ALEX YURI SIMÕES SATO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO
GENE *ID1* EM CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

ALEX YURI SIMÕES SATO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO
GENE *ID1* EM CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holthausen Campos

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Simões Sato, Alex Yuri.

Identificação e caracterização das interações do gene ID1 em células mesangiais humanas / Alex Yuri Simões Sato. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Alexandre Holthausen Campos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Biologia renal.

Versão do título para o inglês: Identification and characterization of ID1 gene interactions in human mesangial cells.

Descritores: 1. Fisiologia renal 2. Nefropatias 3. Biologia molecular 4. Células cultivadas 5. Regulação gênica 6. Sobrevivência celular
I. Campos, Alexandre Holthausen II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia humana III. Título.

ICB/SBIB0193/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alex Yuri Simões Sato.

Título da Tese: identificação e caracterização das interações do gene ID1 em células mesangiais humanas.

Orientador(a): Alexandre Holthausen Campos.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 201/07, referente ao projeto intitulado *Identificação e caracterização das interação de gene e proteína ID1 em células mesangiais humanas* sob a responsabilidade de **Alex Yuri Simões Sato**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2007.

PROF. DR. CARLOS PELLISCH TABORDA
Vice-Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 6.3.07
REL N° 776

Esta tese é dedicada aos meus pais e
à memória de minha avó Maria
Marques da Silva

AGRADECIMENTOS

À Deus e à minha família, principalmente aos meus pais Nézia e Carlos, pelo apoio incondicional, amor e pela formação e base sólida que me deram, possibilitando que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Holthausen Campos, médico e pesquisador excepcional. Sua competência e caráter são exemplos a serem seguidos, tanto no âmbito profissional como pessoal. Muito obrigado pela oportunidade e pela honra de ter sido seu aluno.

Aos laboratórios dos Professores Dr. Carlos Cassola, Dra. Nancy Amaral Rebouças e Dra. Maria Oliveira de Souza pela ajuda dispensada com o uso de equipamentos e espaço físico enquanto nosso laboratório encontrava-se alocado no ICB-USP.

À todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-I, principalmente a Secretaria de Pós-Graduação em nome do José Maria.

Ao Professor Dr. Júlio César Monte pela ajuda nas análises iniciais de Bioinformática.

Aos meus amigos de laboratório Lislaine, Paula Lopes, Paula Poço, Rodrigo, Thiago e Daniele pela convivência e amizade. Faço um agradecimento especial à Eliane Antonioli pela grande colaboração prestada neste trabalho.

À todos os integrantes do laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.

À todos os integrantes do laboratório de Biologia Celular da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP.

À FAPESP pelo apoio e financiamento, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

À Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein, pela infraestrutura e financiamento.

“ A mente que se abre a uma idéia nova jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Simões Sato AY. Identificação e caracterização das interações do gene *ID1* em células mesangiais humanas. [tese (Doutorado em Fisiologia e Biofísica)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

As células mesangiais (CM) apresentam papel essencial na fisiologia glomerular normal, e alterações em seu fenótipo levam ao desenvolvimento de glomerulopatias, como a nefropatia diabética e glomerulosclerose. A fase tardia da glomerulopatia diabética é caracterizada por fibrose e morte por apoptose das CM. Portanto, a identificação de novos elementos envolvidos nas modificações patológicas das CM facilitaria a compreensão da fisiopatologia das doenças glomerulares. A família de genes *ID* está implicada em processos celulares distintos, como proliferação, diferenciação e apoptose. O presente estudo tem por finalidade investigar as interações do gene *ID1*, com o DNA e/ou proteínas, em CM humanas imortalizadas. Experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e imunoprecipitação demonstraram que *Id1* interage de maneira altamente específica com o fator de transcrição USF2, inibindo a atividade transcricional deste. Adicionalmente, análise de bioinformática desvendou sítios de ligação de USF2 na região promotora dos genes *THBS1*, *PAI1* e *BAX*. TGF β -1 e a superexpressão de USF2 estimulam a expressão de *THBS1* e *BAX*, genes pró-fibrótico e pró-apoptótico respectivamente. Além disso, observamos que TGF β -1 e USF2 induzem enquanto que BMP-7 e *ID1* previnem a apoptose em CM. Neste estudo demonstramos que *Id1* apresenta um mecanismo de ação particular em CM e antagoniza a morte celular induzida por TGF β -1. Em suma, nossos dados apontam para uma nova via molecular envolvida na patogênese das doenças renais crônicas.

Palavras-chave: Células mesangiais. *ID1*. Nefropatia diabética. Fibrose. Apoptose. Expressão gênica.

ABSTRACT

Simões Sato AY. Identification and characterization of ID1 gene interactions in human mesangial cells [Ph. D. thesis (Physiology and Biophysics)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Mesangial cells (MC) play an essential role in normal function of the glomerulus, and MC phenotypic changes lead to the development of glomerular diseases, such as diabetic nephropathy. The late phase of diabetic glomerulopathy is characterized by fibrosis and death of MC. Thus, the identification of novel elements involved in these alterations would facilitate the comprehension of the pathophysiology of glomerular diseases. The *ID* (Inhibitors of DNA binding) family of genes has been implicated in diverse cellular processes, such as proliferation, differentiation, and apoptosis. In the present study we investigate the *ID1* gene interactions, with DNA and/or proteins, in immortalized human MC (hMC). By chromatin immunoprecipitation (ChIP) and (co)immunoprecipitation assays we showed that Id1 interacts with the transcription factor USF2, inhibiting its activity. Bioinformatics analysis disclosed USF2 binding sites in the promoter region of *PAI1*; *THBS1* (pro-fibrotic) and *BAX* (pro-apoptotic) genes. In fact, TGF β -1 and USF2 stimulated *THBS1* and *BAX* expression. In addition, TGF β -1 and USF2 overexpression increased whereas BMP-7 and Id1 decreased apoptosis rates in hMC. In this study we demonstrated that Id1 binds specifically to USF2 and antagonizes TGF β -1-induced death by inhibiting USF2 activity in human MC. In conclusion, our results point to a novel molecular path involved in the pathogenesis of glomerular diseases.

Key words: Mesangial cells. ID1. Diabetic nephropathy. Fibrosis. Apoptosis. Gene expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Os rins	15
1.2 Doenças renais: as glomerulopatias	16
1.2.1 A nefropatia diabética (ND).....	17
1.3 As células mesangiais (CM).....	19
1.4 A sinalização do TGF-beta (TGFβ) e sua implicação na ND	21
1.4.1 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	24
1.5 bHLHs	28
1.5.1 Os genes <i>ID</i> s	29
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Cultura celular.....	35
3.2 Tratamento das hCMI com BMP-4, BMP-7 e ou TGF-β1	35
3.3 Imunoprecipitação da cromatina (ChIP).....	35
3.4 Amplificação dos produtos da ChIP por LM-PCR	38
3.5 Clonagem e transformação de <i>E.coli</i>	39
3.6 Sequenciamento dos clones positivos	40
3.7 Análise de bioinformática	40
3.8 Imunoprecipitação (IP)	42
3.9 Western-Blot	42
3.10 Plasmídeos USFs e BAX	43
3.11 Transfecção transitória	43
3.12 Produção de adenovírus para superexpressão de <i>ID1</i>	44
3.13 Infecção das células hCMi para superexpressão de <i>ID1</i>	45
3.14 Ensaio de gene repórter	45
3.15 Desenho de primers	46
3.16 Eletroporação de hCMi	46
3.17 Isolamento de RNA total.....	47

3.18 PCR quantitativo (qRT-PCR)	47
3.19 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS	49
4.1 <i>Id1</i> interage com o fator de transcrição <i>USF2</i>	50
4.2 <i>BMP</i> inibe a atividade de <i>USF2</i> através da superexpressão de <i>Id1</i>	55
4.3 <i>TGFβ-1</i> aumenta a expressão de <i>USF2</i> em <i>hCMI</i>	57
4.4 <i>TGFβ-1</i> aumenta a expressão de <i>PAI1</i> e <i>THBS1</i>	59
4.5 <i>USF2</i> suprarregula a expressão de <i>THBS1</i>	60
4.6 <i>TGFβ</i> induz apoptose em células mesangiais.....	63
4.7 <i>BMP-7</i> e <i>Id1</i> protegem as células mesangiais da apoptose.....	64
4.8 <i>TGFβ-1</i> e <i>USF2</i> estimulam a expressão do gene <i>BAX</i> em <i>hCMI</i>	66
4.9 A superexpressão de <i>USF2</i> estimula a atividade de <i>BAX</i> em <i>hCMI</i>	70
4.10 A superexpressão de <i>USF2</i> induz apoptose em <i>hCMI</i>	71
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	84
ANEXO-Manuscrito submetido	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os rins

Os rins são os principais órgãos excretores dos vertebrados; localizam-se na região retroperitoneal, um de cada lado, medindo em humanos aproximadamente 11 cm de comprimento, 5 cm de largura e 3 cm de espessura. Os rins têm como funções eliminar substâncias tóxicas oriundas do metabolismo, manter a concentração de eletrólitos corporais, regular com precisão o equilíbrio ácido-base, a osmolaridade e o volume de líquido corporal, além de atuar como órgãos endócrinos, produzindo e secretando hormônios como a eritropoietina, renina e prostaglandinas. Morfologicamente podemos dividir o rim em quatro estruturas principais básicas: glomérulos, túbulos, vasos e interstício. Danos nestas estruturas e distúrbios no funcionamento normal dos rins estão diretamente relacionados a altas taxas de morbidade e mortalidade. As doenças renais crônicas perpassam esta divisão anátomo-morfológica acometendo ao longo do tempo todas as estruturas, culminando com a insuficiência renal crônica.

Dentre estas estruturas destacamos o glomérulo, o qual é formado por um tufo capilar constituído por uma estrutura microvascular altamente especializada, responsável pela filtração do plasma para posterior formação da urina. O glomérulo renal maduro contém quatro tipos celulares: células epiteliais parietais, que formam a cápsula de Bowman, células epiteliais viscerais (os podócitos), que circundam a camada mais externa da barreira de filtração glomerular, células endoteliais fenestradas, que se encontram em contato direto com o sangue, e as células mesangiais, situadas entre as alças capilares ^[1]. Em resposta à lesão, motivada por diferentes causas, as células glomerulares podem ser levadas a diferentes processos, incluindo aumento da proliferação, desdiferenciação, hipertrofia, senescência, e morte (apoptose ou necrose) ^[2], fenômenos inerentemente relacionados à patogênese de inúmeras doenças renais.

1.2 Doenças renais: as glomerulopatias

Dentre as moléstias que acometem os rins, as doenças glomerulares são uma das principais causas do aparecimento e desenvolvimento da insuficiência renal crônica. Essas doenças têm sido classificadas clinicamente em dois grandes grupos, conforme apresentação clínico-patológica: síndrome nefrítica e síndrome nefrótica. A síndrome nefrítica é definida pelo aparecimento de edema, hipertensão arterial e hematúria (geralmente macroscópica); já a síndrome nefrótica caracteriza-se por proteinúria, edema, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia. Porém, uma classificação alternativa, preferida pela maioria dos autores, caracteriza estas doenças de acordo com o principal tipo celular lesado. Portanto, orientando-se por esta premissa, as doenças glomerulares podem ser consideradas como consequência do dano primário a três dos quatro tipos celulares existentes no tufo glomerular: células mesangiais, podócitos e células endoteliais ^[2]. Dentre essas, será discutido em mais detalhes em tópico posterior as características, o papel e o envolvimento das células mesangiais na patogênese destas doenças. Além disso, podemos classificar as glomerulopatias separando-as em agudas e crônicas. As glomerulopatias que levam à falência renal aguda estão diretamente relacionadas à infecção, hipotensão e a ação de agentes nefrotóxicos ^[3-6]. Já as glomerulopatias crônicas caracterizam-se principal e primordialmente pelo posterior desenvolvimento de fibrose intersticial, secundária ou não à glomerulopatia primária aguda ou a doenças sistêmicas, impedindo a filtração glomerular normal e levando à falência renal terminal ^[7]. Podemos citar como principais causas da doença renal crônica o diabetes mellitus e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) ^[8, 9].

Com relação a HAS, a falta do monitoramento da hipertensão sabidamente leva a um risco aumentado de morbidade e mortalidade devido a problemas cardiovasculares ^[10], bem como a um declínio da função renal. A hipertensão arterial altera a fisiologia renal por vias de aumento da fração de filtração de sódio, aumento da resistência renovascular, ocorrência de lesões microvasculares, e pela ativação do sistema renina-angiotensina, exacerbando a hipertensão essencial já existente, criando assim um “círculo vicioso”. Dados epidemiológicos sugerem que aproximadamente 90% dos pacientes em estágios severos de doença renal crônica também são hipertensos ^[11]. Ao mesmo tempo, dados da literatura demonstram

claramente uma significativa redução da taxa de progressão da doença renal crônica quando a hipertensão pré-existente é tratada. Diversos estudos vêm demonstrando importantes reduções na progressão da doença renal crônica com o uso de drogas bloqueadoras do sistema renina-angiotensina, comparadas com a mesma redução na pressão arterial atingida por outros anti-hipertensivos.

Ainda não está totalmente esclarecida a fisiopatologia dos efeitos deletérios da hipertensão nos rins de pacientes com doença renal crônica; sabe-se, contudo, que aumento progressivo da resistência vascular intra-renal precede quaisquer das mudanças já descritas na estrutura renal ^[12].

1.2.1 A nefropatia diabética (ND)

Conforme descrito anteriormente, os glomérulos podem ser lesados direta ou indiretamente por fatores inflamatórios e/ou tóxicos, bem como em decorrência de doenças sistêmicas. Dentre estas, podemos citar como uma das principais responsáveis pela maior parte dos casos de insuficiência renal crônica o diabetes mellitus (DM) ^[13,14]. O DM, independentemente de sua etiologia, provoca um conjunto heterogêneo de lesões em diferentes órgãos (incluindo os rins) ao longo dos anos, e isso se deve principalmente às elevadas taxas de glicemia. De fato, a nefropatia diabética (ND) tem sido considerada a principal causa de doença renal crônica em estágios finais no mundo ^[15-22], e embora possa haver alguma variação, todas as modificações na função renal que serão mencionadas aqui se relacionam com ambos os tipos de diabetes (1 e 2) ^[23].

Fisiopatologicamente, a ND é resultado da interação entre fatores metabólicos e hemodinâmicos. As alterações patológicas incluem hipertrofia renal, acúmulo de matriz extracelular (MEC) e morte celular, os quais contribuem para a glomerulosclerose, levando à proteinúria e, como consequência, à falência renal ^[20]. Os mecanismos básicos destas alterações envolvem a produção de citocinas e de fatores de crescimento induzidos pela hiperglicemia, promovendo a infiltração de leucócitos, proliferação celular anormal e a produção de proteínas de matriz. Sabe-se que a hiperglicemia desencadeia uma série de eventos intracelulares nas células tubulares e glomerulares, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio

(ROS), ativação das vias PKC e MAPK, e ativação de fatores de transcrição; atuando através destas diferentes vias, a alta glicose estimula fatores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, bem como a hipertrofia celular ^[18].

Clinicamente, a evidência mais precoce da ND é a detecção de pequenas elevações nas taxas de albumina na urina (microalbuminúria), sendo tais pacientes rotulados nefropatas incipientes. Sem as devidas intervenções, aproximadamente 60-80% dos indivíduos com diabetes apresentando microalbuminúria têm sua taxa de excreção de albumina urinária aumentada em aproximadamente 10-20% ao ano, estendendo-se por um período de 10 a 15 anos. Vários fatores de risco têm sido relacionados ao desenvolvimento da microalbuminúria; incluindo a própria hiperglicemia, hiperlipidemia, obesidade central, hipertensão arterial sistêmica e o tabagismo. Seguindo-se o estabelecimento da nefropatia incipiente, após um período mais tardio, a taxa de filtração glomerular (TFG) gradualmente decai ^[15, 16]. Alterações nas células mesangiais continuam sendo consideradas como o epicentro do dano renal na doença diabética ^[22,24] e responsáveis pelo decaimento da taxa de filtração. Além disso, inúmeros estudos nos últimos anos documentam que a lesão/perda dos podócitos também levam diretamente à proteinúria observada na ND. O dano e morte dos podócitos também influenciam a progressão da glomerulosclerose em pacientes com ND, e consequentemente a redução da TFG ^[20]. Estudos clínicos detectaram a presença de podócitos na urina de 53% dos pacientes diabéticos tipo 2 com microalbuminúria e em 80% com macroalbuminúria, enquanto que na urina de indivíduos controle normais não foram detectadas tais células ^[19, 25, 26].

Análises histológicas evidenciam a expansão e a extensiva deposição de matriz extracelular (MEC) no mesângio como sendo o mais evidente achado da glomerulopatia secundária ao diabetes ^[15,22]; isso leva ao espessamento da membrana basal glomerular (MBG), glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial. Este aumento da síntese e redução da degradação de MEC é mediado por vários fatores, incluindo a angiotensina II, o fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF β); sendo o colágeno (tipos III, IV e VI), fibronectina, laminina e proteoglicanos os principais componentes de matriz alterados ^[17].

Com a expansão de matriz no mesângio, ocorre a constrição dos capilares glomerulares, o que por sua vez provoca a redução da superfície de filtração

disponível e o estreitamento ou mesmo a oclusão do lúmen capilar. Outros estudos recentes mostram que além dos distúrbios metabólicos e hemodinâmicos citados, inflamação também está envolvida na patogênese da ND. Os níveis de uma série de marcadores inflamatórios elevam-se com a progressão da nefropatia nesses pacientes. Como exemplo, já foi demonstrado o aumento da expressão da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e o acúmulo de macrófagos em modelos animais de ND ^[22].

Embora haja um crescente entendimento tanto em nível molecular como celular dos mecanismos que governam as modificações patológicas na doença renal diabética, a sequência cronológica exata dos eventos que levam a estas modificações histológicas e funcionais ainda não está totalmente elucidada. Assim, são necessários estudos adicionais que possam identificar novos agentes envolvidos na patogênese da ND, podendo facilitar o desenvolvimento de novos tratamentos e intervenções mais precoces, reduzindo a prevalência e o impacto desta doença.

1.3 As células mesangiais (CM)

O mesângio representa uma estrutura chave com papel essencial no processo de filtração glomerular. As células mesangiais constituem cerca de 30% da população total das células do glomérulo ^[27], e desempenham funções importantes para o funcionamento normal destes. São responsáveis pelo suporte estrutural para as alças dos capilares glomerulares, pela modulação da hemodinâmica glomerular e superfície de ultrafiltração; além disso, produzem e secretam substâncias vasoativas (AngII), citocinas (IL-2), e proteínas de matriz extracelular ^[28,29].

