ANGÉLICA MASTANDRÉA AMANSO

**Inibição do proteasoma aumenta o estresse oxidativo e
bloqueia a resposta da NADPH oxidase a estímulos em
células musculares lisas vasculares**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de

São Paulo, para obtenção de título de doutor em Ciências

Área de concentração: Cardiologia

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Amanso, Angélica Mastrandréa

Inibição do proteasoma aumenta o estresse oxidativo e bloqueia a resposta da NADPH oxidase a estímulos em células musculares lisas vasculares / Angélica Mastrandréa Amanso. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.NADPH oxidase 2.Estresse oxidativo 3.Isomerase de dissulfeto da proteína 4.Miócitos de músculo liso

USP/FM/SBD-195/09

*Aos meus pais, Paulo e Neusa,
pela vida, pelo amor,
pelo apoio incondicional e
pela fé nos meus estudos.*

*Aos meus irmãos, Ana Lúcia e Alexandre,
pelo carinho e pelo amor durante toda a minha vida.*

Ao meu orientador, Professor Francisco Rafael Martins Laurindo, pela oportunidade, pelo respeito, pelo apoio, pelo carinho, pela paciência, pelas discussões científicas intermináveis e por ter sido amigo e pai em muitos momentos dessa nossa jornada, sempre batalhando pelo meu amadurecimento tanto científico quanto pessoal.

Ao meu grande amigo de longa data e co-orientador desse trabalho, Dr. Célio Xavier da Costa dos Santos, pela amizade, pelas nossas reflexões calorosas e engraçadas, e pelo apoio fraternal que contribuíram muito na minha jornada acadêmica, desde monitoria na Disciplina de Bioquímica no Instituto de Química da USP, passando pela iniciação científica no laboratório da Professora Ohara Augusto, e por fim durante o meu doutorado no Incor.

À minha querida amiga Maria Cristina Thomazella, pela amizade sincera e verdadeira, pela presença sempre tão maternal e tão carinhosa nessa minha jornada.

À Professora Kathy K. Griendling, Emory University (EUA), pelo exemplo de cientista, por ter me dado a oportunidade de estagiar no seu laboratório de pesquisa em Atlanta, e ainda por me orientar e ajudar pessoalmente como parte integrante do seu grupo de pesquisa.

À Dr. Alejandra San-Martín, Emory University (EUA), pela amizade, por ter me recebido com o coração tão aberto e por tornar a minha estadia em Atlanta fácil e muito agradável.

Ao Professor Bernard Lássegue, Emory University (EUA), pela amizade, pelo exemplo e seriedade à pesquisa, por ter me ensinado e me apoiado, e pelas maravilhosas tortas do FarmersMarket em Atlanta.

Ao Dr. Joao Wosniak Junior, pela amizade, pelo apoio e auxílio em vários experimentos, em especial aos de Biologia Molecular.

À Maria Bertoline, pelas engraçadas e estimadas conversas, pelo apoio e auxílio fundamentais nos experimentos com HPLC.

Ao Victor Debbas, pelo apoio e auxílio em muitos experimentos, sem contar nos inúmeros quebra-galhos.

À Ana Lúcia Garippo, pelo apoio e auxílio nos experimentos com microscopia confocal.

À Neuza, Juliana e Eva, da Secretaria de pós-graduação do Departamento de Cardiologia da FMUSP, pelo apoio e suporte nos trâmites burocráticos da pós-graduação.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Vascular e da Unidade de Aterosclerose, pela convivência, pelas discussões científicas, pelo apoio mútuo, e pela troca de experiências que favoreceram meu enriquecimento pessoal.

A Deus pela beleza e complexidade da vida e pelas bênçãos que abriram portas durante toda a minha vida.

Este projeto recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos nº 04/13583-5 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ-Milênio Redoxoma).

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	2
OBJETIVOS.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
Reagentes	33
Cultura celular	34
Co-imunoprecipitação da PDI e p22phox.....	34
Eletroforese Bidimensional	35
Obtenção de fração de membrana.....	35
Produção/indução de superóxido gerado pela atividade da NADPH oxidase....	36
Preparação do lisado celular e imunoprecipitação	38
Western Blot	39
Medida GSH/GSSG intracelular por HPLC	39
Ensaio de proliferação celular utilizando MTT	40
Atividade da Superóxido Dismutase.....	40
Análise da expressão de mRNA das Noxes, p22phox e PDI por PCR quantitativa.....	41

Medida da atividade proteolítica 20S do proteasoma.....	42
Análise do <i>splicing</i> do fator de transcrição XBP1	42
Microscopia Confocal	43
Transcrição transitória da PDI.....	43
Análise estatística	44
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÃO	83
APÊNDICE.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
<i>CURRICULUM VITAE</i>	128

LISTA DE ABREVIATURAS

ANGII	Angiotensina
BSA	Albumina bovina sérica
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate
DHE	dihidroetidina, hidroetidina, dihidroetídio
DTT	Dithiothreitol
DTPA	N,N,N',N''-penta-acetato-dietilenotriamina
E/DHE	razão etídio/DHE consumida
2-EOH	2-hidroxietídio
EOH/DHE	razão 2-hidroxietídio/DHE consumida
EDTA	etilenodiaminatetraacetato de sódio dihidratado
EGTA	etileno-bis(oxietilenonitrila)tetraacetato de sódio
EO	estresse oxidativo
ERAD	degradação de proteínas dependente do RE
ERE	estresse do retículo endoplasmático
F12	<i>F-12 Coon's Modification</i>
GRP	<i>glucose-regulated protein</i>
HRP	peroxidase de rabanete
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HPLC	cromatografia de alta performance
Lacta	Lactacistina

MG132	Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinalZ-LLL-CHO
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
Nox	isoforma da NADPH oxidase (<i>Non-phagocytic oxidase</i>)
O ₂ ^{•-}	ânion radical superóxido
PBS	salina pH 7,4
PDI	Isomerase de dissulfetos protéicos
RASM	células musculares lisas da aorta de coelho
RE	retículo endoplasmático
ROS	espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SOD	superóxido dismutase
TN	Tunicamicina
VSMC	células musculares lisas (<i>vascular smooth muscle cells</i>)
UA	unidades arbitrárias
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UPS	<i>Ubiquitin proteasome system</i>
ε	absortividade molar
λ	comprimento de onda (lambda)
λ _{ex}	comprimento de onda de excitação
λ _{em}	comprimento de onda de emissão

RESUMO

AMANSO AM. Inibição do proteasoma aumenta o estresse oxidativo e bloqueia a resposta da NADPH oxidase a estímulos em células musculares lisas vasculares [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009.

Processos celulares que governam as NADPH oxidases vasculares em condições patológicas não estão claros ainda. Como os processos redox são parte intrínseca da resposta da célula ao estresse, temos investigado se o estresse oxidativo pode convergir com outros tipos de estresse via Nox(es). No presente estudo, focamos na inibição do proteasoma como uma condição relevante de estresse. A incubação de células musculares lisas com concentrações não apoptóticas de inibidores do proteasoma, MG132 e lactacistina, promoveu aumento na produção basal de superóxido e na atividade da NADPH oxidase, diminuição da atividade da SOD e da razão GSH/GSSG. Por outro lado, a inibição do proteasoma diminui a atividade da Nox após estímulo com Angiotensina II ou Tunicamicina, conhecido estressor do retículo endoplasmático. Em condições basais, MG132 induz a expressão de mRNA da Nox1, entretanto o aumento de Nox1 induzido por Angiotensina II foi diminuído na presença de MG132. O mesmo efeito ocorre com a indução de Nox4 pela Tunicamicina, que nesse caso foi drasticamente reduzida na presença de MG132. Além disso, tanto Angiotensina II quanto Tunicamicina induziram a atividade lítica do proteasoma 20S. A seguir, investigamos as consequências fisiológicas do MG132 na sinalização do estresse do RE, uma conhecida resposta mediada por Nox4. Células vasculares incubadas com MG132 induzem a expressão de marcadores do estresse do RE, GRP78 e XBP1, e também os marcadores mais tardios ATF4 e o pró-

apoptótico CHOP/GADD153. Resultados similares ocorrem também com a Tunicamicina. Entretanto, a co-incubação de Tunicamicina e MG132 diminui a sinalização do estresse do RE. AKT e p38 MAPK foram ativados por MG132, possivelmente como resposta ao estresse induzido pela inibição do proteasoma. Assim, a inibição do proteasoma bloqueia a NADPH oxidase, com aumento da atividade basal e expressão da Nox1 versus forte inibição da ativação e expressão da Nox4 frente ao estímulo. A inibição da Nox4 associa-se e pode contribuir para a inibição pelo MG132 da sinalização do estresse do RE. Portanto, o proteasoma parece exercer papel na integração de estresses celulares envolvendo a NADPH oxidase. A inibição do proteasoma pode ter papel na terapia de doenças associadas a estresse do RE.

Descritores: 1.NADPH oxidase 2.Estresse oxidativo 3.Isomerase dissulfeto da proteína 4.Células musculares lisas

Summary

AMANSO AM. Proteasome Inhibitor increases oxidative stress and disrupts NADPH oxidase response to stimuli in vascular smooth muscle cells[Thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009.

Cellular processes governing vascular Nox family NADPH oxidases in disease conditions are unclear. Since redox processes are intrinsic to cell stress response, we asked whether oxidative stress merges with other types of stress via Nox(es). We focused on proteasome inhibition as a relevant stress condition. Vascular smooth muscle cells (VSMC) incubation with non-apoptotic concentrations of proteasome inhibitors MG132 or lactacystin promoted increased baseline superoxide generation (HPLC/DHE products) and NADPH oxidase activity, decreased SOD activity and GSH/GSSG ratio. Conversely, proteasome inhibitors decreased by Nox response to Angiotensin II (AngII) and abrogated Nox response to endoplasmic reticulum (ER) stressor tunicamycin. With MG132, basal Nox1 mRNA levels were increased, while Nox1 response to AngII was blunted. Moreover, MG132 abolished Nox4 mRNA levels TN-induced. Both AngII and TN (at 2 and 4 hs) promoted increased 20S proteasome lytic activity. We next assessed physiological consequences of MG132 in ER stress signaling, a known Nox4-mediated response. VSMC incubation with MG132 alone enhanced expression of the ER stress markers Grp78 and XBP1 and late markers such as ATF4 and proapoptotic CHOP/GADD153. Similar results occurred with the known ER stressor TN. However, co-incubation of TN and MG132 decreased Grp78, Grp94 and CHOP/GADD153, indicating that proteasome inhibition interrupts ER stress. AKT and p38 are activated by MG132 as response to stress and recover to survival. Thus,

proteasome inhibition disrupts NADPH oxidase, with increased baseline activity and Nox1 expression vs. strong inhibition of stimulated Nox1 and Nox4 activation/expression. The later effect may underlie MG132-mediated inhibition of ER stress signaling. (Support: FAPESP, CNPq Milênio Redoxoma)

Descriptors: 1.NADPH oxidase 2.Oxidative stress 3.Protein Disulfide Isomerase 4. Smooth muscle cells

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A geração e os efeitos de espécies reativas de oxigênio (ERO) em sistemas biológicos, bem como os seus possíveis danos e o seu envolvimento com processos celulares e vias de sinalização redox tem sido amplamente estudado na literatura. Os aspectos químicos peculiares a diferentes oxidantes, bem como suas reações com moléculas biológicas, estão cada vez mais evidentes. Entretanto, a tradução destes processos em sinais celulares compartimentalizados e sensíveis a mudanças redox permanece menos compreendida na literatura (Winterbourn, 2008).

Radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio são produzidas em uma grande variedade de processos fisiológicos. Eles são capazes de causar danos biológicos e estão implicados no envelhecimento e na patologia de diversas condições, como por exemplo, câncer, e em doenças cardiovasculares, inflamatórias e degenerativas (Gutteridge and Halliwell, 2000). Entretanto, após intensa investigação, ensaios clínicos com antioxidantes têm sido desapontadores, e nenhum medicamento centrado na modulação de processos redox tem seu uso recomendado presentemente (*Heart Protection Study Collaborative Group*, 2002)

Sinalização redox pode ser definida como a transdução de sinais celulares na qual o elemento integrativo é uma série de reações de transferência de elétrons interconectadas envolvendo radicais livres, equivalentes redutores ou espécies relacionadas. Evidências recentes indicam que a sinalização redox pode ocorrer na ausência de alterações globais do estado redox celular dos principais redutores intracelulares glutatona e tioredoxina; desta forma, sinalização redox pode ser separada do estresse oxidativo, que é uma forma mais extrema de desbalanço redox

celular (Go et al, 2004). De acordo com essa idéia, a maioria dos tampões redox intra- e extracelulares não estão em equilíbrio, sugerindo regulações independentes em subcompartimentos, e ainda que o estado redox seja bem mais complexo do que um simples desbalanço entre oxidantes e antioxidantes. Por sua vez, o estresse oxidativo pode ativar circuitos fisiopatológicos nocivos em várias situações de doença. Estes circuitos viciosos resultam não apenas de dano radicalar a biomoléculas, como também da ativação e/ou expressão inadequadas de proteínas de sinalização devido à produção excessiva, não compensada ou descompartimentalizada de *espécies reativas de oxigênio*. Tem se tornado evidente que a produção celular de ERO não é um evento acidental, porém um processo enzimático controlado, mesmo sob condições de exposição a oxidantes exógenos (Finkel, 2003). Isto sugere que tal fonte enzimática de ERO é um elemento chave de cascatas de sinalização redox (Griendling et al, 2000) e possivelmente um elemento integrativo de uma resposta celular geral a vários tipos de estresse. Além disso, este fato sugere que a geração de ERO seja um processo estreitamente relacionado a eventos que governam o tráfego, degradação e subcompartimentalização de proteínas. Portanto, entender como tais fontes enzimáticas são reguladas em termos estruturais e fisiológicos é um passo fundamental para melhor compreensão da fisiopatologia redox de várias doenças vasculares.

Resposta Celular ao Estresse

A resposta celular ao estresse é um mecanismo de extraordinária significância fisiológica e patofisiológica. Esta resposta representa uma reação de defesa das

células ao meio ambiente que causam danos a macromoléculas. Muitos dos aspectos da resposta ao estresse não são estresse-específico, porque as células monitoram o estresse baseado nas lesões causadas a macromoléculas sem interligar com o tipo de estresse que causou tal dano (Kultz, 2003). Mecanismos celulares ativados por danos ao DNA e às proteínas são interconectados e partilham muitos elementos em comum. Outras respostas celulares mais diretas que reestabelecem a homeostase são estresse específicos e frequentemente são ativados em paralelo à resposta celular ao estresse. Todos os organismos possuem proteínas de estresse, e essas proteínas universalmente conservadas fazem parte de um proteoma de estresse “mínimo”, que incluem proteínas envolvidas em mecanismos fisiológicos de “percepção” em membrana lipídica, proteína, danos ao DNA, proteínas redox, controle de ciclo celular, estabilização e reparo de macromoléculas, e controle do metabolismo. E por fim, as células podem quantificar o estresse e ativar programas de morte celular (apoptose, necrose ou autofagia) quando a tolerância mínima é excedida (Gasch et al, 2000; Kultz, 2005). Essas proteínas são reguladas não somente em níveis de mRNA mas também por outros mecanismos, como por exemplo, o *turnover* da proteína ou por modificações pós-traducionais. Dois dos grandes grupos que compõem essas proteínas de estresse são o da regulação redox e o da degradação de proteínas (Kultz, 2005).

A falta de resposta ao estresse pode resultar em um impacto comum de estresse que são as deformações e lesões em macromoléculas, principalmente em membranas lipídicas, proteínas e DNA (Kultz, 2003). Outro ponto em comum é em diversos tipos de estresse é a geração de estresse oxidativo e mudança de potencial

redox, como por exemplo, em situações de *burst* oxidativo (Pastori and Foyer, 2002; Reth, 2002; Bolwell 1996). Evidências moleculares relacionadas ao aumento de ROS como consequência direta ocorre durante alguns tipos de estresse, a saber, radiação ionizante e alguns reagentes químicos. Entretanto, as bases moleculares redox são muito pouco compreendidas ainda. Sabe-se que em muitos tipos de estresse, a NADPH oxidases são rapidamente ativadas o que poderia aumentar a produção de ROS, e ainda como essas enzimas estão presentes em diversos compartimentos, essa compartimentalização pode ser importante para os efeitos da resposta celular ao estresse (Pastori and Foyer, 2002).

Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)

Uma importante atividade presente no controle de qualidade de proteínas recém-sintetizadas do RE e que está relacionada ao correto enovelamento de proteínas é o fenômeno conhecido como Degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático (ERAD) (Romisch, 2005). ERAD é uma parte importante dos mecanismos normais de controle de qualidade de proteínas e um componente básico da resposta celular ao estresse. Consiste na degradação de proteínas irreversivelmente mal-enoveladas, proteínas órfãs de oligômeros ou proteínas com glicosilação deficiente, efetuada pelo Sistema Ubiquitina-Proteasoma, após o transporte retrógrado da proteína aberrante para o citosol pelo complexo translocon Sec61 situado na membrana do RE (Sitia and Braakman, 2003). Um passo importante para ERAD é poli-ubiquitinação da proteína-alvo, que é efetuada por reações enzimáticas dirigidas por ubiquitina ativadora (E1), ubiquitina carregadora (E2) e ubiquitina ligase (E3). No caso da ERAD, ubiquitina ligases potencialmente

importantes são da família Hrd (Kaneko and Nomura, 2003). Hrd ubiquitina ligases são proteínas da membrana do RE que são induzidas pelo estresse do RE.

Figura 1: Via de degradação de proteínas via ubiquitinação e 26S proteassoma. Após a ligação da cadeia de poliubiquitina na proteína, a mesma é dirigida a degradação, ocorrendo primeiramente o reconhecimento pela subunidade 19S. A degradação ocorre pela atividade proteolítica da subunidade 20S (Romisch, 2005).

O Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS) é responsável pela degradação não-lisossomal da grande maioria das proteínas intracelulares, apresentando um papel crucial em muitos processos celulares, tais como ciclo celular, reparo no DNA, regulação na transcrição, controle de qualidade proteico, resposta imune, apoptose, diferenciação e resposta ao estresse (Nandi et al, 2006). O proteassoma 26S é um complexo protéico de 2.4MDa composto por duas multisubunidades: um centro composto por proteases designado de 20S e um elemento regulatório chamado de

PA700 ou partícula regulatória 19S (DeMartino and Gillette, 2007). A subunidade 20S é um complexo de 700 kDa composto, em eucariotos, de duas cópias de 14 genes diferentes (α 1- α 7 e β 1- β 7), formando uma estrutura cilíndrica de 28 subunidades arranjadas em 4 anéis heptaméricos. Esse *core* proteolítico apresenta múltiplas atividades peptidásicas. A unidade regulatória 19S é formada por 17 subunidades que incluem ATPases, uma enzima de de-ubiquitinação, e subunidades ligantes de poliubiquitina.

O proteasoma pode estar localizado tanto no citoplasma quanto no núcleo, podendo ainda estar associado com elementos do citoesqueleto, RE, membrana plasmática e diversas organelas (Nandi et al, 2006). Dependendo do tipo celular e da densidade e condições de crescimento à cultura, a proporção relativa de proteasomas nucleares versus citoplasmáticos pode variar entre 17 e 50% (von Mikecz, 2006). Além disso, várias subunidades da subunidade 20S contêm sinais de localização nuclear, e a fosforilação em tirosina dessas subunidades teria o papel de sinalizar para a transferência dos proteasomas núcleo-citoplasma. Em leveduras, sabe-se que o UPS atua no controle de qualidade de proteínas nucleares, envolvendo ubiquitina-ligases e conjugadoras no núcleo das células (Gardner et al, 2005).

