante 30 min. Para as análises das telas e obtenção de micrografias eletrônicas, empregamos o microscópio eletrônico do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do ICB da USP, São Paulo (JEOL-100 CX-II). Todo material utilizado na microscopia eletrônica foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marinilce dos Santos do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do ICB da USP.

3.13 Análise celular por citometria de fluxo

Para o estudo da expressão de moléculas de membrana dos fibroblastos de indivíduo normal e paciente foram empregados 10^6 fibroblastos. As células foram lavadas com PBS estéril e estimuladas por 48 h com 100 U/mL de IFN- γ em DMEM sem SFBi. Após tratamento, as células foram tripsinizadas, contadas e 2×10^5 células foram distribuídas por microtubo. A partir deste ponto, as moléculas de superfície das amostras celulares foram marcadas.

Os tubos foram incubados por 30 min a 4 °C com anti-CD59 humano feito em camundongo (1:500), anti-MCP humano feito em camundongo (1:100) e anti-DAF humano feito em coelho (1:100) (BD Biociences, San Jose, Califórnia, Estados Unidos). Ao término da incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 *g* por 5 min. Uma vez removido o sobrenadante, as preparações foram lavadas com PBS e incubadas com anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado com FITC (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos) por 30 min a 4 °C. A seguir, a lavagem foi repetida e as células foram

ressuspendidas em 400 μ L de tampão para análise (PBS contendo 0,1% de ázida sódica e 2% de SFBi) em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biociences, Estados Unidos).

3.14 Purificação da proteína FH do sobrenadante das culturas de fibroblastos de indivíduo normal e paciente

Anticorpos policlonais anti-FH humano (Calbiochem-Novachem, Alemanha) foram acoplados à CNBr-Sepharose para purificação de FH por cromatografia por afinidade. Esta resina foi lavada 3 vezes com PBS pH 7,2 (centrifugando-se a 1200 *g* por 7 min), e as amostras de sobrenadante das culturas de fibroblastos do indivíduo normal e paciente foram adicionados nas proporções de 1:1 e 5:1 de PBS, respectivamente. As amostras foram misturadas suavemente com a resina e deixado em incubação por 18 hs a 4 °C sob agitação muito suave. Finda a incubação, a resina foi retirada da agitação e centrifugada a 1200 *g* por 7 min. Foi realizado outro ciclo de lavagens e adicionados 2 mL de tampão (0,1 M de glicina pH 2,8) para eluição da proteína desejada. A resina foi novamente centrifugada (1200 *g* por 7 min) e o sobrenadante coletado (proteína purificada) foi transferido para um tubo novo contendo 0,33 mL de tampão de neutralização (1 M de Tris-HCl pH 9,0; 0,5 M de NaCl). Após a eluição, a resina foi lavada 3 vezes com PBS 1X pH 7,2 (centrifugando a 1200 *g* por 7 min) em grande excesso de volume e estocada em 10 mL de etanol 20% a 4 °C até o momento de uso.

3.15 Ensaio de atividade de co-fator de FH

Para avaliarmos a atividade de co-fator de FH, incubamos 250 ng de C3b, 200 ng de FI (Complement Technology, Tyler, Texas, Estados Unidos) e 200-500 ng de FH purificado das culturas de fibroblastos do paciente e indivíduo normal em solução de PBS e incubamos por 4 h a 37 °C. Também foram incubados tubos contendo C3b apenas; C3b+FI; C3b+100 ng FH comercial como controles negativos da reação e um tudo contendo C3b+FI+100 ng FH comercial como controle positivo da clivagem de C3b. Findo o tempo de incubação, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE e analisadas por *Western blotting* para C3b utilizando-se anticorpos anti-C3b feito em cabra (1:4000) (Calbiochem-Novachem, Alemanha) e anticorpos anti-IgG de cabra (1:10000) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.16 Padronização das concentrações dos fármacos

Em garrafas contendo 10^6 células foram lavadas 2x com PBS e mantidas em DMEM sem SFBi, tratadas com 100 U/mL de Interferon- γ (IFN- γ) (R&D Systems, Estados Unidos), 1 mM ou 2 mM ácido 4-fenilbutírico (Sigma-aldrich, Estados Unidos), 1 μ M ou 2 μ M curcumina (Sigma-aldrich, Estados Unidos), 110 μ M tapsigargina, 2,5 μ g/mL tunicamicina (ambos gentilmente cedidos pelo Prof. Francisco Laurindo) por 24 h.

4 Resultados

4.1 Sequenciamento do cDNA de FH do paciente, mãe e pai, a partir de cultura de fibroblastos de pele

Em projetos anteriores, nosso grupo caracterizou a deficiência de FH em um paciente que apresentava infecções bacterianas recorrentes (Falcão et al., 2008). Observamos baixos níveis de FB, C3 e C9 no soro do paciente que sugeriram falha na produção de Fator H. Para avaliar se a causa dos níveis indetectáveis de FH no soro do paciente seriam provocadas por alterações genéticas, foi necessário sequenciar o cDNA de culturas de fibroblastos do paciente e de seus pais (**Figura 10**).

Ao sequenciarmos o cDNA de FH a partir de culturas de fibroblastos, constatamos que, enquanto o paciente é homozigoto recessivo para a mutação $CG^{453}T \rightarrow CA^{453}T$, os pais são ambos heterozigotos, confirmando que o paciente herdou esta deficiência de maneira autossômica e recessiva (Falcão et al., 2008). Na **Figura 10** estão representados os resultados do sequenciamento (Fui responsável pelo sequenciamento do cDNA de FH apenas da mãe).

Figura 10 - Sequenciamento do cDNA de FH do paciente, mãe e pai, a partir de cultura de fibroblastos de pele. A-paciente; B-pai; C-mãe. A seta em vermelha indica a heterozigose para simples substituição de nucleotídeo ($CG^{453}T \rightarrow CA^{453}T$), gerando uma modificação de Arg¹²⁷His no SCR-2 de FH nos pais. Esta mutação aparece em homozigose no paciente e em heterozigose.

Fonte: Falcão et al., 2008.

4.2 Análise da secreção de FH das culturas de fibroblastos de pele do paciente, mãe e indivíduo normal

A partir dos resultados obtidos pelo sequenciamento de nucleotídeos, fomos investigar se a mutação Arg¹²⁷His no FH seria capaz de alterar a capacidade de síntese e secreção desta proteína em fibroblastos do paciente, mãe e controle normal. Devido à esperada baixa produção desta proteína pelos fibroblastos, foi necessário concentrar as amostras do sobrenadante das culturas de fibroblastos antes e analisá-las por *Western blotting*.

Quando comparados com células do indivíduo controle, observamos que a marcação com anti-FH era mais intensa no lisado das culturas de fibroblastos do paciente deficiente, porém mais fraca no sobrenadante sugerindo, portanto, que as células do paciente são capazes de sintetizar FH e que parte da proteína sintetizada chega a ser secretada. Já as amostras da mãe apresentaram uma marcação intermediária entre o paciente e indivíduo normal em relação ao sobrenadante (**Figura 11**). Resultado semelhante publicamos no artigo de Falcão e colaboradores em 2008, no qual sou co-autor.

Figura 11 - *Western blotting* para detecção de FH em concentrados dos sobrenadantes e lisados celulares de fibroblastos do paciente, mãe e indivíduo normal. As células foram estimuladas com 100 U/mL de IFN- γ e as amostras foram então coletadas nos tempos de 6, 12, 24 e 48 h.