A origem embrionária e a morfologia das CM são extremamente parecidas com as das células de músculo liso vascular (CMLV) e, de maneira similar, possuem muitas das proteínas constituintes do sistema de contração celular encontrado nessas últimas, principalmente miofilamentos de alfa-actina, conferindo a estas células capacidade de contração e relaxamento. Esta capacidade contrátil, juntamente com a disposição dentro dos glomérulos onde circundam os capilares sanguíneos, permite que as CM participem do controle da hemodinâmica glomerular,

variando a superfície de filtração à medida que se relaxam ou contraem em resposta a agentes vasoativos. Assim, a taxa de filtração glomerular é ajustada de acordo com o balanço entre as ações das substâncias que estimulam a contração das CM, como a angiotensina II e a endotelina, ou o relaxamento, como o peptídeo natriurético atrial e o óxido nítrico [30-32].

Nas últimas duas décadas têm-se verificado que em resposta a determinados estímulos, as células mesangiais alteram seu fenótipo e suas funções, contribuindo para o desenvolvimento de doenças glomerulares, como a glomerulosclerose hipertensiva, nefropatia diabética e glomerulonefrites mesângio-proliferativas [33].

Os principais achados encontrados nas CM nestas condições são o acúmulo de proteínas de matriz extracelular (MEC), aumento de proliferação (inexistente em condições normais), hipertrofia, além de apoptose e/ou necrose [2, 28, 34, 35].

O transporte de glicose nas CM dá-se principalmente pelos transportadores GLUT1. A importância deste transportador foi evidenciada pela sua super-expressão em CM em cultura, a qual gerou uma produção excessiva de proteínas de matriz, mesmo em condições normais de glicemia. Além disso, a produção da proteína de matriz fibronectina em CM induzida pela glicose mostrou-se reduzida com o implemento de um “anti-sense” para GLUT1. O fator de crescimento TGF β também é capaz de aumentar a captação de glicose nas células mesangiais por ativar a transcrição e a tradução de GLUT1 [36].

A resposta das células mesangiais frente à hiperglicemia relaciona-se primariamente à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), iniciando uma complexa série de eventos moleculares que levam ao aumento de fatores como TGF-beta, CTGF e fatores pró-inflamatórios (MCP-1, migração e acúmulo de monócitos/macrófagos); sendo que o papel integral dessas moléculas no estímulo da hiperplasia/hipertrofia mesangial, morte celular e acúmulo de MEC ainda não foi elucidado.

1.4 A sinalização do TGF-beta (TGF β) e sua implicação na ND

Vários fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e agentes vasoativos têm sido implicados na patogênese da nefropatia diabética. Dentre esses fatores o TGF β é possivelmente o mais importante. O TGF β é um membro de uma superfamília de fatores de crescimento que leva o mesmo nome, compreendendo um grande número de proteínas extracelulares solúveis que incluem, além do próprio TGF β , activinas, fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) e as Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Essas citocinas são pleiotrópicas, estando envolvidas em diversos processos biológicos como crescimento, diferenciação, sobrevivência, morte, migração, e adesão celular em diferentes tipos celulares ^[37,38].

A sinalização de TGF β é mediada predominantemente pela via dependente das proteínas Smads: inicialmente TGF β se liga ao seu receptor, chamado receptor TGF β tipo II (TbRII), o qual logo em seguida ativa o receptor TGF β tipo I (TbRI-quinase). Esta associação resulta na fosforilação das proteínas Smads. Estas são subdivididas em três classes, a saber: Smads reguladoras ou R-Smads (Smads 1, 2, 3, 5 e 8), Co-Smad (Smad4) e Smads inibitórias (Smads6 e 7). Seguindo-se a ativação de TbRII, as R-Smads (2 e 3) fosforiladas formam complexos heterodiméricos com a Co-Smad4, originando um complexo transcricionalmente ativo, o qual é translocado para o núcleo modulando a expressão de genes alvos ^[23, 38-41] (Figura 1).

Figura 1. Esquema ilustrando a via canônica de sinalização do TGF-beta.

Embora a sinalização supracitada seja a principal via utilizada pelo TGF β , este também é capaz de ativar outras vias como a das MAPK (ERK, SAPK/JNK, e p38 MAPK) [23,42,43]. O TGF β induz ainda a ativação de PKA em CM por um mecanismo envolvendo a degradação do peptídeo inibitório de PKA (PKI) [44].

A sinalização pelas Smads é estritamente controlada para proteger as células de uma eventual resposta não desejada ou nociva a partir do TGF β . Isso ocorre através de um mecanismo envolvendo tanto as Smads inibitórias e alguns co-repressores transcricionais, como SnoN, Ski, e TGIF. As Smads inibitórias (Smad 6 e 7) atuam abolindo a fosforilação das R-Smads por bloquear o receptor T β RI e/ou promover a degradação dos complexos receptores. Já os co-repressores agem prevenindo a transcrição gênica através da inibição das R-Smads [38,45]. Estes antagonistas são críticos para garantir a regulação da transcrição gênica mediada por Smad; por conseguinte, um balanço fino deve ser alcançado para atingir a homeostase de acordo com as necessidades da célula. Portanto, não é surpreendente que níveis diminuídos de co-repressores transcricionais sejam observados em modelos animais de nefropatia obstrutiva e diabética [46].

A atividade de TGF β é regulada em diversos níveis, incluindo a transcrição, a ativação do complexo TGF β latente e sua ligação aos receptores já mencionados. Em muitos tipos celulares, TGF β é capaz de positivamente regular sua própria expressão [47]. Esta autoindução pode ser uma das responsáveis pelo disparo patológico caracteristicamente associado à fibrose nos rins e em outros órgãos [48]. Além disso, o TGF β pode ser liberado e ativado de sua forma latente por mudanças no pH, por proteases como a plasmina e catepsina D e pela trombospodina (THBS1) [49].

A via de sinalização TGF β /Smad encontra-se presente e funcional nas células mesangiais humanas [50,51] e apresenta um papel integral na patogênese da nefropatia diabética [52], sendo um potente indutor da síntese de proteínas de MEC [26, 51]. Numerosos estudos indicam que a hiperglicemia induz o aumento da expressão de TGF β , mRNA e proteína, em modelos experimentais de diabetes, bem como em CM em cultura. Níveis elevados de expressão de todas as isoformas (TGF β -1, TGF β -2, e TGF β -3) também já foram descritos em modelos animais de diabetes pela administração de estreptozotocina (STZ). Da mesma forma, aumento na produção renal de TGF β em pacientes com ND já está bem documentado e aparenta estar envolvido nas fases precoce e tardia da doença [23]. Com relação às implicações e

mecanismos atuantes na patogênese da ND, o TGF β marcadamente suprarregula a produção de componentes de MEC, incluindo fibronectina e colágeno; concomitantemente, inibe a degradação de matriz pelas proteinases e estimula estresse oxidativo e hipertrofia em CM^[40,41,51-53]. Em adição, durante o processo inflamatório da doença renal crônica foi descrita a capacidade do TGF β em atuar também como molécula quimioatraente de macrófagos/monócitos, além de regular a sobrevivência de linfócitos, células natural-killer e células dendríticas^[54].

Adicionalmente, fatores vasoativos como a angiotensina-II, endotelina-1, e tromboxano A2 podem exercer parte das ações pró-fibrogênicas na doença renal diabética também pela indução da síntese do TGF β -1. De maneira interessante, foi demonstrado em células tubulares proximais que o TGF β estimula a expressão gênica de angiotensinogênio, indicando uma alça de feedback positivo, a qual contribui para o dano renal. De fato, vários dos efeitos pró-fibróticos de AngII são mediados pelo estímulo prévio de TGF β . Processos paralelos envolvendo alterações na hemodinâmica intrarrenal, como o aumento da pressão capilar glomerular, também podem estimular a produção de TGF β ativo^[51].

1.4.1 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

BMPs são fatores de crescimento multifuncionais também pertencentes à superfamília do TGF beta^[55]. São constituídos por cerca de 20 membros^[56] e aparecem altamente conservados durante a evolução. Os papéis das BMPs no desenvolvimento embrionário e nas funções celulares em animais neonatos e adultos têm sido extensivamente estudados nos últimos anos^[57]. A sinalização de BMP apresenta importância crucial no desenvolvimento do coração, pulmões, dentes, intestinos, ossos e, particularmente, dos rins^[58,59]. Além disso, esses fatores também exercem controle sobre os processos de proliferação, diferenciação, migração e apoptose em diferentes tipos celulares na vida adulta.

Assim como o TGF β , as BMPs transmitem seu sinal para o interior das células pela heterodimerização de complexos de receptores transmembrânicos com atividade de serina/treonina quinases (tipo I ou ALKs e tipo II) e ativação das Smads.

As BMPs ligam-se a ambos os subtipos de receptores de forma independente e com baixa afinidade. Porém, esta é intensamente aumentada quando a ligação simultânea a ambos os tipos de receptores acontece. As R-Smads 2 e 3 são específicas para a sinalização de TGF β (TGF-Smads), enquanto que as R-Smads 1, 5 e 8 são específicas para as BMPs (BMP-Smads)^[60] (Figura 2). A especificidade da resposta ao TGF β -1 ou às BMPs também decorre da diferente associação entre os diversos receptores tipo I e tipo II dessa família. Um mesmo ligante pode induzir diferentes respostas celulares, dependendo do complexo de receptores ativados e principalmente da natureza do receptor do tipo I (ALKs). De maneira geral, ALK4, ALK5 e ALK7 são ativados por TGF β , enquanto que ALK1, ALK2, ALK3 e ALK6 são ativados pelas BMPs.

Figura 2. Esquema ilustrando a via de sinalização das BMPs.

A BMP tipo 7, também conhecida como proteína osteogênica-1, é expressa de forma abundante durante a glomerulogênese^[61]. Camundongos nocaute para este gene morrem logo após o nascimento, devido à malformação dos rins destituídos de glomérulos^[62,63]. Já no adulto, BMP7 encontra-se abundantemente expressa no túbulo coletor e, em menor intensidade, no glomérulo e camada adventícia das artérias renais^[64]. Diversos estudos indicam um potencial terapêutico para BMP7 na doença renal, tanto na sua forma aguda como crônica, onde sua expressão encontra-se diminuída^[65]; sua restauração permite reaver, ao menos em parte, a função e morfologia renais^[66-73].

A importância de ambas vias, TGF-beta e BMPs, e o conhecido papel antagônico entre elas nos rins, demonstra a necessidade de mais investigação e estudos adicionais acerca do papel dessas moléculas na biologia renal.

Inerente às vias de sinalização, um fenômeno celular importante cada vez mais estudado é a interação entre diferentes proteínas na regulação em vias de crescimento, ciclo celular, diferenciação e morte; em que processos de homo/heterodimerização convertem moléculas monoméricas inativas em complexos diméricos transcricionalmente ativos em momentos específicos do desenvolvimento celular.

Estudos recentes têm identificado um grande número de regiões evolutivamente conservadas que medeiam essas interações. Uma dessas regiões envolvidas no controle de proliferação e diferenciação, comumente associadas a fatores de transcrição é o domínio básico hélice-alça-hélice (bHLH, do inglês)^[74].

1.5 bHLHs

Os fatores de transcrição pertencentes à família bHLH são um grupo de proteínas que contêm um domínio de heterodimerização composto de duas hélices alfa anfipáticas, separadas por uma alça (loop), e uma região adjacente rica em aminoácidos básicos que permitem a interação com o DNA^[75]. Estes fatores coordenam de maneira específica a expressão de uma série de genes, e estão diretamente implicados em diversos processos do desenvolvimento, como proliferação e diferenciação celular, neurogênese, miogênese e morte celular^[76, 77]. Isto acontece devido às interações de homo ou heterodimerização entre essas proteínas e à presença do domínio básico na maioria dos componentes desta família^[78-83] (Figura 3). Este domínio reconhece e liga-se a sequências consenso no DNA conhecidas como “E-box” (CANNTG, onde N representa qualquer nucleotídeo)^[75,84].

Figura 3. Proteínas bHLH formando heterodímero e ligando-se ao DNA a partir de seus domínios básicos.

1.5.1 Os genes *IDs*

Membros do subgrupo da classe V HLH, conhecidos como *ID* (Inibidores de ligação ao DNA ou Inibidores de diferenciação) não possuem o domínio básico e, portanto, não se ligam diretamente ao DNA. Contudo, apresentam a propriedade de dimerização com outros membros da família mantida, principalmente com as chamadas E-proteínas, incluindo E12, E47, ITF2, e HEB. Conseqüentemente, os genes *ID* atuam primariamente como reguladores dominantes negativos dos fatores bHLH, inibindo sua ligação ao DNA^[74,85-88]. De forma geral, as proteínas Id inibem a atividade das proteínas bHLH, sequestrando-as e originando heterodímeros inativos (Figura 4).

Figura 4. Esquematização do mecanismo clássico dos Ids, atuando como dominantes negativos de bHLHs (E-Proteínas).

Em adição a sua associação com os fatores bHLH, os Ids podem interagir com outras proteínas não pertencentes à família HLH, incluindo as proteínas do Retinoblastoma (pRB), Mida1, e, mais recentemente identificado, com membros dos fatores de transcrição da subfamília *TCF*^[89]. Atualmente, são conhecidos 4 subtipos de *ID* em mamíferos, *ID1-ID4*, os quais podem apresentar padrões de expressão e função distintos em uma grande variedade de tipos celulares. Os genes e proteínas *ID* têm-se mostrado essenciais para vários fenômenos biológicos incluindo a angiogênese, tumorigênese, crescimento celular, diferenciação, neurogênese, morte celular programada e desenvolvimento de células do sistema imune^[39, 90, 91]. Estas e outras funções são rigidamente reguladas tanto em nível transcricional, como de estabilidade protéica. Além disso, têm sido demonstrado que as proteínas Id estão localizadas em quantidades variáveis no citoplasma e no núcleo em várias células, como as hematopoiéticas, neurais, musculares e renais, sugerindo que a translocação entre o núcleo e o citoplasma possa estar envolvida no controle funcional dessas proteínas^[90-94].

Os genes *ID*, assim como seus produtos, já foram detectados em rins de embriões e animais adultos^[95-97]. Trabalhos também descrevem a expressão constitutiva dos *ID* em células mesangiais^[83,98,99]. Contudo, sua função e mecanismo de ação ainda não estão esclarecidos neste tipo celular.

Resultados prévios de nosso grupo demonstram que os genes *ID* são suprarregulados quando estimulados com BMPs, particularmente BMP-4 e BMP-7, destacando-se o gene *ID1*. Recentes trabalhos na literatura também indicam o aumento da expressão de *ID1* induzido por BMPs^[100]. Além disso, dados de nosso laboratório provenientes de experimentos de gene repórter com CM humanas imortalizadas indicam que os Ids não modificam (positiva ou negativamente) a interação entre duas diferentes E-proteínas testadas (E-47 e mash1) e sítios de ligação do tipo E-box. Isso sugere que os Ids tenham uma forma de ação particular nas CM.

Portanto, este estudo prevê a identificação do papel e do mecanismo de ação do gene *ID1* nas células mesangiais humanas. São investigadas interações, diretas ou indiretas, da proteína Id1 com outras proteínas e/ou DNA, que possam modular a expressão de genes e de vias importantes na biologia das células mesangiais, tanto em condições normais como patológicas.

Prevê-se que os resultados aumentarão a compreensão de uma via importante na biologia das células mesangiais e possibilitarão a identificação de potenciais novos marcadores e/ou alvos terapêuticos para as doenças glomerulares.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal definir o papel e o mecanismo de ação do gene *ID1* em células mesangiais humanas imortalizadas (hCMI) através da análise de sua interação com DNA e/ou proteínas.

Dentre os objetivos específicos, temos:

1. Caracterizar interações entre *Id1* e DNA e/ou proteínas em hCMI;
2. Esclarecer o papel dessas interações na regulação de genes relacionados ao desenvolvimento e manutenção de doenças glomerulares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Utilizamos células mesangiais humanas imortalizadas (hCMI), obtidas a partir de doação do Dr. Bernhard Banas (Munique, Alemanha). Estas células foram semeadas em placas de cultura em meio DMEM (Gibco Life Technologies-GLT/Invitrogen,USA) suplementado com soro bovino fetal (SBF) 10% (GLT), penicilina e estreptomicina (50.000 U/L, GLT), a 37° C, com CO₂ a 5% e ar a 95% em incubadora umidificada. As culturas foram utilizadas em um número limitado de passagens, com estoques de células congeladas em nitrogênio líquido para manutenção de uniformidade nos experimentos, garantindo células fenotipicamente semelhantes.

3.2 Tratamento das hCMI com BMP-4, BMP-7 e ou TGFβ-1

Após atingirem a confluência, as células foram lavadas 2x com PBS e mantidas em DMEM com 0,5% de SBF por 24h. Em seguida, foi adicionado DMEM puro contendo BMP-4 (1ng/mL), BMP-7 (5ng/ml), e/ou TGFβ-1 (2ng/ml). Tais concentrações foram previamente estabelecidas em nosso laboratório; e o período de estímulo com os fatores variou de 10 a 48 horas, conforme protocolo experimental.

3.3 Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)

Para a realização desta técnica foi feita uma adaptação do protocolo já descrito por Farnham et al (<http://genomecenter.ucdavis.edu/farnham/farnham>). hCMI foram cultivadas em duas placas conforme já descrito até a confluência. As células, então, foram tratadas com BMP-4 (1ng/ml) pelo período de 10h, para máxima expressão da proteína Id1 (tempo e concentração já otimizados em trabalho anterior do nosso grupo). Após o tratamento, foi adicionado às células formaldeído 1% diluído ao meio de cultura DMEM por 10 minutos a 37 °C para a reação de ligação cruzada. A reação foi paralisada pela adição de glicina 0,125M por 5 minutos a 37 °C. As células foram lavadas 2x com tampão PBS gelado e removidas das placas. Em seguida, as células foram lavadas 1x com PBS contendo coquetel de inibidores de protease (PMSF 100 mM, aprotinina 10mg/ml e leupeptina 10mg/ml) e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Os pellets resultantes foram ressuspensos em tampão de lise celular e inibidores de protease e mantidos em

gelo por 20min para que ocorresse a liberação do núcleo. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e o pellet nuclear formado foi então ressuspenso em tampão de lise nuclear e inibidores de protease, e mantido por 10min em gelo. A cromatina foi sonicada em gelo realizando-se 10 pulsos de 20s cada com intervalos de 30s entre cada pulso, utilizando o sonicador da marca SONICS modelo VCX130, setado a amplitude de 40%. O tamanho dos fragmentos de DNA gerados foi então confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1%. Logo após, os fragmentos de cromatina foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante removido e transferido para um novo tubo. Em seguida, 200µl da amostra foram pré-purificados adicionando proteína-A/G Plus-agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA) e incubando os mesmos por 15 minutos a 4 °C, sob agitação. As amostras foram então centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C, e ao sobrenadante foram adicionados dois volumes de tampão de diluição e inibidores de protease. A esta mistura foi adicionado em um tubo 1 µg do anticorpo anti-Id1 (WH3397M2, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) e ao outro tubo IgG não-imune de camundongo como controle negativo (Santa Cruz). As amostras foram incubadas sob agitação a 4 °C, “overnight”. Logo após, procedemos à adição de proteína-A/G Plus-agarose e à incubação sob agitação a 4 °C por 1h. Centrifugações a 14000 rpm por 4 minutos a 4 °C e lavagens dos pellets formados com o tampão de diálise 1X (2 lavagens) e tampão de lavagem (4 lavagens) foram realizadas. Os complexos anticorpo/proteína/DNA foram então eluídos pela adição de tampão de eluição (50 mM NaHCO₃, 1% SDS), submetidos ao vórtex por 15min e centrifugados por 14000 rpm por 3min em temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados às amostras 4 µl de NaCl 5M para reversão das ligações cruzadas, incubando a 67 °C, “overnight”. No dia seguinte foi adicionado 1 µl de RNase A (10mg/ml) incubando a 37 °C por 30 min, além de 20 µl de TE e 1,5 µl de Proteinase K (20mg/ml), sendo as amostras incubadas a 45 °C por mais 1h para digestão do RNA e proteínas respectivamente. Seguiu-se à extração e purificação do DNA utilizando o kit Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA). Para tanto seguimos as recomendações do fabricante, eluindo a amostra ao final da purificação com 30 µl de água deionizada. Por fim, quantificamos o DNA imunoprecipitado no aparelho Nanovue (GE) a 260 nm.