Além de suas funções canônicas, um número crescente de observações indica que os componentes do proteasoma estão direta e mecanisticamente envolvidos na regulação da transcrição gênica. O proteasoma parece ser importante na transcrição tanto por atividades proteolíticas (mudança de fatores de transcrição na cromatina) quanto por não-proteolíticas (recrutamento de co-ativadores, modificação de histonas entre outras funções), embora exatamente como o proteasoma interage com a

cromatina não esteja ainda claro. Em especial, a partícula 19S, especificamente as subunidades ATPásicas, influenciam na transcrição por mecanismos não-proteolíticos, sendo ainda citado a capacidade dessas proteínas agirem como uma *chaperona-like*, atuando no enovelamento e translocação de proteínas (Collins and Tansey, 2006).

A ubiquitina é uma proteína composta por 76 aminoácidos. Ela é adicionada na proteína entre a porção carboxi-terminal da glicina da ubiquitina, e geralmente, no grupo ϵ -amino da lisina da proteína-alvo. Para a formação de cadeia de poliubiquitina, a ligação subsequente se faz com uma lisina de outra ubiquitina, formando a cadeia por ligações covalentes (Pickart 2001; Weissman 2001; Ciechanover and Iwai 2004). É importante ressaltar que a lisina em que ocorre a poliubiquitinação é extremamente fundamental em termos de sinalização celular. Por exemplo, a formação de cadeias de poliubiquitinação ligadas na lisina-48 e lisina-29 da ubiquitina pode agir como um sinal para degradação pelo proteasoma, entretanto, a ubiquitinação em outras lisinas, como por exemplo, lisina-63, pode agir como sinais para reparo de DNA, ativação de fatores de transcrição, entre outras funções (Weissman, 2001). Por outro lado, a monoubiquitinação apresenta outras funções, como endocitoses, regulação de histonas, tráfego, entre outras (Hicke, 2001).

Os efeitos da inibição do proteasoma no estresse do RE/ UPR não estão ainda compreendidos. Ao mesmo tempo em que a inibição do proteasoma acarreta uma carga ulterior ao RE pela inibição da ERAD (Sitia and Braakman, 2003), inibidores do proteasoma interrompem a UPR por inativarem a quinase transluminal do ER Ire1 α (Lee et al, 2003). Estes efeitos podem ser análogos aos efeitos opostos dos

inibidores de proteasoma na apoptose, indução em células em proliferação vs. inibição em células diferenciadas (Lee et al, 2003). Outro trabalho, utilizando o inibidor PS-341, também conhecido como Bortezomib, induziu apoptose através da indução de estresse oxidativo e do estresse do RE (Fribley, et al 2004). Além disso, o proteasoma é responsável pela degradação da PDI oxidada após exposição de células ao peróxido de hidrogênio (Grune et al, 2002). A própria ubiquitinação parece ser fortemente influenciada por processos redox, promovida principalmente por redutores (Liu and Min, 2002) e geralmente inibida em proteínas oxidadas (Grune et al, 2003). A ubiquitinação, entretanto, não é um pré-requisito para a degradação de proteínas pelo proteasoma, uma vez que proteínas moderadamente oxidadas podem ser diretamente reconhecidas pelo núcleo 20-S do proteasoma, possivelmente via exposição à superfície de grupos de aminoácidos hidrofóbicos (Grune et al, 2003).

Implicações terapêuticas do UPS e inibição do proteasoma como uma condição de estresse

A ativação da NADPH oxidase é o evento central e talvez o primário na produção de ROS por células vasculares e tem assim papel-chave no estresse oxidativo vascular em diversas condições clínicas como aterosclerose, resposta vascular à angioplastia, diabetes mellitus e hipertensão arterial. Entretanto, o uso clínico de antioxidantes tem se mostrado ineficaz na prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares (Taniyama and Griendling, 2003). Este fato sugere que o conhecimento fisiopatológico sobre a gênese do desequilíbrio redox vascular é ainda insuficiente. Além disso, apesar de avanços no conhecimento fisiopatológico das doenças vasculares, muito pouco ou quase nada se avançou no desenho de novos

antioxidantes eficazes, indicando possivelmente que novas estratégias são necessárias para interferir no equilíbrio redox vascular. Os nossos estudos representam o início de um esforço nesse sentido. A identificação de uma possível interação entre a ativação da NADPH oxidase e o proteasoma pode neste sentido representar uma abordagem terapêutica inteiramente nova.

A degradação de proteínas celulares mantém a célula em homeostase, e alterações nesse sistema podem gerar várias condições fisiopatológicas, como câncer e doenças neurodegenerativas (Lee et al, 2004). Assim, o proteasoma tem se tornado alvo importante na busca de novas drogas terapêuticas. De fato, pequenas moléculas capazes de inibir e modular o UPS têm sido descrito como uma nova abordagem na terapia anti-câncer. Particularmente, os inibidores do proteasoma, bloqueiam a ativação do fator nuclear NF-kappa B, desencadeando uma diminuição da proliferação celular e da produção de citocinas angiogênicas, induzindo a morte celular e inibem a adesão da célula tumoral. Além disso, vários estudos têm demonstrado que os inibidores podem potencializar outros tipos de tratamento para câncer, em parte por diminuir a resistência a quimioterapia (Nalepa et al, 2006).

Além de vários compostos naturais terem propriedades inibidoras do proteasoma (Delcros et al, 2003), recentemente foi introduzido na prática clínica o bortezomib, um inibidor do proteasoma para tratamento de fases adiantadas do mieloma múltiplo (Bross et al, 2004; Lee et al, 2003).

Os estados patológicos associados com o UPS podem ser divididos em dois grupos: 1) aqueles que resultam da perda da função, ou seja, mutações em enzimas ou em regiões de reconhecimento no substrato alvo que resulta na estabilização de certas proteínas; e 2) aqueles que resultam em ganho de função, ou seja, anormal ou acelerada degradação de proteínas alvo (Ciechanover, 2005). Essas condições de perda ou ganho de atividade do sistema claramente envolve condições de estresse celular. Está amplamente conhecido na literatura que a inibição do proteasoma gera estresse do RE, ativação de mecanismos anti-oxidantes e também apoptose (Fribley et al, 2004; Meiners et al, 2006; Ding et al, 2006; Dahlmann, 2007).

Na área cardiovascular, vários trabalhos têm revelado a importância do sistema-ubiquitina proteasoma. Estresse oxidativo presente em placas de carótida humana está associado com inibição da atividade do proteasoma e acumulação de proteínas ubiquitinadas, particularmente em pacientes sintomáticos, demonstrando a importância da UPS na estabilidade da placa (Versari et al, 2006). Modelos experimentais de aterosclerose demonstrou um aumento significativo de proteínas ubiquitinadas nos estágios iniciais da doença (Herrmann et al, 2003; Tan et al, 2006). Além disso, há evidências também de aumento da atividade do proteasoma em condições de hipercolesterolemia e hiperglicemia (Herrmann et al, 2007; Xu et al, 2007). Estudos do mesmo grupo mostraram que artérias coronarianas associadas com infarto agudo fatal eram caracterizadas por um aumento na expressão de proteínas ubiquitinadas (Herrmann et al, 2002). Sabe-se ainda que nos processos de hipertrofia cardíaca há acurada regulação do proteasoma (Depre et al, 2006). Meiners et al

mostrou que aplicação local de inibidores do proteasoma resultam em significativa inibição da hiperplasia intimal em modelos de lesão por cateter balão.

Assim, se torna evidente a necessidade de estudos moleculares que possam clarear os mecanismos envolvidos entre a principal fonte de espécies reativas vascular, a NADPH oxidase, e o sistema ubiquitina-proteasoma.

NADPH oxidase

Tanto mitocôndrias como várias outras enzimas incluindo o complexo NADPH oxidase (cujas subunidades catalíticas são denominadas NOX), xantina oxidase, óxido nítrico sintase e constituintes peroxisomais geram ERO. Espécies oxidantes também são geradas no retículo endoplasmático durante o processo de enovelamento protéico e formação de pontes dissulfeto (Malhotra and Kaufman, 2007 Santos et al, 2009). Assim, com diversas fontes enzimáticas, superóxido e peróxido de hidrogênio são considerados subprodutos da atividade catalítica dessas fontes, exceto no caso da NADPH oxidase, a única fonte enzimática dedicada à produção de ERO. NOXs são uma família de enzimas consistindo de uma flavoproteína, citocromo b e subunidades regulatórias específicas para cada membro da família (Tabela 1). As NOXs apresentam uma ampla distribuição tecidual, e quando ativadas as subunidades se arranjam na membrana e promovem redução de oxigênio molecular para superóxido às custas de equivalente redutores fornecidos por NADPH (Lambeth, 2004). O membro mais estudado dessa família é a Nox2 em células fagocíticas, uma vez que é um componente crítico da defesa anti-microbiana promovida por essas células (Figura 1a) (Nauseef, 2007).

Em células vasculares, isoformas vasculares da NADPH oxidase fagocítica são provavelmente a principal e primária fonte de ERO basal ou estimulada por agonistas com finalidade de sinalização (Griendling et al, 2000; Lassegue and Clempus, 2003). Os principais agonistas conhecidos da NADPH oxidase vascular incluem entre outros a angiotensina II (A-II) (Figura1b), fatores de crescimento peptídicos, trombina, ácido araquidônico, fator de necrose tumoral alfa (Griendling et al, 2000), bem como mudanças do *shear stress* (Hwang et al, 2003). A NADPH oxidase contribui para o desequilíbrio redox e disfunção vascular em várias situações patológicas como lesão vascular (Souza et al, 2000; Leite et al, 2004), aterosclerose, hipertensão e no diabetes mellitus (Lassegue and Clempus, 2003).

A NADPH oxidase clássica é uma enzima multimérica que foi originalmente descrita em neutrófilos, cuja principal função é a microbicida. A oxidase de fagócito apresenta um complexo heterodimérico ligado a membrana, o citocromo b558, que consiste da gp91phox (também conhecida como Nox2) e da p22phox, e outras 3 subunidades citosólicas (P47phox, p67phox e a proteína G Rac). Após estímulo com os agonistas, essas subunidades citosólicas translocam para o complexo citocromo, levando a um aumento da atividade enzimática. Em humanos há 5 diferentes homólogos chamados de Nox1 a Nox5, e duas relevantes oxidases, Duox1 e Duox2, bem como duas adicionais unidades citosólicas, NoxO1 e NoxA1 (Banfi et al, 2003; Geiszt et al, 2003; Takeya et al., 2003; Ueyama et al., 2007). Embora todas as oxidases sejam capazes de aumentar a produção de ROS, existem importantes diferenças na ativação, composição das subunidades, localização e expressão (Figura1). Angiotensin II está mais ligada a Nox1 (Lassegue et al, 2001, Dikalova et al, 2005).

Estudos recentes têm mostrado que a composição estrutural da NADPH oxidase difere significativamente entre o endotélio, células musculares lisas e fibroblastos da camada adventícia (revistos por Griendling et al, 2000; Lassegue and Clempus, 2003). Novas subunidades foram também caracterizadas em outros tipos celulares e há vários dados iniciais sugerindo sua presença em células vasculares (Tabela 1) (Laurindo et al, 2008).

Tabela 1: NADPH oxidase vascular

	EC	VSMC	FIB	Subunidades regulatórias	Regulação celular
Nox1	+	++	0/+	p22phox	Profileração
				Noxo 1	Migração
				Noxa 1	
				p47phox?	
Nox2	++	0	+++	p22phox	Proliferação
				p47phox	Migração
				p67phox	Inflamação
				p40phox?	
Nox4	+++	++	+	p22phox	Diferenciação
					Apoptose
Nox5	+	++	?	p22phox	Respostas a Ca^{2+}

EC, célula endotelial; Fib, fibroblasto.

Relativa quantidade (+ a +++) estimada.

Rac1 regula atividade de Nox1 e Nox2, enquanto seu papel para Nox4 e Nox5 não está claro.

Figura2: Geração de espécies reativas pelos sistemas NADPH oxidase. (a) Geração de oxidantes no fagossoma de neutrófilo após ingestão de uma bactéria. NOX2 está ativada na membrana do fagossoma, e elétrons são transportados do NADPH através da membrana para o oxigênio, formando radical superóxido, que sofre dismutação para peróxido de hidrogênio. (b) Geração de espécies reativas pelo sistema NADPH oxidase (NOX1) após estímulo com angiotensinaII em células musculares lisas (Winterbourn, 2008)

Portanto, o termo “oxidase vascular” reflete na verdade uma soma em proporções desiguais de diferentes complexos enzimáticos presentes em cada tipo celular. Sabe-se ainda que esses diferentes complexos enzimáticos estão presentes em diferentes localizações subcelulares, e isso passa a ser um passo fundamental na compreensão de vias de sinalização redox que sejam espacialmente e temporariamente acopladas a proteínas sensíveis a oxidantes mediando várias funções celulares. Desses compartimentos podemos citar os *lipids rafts* em células endoteliais e as caveólas em VSMC, além de compartimentos intracelulares tais com endosoma em respostas imunes pró-inflamatórias, perinuclear e núcleo na regulação

da expressão de genes redox-sensíveis, e retículo endoplasmático atuando com parte integrativa do ERE com o EO (Ushio-Fukai, 2006; Pedruzzi et al, 2004). Entretanto, várias questões permanecem pouco esclarecidas com respeito quanto aos mecanismos que controlam a atividade, à localização intracelular, tráfego, subcompartimentalização em microdomínios bem como modificações pós-traducionais das subunidades da oxidase vascular. Vários mediadores celulares e proteínas associadas têm sido descritas, e apresentam papel importante na regulação e especificidade da oxidase (Brandes and Kreuzer, 2005; Clempus and Griendling, 2006; Ushio-Fukai, 2006).

Interação entre NADPH oxidase e Dissulfeto Isomerase Proteica

Várias evidências na literatura indicam que a NADPH oxidase não-fagocítica pode ser regulada por processos redox. Essa regulação poderia consistir num *feedback* positivo para a sustentação da atividade através de um *crosstalk* redox, aumentando a expressão das subunidades e promovendo a manutenção da oxidase (Laurindo et al, 2008).

Sabe-se que a NADPH oxidase fagocítica é inibida por diversos reagentes oxidantes e tiol alquilantes, gerando uma diminuição no potencial redutor da gp91phox (Cross 1990; Bellavite et al 1983; Doussiere 1998). Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado ao longo dos últimos anos que a oxidase vascular também apresenta tais observações. Demonstramos que DTNB ou N-acetilcisteína diminuem a atividade da oxidase tanto em homogenatos de membrana celular bem como em anéis vasculares (Janiszewski 2000). Assim, propusemos que o estado redox de grupos tiol críticos poderia influenciar significativamente a atividade da oxidase. Nosso foco recaiu sobre a enzima Dissulfeto Isomerase Proteica (PDI), uma

ditiol/dissulfeto oxido-redutase multifuncional da superfamília da tiorredoxina. PDI é uma chaperona redox, normalmente residente no retículo endoplasmático (RE), abundantemente expressa e que apresenta múltiplos efeitos funcionais no processo secretor, aliados a um comportamento redox versátil e a importante capacidade de interação com outras proteínas. (Freedman et al, 1994; Noiva, 1999; Clissold and Bicknell, 2003). Nossos resultados evidenciaram, em células musculares lisas cultivadas (VSMC), que a PDI tem uma interação funcional e espacial com a NAD(P)H oxidase e modula significativamente a ativação da oxidase secundária à A-II. A inibição da PDI por estratégias farmacológicas ou sua supressão por oligonucleotídeo antisenso levou a uma significativa redução da atividade da NAD(P)H oxidase basal ou estimulada por A-II. A ativação da oxidase pela A-II induziu aumento ca. 6 vezes da atividade renaturante da PDI (ligada à sua atividade isomerase redox). Experimentos de co-imunoprecipitação indicaram estreita associação entre a PDI e as subunidades p22phox e Nox1 da oxidase (Figura3), porém não com p47phox ou p67phox. Microscopia confocal demonstrou co-localização entre PDI e p22phox. Em conjunto, estes dados sugerem que a PDI age como uma nova proteína reguladora da NADPH oxidase de VSMC (Janiszewski 2005).

Figura 3: A e B :Células RASM foram estimuladas com AII e submetidas a imunoprecipitação para anti-PDI e anti-p22phox, seguido de gel 2-D SDS-PAGE 12% corado com prata. C e D:Western Blot . E Células RASM foram estimuladas com AII e MG132 por 24horas e submetidas a imunoprecipitação para anti-PDI seguido de Western Blot para p22phox.

Estresse do Retículo Endoplasmático (*Unfolded Protein Response*)

O enovelamento correto de proteínas assistido por chaperonas é uma das principais, se não a principal função do RE, considerando o grande potencial lesivo de proteínas mal-enoveladas e de agregados proteícos (Sitia and Braakman, 2003). Em várias situações fisiológicas e patológicas, a capacidade de o RE enovelar e processar corretamente proteínas recém-sintetizadas não se proporciona à carga protéica, gerando acúmulo de proteínas mal-enoveladas, ou mesmo formação de agregados proteícos. Esta situação é definida como Estresse do RE. Tal acúmulo pode ser induzido potencialmente por redução da concentração intra-reticular de Ca^{2+} , estresse redutor, glicosilação ineficiente de proteínas nascentes, ou simplesmente por um excesso de atividade secretora celular (Rutkowski and Kaufman, 2004; Sitia and Braakman, 2003). A importância do estresse do RE em condições patológicas tem sido reconhecida com frequência cada vez maior, não apenas em tumores (Fribley et al, 2004; Herr et al, 2001) ou doenças neurodegenerativas (Tobisawa et al, 2003; Hayashi et al, 2003), mas também na hipertrofia ventricular com insuficiência cardíaca (Okada et al, 2004), fibrilação atrial (Vitadello et al, 2001), hiperhomocisteinemia (Werstuck et al, 2001), na resistência à insulina e obesidade (Ozcan et al, 2004), e mais recentemente na aterosclerose (Versari et al, 2006).

Como consequência do estresse, o RE ativa uma resposta coordenada de sinalização celular denominada *Unfolded Protein Response*, cujo desencadeante canônico é o próprio acúmulo de proteínas incorreta ou incompletamente enoveladas

no RE (para revisão ver Rutkowski & Kaufman, 2004). A UPR compreende a ativação de três principais redes de sinalização detalhadas a seguir, que têm como objetivo o retorno à homeostase celular. Se o estresse do RE for sustentado em níveis elevados ou atingir intensidades críticas, a própria UPR leva à indução de apoptose pela via do RE (Szegezdi et al, 2006). Em outros casos, a manutenção de níveis sub-letais de estresse do RE leva a uma adaptação celular que inclui, entre outros aspectos, a construção de defesas antioxidantes, cf. discutido a seguir. (Rutkowski and Kaufman, 2007).

A UPR causa como resposta celular:

- 1) Super-regulação de genes para chaperonas (p.ex., Bip/GRP78, GRP94, PDI, etc), no intuito de melhorar o enovelamento proteico. Como também translocação para membrana e secreção de proteínas do RE (p. ex: PDI).
- 2) Ativação e regulação de fatores de transcrição correlacionados a Degradação de proteínas dependente do ER (ERAD), aumentando a degradação de proteínas desenoveladas.
- 3) Suspensão da síntese proteica e da divisão celular decorrente da inibição da tradução de proteínas do ciclo celular como a ciclina D1.
- 4) Estas alterações celulares são eminentemente adaptativas e podem assim contribuir para a homeostase celular. Entretanto, se o estresse for persistente ou intenso, os próprios mecanismos de estresse do RE podem levar à apoptose celular, que é mediada por vias que incluem o fator de transcrição CHOP/GADD153 e particularmente um tipo específico de caspase do RE, a caspase 12 (em roedores – a caspase equivalente no homem parece ser a caspase

A integração celular da UPR envolve elementos de sinalização trans-membrana do retículo para o núcleo e citoplasma, dirigidos contra todos os passos do processo secretor. É composta por um mecanismo sensor, constituído por quinases transmembrana do retículo (por exemplo, Ire1- α ; Ire1- β {*inositol-requiring protein-1*}; PERK {*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*}), e por mecanismos efetores que envolvem fatores de transcrição solúveis citoplasmáticos e nucleares, em particular alguns membros da família ATF/Creb (por exemplo, ATF6 {*transcription factor-6*}) (Figura3) (Szegezdi et al, 2006; Patil and Walter, 2001). Todos esses sensores possuem domínios na parte luminal que liga a chaperona do retículo BIP, em condições de não-estresse. Entretanto, uma vez que proteínas mal-enoveladas se acumulam no lúmen do retículo, BIP é liberada dos sensores da UPR para se ligar a essas proteínas, e essa liberação causa a ativação de todos os fatores simultaneamente (Ma Y, 2001).