4.3 Determinação do compartimento intracelular de retenção da proteína FH do paciente

Uma vez confirmado o retardo da secreção da proteína FH nos fibroblastos do paciente, empregamos microscopia de fluorescência confocal para investigar em qual compartimento intracelular o FH mutante estaria retido. Para tanto, cultivamos fibroblastos de indivíduo normal e de paciente, previamente estimulados com IFN- γ por 24 h. Para isto, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-*Beta coat protein I* (β -COPI

- marcador de retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas derivadas destes compartimentos) e anti- α -manosidase (marcador de complexo de Golgi). Já anticorpos policlonais anti-FH não puderam ser usados neste ensaio, pois poderiam potencialmente reconhecer FHR1, FHR-2, FHR-3 FHR-4 e FHR-5, membros da família do FH e com domínios homólogos. Dessa maneira, decidimos empregar anticorpo anti-FH policlonal produzido em resposta à porção SCR1-4 da proteína e, portanto, reconhece apenas o FH e FHL-1 (**Figura 12**) e não reage com FHR 1-5. A análise por microscopia confocal mostrou co-localização entre FH e β -COPI (**Figura 13**) e co-localização menos marcante de FH e α -manosidase para as células do paciente (**Figura 14**).

É interessante notar que as culturas de fibroblastos do paciente marcaram com anti-FH com maior intensidade, quando comparadas com as culturas de indivíduo normal (**Figura 12-17**), corroborando com os resultados obtidos no *Western blotting* referente à secreção de FH (**Figura 11**).

Figura 12 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para simples marcação de FH. A-Controlé negativo em verde (FITC); B-FH em vermelho (TRITC); C-Núcleo em azul (DAPI); D-sobreposição das marcações (Merge).

Figura 13 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e β -COPI (Marcador de RE, CG e vesículas de origem do CG). A- β -COPI em verde (FITC); B-FH em vermelho (TRITC); C-Núcleo em azul (DAPI); D-sobreposição das marcações em amarelo (Merge).

Figura 14 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e α -manosidase (marcador de CG). A- α -manosidase em verde (FITC); B-FH em vermelho (TRITC); C-Núcleo em azul (DAPI); D-sobreposição das marcações em amarelo (Merge).

Para confirmar os dados obtidos com anti- α -manosidase, marcamos as células com anti-Golgina97, um marcador específico para a porção trans do complexo de Golgi (CG), e anti-FH (**Figura 15**). Em acordo com os resultados mostrados na **Figura 14**, verificamos novamente co-localização destas duas proteínas em menor intensidade,

quando comparada à marcação com anti- β -COPI, excluindo o CG como compartimento principal de retenção da proteína mutante. Além disso, realizamos uma dupla marcação entre anti-FH e anti-*Golgi matrix protein 130* (GM130) (**Figura 16**), um marcador específico para região cis-golgi, evidenciando uma discreta co-localização entre estes anticorpos, provavelmente por esta organela fazer parte da via de secreção da proteína. Isto sugere que o RE deva ser o compartimento onde a proteína mutante FH Arg¹²⁷His está preferencialmente retida nas células do paciente deficiente.

Para analisar esta hipótese, foi realizada uma dupla marcação com anti-FH e anti-calnexina. A partir desta análise, foi possível observar uma co-localização entre FH e calnexina, confirmando que a proteína está retida no RE (**Figura 17**).

Como controle da especificidade, culturas de fibroblastos foram incubadas apenas com DAPI e com anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou de camundongo conjugados com fluorescência (TRITC e FITC, respectivamente). As culturas também foram incubadas com cada anticorpo primário individualmente e os anticorpos secundários conjugados com fluorescência (TRITC e FITC) para descartar a possibilidade de reação cruzada entre os anticorpos primários e secundários. Nenhuma reação inespecífica foi observada.

Figura 15 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e anti-Golgina97 (marcador da porção Trans-CG). A-Golgina97 em verde (FITC); B-FH em vermelho (TRITC); C-Núcleo em azul (DAPI); D-sobreposição das marcações em amarelo (Merge).

Figura 16 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e GM130 (Marcador da porção Cis-CG). GM130 em verde (FITC); FH em vermelho (TRITC); Em amarelo a sobreposição das marcações (Merge).

Figura 17 - Microscopia confocal de fibroblastos do indivíduo normal e paciente para dupla marcação de FH e calnexina (Marcador de Retículo endoplasmático). Calnexina em verde (FITC); FH em vermelho (TRITC); Em amarelo a sobreposição das marcações (Merge).

4.4 Sequenciamento do plasmídeo pIC-Neo-FH e seleção dos clones mutantes e selvagens

Para confirmar se a mutação Arg¹²⁷His encontrada no paciente seria realmente responsável pelo retardo de secreção do FH, fibroblastos de rim de macaco da linhagem Cos-7 foram transfectados com plasmídeos contendo a sequência íntegra codificadora

da proteína FH do indivíduo normal (selvagem) ou do paciente (mutante). Para isto, o plasmídeo pIC-Neo-FH selvagem foi manipulado por mutação sítio-dirigida de modo a conter a mesma mutação do paciente. O sequenciamento de nucleotídeos do plasmídeo mutante apresentou duas mutações silenciosas: uma $GCC^{1161} \rightarrow GCA^{1161}$ (Ala³⁸⁷Ala) (**Figura 18A**) e outra $CCA^{2256} \rightarrow CCG^{2256}$ (Gln⁶⁷²Gln) (**Figura 18B**), já existentes no plasmídeo original contendo o FH selvagem e que não interferiram na transfecção e expressão da proteína. Além disso, tivemos sucesso na obtenção do plasmídeo contendo a mutação $CG^{453}T \rightarrow CA^{453}T$ responsável pela troca dos aminoácidos Arg¹²⁷His (**Figura 18C**). Após esta etapa, as células Cos-7 foram transfectadas com os plasmídeos pIC-Neo-FH selvagem ou mutante. Os clones foram aliquotados em placas de 24 poços e selecionados por ELISA (**Figura 19**) e microscopia confocal (**Figura 20**). Devido ao método de transfecção gerar clones produtores e não produtores da proteína, selecionamos apenas as colônias com pelo menos 20% de clones produtores de FH para utilizarmos nos experimentos.

Figura 18 - Sequenciamento do plasmdeo pIC-Neo mutado. As setas indicam locais de mutao. A-Mutao silenciosa $GCA^{1161} \rightarrow GCC^{1161}$. B-Mutao silenciosa $CAA^{2256} \rightarrow CAG^{2256}$. C-Mutao sio dirigida $CG^{453}T \rightarrow CA^{453}T$.

Figura 19 - Concentração de FH nos sobrenadantes de clones Cos-7 transfectados com plasmídeo pIC-Neo-FH selvagem ou mutante, e incubados em DMEM sem SFBi por 48 h. As setas indicam os clones selecionados com produção acima de 1,5 µg/mL.

Figura 20 - Microscopia confocal para detecção de FH das células Cos-7 transfectadas com pIC-Neo-FH selvagem ou mutante incubadas em DMEM sem SFBi por 24 h. As setas em amarelo indicam clones produtores de FH.

4.5 Análise da secreção de FH das culturas de fibroblastos Cos-7 transfectados com o pIC-Neo-FH selvagem ou pIC-Neo-FH mutante

Após a seleção das colônias produtoras de FH, fomos avaliar a secreção desta proteína por estas células. Quando analisamos por *Western blotting*, as culturas de fibroblastos Cos-7 transfectados com pIC-Neo-FH selvagem ou pIC-Neo-FH mutante, observamos que as células que receberam o plasmídeo selvagem apresentaram menor intensidade de marcação para FH nos lisados celulares, quando comparado com o sobrenadante. Desta forma, confirmamos que logo após a síntese do FH selvagem estas células secretam rapidamente esta proteína, descartando algum problema de expressão

do vetor nestas células. Já as células que receberam o plasmídeo mutante mostraram maior intensidade de marcação da proteína FH nos lisados celulares, quando comparados com o sobrenadante (**Figura 21**). Culturas celulares mantidas por mais tempo apresentaram marcação mais intensa, devido ao acúmulo da proteína no citoplasma das células transfectadas com o plasmídeo mutante. Além disso, os fibroblastos que receberam o plasmídeo mutante foram capazes de secretar parte da proteína FH da mesma maneira que fibroblastos do paciente, como foi verificado no sobrenadante da cultura das células transfectadas. Desta forma, confirmamos que o retardo na secreção de FH por fibroblastos do paciente deficiente é causado pela mutação Arg¹²⁷His e não por um defeito intrínseco de suas células.

