Monica Massako Watanabe

**Medidas das atividades da Dissulfeto Isomerase Proteica:
uma análise crítica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Programa de: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Denise de Castro Fernandes

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Watanabe, Monica Massako

Medidas das atividade de Dissulfeto Isomerase Proteica : uma análise crítica /
Monica Massako Watanabe. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Denise de Castro Fernandes.

Descritores: 1.Isomerases de dissulfetos de proteínas 2.Dobramento de
proteína 3.Isomerismo 4.Oxidação

USP/FM/DBD-227/14

Este trabalho foi desenvolvido com recursos públicos provenientes da Fundação Zerbini, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedicatória

À minha família pelo incentivo e ao Danilo
pela compreensão e amor.

Agradecimentos

À Denise de Castro Fernandes pela orientação, inspiração, compreensão e apoio em todos os momentos nessa fase, exemplo de pessoa que sempre irei me inspirar.

Ao Prof. Francisco Laurindo pelo apoio e as conversas científicas, que me inspiraram sobre o que é realmente fazer ciência.

À minha família (Cecília, Eduardo, Marcela, Yoshio e Ytiro) pelo apoio e compreensão incondicional.

Ao Danilo por estar ao meu lado, com carinho e compreensão, nesta etapa que certamente será importante para futuras etapas em nossa vida.

Ao João Wosniak Jr pelo apoio e ajuda cultivo celular, na otimização de condições experimentais e em todas as minhas apresentações.

À Maria Bertoline, que sempre me ajudou no HPLC e pela carinhosa companhia no laboratório.

Aos colegas de laboratório: Ana Moretti, Angélica, Carol, Daniela, Jéssyca, Júlia, Laura, Leonora, Luciana, Raquel, Renata, Phelipe, Thais, Thalita, Vanda, Victor.

Aos colegas de trabalho: Elaine, Fernanda, Gabriela, Juarez, Larissa, Lilian, Melina, Rafael Raphael, Vanessa.

À Deus por tudo.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de abreviaturas

Resumo

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura e função da Dissulfeto Isomerase Proteica.....	1
1.2 Dissulfeto Isomerase Proteica em processo fisiológico.....	5
1.3 Dissulfeto Isomerase Proteica na regulação de processos redox.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MEDIDAS DAS ATIVIDADES DA DISSULFETO ISOMERASE PROTEÍCA...	10
3.1 Ensaio para medir atividade isomerase da PDI.....	14
3.2 Ensaio para medir enovelamento oxidativo da PDI.....	15
3.3 Ensaio para medir atividade redutase da PDI	16
3.4 Ensaio que utiliza peptídeos como substrato para medir atividades da PDI.....	18
3.5 Ensaio para medir atividade chaperona da PDI.....	19
4. INTERFERENTES NA ATIVIDADE REDUTASE DA PDI: INIBIDORES	20
ESPÚRIOS E SURFACTANTES.....	
4.1 Resultados.....	20
4.2 Discussão.....	26
4.3 Conclusões.....	28
4.4 Materiais e métodos.....	29
5. REFERÊNCIAS.....	30
6. ANEXO I: artigo submetido para publicação.....	36
7. ANEXO II: Efeito da perda de função da PDI durante shear laminar sustentado: participação de	51
espécies reativas.....	
Curriculum.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura tridimensional da PDI.....	1
Figura 2	Propriedades estruturais dos membros da família da PDI.....	2
Figura 3	Esquema simplificado da estrutura da PDI.....	2
Figura 4	Reações redox catalisadas pela PDI.....	4
Figura 5	Possíveis vias de regeneração da PDI durante o enovelamento de proteínas no RE..	6
Figura 6	Isomerização de ligações dissulfeto em substratos catalisada pela PDI.....	12
Figura 7	Redução da insulina mediada pela PDI.....	13
Figura 8	Esquema de uso da RNase para medidas de atividades da PDI.....	15
Figura 9	Comparação das estruturas da RNase bovina e RNase T1.....	16
Figura 10	Acoplamento da redução da insulina com o consumo NADPH.....	18
Figura 11	Estruturas do peptídeo TI dansilado e dos peptídeos peguilados.....	19
Figura 12	Atividade redutase da PDI utilizando-se como substrato a insulina.....	21
Figura 13	Lag time da atividade redutase da PDI medida na presença de diversos detergentes	24
Figura 14	Atividade redutase da PDI em presença de colesterol.....	25
Figura 15	Ensaio de redução da insulina em homogenatos de células vasculares.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano-sulfonato)
CO ₂	dióxido de carbono
DHE	dihidroetidina, hidroetidina, dihidroetidio
DOC	Deoxicolato de sódio
DTPA	N,N,N',N''-penta-acetato-dietilenotriamina
DTT	dithiothreitol
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
E/DHE	razão etídio/DHE consumida
EOH	2-hidroxietídio
EOH/DHE	razão 2-hidroxietídio/DHE consumida
EDTA	etilenodiaminatetraacetato de sódio dihidratado
EGTA	etileno-bis(oxietilenonitrila) tetraacetato de sódio
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
HRP	peroxidase de rabanete
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HPLC	cromatografia de alta performance
LS	estresse de cisalhamento laminar (laminar shear)
•NO	óxido nítrico
Nox	isoforma da NADPH oxidase (Non-phagocytic oxidase)
O ₂ •-	ânion radical superóxido
ONOO-	peroxinitrito
NP40	Nonidet-P40 (octilfenoxipolietóxiletanol)
PBS	salina pH 7,4
PBS/DTPA	salina pH 7,4 contendo DTPA 0,1 mM
PDI	dissulfeto isomerase protéica
PDI-mut	dissulfeto isomerase protéica mutada
PDI-wt	dissulfeto isomerase protéica selvagem
PDI si	dissulfeto isomerase protéica silenciada
RAEC	células endoteliais de aorta de coelho (rabbit aortic endothelial cells)
RASM	células musculares lisas de aorta de coelho (rabbit aortic smooth muscle)
RE	retículo endoplasmático
RNS	espécies reativas de nitrogênio (reactive nitrogen species)
ROS	espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species)
SAP	saponina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
St	condição estática (vs. shear laminar) (static)
VSMC	células musculares lisas (vascular smooth muscle cells)
UA	unidades arbitrárias
ε	absortividade molar
k	constante de velocidade de reação
λ _{ex}	comprimento de onda de excitação
λ _{em}	comprimento de onda de emissão