Figura 4: Sinalização do Estresse do RE (*Unfolded Protein Response*-UPR). Essa cascata de sinalização contém três sensores de estresse principais: PERK, ATF6 e IRE1. Quando há acúmulo de proteínas mal-enoveladas, a chaperona BIP (grp78) se “desliga” desses sensores e passa a atuar nessas proteínas. A partir daí, tem-se a ativação desses sensores que passam a coordenar a resposta de retorno ao equilíbrio homeostático celular (Szegezdi, et al 2006)..

IRE1 : Ire1 é considerado o mais primitivo de todos os sensores da UPR, ainda é conservado desde a levedura até o homem (Ron and Walter, 2007). Há duas formas de Ire1 que estão presentes em células de mamíferos, Ire1 α que é amplamente expressa e Ire1 β que é expresso somente em epitélio de intestino. Durante estresse do RE, BIP é liberado do domínio do Ire1, que se dimeriza e autofosforila. Estas modificações ativam uma atividade endoribonuclease presente no domínio C-terminal citoplasmático. Apenas um alvo foi identificado até o momento para essa atividade, o XBP1 (*X-box binding protein-1*), que na forma *unspliced* codifica uma proteína com um domínio de ligação ao DNA, mas sem domínio de transativação. Com a retirada de 26 bases, a região C-terminal do XBP1 se altera, e então a forma do XBP1 que sofre *splicing* codifica ambos, o domínio de ligação ao DNA e o domínio de transativação. Assim, a forma que sofreu *splicing*, XBP1(S), regula componentes da via do ERAD e também co-fatores de chaperonas do RE, como a própria BIP (Yoshida et al, 2001). Quando o estresse do ER está controlado, a forma que não sofre *splicing* XBP1(U) age como um regulador negativo da forma XBP1(S), formando um heterodímero que é transportado para o citosol para degradação. Finalmente, em adição a sua atividade ribonuclease, Ire1 ativa JNK (c-Jun amino-terminal kinase) e caspase 12 via uma interação direta com TRAF2 (Urano et al, 2000; Yoneda et al, 2001).

PERK: O segundo sensor da UPR é a quinase PERK, que faz parte da família de quinases eIF2 α (Harding et al, 1999; Shi et al, 1998). Embora a PERK não seja encontrada em levedura, é um componente da UPR presente em todos os metazoários (Patil and Walter, 2001). A liberação de BIP em resposta ao estresse de RE causa a oligomerização e auto-fosforilação da PERK. PERK ativado fosforila a serina 51 da subunidade α do eIF2 α , que resulta na forte inibição da tradução de novas proteínas (Harding, et al, 2000). Isto é suficiente para reduzir 70-90% da síntese protéica após ativação da UPR com indutores farmacológicos como tapsigargina ou DTT. Paradoxalmente, eIF2 α fosforilado induz a tradução de mRNAs independentes do *cap*, tais como ATF4. ATF4 é um fator de transcrição que se liga ao promotor do GADD34 (Ma et al, 2001), uma subunidade regulatória da fosfatase PP1, que é capaz de desfosforilar eIF2 α e restaurar a síntese protéica (Novoa et al, 2001). Outro alvo do ATF4 é o fator de transcrição homólogo ao C/EBP, o CHOP (Ma et al, 2002). CHOP pode heterodimerizar com outros componentes da família do C/EBP, ligando-se assim a novos alvos (Ron and Walter, 2007). Além disso, homodímeros de CHOP apresentam diferente alvos. Embora a indução de CHOP ocorra durante os passos iniciais da ativação da UPR, sua função primária está ligada à apoptose em tempos mais tardios na resposta ao estresse em diferentes células e em várias condições patológicas (Zinszner, et al 1998).

ATF6: O terceiro sensor do estresse do RE, ATF6, é específico de metazoários e ocorre em duas isoformas em mamíferos (α e β), embora o ATF6 α seja o principal efetor durante a resposta da UPR (Adachi, et al, 2008). ATF6 está retido no ER na ausência de estresse, via sua associação com a BIP (Patil and Walter, 2001). Uma

vez que a BIP é liberado dessa ligação pelas próprias proteínas mal-enoveladas, ATF6 é translocado para o Golgi onde é clivado pelas proteases S1P e S2 (Ye et al, 2000). Após a clivagem, ATF6 migra para o núcleo e ativa a transcrição de chaperonas, um grande número de *PDI-likes* que catalisam a formação de pontes dissulfeto, Ero1 β , que age na manutenção do meio ambiente oxidante do RE, várias proteínas envolvidas na ERAD, e o gene XBP1 (Yamamoto et al, 2007; Adachi et al, 2008).

Outra importante via de sinalização celular presente nas células durante o estresse do RE é a via PI3Kinase/AKT (Hosoi et al, 2007). A indução de estresse do RE via farmacológica, com tunicamicina ou taspigargina, leva à ativação de AKT via PI3Kinase, em curto prazo (30 minutos até 4 horas), mas essa ativação desaparece em tempos mais prolongados (12 a 24 horas). A ativação dessa via ocorre em tempos exatamente opostos da indução de BIP e CHOP, uma vez que estes são ativados em tempos mais prolongados. Acredita-se que essa ativação da AKT em resposta ao estresse do RE seja uma tentativa de promover a sobrevivência a tal estresse. Com a exposição prolongada dos indutores farmacológicos de estresse do RE, a sobrevivência fica comprometida e as células apresentam *down*-regulação da AKT, levando à morte celular.

Dois fatores são essenciais para a função chaperona do RE. O primeiro é a manutenção de um ambiente oxidativo intra-organela, o qual depende dos níveis de GSH/GSSG e da atividade de tiol-oxiredutase, p. ex., PDI e análogos. Em segundo lugar, a manutenção de altas concentrações de cálcio intra-reticular é essencial para todas as etapas do processo secretor. Desta forma, não é surpreendente que os

principais estímulos que induzem estresse do RE consistam em substâncias fortemente redutoras ou que alterem os níveis de cálcio. Assim, as principais ferramentas experimentais indutoras do estresse do RE são:

- a) Ditioneitol (DTT): agente redutor
- b) Tapsigargina, ácido ciclopiazônico, tert-butil hidroquinona: inibidores da Ca^{2+} -ATPase, depletando o cálcio intrareticular.
- c) Tunicamicina: um antibiótico que inibe a glicosilação de proteínas e sua exportação do retículo
- d) Brefeldina-A: inibidor do transporte retículo-Golgi (Xiao et al. 1999)

Acoplamento entre estresse oxidativo e estresse do RE

Recentes evidências da literatura sugerem convergência entre estresse do RE e estresse oxidativo (revista em nosso grupo por Santos et al, 2009). Em parte, esta convergência ocorre no contexto do próprio enovelamento protéico. O enovelamento correto de proteínas ocorre em ambiente oxidante do RE, facilitando a formação de pontes dissulfeto pela atividade isomerase da PDI oxidada. A reoxidação da PDI é promovida pela oxidase Ero1 em um processo no qual a transferência de equivalentes oxidantes da Ero1 para a PDI é compensada e alimentada pela transferência de elétrons da Ero1 para o oxigênio via FAD, gerando peróxido de hidrogênio. Assim, a geração de ROS ocorre como subproduto do enovelamento protéico oxidativo. Este mecanismo está fortemente exacerbado durante a UPR, de modo que a produção de ROS é um componente integrante da resposta a estresse do RE, sendo desencadeada pela UPR e ao mesmo tempo contribuindo para sustentar a

sinalização desta via (Santos et al, 2009). Neste contexto, a ativação da UPR pode ser um mecanismo adaptativo para preservar a função celular e a sobrevivência durante estresse oxidativo. De fato, ocorre ativação da UPR em resposta ao dano oxidativo a proteínas do retículo, talvez como uma forma de controlar a produção de ROS (Kelsen et al, 2008; Lai et al, 2003). Esse acoplamento está presente na patogênese de várias doenças incluindo diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (Malhotra and Kaufman, 2007; Yokouchi, et al 2008; Tagawa, et al 2008).

A existência de uma fonte enzimática de geração de ROS levanta a hipótese de que tal enzima (p.ex. a NADPH oxidase) possa agir como um elemento integrador da resposta celular a diferentes tipos de estresse. Dados da literatura sustentam essa idéia, uma vez que a subunidade NOX4 é elemento integrativo do estresse do RE em células musculares lisas (Pedruzzi, et al, 2004; Santos, et al, 2009). Nesse trabalho, a Nox4 está presente durante a indução do estresse do RE por *7-ketocholesterol*, e ainda parece estar envolvida nas vias apoptóticas derivadas da UPR (Pedruzzi, et al, 2004). Sabe-se ainda que a Nox4 está localizada no retículo endoplasmático e que essa localização é fundamental para a sua sinalização de ROS, como por exemplo, a regulação da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), também residente do RE cuja regulação é redox dependente (Salmeen and Barford, 2005). No estresse do RE, pode ocorrer, como visto acima, regulação e translocação para a membrana da PDI. Assim, nosso laboratório tem investigado a hipótese de que a interação entre a PDI e a NAD(P)H oxidase pode servir como um mecanismo acoplador entre o estresse do RE e estresse oxidativo. Estudos em andamento (Santos, et al, 2009) mostraram intensa ativação da NADPH oxidase em células musculares lisas e fagócitos submetidos ao estresse do RE. Os mecanismos e efeitos biológicos resultantes da

interação entre os dois tipos de estresse estão sob ativa investigação e devem variar conforme o tipo de célula, a intensidade dos estímulos, poder redutor celular total e capacidade de adaptação à resposta do estresse do RE. É importante ressaltar que a associação da PDI ao RE é bem conhecida, com a proteína ligada à membrana da organela pela sequência KDEL (Harter & Wieland, 1996). Apesar do importante papel da PDI no RE, a PDI exerce papéis em outros compartimentos. No citoplasma, a PDI parece estar associada a outras proteínas do citoesqueleto, com enzimas como a prolil-4-hidroxilase presente na membrana do RE (Klappa et al, 2000) e também com a proteína de triglicerídeos microssomal (Wetterau et al, 1991). Assim, a interação PDI-oxidase está estreitamente vinculada à função e disfunção do RE.

A interação entre estresse do RE e estresse oxidativo ocorre também no contexto da adaptação antioxidante em resposta ao estresse. De fato, foi demonstrado em modelos celulares e em *C. elegans* que as respostas celulares resultantes do estresse do RE conferem adaptação cruzada a estímulos oxidantes e foram associados a alterações adaptativas no metabolismo de aminoácidos (Harding et al., 2003; Rutkowski & Kaufman, 2003). O fator de transcrição ATF4 parece ser um dos elementos centrais à integração de tal resposta celular ao estresse, uma vez que ele regula um importante número de genes envolvidos na proteção ao estresse oxidativo, como heme-oxigenase1, glutathione peroxidase e peroxirredoxina1 (Harding et al, 2003; Kitiphongspattana et al, 2007). Além disso, estudos têm indicado que o aumento da degradação, uma das respostas induzidas pela UPR, é também importante no controle do estresse oxidativo, uma vez que a inibição do ERAD com o uso de inibidores do proteasoma em células causa um aumento de ROS (Hsieh et al, 2007; Lai and Wong, 2005). Outro importante fator de integração dessas vias é o

fator de transcrição XBP1. O XBP1 é regulado pela via IRE1 durante a resposta ao estresse do RE e sua ativação ocorre via *splicing* alternativo. A proteína codificada deste *splicing* age como fator de transcrição de regulação positiva para chaperonas residentes do ER bem como elementos integrantes da ERAD, ou seja, uma parte de resposta protetora para as células em estresse (Kim et al, 2008). Estudos recentes mostraram outro papel de XBP1, relacionado à prevenção do estresse oxidativo induzido por H₂O₂, por meio de regulação positiva da expressão da catalase (Liu et al, 2009). Além disso, estudos de proteômica mostraram que além de genes para proteção redox, outros genes regulados pelo XBP1 estão envolvidos com reparos a danos ao DNA (Acosta-Alvear et al, 2007). De fato, XBP1 é fundamental para a sobrevivência celular durante a hipóxia (Romero-Ramirez, et al, 2004).

Em suma, talvez na maioria das condições patológicas, estresse oxidativo ocorra no contexto de integração com vários outros tipos de estresse celular, como p.ex. estresse do RE. O papel do complexo NADPH oxidase neste contexto tem sido investigado recentemente. Entretanto, o papel de NADPH oxidase e PDI no estresse oxidativo associado ao estresse induzido por inibição do proteasoma, uma condição de importância fisiopatológica e implicações terapêuticas, não está claro. Por um lado, pode-se esperar que a inibição do proteasoma induza uma resposta geral integrada de estresse, desencadeando fenômenos comuns e ancestralmente conservados de resposta ao estresse celular. Por outro lado, pode-se esperar que a inibição do proteasoma tenha efeitos diretos no complexo NADPH oxidase, tanto por modulação dos níveis e compartimentalização protéica de suas subunidades como por potenciais efeitos independentes da proteólise, p.ex., na transcrição gênica. Além disso, a resposta celular à inibição do proteasoma tem estreita interação com a UPR,

já que a inibição do proteasoma pode gerar acúmulo de proteínas mal-formadas não degradadas. Os efeitos da inibição do proteasoma na sinalização da UPR, entretanto, foram pouco estudados, particularmente o efeito da inibição do proteasoma na ativação da isoforma Nox4 da NADPH oxidase, que é um componente importante da UPR em células musculares lisas vasculares.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Gerais

Investigar o papel do complexo NADPH oxidase e da PDI na resposta redox ao estresse induzido por inibição do proteasoma, bem como o efeito da inibição do proteasoma na regulação redox da UPR mediada pela isoforma Nox4 da NADPH oxidase.

Específicos

- i. Estudar o efeito da inibição do proteasoma (MG132 e lactacistina) na atividade e expressão da NADPH oxidase vascular, produção de ROS e sinalização celular desencadeada por diferentes mecanismos, a saber, estresse do RE (tunicamicina) e o ativador clássico angiotensina II.
- ii. Investigar o efeito da inibição do proteasoma na sinalização da UPR e possível associação com efeitos na isoforma Nox4 da NADPH oxidase.
- iii. Investigar o possível papel da PDI na resposta redox à inibição do proteasoma.
- iv. Investigar a ocorrência e perfil de ubiquitinação e fosforilação da PDI secundária à ativação da NAD(P)H oxidase e estresse do RE (apêndice).

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema Nanopure da Barnstead e eventualmente com Chelex-100.

O meio de cultura F-12 Coon's Modification (F-12), MG132, e a angiotensina II foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, EUA), o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), meio cultura LB, penicilina/estreptomicina, soro fetal bovino (SFB) e tripsina da Gibco BRL-Life Technologies, Grand Island, EUA. Os inibidores de protease (PMSF, aprotinina, pepstatina A, ortovanadato de sódio, fluoreto de sódio e pirofosfato de sódio), albumina bovina, NADPH, lactacistina, fosfato de sódio utilizados são da Calbiochem ou Merck (Darmstadt, Alemanha).

O anticorpo da PDI foi adquirido pela Stressgen Biotechnologies, San Diego, EUA; e da p22phox foi cedido pelo Dr. Verhoeven. Os anticorpos anti-fosfoserina e anti-fosfotreonina foram adquiridos da Qiagen e o anti-fosfotirosina da BD Technologies. A proteína G, Coomassie Blue, Immobiline DryStrip pH 3-10, CHAPS, DTT, azul de bromofenol, urea, iodoacetamida, Silver Staining Kit Protein, SDS, PharmalyteTM 3-10 e o kit ECL da Amersham Biosciences, EUA.

O peróxido de hidrogênio foi obtido da Fisher Scientific (Pittsburgh, EUA), e sua concentração foi periodicamente determinada por espectrofotometria ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Kuthan e Ulrich, 1982). O *Amplex Red Peroxide/Peroxidase Assay Kit* e a dihidroetidina foram adquiridos da Molecular Probes.

A concentração de proteína nas soluções foi medida utilizando-se o kit Biorad Protein Assay (Biorad) baseado no método de Bradford, utilizando como padrão a albumina bovina.

Cultura celular

As células musculares lisas aórticas de coelhos (RASM) foram cultivadas a partir de uma linhagem celular estabelecida e imortalizada por seleção pelo Prof. V. Buonassisi na Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (Buonassisi et al, 1976). As células RASM foram mantidas em frascos de cultura contendo meio completo F-12 Coon's com penicilina/estreptomicina, suplementado com 10% (v/v) de SFB. Seu crescimento foi permitido até confluência em torno de 90%. Em experimentos específicos, as células RASM foram incubadas com angiotensina-II (100 nM), tunicammina (5µg/mL), MG132 (100µM) e lactacistina (20µM) por 4h confluência >80%.

Co-imunoprecipitação da PDI e p22phox

Uma fração de células previamente incubadas com estressores do RE e/ou inibidores do proteasoma, foi ressuspensa em tampão de imunoprecipitação (50mM Tris-HCl, pH 7.5, contendo 0.1% Triton, 2mM ortovanadato de sódio, 1mM fluoreto de sódio, 1mM pirofosfato de sódio, 1µg/mL leupeptina, 1µg/mL aprotinina, and 1µg/mL pepstatina em gelo). A seguir, as amostras foram sonicadas (3x/10s com 4W) e centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi incubado com anticorpo específico (anti-PDI 1:1000 Stressgen e anti-p22phox 1:1000 Santa Cruz) por 12 horas. A precipitação dos imunocomplexos foi desencadeada pela adição de

proteína G. Após 2 hs, o imunocomplexo foi recuperado por centrifugação a 12.000rpm. Esse imunoprecipitado foi lavado e centrifugado por três vezes. O precipitado foi ressuspendido em tampão de amostra e em seguida centrifugado. O imunoprecipitado da PDI e da p22phox foi resolvido em gel 2-D.

Eletroforese bidimensional

Os imunocomplexos foram solubilizados em solução de amostra (8M urea, 4%CHAPS, 60mM DTT, 2% PharmalyteTM 3-10, 0.002% azul de bromofenol) e submetidos a focalização isoeétrica usando *Immobiline DryStrip pH 3-10 isoelectrofocusing gel*. A focalização foi realizada utilizando o *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System* da Amersham Biosciences. Após a focalização, as tiras foram equilibradas com DTT 2,5mg/ml em tampão de equilíbrio contendo uréia 6M e SDS 1% por 15 minutos e em seguida no mesmo tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida 45mg/ml por mais 15 minutos. As tiras equilibradas foram submetidas á segunda dimensão em gel de SDS-PAGE 12% para separação de proteínas baseada no peso molecular. O gel foi corado com prata utilizando o *Silver Staining Kit Protein* (Amersham Biosciences) ou submetido a western blotting, como descrito abaixo.