Figura 21 - Análise por *Western blotting* para detecção de FH nos concentrados de sobrenadantes e nos lisados celulares de Cos-7 transfectadas com pICNeo-FH mutante ou selvagem. As amostras foram selecionadas, após 6, 12, 24 ou 48 h de incubação com DMEM sem SFBi.

4.6 Determinação do compartimento intracelular de retenção da proteína FH mutante

Uma vez confirmado o retardo da secreção de FH pelos fibroblastos Cos-7 transfectados com o plasmídeo pIC-Neo-FH Mutante, investigamos qual compartimento intracelular específico a proteína mutante poderia estar retida nestas células. Para isto, utilizamos microscopia de fluorescência confocal, empregando os mesmos anticorpos utilizados nos fibroblastos do indivíduo normal e paciente. A análise por microscopia confocal confirmou a retenção intracelular da proteína mutante de FH em Cos-7 transfectadas, quando comparado aos clones que produziram proteína FH selvagem (**Figura 22**).

Em paralelo, pôde-se observar uma sobreposição sugestiva de co-localização entre FH e β -COPI e entre FH e calnexina (**Figura 23-24**). Contudo, a marcação anti-golgina97 e anti-FH apresentou um sobreposição entre os anticorpos, provavelmente estas proteínas devem estar apenas sobrepostas e pouco co-localizadas devido à intensidade de marcação de FH e pelo complexo de Golgi ser utilizado na via de secreção desta proteína (**Figura 25**).

Figura 22 - Microscopia confocal de fibroblastos Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His¹²⁷ (mutante) ou Arg¹²⁷ (selvagem). A-Núcleo em azul (DAPI); B-Controle negativo; C-FH em vermelho (TRITC); D-sobreposição das marcações (Merge).

Figura 23 - Microscopia confocal de fibroblastos linhagem Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His¹²⁷ (mutante) ou Arg¹²⁷ (selvagem) empregando anti-FH e anti- β -COPI (Marcador de RE, CG e vesículas de origem do CG). β -COPI em verde (FITC); FH em vermelho (TRITC); Sobreposição das marcações (Merge) em amarelo.

Células Cos-7 pIC-Neo-FH mutante

Células Cos-7 pIC-Neo-FH selvagem

Figura 24 - Microscopia confocal de fibroblastos Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His¹²⁷ (mutante) e Arg¹²⁷ (selvagem) incubados com anti-FH e anti-calnexina (Marcador de Retículo endoplasmático). Calnexina em verde (FITC); FH em vermelho (TRITC); Sobreposição das marcações (Merge) em amarelo.

Células Cos-7 pIC-Neo-FH mutante

Células Cos-7 pIC-Neo-FH selvagem

Figura 25 - Microscopia confocal de fibroblastos Cos-7 transfectados com pICNeo-FH His¹²⁷ (mutante) ou Arg¹²⁷ (selvagem) incubados com anti-FH e anti-Golgi97 (Marcador da porção Trans do CG). Golgi97 em verde (FITC); FH em vermelho (TRITC); Sobreposição das marcações (Merge) em amarelo.

4.7 Análise morfológica do retículo endoplasmático por microscopia eletrônica de transmissão

A partir dos resultados obtidos por microscopia confocal, onde se verificou que a proteína FH mutante estava retida no RE, fomos observar se esse acúmulo protéico é capaz de causar alguma alteração na morfologia do RE. Para isto, analisamos as culturas de fibroblastos de paciente e indivíduo normal por microscopia eletrônica, após tratamento das culturas celulares com IFN- γ por 48 h. Observamos que fibroblastos do

paciente apresentavam uma alteração em cisternas do RE, tanto em tamanho como em quantidade, e dificuldade na localização do CG (**Figura 26**).

Figura 26 - Análise por microscopia eletrônica de fibroblastos de indivíduo normal e paciente. A e C paciente; B e D indivíduo normal; As imagens A e B estão com aumento de 5000x; As imagens C e D estão com aumento de 10000x. Setas em Vermelho – retículo endoplasmático; Seta em amarelo – complexo de Golgi.

4.8 Análise da interação de Fator H e citoesqueleto dos fibroblastos do paciente e controle normal

Ao analisarmos todos os painéis da microscopia confocal, chamou a nossa atenção a presença de polímeros de FH em forma de filamentos em algumas fotos (**Figura 27**). Este resultado nos sugeriu a possibilidade de interação entre FH e o citoesqueleto. Além disso, é sabido que o estresse no RE pode causar alterações de citoesqueleto. Desta forma, foi realizada uma marcação dupla de FH e β -tubulina para verificarmos se haveria sobreposição destas proteínas (**Figura 28**). Pode-se observar que não houve sobreposição nem alteração dos filamentos de β -tubulina nos fibroblastos do paciente. Contudo, a hipótese de estresse no RE não pôde ser descartada,

pois alterações de citoesqueleto causadas por estresse no RE ocorrem em estágios mais prolongados de exposição.

Figura 27 - Fibroblastos de indivíduo normal e paciente. Marcação com anti-FH em verde para o indivíduo normal e em vermelho para o paciente. As setas em branco indicam os polímeros de FH na forma de filamentos.

Figura 28 - Microscopia confocal de fibroblastos de indivíduo normal e paciente para marcação dupla de Fator H e β -tubulina. Linha A-Marcação das células do paciente; Linha B-Marcação das células do indivíduo normal. FH em vermelho (TRITC); β -tubulina em verde (FITC); Sobreposição das marcações (Merge) em amarelo.

4.9 Determinação da expressão de moléculas reguladoras do sistema complemento

Baseados nos resultados de alteração da estrutura do RE evidenciada por microscopia eletrônica dos fibroblastos do paciente, indagamo-nos se a retenção da proteína mutada seria capaz de causar estresse no RE suficiente para alterar os níveis de expressão de algumas moléculas de membrana do sistema complemento. Tendo em vista, que o estresse no RE atua sobre o receptor CD59, mas não sobre DAF (Oikawa et al., 2007), medimos a expressão destas proteínas reguladoras de membrana, empregando citometria de fluxo.

Na análise por citometria de fluxo observamos que houve uma variação da expressão das proteínas CD59 e DAF dos fibroblastos de indivíduo normal e paciente não estimulados que permaneceu quando as amostras eram estimuladas com IFN- γ . Desta forma, não foi possível observar diferenças na expressão destas proteínas reguladoras nas células do paciente, quando comparada às células do controle (**Figura 29**).

Figura 29 - Análise por citometria de fluxo da média de fluorescência da expressão de CD59 e DAF em fibroblastos de indivíduo normal ou paciente estimulados ou não com IFN- γ por 24 h. Cada ponto representa um experimento independente.

4.10 Determinação da expressão de CD59, DAF e MCP frente a estresse do RE

Baseados no artigo de Oikawa et al. (2007), onde foi relatado a diminuição de RNAm de CD59 em células tratadas com tunicamicina, avaliamos se o estresse do RE

seria capaz de causar diminuição dos reguladores de membrana do sistema complemento em fibroblastos. Para isto, utilizamos drogas indutoras clássicas de estresse do RE como: tunicamicina e tapsigargina.

Na análise da expressão destas proteínas por citometria de fluxo observamos que houve tendência expressão de DAF, porém a expressão de CD59 e MCP não foram alteradas ao tratarmos os fibroblastos com 2,5 µg/mL de tunicamicina por 24 h (**Figura 30 A**). Já os fibroblastos tratados com 10 µM de tapsigargina, mostraram um aumento de expressão de MCP e DAF, mas não de CD59 (**Figura 30 B**).