A ilustração a seguir (Figura 5) exemplifica as etapas da imunoprecipitação da cromatina:

Figura 5. Esquematização da metodologia de imunoprecipitação de cromatina (ChIP).

3.4 Amplificação dos produtos da ChIP por PCR mediado por ligação (LM-PCR)

Os produtos com sequências desconhecidas provenientes da ChIP foram amplificados por PCR mediado por ligação (LM-PCR), sendo esta etapa baseada no protocolo de clonagem para a ChIP descrito por Oberley et al, 2004. Inicialmente, foi construído um adaptador pelo acoplamento dos oligonucleotídeos JW102 (5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3') e JW103 (5'-GAATTCAGATC-3'). Para tanto foi feita a combinação de 6,7 µl do oligonucleotídeo JW102 (100 µM), 6,7 µl do oligonucleotídeo JW103 (100µM) e 86,6 µl de H₂O. Essa mistura foi aquecida a 95 °C por 5 minutos e então resfriada vagarosamente à temperatura ambiente. O oligonucleotídeo dupla fita resultante (JW102/JW103) foi então armazenado a -20 °C. Os fragmentos de DNA das amostras da ChIP tiveram suas extremidades preenchidas através da ação da T4 DNA polimerase (Invitrogen). Para isso, a mistura de 20 ng de DNA imunoprecipitado, 11 µl de tampão T4 Polimerase, 5 µl de dNTPs (2mM), 1 µl da T4 DNA polimerase e 89 µl de H₂O foi incubada a 37 °C por 1 hora. As amostras foram posteriormente purificadas pelo Kit Illustra GFX PCR and Gel Band Purification (GE). Em seguida, o oligonucleotídeo adaptador foi ligado aos fragmentos de DNA pela adição de 27 µl do DNA purificado, 4,3 µl de H₂O, 10 µl do tampão T4 Ligase 5X, 6,7 µl do adaptador (JW102/JW103) e 2 µl da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) (1U/µl); a reação aconteceu a 16 °C "overnight". As amostras de cromatina-adaptador foram purificadas e eluídas em 30 µl de H₂O deionizada e serviram de molde para a PCR contendo 5 µl de tampão (10X), 1,5 µl dNTPs (10 mM), 1,5 µl MgSO₄ (50 mM), 2,5 µl do oligo JW102 (20µM), 0,6 µl da enzima Pfx Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e 13,9 µl de H₂O; a ciclagem utilizada foi de 55 °C-2min, 72 °C-5min, 95 °C-2min, e a seguir 20 ciclos de 95 °C-30s, 55 °C-30s e 72 °C-1min. A enzima Pfx Platinum possui alta fidelidade e atividade exonucleásica 3'-5', gerando produtos com final "blunt" (rombo). Após a PCR, cada reação foi novamente purificada e eluída. A etapa de PCR seguida de purificação foi repetida mais uma vez. Os produtos de PCR aplicadas em gel de agarose devem-se apresentar concentrados na faixa de tamanho entre 200-600/1000 pb, sendo posteriormente utilizados para clonagem e sequenciamento.

3.5 Clonagem e transformação de *E.coli* para propagação de plasmídeos

10 µl dos produtos e sequências “blunt” oriundas da ChIP para Id1 e IgG-não imune, amplificadas por LM-PCR e posteriormente purificadas foram aplicados em gel de agarose 1%, tendo a região entre 200/600-1000pb cortada do gel e purificada com o kit Illustra GFX (GE). Logo após a purificação do gel, a amostra foi quantificada no aparelho Nanovue a 260 nm. Este material foi utilizado para a etapa de clonagem, na qual utilizamos o Kit CloneJET PCR Cloning (Fermentas Life Sciences, Canada). A reação de ligação do inserto/vetor foi realizada na relação molar 3:1 como se segue: 10 µl do tampão de reação 2X, 30 ng do produto da LM-PCR purificado, 50 ng do vetor pJET1.2/blunt, 1 µl de T4 Ligase e H₂O q.s.p 20 µl. A mistura foi incubada a 22 °C por 30min e usada logo a seguir para transformação das bactérias. Metade da reação de ligação foi incubada com cepas específicas de *E. coli* (One-Shot Stbl3; Invitrogen) e mantida em gelo por 30min. A seguir as bactérias foram submetidas a um choque térmico (42 °C, 45s) e novamente colocadas em gelo por 5 min. Após, foi adicionado 250ul de meio SOC (Invitrogen) às bactérias, que foram mantidas sob agitação a 37 °C por 1h. A mistura foi então semeada em placas contendo LB-ágar com antibiótico seletivo (Ampicilina, 100µg/ml) para crescimento de colônias transformadas (que incorporaram o plasmídeo de interesse) e transferidas para incubadora seca a 37 °C por aproximadamente 18h. No dia seguinte foi realizado PCR das colônias propagadas na placa utilizando-se os primers pJET 1.2 Forward sequencing e pJET 1.2 Reverse sequencing (Fermentas) para detectar quais delas tinham recebido o inserto. A seguir, as colônias identificadas e selecionadas pelo PCR foram transferidas de maneira independente para tubos contendo meio LB líquido com antibiótico. Os tubos foram mantidos sob agitação a 37 °C por 16-18h e a seguir uma amostra da mistura foi utilizada para confirmação da identidade do plasmídeo com o kit de extração Mini-Prep (Fermentas). Os plasmídeos purificados foram quantificados por espectrofotometria a 260 nm.

3.6 Sequenciamento dos clones positivos

Os clones positivos (plasmídeos) que receberam os insertos purificados da ChIP para Id1 e IgG-não imune controle foram sequenciados utilizando-se o equipamento MegaBACE 1000 (GE) e o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (GE) seguindo as indicações do fabricante. Resumidamente, ~100 ng de DNA, 5 pmol de primer (pJET1.2 F ou R), 8 ul do reagente Sequencing premix e H₂O q.s.p. 20ul foram adicionados em placa de 96 poços (cada amostra foi feita em duplicata para ambos os primers). Logo após, a placa foi selada com adesivo apropriado, submetida a vórtex seguido de rápida centrifugação. Em seguida, foi realizada em termociclador convencional a seguinte ciclagem: 30 ciclos de 95 °C – 20s; 50 °C – 15s; 60 °C – 1min. Terminado o programa, as reações foram precipitadas com etanol 100% (SIGMA-Aldrich, USA) e acetato de amônio 7,5 M. Após centrifugações a 4 °C, os pellets precipitados foram lavados com etanol 70% (SIGMA-Aldrich), submetidos à centrifugação e secos em temperatura ambiente por aproximadamente 5min. Logo após, cada pellet foi ressuspensionado em 10 ul de MegaBACE loading solution. Por fim, as amostras foram aplicadas no aparelho MegaBACE 1000 nas seguintes condições:

Injeção: 2 Kv x 75 seg e corrida: 9 Kv x 100min. A visualização e confirmação da qualidade das sequências obtidas foi feita utilizando-se o software Chromas®. Além disso, o alinhamento das duplicatas que confere confiabilidade das sequências foi verificado utilizando-se o software MegAlign (DNA Star Pack).

3.7 Análise de bioinformática

A identificação e análise das sequências provenientes do experimento de ChIP tanto para Id1 como para IgG-não imune foram feitas pela utilização de ferramentas de bioinformática disponíveis gratuitamente na web. Os programas usados com seus respectivos links foram:

- Human BLAT Search (UCSC) <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>
- AlgggenPROMO
http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3
- BIOBASE <https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>

De forma sucinta, a ferramenta BLAT foi utilizada para a procura de similaridade e identidade das nossas sequências com genes humanos, preferencialmente com

regiões regulatórias e promotoras. O site Alggen PROMO consiste em uma ferramenta que permite a identificação de sítios de ligação para fatores de transcrição em sequências de DNA de diferentes espécies. Para tanto, o programa se utiliza da construção de matrizes com a sequência alvo consenso para diferentes fatores de transcrição contidas no banco de dados TRANSFAC (Wingender et al., 2001). A predição e confiabilidade da presença de potenciais sítios regulatórios é feita por cálculos estatísticos baseados na:

- 1) similaridade da sequência de entrada com a matriz consenso de determinado fator de transcrição; 2) na probabilidade (representado pelo valor “RE query”) de um determinado “hit” da sequência ser encontrado aleatoriamente no genoma. Por exemplo, um valor RE= 0,001 significa que a chance de ocorrência deste “hit” ao acaso é de 1 vez em 1 Mb (megabases).

Já o site BIOBASE consiste em um banco de dados que baseado tanto em evidências semânticas (teóricas) quanto experimentais, fornece listas de genes que são potencialmente regulados por determinado fator de transcrição, além de indicar se estas regulações gênicas são diretas ou indiretas, por meio de possíveis dimerizações.

A esquematização abaixo sumariza o processo completo do método.

3.8 Imunoprecipitação (IP)

Para confirmar a interação entre Id1-USF2 imunoprecipitação para Id1 foi realizada. Resumidamente, 100µg de extrato de proteína total de hCMI foram pré-purificados adicionando-se 0,25µg de IgG de camundongo não-imune controle (Santa Cruz) juntamente com 20µl de proteína A/G Plus-Agarose (Santa Cruz); sendo a mistura imediatamente incubada a 4 °C por 30 min. Em seguida, o pellet foi precipitado realizando-se centrifugação a 3000 rpm por 2min a 4 °C, salvando o sobrenadante (lisado celular). Este último foi incubado com 1µg do anticorpo anti-Id1 (WH3397M2, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) ou com IgG não-imune de camundongo (Santa Cruz) como controle a 4 °C, “*overnight*”, sob agitação. Na manhã seguinte, 20µl da proteína A/G Plus-Agarose foi adicionada, voltando à incubação a 4 °C sob agitação por mais 4 horas. Logo após, o pellet foi coletado por centrifugação a 3000 rpm por 2min a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O pellet formado foi lavado por 3x com tampão RIPA (Sigma), repetindo a etapa de centrifugação anterior após cada lavagem. Após a última lavagem e descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuscitado em 50 µl de tampão de amostra 2x para eletroforese. Em seguida, 25 µl das amostras (~50µg de proteína) foram fervidos por ~ 10min (para desprendimento dos beads de agarose) e carregados em gel SDS-PAGE de poliacrilamida a 15%.

3.9 Western-Blot

Amostras de proteína previamente imunoprecipitadas foram aplicadas e analisadas em gel de Glicina SDS-PAGE (15%). Logo em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0.22 µm) e bloqueada por 1h em leite desnatado a 5% mais tampão TBST. Em seguida a membrana foi incubada por aproximadamente 16h com anticorpo primário anti-Id1 (WH3397M2, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) ou anti-USF2 (WH7392M1, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado a HRP (sc-2030; Santa Cruz) por mais 1h. As membranas foram reveladas através de reagente quimioluminescente (ECL plus, GE Healthcare, USA).

3.10 Plasmídeos USFs e BAX

O plasmídeo repórter luciferase pU3ML-Luc foi gentilmente doado pela Dra. Leslie Heckert (Universidade do Kansas, USA) com a prévia autorização da Dra. Michèle Sawadogo (Universidade do Texas/MD Anderson Cancer Center, USA). Este plasmídeo repórter foi gerado inserindo-se no vetor pML-Luc, digerido com a enzima de restrição SmaI, 3 repetições do oligonucleotídeo de sequência 5'-GATCCTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCA-3', representando domínios de ligação consenso para os fatores USFs. Os vetores de expressão pUSF2 e pUSF1 foram gentilmente doados pelo laboratório do Dr. A. Verhoeven (Erasmus MC, Rotterdam, Holanda). O plasmídeo pUSF1 foi obtido pelo Dr. Verhoeven a partir de doação feita pelo Dr. B. Staels (Pasteur Institute, Lille, França). Já o vetor pUSF2 foi construído a partir da sequência codificadora humana de USF2 gerada por RT-PCR a partir do RNA total de células HepG2.

Primers utilizados: 5'-gcgaattCCATGGACATGCTGGAC-3'

5'-gctctagaGCGTGGTGGTGGCGG-3'

Os sítios de restrição EcoRI e XbaI (sublinhados) foram adicionados para posterior clonagem no vetor pcDNA3.1.

Os plasmídeos BAX-Promoter-Luc e seu respectivo controle pGL3-basic foram gentilmente cedidos pelo Dr. Moshe Oren (Dept. of Molecular Cell Biology/Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Resumidamente, um inserto de 370pb correspondendo ao promotor mínimo do gene BAX foi clonado no plasmídeo repórter pGL3-basic (Promega, Madison, USA) nos sítios de restrição para as enzimas KpnI e SacI.

3.11 Transfecção transitória

hCMI em confluência entre 50-60% foram transfectadas através do uso do kit Effectene (QIAGEN, USA) com o vetor de interesse. Resumidamente, os plasmídeos a serem transfectados foram combinados, na presença de um tampão específico ("EC"), a um condensador de DNA ("Enhancer") e, após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, a uma suspensão lipídica capaz de formar

pequenas micelas envolvendo o DNA (“Effectene”). À suspensão de transfecção foi acrescentado meio de cultura e as células foram incubadas com esse preparo. Após 24 horas, o meio foi aspirado e substituído por meio de cultivo novo. Após 48 horas da transfecção, as células foram submetidas a ensaio de gene repórter luciferase.

3.12 Produção de adenovírus para superexpressão de *ID1*

Para a construção dos vetores utilizamos o kit ViralPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen). Amplificamos a sequência do gene *ID1* a partir de uma reação de PCR, com enzima Pfx (Invitrogen). O produto purificado foi inserido no vetor de entrada pENTR™/SD/D-TOPO, utilizando-se uma proporção molar 1:1 e incubação por 30 minutos a 23 °C. Após, o plasmídeo foi propagado em *E. coli* OneShotTOP10 selecionadas na presença de Kanamicina (50 µg/mL). O vetor foi isolado e submetido à digestão com as enzimas de restrição SmaI e EcoRV e sequenciamento, para confirmação da inserção correta do gene amplificado no vetor de entrada.

O gene de interesse foi então inserido no vetor de expressão pAd/CMV/V5-DEST™ por reação de recombinação homóloga: 150 ng do vetor pENTR_ID1 ou pENTR_LacZ foram combinados com 150 ng do vetor pAd/CMV/V5-DEST juntamente com o mix de enzimas Gateway LR Clonase II (Invitrogen), e incubados por 18 horas. Após esse período foi adicionado 1 µL de proteinase K e a reação foi incubada por mais 10 minutos a 37 °C. A propagação foi feita em *E. coli* Stbl3 selecionadas a partir da presença de Ampicilina (100µg/mL). O plasmídeo pAd/CMV/V5-DEST_ID1 foi purificado e submetido à digestão enzimática com SmaI, o que confirmou a entrada do inserto no sentido correto. Os plasmídios (inclusive pAd/CMV/V5-DEST-LacZ) então foram submetidos à digestão com a enzima de restrição PacI e 1 µg destes vetores foi transfectado em células empacotadoras (293A) utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Após 48h, as células foram tripsinizadas e cultivadas em meio de cultura completo. As células foram mantidas em cultura até apresentarem a formação da placas de efeito citopático (CPE) em aproximadamente 80% da placa. O lisado viral foi preparado conforme recomendação, ou seja, as células e o meio foram submetidas a 3 ciclos de congelamento (-80 °C) seguido de descongelamento (37 °C). O lisado viral foi centrifugado (3000rpm) e o sobrenadante contendo as partículas virais foi aliquoteado

e congelado a -80 °C. Esse primeiro estoque foi novamente expandido através da adição do lisado viral em novas células 293A. Após dois dias as células com CPE foram submetidas a uma nova preparação de novo lisado, o qual foi denominado “estoque amplificado”.

A titulação foi feita (conforme recomendações do fabricante) em células 293A transduzidas com uma diluição seriada do estoque viral amplificado (10^{-5} a 10^{-9} PFU-unidades formadoras de placas/ml). Vinte e quatro horas após, o meio de cultura foi substituído por 2 mL de solução de agarose e meio de cultura renovado. Após 8 dias as células foram coradas com MTT. O título de adenovírus foi determinado pelo número de CPEs observadas em cada diluição.

3.13 Infecção das células hCMi para superexpressão de ID1

Células mesangiais (hCMi) foram plaqueadas na densidade de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ céls/ml e transduzidas com o adenovírus superexpressor de *ID1* no MOI (multiplicidade de infecção) 30. Após 24h, os vírus foram retirados e o meio de cultura renovado. Após 48h da transdução viral as células foram recolhidas ou lisadas para posterior análise.

3.14 Ensaio de gene repórter

As células foram lavadas com PBS e lisadas em tampão apropriado Glo Lysis Buffer (Promega; USA) por 5min. Esse lisado foi transferido para uma placa de 96 poços (Lumitrac 200, Greiner bio-one) e a fluorescência emitida pelas amostras a 595 nm quando excitadas a 544 nm foi analisada em uma leitora de placas (FARCyte, Amersham). A seguir, um reagente contendo luciferina (Bright-Glo Luciferase Assay system, Promega), na proporção de 1:1 (v:v), foi adicionado às amostras e a luminescência foi analisada na mesma leitora de placas. Para controle da eficiência da transfecção todos os grupos foram cotransfectados em igual proporção com o plasmídeo pDS-RedMito (Clontech, Califórnia, USA). Para compensar a heterogeneidade da eficiência da transfecção, a intensidade de luminescência obtida foi normalizada pelo valor da fluorescência emitida por cada amostra.