Obtenção da fração particulada de membrana

Todo o procedimento foi realizado sobre gelo ou com soluções resfriadas a 4°C. Utilizamos *ca.* 10⁷ células ainda aderentes aos frascos de cultura em torno de 90% de confluência, que foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (50 mM PBS com 10µM EDTA), pH 7,4 , sendo a seguir raspadas das placas para tubos de

centrifugação contendo tampão de extração (Tris 50 mM, pH 7,4 com PMSF 1 mM, pepstatina A 2μM e leupeptina 2μM), e em seguida sonicadas (3 x 10 s com 4W). O material foi centrifugado a 200 g por 5 minutos para remoção de células intactas e grandes aglomerados. Uma segunda centrifugação do material sobrenadante a 18.000 g por 15 minutos permitiu a precipitação de núcleos celulares, mitocôndrias e grandes organelas. Por fim, o sobrenadante da centrifugação anterior foi submetido a uma última centrifugação a 100.000 g por 60 minutos. O material precipitado desse último procedimento contendo principalmente microssomas e vesículas de membrana plasmática foi ressuspensionado em 100μl de tampão Tris 50 mM contendo inibidores de protease, e congelados a -80°C até a análise.

Produção/indução de $O_2^{\bullet-}$ gerado pela atividade NADPH oxidase e análise da produção total de ROS em VSMC

Análise por quimiluminescência da lucigenina: medida da produção de $O_2^{\bullet-}$

A quimiluminescência amplificada por lucigenina foi analisada nas frações de membrana de células VSMC. 20μL de fração de membrana (20μg proteína) foram adicionados em 1 mL de solução de PBS/10μM EDTA, após termostatização a 37°C, foi adicionado 5μM de lucigenina. Após contagem basal, 300μM de NADPH foram adicionados e as contagens de luminescência foram registradas continuamente por 5 minutos, em um luminômetro Berthold 9505 (GE & Instruments GmbH, Munique, Alemanha). Os sinais da linha de base foram subtraídos daqueles obtidos após a adição de NADPH, e os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína e descritos como $\text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Oxidação da DHE em células intactas e fração de membrana

Células com confluência >80% foram mantidas em placas de 6 poços e estimuladas por 4h com angiotensina-II 100 nM, tunicammina 5µg/mL na presença ou não de MG132 100µM e lactacistina 20µM. Após lavagem com PBS, as células foram mantidas em PBS/EDTA ao qual foi adicionado DHE 50 µM por 30 min. Após lavagem com PBS, as células foram lisadas mecanicamente em presença de acetonitrila (0,5mL por poço), sonicadas (1 ciclo de 10s), e centrifugadas (12.000 rpm por 10 min a 4°C). Os sobrenadantes foram secos sob vácuo (Speed VacR Plus SC-110A, Thermo Savant) e guardados a - 20°C até o uso. Para análise por HPLC, os precipitados foram ressuspensos em 120 µl PBS.

Para análise da atividade NADPH oxidase, fração de membrana (*ca.* 20 µg) foi incubada com DHE 50 µM em PBS (pH 7,4 contendo DTPA 100µM) na presença de NADPH 300µM por 30 min. a 37°C no escuro. A reação foi paralisada no gelo e após a centrifugação (12.000 rpm, 10 min) o sobrenadante da reação foi injetado para análise por HPLC.

Análise por sistema de HPLC

Estes procedimentos foram recentemente validados em nosso laboratório (Laurindo et al, 2008) e representam avanço metodológico significativo em relação à análise da fluorescência total das células. As amostras foram analisadas em sistema HPLC (Waters) equipado com detectores UV-visível (PDA) (W2996) e fluorescência (W2475). A separação foi realizada em coluna NovaPak C18 (3,9x150mm, 5µm de diâmetro de partícula), com gradiente linear de H₂O:CH₃CN (9:1 v/v) + TFA 0,1%

para CH₃CN (100%) em 35 min. com fluxo de 0,5 mL/min. DHE foi monitorada a 245 nm e EOH e E por detecção por fluorescência (excitação 510nm e emissão 595nm). A quantificação foi realizada pela integração das áreas dos picos correspondentes e comparação com as áreas obtidas de padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas. As concentrações dos padrões foram realizadas utilizando-se da absorvidade molar de cada composto (E $\epsilon_{285\text{nm}} = 5.740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e DHE $\epsilon_{265\text{nm}} = 1.963 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O padrão de hidroxietídio foi preparado conforme descrito anteriormente (Zhao et al, 2003). DHE (50 μM) foi oxidada pelo sistema xantina/xantina oxidase (0,5 mM/0,05 U/mL) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) contendo 100 μM DTPA a 37°C por 30 min. EOH foi coletado por HPLC e seco. O resíduo cor-de-rosa obtido foi ressuspensão em DMSO e analisado por espectroscopia de absorção (E-OH $\epsilon_{285\text{nm}} = 9.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Zhao et al, 2005).

Preparação do lisado celular e imunoprecipitação

Uma fração das células, após serem incubadas com estressores do RE e inibidores do proteasoma, foi ressuspensa em tampão de imunoprecipitação (50mM Tris-HCl, pH 7.5, contendo 0.1% Triton, 2mM ortovanadato de sódio, 1mM fluoreto de sódio, 1mM pirofosfato de sódio, 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina, and 1 $\mu\text{g/mL}$ pepstatina A em gelo); em seguida as amostras foram sonicadas (3 vezes por 10 segundos com 4W) e centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi incubado com anticorpo primário específico overnight. A precipitação dos imunocomplexos foi desencadeada pela adição de proteína G. Após 2 horas o imunocomplexo foi recuperado por centrifugação a 12.000rpm. Esse

imunoprecipitado foi lavado e centrifugado por três vezes. O precipitado foi ressuspenso em tampão de amostra, e em seguida, centrifugado. O imunoprecipitado foi resolvido por Western Blotting (Johansen and Svensson, 2002).

Western Blotting

As proteínas de lisados celulares (alíquota de 30 µg por canaleta) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8 ou 12%, conforme o caso). A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (sistema de transferência “semi-dry”). A membrana foi bloqueada com tampão de lavagem (tris-HCl 50 mM, pH 7.4, e NaCl 150 mM) contendo Tween 20 0,05%, e leite desnatado 5% (ou albumina bovina), por 90 min. A seguir, a membrana foi incubada, durante a noite, em solução contendo anticorpo primário, sendo a seguir incubada por 1h com anticorpo secundário (IgG anti Ig de camundongo, cabra ou rato, conjugada com peroxidase – as diluições utilizadas foram aquela recomendadas pelos fabricantes). A revelação foi feita por quimiluminescência, com kit ECL da Amersham Pharmacia Biotech, com diferentes tempos de exposição ao filme fotográfico.

Medida de GSH/GSSG intracelular por HPLC

As VSMC foram lavadas com PBS/EDTA e raspadas em tampão acetato (10mM pH 6,5 0,5% Triton e 100µM EDTA). A análise de GSSG foi realizada indiretamente pela sua redução enzimática a GSH pela glutathione redutase (0,6U/ml)/NADPH (0,2mg/ml) por 30 minutos. A reação foi paralizada com a centrifugação das amostras (10.000 rpm/5min) em ácido trifluoroacético 10%. Os sobrenadantes foram injetados em sistema HPLC (Waters Corp. Milford, MA), com

detecção eletroquímica o GSH foi identificado e quantificado pela comparação do tempo de retenção da amostra com padrão autêntico submetido às mesmas condições cromatográficas. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína e expressos em nmol/mg proteína. A quantificação de GSSG foi inferida pela diferença de GSSG total reduzida em relação à GSH total das mesmas amostras, considerando-se a estequiometria 2GSH/GSSG (Hiraku et al, 2002).

Ensaio de proliferação celular MTT

Para o ensaio, 1×10^4 células por *well* foram cultivadas, seguindo-se por dois dias, em uma placa de 96 poços com 100µl de meio de cultura. No dia indicado, foi adicionado 10µl de MTT (Molecular Probes, 10 mg/ml) em cada *well*, e em seguida a placa foi incubada a 37°C por 4 horas. Após a remoção do meio de cultura, o precipitado roxo em cada well foi dissolvido em 200µl de DMSO e a densidade óptica em 570nm foi então quantificada. Este ensaio foi realizado em quadruplicata.

Atividade da Superoxido Dismutase

A atividade superóxido dismutase foi medida pela inibição da redução do citocromo c^{3+} para citocromo c^{2+} acompanhando-se a absorbância a 550nm a 25°C. Homogenatos das células (10-15µg) foram adicionados à cubeta contendo tampão fosfato (50mM, pH 7,8, contendo EDTA 0,1mM), xantina (0,5mM), xantina oxidase (cerca de 0,2 U/mL) e citocromo c^{3+} (20µM). A redução de 50% da oxidação do citocromo c^{3+} pelo homogenato foi considerada 1U de SOD (Imalay and Fridovich, 1991).

Análise da expressão de mRNA das Noxes, p22phox e PDI por PCR quantitativa

O mRNA total das VSMC foi purificado com o kit SpinMini RNA isolation (GE). A quantificação do mRNA foi feita por absorbância a 260nm (NanoDrop) e a pureza confirmada pela análise das bandas de rRNA em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio. O mRNA (3-5µg) foi convertido em cDNA pela incubação com OligodT (25ng/µL), dNTP (500µM de cada), DTT (5µM), RNase OUT (2U/µL) e SuperScript II, a 42⁰C por 50 min. Para quantificar as isoformas da NADPH oxidase de células de coelho, colaboramos com o Prof. Bernard Lassègue (Emory University, Atlanta, EUA) que já havia clonado as seqüências das Nox1 e Nox4 de coelho e tornou-as disponíveis para nossos estudos (pois não estão ainda publicadas no PubMed). Estas seqüências permitiram a obtenção de padrões (em plasmídeos) e o desenho de primers de altas temperaturas para RT-PCR em tempo real, que foram gentilmente cedidos ao nosso grupo. Os clones foram obtidos a partir de amostras de cólon (Nox1) e rim (Nox4) de coelho. Os plasmídeos foram amplificados em bactérias competentes e purificados (Kit MidPrep/Qiagen). As soluções de reação para as corridas de Real Time-PCR foram realizadas com: plasmídeos (entre 10³ a 10⁷ cópias/reação), primers (200nM), cDNA (150ng) e reagente SyberMasterMix (Invitrogen) conforme especificações sugeridas pelo fabricante. Os primers para PDI, p22phox e 18S foram obtidos pelo software *OligoPerfectTMDesigner* da Invitrogen. Os primers testados que apresentaram melhores curvas de calibração foram: Nox1, right (CATCATGGAAGGAAGGAGA), left (GCTTCCGGATAGGCTCCACA); Nox4,

right (CCACAGACTTGGCTTTGGAT), left (TACTGGCCAGGTCTTGCTTT);
GAPDH, right (TCACCATCTTCCAGGAGCGA), left
(CACAATGCCGAAGTGGTCGT); PDI, right
(CGGCCCAGGAACCTTCTTAAAGCCG), left
(CTTCCCAACGCTCAAGTTCTTC), p22phox, right
(GTACTTCATGGCGTAGGTGCCGAAGTAC) left
(CAGATCGAGTGGGCCATGTG), 18S, right (CCGGTCCAAGAATTTACCTC)
left (CGGTTCGGAATAATGGAACAGGACCG). As reações foram realizadas no
equipamento RG6000 (Corbett).

Atividade proteolítica 20S Proteasoma

A atividade proteolítica 20S foi determinada em alíquotas de 10µg de homogenato protéico celular, utilizando uma probe fluorescente (AMC) que corresponde a um peptídeo substrato sintético (excitação: 355nm e emissão: 460nm), LLVY-AMC na presença de SDS (kit *20S proteasoma*, Calbiochem).

***Splicing* XBP1**

Células musculares lisas de rato foram estimuladas com angiotensinaII, tunicamicina e MG132 overnight. As amostras de RNA foram obtidas a partir do kit RNeasy da Qiagen, em seguida realizou-se RT-PCR e finalmente a PCR com *Platinum Taq Polymerase* da Invitrogen com primers para as formas de *splicing* e *unsplicing* do XBP1, fabricados pela Invitrogen, com temperatura de anelamento de 72oC em 35 ciclos de 15 segundos. Os produtos da reação devem ter 200 e 174 pares de bases para *unsplicing* e *splicing* formas de XBP1, respectivamente. Para

verificar esses produtos realizamos eletroforese na presença de brometo de etídio em gel de agarose 3%.

Microscopia confocal

As células contidas em lamínulas (13mm) foram fixadas com paraformaldeído 4% *overnight*. Após permeabilização (Nonidet P40 0,1% em PBS), as células foram incubadas com anticorpo primário (anti-PDI da Santa Cruz 1:100 e anti-26S proteasoma 1:100) diluídos em PBS contendo albumina (1%) *overnight* a 4°C. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpos secundários (anti-camundongo conjugado com Alexa488 e anti-cabra conjugado com Alexa680), juntamente com 4'6-diamidina-2-fenilindol (DAPI, 10µg/mL, Sigma) e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM510 Meta (projeto Multiusuários Fapesp 04/08908-2).

Transfecção transitória da PDI-GFP

O plasmídeo contendo a sequência da PDI seguido da sequência da proteína fluorescente verde (GFP-*green fluorescent protein*) foi construído em pcDNA 3.1 em colaboração com o Professor Bernard Lassègue da Emory University, Atlanta, Georgia). O plasmídeo foi superexpresso em E. coli DH5α competente e purificado em kit MidiPrep (Qiagen). Células HEK293 foram crescidas em placas de cultura de 10cm de diâmetro. Após 24horas de carenciamento (meio de cultura F12 sem soro fetal bovino), substituiu-se o meio de cultura por 10 ml de meio de transfecção (F12 contendo soro fetal bovino 10%, 10µg de plasmídeo e 25µL de Lipofectamina®, Invitrogen). Após 8 horas, o meio de transfecção foi substituído pelo meio de cultura

F12 com 10% de SFB. Após 48 horas, iniciou-se os estímulos e os protocolos de imunoprecipitação.

Análise estatística

Os valores foram expressos com média $\pm$ desvio padrão da média. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste t de Student para valores não pareados ou análise de variâncias (ANOVA), seguida por teste Student-Newman Keuls, com significância estatística de 5%. O software utilizado foi *The Primer of Biostatistics*, de Staton A. Glantz, versão 3.01, McGraw-Hill, 1992.

RESULTADOS

RESULTADOS

Escolha de concentrações sub-apoptóticas de inibidores do proteasoma em células musculares lisas vasculares

Considerando os efeitos geralmente pró-apoptóticos dos inibidores de proteasoma, experimentos iniciais investigaram curvas concentração-resposta dos compostos MG132 e lactacistina, com o fim de identificar concentrações sub-letais que não gerassem resultados inespecíficos relacionados ao processo apoptótico em si. Ensaio de viabilidade celular na presença e na ausência do soro fetal bovino mostraram concentrações apropriadas de 1 μ M para MG132 e de 5 μ M para lactacistina (Figura 5).

Figura 5: Análise da viabilidade celular na presença de inibidores do proteasoma. 1×10^4 densidade de células por well foram cultivadas em placas de 96 poços. Após a incubação de Lactacistina (1-5 μ M) e MG132 (1-10 μ M) por 24 horas, foi adicionado MTT (Molecular Probes, 10 mg/ml) em cada well, e em seguida a placa foi incubada a 37°C por 4 horas. Após a remoção do meio de cultura, o precipitado foi dissolvido em 200 μ l de DMSO e a densidade óptica em 570nm foi então quantificada. Os resultados refletem os valores de 4 experimentos independentes.

Inibidores do proteasoma causam estresse oxidativo

Para investigar em que grau os inibidores do proteasoma induzem estresse oxidativo per se, avaliamos os produtos de oxidação da DHE, analisados por HPLC, nas células musculares lisas. Tanto MG132 quanto lactacistina induziram aumento significativo dos subprodutos 2-hidroxi-etídio (indicativo da produção de superóxido) e etídio (indicativo menos específico da produção de oxidantes como peróxidos, assim como atividade de peroxidases e níveis de heme) em relação ao controle,

inclusive de forma similar à tunicamicina (Figura 6). A atividade superóxido dismutase sofre, no caso da incubação com lactacistina, uma diminuição da atividade, embora a alteração não tenha sido estatisticamente significativa após incubação com MG132 (Figura 7). Como caracterização mais direta de estresse oxidativo celular, a análise dos níveis de glutathione mostrou diminuição significativa da relação GSH/GSSG após incubação com MG132, em níveis comparáveis aos observados após indução de estresse do RE com tunicamicina. Interessantemente, a co-incubação de tunicamicina com MG132 não induziu efeito aditivo nestes índices. (Tabela2). Estes dados indicam que a inibição do proteasoma em nossas células musculares lisas vasculares gera per se níveis elevados de produção de ROS e estresse oxidativo.

Figura 6: Inibidores do proteasoma induzem estresse oxidativo. Quantificação das taxas de formação de EOH e E em extrato total de células RASM expostas a tunicamicina, lactacistina e MG132 pelo método da DHE, conforme descrito em materiais e métodos. C corresponde ao controle, TN a tunicamicina, Lacta a lactacistina e MG a MG132. Este resultado reflete os valores de 3 experimentos independentes.

Figura 7: Inibidores do proteasoma induzem estresse oxidativo. Atividade da Superóxido Dismutase em extrato celular de RASM após 4 horas de incubação com tunicamicina, lactacistina e MG132, conforme descrito em materiais e métodos. C corresponde ao controle, TN a tunicamicina, Lacta a lactacistina e MG a MG132. Este resultado reflete os valores de 3 experimentos independentes.

Razão GSH/GSSG em homogenatos totais de RASM^a

Amostras	GSH/GSSG (% of controle)
Controle ^b	100.0 ± 2.0
Tunicamicina*	40 ± 8.0
MG132*	41 ± 6.0
Tunicamicina+MG132*	33 ± 3.0

^a Tempo de incubação foi de 4 h.

^b Quantidade total de GSH no controle foi 33.4 ± 4.5 nmolGSH/mg proteína.

* P < 0.005 vs, controle

HPLC representativo da detecção eletroquímica de GSH em homogenatos totais de RASM

Tabela2: Inibidores do proteasoma induzem estresse oxidativo. Taxa de GSH/GSSG após incubação de 4 horas com tunicamicina e MG132 em homogenatos totais de RASM. Este resultado reflete os valores de 3 experimentos independentes

Inibidores do proteasoma estimulam a atividade basal da NADPH oxidase porém perturbam significativamente a resposta desse complexo a agonistas

Experimentos subsequentes analisaram a medida da atividade NADPH oxidase na fração de membrana de células musculares lisas vasculares incubadas ou não com inibidores de proteasoma em combinação ou não com agonistas ou estímulos conhecidos do complexo. Angiotensina II ativa preferencialmente a isoforma Nox1 da oxidase, enquanto o estressor de RE tunicamicina ativa preferencialmente a isoforma Nox4. A atividade da oxidase foi avaliada tanto pela metodologia da DHE como pela lucigenina. Em condições basais, tanto MG132 quanto lactacistina induzem aumento significativo na atividade da oxidase, embora este efeito não exiba uma dependência clara da concentração e varie conforme o método, provavelmente devido a diferentes sensibilidades dos mesmos e detecção preferencial de tipos específicos de ROS (Figura 8). Por outro lado, a incubação com MG132 reduz a resposta à angiotensina II, tanto no valor percentual de ativação (que reduz 21%) como na ativação máxima (que reduz 53%). Além disso, a inibição do proteasoma anula e chega a reverter a resposta à tunicamicina (Figura 9).

Figura 8: Inibidores do proteasoma induzem a atividade basal da NAD(P)H oxidase. Quantificação das taxas de formação de EOH e E em fração de membrana de células RASM expostas a tunicamicina, lactacistina e MG132 pelo método da DHE, e também ensaio de lucigenina para as mesmas condições, conforme descrito em materiais e métodos. C corresponde ao controle, TN a tunicamicina, Lacta a lactacistina e MG a MG132. Estes resultados refletem os valores de 3 experimentos independentes.