Figura 30 - Análise da média de fluorescência da expressão das proteínas reguladoras do sistema complemento por citometria de fluxo. Em A-Expressão de MCP, DAF e CD59 em fibroblastos tratados ou não com 2,5 µg/mL tunicamicina por 24 h. Em B-Expressão de MCP, DAF e CD59 em fibroblastos tratados ou não com 10 µM de tapsigargina por 24 h. Cada ponto representa um experimento independente.

4.11 Avaliação da atividade de co-fator de FH

Uma vez confirmado que a mutação Arg¹²⁷ é responsável pelo retardo na secreção de FH, fomos observar se a mutação também seria capaz de alterar a atividade reguladora da proteína. Para isto, a proteína foi purificada a partir do sobrenadante das culturas de fibroblastos de paciente e indivíduo normal, com o auxílio de resina de cromatografia acoplada com Sepharose 4B-CNBr conjugada com anticorpos anti-FH. Após a purificação, estas proteínas foram incubadas com C3b e FI para observarmos se a mutação Arg¹²⁷ foi capaz de alterar a capacidade de FH auxiliar FI na clivagem de C3b,

gerando iC3b. Finda a incubação, esta atividade foi avaliada por *Western blotting* empregando anti-C3b.

Após análise por *Western blotting* verificamos que a proteína FH mutante do paciente não perdeu a capacidade de atuar como co-fator de FI na clivagem C3b. Além disso, a intensidade do produto de clivagem de C3b mostrou-se a mesma entre as amostras que foram incubadas com FH do paciente e as amostras que foram incubadas com FH do indivíduo normal (**Figura 31**). Desta forma, a mutação Arg¹²⁷His é capaz de causar um retardo de secreção da proteína FH do paciente, contudo a proteína permanece funcional.

Figura 31 - Análise da capacidade de FH atuar como co-fator de FI na clivagem de C3b gerando iC3b. Análise por *Western blotting* para detecção de fragmentos de C3b. 1- C3b; 2- C3b + FH comercial; 3- C3b + FI; 4- C3b + FI + FH 200 ng paciente; 5- C3b + FI + FH 500 ng paciente; 6- C3b + FI + FH 200 ng Normal; 7- C3b + FI + FH 500 ng normal; 8- C3b + FI + FH 100 ng comercial. As amostras foram incubadas por 4 h a 37 °C.

4.12 Avaliação da secreção de FH por fibroblastos do paciente tratados com chaperonas químicas

Após confirmar que a proteína FH mutante possui atividade reguladora, induzimos sua secreção com drogas que atuam no dobramento protéico. Na tentativa de aumentar a concentração de proteínas responsáveis pelo enovelamento protéico, foi realizado um ensaio piloto com baixas doses de tapsigargina, um indutor de estresse de retículo endoplasmático. Como se pode observar, as células que estimuladas com IFN- γ e tapsigargina por 48h secretaram 18% mais FH, quando comparadas com as células que foram tratadas apenas com IFN- γ ou tapsigargina (**Figura 32**).

Figura 32 - Análise por *Western blotting* para detecção de FH de sobrenadante de culturas de fibroblastos do paciente incubadas com 1 μ M de tapsigargina. 1-Tapsigargina (Tg); 2-IFN- γ ; 3-Tapsigargina + IFN- γ . Ao lado a análise de densitometria das bandas.

A partir do resultado com secreção da proteína induzida pela tapsigargina, fomos observar se drogas que diminuem o estresse no RE seriam capazes de estimular a secreção de FH de forma mais eficiente. Para isto, testamos 2 drogas conhecidas no tratamento de retenção protéica: curcumina e ácido 4-fenilbutírico (PBA).

Para descobrirmos a melhor concentração, fizemos uma curva dose-resposta em culturas de fibroblastos do paciente. Tratado-os com 1 μ M e 2 μ M de curcumina ou 1 mM e 2 mM de PBA por 24 h. Finda a incubação, as amostras do sobrenadante foram concentradas e realizadas por *Western blotting* para detectar FH nas amostras de sobrenadante e lisado celular. Na análise do *Western blotting*, observamos que a concentração de 2 μ M de curcumina é suficiente para induzir a secreção de FH, tendo em vista que a concentração de 3 μ M de curcumina causou morte celular (resultado não apresentado) (**Figura 33**). Já para o PBA, a concentração de 2 mM mostrou-se ser a melhor dose de uso (**Figura 33**). Assim, os dois fármacos são candidatos potenciais para induzir a secreção de FH neste paciente.

Figura 33 - Análise por *Western blotting* para detecção de FH nos concentrados de sobrenadantes e nos lisados celulares de fibroblastos do paciente tratados com curcumina e PBA por 24 h. As concentrações utilizadas no ensaio de dose-resposta foram 1 μ M e 2 μ M curcumina e 1 mM e 2 mM PBA. Fibroblastos do paciente não tratados foram utilizados como controle para intensidade de banda.

4.13 Cinética de secreção de FH por fibroblastos de paciente tratados com chaperonas químicas

Para avaliar a duração do efeito do tratamento com curcumina e PBA sobre as células do paciente, foi realizada uma cinética de secreção de FH. Os fibroblastos do paciente foram tratados com 2 μ M de curcumina e 2 mM de PBA por 3, 6, 12 e 24 h. Após o período de tratamento, sobrenadante e lisado celular foram coletados para análise por *Western blotting* para detecção de FH. Como pode-se observar, tanto a curcumina como o PBA atingem o pico de secreção de FH entre 3 e 6 h de tratamento e apresentam um decaimento em 12 h de tratamento. Contudo, após o decaimento, os níveis de secreção de FH se mantêm até 24 h de tratamento (**Figura 34**). Desta forma, é possível observar que as drogas podem atuar sobre os fibroblastos por até 6 h de tratamento e que decorrido este tempo é necessária uma segunda dose dos fármacos para um melhor resultado no tratamento do paciente.

Figura 34 – Cinética de secreção de FH dos fibroblastos do paciente tratados com curcumina e PBA. Análise por *Western blotting* para detecção de FH de concentrados dos sobrenadantes e lisados celulares dos fibroblastos do paciente tratados com 2 μ M curcumina e 2 mM PBA por 3, 6, 12 e 24 h. Fibroblastos do paciente não tratados foram utilizados como controle para intensidade de banda.

5 Discussão

O sistema complemento exerce funções protetoras e reguladoras fundamentais para a homeostase do sistema imune. A sua importância para a resposta imune fica confirmada pelas deficiências genéticas em componentes do sistema complemento que já foram descritas na literatura. Estas deficiências são associadas com infecções bacterianas e doenças autoimunes, principalmente devido à falha na opsonização e remoção de patógenos e compostos imunoreativos (Basiglio et al., 2009).

Vários casos de deficiência de proteínas do complemento têm sido relatados desde a metade do século passado e foram fundamentais para o conhecimento das consequências clínicas de tais deficiências (Botto et al., 2009). Um dos exemplos clínicos mais esclarecedores é aquele observado em pacientes deficientes em C3. Estes pacientes possuem maior susceptibilidade a infecções graves e recorrentes como pneumonia, meningite, otite, tonsilite e sinusite, e doenças renais crônicas como glomerulonefrite e síndrome hemolítico-urêmica (Botto et al., 2009). Alguns deles apresentam doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico (Reis et al., 2006).

Da mesma forma que os portadores de deficiência de C3, os pacientes deficientes de FH desenvolvem frequentemente infecções causadas por bactérias capsuladas tais como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* e podem desenvolver complicações renais em decorrência da deposição de imunocomplexos e ativação descontrolada do sistema complemento (Reis et al., 2006; Welch et al., 2009).

No presente estudo, investigamos o caso de uma criança do sexo masculino, descendente de pais consanguíneos e com vários episódios de pneumonia. A partir da análise de componentes do sistema complemento presentes no soro, encontramos baixos níveis de FH (16,8 µg/mL, valores normais entre 225 a 1636 µg/mL) e C9 (5,6 µg/mL, valores normais acima de 59 µg/mL) e níveis indetectáveis de C3 e FD (Falcão et al., 2008).