RESUMO: Medidas das atividades da Dissulfeto Isomerase Proteína: uma análise crítica dos métodos

A Dissulfeto Isomerase Proteína (PDI) é uma chaperona redox essencial responsável pela inserção correta das ligações dissulfeto em proteínas nascentes no retículo endoplasmático. Nesta localização celular, bem como em outras regiões, como na superfície celular, a PDI atua na manutenção da homeostase redox e sinalização. Houve substancial evolução no conhecimento sobre a estrutura e funções da PDI, graças a estudos *in vitro* que utilizam a PDI purificada, quimeras ou seus domínios isolados. Nestas abordagens experimentais, as medidas das atividades redutase e chaperona da PDI são realizadas de forma relativamente simples. Entretanto, medir a atividade isomerase, que é a atividade autêntica da família das PDIs, é tecnicamente bastante complexo. Em células e tecidos, o papel da PDI tem sido descrito com base principalmente em estratégias experimentais de ganho e perda de função. Todavia, ainda há pouca informação na correlação entre os resultados funcionais com a medida das atividades da PDI. Este trabalho compila os principais métodos descritos para medir as quatro atividades da PDI: tiol redutase, tiol oxidase, tiol isomerase e chaperona, com ênfase na descrição de controles e interferentes críticos, como os tampões que contêm surfactantes. Ainda, discutir-se-á criticamente os resultados obtidos quando da transposição destes métodos para amostras de homogenatos (celular ou tecidual).

Descritores: Isomerases de dissulfetos de proteínas, Dobramento de proteína, Isomerismo, Oxidação.

Abstract: Methods for measuring Protein Disulfide Isomerase activities: a critical overview

Protein disulfide isomerase is an essential redox chaperone from endoplasmic reticulum, responsible for correct disulfide bond insertion in nascent proteins. At the endoplasmic reticulum and other locations including the cell surface, PDI accounts for redox homeostasis and signaling. Knowledge about PDI structure and function evolved substantially from in vitro studies using purified PDI and chimeras. In these experimental scenarios, PDI reductase and chaperone are readily approachable. However, isomerase activity, the hallmark of PDI family, is significantly complex. Assessment of PDI roles in cells and tissues mainly relies on gain- or loss-of-function experiments. However, there is limited information regarding correlation of these results with PDI activities. In this manuscript, we put together the main methods described for measuring the four PDI activities: thiol reductase, thiol oxidase, thiol isomerase and chaperone, with emphasis on controls and critical interferents, such as detergent-containing buffers. We also discuss the transposition of these methods from purified PDI to cellular or in vivo samples, with critical thoughts about the interpretation of results.