Figura 9: Inibidores do proteasoma promovem diminuição da atividade da NAD(P)H oxidase frente a seus agonistas. Quantificação das taxas de formação de EOH e E em fração de membrana de células RASM expostas a tunicamicina, angiotensina-II e MG132 pelo método da DHE, conforme descrito em materiais e métodos. C corresponde ao controle, TN a tunicamicina, Lacta a lactacistina e MG a MG132. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Inibidores do proteasoma alteram fortemente a expressão do mRNA das subunidades da NADPH oxidase

A análise da expressão do mRNA de subunidades do complexo está fundamentada nos fatos de que (1) tais alterações ocorrem normalmente na NADPH oxidase não –fagocítica durante a resposta a agonistas e (2) o sistema ubiquitina-proteasoma não só atua na degradação de proteínas como também na transcrição gênica (Collins and Tansey 2006).

A incubação de células musculares lisas vasculares com angiotensina II ou tunicamicina induziu aumentos preferenciais na expressão do mRNA de NOX1 e Nox4, respectivamente, em concordância com dados prévios de nosso laboratório (Santos et al, 2009) e da literatura (Dikalov et al, 2008; Dikalova et al, 2005; Lassègue et al, 2001).

Com relação à Nox1, a incubação apenas com MG132 promoveu pequeno aumento na sua expressão, não estatisticamente significativa. A incubação com angiotensin II (200 nM, 16 horas) na presença de MG132 (1µM) induziu significativa redução da expressão do mRNA de Nox1 em relação a esse agonista. (Figura 10 e 11). Após tunicamicina (5µg/mL, 16 horas), a expressão de Nox1 não teve alterações estatisticamente significativas, embora a expressão na presença de MG132 tenha sido menor vs. controle. A expressão da subunidade reguladora p22phox não sofreu alterações estatisticamente significativas, embora tenha mostrado diminuição após incubação com MG132.

A co-incubação de MG132 e TN promoveu significativa e quase completa redução na expressão do mRNA da NOX4, em sintonia com o efeito na atividade NADPH oxidase. A expressão do mRNA da PDI aumentou com o estímulo da tunicamicina (5µg/mL, 16 horas). MG132 não induziu *per se* expressão do mRNA da PDI, porém a sua co-incubação com tunicamicina preveniu completamente o aumento induzido de sua expressão por esta.

Nesses ensaios não foi possível utilizar o mRNA GAPDH ou 18S como normalizadores, uma vez que ambos variaram muito na presença do inibidor do proteasoma.

Figura10: Estudos da expressão gênica das subunidades NOX1 e p22phox da NADPH oxidase vascular. Células RASM foram estimuladas com Angiotensina II, Tunicamicina e MG132 e submetidas a extração de mRNA, posterior reação de transcriptase reversa e finalmente PCR em tempo real para NOX1 e p22phox, conforme descrito em materiais e métodos. RT-PCR: PCR-tempo real. C corresponde ao controle, AII à angiotensinaII 200nM, TN a tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM. Esses resultados foram obtidos a partir de 6 experimentos independentes.

Figura 11: Estudos da expressão gênica das subunidades NOX4 e PDI da NADPH oxidase vascular. Células RASM foram estimuladas com Angiotensina II, Tunicamicina e MG132 e submetidas a extração de mRNA, posterior reação de transcriptase reversa e finalmente PCR em tempo real para NOX4 e PDI, conforme descrito em materiais e métodos. RT-PCR: PCR-tempo real. C corresponde ao controle, AII à angiotensinaII 200nM, TN a tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM. Esses experimentos foram obtidos a partir de 6 experimentos independentes.

Estudos da expressão protéica das subunidades da NADPH oxidase

Análise western da subunidade NOX4 em células musculares lisas mostrou que, ao contrário do aumento da expressão do mRNA, a incubação com tunicamicina (5µg/mL, 16horas) induz alterações mínimas na expressão protéica dessa

subunidade. (Figura 13). A inibição do proteasoma diminuiu a expressão proteica, indicando que o proteasoma não é um fator limitante da quantidade instantânea da proteína neste caso e que a redução do mRNA da Nox4 corresponde a uma redução da proteína.

Análise da expressão proteica da subunidade NOX4

Figura 12: Estudos da expressão protéica da subunidade NOX4. Células RASM foram estimuladas com AII, Tunicamicina e MG132 por 16 horas e submetidas à obtenção de homogenato total. Em seguida essas amostras foram submetidas a Western Blot para NOX4 (anticorpo cedido gentilmente pelo Pesquisador David Lambert), conforme descrito em materiais e métodos. WB: Western Blot

Angiotensina II e tunicamicina induzem a atividade proteolítica da subunidade 20S do proteasoma

Tendo demonstrado que a NADPH oxidase contribui para o estresse oxidativo causado pelos inibidores do proteasoma, e que a via do sistema ubiquitina-proteasoma contribui para resposta de ativação da oxidase aos seus agonistas, realizamos experimentos analisando a atividade proteolítica da subunidade 20S do proteasoma na condição basal ou após incubação com angiotensina II ou

tunicamicina. A atividade do proteasoma foi analisada após 4 horas de incubação, pois nossos dados prévios indicam que existe um aumento mensurável de atividade NADPH oxidase na fração de membrana com ambos os agonistas. Os resultados mostraram aumento precoce da atividade do proteasoma, que é inibida como esperado por MG132 (Figura 13). É interessante notar que angiotensina II ou tunicamicina, que são acompanhadas por ativação do proteasoma, desencadeiam vias bastante distintas de sinalização intracelular. Angiotensina II ativa vias de sinalização PI3K/AKT, entretanto não induz estresse do RE em condições normais de incubação (Santos et al, 2009). Por outro lado, tunicamicina, ao induzir estresse do RE, leva à ativação de vias de sinalização da UPR, incluindo nas fases tardias pelo menos a via JNK, que se forem persistentemente ativadas, culminam em apoptose. Assim, embora os mecanismos que levam à ativação do proteasoma não estejam claros, a interação entre PDI e NADPH oxidase é potencial candidata a interagir e interligar esses mecanismos, que envolvem vias de sinalização redox. Para esclarecer melhor este possível mecanismo, estudos da atividade do proteasoma foram realizados na presença de silenciamento da PDI induzido por siRNA, que induziu um significativo e consistente aumento na atividade basal do proteasoma, indicando que a expressão basal da PDI é um freio a essa atividade. O aumento da atividade do proteasoma induzido por angiotensina II e tunicamicina não foi, entretanto, observado, indicando uma possível saturação máxima dessa atividade já com o silenciamento da PDI. (Figura 14).

Figura 13: Angiotensina-II e tunicamicina promovem ativação do atividade proteolítica 20S do proteasoma. Quantificação das taxas de formação da probe fluorescente AMC em extrato total de células RASM expostas a angiotensina-II, tunicamicina e MG132, conforme descrito em materiais e métodos. C corresponde ao controle, AII à angiotensinaII 200nM, TN a tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM. Esses experimentos foram obtidos a partir de 4 experimentos independentes

Atividade 20S do proteasoma na presença de siRNA da PDI

Figura 14: Atividade 20S Proteasoma - Perda da responsividade a AngiotensinaII e tunicamicina na presença do siRNA da PDI. Quantificação das taxas de formação da probe fluorescente AMC em extrato total de células RASM expostas a angiotensina-II, tunicamicina e MG132 por 4 horas, conforme descrito em materiais e métodos. C corresponde ao controle, Ang-II à angiotensinaII 200nM, TN a tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM. Esses experimentos foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Interação entre PDI e Proteasoma

Após verificarmos a atuação importante da inibição do proteasoma na ativação/expressão da NADPH oxidase e também nas alterações da sinalização do

estresse do RE induzido por tunicamicina, tornou-se importante averiguarmos a inter-relação entre PDI e o proteasoma. Como descrito anteriormente, a atividade 20S do proteasoma é alterada com o silenciamento da PDI induzido por siRNA. Para investigar a possibilidade de interação mais estreita entre PDI e proteasoma, realizamos experimentos de co-localização por microscopia confocal. Os dados mostram evidência de co-localização entre a PDI e o proteasoma 26S. Essa associação foi detectada de forma mais intensa nas regiões perinucleares. (Figura 15).

Indicativo de colocalização perinuclear entre PDI e 26S proteasoma

Figura 15: Imunomarcção em microscopia confocal para PDI e 26S proteasome. As células contidas em lamínulas (13mm) foram fixadas com paraformaldeído 4% *overnight*. Após permeabilização (Nonidet P40 0,1% em PBS), as células foram incubadas com anticorpo primário (anti-PDI da Santa Cruz 1:100 e anti-26S proteasome 1:100) diluídos em PBS contendo albumina (1%) *overnight* a 4°C. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpos secundários (anti-camundongo conjugado com Alexa488 e anti-cabra conjugado com Alexa680), juntamente com DAPI (10µg/mL, Sigma) e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM510 Meta.

Inibidores do proteasoma causam estresse do retículo endoplasmático, porém inibem a indução de estresse do RE por tunicamicina

Considerando que a Nox4 contribui significativamente para a sinalização de vias pró-adaptativas e pró-apoptóticas da UPR (Santos et al, 2009) e que a inibição

do proteasoma reduz tanto a sinalização da UPR como a Nox4, examinamos a hipótese de que a inibição da sinalização da UPR pelo proteasoma envolva a inibição da Nox4. A expressão protéica de chaperonas do RE, cujo aumento é um indicador de ERE, apresentou regulação diferencial de pelo menos duas destas chaperonas, com um aumento da grp78 e diminuição da grp94 após inibidores do proteasoma (Figura 16). Em parte, esses resultados estão de acordo com dados descritos na literatura para outros tipos celulares, indicando que a inibição do proteasoma causa estresse do RE devido ao aumento de proteínas mal-enoveladas que não foram degradadas (Bush et al, 1997; Uehara et al, 2006). Por outro lado, a indução diferencial das grps pode ser reveladora de um mecanismo regulatório específico exercido pelo proteasoma.

Figura 16: Inibidores do proteasoma induzem estresse do RE. Células RASM foram estimuladas 16 horas com tunicamicina, lactacistina e MG132 e submetidas a Western Blot em gel SDS-PAGE 12%, conforme descrito em materiais e métodos. C= controle, WB= western blot, Tunicamicina: 5 µg/mL, Lactacistina: 5-1 µM, MG132: 10-1 µM.

Para entender os efeitos da inibição do proteasoma no estresse do RE desencadeado por agonistas clássicos, como p.ex. tunicamicina, avaliamos o efeito de MG132 no estresse do RE induzido pela tunicamicina. Ensaios de Western Blot contra proteínas KDEL foram realizados em células RASM sob estímulo isolado ou concomitante de MG132 e TN. KDEL consiste em uma sequência C-terminal de aminoácidos sinalizando retenção no RE, presente em várias chaperonas específicas do RE. Com a incubação conjunta de MG132 e tunicamicina, ocorreu diminuição significativa da expressão de Grp78 e Grp94 (Figura 17). Além da redução da sinalização proadaptativa da UPR, ocorreu também inibição da sinalização proapoptótica, representada por menor expressão proteica de CHOP (fator de transcrição envolvido em processos de apoptose) no extrato nuclear, assim como de ATF4 (fator de transcrição envolvido na transcrição de Chop, assim como de genes antioxidantes e de adaptação metabólica) (Figura 18). Tanto tunicamicina quanto MG132 induziram clivagem do fator de transcrição XBP1, enquanto a co-incubação induz aumento ulterior da forma clivada (Figura 19). Este último resultado pode parecer paradoxal por indicar aumento da sinalização da UPR, porém evidências recentes indicam que a indução de XBP1 tem um papel protetor na indução de genes antioxidantes e enzimas de reparo de DNA (Liu et al, 2009). É importante ressaltar que os efeitos da inibição do proteasoma na sinalização de CHOP e Grps foi essencialmente idêntico ao de um siRNA contra a Nox4, o que é coerente com o efeito dos inibidores de proteasoma na profunda redução do mRNA de Nox4, mostrada à Figura 12.

As vias pelas quais o proteasoma interage com a cascata da UPR podem ser múltiplas. Ensaios de western blotting indicaram que vias de estresse e sobrevivência são ativadas pela inibição pelo proteasoma, a saber, AKT e p38 MAP quinase (Figuras 20 e 21).

Inibição do proteasoma diminui a expressão dos marcadores do Estresse do RE após tunicamicina.

Figura 17: Inibidores do proteasoma induzem estresse do RE, entretando diminuiem o estresse causado por tunicamicina. Células RASM foram estimuladas 24 horas com tunicamicina, e MG132 e submetidas a Western Blot em gel SDS-PAGE 12%, conforme descrito em materiais e métodos. C corresponde ao controle, TN a tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM. Esses experimentos foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes

Inibição do proteasoma diminui a expressão do marcador de Estresse do RE pró-apoptótico CHOP/GADD153 e também do fator de transcrição ATF4 após tunicamicina

Figura 18: Estudos da sinalização do Estresse do RE frente a inibição do proteasoma induzida por MG132. Células RASM foram estimuladas com Tunicamicina e MG132 e submetidas a obtenção de extrato nuclear. Em seguida essas amostras foram submetidas a Western Blot para CHOP e ATF4, conforme descrito em materiais e métodos. WB: western blot. C corresponde ao controle, TN a tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM. Esses experimentos foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes

Figura 19: Splicing XBP1. Células RASM foram estimuladas com tunicamicina e MG132 overnight. As amostras de RNA foram obtidas a partir do kit RNeasy da Qiagen, em seguida realizou-se RT-PCR e finalmente a PCR com *Platinum Taq Polymerase* da Invitrogen com primers para as formas de *splicing* e *unsplicing* do XBP1, fabricados pela Invitrogen, com temperatura de anelamento de 72°C em 35 ciclos de 15 segundos. Os produtos da reação foram de 200 e 174 pares de bases para *unsplicing* e *splicing* formas de XBP1, respectivamente. Os produtos foram resolvidos em eletroforese na presença de brometo de etídio em gel de agarose 3%. Esses resultados foram obtidos em três experimentos independentes.

AKT é ativado pelo inibidor do proteasoma MG132

Figura 20: Estudos da ativação da AKT/PKB frente a inibição do proteasoma induzida por MG132. Células RASM foram estimuladas com MG132 1 μ M nos tempos de 2, 6 e 18 horas e submetidas a obtenção de extrato nuclear. Em seguida essas amostras foram submetidos a Western Blot para fosfoAKT e AKT total, conforme descrito em materiais e métodos. WB: western blot. Esses experimentos foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes

Figura 21: Ativação da MAP quinase p38. Células RASM foram estimuladas com AII, Tunicamicina e MG132 nos tempos de 30minutos, 4 e 24 horas, e submetidas à obtenção de extrato de homogenato total. Em seguida essas amostras foram submetidas a Western Blot para fosfo-p38 e p38 conforme descrito em materiais e métodos.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que a inibição subletal do proteasoma é acompanhada pela alteração da regulação da NADPH oxidase, com ativação em condições basais e forte inibição da ativação dependente de estímulo. Em particular, inibição do proteasoma induziu importante redução da resposta ao estressor do retículo endoplasmático tunicamicina, conhecido indutor da expressão de Nox4 e da geração de ROS (Santos et al, 2009; Pedruzzi et al, 2004). Alterações associadas à tunicamicina foram acompanhadas de profunda diminuição na expressão do mRNA e da proteína da Nox4 e também da PDI, cuja função reguladora da NADPH oxidase foi recentemente descrita (Janiszewski et al, 2005). Ativação da NADPH oxidase mediada por AngII e a expressão do mRNA da Nox1 foram apenas moderadamente prevenidos pela inibição do proteasoma, embora tunicamicina e AngII tenham igualmente induzido a atividade proteolítica 20S do proteasoma. A inibição do proteasoma promove sinalização de sobrevivência e de estresse, tais como a fosforilação de Akt e p38MAPK. Além disso, a inibição do proteasoma induz a sinalização da UPR de forma mais amena quando comparada à induzida pela tunicamicina. Entretanto, em paralelo com baixa expressão de Nox4, a inibição do proteasoma atenua fortemente a sinalização da UPR induzida pela tunicamicina, através da diminuição da indução de proteínas KDEL e PDI, bem como ATF4 e do fator de transcrição CHOP, embora *splicing* do XBP1 tenha aumentado. Essas mudanças foram similares às aquelas obtidas por um siRNA da Nox4. A forte sub-regulação da UPR dependente da expressão da Nox4 induzida pela inibição do proteasoma tem implicações mecânicas e fisiopatológicas.

A inibição do proteasoma induz uma complexa resposta celular ao estresse, e nos nossos estudos, foi caracterizado pela ativação de kinases envolvidas em sobrevivência e estresse, como Akt e p38MAPK, bem como a sinalização da UPR, que é resultante do bloqueio da ERAD (Wosniak et al, 2008). Em adição, inibição do proteasoma pode promover parada reversível na síntese de proteínas (Jiang and Wek et al, 2005), possivelmente como parte de uma resposta integrada ao estresse celular (Wang et al, 2009). Nosso estudo foi focado na inibição do proteasoma como uma forma de estresse celular, sendo assim importante ressaltar que é preciso ter cuidado ao fazer inferências, a partir de nossos dados, sobre um possível papel direto do proteasoma na função da NADPH oxidase. Mesmo assim, é possível sugerir, a partir de nossos dados, que o proteasoma parece exercer um pequeno efeito inibitório basal na oxidase com respeito à regulação fisiológica deste complexo enzimático. Com concentrações maiores de inibidores de proteasoma, vimos de fato aumento na atividade da oxidase e na geração de ROS, em concordância com estudos reportados por outros laboratórios usando 5 μ M de MG132 em células renais (Block et al, 2007). Nesse estudo, a inibição do proteasoma estabiliza a proteína p22phox e aumenta os seus níveis protéicos juntamente com a atividade da oxidase. Não observamos um efeito semelhante em nossos estudos, provavelmente por causa das diferentes condições e tipo celular. Rac1 é outra subunidade capaz de sofrer degradação pelo proteasoma via mecanismos redox (Kovacic et al, 2001). Entretanto, as concentrações de MG132 ou lactacistina que efetivamente aumentam a produção de ROS e ativam NADPH oxidase foram no nosso estudo subsequentemente (48h) associadas com aumento de perda celular, e embora quantificações de ROS e da atividade da oxidase já estavam aumentadas após 4 horas de incubação. Desta forma, não está claro até

que ponto o proteasoma exerce um papel relevante no controle da NADPH oxidase em condições mais fisiológicas. Trabalhos publicados têm associado o estresse oxidativo pós-inibição do proteasoma à disfunção mitocondrial (Sullivan et al, 2004), particularmente no contexto de indução de morte celular em tumores. De fato, inibidores do proteasoma induzem geração de ROS, quebra do potencial de membrana da mitocôndria, e induzem autofagia (Mijaljca et al, 2006; Ling et al, 2003, Din and Ying et al 2008). Entretanto, à semelhança da NADPH oxidase em nossas células, não está claro até que ponto tais alterações podem refletir apenas processos secundários de morte celular. Estresse oxidativo mediado pela inibição do proteasoma em nossas VSMC foi associado com consumo de glutathione em níveis similares aos observados com tunicamicina ou AngII (Santos et al, 2009), que por sua vez induzem níveis significativamente maiores de ROS do que MG132 (1 μ M; Figura 6). Uma possível explicação para este fato é que a inibição do proteasoma induz acúmulo de proteínas mal-enoveladas apresentando disulfetos não-naturais, que são então reduzidos pela glutathione (Nakamura and Lipton et al, 2008).

Os efeitos da inibição do proteasoma na NADPH oxidase em nossos estudos foram substancialmente distintos daqueles associados com outros tipos de estresse. Disfunção mitocondrial induz a expressão basal de Nox4 e interrompe a ativação de Nox1 mediada por AngII em VSMC (Wosniak et al, 2009). Estresse do retículo endoplasmático promove significativa indução de Nox4, com pequenas mudanças nos níveis de Nox1 (Santos et al, 2009). É importante notar que a inibição do proteasoma induz vários marcadores da UPR em nossas células. De fato, em várias células tumorais, estresse do RE pode ser um importante mecanismo de morte celular

decorrente da inibição do proteasoma (Fribley et al, 2004; Jiang and Wek, 2005; Lee et al, 2003). Desta forma, a inibição do proteasoma é capaz de sobrepor-se às consequências do estresse do RE na sinalização da Nox4, induzindo em nossas células uma prevenção quase completa da indução do mRNA da Nox4 após incubação com tunicamicina. Uma conclusão indireta dessas considerações é que as respostas celulares a estresse associadas à indução de Nox são dependentes do tipo específico de estresse, bem como do tipo celular.