Confirmado o perfil imunoquímico compatível com de deficiência de FH, analisamos o cDNA de FH obtido a partir de fibroblastos do paciente e observamos a presença da mutação **CG**⁴⁵³**T**→**CA**⁴⁵³**T**, responsável pela troca de aminoácido Arg¹²⁷His no SCR2 de FH (Falcão et al., 2008). A mutação Arg¹²⁷Leu foi descrita por um grupo francês como responsável pela deficiência de FH em dois irmãos (Dragon-Durey et al.,

2007). Com a análise do sequenciamento do cDNA de fibroblastos da família, confirmamos o padrão de herança desta mutação como sendo autossômico recessivo.

Assim, especulamos inicialmente se a Arg¹²⁷ seria importante para a região SCR2 do FH alinhando as sequências de aminoácidos desta proteína encontrada em várias espécies. Observamos que a Arg¹²⁷ pode potencialmente desempenhar um importante papel para o FH, uma vez que é bem conservada nesta proteína em diversos animais (**Quadro 4**). Além disso, resíduos de Arg são frequentemente localizados nas proximidades de pelo menos 1 das 4 Cys que formam os domínios SCRs desta proteína.

Quadro 4 - Alinhamento do domínio SCR2 da proteína FH entre diversas espécies. Abaixo de cada nome das espécies está indicada a referência empregada (www.ncbi.nlm.nih.gov). Em vermelho Arg¹²⁷.

Espécie	Fração FH domínio SCR2
Homo sapiens NP_000177.2	TPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVT
Pan troglodytes XP_001136109	TPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVT
Macaca mulatta XP_001111875.1	TPFG F+L GGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPV
Bos taurus NP_001029108	TPFG+F L G FEYG K VYTC+EGYQ++GE+N+RECDT+GWTNDIPICEVVKCLPVT
Rattus norvegicus NP_569093	TPFG+F L G+ FE+G K VYTC+ EGY LLG I+YRECD DGWTNDIPICEVVKCLPVT
Canis familiaris XP_857565.1	FG+F L GN FEYG K VYTCNEGYQL+G IN+ REC+ DGWTNDIPICEVVKCLPVT
Sus scrofa NP_999446.1	T FG+F L G FEYG K YTC+EGYQ+LGE IN+ RECDT+GWTN+IP+CEVVKCLPVT
Mus musculus NP_034018.2	TPFG+F L G+ FE+G K VYTC++GYQLLGEI+YRECD GW NDIP+CEVVKCLPVT
Gallus gallus XP_426613.1	FG+F LT GN F +G + Y CN+GY++L +NYREC +GW+NDIP CEV KCLPV
Oncorhynchus mykiss XP_001511661	T G+++ GN F +G YTCN+GYQ++ ++ R C GW+ N+PICEVV C+P
Paralabrax nebulifer AAA92556	F F L GN F +G K VYTC +GYQ++ INYR C +GW +P+CE +C
Xenopus tropicalis NP_989218.1	P G I F L GN F IGV Y I C I GYQ I I I I R C I G W I N I P C E I C P V
Xenopus laevis NP_001079684	P G I F L G F I G Y C I GYQ I L I I I R C I G W I N I P C E V C P V
Danio rerio XP_686771	F L G F +G VYTC +GY++ IN R C + GW N I P C E V V C

Fonte: Falcão et al., 2008.

A partir dos resultados anteriores (Falcão et al., 2008), decidimos aprofundar nossos estudos avaliando a taxa de secreção do FH pelas células do paciente, de sua mãe e de um indivíduo normal, por *Western blotting*. Por meio destes resultados constatamos um retardo na secreção de FH nas amostras de fibroblastos do paciente, compatível com níveis reduzidos de FH no soro do paciente. Mais ainda, ao observarmos a mãe heterozigota para mutação, notamos uma redução no nível de secreção de FH, o que corrobora com os resultados descritos nos ensaios de atividade hemolítica pela via

alternativa, *Western blotting* e ELISA do soro da mãe da paciente, onde a mesma possui baixa concentração de FH (140,5 $\mu\text{g/mL}$), quando comparada a um indivíduo normal (225-1636 $\mu\text{g/mL}$) (Ferreira de Paula et al., 2003; Falcão et al., 2008). Desta forma, estes resultados reforçam ainda mais a importância da mutação para a produção desta proteína, visto que a mãe apresentou alterações nas proteínas do sistema complemento, mostrando um perfil intermediário (heterozigoto) entre o indivíduo normal e o paciente.

Após confirmação do retardo na secreção de FH pelos fibroblastos do paciente, utilizamos a técnica de microscopia confocal para localizar o possível compartimento onde o FH mutante pudesse ficar retido. Para isto empregamos anticorpo anti- β -COPI (que marca RE, CG e vesículas de origem desses compartimentos) e anticorpo α -manosidase (que marca apenas CG). A análise da microscopia confocal demonstrou uma co-localização com β -COPI e uma discreta co-localização da α -manosidase com a proteína FH mutante. Este resultado sugere duas hipóteses: 1- é possível que a co-localização observada no CG seja causada pelo acúmulo de proteínas no RE que acabam escapando do sistema de qualidade do RE e são transportadas até uma região conhecida como compartimento intermediário do RE-Golgi (ERGIC). Contudo as proteínas mal-formadas não conseguem ser liberadas dentro do CG e acabam retornando para o RE, onde serão dobradas novamente ou degradadas (Amodio et al., 2009); 2- parte da co-localização poderia ser explicada pela presença de proteínas que atingiriam um estágio de dobramento que permitiria que fossem secretadas.

Para abordar melhor estas questões, investigamos se haveria co-localização entre FH e proteínas de regiões específicas do CG. No entanto, não observamos uma co-localização relevante nas regiões trans ou cis do Golgi das células do paciente e nem nas do indivíduo normal, provavelmente em consequência do baixo nível de produção desta proteína normalmente expressada por fibroblastos. Mesmo assim, esta organela é usada para a secreção de proteínas e, como observamos pelo *Western blotting* da **Figura 1**, o paciente é capaz de secretar apenas pequenas quantidade de FH, justificando a baixa marcação neste compartimento. Estes resultados sugerem que a maior parte da co-localização encontrada entre FH mutante e α -manosidase representa proteínas que foram transportadas até a ERGIC e retornaram ao RE, o restante seria formado por proteínas que conseguiram ser secretadas. Além disso, como não observamos sobreposição que confirmasse a retenção de FH no CG e como a maioria da marcação

para FH está localizada em outra organela distribuída no citoplasma, o CG foi excluído como principal compartimento de retenção da proteína mutante.

Desta forma, o RE foi sugerido como local mais provável da retenção da proteína mutante e, após observar co-localização entre FH e calnexina, confirmamos como sendo o compartimento onde a proteína está retida. Isto corrobora com resultados da literatura, que descrevem o reconhecimento de proteínas mal-formadas pelo RE que acabam sendo retidas no local até atingir um determinado estágio de dobramento ou serem finalmente degradadas (Filippo et al., 2006; Datta et al., 2009).

Assim, fomos confirmar se a mutação Arg¹²⁷His na molécula de FH seria realmente responsável pelo perfil de retenção da proteína FH mutante encontrada no paciente e não um defeito intrínseco em outro componente celular. Para isto, transfectamos fibroblastos Cos-7 com plasmídeos pIC-Neo contendo a sequência selvagem ou mutada codificadora da proteína íntegra FH. Pela análise por *Western blotting* dos lisados de fibroblastos Cos-7 transfectados com o plasmídeo mutante mostramos acúmulo gradual da proteína FH no decorrer dos tempos selecionados. Esta retenção protéica foi semelhante àquela apresentada pelos fibroblastos do paciente. Contudo, a proteína foi capaz de ser secretada, como observamos no sobrenadante das culturas. A partir deste resultado, podemos afirmar que a mutação Arg¹²⁷His em FH é responsável por retardar a secreção desta proteína nas células do paciente.