Keywords: Protein disulfide isomerase, Chaperone, Isomerization, Oxidation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura da Dissulfeto Isomerase Proteica

A Dissulfeto Isomerase Proteica - PDI (também denominada PDIA1 ou no genoma humano, gene P4HB) é uma chaperona redox pertencente ao grupo de ditiol-proteínas da superfamília da tiorredoxina (Fig. 1), cuja principal função é catalisar o enovelamento protéico pela inserção de pontes dissulfeto em proteínas recém-sintetizadas no retículo endoplasmático que serão secretadas ou irão para a membrana plasmática (Gruber e col., 2006). A PDIA1 é a proteína fundadora da família das PDI, que atualmente é composta por pelo menos 20 membros, cada um contendo ao menos 1 domínio PDI (Fig. 2). Além disso, apesar de seu sinal de retenção KDEL, a PDI também é encontrada fora do seu compartimento habitual, o retículo endoplasmático, e apresenta outras funções como transporte subcelular e secreção de várias proteínas (Terada e col., 1995).

Figura 1. Estrutura tridimensional da PDI (Laurindo, 2008).

Figura 2. Propriedades estruturais dos membros da família da PDI. Os domínios tioredoxina (a, a', b e b') são descritos em diferentes cores, assim como os domínios transmembrana, quando houver. Erp= *Endoplasmic reticulum protein* (o número sequencial corresponde ao peso molecular); GRP = *Glucose related protein* (Xu e col., *Drug Disc. Today*, 2014)

A PDI é uma proteína de 55 kDa formada por quatro domínios tioredoxina (denominados a-b-b'-a'), sendo que os sítios catalíticos contém 2 cisteínas (motivo WCGHC) e estão presentes nos dois domínios a e a' (Fig. 1). Os domínios b e b' não têm cisteínas redox e

contém resíduos hidrofóbicos envolvidos no reconhecimento e ligação do substrato. Esta região é responsável pela atividade chaperona da PDI (de impedir agregação proteica), que é independente das cisteínas redox (Hatahet e Ruddock, 2009). Os domínios b' e a' estão conectados pela região de 19 aminoácidos chamada alça x (Wang e col., 2010), uma alça móvel que pode aumentar ou reduzir a acessibilidade dos substratos à região hidrofóbica da PDI, dependendo do estado redox das cisteínas dos sítios ativos (Wang e col., 2012) (Fig. 3). Já a região C-terminal (domínio c) apresenta concentração de aminoácidos ácidos e está envolvida na ligação de cálcio, além de conter a sequência clássica de aminoácidos de retenção no retículo endoplasmático KDEL (Cai e col., 1994).

Figura 3. Esquema simplificado da estrutura da PDI (domínios a-b-b'-x-a'-c e as 4 cisteínas redox). (A) A estrutura cristalizada da PDI de levedura obtida a 4°C exibe a forma da letra “U” torcida (Tian e col., 2006) com a região hidrofóbica na base do “U” e os sítios ativos de frente um para o outro. (B) A PDI com as cisteínas do domínio a' reduzidas assume uma configuração estrutural mais fechada da letra “U”; nesta forma a região x compete com substratos mal enovelados diminuindo a afinidade dos mesmos com a região hidrofóbica b' (Wang e col., 2010). Figura adaptada de Laurindo e col., 2012.

Estudos de cristalização da PDI de levedura realizados em diferentes temperaturas (4°C versus 22°) (Tian e col., 2006; Tian e col., 2008) descreveram uma proteína altamente flexível, que pode portanto, ajustar sua estrutura para ligar substratos de diferentes tamanhos e conformações, de tal forma que permite a acessibilidade dos sítios redox da PDI para tióis críticos dos substratos. Nestes trabalhos observou-se que a PDI de levedura pode apresentar duas distintas conformações, dependendo da temperatura de cristalização: i) uma forma em “U”, na qual os dois sítios catalíticos estão frente a frente e os resíduos hidrofóbicos estão na base rígida do “U” (Fig. 3) ou ii) uma forma aberta, denominada “forma de barco”. Além disso, a alça x proporciona flexibilidade para a PDI assumir conformação “tampada” (*capped*) e assim restringir o acesso de substratos (Wang e col., 2010).