3.15 Desenho de primers

Pares de primers para verificar a expressão em hCMI dos fatores de transcrição USFs e de genes regulados por estes foram desenhados e sintetizados.

Segue as sequências dos primers:

hUSF1 Fw	5´-CCGCCGAGACAAGATCAACAACACTG-3´	Tm=55 °C
hUSF1 R	5´-ATCCGTGGTGCCGCAACTGAG-3´	
hUSF2 Fw	5´-ACGCCCCAGGATGTGCTTCAG-3´	Tm=55 °C
hUSF2 R	5´-CTCCGCCTCCGCTCCACTTC-3´	
THBS1 Fw	5´-GCGGCCTCCCCTATGCTATC-3´	Tm=55 °C
THBS1 Rv	5´-CGGTTGTTGAGGCTATCGCAG-3´	
PAI1 Fw	5´-CCCGATGGCCATTACTACGA-3´	Tm=55 °C
PAI1 Rv	5´-ATGCGGGCTGAGACTATGACA-3´	
GAPDH F	5´-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3´	Tm=58 °C
GAPDH R	5´-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3´	
BAX F	5´-CGCCCTTTTCTACTTTGCCAGC-3´	Tm=60 °C
BAX R	5´-GTGAGGCGGTGAGCACTCCC-3´	
Bcl2 F	5´-ACGACTTCTCCCGCCGCTAC-3´	Tm=54 °C
Bcl2 R	5´-CATCTCCCGGTTGACGCTCTC-3´	

3.16 Eletroporação de hCMI

hCMI semiconfluentes foram tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura (DMEM + SBF 10%) para uma concentração de $1-2 \times 10^6$ células/ml e centrifugadas a 1200 RPM por 10min para formação de pellet. Logo em seguida à centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pellet celular ressuspendido em 1 ml do Electroporation Buffer Hiposmolar (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Esta suspensão foi então transferida para micro tubos 1,5 ml e a ela adicionado o DNA plasmidial (no caso pUSF2 e/ou pUSF1, ou pcDNA controle) para concentração final de 10 ug/ml. Logo após, a mistura foi transferida para cubetas específicas para eletroporação (Eppendorf). As células então foram submetidas ao processo de

eletroporação no aparelho Multiporator® Eppendorf seguindo os seguintes parâmetros:

Modo: eucariotos;

Voltagem: 150V;

Tempo: 100 useg

Nº de pulsos: 3.

Após os pulsos, a suspensão celular permaneceu em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, as células foram cuidadosamente transferidas para tubos falcon 15 ml contendo 3-5 ml de meio de cultura e plaqueadas de forma homogênea em placas de 6 poços. Passadas as primeiras 24 horas após a eletroporação, o meio foi renovado e substituído por SBF a 0,5%, visando retirar a influência do soro nos experimentos posteriores. Após 48 horas as células foram coletadas e o RNA total extraído.

3.17 Isolamento de RNA total

O RNA total das hCMi foi extraído através do kit RNeasy (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, a partir da absorbância em 260 nm, e a pureza das amostras foi determinada pela razão entre os valores de absorbâncias em 260 nm e 280 nm. Somente as amostras que apresentarem razões entre 1.9 e 2.1 foram utilizadas. A integridade do RNA foi averiguada por eletroforese em gel de agarose.

3.18 PCR quantitativo (qRT-PCR)

cDNA foi preparado a partir de 0,5 a 1 µg de RNA total com o uso da enzima ImProm II (Promega), combinando-se oligo-dT (500 ng), MgCl₂ (25 mM) e dNTP mix (10 mM) em tampão concentrado específico e água. Uma alíquota de cDNA foi combinada aos componentes do kit SYBR GREEN PCR Master Mix (Qiagen) e primers específicos para cada gene. A reação consistiu na ativação da enzima Taq DNA polimerase a 95° C por 15 minutos, seguida de 35-45 ciclos com as seguintes etapas: denaturação do DNA a 94 °C por 30 segundos, anelamento dos primers (temperatura determinada pelo par de primers utilizado na reação) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Os produtos foram quantificados e

comparados a controles a partir da análise do número de ciclos necessários para obtenção de dado valor de fluorescência na fase log-linear da reação. Diluições seriadas de amostras controle foram analisadas simultaneamente para estabelecimento de uma curva-padrão. Reações utilizando primers para o gene GAPDH foram utilizadas para normalizar os resultados obtidos. A especificidade do produto gerado foi confirmada por análise da curva de dissociação dos produtos, bem como por eletroforese em gel de agarose convencional.

3.19 Análise estatística

Os dados relativos a cada grupo experimental foram comparados independentemente ao grupo controle. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Foram aplicados testes “t” não-pareado ou análise de variância ANOVA (seguida por teste de Tukey). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Id1 interage com o fator de transcrição USF2

Para investigarmos regiões no DNA de hCMI que fossem alvos diretos ou indiretos para a proteína Id1 realizamos a técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Inúmeros trabalhos prévios demonstram a validade da técnica de ChIP para identificar interações sítio-específicas entre proteína e DNA. A partir de aproximadamente 10 milhões de células (hCMI) tratadas com BMP-4 (1ng/ml) pelo período de 10 horas (para máxima expressão protéica de Id1), procedemos ao protocolo como já descrito e obtivemos uma região amplificada concentrada entre aproximadamente 200-1000 pb (Figura 6).

Figura 6. LM-PCR dos fragmentos imunoprecipitados com Id1.

M: ladder 100pb, ChIP-Id1: 10ul de amostra após LM-PCR e purificação

No passo seguinte (clonagem), fizemos a avaliação de 155 clones relativos aos fragmentos imunoprecipitados com Id1 e de 65 clones relativos aos fragmentos imunoprecipitados com IgG não-imune controle. Desses, obtivemos 11 clones positivos (com inserto) para ChIP-Id1 e apenas 3 clones positivos para ChIP-IgG (Figuras 7 e 8).

Figura 7. PCR representativo de colônias após clonagem dos fragmentos oriundos da ChIP-Id1.

M: ladder; Amostras 96, 97 e 113: 3 dos 11 clones positivos para a presença de insertos. As demais bandas de aproximadamente 122pb representam colônias que foram transformadas apenas com o vetor vazio pJET1.2.

Figura 8. PCR representativo de colônias após clonagem dos fragmentos oriundos da ChIP-IgG.

M: ladder; Amostras 34 e 58: dois dos três clones positivos para a presença de insertos. As demais bandas de aproximadamente 122pb representam colônias que foram transformadas apenas com o vetor vazio pJET1.2.

A seguir, realizamos o sequenciamento dos plasmídeos previamente purificados por mini-prep dos clones positivos para Id1 e para IgG não-imune (controle negativo). Os cromatogramas das sequências obtidas e visualizadas no software Chromas2 foram modificadas para o formato FASTA e analisados utilizando as ferramentas de bioinformática citadas na seção de métodos. Primeiramente realizamos a busca das nossas sequências pela ferramenta “BLAT search”. Com esse aplicativo, não verificamos identidades ou similaridades gênicas significativas, muito provavelmente devido ao tamanho limitado das nossas sequências.

Posteriormente, fizemos nossa análise utilizando a ferramenta “Alggen PROMO”, que localiza e identifica elementos regulatórios e sítios de ligação para fatores de transcrição (FTs) a partir do banco de dados TRANSFAC, com uma similaridade mínima de 85%^[101, 102]. Nesta busca encontramos 40 hits para sítios de ligação de FTs em nossas sequências para ChIP-Id1. Logo a seguir, realizamos um processo de filtragem, onde seguimos os seguintes critérios de seleção: descartamos os hits também presentes nas sequências do ChIP-IgG não imune bem como os hits com dissimilaridade consideravelmente alta. Feito isto, obtivemos 11 potenciais regiões regulatórias em 5 clones, com a presença de sítios de ligação para 6 diferentes FTs. Foi observada predominância de sítios para o fator USF2 (Figura 9).

Figura 9. Representação dos clones ChIP-Id1 com presença de sítios de ligação para FTs. Notar a prevalência das regiões alvo para o fator USF2, presente em 3 clones distintos, com duplo “hit” em um dos clones. Valores de RE e dissimilaridade observados (inserto) indicam a especificidade dos achados.

Embora este achado tenha nos fornecido 6 sítios para fatores de transcrição diferentes (Elk-1, USF2, LEF1, cMyB, HIF1 e CREB), concentramos nossa atenção no fator USF2 (Upstream Stimulatory Factor 2). Isto porque dentre todos os outros, as sequências encontradas para USF2 foram as de maior frequência (4 aparições em 3 clones distintos). Além disso, verificamos boa significância estatística

(RE $\leq 0,001$, vide métodos) e uma alta especificidade, representada por dissimilaridade $\leq 0,52\%$, se comparada a sequência matriz consenso (“AGGT**CACGTG**”). Ainda, o núcleo principal (marcado em vermelho) apresentou identidade de 100% com nossos clones. Para comprovarmos a expressão de USF2 e também do fator USF1 (formador frequente de heterodímeros com USF2) em CM humanas, utilizamos de RT-PCR convencional. Demonstramos a expressão constitutiva de ambos os genes em nossas células (Figura 10).

Figura 10. RT-PCR convencional para USF1 e USF2.

M: Ladder 100pb; 1 e 2:USF1 (amplicon 272pb);
3 e 4:USF2 (amplicon 143 pb); N: controle negativo.

Em seguida, para comprovarmos a existência de interação física entre Id1 e USF2 realizamos imunoprecipitação para Id1 seguida de western blot para USF2. O resultado obtido, apresentado na Figura 11, confirma os dados de ChIP além de demonstrar de fato a interação proteica com USF2.

Figura 11. Imunoprecipitação (IP) de Id1 de extrato proteico de hCMI. Proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE e analisadas por Western blot com anticorpo anti-USF2. O sucesso da imunoprecipitação de Id1 (controle positivo) foi mostrado por Western blot do precipitado com anticorpo monoclonal anti-Id1. Resultados de IP com IgG não-imune são apresentados como controles negativos.

4.2 BMP inibe a atividade transcricional de USF2 através da superexpressão de Id1

Visando esclarecer o papel biológico de USF2 nas hCMI e sua relação com Id1, realizamos ensaio de gene repórter para verificar se a atividade de USF2 era influenciada por Id1 e/ou pelos fatores BMP e TGF-beta. Para tanto, o vetor pU3ML-Luc (Figura 12) foi transfectado em hCMI infectadas com adenovírus super-expressando Id1 ou LacZ (controle), e tratadas ou não com TGFβ-1 (2ng/ml) e/ou BMP-4 (1ng/ml). Como mostrado na Figura 13, o tratamento com BMP-4 significativamente reduziu enquanto TGFβ-1 aumentou a atividade de USF2. Da mesma forma, BMP-4 foi capaz de inibir o efeito provocado pelo TGFβ-1. Similarmente a BMP-4, a superexpressão de Id1, mesmo na presença de TGFβ-1 diminuiu a atividade de USF2 em nossas células. Este conjunto de resultados confirma que Id1 interage (direta ou indiretamente) com o fator USF2, inibindo sua atividade. Além disso, BMP-4, através da suprarregulação de Id1, antagoniza os efeitos de TGFβ-1, inibindo a atividade transcricional de USF2 antes aumentada (Figura 13).

Figura 12. Esquematização do plasmídeo repórter pU3ML-Luc contendo 3 sequências consenso para USF2.

RedMito	+	+	+	+	+	+
pU3ML-Luc	+	+	+	+	+	+
BMP-4	-	+	-	+	-	-
TGFβ-1	-	-	+	+	-	+
Ad-LacZ	-	+	+	+	-	-
Ad-ID1	-	-	-	-	+	+

Figura 13. BMP4 inibe a atividade transcricional de USF2 através da suprarregulação de Id1.

hCMI foram transfectadas com vetor repórter controlado por três repetições consenso do sítio de ligação para USF2. Grupos foram tratados com TGFβ-1(2ng/ml) e/ou BMP-4(1ng/ml) e infectados com Adeno-ID1 ou LacZ controle (MOI=30). Após 48h as células foram lisadas e submetidas a ensaio de gene repórter. pDS-RedMito foi cotransfectado como controle interno da eficiência de transfecção. A atividade de luciferase foi quantificada em unidades relativas arbitrárias de luminescência e normalizada pela fluorescência. n=6. * p<0,01 vs grupo controle; # p<0,01 vs grupo TGFβ-1+LacZ.

4.3 TGFβ-1 aumenta a expressão de USF2 em hCMI

Posteriormente, visando confirmar se os achados no ensaio de gene repórter traduziam-se também em modulação da expressão de USF2, tratamos as hCMI com TGFβ-1 (2ng/ml) por 24 horas, realizando a seguir PCR quantitativo.

A análise dos resultados constatou que TGFβ-1 aumenta a atividade de USF2 por conta de incremento significativo na expressão de seu mRNA (2,24x) (Figura 14).

Figura 14. Regulação do mRNA de USF2 induzida por TGFβ-1. qPCR para o gene USF2. hCMI confluentes foram privadas de soro por 24h e então tratadas com TGFβ-1 (2ng/ml) ou veículo durante 24h. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. N=4, * p<0,05 versus grupo controle.

A seguir, utilizando o banco de dados BIOBASE obtivemos uma lista de genes humanos que são potencialmente regulados por USF2 (Quadro 1), a partir evidências moleculares (experimentais) ou semânticas (teóricas) da literatura. Entre os genes relacionados, dois em especial foram selecionados para investigação adicional, dada sua importância em processos fisiopatológicos em CM. São eles: *PAI1* (plasminogen activator inhibitor-1) e *THBS1* (trombospondina-1), conhecidos genes pró-fibróticos no desenvolvimento de lesão renal.

Quadro 1. Relação dos genes portencialmente regulados por USF2 obtidos a partir do banco de dados BIOBASE. Em destaque os genes selecionados.

<u>Gene</u>	<u>Evidência</u>
BRCA2	Molecular
CATH-D	Molecular
GLI	Molecular
PIGR	Molecular
TERT	Molecular
THBS1	Molecular
apoAII	Molecular
apoCIII	Molecular
PAI1	Semântica
ADH1B	Semântica
AVP	Semântica
C/EBPalpha	Semântica
CXCR4	Semântica
Fmr1	Semântica
GCK	Semântica
HOXB4	Molecular
IGF2R	Semântica
LPK	Semântica
MSX1	Semântica
PES2	Semântica
TFF2	Semântica
c-myc	Semântica
FMR1	Molecular
HBB	Molecular
ABCA1	Molecular
DCK	Molecular
APP	Molecular

4.4 TGF β -1 aumenta a expressão de PAI1 e THBS1

Em seguida, para verificar a modulação dos genes potencialmente regulados por USF2 selecionados anteriormente, hCMi previamente tratadas com TGF β -1 em condições já descritas foram submetidas a qPCR para os genes PAI-1 e THBS1. Assim como observado com relação ao gene USF2, TGF β foi capaz de induzir aumento significativo da expressão tanto de *PAI1* (5,14x) quanto de *THBS1* (4,48x) (Figura 15). O aumento observado em relação ao gene *PAI1* confirma dados já conhecidos da literatura, que indicam que *PAI1* represente um dos mediadores pelos quais TGF β promove o acúmulo de MEC [23,24].

Figura 15. Regulação do mRNA dos genes PAI-1 e THBS1 induzida por TGFβ. qPCR para os genes PAI-1 e THBS-1. hCMI confluentes foram privadas de soro por 24h e então tratadas com TGFβ-1 (2ng/ml) ou veículo durante 24h. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. N=4, * p<0,05 versus grupo controle.

4.5 USF2 suprarregula a expressão de THBS1

Uma vez que TGFβ-1 estimula a expressão de USF2 e dos genes *PAI1* e *THBS1* (que potencialmente contêm sítios de ligação para USF2 em sua região promotora), avaliamos se esta regulação era diretamente mediada por USF2. Para tanto, os vetores de expressão pcDNA3.1 ou pUSF2 foram transfectados nas hCMI por eletroporação em uma concentração final de 10 ug/ml. Após 48h da transfecção, qPCR foi efetuado. Observamos exuberante aumento na expressão de USF2 (130x) em nossas células, confirmando a funcionalidade do vetor de expressão (Figura 16). USF2 por si só foi capaz de modular positivamente apenas a transcrição da *THBS1* (2.04x), não alterando, porém, a expressão de *PAI1* (Figuras 17 e 18).

Figura 16. Super-expressão de USF2 em hCMI. qPCR para o gene USF2. hCMI ($1,0 \times 10^6$ células) foram eletroporadas com o vetor superexpressor pUSF2 (10 ug/ml) ou pcDNA3.1 controle. Após 48h as células foram lisadas e RNA total extraído. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. n=4, * $p < 0,01$ versus grupo controle.

Figura 17. Regulação de THBS1 em hCMI por USF2. qPCR para o gene THBS1. hCMI ($1,0 \times 10^6$ células) foram eletroporadas com o vetor superexpressor pUSF2 ou pcDNA3.1 (controle). Após 48h as células foram lisadas e RNA total extraído. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. n=4, *p<0,01 versus grupo controle.

Figura 18. Expressão de PAI1 em hCMI não é regulada por USF2. qPCR para o gene PAI1. hCMI ($1,0 \times 10^6$ células) foram eletroporadas com o vetor superexpressor pUSF2 ou pcDNA3.1 (controle). Após 48h as células foram lisadas e RNA total extraído. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. n=4.

4.6 TGF β induz apoptose em células mesangiais

Além de fibrose, outro fenômeno celular importante para a progressão e manutenção das doenças glomerulares é a morte por apoptose de células mesangiais. Dados recentes de nosso laboratório mostram que o tratamento das células com TGF β -1 induz o aumento nas taxas de apoptose tanto na presença como na ausência de soro (Figura 19). A avaliação foi realizada por análise da morfologia nuclear, corando o núcleo das células com Hoescht 33342.

Figura 19. TGF β -1 induz a apoptose de hCMI. hCMI cultivadas em placas de 6 poços, privadas ou não de soro por 24h, e tratadas com TGF β -1 (2ng/ml) ou veículo por mais 24h. Após este período, Hoescht 33342 (0,5 ug/ml) foi adicionado ao meio. As células foram coletadas e analisadas sob microscopia de fluorescência UV (400x). A taxa de apoptose foi mensurada de acordo com a morfologia da cromatina. Duzentas células por amostra foram contadas. Resultado expresso como porcentagem de células apoptóticas; $p < 0,05$. Fonte: Antonioli et al.¹(2010).