Além disso, a análise por microscopia confocal de fibroblastos Cos-7 transfectados com plasmídeo mutante e selvagem mostrou que as células que receberam o plasmídeo pIC-Neo-FH mutante apresentaram maior intensidade de marcação, quando comparadas com as células que receberam o plasmídeo pIC-Neo-FH normal. Em paralelo, as células que foram transfectadas com o plasmídeo mutante mostraram sobreposição característica de co-localização para a dupla marcação entre FH e β -COPI e FH e calnexina. Este tipo de marcação foi evidenciado nos fibroblastos do paciente, reforçando a importância da Arg¹²⁷ para a secreção da proteína. Entretanto, a dupla marcação entre FH e Golgina97 em Cos-7 transfectadas com pIC-Neo-FH mutante mostrou sobreposição de marcação que não foi observada nos fibroblastos de indivíduo normal e paciente. Esta marcação pode ser explicada pelo fato deste compartimento ser usado na via de secreção da proteína e pelas células transfectadas produzirem mais FH que os fibroblastos de indivíduo normal e paciente.

Relatos de estudos com pacientes portadores de deficiência de FH são raros, porém a associação da deficiência no soro com retenção da proteína no RE não é nova. Em 1997, Ault e colaboradores descreveram um paciente deficiente de FH que desenvolveu glomerulonefrite membranoproliferativa. No decorrer do estudo, foi observado que o paciente era capaz de sintetizar a proteína FH, porém esta se encontrava retida no retículo endoplasmático. Ao sequenciar o cDNA de células do paciente e de seus pais, os autores verificaram que o paciente possuía duas mutações de troca simples de nucleotídeos gerando a troca dos aminoácidos Cys⁵¹⁸Arg e Cys⁹¹⁴Tyr. Estes aminoácidos são importantes para formação do domínio “sushi” característico de FH (Ault et al., 1997).

Dois anos depois, em 1999, Schmidt e colaboradores mostraram que apenas uma mutação nos aminoácidos Cys⁵¹⁸, Cys⁵⁴⁶ ou Cys⁹¹⁴ era necessária para provocar retenção de FH no retículo endoplasmático em células Cos-1 e HepG2 e sua ausência no sobrenadante das culturas transfectadas. Estas cisteínas seriam responsáveis pela formação de pontes dissulfeto que fazem parte da conformação estrutural da proteína. Com a quebra destas pontes dissulfeto, a proteína formada teria uma conformação anormal que seria reconhecida pelo maquinário de controle de qualidade do RE. Desta forma, a proteína seria retida neste compartimento até atingir a conformação nativa ou ser degradada (Schmidt et al., 1999; Lavoie et al., 2008).

Ciente destes dados na literatura, fomos buscar novas informações sobre a retenção de FH e as deficiências do sistema complemento. Assim, observamos que vários trabalhos relatam que proteínas retidas no RE podem causar alteração em suas cisternas dependendo da quantidade de proteínas produzidas (Tanaka et al., 2005; Truettner et al., 2009; Uemura et al., 2009). Com base nestes trabalhos, estimulamos por 48 h a produção de FH nas culturas de fibroblastos do paciente deficiente e notamos alterações no RE por microscopia eletrônica, sugerindo um acúmulo anormal de proteínas, um evento característico de retenção. Desta forma, a microscopia eletrônica junto com a marcação de calnexina endossaram a hipótese que o RE é o local onde a proteína FH Arg¹²⁷His está retida.

Como já mencionado nos resultados, a marcação de FH em algumas lâminas de microscopia confocal sugeriram a formação de polímeros desta proteína nos fibroblastos semelhantes a filamentos. Desta forma, fomos estudar se haveria algum tipo de interação entre FH e filamentos do citoesqueleto ou se a retenção protéica seria capaz

de alterar microtúbulos de β -tubulina. Contudo, não foi possível verificarmos nenhuma alteração nestes filamentos ou interações entre FH e β -tubulina.

É sabido que as células com estresse de RE induzido por tunicamicina clivam RNAm de CD59 via IRE1 α (Oikawa et al., 2007). Em paralelo, o estresse de RE induz um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem atuar sobre a membrana das células diminuindo a expressão de reguladores do sistema complemento, como: CD59 e DAF (Thurman et al., 2009; Reijonen et al., 2010). Contudo, a expressão dos reguladores CD59, DAF e MCP não foi afetada pela produção prolongada de FH na células do paciente ou em fibroblastos normais sobre indução de estresse do RE. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao estresse causado pela retenção de FH não ser capaz de liberar quantidades de ROS suficientes para atuar sobre a membrana da célula. Além disso, embora o tratamento com agentes indutores de estresse do RE possa diminuir a transcrição do RNAm de CD59, a quantidade de RNAm é suficiente para manter os níveis de expressão de CD59 na membrana dos fibroblastos.

Embora a mutação possa causar a retenção da proteína, não sabemos se ela seria suficiente para alterar a capacidade do FH regular o SC. Para responder essa questão, purificamos FH das culturas de fibroblastos de paciente e indivíduo normal e analisamos se a molécula teria sua atividade de co-fator afetada em ensaio de clivagem de C3b. Como mencionado, a capacidade de regulação de FH não foi alterada pela mutação.

Já que a proteína é funcional e que as células conseguem secretar parte do FH produzido, induzimos a secreção de FH aumentando a expressão de proteína responsáveis pelo dobramento protéico. Para isto, tratamos as células com baixas doses de tapsigargina para aumentar a expressão de BiPs e facilitar o dobramento da proteína FH mutante (Sobolewski et al., 2008). A administração de doses relativamente baixas de tapsigargina foi suficiente para induzir secreção de FH, quando comparada com as células estimuladas com IFN- γ . Desta forma, verificamos que é possível induzir a secreção da proteína com drogas mais específicas para o enovelamento protéico.

Assim, fomos tratar os fibroblastos com chaperonas químicas como curcumina e PBA (Filippo et al., 2006; Datta et al., 2007; Sobolewski et al., 2008; Datta et al., 2009). Após o tratamento, observamos que ambas as drogas conseguem induzir a secreção da proteína e mantêm seus efeitos durante 6 h. Decorrido este período, nova dose do fármaco deve ser administrada para um melhor desempenho do tratamento. É necessário também levar em consideração que estas drogas têm efeito dependendo do

tipo de alteração que a mutação causou (Filippo et al., 2006). No caso de mutações *frameshift*, mutações em aminoácidos especiais (cisteína, triptofano e prolina) ou em aminoácidos com importantes funções estruturais, estas drogas podem ter seu efeito anulado ou diminuído (Filippo et al., 2006). Desta forma, estes fármacos podem induzir a secreção de FH no paciente Arg¹²⁷His e poderiam também funcionar nos pacientes franceses Arg¹²⁷Leu, contudo pacientes deficientes de FH com mutações em aminoácidos distintos devem ser avaliados antes de utilizar este tratamento.

Embora ambas as drogas sejam capazes de aumentar os níveis extracelulares de FH *in vitro*, a curcumina mostrou-se ser mais eficaz. Assim sendo, ela seria a melhor escolha no tratamento do paciente levando em consideração que é um composto encontrado em alimentos, por já ser usado como suplemento alimentar em alguns países e pelo avanço nas pesquisas com este fármaco (Chainani-Wu et al., 2007; Dhillon et al., 2008; Gota et al., 2010; Shing et al., 2011). Em paralelo, a dose não tóxica de curcuminóides encontrada em seres humanos (12 g/dia) é muito superior a dose utilizada em tratamentos via oral (2-8 g/dia) (Lao et al., 2006; Dhillon et al., 2008; Gota et al., 2010). Contudo, efeitos colaterais como dor de cabeça, dores estomacais, erupções cutâneas e diarreia dependem da sensibilidade do paciente ao fármaco, podendo ser observados nas doses de tratamento (Lao et al., 2006; Dhillon et al., 2008; Gota et al., 2010). Contudo, caso estes sintomas sejam observados, o tratamento deve ser suspenso imediatamente.