Os mecanismos potenciais pelos quais a inibição do proteasoma inibe os níveis do mRNA da Nox4 durante a UPR são múltiplos. A diminuição observada nos níveis protéicos de Nox4 nessas circunstâncias é contra-intuitiva e indica que o principal efeito da inibição do proteasoma ocorre no âmbito da expressão de mRNA. Este efeito reflete possivelmente o importante papel do proteasoma na transcrição gênica, que tem sido cada vez mais reconhecido (Collins and Tansey et al, 2006; von Mikecz 2006). Inibição do proteasoma diminui a transcrição de várias proteínas, incluindo p.ex. o receptor de estrógeno (Lonard et al, 2000; Reid et al, 2003). Tal efeito pode ocorrer por vários mecanismos em diferentes níveis, incluindo atividade da RNA polimerase, regulação direta de elementos responsivos de promotores gênicos, além de vias epigenéticas (von Mikecz 2006). Com relação a estas últimas, foi descrito recentemente um papel da inibição da ERAD e subsequente indução de estresse do RE na transcrição da proteína NOXA em células tumorais (Wang et al, 2009). Além da transcrição, a inibição do proteasoma pode estar associada à regulação de fatores que controlam a tradução de proteínas, possivelmente por vias indiretas, por exemplo, indução de fosforilação induzida por estresse de fatores de

iniciação como eIF2 α (Karin and Bem-Neriah, 2000). Finalmente, o proteasoma pode também regular os níveis de vários fatores de transcrição potencialmente associados com a Nox4 (Zhang et al, 2008). É importante notar que a regulação da atividade da Nox4 parece estar determinada principalmente pelos níveis de mRNA (Serrander et al, 2007). Portanto, os efeitos da inibição do proteasoma durante a UPR podem diretamente impactar na atividade da Nox4 e na produção de ROS pela oxidase. Em adição à Nox4, nossos resultados mostraram que a inibição do proteasoma também prejudica a expressão de mRNA e proteína da PDI. Quase nada é conhecido sobre os mecanismos regulatórios da transcrição da PDI em eucariotos, em parte porque a PDI é abundantemente expressa e parece ser altamente regulada pelo níveis da expressão da proteína, além de translocação e provavelmente modificações pós-traducionais ainda não conhecidas (V. Apêndice). Recentes experimentos do nosso grupo indicam que a superexpressão da PDI promove ativação espontânea da NADPH oxidase, enquanto o siRNA da PDI diminui a expressão basal e estimulada de Nox1 (Fernandes et al, 2009). É possível que a redução do mRNA da PDI contribua para dirigir a célula a um estado de baixa resposta de Nox1 a mitógenos. De fato, observamos uma diminuição (embora moderada) de Nox1 em resposta à AngII em nossas células. Além disso, considerando que a PDI parece exercer um papel na geração de ROS durante o estresse do RE (Santos et al, 2009) sua menor expressão pode representar um mecanismo adaptativo à UPR induzida pelo inibidor do proteasoma.

O aumento da atividade proteolítica do 20S-proteasoma com o silenciamento gênico da PDI indica um importante mecanismo regulatório basal desta chaperona no

proteasoma. É possível que este mecanismo envolva vias redox dependentes de tióis, conforme sugerido por recentes observações de que membros da família tiorredoxina (Trp32) controlam a atividade do proteasoma por mecanismos redox (Wiseman et al, 2009).

As vias da UPR que são sensíveis às mudanças da transcrição da Nox4 induzidas pela inibição do proteasoma em VSMC não estão claras. Evidências prévias indicam que os inibidores do proteasoma interrompem a sinalização da UPR por perturbarem o fator de transcrição XBP1 (Lee et al, 2003). Nessas células, os inibidores do proteasoma previnem a geração de forma ativa do XBP1 (clivada) e estabilizam a sua forma não clivada, que produz sub-regulação da UPR. Em nossas células, entretanto, clivagem do XBP1 foi aumentada após a inibição do proteasoma e particularmente após a co-incubação com tunicamicina. Este resultado está aparentemente em uma direção oposta aos efeitos nos outros indicadores da UPR. Para assegurar se esse efeito é peculiar à nossa linhagem celular específica, repetimos o experimento reportado na Figura 19 em A7R5 (células musculares lisas de aorta de rato), com resultados análogos, exceto que nessas células a clivagem do XBP1 não foi tão evidente após MG132 sozinho, embora bastante importante após MG132 + tunicamicina (dados não apresentados). Nessas células, ocorreu também uma forte inibição do mRNA da Nox4 pela inibição do proteasoma, sozinho ou em combinação com a tunicamicina. Essas considerações indicam que: a) Sítios outros que não o XBP1 podem contribuir para o efeito dos inibidores do proteasoma na UPR em VSMC, ao contrário de células de mieloma. Embora intrigantes, essas diferenças não são inesperadas, considerando que as células de mieloma são células secretoras

profissionais nas quais a UPR exerce um papel particularmente vital na proteção contra estresse do RE e apoptose (Lee et al, 2003; Ling et al 2003; Fribley et al, 2004). De fato, a clivagem do XBP1 é um importante componente protetor da UPR, particularmente contra o estresse oxidativo, uma vez que é capaz de codificar um grande número de genes antioxidantes; b) A clivagem de XBP1 não parece estar diretamente relacionada à expressão de Nox4 em VSMC; c) A indução de Nox4 parece dominar significativamente a UPR em células musculares lisas, o que está de acordo com dados nossos e de outros laboratórios (Santos et al, 2009; Pedruzzi et al, 2004). De fato, em nosso estudo, a sinalização da UPR apresentou uma analogia entre os efeitos da inibição do proteasoma e do silenciamento gênico da Nox4, particularmente no fator de transcrição CHOP; d) Existe uma significativa diversidade na sinalização da UPR conforme o tipo celular e tipo de estressor do RE. Por exemplo, como discutido acima, sinais da UPR causados pela inibição do proteasoma são diferentes daqueles observados pela tunicamicina em VSMC. Em cardiomiócitos, a inibição do proteasoma promove a indução dos fatores de transcrição CHOP e ATF6, mas não de XBP1 e de proteínas KDEL (Fu et al, 2008). Além disso, os efeitos fisiológicos da interrupção da UPR podem diferir de acordo com o estado celular. Em células proliferativas, a inibição do proteasoma tende a induzir a apoptose, enquanto em células diferenciadas o efeito predominante é a redução da apoptose (Papa and Rockwell, 2008). Tanto a função do proteasoma como a UPR per se podem favorecer a diferenciação celular. É possível que a inibição do proteasoma possa evitar a diferenciação, que em VSMC parece estar associada com Nox4 (Clempus et al, 2007).

Os resultados de nosso estudo podem ter implicações não só para melhor compreensão dos mecanismos de estresse oxidativo induzido por inibidores do proteasoma, como para potenciais implicações terapêuticas desses compostos em doenças cardiovasculares. A inibição do proteasoma diminui a formação de neointima após lesão por meio de vários mecanismos, que incluem: diminuição da proliferação via degradação de proteínas do ciclo celular, diminuição da migração celular, aumento da degradação de I κ B α , e aumento da apoptose (Meiners et al, 2002). Além disso, a interrupção da UPR e da Nox4 pode gerar impactos nas estratégias para limitar o estresse do RE associado a várias condições cardiovasculares e seus fatores de risco, incluindo aterosclerose (Herrmann et al, 2008), hiperhomocisteinemia (Carluccio et al, 2007), resistência à insulina e diabetes (Kitiphongspattana et al, 2005), e hipertrofia cardíaca (Dickhout and Austin, 2006). De fato, juntamente com o aumento do estresse do RE, o sistema ubiquitina-proteasoma está mal-funcionante em placas ateroscleróticas humanas, particularmente placas instáveis (Versari et al, 2006).

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados indicam que a inibição do proteasoma produz uma resposta de estresse celular com ativação de vias de sinalização da UPR e estresse oxidativo. Tanto por possíveis efeitos diretos do proteasoma como por possíveis efeitos da resposta celular a estresse, ocorre importante perda da ativação da NADPH oxidase em resposta a estímulos, particularmente estressores do RE. A perda de resposta redox a estressores do RE é acompanhada de profunda redução da expressão do mRNA da Nox4. Estas alterações estão associadas a uma importante inibição da sinalização da UPR em resposta a estressores do RE, particularmente da sinalização pró-apoptótica via CHOP. A compreensão de como a Nox4 interage com esses processos via proteasoma deve promover interessantes avanços no entendimento da fisiopatologia de processo redox celulares.

APÊNDICE

**Estudos de fosforilação da PDI como possível
modificação pós-traducional em condições fisiológicas**

Modificações pós-traducionais da PDI

Dissulfeto Isomerase Proteica

Dissulfeto isomerase protéica (PDI) é uma ditiol-dissulfeto oxidoreductase do retículo endoplasmático (RE) pertencente à super-família da tioredoxina (Figura 22). Estas proteínas contêm uma característica sequência CXXC no sítio ativo onde duas cisteínas catalisam a troca de pontes dissulfeto inter- ou intra-moleculares. A PDI é uma proteína abundante que existe preferencialmente em dois estados semi-oxidados *in vivo* (i.e., ou o primeiro ou o segundo sítio ativo está oxidado). Dependendo de variáveis redox do meio ambiente, PDI agir tanto como redutase, oxidase ou isomerase (Appenzeller-Herzog and Ellgaard et al, 2008).

A função primária dessa família é promover o enovelamento redox de proteínas no RE. Entretanto, recentes trabalhos incluem funções em outros processos tais como Degradação de Proteínas dependente do RE (ERAD), tráfego de proteínas, homeostase de cálcio, bem como apresentação de antígeno.

A formação de pontes dissulfeto em proteínas no RE é dirigida pelas enzimas PDI e ERO1 (Endoplasmatic reticulum oxidase 1). ERO1 age em associação com a flavina FAD, que é sintetizada no citosol, mas pode rapidamente entrar no lúmen do RE. PDI recebe elétrons (e-) de substratos (proteínas em processo de enovelamento), assim oxida grupos tióis (-SH) em resíduos de cisteína, resultando na formação de pontes dissulfeto. ERO1 usa uma reação FAD-dependente para transferir elétrons da PDI para o oxigênio molecular (O₂), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio. Glutathione reduzida pode assistir a redução de pontes dissulfeto que ocorre quando há um acúmulo de proteínas a serem enoveladas ou ainda em situações de

acúmulo de proteínas mal enoveladas, resultando na produção de glutathiona oxidada (GSSG). Além disso, PDI reduzida pode promover redução de grupos tióis incorretamente pareados em proteínas não naturalmente oxidadas. Como a atividade da ERO1 é modulada pela quantidade de FAD no RE, formação de pontes dissulfeto está ligada a condições nutricionais e/ou metabólicas da célula. As vias pelas quais o transporte de FAD para o lúmen do RE é regulado em células eucarióticas são virtualmente desconhecidas.

Figura 22: Geração de espécies reativas de oxigênio a partir do enovelamento redox de proteínas.

A PDI está localizada no lúmen do RE, aonde assiste o enovelamento correto de proteínas. É uma abundante proteína presente em concentrações milimolares no RE de fígado (Noiva 1999). Vários análogos da PDI foram descritos, indicando que a PDI é parte de uma família maior de proteínas que têm em graus variáveis atividades tiol oxido-redutase, chaperona e isomerase (Clissold and Bicknell, 2003). A molécula

da PDI apresenta uma contínua superfície hidrofóbica e articulação bastante dinâmica dos braços da proteína, condições que permitem sua interação com substratos de diversos tamanhos e com diferentes localizações de pontes dissulfeto. Sabe-se também que a função chaperona não requer necessariamente os domínios redox da proteína, e que várias interações proteína-proteína – talvez a maioria – da PDI não necessitam da porção redox, embora seja essencial para estabilizar da ligação (Klappa 1997; Noiva 1993; Tian 2006). Em células de mamíferos, a expressão da PDI sustenta a sobrevivência celular e sua super-regulação aumenta a resistência à apoptose (Fratelli 2002; Sullivan 2003; Tanaka 2000). Apesar de conter no domínio C-terminal a sequência KDEL de retenção no RE, a PDI mostra um ativo tráfego intracelular e é encontrada na superfície de vários tipos de células eucarióticas e procarióticas, aonde age provavelmente como uma redutase. A combinação de efeitos redox da PDI com o seu conhecido papel no controle do tráfego e secreção de proteínas tornam seus possíveis efeitos atraentes no sentido de entender mecanismos de ação da NAD(P)H oxidase, com a qual interage. Uma importante situação na qual, entre vários outros fenômenos, a PDI pode ser regulada e se transloca para a membrana, é o Estresse do Retículo Endoplasmático (ERE), gerando uma resposta celular chamada *Unfolded Protein Response* (UPR).

Embora a PDI seja a mais bem caracterizada oxidoreductase, a família PDI-like possui no mínimo 20 membros identificados em células humanas, que apresentam uma ampla variedade de domínios e sítios ativos (Appenzeller-Herzog and Ellgaard et al, 2008). Esse amplo número permite essas proteínas de atuarem em específicas funções. A ERp57 é um exemplo, pois interage com chaperonas

glicoprotéicas do RE, calnexina e calreticulina, e assiste a formação de pontes dissulfeto em proteínas glicosiladas (Oliver et al, 1997). Outra PDI-like é a ERdj5 que age como redutase para promover o desenovelamento de proteínas, preparando-as para retrotranslocação e degradação via ERAD (Ushioda et al, 2008).

Nosso grupo descreveu e tem ativamente estudado um efeito PDI na regulação da NADPH oxidase vascular, um contexto no qual a PDI migra para a superfície celular (conforme descrito no item Introdução). Neste contexto, é muito provável que a PDI sofra modificações pós-traducionais funcionalmente relevantes, dentre as quais alterações no padrão de ubiquitinação e fosforilação. Esta fosforilação ocorre relativamente longe dos sítios tiol e parece modular a ligação de peptídeos/proteínas à PDI (Quéméneur et al, 1994). Deste modo, estudos de fosforilação da PDI podem abrir caminhos na compreensão mecanística da interação física e funcional da NADPH oxidase com a PDI. Portanto, *um objetivo adicional do presente estudo foi entender a ocorrência e o padrão de fosforilação da PDI durante a ativação da NADPH oxidase frente tanto ao inibidor do proteasoma quanto a seus conhecidos agonistas, angiotensina II e tunicamicina*. Estudos prévios in vitro mostram que a PDI é potencialmente fosforilada em pelo menos dois sítios (em treonina e tirosina) (Quéméneur et al, 1994).

Os estudos relatados a seguir foram realizados no período de 15 de janeiro a 12 de julho de 2008 no departamento de Cardiologia na Faculdade de Medicina da *Emory University* em Atlanta/Georgia/Estados Unidos, em colaboração com a Profa. Dra. Kathy Griendling.

Foram realizados estudos relacionados à fosforilação da PDI e das chaperonas grp 78 e 94. Os resultados compreendem cinco partes: 1) Validação dos ensaios de imunoprecipitação da PDI; 2) Verificação da fosforilação da PDI por ensaios de co-imunoprecipitação, utilizando anticorpos anti-PDI e anti-fosfoproteínas (serina, tirosina e treonina); 3) Purificação de proteínas fosforiladas por colunas de cromatografia por afinidade, seguido por western blot para PDI e proteínas KDEL (chaperonas); 4) Verificação da fosforilação utilização plasmídeo PDI-GFP e ensaios de imunoprecipitação utilizando anticorpos GFP e anti-fosfoproteínas (serina, tirosina e treonina); 5) Ensaios de imunoprecipitação da PDI utilizando fósforo radioativo P32.

Inicialmente, utilizando anticorpos anti-PDI de duas companhias, ABR e Assay Designs/Stressgen, imunoprecipitações da PDI foram validadas e a seguir utilizadas para ensaios de co-imunoprecipitação para estudo da fosforilação (Figura 23). A possível banda fosforilada da PDI foi muito fracamente marcada quando utilizávamos os anticorpos anti-fosfotirosina e anti-fosfotreonina. Em parte, tal dificuldade foi devida à presença das bandas de imunoglobulina da cadeia pesada do anticorpo utilizado para imunoprecipitação, uma vez que o tamanho da PDI (55kDa) é muito próximo da IgGs (50kDa).

Figura 23: Validação dos ensaios de imunoprecipitação. Células HEK293 foram lisadas e submetidas a imunoprecipitação para PDI e em seguida para Western Blot contra PDI, conforme descrito em materiais e métodos. Como validação foi utilizado IgG de camundongo para verificar possíveis marcações inespecíficas.

Três ferramentas foram então utilizadas. Inicialmente, utilizamos coluna cromatográfica (Purification Phosphoprotein kit, Qiagen) para purificação de proteínas fosforiladas. Os resultados mostraram que a PDI está fosforilada tanto em condições basais e mais intensamente com Angiotensina II e o inibidor do proteasoma MG132; entretanto, houve também marcação da PDI no FlowThrough, indicando certa quantidade de PDI não-fosforilada. Por essa metodologia, também verificamos que as grps 78 e 94 estão fosforiladas em condições basais e mais

fortemente após estímulo com Angiotensina II, com pouca presença dessas proteínas no FlowThrough (Figura 24).

Figura 24: Estudos de fosforilação da PDI por ensaios de cromatografia por afinidade. Células RASM foram estimuladas com tunicamicina e MG132 por 24 horas. Em seguida, as células foram lisadas e os lisados proteicos foram aplicados em colunas de separação de proteínas fosforiladas (como esquematizado no item A, fornecido pelo fabricante das colunas, QIAGEN). Os eluatos (eluate), os *flowthrough* e os lisados (lysates) foram submetidos a separação em gel de poliacrilamida 10% seguidos de *immunoblotting* (B). A membrana foi bloqueada com tampão de lavagem (tris-HCl 50 mM, pH 7.4, e NaCl 150 mM) contendo Tween 20 0,05%, e leite desnatado 5% (ou albumina bovina), por 90 min. A seguir, a membrana foi incubada, durante a noite, em solução contendo anticorpo primário (Anti-PDI ou anti-KDEL, Stressgen, 1:1000), sendo a seguir incubada por 1h com anticorpo secundário (IgG anti Ig de camundongo, conjugada com peroxidase – 1:1000). A revelação foi feita por quimiluminescência, com kit ECL da Amersham Pharmacia Biotech, com diferentes tempos de exposição ao filme fotográfico. C corresponde ao controle, AII à angiotensinaII 200nM e MG a MG132 1μM.

A segunda ferramenta foi a utilização de plasmídeos conjugados com um rótulo (“tag”) de GFP, para que pudéssemos aumentar o tamanho da proteína de fusão - que passaria a ser aproximadamente 85kDa -, bem como a utilização de anticorpos anti-GFP (Figura 25 e 26).

Figura 25: Construção do vetor PDI-GFP no plasmídeo pDNA3.1. A PDI foi inserida nos sítios entre BamHI e XbaI. Já a sequência do GFP foi inserido entre os sítios da EcoRI. A sequência da PDI utilizada foi a de coelho.