Para enovelar proteínas no lúmen do retículo endoplasmático, a PDI catalisa com grande eficiência ciclos repetidos de oxidação e de redução de tiol; por exemplo, *in vitro* a PDI aumenta a introdução de dissulfeto de 100 a 6000 vezes (Wilkinson e Gilbert, 2004). Isso reflete o perfil geral das atividades redox da PDI: oxidase, redutase ou isomerase (Fig. 4), sendo esta última a realocação intra-molecular da ponte dissulfeto, uma característica autêntica (*the hallmark*) das proteínas da família da PDI. A atividade chaperona da PDI pode ser independente do sítio redox, já que a PDI é capaz de enovelar também proteínas que não contêm pontes dissulfeto (Cai e col., 1994; Puig e col., 1994), mas recentemente Wang e colaboradores (2010) demonstraram que o estado redox da PDI reduzido mantém a estrutura tridimensional da proteína mais fechada, com potencial interferência na ligação com substratos, inclusive durante atividade chaperona da PDI. Apesar da diferenciação das atividades chaperona e oxidoreductase da PDI *in vitro*, o enovelamento de proteínas com pontes dissulfeto parece requerer ambas as atividades *in vivo*.

Figura 4. Reações redox catalisadas pela PDI (adaptado de Laurindo e col., 2008).

A PDI é abundantemente expressa e apresenta concentrações da ordem de mM no lúmen do retículo endoplasmático (faixa estimada de 0,2-0,5 mM) (Zapun e col., 1992; Lyles e Gilbert, 1991). Sua reatividade é dependente do pH, sendo que em pH fisiológico a cisteína redox que se liga ao substrato (cisteína do lado N-terminal do motivo WCGHC) está desprotonada ($pK_a 5,6 \pm 0,1$, Ruddock e col., 1996) enquanto que a outra cisteína (“cisteína de resolução”) do mesmo motivo geralmente está protonada ($pK_a > 10$) (Lappi e col., 2004); estas diferenças são atribuídas sobretudo às interações com resíduos adjacentes, tais como a histidina. Durante a oxidação do substrato pela PDI (primeiro passo da isomerização), o pK_a da cisteína de resolução provavelmente é alterado para menos de 7 via mudanças conformacionais (possivelmente relacionadas com a arginina 120, que é conservada em toda a família PDI) de tal

forma que o dissulfeto misto entre a PDI e o substrato é desfeito e o substrato é liberado, no segundo passo da isomerização (Hatahet e Ruddock, 2009).

1.2 Dissulfeto Isomerase Proteica em processos fisio(pato)lógicos

A função canônica da PDI é inserir ligações dissulfeto em proteínas nascentes do retículo endoplasmático. Ao final do processo, a PDI reduzida terá que ser oxidada para manter o enovelamento de proteínas no RE. Para tal diversas vias de oxidação da PDI no RE foram propostas (Fig. 5); a mais importante é a oxidação da PDI pela oxidase do RE 1 (Ero1), que gera H_2O_2 como subproduto que pode contribuir para o ambiente mais oxidante deste compartimento celular. Mas Ero1 não é um gene essencial, já que o duplo nocaute para ambas as isoformas de Ero1 (Ero1 α e Ero1 β) é viável (Zito e col., 2010), então outras vias são propostas, como a oxidação da PDI diretamente pela glutathiona oxidada ou pelo oxidante H_2O_2 , bem como pela glutathiona peroxidase isoformas 7/8 (Appenzeller-Herzog, 2011; Karala e col., 2009; Nguyen et al., 2011). Outra via recentemente proposta envolve a peroxirredoxina 4 (PrxIV) que, ao contrário da Ero1, consome H_2O_2 para oxidar a PDI. Interessante, a família das peroxirredoxinas, além de consumirem H_2O_2 apresentam também, em determinadas circunstâncias, atividade chaperona (Kumsta e Jakob, 2009).

Figura 5. Possíveis vias de regeneração da PDI durante o enovelamento de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático. PrxIV= peroxirredoxina 4; Ero1= oxidase do retículo endoplasmático 1; GSSG= glutathiona oxidada; GSH= glutathiona reduzida; GPx= glutathiona peroxidase; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio (adaptado de Laurindo e col., 2012).

Devido ao seu papel no RE, a PDI também tem sido proposta como protetora no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose lateral amiotrófica (ALS). A função de chaperona redox da PDI no RE estaria diminuída nestas doenças pela nitrosonação dos tióis redox da PDI, com consequente aumento do acúmulo de proteínas mal enoveladas e maior ativação das vias de estresse do RE (Uehara e col.; 2009; Jeon e col.; 2014). No caso da ALS, a menor atividade da PDI aumentaria a agregação da superóxido dismutase 1 mutada; 5-10% dos casos de ALS familiar são associados à mutações na SOD1 (Jeon e col.; 2014).