4.7 BMP-7 e Id1 protegem as células mesangiais da apoptose

Contrapondo os efeitos observados após tratamento com TGF β -1, BMP-7 atua como um fator anti-apoptótico nas hCMi, reduzindo as taxas da mesma (Figura 20). Para explorar se Id1 também seria capaz de regular as taxas de morte celular programada em nossas células, hCMi foram infectadas com Ad-ID1 (MOI 30). Vinte quatro horas após a infecção, as células foram privadas de soro por mais 24h e logo após foi realizada análise da morfologia da cromatina. Como visto na Figura 21A, a superexpressão de Id1 previniu a apoptose induzida pela privação de soro. Resultado semelhante foi observado em ensaio da atividade de Caspase-3 (Figura 21B).

Figura 20. BMP-7 previne a apoptose em hCMi. hCMi foram cultivadas em placas de 6 poços, privadas de soro por 24h, e tratadas com BMP-7 (5ng/ml) ou veículo por mais 24h. Após este período, Hoescht 33342 (0,5 ug/ml) foi adicionado ao meio. As células foram coletadas e analisadas sob microscopia de fluorescência UV (400x). A taxa de apoptose foi mensurada de acordo com a morfologia da cromatina. Duzentas células por amostra foram contadas. Resultado expresso como porcentagem de células apoptóticas; $p < 0,05$. Fonte: Antonioli et al.¹ (2010).

¹ Informação fornecida por Antonioli et al. (2010).

A)

B)

Figura 21. Id1 protege células mesangiais de apoptose. hCMi infectadas com Ad-Id1 ou LacZ-controle. Após 24h da infecção as células foram privadas de soro por mais 24h. (A) Hoescht 33342 (0,5 ug/ml) foi adicionado ao meio e células coletadas para análise sob microscopia de fluorescência UV (400x). A taxa de apoptose foi mensurada de acordo com a morfologia da cromatina. Duzentas células por amostra foram contadas; $p < 0,05$ (B) hCMi foram submetidas a ensaio fluorimétrico de atividade de caspase-3 (Sigma-Aldrich). Fluorescência lida em comprimentos de onda de excitação em 360 nm e emissão em 460 nm. Resultado expresso em unidades arbitrárias de fluorescência
Fonte: Antonioli et al.² (2010).

² Informação fornecida por Antonioli et al. (2010).

4.8 TGF β -1 e USF2 estimulam a expressão do gene pró-apoptótico BAX em hCMI

Análise feita utilizando a ferramenta de bioinformática Algggen-PROMO^[101, 102] apontou para sítios de ligação consenso para o fator USF2 na região promotora de *BAX*, conhecido gene pró-apoptótico pertencente à família Bcl2. Células mesangiais humanas eletroporadas com plasmídeo expressor pUSF2 ou controle, conforme descrito anteriormente, foram submetidas a qPCR para *BAX* após 48h. Como mostrado na Figura 22, USF2 foi capaz de aumentar de forma significativa a expressão de *BAX* (1.40x). De forma similar, o tratamento com TGF β -1 (2ng/ml; 24h) também aumentou a expressão de *BAX* (1.82x) em hCMI (Figura 23).

Figura 22. Regulação do mRNA de BAX em hCMI por USF2 . qPCR para o gene BAX. hCMI ($1,0 \times 10^6$ células) foram eletroporadas com o vetor superexpressor pUSF2 ou pcDNA3.1 (controle). Após 48h as células foram lisadas e RNA total extraído. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. n=4, *p<0,01 versus grupo controle.

Figura 23. Regulação do mRNA de BAX induzido por TGFβ-1. qPCR para o gene BAX. hCMI confluentes foram privadas de soro por 24h e então tratadas com TGFβ-1 (2ng/ml) ou veículo durante 24 h. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. n=4, * $p < 0,05$ versus grupo controle.

Em seguida, averiguamos o padrão de expressão de Bcl2, gene anti-apoptótico e opositor de BAX. Em ambas as condições, presença de TGFβ ou superexpressão de USF2, não detectamos alteração na modulação do mRNA de Bcl2 (Figura 24 A e B). Estes dados em conjunto indicam que a razão BAX:Bcl2 encontra-se aumentada nestes cenários.

Figura 24. Regulação do mRNA de Bcl2. qPCR para o gene Bcl2. hCMI confluentes foram privadas de soro por 24h e então tratadas com TGF β -1 (2ng/ml) ou veículo durante 24h (A). hCMI($1,0 \times 10^6$ células) foram eletroporadas com o vetor superexpressor pUSF2 ou pcDNA3.1 (controle) (B). Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. n=4.

É sabido que USF2 pode atuar através da formação de homodímeros ou heterodímeros com USF1^[103-105]. Para verificar se a associação entre USF2-USF1 modificaria o aumento da expressão de BAX, transfectamos as células com pUSF1 e/ou pUSF2 em concentrações equivalentes (concentração final de 10ug/ml). A Figura 25 demonstra que USF1 por si só ou associado à USF2 não é capaz de influenciar (positiva ou negativamente) o aumento da expressão do gene *BAX*.

Figura 25. Superexpressão de USF2, mas não de USF1, suprarregula a expressão de BAX em hCMI. qPCR para o gene BAX. hCMI ($1,0 \times 10^6$ células) foram eletroporadas com os vetores pcDNA3.1 (10ug/ml), pUSF1 (10ug/ml), pUSF2 (10ug/ml), ou ambos (5ug/ml cada). Após 48h as células foram lisadas e RNA total extraído. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como número de vezes relativo ao controle. n=4, *p<0,01 *versus* grupo controle.

4.9 A superexpressão de *USF2* estimula a atividade promotora do gene *BAX* em *hCMI*

Visando confirmar se o aumento da expressão de *BAX* por *USF2* era de fato controlado transcricionalmente, realizamos novamente ensaio de gene repórter utilizando agora o vetor *BAX-Promoter-Luc*. A Figura 26 nos mostra que a atividade basal da região promotora do gene *BAX* em *hCMI* é estimulada de forma marcante quando estas são transfectadas com o vetor superexpressor de *USF2*. De forma semelhante, o tratamento com *TGFβ-1* (2ng/ml; 24h) também foi capaz de aumentar a atividade promotora de *BAX*.

Figura 26. *USF2* e *TGFβ-1* estimulam a atividade promotora de *BAX*. *hCMI* foram transfectadas com vetor repórter controlado por um fragmento da região promotora do gene *BAX* humano, vetor superexpressor de *USF2* e seus respectivos controles. Grupos foram tratados com *TGFβ-1* (2ng/ml) durante 24h. Após 48h, as células foram lisadas e submetidas a ensaio de gene repórter. pDS-RedMito foi co-transfectado como controle interno da eficiência de transfecção. A atividade de luciferase foi quantificada como unidades relativas arbitrárias de luminescência e normalizada pela fluorescência. n=6. * p<0.05 vs grupo controle; # p<0,01vs grupo *BAX-Luc*+*pUSF2* ; \$ p<0,05 vs grupo *pGL3-basic*+*TGFβ*.

4.10 A superexpressão de USF2 induz apoptose em hCMi

Em uma outra série de experimentos, superexpressamos USF2 em hCMi e executamos ensaio de apoptose por análise de morfologia da cromatina. Os resultados indicam que, de fato, USF2 induz aumento significativo na taxa de apoptose nas hCMi em condições de privação de soro (Figura 27).

Figura 27. USF2 induz apoptose em CMs humanas. hCMi transfectadas com pcDNA3.1 controle ou pUSF2 (10 ug/ml). Após 24h da transfecção, as células foram privadas de soro por mais 24h. Hoescht 33342 (0,5 ug/ml) foi adicionado ao meio e células foram coletadas para análise sob microscopia de fluorescência UV (400x). A taxa de apoptose foi mensurada de acordo com a morfologia da cromatina. Duzentas células por amostra foram contadas * $p < 0,02$.

5 DISCUSSÃO

O mesângio apresenta funções essenciais para o funcionamento normal dos glomérulos, e alterações fenotípicas em suas células residentes participam diretamente no desenvolvimento e manutenção das moléstias glomerulares crônicas, como a glomerulosclerose diabética. Portanto, a identificação e caracterização de moléculas mediadoras envolvidas nas alterações das células mesangiais mostra-se crucial para a melhor compreensão dos processos fisiopatológicos que afetam os rins.

No presente trabalho nós demonstramos pela primeira vez que a proteína Id1 interage com o fator de transcrição USF2, inibindo sua atividade. Verificamos que USF2 modula a expressão de genes diretamente relacionados com fibrose e morte celular por apoptose. Adicionalmente, foi observado um papel protetor de Id1 em relação à apoptose em células mesangiais humanas.

Os *IDs* representam uma classe de genes da família HLH (hélice-alça-hélice) que modulam a expressão gênica em diferentes tipos celulares. Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram que os *IDs* encontram-se constitutivamente expressos em células mesangiais e são rápida e potentemente suprarregulados pelas BMPs, principalmente pelas BMP-4 e 7; destacando-se o gene *ID1* como o mais suprarregulado sob estes estímulos quando comparado com os outros membros de sua família (*ID2*, *ID3* e *ID4*). Os genes *IDs* têm sido reportados na literatura em diferentes sistemas, promovendo crescimento e proliferação celular ^[83,106-109] além do aumento da expressão dos mesmos estar relacionado a diversas formas de câncer ^[81,88].

Dados prévios de nosso laboratório também mostraram que em células mesangiais humanas, Id1 não interfere na interação entre as E-proteínas E-47 e Mash-1 e sítios E-Box (CANNTG) no DNA, sua forma clássica de ação, sugerindo um mecanismo específico e particular nestas células; até o presente momento o papel e mecanismo de atuação deste gene nas CMs permanecia desconhecido.

Aqui, nós identificamos a interação entre as proteínas Id1 e USF2, interação esta ainda não reportada na literatura.

Os fatores de transcrição conhecidos como “Upstream Stimulatory Factors” (USFs) foram originalmente identificados no extrato nuclear de células HeLa. Duas proteínas com massas moleculares aparentes de 43 e 44 kDa foram obtidas destas células e nomeadas como USF1 e USF2, respectivamente ^[104]. A família destes fatores de transcrição é caracterizada pelo domínio de ligação ao DNA altamente conservado “basic-helix-loop-helix-leucine zipper” (bHLH-zip), que reconhece os sítios de ligação consenso “CACGTG” ^[103].

Tanto USF1 como USF2 estão implicados no controle de proliferação celular, tendo papel essencial durante o desenvolvimento embrionário ^[110]. Curiosamente os USFs também pertencem à uma sub-classe de bHLHs, e como tal reconhecem os chamados sítios “E-box”, porém com diferenças determinantes com relação aos sítios reconhecidos por outros bHLHs, como a já mencionada família das E-proteínas. Estas diferenças estão relacionadas a especificidade destes sítios, o sítio E-box para as E-proteínas é constituído pela sequência “CANNTG”, sendo N qualquer nucleotídeo; já o sítio E-box para USF2 apresenta uma sequência maior e com um núcleo não variável representado por AGGTCACGTG. Dada a premissa de Id1 tratar-se de uma proteína “HLH”, que portanto não apresenta o domínio básico que permitiria a ligação direta ao DNA, a hipótese mais coerente da potencial interação física com USF2, em um mecanismo em que Id1 sequestra USF2, foi confirmada pelos ensaios de (co)imunoprecipitação.

A expressão de USF2 já havia sido demonstrada em células mesangiais ^[111-115], e aparenta estar diretamente relacionada com o desenvolvimento de doenças renais crônicas, incluindo a nefropatia diabética. Sua expressão encontra-se aumentada sob condições de altas concentrações de glicose; além disso, trabalhos indicam que a atividade de TGFβ é estimulada pelo fator USF2 ^[112-115].

A análise da atividade transcricional de USF2 revelou que TGFβ-1 aumenta, enquanto que BMP-4 ou a superexpressão de Id1 diminui a atividade de USF2. Sugerimos que esta ação inibitória de BMP ocorra pela suprarregulação da expressão de Id1, já demonstrada por nós neste mesmo modelo. Adicionalmente, verificamos que o tratamento com TGFβ-1 induz a expressão de USF2, refletindo uma modulação transcricional.

Recente publicação também demonstrou a suprarregulação transcricional da expressão de USF2 induzida por produtos avançados de glicosilação (AGEs) em células mesangiais de rato, processo mediado por região responsiva ao fator NF- κ B^[116], um fator de transcrição dimérico, que apresenta importante papel nas doenças renais^[117], principalmente ao que se refere a processos inflamatórios; além de que vale ressaltar que NF- κ B também é estimulado pelo TGF β .

O fator de crescimento TGF β é secretado pela maioria das células em sua forma inativa, nomeada como TGF β -latente, a qual necessita ser ativada para exibir seus efeitos biológicos. Está demonstrado que a proteína de matriz extracelular trombospondina-1 (THBS1 ou TSP1) é um dos principais ativadores de TGF β -latente^[118]. A THBS1 é uma das cinco isoformas existentes da trombospondina e é sintetizada e secretada por uma variedade de células renais, incluindo as células mesangiais. A exposição a alta concentração de glicose suprarregula a expressão de THBS1 em CMs, tanto em glomérulos de modelos animais diabéticos como em pacientes com nefropatia diabética. Além disso, estudos demonstram que camundongos nocaute para THBS1 apresentam fenótipo similar a camundongos nocaute para TGF β , sugerindo importante papel deste mecanismo de ativação *in vivo*^[23]. Outros trabalhos utilizando células mesangiais humanas confirmam a transformação de TGF β -latente em ativo através de THBS1, e descrevem a expressão de THBS1 aumentada via regulação pelo fator USF2^[110,115]. Nossos dados confirmam que tanto o tratamento com TGF β -1 quanto a super-expressão de USF2 modulam positivamente a expressão de THBS1 em células mesangiais humanas imortalizadas. A partir desses dados, sugerimos a existência de uma alça de “feedback” positivo, em que TGF β induz a expressão de THBS1, mediada por USF2, na qual THBS1, por sua vez, transforma mais TGF β -latente em sua forma ativa, desencadeando um ciclo “vicioso” que contribui para o acúmulo de proteínas de MEC e consequentemente para a progressão do dano renal glomerular (Figura 28). Essa hipótese necessita de experimentação adicional para avaliação de suas implicações *in vitro* e, principalmente, *in vivo*.

Figura 28. Esquema representativo sumarizando a regulação positiva de THBS1 induzida pela ação de TGF β mediada pela suprarregulação de USF2. Notar a alça de “feedback” positiva sugerida para a ativação de TGF β pela THBS1.

Por outro lado, o tratamento das células com BMP-4 e como consequência o aumento na expressão de ID1 apresenta efeito contraposto ao TGF β , efeito este traduzido na inibição da atividade do fator USF2 (Figura 29), sendo este um dado totalmente novo.

Figura 29. Esquema representativo mostrando a supregulação de ID1 induzida por BMP, e a inibição da atividade de USF2.

O papel antagônico das BMPs com relação aos efeitos pró-fibróticos do TGF β nos rins já está bem estabelecido na literatura. Sugimoto, et al. (2007)^[70] demonstraram que o tratamento utilizando BMP-7 em conjunto com inibidores de AGEs (produtos avançados finais de glicosilação) promovem a inibição e mesmo a regressão de lesões glomerulares em modelos de camundongos diabéticos por injeção de streptozotocina. Neste estudo, BMP-7 mostrou-se eficaz tanto na inibição da inflamação tubular quanto da fibrose túbulo-intersticial. De maneira semelhante, Zeisberg et al. (2003, 2005)^[72,73] reportaram que a administração de BMP-7 recombinante humano inibe a progressão da doença renal crônica, exercendo efeitos antifibróticos em modelos de ratos com obstrução ureteral unilateral ou com nefropatia diabética.

Similarmente, trabalhos mostram que a citocina anti-fibrótica HGF é capaz de prevenir a fibrose tecidual renal após danos crônicos ^[119,120]. A administração de HGF reduz a perda de função renal, enquanto o bloqueio de sua sinalização exacerba a extensão e progressão da fibrose renal. Assim como a BMP-7; HGF e TGF β mostram ter uma correlação antagônica: HGF inibiu a transição epitélio-mesenquimal (EMT) induzida por TGF β , e promoveu melhora das lesões fibróticas em numerosos modelos de doença renal ^[120]. Porém, os mecanismos moleculares que medeiam tais efeitos protetivos ainda permanecem desconhecidos.

Interessantemente, verificamos BMP-4 apresentando o maior efeito com relação a regulação de *ID1*, com consequente inibição da atividade de USF2, sugerindo um papel protetor de BMP-4 nos rins semelhante a BMP-7. Trabalhos recentes reforçam esta constatação. Otani et al. (2007) ^[121] apresentam BMP-4 e -7 inibindo a proliferação em células mesangiais induzida pela aldosterona, melhorando o dano renal glomerular. McKnight et al. (2010)^[122] mostram correlação entre mutações pontuais no gene de BMP-4 com o desenvolvimento de nefropatia em pacientes com diabetes mellitus tipo I.

Embora o uso de BMP exógeno não tenha se mostrado tóxico nos casos supracitados, essas proteínas, assim como o TGF-beta, são fatores de crescimento com atividade pleiotrópica, ou seja, exercem inúmeras funções em diferentes tecidos. Sendo assim, reforço ou supressão destes como forma de intervenção terapêutica são potencialmente deletérias, por conta de efeitos sistêmicos não desejados.

Portanto, enfatiza-se a importância do estudo e descoberta de moléculas “downstream” de ambas as vias, que possam vir a ser potenciais alvos terapêuticos mais específicos.

Além dos mecanismos que promovem fibrose durante o estabelecimento e manutenção das doenças renais crônicas, destacam-se também eventos celulares envolvendo morte por apoptose e/ou necrose. Embora a apoptose de células mesangiais já tenha sido observada nos processos patológicos como a nefropatia diabética^[123,124], o foco principal dos estudos na área ainda residem na análise de fatores envolvidos no controle de produção e degradação de matriz extracelular; sendo ainda pouco compreendidos os mecanismos moleculares que governam o processo de morte das células mesangiais glomerulares.

Aqui, demonstramos que TGF β -1 é capaz de induzir apoptose em CM humanas. Em concordância com nossos dados, outros trabalhos já mostraram TGF β -1 promovendo morte em diversos tipos celulares, incluindo as CM. Em um cenário mimetizando a nefropatia diabética, foi demonstrado que um ambiente com alta concentração de glicose sensibiliza as CM aos efeitos deletérios de TGF β -1, com subsequente alteração da razão de expressão dos genes *BAX:Bcl2*, favorecendo a ativação da caspase-3 e aumento nas taxas de apoptose^[125].