Figura 26: Verificação da overexpressão da PDI-GFP em células HEK293. (A) Células HEK293 foram transfectadas com plasmídeo PDI-GFP e a fluorescência intrínseca do GFP foi verificada por microscopia. (B) as células em seguida foram lisadas e submetidas a imunoprecipitação para GFP e as amostras submetidas para Western Blot contra PDI. A membrana foi bloqueada com tampão de lavagem (tris-HCl 50 mM, pH 7.4, e NaCl 150 mM) contendo Tween 20 0,05%, e leite desnatado 5% (ou albumina bovina), por 90 min. A seguir, a membrana foi incubada, durante a noite, em solução contendo anticorpo primário (Anti-PDI, Stressgen, 1: 1000), sendo a seguir incubada por 1h com anticorpo secundário (IgG anti Ig de camundongo, conjugada com peroxidase – 1:1000). A revelação foi feita por quimiluminescência, com kit ECL da Amersham Pharmacia Biotech, com diferentes tempos de exposição ao filme fotográfico. C corresponde ao controle, TN à tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM.

Nesses experimentos, verificamos que a PDI era fracamente marcada com anticorpos anti-fosfotirosina e anti-fosfotreonina (Figura 27)

Figura27 : Estudos de fosforilação da PDI por ensaios de imunoprecipitação. Células HEK293 foram transfectadas com plasmídeo PDI-GFP e após 48 horas foram estimuladas com tunicamicina e MG132 por 24 horas. Após a fluorescência intrínseca do GFP ter sido verificada por microscopia, as células então foram lisadas e submetidas a imunoprecipitação para GFP e as amostras submetidas para Western Blot contra PDI, fosfotirosina (phosphoTYR) e fosfotreonina (fosfoThre). A membrana foi bloqueada com tampão de lavagem (tris-HCl 50 mM, pH 7.4, e NaCl 150 mM) contendo Tween 20 0,05%, e leite desnatado 5% (ou albumina bovina), por 90 min. A seguir, a membrana foi incubada, durante a noite, em solução contendo anticorpo primário (Anti-PDI, Stressgen, 1: 1000), sendo a seguir incubada por 1h com anticorpo secundário (IgG anti Ig de camundongo, conjugada com peroxidase – 1:1000). A revelação foi feita por quimiluminescência, com kit ECL da Amersham Pharmacia Biotech, com diferentes tempos de exposição ao filme fotográfico. C corresponde ao controle, TN à tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM. Controle negativo (-) se refere a canaleta com apenas anticorpo primário e secundário, sem a adição de lisado celular.

A terceira ferramenta foi a utilização de kits comerciais que evitassem o marcação das IgGs, em especial o GenScript's One-Step Western™.kit (GenScript). Com esse kit, evitamos a marcação da IgGs, e a partir daí foi possível verificar precisamente a banda da PDI. Entretanto, a marcação da fosforilação mostrou-se fraca ou até mesmo inexistente nesses experimentos. Estudos subsequentes foram

realizados com a utilização de fósforo radioativo nos ensaios de imunoprecipitação. Para nossa surpresa, a imunoprecipitação da PDI não evidenciou marcação na altura esperada e sim em complexos no topo do gel, que devido ao seu tamanho não foram separados por eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 28). Ensaios subsequentes de imunoprecipitação e immunoblot nas mesmas condições mostraram que (além da marcação na altura esperada), a marcação da PDI no topo do gel é desfeita na presença de Uréia no tampão de lise celular (Figura29)

Figura 28: Estudos de fosforilação da PDI por ensaios de imunoprecipitação – Utilização de fósforo radioativo. Células RASM foram estimuladas com angiotensina II por 10 e 30 minutos, com e sem pré-estímulo de 2 horas com MG132, e também estimulada com tunicamicina e MG132 por 24 horas. Em seguida, as células foram lisadas e os lisados proteicos foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PDI (ABR, 1:1000), e então após sucessivas lavagens foram aplicados em gel SDS-PAGE 10%. A gel foi exposto a filmes fotográficos em diferentes tempos. C corresponde ao controle, AII à angiotensinaII 200nM, TN a tunicamicina e MG a MG132 1μM.

Figura 29: Imunoprecipitação da PDI – Utilização de diferentes tampões de lise. Células RASM foram lisadas e os lisados proteicos foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PDI (ABR, 1:1000), e então após sucessivas lavagens foram aplicados em gel SDS-PAGE 10%, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e realizamos então western blot para PDI (Stressgen, 1:1000), como descrito em materiais e métodos.

Assim, nossos dados sugerem que: 1) a PDI está fosforilada em complexos de alto peso molecular homo ou hetero-oligoméricos (eventualmente, a fosforilação da PDI poderia até ser a condição que determina a formação de tais complexos); 2) alternativamente, não se pode descartar a possibilidade de que a PDI não é fosforilada diretamente e está agregada a outras proteínas fosforiladas.

Podemos dizer que a fosforilação da PDI e das grps 94 e 78, tanto por angiotensina II quanto pelo MG132, pode ser sinalizador para efeitos importantes dessas chaperonas. Recentes dados da literatura mostraram fosforilação de grps por angiotensina II, no contexto de degradação muscular (Krishna et al, 2007). As chaperonas possuem diversos sítios de fosforilação e essa sinalização pode mediar suas interações proteína-proteína e aumentar a sua capacidade de enovelamento de substratos protéicos. Portanto essa habilidade poderia ser uma resposta de proteção à produção de oxidantes induzida pela angiotensina, uma vez que estresse oxidativo é necessário para essa fosforilação, evitando assim desenovelamento e degradação de proteínas devido a esse estresse. Nesse contexto, poderíamos especular que a fosforilação induzida pelo MG132 poderia ser uma resposta adaptativa, evitando a formação de agregados devido ao bloqueio da degradação. Além disso, mostramos ainda que a angiotensinaII aumenta a atividade proteolítica 20S do proteasoma, o que poderia portanto ser uma possível ligação entre fosforilação da PDI com regulação e degradação protéica via sistema ubiquitina-proteasoma.

Assim, estes dados indicam que em geral a PDI é fracamente fosforilada e a fosforilação não obedece a um padrão simples que sugira uma regulação direta linear da ativação da NADPH oxidase ou do efeito do proteasoma na NADPH oxidase por meio dessa modificação pós-traducional.

Finalmente, a fosforilação de proteínas é uma das modificações pós-traducionais que podem ativar ou até mesmo antagonizar sua ubiquitinação, sendo, portanto um processo de regulação tanto para a degradação quanto para outras funções, independente do proteasoma, da sinalização mediada pela ubiquitina, tais

como tráfego, apoptose, ciclo celular e transcrição gênica. (Luciano F, 2003; Meller R, 2006; Pickart CM, 2004, Brichese L, 2002). Desta forma, não é improvável que esta modificação pós-traducional da PDI possa alterar a sua inter-relação com a NADPH oxidase. Ubiquitinação é uma modificação pós-traducional reversível que atua em diversos processos celulares distintos da sua clássica função relacionada ao proteasoma. Dentre elas, podemos citar divisão celular, diferenciação, tráfego de proteínas, controle de qualidade, endocitose, entre outras (Mukhopadhyay and Riezman, 2007). Além disso, sabe-se que a ubiquitinação pode remodelar a superfície de proteínas e assim pode potencialmente afetar sua estabilidade e atividade, alterando suas interações com outras proteínas e dirigindo a sua localização subcelular.

Existem diversas formas de ubiquitinação de proteínas: monoubiquitinação (uma única ubiquitina está ligada à proteína), multiubiquitinação (várias lisinas da proteína alvo estão ligadas a uma única ubiquitina) e poliubiquitinação (uma cadeia de várias ubiquitinas é ligada à proteína alvo).

Para averiguarmos um possível perfil de ubiquitinação da PDI, células RASM foram carenciadas e estimuladas com tunicamicina e MG132 overnight. Em seguida, realizou-se a imunoprecipitação para PDI e western blot para proteínas ubiquitinadas (Figura 24). Os dados indicam que a PDI apresenta-se monoubiquitinada, especialmente na presença de MG132. A existência de bandas detectadas pela marcação com Ac anti-ubiquitina em pesos moleculares mais altos sugere que multi ou poli-ubiquitinação estão também presentes, embora sejam necessários mais

experimentos para estabelecer um possível padrão de resposta a estímulos específicos, que no momento não foi verificado.

Figura 30: Estudos de ubiquitinação da PDI por ensaios de imunoprecipitação. Células HEK293 foram estimuladas com tunicamicina e MG132 por 2 horas. As células então foram lisadas e submetidas a imunoprecipitação para PDI (ABR, 1:1000) e as amostras submetidas para Western Blot para proteínas ubiquitinadas (Invitrogen, 1:1000). A membrana foi bloqueada com tampão de lavagem (tris-HCl 50 mM, pH 7.4, e NaCl 150 mM) contendo Tween 20 0,05%, e leite desnatado 5% (ou albumina bovina), por 90 min. A seguir, a membrana foi incubada, durante a noite, em solução contendo anticorpo primário, sendo a seguir incubada por 1h com anticorpo secundário (IgG anti Ig de camundongo, conjugada com peroxidase – 1:1000). A revelação foi feita por quimiluminescência, com kit ECL da Amersham Pharmacia Biotech, com diferentes tempos de exposição ao filme fotográfico. C corresponde ao controle, TN à tunicamicina 5µg/mL e MG a MG132 1µM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD. *XBPI controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks*. Mol Cell. 2007 Jul 6;27(1):53-66.

Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. *ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum*. Cell Struct Funct. 2008;33(1):75-89. Epub 2008 Mar 18.

Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. *The human PDI family: versatility packed into a single fold*. Biochim Biophys Acta. 2008 Apr;1783(4):535-48. Epub 2007 Dec 3. Review.

Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. *Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1*. J Biol Chem. 2003 Feb 7;278(6):3510-3. Epub 2002 Dec 6.

Bellavite P, Cross AR, Serra MC, Davoli A, and Jones OTG. *The cytochrome b and flavin content and properties of the O₂-forming NADPH oxidase solubilized from activated neutrophils*. Biochim Biophys Acta 746: 40–47; 1983.

Block K, Gorin Y, Hoover P, Williams P, Chelmicki T, Clark RA, Yoneda T, Abboud HE. *NAD(P)H oxidases regulate HIF-2alpha protein expression*. J Biol Chem. 2007 Mar 16;282(11):8019-26. Epub 2007 Jan 2

Brandes RP and Kreuzer J. *Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation*. Cardiovasc Res 65: 16–27, 2005.

Brichese L, Barboule N, Heliez C, Valette A. *Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to Bid*. Exp Cell Res. 2002 Aug 1;278(1):101-11.

Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, Bradley S, Gobburu JV, Goheer A, Lee SL, Leighton J, Liang CY, Lostritto RT, McGuinn WD, Morse DE, Rahman A, Rosario LA, Verbois SL, Williams G, Wang YC, Pazdur R. *Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma*. Clin Cancer Res. 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3954-64.

Bolwell GP. *The origin of the oxidative burst in plants*. Biochem Soc Trans. 1996 May;24(2):438-42. Review. No abstract available.

Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK. *Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance*. J Biol Chem. 1997 Apr 4;272(14):9086-92.

Buonassisi V, Venter JC. *Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 May;73(5):1612-6.

Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C, De Caterina R. *Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Oct;293(4):H2344-54. Epub 2007 Jun 22.

Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF Jr. *Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization.* J Cell Biol. 2008 Jun 30;181(7):1129-39. Epub 2008 Jun 23.

Ciechanover A, Iwai K. *The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed.* IUBMB Life. 2004 Apr;56(4):193-201.

Ciechanover A. *Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture).* Angew Chem Int Ed Engl. 2005 Sep 19;44(37):5944-67. Review.

Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassègue B, Griendling KK. *Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Jan;27(1):42-8. Epub 2006 Nov 2. Erratum in: Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Feb;27(2):e8. Schmidt, Harald H H [added].

Clissold PM, Bicknell R. *The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins.* Bioessays. 2003 Jun;25(6):603-11.

Collins GA, Tansey WP. *The proteasome: a utility tool for transcription?* Curr Opin Genet Dev. 2006 Apr;16(2):197-202. Epub 2006 Feb 28. Review.

Clempus R and Griendling KK. *Reactive oxygen signaling in vascular smooth muscle cells.* Cardiovasc Res 71: 216–225, 2006

Cross AR. *Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase: Mechanisms of action and methods for their elucidation*. Free Radical Biol Med 8: 71–93, 1990.

Dahlmann B. *Role of proteasomes in disease*. BMC Biochem. 2007 Nov 22;8 Suppl 1:S3. Review.

Delcros JG, Floc'h MB, Prigent C, Arlot-Bonnemains Y. *Proteasoma inhibitors as therapeutic agents: current and future strategies*. Curr Med Chem. 2003 Mar;10(6):479-503.

Demartino GN, Gillette TG. *Proteasomes: machines for all reasons*. Cell. 2007 May 18;129(4):659-62.

Depre C, Wang Q, Yan L, Hedhli N, Peter P, Chen L, Hong C, Hittinger L, Ghaleh B, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Madura K. *Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy*. Circulation. 2006 Oct 24;114(17):1821-8. Epub 2006 Oct 16.

Dickhout JG, Austin RC. *Proteasomal regulation of cardiac hypertrophy: is demolition necessary for building?* Circulation. 2006 Oct 24;114(17):1796-8. No abstract available.

Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griending KK. *Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production*. Free Radic Biol Med. 2008 Nov 1;45(9):1340-51. Epub 2008 Aug 16.

Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griending KK. *Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice.* Circulation. 2005 Oct 25;112(17):2668-76. Epub 2005 Oct 17.

Ding Q, Dimayuga E, Keller JN. *Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS.* Antioxid Redox Signal. 2006 Jan-Feb;8(1-2):163-72. Review.

Ding WX, Yin XM. *Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome.* Autophagy. 2008 Feb 16;4(2):141-50. Epub 2007 Oct 19. Review.

Donella-Deana A, Cesaro L, Ruzzene M, Brunati AM, Marin O, Pinna LA. *Spontaneous autophosphorylation of Lyn tyrosine kinase at both its activation segment and C-terminal tail confers altered substrate specificity.* Biochemistry 1998; 37:1438-46.

Doussiere J, Poinas A, Blais C, and Vignais PV. *Phenylarsine oxide as an inhibitor of the activation of the neutrophil NADPH oxidase—identification of the beta subunit of the flavocytochrome b component of the NADPH oxidase as a target site for phenylarsine oxide by photoaffinity labeling and photoinactivation.* Eur J Biochem 251: 649–658, 1998.

Egger L, Madden DT, Rhême C, Rao RV, Bredesen DE. *Endoplasmic reticulum stress-induced cell death mediated by the proteasome*. Cell Death Differ. 2007 Jun;14(6):1172-80. Epub 2007 Mar 30.

Fernandes DC, Manoel AH, Wosniak J Jr, Laurindo FR. *Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure*. Arch Biochem Biophys. 2009 Apr 15;484(2):197-204.

Finkel T. *Oxidant signals and oxidative stress*. Curr Opin Cell Biol 2003; 15: 247-54.

Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Eberini I, Salmona M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E, Bachi A, Vandekerckhove J, Gianazza E, and Ghezzi P. *Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3505–3510,2002.

Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. *Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding*. Trends Biochem Sci 1994; 19:331-6.

Fribley A, Zeng Q, Wang CY. *Proteasoma Inhibitor PS-341 Induces Apoptosis through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress-Reactive Oxygen Species in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells*. Mol Cell Biol. 2004 Nov;24(22):9695-704.

Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE. *Degradation-mediated protein quality control in the nucleus*. Cell. 2005 Mar 25;120(6):803-15.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes*. Mol Biol Cell. 2000 Dec;11(12):4241-57.

Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H, Asano Y, Fujita M, Takashima S, Hori M, Kitakaze M. *Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition*. Cardiovasc Res. 2008 Sep 1;79(4):600-10. Epub 2008 May 28.

Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. *Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense*. FASEB J. 2003 Aug;17(11):1502-4. Epub 2003 Jun 3.

Go YM, Gipp JJ, Mulcahy RT, Jones DP. *H₂O₂-dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1*. J Biol Chem 2004; 279:5837-45.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res 2000; 86: 494-501.

Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. *Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasoma*. Biochem Biophys Res Commun 2003; 305:709-18.

Grune T, Reinheckel T, Li R, North JA, Davies KJA. *Proteasoma-dependent turnover of protein disulfide isomerase in oxidatively stressed cells*. Arch Biochem Biophys 2002; 397:407-13.

Gutteridge JM, Halliwell B. *Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future.* Ann N Y Acad Sci. 2000;899:136-47. Review.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase.* Nature. 1999 Jan 21;397(6716):271-4. Erratum in: Nature 1999 Mar 4;398(6722):90.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. *Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response.* Mol Cell. 2000 May;5(5):897-904.

Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress.* Mol Cell 2003; 11:619-33.

Harter C, Wieland F *The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport.* Biochim Biophys Acta. 1996, 1286: 75-93.

Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH. *Oxidative injury to the endoplasmic reticulum in mouse brains after transient focal ischemia.* Neurobiol Dis. 2004 Mar;15(2):229-39.

Herr I, Debatin KM. *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy.* Blood. 2001 Nov 1;98(9):2603-14.

Herrmann J, Edwards WD, Holmes DR Jr, Shogren KL, Lerman LO, Ciechanover A, Lerman A. *Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques*

associated with acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol. 2002 Dec 4;40(11):1919-27.

Herrmann J, Saguner AM, Versari D, Peterson TE, Chade A, Olson M, Lerman LO, Lerman A. *Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis.* Circ Res. 2007 Oct 26;101(9):865-74. Epub 2007 Sep 6.

Herrmann J, Soares SM, Lerman LO, Lerman A. *Potential role of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: aspects of a protein quality disease.* J Am Coll Cardiol. 2008 May 27;51(21):2003-10.

Hwang J, Saha A, Boo, YC, Sorescu GP, McNally JS, Holland SM, Dikalov S, Giddens DP, Griendling KK, Harrison DG, Jo H. *Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O₂⁻ from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion.* J Biol Chem 2003; 278:47291-8.

Hicke L. *Protein regulation by monoubiquitin.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar;2(3):195-201. Review.

Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. *Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay.* Biochim Biophys Acta. 2002 Feb 15;1570(1):47-52.

Hsieh YH, Su IJ, Lei HY, Lai MD, Chang WW, Huang W. *Differential endoplasmic reticulum stress signaling pathways mediated by iNOS.* Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 3;359(3):643-8. Epub 2007 May 30.

Imlay JA, Fridovich I. *Isolation and genetic analysis of a mutation that suppresses the auxotrophies of superoxide dismutase-deficient Escherichia coli K12*. Mol Gen Genet. 1991 Sep;228(3):410-6.

Janiszewski M, Pedro MA, Scheffer RCH, van Asseldonk JT, Souza LC, da Luz PL, Laurindo FRM. *Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status*. Free Radic Biol Med 2000; 29:889-99.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, Laurindo FR. *Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem. 2005 Dec 9;280(49):40813-9. Epub 2005 Sep 8.

Jiang HY, Wek RC. *Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition*. J Biol Chem. 2005 Apr 8;280(14):14189-202. Epub 2005 Jan 31.

Johansen K, Svensson L. *Immunoprecipitation*. In: Walker JM. Ed. The protein protocol handbook. Humana Press, USA, 2002, 1097-1106.

Jung T, Bader N, Grune T. *Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome*. Arch Biochem Biophys. 2007 Jun 15;462(2):231-7. Epub 2007 Mar 1. Review.

Kaneko M, Nomura Y. *ER signaling in unfolded protein response*. Life Sci 2003; 74:199-205.

Karin M, Ben-Neriah Y. *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol. 2000;18:621-63.

Kelsen SG, Duan X, Ji R, Perez O, Liu C, Merali S. *Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 May;38(5):541-50. Epub 2007 Dec 13.c

Kim I, Xu W, Reed JC. *Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities*. Nat Rev Drug Discov. 2008 Dec;7(12):1013-30. Review.

Kitiphongspattana K, Khan TA, Ishii-Schrade K, Roe MW, Philipson LH, Gaskins HR. *Protective role for nitric oxide during the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007 Jun;292(6):E1543-54. Epub 2007 Jan 30.