Além disso, foi observado que a curcumina é capaz de diminuir a secreção de citocina pró-inflamatórias como: IL-1 β e IL-6 em mononucleares de sangue periférico de pacientes com doença renal crônica (Shing et al., 2011). É sabido que pacientes com deficiência de FH normalmente desenvolvem glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo II e esta doença renal crônica ocorre devido a ativação descontrolado do sistema complemento, resultando na deposição de C3 na parede do glomérulo (Córdoba et al., 2008; Ricklin et al., 2010). Assim, a curcumina poderia atuar diminuindo a inflamação causada pelos fragmentos protéicos reativos gerados pela ativação da cascata do sistema complemento, reduzindo a lesão tecidual.

Desta forma, o tratamento com curcumina poderia aumentar os níveis de FH no soro e, com isso, regular o sistema complemento do paciente diminuindo os casos de infecções recorrentes, além de atuar retardando a evolução da doença para GNMPH. Assim, o uso da curcumina como tratamento alternativo poderia melhorar sobrevida do

paciente brasileiro (Arg¹²⁷His) e, possivelmente, dos irmãos turcos (Arg¹²⁷Leu) relatados no estudo francês (Dragon-Durey et al., 2004).

6 Conclusões

A Arg¹²⁷ da molécula de FH é essencial para a secreção desta proteína por fibroblastos. A mutação Arg¹²⁷His causa deficiência deste importante regulador da Via Alternativa do sistema complemento e maior susceptibilidade a infecções.

A proteína mutante FH Arg¹²⁷His é retida principalmente no retículo endoplasmático.

A retenção da proteína mutante Arg¹²⁷His provoca alterações morfológicas de cisternas do retículo endoplasmático, contudo não é capaz de alterar a expressão de CD59, DAF e MCP nem a formação do citoesqueleto.

O estresse do RE não interfere significativamente na expressão dos reguladores de membrana CD59, DAF e MCP.

Embora a Arg¹²⁷ seja importante para a secreção de FH, a mutação não afetou a atividade da proteína.

A curcumina e o PBA são capazes de aumentar *in vitro* a secreção FH com efeito máximo de duração de até 6 h.

Referências*

Amodio G, Renna M, Paladino S, Venturi C, Tacchetti C, Moltedo O, Franceschelli S, Mallardo M, Bonatti S, Remondelli P. Endoplasmic reticulum stress reduces the export from the ER and alters the architecture of post-ER compartments. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(12):2511-21.

Ault BH, Schmidt BZ, Fowler NL, Kashtan CE, Ahmed AE, Vogt BA, Colten HR. Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism. *J Biol Chem.* 1997;272(40):25168-75.

Basiglio CL, Arriaga SM, Pelusa F, Almará AM, Kapitulnik J, Mottino AD. Complement activation and disease: protective effects of hyperbilirubinaemia. *Clin Sci (Lond).* 2009;118(2):99-113.

Beinrohr L, Dobo J, Závodszky P, Gal P. C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med.* 2008;14(12):511-21.

Benz K, Amann K. Pathological aspects of membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) and haemolytic uraemic syndrome (HUS) / thrombocytic thrombopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost.* 2009;101(2):265-70.

Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol.* 2009;46(14):2774-83.

Castro J, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarrés M. The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2008;7(5):345-51.

Chainani-Wu N, Silverman Jr S, Reingold A, Bostrom A, Culloch CM, Lozada-Nur F, Weintraub J. A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of curcuminoids in oral lichen planus. *Phytomedicine.* 2007;14:437-46.

Córdoba SR, Jorge EG. Translational mini-review series on complement Factor H: genetics and disease associations of human complement Factor H. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):1-13.

Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(3):187-93.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: example references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Daha MR. Pathogenic role of auto-antibodies against complement components in systemic lupus. *Lupus*. 2008;17:385–8.

Datta R, Waheed A, Shah GN, Sly WS. Signal sequence mutation in autosomal dominant form of hypoparathyroidism induces apoptosis that is corrected by a chemical chaperone. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(50):19989-94.

Datta R, Waheed A, Bonapace G, Shah GN, Sly WS. Pathogenesis of retinitis pigmentosa associated with apoptosis-inducing mutations in carbonic anhydrase IV. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(9):3437-42.

Dickhout JG, Krepsinsky J. Endoplasmic reticulum stress and renal disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2341-52.

Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL, Ng CS, Badmaev V, Kurzrock R. Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Câncer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4491-99.

Dragon-Durey MA, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C, Blouin J, Niaudet P, Deschenes G. Heterozygous and homozygous Factor H deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:787-9.

Dragon-Durey MA, Frémeaux-Bacchi V. Atypical haemolytic uraemic syndrome and mutations in complement regulator genes. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;27(3):359-74.

Edey MM, Mead PA, Saunders RE, Strain L, Perkins SJ, Goodship TH, Kanagasundaram NS. Association of a factor H mutation with hemolytic uremic syndrome following a diarrheal illness. *Am J Kidney Dis*. 2008;51(3):487-90.

Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA, Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):421-4.

Endo Y, Matsushita M, Fujita T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(5):705-12.

Estaller C, Koistinen V, Schwaebler W, Dierich MP, Weiss EH. Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule. *J Immunol*. 1991;146(9):3190-6.

Falcão DA, Reis ES, Paixão-Cavalcante D, Amano MT, Delcolli MI, Florido MP, Albuquerque JA, Moraes-Vasconcelos D, Duarte AJ, Grumach AS, Isaac L. Deficiency of the human complement regulatory protein Factor H associated with low levels of component C9. *Scand J Immunol.* 2008;68(4):445-55.

Ferreira de Paula P, Barbosa JE, Roxo Jr P, Ferriani VPL, Latorre MRD, Nudelman V, Isaac L. Ontogeny of complement regulatory proteins concentrations of Factor H, Factor I, C4b-binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages and in adults. *Scand J Immunol.* 2003;58:572-577.

Filippo CA, Pasquali M, Longo N. Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Hum Mutant.* 2006;27(6):513-23.

Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(6):1461-6.

Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmenn RE, Oechslin R. Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz Med Wochenschr.* 1955;85(38-39):905-9.

Gota VS, Maru GB, Soni TG, Gandhi TR, Kochar N, Agarwal MG. Safety and Pharmacokinetics of a Solid Lipid Curcumin Particle Formulation in Osteosarcoma Patients and Healthy Volunteers. *J Agric Food Chem.* 2010;58:2095-99.

Gros P, Milder FJ, Janssen BJ. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):48-58.

Gu J, Pauer GJ, Yue X, Narendra U, Sturgill GM, Bena J, Gu X, Peachey NS, Salomon RG, Hagstrom SA, Crabb JW. Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with proteomic and genomic biomarkers. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(6):1338-49.

Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007;87:1377-408.

Hebecker M, Okemefuna AI, Perkins SJ, Mihlan M, Huber-Lang M, Józsi M. Molecular basis of C-reactive protein binding and modulation of complement activation by factor H-related protein 4. *Mol Immunol.* 2010;47(6):1347-55.

Hellwege J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* 1999;462(3):345-52.

Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature.* 2009;458(7237):453-60.

Hocking HG, Herbert AP, Kavanagh D, Soares DC, Ferreira VP, Pangburn MK, Uhrín D, Barlow PN. Structure of the N-terminal region of complement Factor H and conformational implications of disease-linked sequence variations. *J Biol Chem.* 2008;283(14):9475-87.

Józsi M, Oppermann M, Lambris JD, Zipfel PF. The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol Immunol.* 2007;44(10):2697-706.

Józsi M, Zipfel PF. Factor H family proteins and human diseases. *Trends in Immunology.* 2008;28(9):380-7.