Kang, et al. (2003)^[126] propôs uma via de apoptose induzida pela glicose em CM humanas e murinas caracterizada pelo aumento da razão *BAX:Bcl2* através de mecanismos redox-dependentes. Adicionalmente, estudos distintos demonstram que a apoptose em CM induzida por TGF β é mediada por Smad7 e consequente ativação de caspase-3^[127], ou ainda pela caseína quinase-2, a qual fosforila e ativa a proteína pró-apoptótica p53^[128]. Nossos dados complementam tais dados e mostram que a morte celular em CM induzida por TGF β -1 é mediada por BAX, é dependente do fator USF2, sendo que até o momento não havia evidências do papel de USF2 no processo de apoptose de CM. Além disso, apesar do já estabelecido papel antagonico das BMPs ao TFG β , o papel e mecanismo destas proteínas com relação a regulação de morte em CM, particularmente em condições patológicas, também ainda necessitam serem melhor definidos.

Recente estudo utilizando células mesangiais de camundongo sugere que a manutenção da atividade de BMP-7 pelo silenciamento do gene Gremlin (um antagonista de BMP) protege as células de anormalidades e alterações induzidas pela alta concentração de glicose, incluindo morte por apoptose e o aumento na

produção e acúmulo de colágeno tipo IV ^[129]. Outro trabalho indicou que BMP-7, através da ativação de Smad5, atua como um fator de diferenciação e sobrevivência para podócitos, reduzindo a taxa de apoptose destas células que ocorre durante a fase precoce do dano renal diabético^[130]. Em oposição, a apoptose de CM é descrita como ocorrendo em um período mais tardio da doença ^[125,126].

Nosso estudo suporta a idéia de que BMP, a partir da supra-regulação de *ID1*, exerce um efeito protetor frente ao dano glomerular induzido pela ação do TGFβ-1, não apenas por prevenir a produção e deposição de matriz extracelular, mas também por reduzir as taxas de morte celular no mesângio.

O fator USF2 apresenta-se como um potencial candidato para alvo terapêutico na manipulação e tratamento durante a progressão da nefropatia diabética. As consequências do silenciamento de USF2 *in vivo* ainda necessitam serem avaliadas. Adicionalmente, a possível utilização de USF2 como alvo terapêutico depende enormemente da demonstração de que esta sua ação aqui demonstrada é célula-específica, além de seletiva para a produção de matriz e apoptose de células glomerulares.

A seguir a Figura 30 sumariza os dados e achados apresentados neste trabalho. As moléculas *ID1* bem como USF2 mostram-se promissoras como futuros marcadores e/ou alvos moleculares na nefropatia e glomerulosclerose diabética; porém estudos complementares além do escopo desta tese, particularmente estudos *in vivo*, são necessários para definir e avaliar os achados aqui descritos.

Figura 30. Esquema representativo de uma nova via envolvida no controle da apoptose em células mesangiais humanas.

6 CONCLUSÕES

Como conclusões gerais desta tese, temos:

1. No presente trabalho indicamos que Id1 interage com o fator de transcrição USF2, inibindo sua atividade transcricional, apresentando um mecanismo de ação particular em células mesangiais;
2. USF2 e TGF β -1 modulam a expressão de genes diretamente relacionados com a fibrose e a morte de células mesangiais;
3. BMPs, pela suprarregulação de Id1, apresentam um papel protetor em relação à apoptose em células mesangiais humanas, inibindo os efeitos de TGF β -1 bem como a atividade de USF2;

Em suma, nossos resultados demonstram uma nova via molecular envolvida na patogênese de doenças glomerulares, provendo bases para futuros estudos em relação à prevenção da progressão destas doenças.

REFERÊNCIAS*

1. Vaughan MR, Quaggin SE. How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(1):24-33.
2. Marshall CB, SJ Shankland. Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;102(2):39-48.
3. Mc'ligeyo SO. The Kidney: An important target for HIV infection. *Afr J Health Sci*. 1998;5(1-2):63-6.
4. Wen YK, Chen ML. The significance of atypical morphology in the changes of spectrum of postinfectious glomerulonephritis. *Clin Nephrol*. 2010;73(3):173-9.
5. Sun N, Shen Y, He LJ. Histopathological features of the kidney after acute renal failure from melamine. *N Engl J Med*. 2010;362(7):662-4.
6. Spek CA, Bruggemann LW, Borensztajn KS. Protease-activated receptor 2 blocking peptide counteracts endotoxin-induced inflammation and coagulation and ameliorates renal fibrin deposition in a rat model of acute renal failure. *Shock*. 2010;33(3):339-40.
7. Woo KT, Wong KS, Chan CM. Clinical trials of the past decade in the management of chronic kidney disease. *Rev Recent Clin Trials*. 2009;4(3):159-62.
8. Bohle A, Kressel G, Müller CA, Müller GA. The pathogenesis of chronic renal failure. *Pathol Res Pract*. 1989;185(4):421-40.
9. Wahba IM, Mak RH. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(3):550-62.
10. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):2034-47.

*De acordo com:

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

11. Lindholm B, Wang T, Heimbürger O, Bergström J. Influence of different treatments and schedules on the factors conditioning the nutritional status in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(Suppl 6):66-73.
12. Wright J, Hutchison A. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:713-22.
13. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002;288(20):2579-88.
14. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(Suppl 1):S55-7.
15. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH et al. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(Suppl 1):S79-83.
16. Vergouwe Y, Soedamah-Muthu SS, Zgibor J, Chaturvedi N, Forsblom C, Snell-Bergeon JK et al. Progression to microalbuminuria in type 1 diabetes: development and validation of a prediction rule. *Diabetologia*. 2010;53(2):254-62.
17. Gerth J, Cohen CD, Hopfer U, Lindenmeyer MT, Sommer M, Gröne HJ et al. Collagen type VIII expression in human diabetic nephropathy. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(10):767-73.
18. Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizarra P, Mallavia B, Flores C et al. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(5):763-72.
19. Brownlee M. Preventing kidney cell suicide. *Nat Med*. 2007;13(11):1284-85.
20. Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*. 2008;74(1):22-36.
21. Zhang Z, Peng H, Chen J, Chen X, Han F, Xu X et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice. *FEBS Lett*. 2009;583(12):2009-14.
22. Min D, Lyons JG, Bonner J, Twigg SM, Yue DK, McLennan SV. Mesangial cell-derived factors alter monocyte activation and function through inflammatory

pathways: possible pathogenic role in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(5):1229-37.

23. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1358-73.

24. Brosius FC, 3rd. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9(4):245-54.

25. Miyauchi M, Toyoda M, Kobayashi K, Abe M, Kobayashi T, Kato M et al. Hypertrophy and loss of podocytes in diabetic nephropathy. *Intern Med.* 2009. 48(18):1615-20.

26. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2005;54(6):1626-34.

27. Johnson RJ, Floege J, Yoshimura A, Lida H, Couser WG, Alpers Ce. The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"? *J Am Soc Nephrol.* 1992; 2(10 Suppl):S190-97.

28. Herrera GA. Plasticity of mesangial cells: a basis for understanding pathological alterations. *Ultrastruct Pathol.* 2006;30(6):471-9.

29. Sinuani I, Beberashvili I, Averbukh Z, Cohn M, Gitelman I, Weissgarten J. Mesangial cells initiate compensatory tubular cell hypertrophy. *Am J Nephrol.* 2010; 31(4):326-31.

30. Abboud HE. Growth factors and the mesangium. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2(Suppl 10):S185-9.

31. Schlondorff D. Roles of the mesangium in glomerular function. *Kidney Int.* 1996; 49(6):1583-85.

32. Stockand JD, Sansom SC. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol Rev.* 1998;78(3):723-44.

33. Schlondorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1179-87.

34. Graham S, Ding M, Sours-Brothers S, Yorio T, Ma JX, Ma R. Downregulation of TRPC6 protein expression by high glucose, a possible mechanism for the impaired Ca²⁺ signaling in glomerular mesangial cells in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(4):1381-90.
35. Chan WL, Leung JC, Chan LY, Tam KY, Tang SC, Lai KN. BMP-7 protects mesangial cells from injury by polymeric IgA. *Kidney Int.* 2008;74(8):1026-39.
36. Haneda M, Koya D, Isono M, Kikkawa R. Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1374-82.
37. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390(6659):465-71.
38. Hills CE, Squires PE. TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2010;31(1):68-74.
39. Osman B, Doller A, Akool el-S, Holdener M, Hintermann E, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Rapamycin induces the TGFbeta1/Smad signaling cascade in renal mesangial cells upstream of mTOR. *Cell Signal.* 2009;21(12):1806-17.
40. Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, Poncelet AC. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(2):243-52.
41. Kim SI, Kwak JH, Na HJ, Kim JK, Ding Y, Choi ME. Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF-beta receptor kinase activity in mesangial cells. *J Biol Chem.* 2009;284(33):22285-96.
42. Mulder KM. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(1-2):23-35.
43. Chin BY, Mohsenin A, Li SX, Choi AM, Choi ME. Stimulation of pro-alpha(1)(I) collagen by TGF-beta(1) in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(3):495-504.
44. Wang L, Zhu Y, Sharma K. Transforming growth factor-beta1 stimulates protein kinase A in mesangial cells. *J Biol Chem.* 1998;273(14):8522-27.

45. Luo K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(1):65-70.
46. Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Oda T et al. Ubiquitin-dependent degradation of SnoN and Ski is increased in renal fibrosis induced by obstructive injury. *Kidney Int.* 2006;69(10):1733-40.
47. Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem.* 1988;263(16):7741-46.
48. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994;331(19):1286-92.
49. Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13586-93.
50. Poncelet AC, de Caestecker MP, Schnaper HW. The transforming growth factor-beta/SMAD signaling pathway is present and functional in human mesangial cells. *Kidney Int.* 1999;56(4):1354-65.
51. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 2006;70(11):1914-19.
52. Kato M, Putta S, Wang M, Yuan H, Lanting L, Nair I et al. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol.* 2009;11(7):881-89.
53. Fukuda N, Tahira Y, Matsuda H, Matsumoto K. Transforming growth factor-beta as a treatment target in renal diseases. *J Nephrol.* 2009;22(6):708-15.
54. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99-146.
55. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Löwik CW, ten Dijke P. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci.* 2007; 120:964-72.

56. Scherner O, Meurer SK, Tihaa L, Gressner AM, Weiskirchen R. Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem*. 2007;282(19):13934-43.
57. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004;22(4):233-41.
58. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. 1996;10(13):1580-94.
59. Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(4):1093-97.
60. Zhang AS, Gao J, Koeberl DD, Enns CA. The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *J Biol Chem*. 2010;285(22):16416-23.
61. Vukicevic S, Kopp JB, Luyten FP, Sampath TK. Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(17):9021-26.
62. Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*. 1995;9(22):2808-20.
63. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev*. 1995;9(22):2795-807.
64. Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS et al. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol*. 1999;276:382-89.
65. Wang SN, Lapage J, Hirschberg R. Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(11):2392-99.

66. Hruska KA, Guo G, Wozniak M, Martin D, Miller S, Liapis H et al. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279(1):130-43.
67. Morrissey J, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(Suppl 1):S14-21.
68. Lin J, Patel SR, Cheng X, Cho EA, Levitan I, Ullenbruch M et al. Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease. *Nat Med*. 2005;11(4):387-93.
69. Miyazaki Y, Ueda H, Yokoo T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T et al. Inhibition of endogenous BMP in the glomerulus leads to mesangial matrix expansion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(2):681-8.
70. Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenetic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes*. 2007;56(7):1825-33.
71. Okada H, Kalluri R. Recapitulation of kidney development paradigms by BMP-7 reverses chronic renal injury. *Clin Exp Nephrol*. 2005;9(2):100-1.
72. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenetic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8094-100.
73. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Müller GA, Kalluri R. Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(6):1060-7.
74. Langlands K, Yin X, Anand G, Prochownik EV. Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem*. 1997;272(32):19785-93.
75. Tournay O, Benezra R. Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(5):2418-30.

76. Lee SU, Song HO, Lee W, Singaravelu G, Yu JR, Park WY. Identification and characterization of a putative basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor interacting with calcineurin in *C. elegans*. *Mol Cells*. 2009;28(5):455-61.
77. Viñals F, Reiriz J, Ambrosio S, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression. *EMBO J*. 2004;23(17):3527-37.
78. Wong YC, Wang X, Ling MT. Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis*. 2004;9(3):279-89.
79. Finkel T, Duc J, Fearon ER, Dang CV, Tomaselli GF. Detection and modulation in vivo of helix-loop-helix protein-protein interactions. *J Biol Chem*. 1993;268(1):5-8.
80. Forrest S, McNamara C. Id family of transcription factors and vascular lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(11):2014-20.
81. Hasskarl J, Munger K. Id proteins--tumor markers or oncogenes? *Cancer Biol Ther*. 2002;1(2):91-6.
82. Riechmann V, van Cruchten I, Sablitzky F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(5):749-55.
83. Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol*. 2002;190(1):21-8.
84. Semov A, Marcotte R, Semova N, Ye X, Wang E. Microarray analysis of E-box binding-related gene expression in young and replicatively senescent human fibroblasts. *Anal Biochem*. 2002;302(1):38-51.
85. Bounpheng MA, Melnikova IN, Dimas JJ, Christy BA. Identification of a novel transcriptional activity of mammalian Id proteins. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(7):1740-6.
86. Yang Y, Liou HC, Sun XH. Id1 potentiates NF-kappaB activation upon T cell receptor signaling. *J Biol Chem*. 2006;281(46):34989-96.

87. Sun XH, Copeland NJ, Jenkins NA, Baltimore D. Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol.* 1991;11(11):5603-11.
88. Gupta GP, Perk J, Acharyya S, de Candia P, Mittal V, Todorova-Manova K et al. ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19506-11.
89. Roberts EC, Deed RW, Inoue T, Norton JD, Sharrocks AD. Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol.* 2001;21(2):524-33.
90. Zhang H, Lawson WE, Polosukhin VV, Pozzi A, Blackwell TS, Litingtung Y, Chiang C. Inhibitor of differentiation 1 promotes endothelial survival in a bleomycin model of lung injury in mice. *Am J Pathol.* 2007;171(4):1113-26.
91. Makita J, Kurooka H, Mori K, Akagi Y, Yokota Y. Identification of the nuclear export signal in the helix-loop-helix inhibitor Id1. *FEBS Lett.* 2006;580(7):1812-16.
92. Nishiyama K, Takaji K, Uchijima Y, Kurihara Y, Asano T, Yoshimura M et al. Protein kinase A-regulated nucleocytoplasmic shuttling of Id1 during angiogenesis. *J Biol Chem.* 2007;282(23):17200-9.
93. Nishiyama K, Takaji K, Takaoka K, Kurihara Y, Yoshimura M, Kato A et al. Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis. *Circulation.* 2005;112(18):2840-50.
94. Doran AC, Meller N, Cutchins A, Deliri H, Slayton RP, Oldham SN et al. The helix-loop-helix factors Id3 and E47 are novel regulators of adiponectin. *Circ Res.* 2008;103(6):624-34.
95. Coppe JP, Smith AP, Desprez PY. Id proteins in epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2003;285(1):131-45.
96. Jen Y, Manova K, Benezra R. Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn.* 1996;207(3):235-52.

97. Li Y, Yang J, Luo JH, Dedhar S, Liu Y. Tubular epithelial cell dedifferentiation is driven by the helix-loop-helix transcriptional inhibitor Id1. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(2):449-60.
98. Simonson MS, Rooney A, Herman WH. Expression and differential regulation of Id1, a dominant negative regulator of basic helix-loop-helix transcription factors, in glomerular mesangial cells. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(24):5767-74.
99. Imabayashi T, Iehara N, Takeoka H, Uematsu-Yanagita M, Kataoka H, Nishikawa S et al. Expression of basic helix-loop-helix proteins in the glomeruli. *Clin Nephrol.* 2001;55(1):53-8.
100. Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, Harada T, Takaoka K, Kato H et al. Comparative roles of Twist-1 and Id1 in transcriptional regulation by BMP signaling. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 8):1350-7.
101. Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Alba MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* 2002;18(2):333-4.
102. Farré D, Roset R, Huerta M, Adsuar JE, Roselló L, Alba MM, Messeguer X. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3651-3.
103. Luo X, Sawadogo M. Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(3):1308-13.
104. Yan S, Sloane BF. Isolation of a novel USF2 isoform: repressor of cathepsin B expression. *Gene.* 2004;337:199-206.
105. Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res.* 2005;18(5):337-48.
106. Barone MV, Pepperkok R, Peverali FA, Philipson L. Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91:4985-8.
107. Hara E, Yamaguchi T, Nojima H, Ide T et al. Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry.* 1994;269:2139-45.

108. Lee TK, Man K, Ling MT, Wang XH et al. Over-expression of Id-1 induces cell proliferation in hepatocellular carcinoma through inactivation of p16INK4a/RB pathway. *Carcinogenesis*. 2003;24:1729-36.
109. Chaudhary J, Sadler-Rigglesman I, Ague JM, Skinner MK. The Helix-Loop-Helix Inhibitor of Differentiation Proteins Induce Post-Mitotic Terminally Differentiated Sertoli Cells to Re-Enter the Cell Cycle and Proliferate. *Biol Reprod*. 2005; 72(5):1205-17.
110. Qyang Y, Luo X, Lu T, Ismail PM, Krylov D, Vinson C, Sawadogo M. Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1999;19(2):1508-17.
111. Gupta AK, Kone BC. USF-1 and USF-2 trans-repress IL-1 β -induced iNOS transcription in mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(4):1065-72.
112. Wang S, Skorczewski J, Feng X, Mei L, Murphy-Ullrich JE. Glucose up-regulates thrombospondin 1 gene transcription and transforming growth factor- β activity through antagonism of cGMP-dependent protein kinase repression via upstream stimulatory factor 2. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34311-22.
113. Zhu Y, Casado M, Vaulont S, Sharma K. Role of upstream stimulatory factors in regulation of renal transforming growth factor- β 1. *Diabetes*. 2005;54(7):1976-84.
114. Liu S, Shi L, Wang S. Overexpression of upstream stimulatory factor 2 accelerates diabetic kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(5):1727-35.
115. Shi L, Liu S, Nikolic D, Wang S. High glucose levels upregulate upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells. *J Cell Biochem*. 2008; 103(6):1952-61.
116. Li Y, Wang S. Glycated albumin upregulates upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299:121-7.
117. Otani H, Otsuka Fumio. Antagonistic effects of bone morphogenetic protein-4 and -7 on renal mesangial cell proliferation induced by aldosterone through MAPK activation. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2007;292:1513-25.