Klappa P, Koivunen P, Pirneskoski A, Karvonen P, Ruddock LW, Kivirikko KI, Freedman RB. *Mutations that destabilize the a' domain of human protein-disulfide isomerase indirectly affect peptide binding*. J Biol Chem. 2000 May 5;275(18):13213-8.

Klappa P, Hawkins HC, and Freedman RB. *Interactions between protein disulphide isomerase and peptides*. Eur J Biochem 248:37–42, 1997.

Kovacic HN, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ. *Redox regulation of human Rac1 stability by the proteasome in human aortic endothelial cells*. J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):45856-61. Epub 2001 Oct 3.

Krishna SB, Alfonso LF, Thekkumkara TJ, Abbruscato TJ, Bhat GJ. *Angiotensin II induces phosphorylation of glucose-regulated protein-75 in WB rat liver cells*. Arch Biochem Biophys. 2007 Jan 1;457(1):16-28. Epub 2006 Nov 2.

Kültz D. *Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function*. J Exp Biol. 2003 Sep;206(Pt 18):3119-24. Review.

Kültz D. *Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response*. Annu Rev Physiol. 2005;67:225-57. Review.

Kuthan H, Ullrich V. *Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system*. Eur J Biochem. 1982 Sep 1;126(3):583-8.

Lai MT, Huang KL, Chang WM, Lai YK. *Geldanamycin induction of grp78 requires activation of reactive oxygen species via ER stress responsive elements in 9L rat brain tumour cells*. Cell Signal. 2003 Jun;15(6):585-95.

Lai WL, Wong NS. *ROS mediates 4HPR-induced posttranscriptional expression of the Gadd153 gene*. Free Radic Biol Med. 2005 Jun 15;38(12):1585-93. Epub 2005 Mar 19.

Lambeth JD. *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol. 2004 Mar;4(3):181-9. Review. No abstract available.

Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. *Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression*. Free Radic Biol Med. 2007 Aug 1;43(3):319-31. Epub 2007 Apr 1. Review.

Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griending KK. *Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways*. Circ Res. 2001 May 11;88(9):888-94.

Lassègue B, Clempus RE. *Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation*. Am J Physiol 2003; 285:R277-97.

Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CX. *Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases*. Antioxid Redox Signal. 2008 Jun;10(6):1101-13. Review.

Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. *Proteasoma inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:9946-51.

Lee CS, Tee LY, Warmke T, Vinjamoori A, Cai A, Fagan AM, Snider BJ. *A proteasomal stress response: pre-treatment with proteasoma inhibitors increases proteasoma activity and reduces neuronal vulnerability to oxidative injury*. J Neurochem. 2004 Nov;91(4):996-1006.

Leite PF, Liberman M, Sandoli de Brito F, Laurindo FR. *Redox processes underlying the vascular repair reaction*. World J Surg 2004; 28: 331-6.

Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R. *Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest*

and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. Clin Cancer Res. 2003 Mar;9(3):1145-54.

Liu Y, Min W. *Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner.* Circ Res 2002; 90:1259-66.

Liu Y, Adachi M, Zhao S, Hareyama M, Koong AC, Luo D, Rando TA, Imai K, Shinomura Y. *Preventing oxidative stress: a new role for XBP1.* Cell Death Differ. 2009 Feb 27. [Epub ahead of print]

Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW. *The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation.* Mol Cell. 2000 Jun;5(6):939-48.

Luciano F, Jacquelin A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G, Auburger P. *Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function.* Oncogene. 2003 Oct 2;22(43):6785-93.

Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. *Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response.* J Mol Biol. 2002 May 17;318(5):1351-65.

Malhotra JD, Kaufman RJ. *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response.* Semin Cell Dev Biol. 2007 Dec;18(6):716-31. Epub 2007 Sep 8. Review.

- Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, Kaufman RJ. *Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 25;105(47):18525-30. Epub 2008 Nov 14.
- Meiners S, Laule M, Rother W, Guenther C, Prauka I, Muschick P, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl K. *Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis*. Circulation. 2002 Jan 29;105(4):483-9.
- Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, Dreger H, Baumann G, Stangl V, Stangl K. *Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells*. Free Radic Biol Med. 2006 Jun 15;40(12):2232-41. Epub 2006 Mar 31.
- Meller R, Cameron JA, Torrey DJ, Clayton CE, Ordonez AN, Henshall DC, Minami M, Schindler CK, Saugstad JA, Simon RP. *Rapid degradation of Bim by the ubiquitin-proteasome pathway mediates short-term ischemic tolerance in cultured neurons*. J Biol Chem. 2006 Mar 17;281(11):7429-36. Epub 2006 Jan 23.
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. *Endoplasmic reticulum and Golgi complex: Contributions to, and turnover by, autophagy*. Traffic. 2006 Dec;7(12):1590-5. Epub 2006 Oct 16. Review.
- Mukhopadhyay D, Riezman H. *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. Science. 2007 Jan 12;315(5809):201-5. Review.
- Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. *Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system*. Nat Rev Drug Discov. 2006 Jul;5(7):596-613. Review.

Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. *The ubiquitin-proteasome system*. J Biosci. 2006 Mar;31(1):137-55. Review.

Nakamura T, Lipton SA. *Emerging roles of S-nitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases*. Antioxid Redox Signal. 2008 Jan;10(1):87-101. Review.

Nauseef WM. *How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view*. Immunol Rev. 2007 Oct;219:88-102. Review.

Noiva R. *Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum*. Semin Cell Dev Biol 1999; 10:481-93.

Noiva R, Freedman RB, and Lennarz WJ. *Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites*. J Biol Chem 268: 19210–19217, 1993.

Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha*. J Cell Biol. 2001 May 28;153(5):1011-22.

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoiike H, Hori M, Kitakaze M. *Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis*. Circulation. 2004 Aug 10;110(6):705-12. Epub 2004 Aug 02.

Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ, High S. *Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins*. Science. 1997 Jan 3;275(5296):86-8.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science. 2004 Oct 15;306(5695):457-61.

Papa L, Rockwell P. *Persistent mitochondrial dysfunction and oxidative stress hinder neuronal cell recovery from reversible proteasome inhibition*. Apoptosis. 2008 Apr;13(4):588-99.

Pastori GM, Foyer CH. *Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls*. Plant Physiol. 2002 Jun;129(2):460-8. Review. No abstract available.

Patil C, Walter P. *Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals*. Curr Opin Cell Biol 2001; 13:349-55.

Pickart CM. *Back to the future with ubiquitin*. Cell. 2004 Jan 23;116(2):181-90. Review.

Pickart CM. *Ubiquitin enters the new millennium*. Mol Cell. 2001 Sep;8(3):499-504. Review.

Quéméneur E, Guthapfel R, Gueguen P. *A major phosphoprotein of the endoplasmic reticulum is protein disulfide isomerase*. J Biol Chem 1994; 269: 5485-8.

Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidallo MA, Lizard G, Ogier-Denis E. *NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells*. Mol Cell Biol. 2004 Dec;24(24):10703-17.

Reid G, Hübner MR, Métivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F. *Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling*. Mol Cell. 2003 Mar;11(3):695-707.

Reth M. *Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation*. Nat Immunol. 2002 Dec;3(12):1129-34. Review.

Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, Mori K, Glimcher LH, Denko NC, Giaccia AJ, Le QT, Koong AC. *XBPI is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth*. Cancer Res. 2004 Sep 1;64(17):5943-7.

Römisch K. *Endoplasmic reticulum-associated degradation*. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:435-56. Review.

Ron D, Walter P. *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Jul;8(7):519-29. Review.

Rutkowski DT, Kaufman R.J. *A trip to the ER: coping with stress*. Trends Cell Biol. 2004; 14: 20-8.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. *That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress*. Trends Biochem Sci. 2007 Oct;32(10):469-76.

Salmeen A, Barford D. *Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases*. Antioxid Redox Signal. 2005 May-Jun;7(5-6):560-77.

Santos CX, Tanaka LY, Wosniak JJ, Laurindo FR. *Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport and NADPH Oxidase*. Antioxid Redox Signal. 2009 Apr 23. [Epub ahead of print]

Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, Sienkiewicz A, Fórró L, Schlegel W, Krause KH. *NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation*. Biochem J. 2007 Aug 15;406(1):105-14.

Shi Y, Taylor SI, Tan SL, Sonenberg N. *When translation meets metabolism: multiple links to diabetes*. Endocr Rev. 2003 Feb;24(1):91-101. Review

Sitia R, Braakman I. *Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory*. Nature 2003; 426: 891-4.

Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, Pereira AC, Junqueira ML, Krieger JE, Da Luz PL, Augusto O, Laurindo FRM. *Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity*. Free Radic Biol Med 2000; 28:1232-42.

Sullivan DC, Huminiecki L, Moore JW, Boyle JJ, Poulsom R, Creamer D, Barker J, and Bicknell R. *EndoPDI, a novel proteindisulfide isomerase-like protein that is*

preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. J Biol Chem 278:47079–47088, 2003.

Sullivan PG, Dragicevic NB, Deng JH, Bai Y, Dimayuga E, Ding Q, Chen Q, Bruce-Keller AJ, Keller JN. *Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover.* J Biol Chem. 2004 May 14;279(20):20699-707. Epub 2004 Jan 22.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.* EMBO Rep. 2006 Sep;7(9):880-5. Review.

Tagawa Y, Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Okamura M, Yao J, Kitamura M. *Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP).* Free Radic Biol Med. 2008 Jul 1;45(1):50-9. Epub 2008 Mar 18.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. *Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases.* J Biol Chem. 2003 Jul 4;278(27):25234-46. Epub 2003 Apr 25.

Tan C, Li Y, Tan X, Pan H, Huang W. *Inhibition of the ubiquitin-proteasome system: a new avenue for atherosclerosis.* Clin Chem Lab Med. 2006;44(10):1218-25.

Tanaka S, Uehara T, and Nomura Y. *Up-regulation of protein disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death.* J Biol Chem 275:10388–10393, 2000.

Taniyama Y, Griendling KK. *Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms*. Hypertension. 2003 Dec;42(6):1075-81. Epub 2003 Oct 27. Review.

Tian G, Xiang S, Noiva R, Lennarz WJ, and Schindelin H. *The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites*. Cell 124: 61–73, 2006.

Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, Koyama S, Wada M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Goto K, Kato T. *Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice*. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Apr 4;303(2):496-503.

Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. *S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration*. Nature. 2006 May 25;441(7092):513-7.

Ueyama T, Lekstrom K, Tsujibe S, Saito N, Leto TL. *Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms*. Free Radic Biol Med. 2007 Jan 15;42(2):180-90. Epub 2006 Sep 12.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. Science. 2000 Jan 28;287(5453):664-6.

Ushio-Fukai M. *Localizing NADPH oxidase-derived ROS*. Sci STKE. 2006 Aug 22; 2006(349):re8. Review.

Ushioda R, Hoseki J, Araki K, Jansen G, Thomas DY, Nagata K. *ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER*. Science. 2008 Jul 25;321(5888):569-72.

Versari D, Herrmann J, Gössl M, Mannheim D, Sattler K, Meyer FB, Lerman LO, Lerman A. *Dysregulation of the ubiquitin-proteasoma system in human carotid atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Sep;26(9):2132-9. Epub 2006 Jun 15.

Vitadello M, Ausma J, Borgers M, Gambino A, Casarotto DC, Gorza L *Increased myocardial GRP94 amounts during sustained atrial fibrillation: a protective response?* Circulation. 2001, 103: 2201-2206.

von Mikecz A. *The nuclear ubiquitin-proteasome system*. J Cell Sci. 2006 May 15;119(Pt 10):1977-84. Review.

Xiao G, Chung TF, Fine RE, Johnson RJ *Calreticulin is transported to the surface of NG108-15 cells where it forms surface patches and is partially degraded in an acidic compartment*. J Neurosci Res.1999, 58: 652-662.

Xu J, Wu Y, Song P, Zhang M, Wang S, Zou MH. *Proteasome-dependent degradation of guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I causes tetrahydrobiopterin deficiency in diabetes mellitus*. Circulation. 2007 Aug 21;116(8):944-53. Epub 2007 Aug 6.

Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. *Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by*

single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Dev Cell. 2007 Sep;13(3):365-76.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs.* Mol Cell. 2000 Dec;6(6):1355-64.

Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Okamura M, Du S, Kasai A, Takano Y, Shitamura A, Shimada T, Yao J, Kitamura M. *Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response.* J Biol Chem. 2008 Feb 15;283(7):4252-60. Epub 2007 Dec 17.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. *Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress.* J Biol Chem. 2001 Apr 27;276(17):13935-40. Epub 2001 Jan 29.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor.* Cell. 2001 Dec 28;107(7):881-91.

Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, Perez-Galan P, Wolford C, Hai T, Ron D, Chen W, Trenkle W, Wiestner A, Ye Y. *ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Feb 17;106(7):2200-5. Epub 2009 Jan 22

Weissman AM. *Themes and variations on ubiquitylation.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar;2(3):169-78. Review.

Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC *Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways.* J Clin Invest. 2001, 107: 1263-1273.

Wetterau JR, Combs KA, McLean LR, Spinner SN, Aggerbeck LP *Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein.* Biochemistry. 1991, 30: 9728-9735.

Winterbourn CC. *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species.* Nat Chem Biol. 2008 May;4(5):278-86. Review.

Wiseman RL, Chin KT, Haynes CM, Stanhill A, Xu CF, Roguev A, Krogan NJ, Neubert TA, Ron D. *Thioredoxin related protein 32 is an arsenite-regulated thiol reductase of the proteasome 19S particle.* J Biol Chem. 2009 Apr 6. [Epub ahead of prin].

Wosniak J, Santos CX, Kowaltowski AJ, Laurindo FRC *Cross-Talk Between Mitochondria and NADPH Oxidase: Effects of Mild Mitochondrial Dysfunction on Angiotensin II-Mediated Increase in Nox Isoform Expression and Activity in Vascular Smooth Muscle Cells.* Antioxid Redox Signal. 2009 Jun;11(6):1265-78.

Zhang L, Sheppard OR, Shah AM, Brewer AC. *Positive regulation of the NADPH oxidase NOX4 promoter in vascular smooth muscle cells by E2F.* Free Radic Biol Med. 2008 Sep 1;45(5):679-85. Epub 2008 May 29.

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikon, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B *Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent*

product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. Free Radic. Biol. Med. 2003, 34, 1359-1368

Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. *Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 19;102(16):5727-32. Epub 2005 Apr 11. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 21;102(25):9086.

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. *CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum.* Genes Dev. 1998 Apr 1;12(7):982-95.

-Curriculum Vitae

ANGÉLICA MASTANDRÉA AMANSO

Nascimento: 21 de maio de 1979, São Paulo

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo

Laboratório de Biologia Vascular- Instituto do Coração

Avenida: Dr Eneas carvalho Aguiar, 44, Bloco II

Cidade/Estado/Cep: São Paulo/SP/05403-000

e-mail: amansoam@yahoo.com.br

Fone: +551130695185/fax: +551130695920

Formação

Pós-Graduação – Doutorado (início: 2006)

Área: Ciências Biológicas – Cardiologia

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

Graduação (1999-2005)

Curso: Farmácia-Bioquímica

Instituição: Instituto de Ciências Farmacêuticas – USP

Ensino Médio (1995-1998)

Instituição: Escola Estadual de Segundo Grau Professor Manuel Ciridião Buarque

Ocupação

1) Bolsista – Doutorado (início: 2006)

Agência Financiadora: FAPESP

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

2) Bolsista: Iniciação Científica (2003-2005)

Agência Financiadora: Pró-Reitoria de Pesquisa-USP

Área: Ciências Biológicas – Fisiologia

Orientação: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho e Prof. Dr. Luiz Roberto Britto

Instituição: Departamento de Fisiologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP

3) Bolsista: Iniciação Científica (2001-2002)

Área: Ciências Biológicas – Bioquímica

Agência Financiadora: FAPESP

Orientação: Profa. Dra. Ohara Augusto

Instituição: Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – USP

PUBLICAÇÕES:

1. **Amanso AM**, Santos CX, Laurindo FR (2009). *Proteasome inhibitors disrupt NADPH oxidase response to stimuli and attenuate the ER stress signaling in vascular smooth muscle cells*. Manuscript in preparation.

2. Santos CX, Stolf B, Takemoto PV, **Amanso A**, Lopes L, Souza E, Goto H, Laurindo FR (2009) *Protein disulfide isomerase associate with NADPH oxidase and is required for efficient Leishmania phagocytosis by macrophages*. Journal of Leukocyte Biology. In Press.
3. Simon MN, Azevedo-Martins AK, **Amanso AM**, Carvalho CR, Curi R. *Persistent activation of Akt or ERK prevents the toxicity induced by saturated and polyunsaturated fatty acids in RINm5F beta-cells*. Toxicol In Vitro. 2008 Jun;22(4):1018-24. Epub 2008 Feb 26.
4. Laurindo RM, Fernandes DC, **Amanso AM**, Santos CX. (2007) *Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases*. Antioxid Redox Signal. 2008 Jun;10(6):1101-13.
5. Caperuto LC, Anhê GF, **Amanso AM**, Ribeiro LM, Medina MC, Souza LC, Carvalho OM, Bordin S, Saad MJ, Carvalho CR. *Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats*. Endocrine. 2006 Jun;29(3):391-8.
6. Rossoni LV, Xavier FE, Moreira CM, Falcochio D, **Amanso AM**, Tanoue CU, Carvalho CR, Vassallo DV. *Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats*. Life Sci. 2006 Sep 13;79(16):1537-45. Epub 2006 Apr 29.
7. Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhe GF, **Amanso AM**, Teixeira VP,

Bordin S, Carpinelli AR, Britto LR, Barbieri RL, Borella MI, Carvalho CR. *Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats*. FEBS Lett. 2006 Jan 9;580(1):285-90. Epub 2005 Dec 19. Erratum in: FEBS Lett. 2006 Feb 20;580(5):1528.

8. Carvalho CR, Carvalheira JB, Lima MH, Zimmerman SF, Caperuto LC, **Amanso A**, Gasparetti AL, Meneghetti V, Zimmerman LF, Velloso LA, Saad MJ. *Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways*. Endocrinology. 2003 Feb;144(2):638-47.

9. Augusto O, Bonini MG, **Amanso AM**, Linares E, Santos CC, De Menezes SL. *Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology*. *Free Radic Biol Med*. 32(9):841-59,(2002).

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS:

- 1. Apresentação oral/TRAVEL AWARD.** *“Proteasome inhibition increases oxidative stress and disrupts NADPH oxidase response to stimuli in vascular smooth muscle cells”*. Society of Free Radical Biology and Medicine Meeting 2008, Section: Adaptive and Regulatory Responses • Indianapolis, IN/USA/2008.
- 2. Apresentação de poster.** *“Essential role of ubiquitin-proteasoma system in control of Nox4 mRNA levels during the unfolded protein response:*

contribution to proapoptotic signaling". Cold Spring Harbor. Molecular Chaperones & Stress Response Meeting, New York, NY/USA/ 2008.

3. **Apresentação de poster** "*Role of ubiquitin-proteasoma system in the control of NADPH oxidase in vascular smooth muscle cells.*" Free Radicals in Montevideo 2007 V Meeting of SFRBM - South American Group /Uruguay/2007.
4. **Apresentação de poster** "*Endoplasmic Reticulum Stressors induce protein disulfide isomerase ubiquitination and phosphorylation in vascular smooth muscle cells*". SBBq /Brazil/2007, *Brazilian Biochemistry Society*.
5. **Apresentação oral** "*Proteasoma inhibition leads to enhanced NADPH oxidase activity, induction of endoplasmic reticulum chaperones and cell death in vascular smooth muscle cells*". SBBq /Brazil/2006, *Brazilian Biochemistry Society*.
6. **Apresentação de poster** "*An improved 2-D Gel Electrophoretic approach to assess co-immunoprecipitation between protein disulfide isomerase and p22phox NADPH Oxidase subunit in vascular smooth muscle cells*". In: IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia. Brazil/2005