Kavanagh D, Richards A, Atkinson J. Complement regulatory genes and hemolytic uremic syndromes. *Annu Rev Med.* 2008;59:293-309.

Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin: Emerging Roles of a Pattern-Recognition Molecule. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28:131-55.

Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol.* 2006;118(2-3):127-36.

Köhl J. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol.* 2006;586:71-94.

Lao CD, Ruffin IV MT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, Boggs ME, Crowell J, Rock CL, Brenner DR. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med.* 2006;6:10.

Lavoie C, Paiement J. Topology of molecular machines of the endoplasmatic reticulum: a compilation of proteomics and cytological. *Histochem Cell Biol.* 2008;129:117-28.

Leshner AM, Song WC. Review: Complement and its regulatory proteins in kidney diseases. *Nephrology.* 2010;15:663-75.

Licht C, Heinen S, Józsi M, Löschmann I, Saunders RE, Perkins SJ, Waldherr R, Skerka C, Kirschfink M, Hoppe B, Zipfel, PF. Deletion of Lys²²⁴ in regulatory domain 4 of Factor H reveals a novel pathomechanism for dense deposit disease (MPGN II). *Kidney International.* 2006;70:42-50.

Licht C, Schlötzer-Schrehardt U, Kirschfink M, Zipfel PF, Hoppe B. MPGN II – genetically determined by defective complement regulation? *Pediatr Nephrol.* 2007;22:2-9.

Losse J, Zipfel PF, Józsi M. Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity. *J Immunol.* 2010;184(2):912-21.

- Macor P, Tedesco F. Complement as effector system in cancer immunotherapy. *Immunol Lett.* 2007;111(1):6-13.
- McRae JL, Duthy TG, Griggs KM, Ormsby RJ, Cowan PJ, Cromer BA, McKinsty WJ, Parker MW, Murphy BF, Gordon DL. Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J Immunol.* 2005;174(10):6250-6.
- Nakatsukasa K, Brodsky JL. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic.* 2008;9(6):861-70.
- Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):148-55.
- Oikawa D, Tokuda M, Iwawaki T. Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360(1):122-7.
- Pallet N, Fougeray S, Beaune P, Legendre C, Thervet E, Anglicheau D. Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation.* 2009;88(5):605-13.
- Pichette V, Quérin S, Schürch W, Brun G, Lehner-Netsch G, Delâge JM. Familial hemolytic-uremic syndrome and homozygous factor H deficiency. *Am J Kidney Dis.* 1994;24(6):936-41.
- Potlukova E, Kralikova P. Complement component c1q and anti-c1q antibodies in theory and in clinical practice. *Scand J Immunol.* 2008;67(5):423-30.
- Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* 2009;14(8):996-1007.
- Reijonen S, Kukkonen JP, Hyrskyluoto A, Kivinen J, Kairisalo M, Takei N, Lindholm D, Korhonen L. Downregulation of NF-kappaB signaling by mutant huntingtin proteins induces oxidative stress and cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:1929-41.
- Reis ES, Baracho GV, Lima AS, Farah CS, Isaac L. Homozygous hereditary C3 deficiency due to a premature stop codon. *J Clin Immunol.* 2002;22(6):321-30.
- Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res.* 2006;55(5):179-84.
- Reis ES, Barbuto JAM, Köhl J, Isaac L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. *Mol Immunol.* 2008;45(7):1952-62.

Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2007;25(11):1265-75.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11(9):785-97.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):776-87.

Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev.* 2007;219:157-66.

Runza VL, Schwaeble W, Männel DN. Ficolins: novel pattern recognition molecules of the innate immune response. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):297-306.

Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: Roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(10):2409-27.

Saunders RE, Goodship TH, Zipfel PF, Perkins SJ. An interactive web database of Factor H-associated hemolytic uremic syndrome mutations: insights into the structural consequences of disease-associated mutations. *Hum Mutant.* 2006;27(1):21-30.

Schejbel L, Schmidt IM, Kirchhoff M, Andersen CB, Marquart HV, Zipfel P, Garred P. Complement factor H deficiency and endocapillary glomerulonephritis due to paternal isodisomy and a novel factor H mutation. *Genes and Immunity.* 2011;12:90-9.

Schwaehle W, Zwirner J, Schulz TF, Linke RP, Dierich MP, Weiss EH. Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. *Eur J Immunol.* 1987;17:1485-9.

Schmidt BZ, Fowler NL, Hidvegi T, Perlmutter DZ, Colten HR. Disruption of disulfide bonds is responsible for impaired secretion in human complement factor H deficiency. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11782-8.

Schmidt CQ, Herbert AP, Hocking HG, Uhrín D, Barlow PN. Translational mini-review series on complement Factor H: structural and functional correlations for Factor H. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):14-24.

Schneider MC, Exley RM, Ram S, Sim RB, Tang CM. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol.* 2007;15(5):233-40.

Scholl HP, Charbel IP, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche LG, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BH, Oppermann M. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2008;3(7):2593.

Shing CM, Adams MJ, Fassett RG, Coombes JS. Nutritional compounds influence tissue factor expression and inflammation of chronic kidney disease patients in vitro. *Nutrition*. 2011;1–6.

Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol*. 2009 30(2):83-90.

Skerka C, Licht C, Mengel M, Uzonyi B, Strobel S, Zipfel PF, Józsi M. Autoimmune forms of thrombotic microangiopathy and membranoproliferative glomerulonephritis: Indications for a disease spectrum and common pathogenic principles. *Mol Immunol*. 2009;46(14):2801-7.

Sobolewski A, Rudarakanchana N, Upton PD, Yang J, Crilley TK, Trembath RC, Morrell NW. Failure of bone morphogenetic protein receptor trafficking in pulmonary arterial hypertension: potential for rescue. *Human Molecular Genetics*. 2008;17(20):3180–90.

Tanaka Y, Ueda K, Ozawa T, Kitajima I, Okamura S, Morita M, Yokota S, Imanaka T. Mutation study of antithrombin: the roles of disulfide bonds in intracellular accumulation and formation of russell body-like structures. *J Biochem*. 2005;137(3):273-85.

Teixeira AG, Silva AS, Lin FL, Velletri R, Bavia L, Belfort R Jr, Isaac L. Association of complement factor H Y⁴⁰²H polymorphism and age-related macular degeneration in Brazilian patients. *Acta Ophthalmol*. 2010;(5):165-9.

Thompson RA, Winterborn MH. Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol*. 1981;46(1):110-9.

Thurman JM, Renner B, Kunchithapautham K, Ferreira VP, Pangburn MK, Ablonczy Z, Tomlinson S, Holers VM, Rohrer B. Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury. *J Biol Chem*. 2009;284(25):16939-47.

Truettner JS, Hu K, Liu CL, Dietrich WD, Hu B. Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats. *Brain Res*. 2009;1249:9-18.

Uemura T, Sato T, Aoki T, Yamamoto A, Okada T, Hirai R, Harada R, Mori K, Tagaya M, Harada A. p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival. *Mol Cell Biol*. 2009;29(7):1869-81.

Ward PA. The Harmful Role of C5a on Innate Immunity in Sepsis. *J Innate Immun*. 2010;2:439–45.

Welch TR, Blystone LW. Renal disease associated with inherited disorders of the complement system. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(8):1439-44.

Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmatic reticulum associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(12):944-57.

Vyse TJ, Morley BJ, Bartok I, Theodoridis EL, Davies KA, Webster AD, Walport MJ. The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J Clin Invest*. 1996;97(4):925-33.

Zipfel PF, Skerka C. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today*. 1994;15(3):121-6.

Zipfel PF, Mihlan M, Skerka C. The alternative pathway of complement: a pattern recognition system. *Adv Exp Med Biol*. 2007;598:80-92.

Zipfel PF, Smith RJ, Skerka C. Factor I and Factor H deficiency in renal diseases: similar defects in the fluid phase have a different outcome at the surface of the glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(2):385-7.