118. Wang S, Lincoln TM, Murphy-Ullrich JE. Glucose downregulation of PKG-I protein mediates increased thrombospondin1-dependent TGF- β activity in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(5):1188-97.
119. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:96–107.
120. Yang J, Dai C, Liu Y. Systemic administration of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal fibrosis in mice. *Gene Ther*. 2001;8:1470–9.
121. Otani H, Fumio O. Antagonistic effects of bone morphogenetic protein-4 and -7 on renal mesangial cell proliferation induced by aldosterone through MAPK activation. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2007;292:1513-25.
122. McKnight AJ, Pettigrew KA, Patterson CC, Kilner J, Sadlier DM, Maxweel AP et al. Investigation of the association of BMP gene variants with nephropathy in type I diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2010;27(6):624-30.
123. Santini E, Lupi R, Baldi S, Madec C, Chimenti D, Ferrannini E, Solini A. Effects of different LDL particles on inflammatory molecules in human mesangial cells. *Diabetologia*. 2008;51(11):2117-25.
124. Hornigold N, Craven RA, Keen JN, Johnson T, Banks RE, Mooney AF. Upregulation of Hic-5 in glomerulosclerosis and its regulation of mesangial cell apoptosis. *Kidney Int*. 2010;77(4):329-38.
125. Khera T, Martin J, Riley S, Steadman R, Phillips AO. Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Lab Invest*. 2006;86(6):566-77.
126. Kang BP, Frencher S, Reddy V, Kessler A, Malhotra A, Meggs LG. High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(3):455-66.
127. Okado T, Terada Y, Tanaka H, Inoshita S, Nakao A, Sasaki S. Smad7 mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int*. 2002;62(4):1178-86.

128. Negulescu O, Bognar I, Lei J, Devarajan P, Silbiger S, Neugarten J. Estradiol reverses TGF-1-induced mesangial cell apoptosis by a casein kinase 2-dependent mechanism. *Kidney Int.* 2002;62:1989–98.
129. Zhang Q, Shi Y, Wada J, Malakauskas SM, Liu M, Ren Y, Du C, Duan H, Li Y, Zhang Y. In vivo delivery of gremlin siRNA plasmid reveals therapeutic potential against diabetic nephropathy by recovering bone morphogenetic protein-7. *Plos One.* 2010;5(7):1-13.
130. Mitu GM, Wang S, Hirschberg R. BMP7 is a podocyte survival factor and rescues podocytes from diabetic injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:1641-48.

ANEXO – Manuscrito submetido

Simões Sato AY, Antonioli E, Tambellini R, Campos AH. **ID1 inhibits USF2 and blocks TGF- β -induced apoptosis in mesangial cells.** Kidney International.

ID1 inhibits USF2 and blocks TGF- β -induced apoptosis in mesangial cells

Alex Yuri Simões Sato^{1,2}; Eliane Antonioli²; Rodrigo Tambellini³; and Alexandre Holthausen Campos²

1. Department of Physiology and Biophysics, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, Brazil; 2. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil; 3. Nephrology Division, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Mesangial cells (MC) play an essential role in normal function of the glomerulus. Phenotypic changes in MC lead to the development of glomerular diseases such as diabetic nephropathy and glomerulosclerosis. The late phase of diabetic glomerulopathy is characterized by MC death and fibrosis. Current data highlight the growth factor TGF- β as a trigger of the pathological changes observed in MC, including death by apoptosis. However, the mechanisms and mediators involved in this process are still poorly understood. Identification of novel elements involved in MC death may provide a better understanding of the pathophysiology of glomerular diseases. Here we show that BMPs (known antagonists of the profibrotic effects of TGF- β in the kidney) strongly induce ID1 (Inhibitor of DNA Binding) mRNA transcription and protein expression in human MC. ID genes have been implicated in cell survival control and are constitutively expressed in MC. We show that BMPs and ID1 exert an anti-apoptotic effect in MC by inhibition of USF2 transcriptional activity. On the other hand, TGF- β upregulates USF2, increasing BAX (pro-apoptotic gene) levels and apoptosis rates. Taken together, our results point to a novel molecular pathway that modulates MC apoptosis, which is potentially involved in the pathogenesis of glomerular diseases.

Introduction

Diabetes is a leading cause of end-stage renal disease, which is associated with high morbidity and mortality rates^{1,2}. The late phase of diabetic nephropathy is characterized by loss of resident glomerular cells, a process that correlates with a decline in glomerular filtration rate³. Apoptosis leads to the elimination of mesangial cells (MC) associated with progressive glomerulosclerosis^{4,5,32}. It has been shown that loss of glomerular cells through apoptosis occurs in experimental diabetic nephropathy⁶, whereas MC apoptosis has been shown to correlate with worsening of albuminuria⁷. In overt nephropathy, expansion of the mesangial matrix, loss of MC, and glomerular sclerosis are associated with proteinuria, hypertension, and renal dysfunction^{8,9}. In biopsy specimens from patients with IgA nephropathy and systemic lupus erythematosus, the number of apoptotic glomerular cells correlates with the glomerulosclerosis index and loss of renal function¹⁰. The increase in apoptotic glomerular cells in diabetes is not a consequence of inflammatory injury, but of a direct stimulation of proapoptotic pathways in MC¹¹. It has been shown that TGF- β induces apoptosis in MC^{11,12,32} and modulates the expression or activity of various components of apoptotic pathways. TGF- β 1 induces apoptosis in MC by reducing Bcl-2 and increasing Bax levels in mouse MC^{11,12}.

The bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the TGF- β superfamily and antagonists of the profibrogenic effect of TGF- β 1 in the kidney¹³⁻¹⁶. Several studies suggest a therapeutic role for BMPs in renal disease. Administration of BMP7 restores, at least in part, renal morphology and function¹⁷. However, while the anti-fibrogenic action of BMPs is well established, there are no studies on the action of BMPs on MC apoptosis.

MC activation by growth factors, mainly TGF- β , triggers the pathological alterations observed in these cells, such as increase in proliferation, hyperplasia, fibrosis, and death, whereas blockade of specific systems tends to attenuate the glomerular damage^{3,18}. However, little is known regarding intermediate and more downstream players, specifically those concerning MC apoptosis.

Previous observations done in our laboratory using DNA microarray technology (10,000 probes tested) revealed that serum upregulates genes of the Inhibitor of DNA Binding (ID) family in human MC. ID genes are classically described as dominant negatives of E-proteins, inhibiting their binding to DNA consensus sequences named E-boxes. ID genes have been implicated in diverse cellular processes, including apoptosis, in various cell types¹⁹⁻²⁶.

This study investigates the role of ID1 in MC apoptosis. Here we show that BMPs rapidly induce ID1 expression in MC. ID1 was responsible for the anti-apoptotic effect of BMPs in MC by inhibiting the transcriptional activity of the TGF β 1-regulated factor, namely USF2, which increases transcriptional activity and mRNA levels of BAX.

Methods:

Cell culture and treatment

Immortalized human MC (hMCi) were kindly provided by Dr. Bernhard Banas (Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany), and grown in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Serum-starved hMCi were treated with TGF β 1 (2ng/ml) and BMP-4 (1ng/ml) or 7 (5ng/ml) for various periods of time. Next, cells were collected for qPCR, western blotting, and gene reporter assays (see details below).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assays were performed as described previously^{27,28}. Formaldehyde was added at a final concentration of 1% directly to cell cultures. Fixation was carried out at 37°C for 10 min and then stopped by the addition of glycine to a final concentration of 0.125 M. hMCi were collected and rinsed in cold PBS. Cell pellets were resuspended in swelling buffer plus proteinase inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and incubated in ice for 20 min. The nuclei were collected and then resuspended in sonication buffer plus protease inhibitors and incubated in ice for 10 min. Cells were sonicated (Sonics VCX 130, NewTown, CT, USA) in ice at a setting of 40% for 10 pulses, 20s, to obtain DNA fragments with a range of length of approximately 200-1000 bp. The chromatin solution was precleared with the addition of protein A/G-plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 15 min at 4°C. Precleared chromatin from hMCi was incubated with 1 μ g of anti-Id1 mouse monoclonal antibody (Sigma, Saint Louis, MO, USA) or non-immune IgG (sc-2027, Santa Cruz) and rotated at 4°C for approximately 12 to 16h. Immunoprecipitation, washing, and elution of immune complexes were performed as previously described. Cross-links were reversed by the addition of NaCl to a final concentration of 5M. RNA and proteins were removed by the addition of 1 μ l of RNaseA (10mg/ml) per sample (37°C for 30 min), and 20 μ l of TE buffer plus 1.5 μ l of Proteinase K (20mg/ml) (45°C for 1h). Samples were extracted

and purified with the Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA). Finally, DNA fragments were amplified, cloned into *E.coli*, and sequenced. Sequence analysis employed free-access bioinformatics tools UCSC Human BLAT search, Aliggen-PROMO^{29,30} and BIOBASE.

Construction of ID1 overexpression vector

Id1-overexpressing adenoviral vector was built with the ViralPower Adenoviral Expression System (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Human full-length coding sequence of ID1 cDNA was cloned into the pAd/CMV/V5-DEST (confirmed by DNA sequencing). Adenoviral stocks were obtained by transfection of 5×10^6 293A cells with 5 μ g of vector in Opti-MEM-I without antibiotics. Cells were cultured for 72 h and culture medium was collected, centrifuged at 4°C, 3000 rpm for 15 min, and stored at -80°C. Adenoviral stocks were titrated in 293A cells. Adenoviral vector LacZ expressing β -galactosidase was used as control. For apoptosis and gene reporter assays, MC were infected with Ad-ID1 or Ad-LacZ at MOI 60, obtained from previous dose-response experiments (data not shown).

Chromatin morphology analysis

hMCi overexpressing ID1 were cultured in 6-well plates and deprived from serum for 24 h in a subconfluent stage, when Hoechst 33342 (0.5 μ g/ml, Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) was added to the medium. Adherent and floating cells were collected and analyzed under UV fluorescence microscopy (x400). Apoptosis was evaluated according to chromatin morphology³¹. Two hundred cells per sample were counted. Results were expressed as percentage of apoptotic cells.

Plasmids

pDsRed1-Mito (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA) transcribes a red-fluorescent protein. The PU3ML-Luc luciferase construct was a gift from Dr. Leslie Heckert from University of Kansas (USA) with the formal consent of Dr. Michèle Sawadogo from MD Anderson Cancer Center/University of Texas (USA). This reporter plasmid contains three repetitions of consensus binding sites to USF transcription factors. (5'-GATCCTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCA-3'). The expression vectors pcDNA3.1, pUSF1, and pUSF2 were kindly donated by Dr. A. Verhoeven (Erasmus MC, Rotterdam, Netherlands). BAX-Promoter luciferase plasmid and its respective control pGL3-basic were kindly donated by Dr. Moshe Oren (Department of Molecular Cell Biology, Weizmann

Institute of Science, Rehovot, Israel). Briefly, an insert of 370 bp corresponding to BAX promoter was cloned into KpnI and SacI restriction sites of the pGL3-basic luciferase reporter vector (Promega, Madison, USA).

Quantitative Real Time-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA from cell pellets was extracted (Illustra RNAspin MiniRNA Isolation Kit, GE) and reverse transcriptase reaction (ImpromII, Promega) was performed. QRT-PCR was carried out using the ABI7500 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) and the Quantitect SYBR Green I kit (QIAGEN, Düsseldorf, Germany), according to manufacturer's recommendations. Primer sequences and PCR parameters are provided upon request. Expression of target genes was normalized by GAPDH mRNA levels measured concurrently.

Caspase-3 activity assay

Cells were collected as described above (see chromatin morphology analysis). A Caspase-3 Fluorometric Assay Kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was used. Cells were grown in 6-well plates in DMEM, collected, and lysed. Protein concentration was normalized by BCA Protein Assay Kit (BioAgency, Sao Paulo, Brazil). Cell lysates were incubated with the same amounts of reaction buffer and 50 mmol/L DEVD-AFC substrate for two hours at 37°C. Fluorescence was measured with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 460 nm.

Lipid-based transfection

hMCi were seeded in 24-well plates one day before transfection. At a confluence between 40-80% cells were transfected by non-liposomal lipid based technique with the plasmids pU3ML-Luc, pGL3-basic, or BAX-Promoter-Luc using the Effectene Transfection kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection, medium containing transfection reagents was replaced by fresh medium. Cells were serum-starved for 24 h before treatment. TGF- β 1, BMPs, or vehicle were then added to cells. Total duration of all assays was 48 h. Cells were then washed with PBS and prepared for luciferase activity detection.

Electroporation

hMCi were transfected by electroporation with expressor plasmids pcDNA3.1, pUSF1, or pUSF2 using the Multiporator[®] Eppendorf (Hamburg, Germany). Briefly, hMCi cells were detached and resuspended in 1 ml of hyposmolar electroporation buffer (Eppendorf). This suspension was then transferred to 1.5 ml microtubes and DNA added to a final concentration of 10 µg/ml. Cells were transferred to electroporation cuvette and submitted to 3 pulses of 150V, during 100 µsec. Next, cells were seeded in 6-well plates. Twenty-four hours after electroporation, medium was replaced by medium containing 0.5% serum. After a total of 48 h cells were collected and total RNA extracted for further analysis.

Luciferase assay

Luciferase activity was measured in cell lysates through a non-homogeneous assay using Glo-Lysis Buffer and Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, USA), as recommended by the manufacturer. pDsRed1-Mito was co-transfected as an internal control. FARCyte Plate Reader (Amersham/GE, USA) was used for fluorescence (544nm excitation and 595nm emission wavelengths) and luminescence quantitation.

Western blotting

Cell cultures were scrapped in RIPA buffer with 1% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Total protein quantity was measured by BCA Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Samples were loaded and analyzed by Glicine SDS-PAGE (15%). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (0.22 µm) and blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk TBST buffer, incubated overnight with anti-ID1 (WH3397M2, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), anti-USF2 (WH7392M1, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) or for 1 h with anti-β-actin (A1978; Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), and another 1 h with proper secondary HRP-conjugated antibodies (sc-2030; Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA). Membranes were developed through chemiluminescence (ECL plus, GE Healthcare).

Statistical analysis

Comparisons were performed through Student's t test or ANOVA. Results were presented as means $\pm$ SEM. At least 3 different samples were analyzed in each experimental group. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

BMPs 4 and 7 induce fast and potent upregulation of ID genes in MC.

BMPs 4 and 7 induce concentration-dependent upregulation of all ID genes analyzed (Figure 1A and B). ID1 presented the highest fold-changes in mRNA expression levels in all cases. Of note, a concentration as low as 1 ng/mL could produce significant increments in ID mRNA levels. Next, we selected submaximal concentrations for each BMP and performed time-response curves. As shown in Figure 1C and D, regulation induced by BMPs led to maximum ID expression in 1 to 3 h after agonist stimulation. We also evaluated protein expression. As depicted in Figure 1E, ID1 protein levels were markedly elevated after stimulation with BMP4 and BMP7.

Id1 interacts with the transcription factor USF2

ID genes are classically described as dominant negative modulators of E-proteins in a variety of systems. However, our group failed to demonstrate that Id1 interacts with E-proteins E47 and Mash-1 (data not shown). To investigate alternative interactions between Id1 and/or DNA/proteins, ChIP, sequencing, and bioinformatics analysis was performed. A total of 155 clones obtained from DNA fragments immunoprecipitated with Id1 and 65 clones from immunoprecipitation with non-immune IgG were screened. ChIP showed that Id1, but not non-immune IgG, interacts with conserved binding sites for the transcription factor USF2, present (four hits) in three out of five distinct clones (Figure 2A), with significantly high specificity (dissimilarity $\leq 0.52\%$; hit by chance ≤ 0.001). In addition, we performed immunoprecipitation for Id1 followed by western-blot to USF2. These experiments, presented in Figure 2B, confirm data obtained from ChIP and also demonstrate that Id1 interacts physically with USF2.

BMP inhibits USF2 activity through overexpression of ID1 while TGFβ1 increases it

To better characterize the interaction between Id1 and USF2, we performed gene reporter assays by transfecting hMCi with the plasmid pU3ML-Luc, with repeats of USF2 consensus sequences. Cells were previously infected with adenoviruses overexpressing ID1 or LacZ, and treated with TGFβ1 (2ng/ml) and/or BMP-4 (1ng/ml). As shown in Figure 3, treatment with BMP4 significantly reduced USF2 transcriptional activity whereas TGFβ1 increased it. Also, BMP4 blocked TGFβ1 stimulatory effect. Similarly, ID1 overexpression, even in the presence of TGFβ1, significantly (-76%, n=6, p<0.01) decreased USF2 transcriptional activity in hHMc, confirming the potential interaction between Id1 and USF2.

Antagonic roles of TGFβ and BMPs on MC apoptosis

Previous studies have described the induction of apoptosis in MC by TGFβ³². We investigated the effect of BMP-7 and ID1 on TGFβ1-induced hMCi apoptosis. Cell death was evaluated by nuclear morphology and caspase-3 activity. Figure 4A and B shows that, while TGFβ1 increased apoptosis, BMP7 acted as an anti-apoptotic factor in hMCi. In a separate series of experiments, ID1 was overexpressed in hMCi at 24 hours (see Supplemental Figure 1 for confirmatory data on successful infection). Cells were deprived from serum for additional 24 hours and analyzed for apoptosis. As shown in Figure 5A and B, ID1 overexpression prevented apoptosis induced by serum deprivation in hCmi.

TGFβ-1 increases BAX expression and apoptosis through mediation of USF2

According to qPCR experiments, TGFβ-1 (2ng/ml, 24 h) significantly increased USF2 expression (2.24x) (Figure 6A). Bioinformatics analysis using the Algen-PROMO tool revealed three USF2-consensus binding sites in the promoter region of BAX, a well-known pro-apoptotic gene. Accordingly, TGFβ-1 also upregulated BAX expression, as compared to controls (1.82x) (Figure 6B). On the other hand, TGFβ-1 treatment failed to modify Bcl2 mRNA levels (data not shown). To test whether TGFβ-1-induced BAX upregulation was mediated by USF2, gene reporter assays were performed. hCmi were co-transfected with BAX-Promoter-Luc and pUSF2, and treated with TGFβ-1 or vehicle. BAX transcriptional activity was significantly stimulated (7.42x) when USF2 was overexpressed. Similarly, TGFβ-1 treatment also increased the BAX promoter activity (3.25x) (Figure 7). Next, pUSF2 or pcDNA3.1 expression vectors were transfected by electroporation in hMCi cells. Note that USF2 stimulated BAX expression (1.40x) (Figure 8A). It is known that USF2 forms homodimers, or heterodimers with USF1³³⁻³⁵. To verify the role of USF1 on BAX

expression, we transfected cells with pUSF1, pUSF2, or a combination of both at equivalent concentrations. Figure 8A shows that USF1, alone or combined with USF2, did not modify BAX expression, indicating that the regulation observed was mediated by USF2 only. Finally, we tested if USF2 was capable of increasing apoptosis in hCMi. As seen in Figure 8B, USF2 overexpression potentiated serum-deprivation-induced cell death by 23%.

Discussion

Apoptosis is one of the mechanisms of glomerular cell deletion, essential for the development and progression of glomerular diseases^{36,37}. Although apoptosis of glomerular cells (such as MC and podocytes) has been described⁴, most studies have focused mainly on extracellular matrix overproduction/reduced degradation by MC as the primary cause of glomerular capillary destruction⁵⁴⁻⁵⁶. Hence, the characterization of downstream mediators of MC apoptosis is crucial for a better understanding of the pathophysiological processes that affect the glomerulus.

The results presented here show that BMPs act as antiapoptotic agents on MC through upregulation of ID1, which interacts with the transcription factor USF2, inhibiting its activity. On the other hand, we identified increases in USF2 activity, BAX expression levels, and TGF- β 1-mediated apoptosis in MC, whose levels are often elevated in injured glomeruli.

In this study, we show that TGF- β 1 is capable of inducing apoptosis in MC. In agreement with our data, other studies have already shown that TGF- β 1 induces death by apoptosis in various cell lines, including MC^{12,32,39}. In a condition mimetizing diabetic nephropathy, the high ambient glucose sensitizes MC to the effects of TGF- β 1, which subsequently decreases NF- κ B activation and in turn alters the expression ratio of BAX:Bcl2. The latter favors caspase-3 activation and increases apoptosis³⁹. Also, authors proposed a pathway for glucose-induced apoptosis in MC characterized by increased BAX:Bcl2 ratio through redox-dependent mechanisms^{38,40}. This signaling cascade also involves the activity of the heterodimeric transcription factor NF- κ B. In addition, other studies have shown that TGF- β -induced apoptosis in MC is mediated by Smad7 and consequent caspase-3 activation³², or by casein kinase-2, which phosphorylates and activates the pro-apoptotic protein p53¹².

Our results show for the first time that TGF- β 1-induced, BAX-mediated death of MC depends on USF2. USF2 belongs to the myc family of transcription factors characterized by a bHLH leucine zipper domain, which is responsible for dimerization and DNA binding.

Through binding to specific regions called E-boxes (CACGTG), USF2 regulates the expression of many target genes⁴¹.

It is already known that USF2 is involved in the progress of diabetic kidney injury. USF2 is upregulated by high-ambient glucose through CREB-dependent transactivation of USF2 promoter⁴², and also by glycated albumin through NF- κ B-dependent transactivation¹⁷. USF2 increases the expression of pro-fibrotic genes, among them fibronectin and thrombospondin-1 (TSP1), the major regulator of TGF- β activation in renal and cardiac complications of diabetes⁴³⁻⁴⁵. However, until now there was no evidence on the role of USF2 regarding MC apoptosis.

The profibrotic role of TGF- β in the kidneys is well established⁴⁹⁻⁵², while BMPs are described as antagonists of these effects^{46,47,53}. BMPs are best known for their role as morphogens during embryonic development, but they also regulate growth, differentiation, chemotaxis, and apoptosis of various adult cell types, including epithelial, mesenchymal, hematopoietic, and neuronal cells⁴⁸. However, the role of BMPs on MC death, particularly in pathological settings, is yet to be defined. A recent study using mouse MC suggests that the maintenance of BMP-7 activity by silencing gremlin (a BMP antagonist) protected cells from high-ambient glucose-induced abnormalities, such as apoptosis and increased collagen IV overproduction⁴⁷. Another study indicates that BMP-7, through smad-5 activation, is a differentiation and survival factor for podocytes, reducing diabetic podocyte apoptosis that occurs early on the course of diabetic renal damage⁴⁸, as opposed to MC apoptosis, which seems to occur in a later stage^{39,40}. Our study supports the notion that BMP, through Id1 upregulation, exerts a protective action against TGF- β 1-induced glomerular damage not just by preventing ECM deposition, but also by reducing death.

In spite of the potential beneficial effects of BMPs on the diabetic nephropathy, pleiotropic actions of BMPs in various systems do not allow them to be considered suitable therapeutic targets. Similar remarks could be made concerning TGF- β 1.

Thus, the identification of novel, downstream mediators of BMPs and/or TGF- β 1 pathways in the glomerulus seems to be critical for the development of tools for the treatment of diabetic nephropathy. USF2 appears to be a potential target for manipulation in that scenario. The consequences of silencing USF2 in vivo remain to be evaluated and the success of this endeavor will largely depend on demonstrating that its action is cell-specific and selective to EMC production and glomerular cell apoptosis.

Here we describe a novel regulatory pathway in which ID1 plays a protective role against MC apoptosis by inhibiting USF2 activity (Figure 9), and thereby potentially

contributing to halting the progression of glomerular damage. The role of USF2 as a marker of disease or therapeutic target in diabetic nephropathy is promising, but yet to be tested. Complementary *in vivo* studies, beyond the scope of this manuscript, are necessary to define the full implications of the findings here described.

Acknowledgements

This work was supported by project grants from FAPESP (# 06/05818-8) and from SBIB Albert Einstein.

Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Sheetz MJ, King GL: Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *Jama* 288: 2579-2588, 2002
2. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A: Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116: 288-296, 2006
3. Osterby R, Schmitz A, Nyberg G, Asplund J: Renal structural changes in insulin-dependent diabetic patients with albuminuria. Comparison of cases with onset of albuminuria after short or long duration. *APMIS* 106:361–370, 1998
4. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota A: Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49:103–111, 1996
5. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugizaki Y, Yamanaka M: Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 47:114–121, 1995
6. Pesce C, Menini S, Pricci F, Favre A, Leto G, DiMario U, Pugliese G: Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experimental diabetes mellitus. *Nephron* 90:484–488, 2002
7. Mishra R, Emancipator SN, Kern T, Simonson MS: High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int* 67:82–93, 2005
8. Sharma K, Ziyadeh FN: Hyperglycaemia and diabetic kidney disease. *Diabetes* 44:1139–1146, 1995
9. Steffes MW, Osterby R, Chavers B, Mauer SM: Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes* 38: 1077–1081, 1989
10. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J: Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 94:2105– 2116, 1994
11. Khera TK, Martin J, Riley SG, Steadman R, Phillips AO: Glucose modulates handling of apoptotic cells by mesangial cells: involvement of TGF-beta1. *Lab Invest* 87:690–701, 2007
12. Negulescu O, Bognar I, Lei J, Devarajan P, Silbiger S, Neugarten J: Estradiol reverses TGF-1-induced mesangial cell apoptosis by a casein kinase 2-dependent mechanism. *Kidney Int* 62 :1989–1998, 2002
13. Ziyadeh FN: Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 15 Suppl 1: S55-57, 2004
14. Wang S, Hirschberg R: BMP7 antagonizes TGF-beta-dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1006-1013, 2003

15. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R: BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9: 964-968, 2003
16. Wang S, Hirschberg R: Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol Chem* 279:23200-23206, 2004
17. Zeisberg M, Kalluri R: Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 23:1395-1398, 2008
18. Schlondorff D: Roles of the mesangium in glomerular function. *Kidney Int* 49:1583-1585, 1996
19. Ruzinova MB, Benezra R: Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13: 410-418, 2003
20. Norton JD: ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 22): 3897-3905, 2000
21. Barone MV, Pepperkok R, Peverali FA, Philipson L: Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4985-4988, 1994
22. Hara E, Yamaguchi T, Nojima H, Ide T, Campisi J, Okayama H, Oda K : Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 269: 2139-2145, 1994
23. Yokota Y, Mori S: Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* 190: 21-28, 2002
24. Lee TK, Man K, Ling MT, Wang XH, Wong YC, Lo CM, Poon RT, Ng IO, Fan ST: Over-expression of Id-1 induces cell proliferation in hepatocellular carcinoma through inactivation of p16INK4a/RB pathway. *Carcinogenesis* 24: 1729-1736, 2003
25. Chaudhary J, Sadler-Riggleman I, Ague JM, Skinner MK: The Helix-Loop-Helix Inhibitor of Differentiation Proteins Induce Post-Mitotic Terminally Differentiated Sertoli Cells to Re-Enter the Cell Cycle and Proliferate. *Biol Reprod* 5:1205-17, 2005
26. Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM: Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 3: 525-530, 2003
27. Weinmann AS, Bartley SM, Zhang T, Zhang MQ, Farnham PJ: Use of Chromatin Immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol and Cell Biol* 21(20):6820-6832, 2001
28. Wells J, Yan PS, Cechvala M, Huang T, Farnham PJ: Identification of novel pRB binding sites using CpG microarrays suggests that E2F recruits pRB to specific genomic sites during S phase. *Oncogene* 22:1445-1460, 2003

29. Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM: PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18(2): 333-334, 2002
30. Farré D, Roset R, Huerta M, Adsua JE, Roselló L, Albà MM, Messeguer X: Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3651-3653, 2003
31. Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH: Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res* 84:113-21, 1999
32. Okado T, Terada Y, Tanaka H, Inoshita S, Nakao A, Sasaki S: Smad7 mediates transforming growth factor- β -induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int* 62:1178-1186, 2002
33. Luo X, Sawadogo M: Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1308-1313, 1996
34. Yan S, Sloane BF: Isolation of a novel USF2 isoform: repressor of cathepsin B expression. *Gene* 337:199-206, 2004
35. Corre S, Galibert Marie-Dominique: Upstream stimulatory factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 18:337-348, 2005
36. Santini E, Lupi R, Baldi S, Madec S, Chimenti D, Ferrannini E, Solini A: Effects of different LDL particles on inflammatory molecules in human mesangial cells. *Diabetologia* 11:2117-25, 2008
37. Hornigold N, Craven RA, Keen JN, Johnson T, Banks RE, Mooney AF: Upregulation of Hic-5 in glomerulosclerosis and its regulation of mesangial cell apoptosis. Hic-5 regulation of mesangial cell phenotype. *Kidney Int* 77: 329-338, 2010
38. Brownlee M: Preventing kidney cell suicide. *Nat Med* 13(11):1284-1285, 2007
39. Khera T, Martin J, Riley S, Steadman R, Phillips AO: Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Lab Invest* 86:566-577, 2006
40. Kang BP, Frencher S, Reddy V, Kessler A, Malhotra A, Meggs LG: High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 455-466, 2003
41. Shi L, Nikolic D, Liu S, Lu H, Wang S: Activation of renal renin-angiotensin system in upstream stimulatory factor 2 transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:257-265, 2009
42. Shi L, Liu S, Nikolic D, Wang S: High glucose levels upregulate upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells. *J Cell Biochem* 103:1952-1961, 2008

43. Wang S, Lincoln TM, Murphy-Ullrich JE: Glucose downregulation of PKG-I protein mediates increased Thrombospondin 1 – dependent TGF- β activity in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. Article in Press.
44. Liu S, Shi L, Wang S: Overexpression of upstream stimulatory factor 2 accelerates diabetic kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:1727-1735, 2007
45. Wang S, Skorzewski J, Feng X, Mei L, Murphy-Ullrich JE: Glucose up-regulates Thrombospondin 1 gene transcription and Transforming Growth Factor- β activity through antagonism of cGMP-dependent protein kinase repression via upstream stimulatory factor 2. *J Biol Chem* 279(33):34311-34322, 2004
46. Li Y, Wang S: Glycated albumin upregulates upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:121-127, 2010
47. Zhang Q, Shi Y, Wada J, Malakauskas SM, Liu M, Ren Y, Du C, Duan H, Li Y, Zhang Y: In vivo delivery of gremlin siRNA plasmid reveals therapeutic potential against diabetic nephropathy by recovering bone morphogenetic protein-7. *Plos One* 5(7):1-13, 2010
48. Mitu GM, Wang S, Hirschberg R: BMP7 is a podocyte survival factor and rescues podocytes from diabetic injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:1641-1648, 2007
49. I Sinuani, I Beberashvili, Z Averbukh, M Cohn, I Gitelman, J Weissgarten: Mesangial Cells Initiate Compensatory Tubular Cell Hypertrophy. *Am J Nephrol* 31:326-331, 2010
50. Claire E, Hills Paul, E Squires: TGF β 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Therapeutic Intervention in Diabetic Nephropathy. *Am J Nephrol* 31:68–74, 2010
51. Osman B, Doller A, Akool el-S, Holdener M, Hintermann E, Pfeilschifter J, Eberhardt H: Rapamycin induces the TGF β 1/Smad signaling cascade in renal mesangial cells upstream of mTOR. *Cell Signal* 12:1806-17, 2009
52. Kim SI, Kwak JH, Na HJ, Kim JK, Ding Y, Choi ME: TGF-beta1 activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF- β receptor kinase activity in mesangial cells. *J Biol Chem* 284(33):22285-96, 2009
53. Scherner O, Meurer SK, Tihaa L, Gressner AM, Weiskirchen R: Endoglin differentially modulates antagonistic TGF-b and BMP-7 signaling. *J Biol Chem* 282(19):13934-43, 2007
54. Jiang X, Tsitsiou E, Herrick SE, Lindsay MA: MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J* 277(9):2015-21, 2010
55. Krag S, Osterby R, Chai Q, Nielsen CB, Hermans C, Wogensen L: TGF-beta1-induced glomerular disorder is associated with impaired concentrating ability mimicking primary glomerular disease with renal failure in man. *Lab Invest* 80(12):1855-68, 2000

56. Tomita M, Koike H, Han GD, Shimizu F, Kawachi H: Decreased collagen-degrading activity could be a marker of prolonged mesangial matrix expansion. *Clin Exp Nephrol* 8(1):17-26, 2004

Figure 1. BMPs 4 and 7 induce rapid and potent up-regulation of ID genes in mesangial cells. Quantitative PCR for Id genes. Confluent hMCi cells were serum-starved for 24 h and treated with BMP 4 (A), 7 (B), or vehicle: BMP concentration-response curve after 3 h of stimulation. (C and D): time-course analysis (0.5 h to 3 h) for BMP response applied at sub-maximal concentrations. Data were normalized to GAPDH expression levels and expressed as fold-change relative to vehicle. BL: baseline. N=4. *P<0.01 and **P<0.05 *versus* control group. (E) Western-blotting for Id1 and α -actin proteins in human immortalized mesangial cells serum-starved for 24 h and stimulated for 10 h BMP4 (1 ng/mL), BMP7 (5 ng/mL), or vehicle (ctrl). Results are representative of two independent experiments.

Figure 2. Id1 Interacts with the transcription factor USF2.

(A) Representation of ChIP-Id1 clones with binding motifs for transcription factors. Four USF2 hits (2 of them in clone #6) in 5 clones were identified. No USF2 binding site was detected in negative controls. RE and dissimilarity levels observed (inset) indicate statistical significance and specificity of the finding. (B) Immunoprecipitation (IP) of Id1 from hMCi protein extract was performed. Proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting (WB) with anti-USF2 antibody. Successful immunoprecipitation of Id1 (positive control) was shown by Western blot analysis of the precipitates with the monoclonal anti-Id1 antibody. Results of IP with non-immune IgG are presented as negative controls.

Figure 3. BMP inhibits USF2 transcriptional activity through overexpression of Id1. (A) Western-Blot for hMCi infected with Ad-LacZ or Ad-Id1 showing the Id1 protein overexpression efficiency. (B) hMCi were transfected with reporter vector controlled by three repetitions of the consensus binding site for USF2. Groups were treated with TGF β 1 (2 ng / ml) and/or BMP-4 (10ng/ml) and transduced with adenovirus vector Id1 or control LacZ (MOI = 30). After 48 h, cells were lysed and gene reporter was performed. pDS-RedMito was co-transfected as internal control of transfection efficiency. Luciferase activity was quantitated as arbitrary units of luminescence and normalized to arbitrary units of fluorescence. n = 3, (*) groups compared to pU3ML-Luc, and (#) compared to BMP4, p <0.01.

Figure 4. TGF- β 1 promotes while BMP-7 inhibits apoptosis in human MC.

(A) hMCi were treated with TGF- β 1 for 24 h, with or without serum deprivation for additional 24 h. Morphological analysis of chromatin was performed by staining cell nuclei with Hoechst33342 and expressed as percentage of apoptotic cells. n = 6, * p <0.05 vehicle vs. TGF- β 1. (B) Subconfluent hMCi were treated with BMP7 for 8 h followed by serum deprivation for 24 h. Analysis was performed as in (A). n = 6, * p <0.01 vehicle vs. BMP7

Figure 5. ID1 protects human mesangial cells from apoptosis. (A) hMCi overexpressing Id1 or LacZ (MOI30) were deprived from serum for 24 h. Morphological analysis of chromatin was carried out by staining cell nuclei with Hoechst33342 and expressed as percentage of apoptotic cells. As controls, cells were cultured in the presence or absence of serum without contact with adenoviral vectors. n = 6, p <0.01 ID1 vs. LacZ. (B) hMCi overexpressing Id1 or LacZ (MOI30) were deprived from serum for 24 h. Caspase-3 activity was determined by as described in Suppl. Methods and expressed as arbitrary units of fluorescence. * P <0.01 ID1 vs. LacZ.

Figure 6. Regulation of USF2 and BAX mRNA levels by TGF- β 1. qPCR for genes USF2 (A), and BAX (B). Confluent hMCi were deprived from serum for 24 h and then treated with TGF- β 1 (2 ng/ml) or vehicle for 24 h. Data were normalized by GAPDH expression levels and expressed as fold change relative to control. N = 4, * p <0.05 vs. vehicle.

Figure 7. USF2 and TGF- β 1 induce BAX promoter activity. hMCI were transfected with BAX-promoter reporter plasmid, USF2-expressor plasmid and their respective controls. Groups were treated with TGF- β 1 (2ng/ml) for 24h. After 48h, cells were processed for gene reporter luciferase assay. pDS-RedMito plasmid was co-transfected as an internal control for transfection efficiency. Luciferase activity was expressed as relative arbitrary units of luminescence, normalized by fluorescence. N=6; (*) groups compared to pGL3-basic, (#) compared to pcDNA3.1, and (\$) compared to pGL3-basic + TGF β -1; p <0.01.

Figure 8. Overexpression of USF2, but not USF1, upregulates BAX expression and promotes apoptosis in hMCI . qPCR for BAX gene.(A) hMCI (1×10^6 cells) were transfected by electroporation with pcDNA3.1 (10 ug/ml), pUSF1 (10ug/ml), pUSF2 (10 ug/ml) or both (5 ug/ml each). After 48h, total RNA extracted. Data were normalized by GAPDH expression levels and expressed as fold-change. N=4; *p<0.01 vs. pcDNA3.1. (B) hMCI were transfected by electroporation with pcDNA3.1 or pUSF2 (10 ug/ml). After 24 h, cells were deprived from serum. Morphological analysis of chromatin was carried out by staining cell nuclei with Hoechst33342 and expressed as percentage of apoptotic cells. n = 6, * p<0.02.

Figure 9. Summary of the findings presented in this manuscript. Representation of a novel pathway involved in the control of human MC apoptosis.

Figure 1A

Figure 1B

Figure 1C

Figure 1D

Figure 1E

Figure 2A

Figure 2B

Figure 3A

Figure 3B

Figure 4A

Figure 4B

Figure 5A

Figure 5B

Figure 6A

Figure 6B

Figure 7

Figure 8A

Figure 8B

Figure 9