Paralelamente à sua função primordial de chaperona redox no RE, a PDI também apresenta importantes funções em outros compartimentos celulares. Na membrana plasmática, por exemplo, a PDI também exerce modulação redox de proteínas de superfície (Jiang e col., 1999), como é o caso de integrinas. No caso da invasão de vírus HIV, a PDI aumenta a atividade funcional da galectina-9 (uma lectina secretada envolvida na adesão celular) promovendo maior infecção de células T expostas ao vírus (Bi e col., 2011). Além disso, a expressão da PDI na superfície celular está envolvida no controle redox da ativação do fator tecidual da coagulação em células musculares lisas e endoteliais (Lahav e col., 2009), constituindo-se, desta forma, em uma via redox desencadeante de trombogenicidade vascular (Manukyan e col., 2008). Recentemente, usando camundongos nocautes para PDI especificamente em plaquetas, observou-se que a PDI é necessária para a formação do trombo, mas não altera o tempo de sangramento (Kim e col., 2013). Estes dados tem instigado diversos grupos de pesquisa a buscar inibidores específicos para a PDI, especialmente para a PDI de superfície.

De fato, algumas pequenas moléculas foram descritas como capazes de inibir PDI em algumas condições experimentais particulares, como os derivados de plantas que inibiram a PDI *in vitro* de forma reversível: juniferdina (Khan e col., 2011) e quercetina- 3-rutinosídeo (Jasuja e col., 2012). Também foram descritos os compostos sintéticos que inibem a PDI de forma irreversível *in vitro*: 16F16 (encontrado por *high-through-put-screening* de compostos que suprimiam apoptose em células em cultura; Hoffstrom e col., 2010); RB-11-ca (identificado por *click-chemistry*; Banerjee e col., 2013); e PCMA31 (que foi citotóxico em ensaios com células de câncer de ovário; Xu e col., 2012).

1.3 Dissulfeto Isomerase Proteica na regulação de processos redox

A PDI também foi descrita como uma proteína reguladora e talvez adaptadora da ativação do complexo NADPH oxidase em células musculares lisas vasculares (Janiszewski e

col., 2005; Laurindo e col., 2012), bem como macrófagos (Santos e col., 2009), células endoteliais e neutrófilos (Laurindo e col., 2008); portanto, com implicações na regulação de oxidantes para fins de sinalização redox intracelular.

O complexo NADPH oxidase é a única fonte especificamente dedicada à produção de ROS (ânion superóxido e H_2O_2) e tem capacidade de sinalização fina e regulada de processos localizados em compartimentos específicos, p.ex., polos de migração celular (Ushio-Fukai 2006), em oposição a outras fontes enzimáticas conhecidas de oxidantes (enzimas mitocondriais, complexo NADPH oxidase, NO sintases desacopladas, xantina oxidase, citocromo P450 e ciclooxigenases, etc.; (Halliwell e Gutteridge, 2007). A regulação da atividade e expressão deste complexo é um tema importante da fisiopatologia de processos redox e está envolvida em várias doenças vasculares (Lassegue e col., 2012). O complexo NADPH oxidase tem uma estrutura modular com múltiplas subunidades, das quais uma delas é uma subunidade catalítica (Nox) com sítios de ligação a flavinas e heme, e várias outras são subunidades regulatórias canônicas cuja combinação varia de acordo com a isoforma de Nox (Lassegue e col., 2012).

Experimentos de perda de função da PDI com antagonistas farmacológicos, mas especialmente com o anticorpo neutralizante RL90, oligonucleotídeos antisense e RNA de interferência, evidenciaram de modo consistente que a PDI exerce modulação funcional da oxidase, e particularmente de sua ativação por angiotensina II, que é o agonista clássico da isoforma Nox1 em VSMC (Janiszewski e col., 2005; Fernandes e col., 2009). Além disso, nossos dados indicam que a PDI co-localiza ou co-imunoprecipita pelo menos com as subunidades p22phox, Nox1, Nox2 and Nox4 da NADPH oxidase, indicando pelo menos algum grau de associação física com o complexo enzimático (Janiszewski e col., 2005; Laurindo e col., 2008). Durante a ativação da oxidase, a PDI transloca-se para compartimentos de membrana(s), onde parece sustentar a atividade do complexo NADPH oxidase por mecanismos ainda não conhecidos (Janiszewski e col., 2005; Fernandes e col., 2009). De fato, o ganho de função de PDI em células musculares lisas (por superexpressão plasmidial) tornou estas células irresponsivas ao estímulo com angiotensina II, possivelmente porque a indução da expressão/atividade da isoforma Nox1 observada após a superexpressão da PDI deve ter alcançado a máxima resposta celular (Fernandes e col., 2009). Como consequência funcional, a perda de função da PDI (por silenciamento com siRNA) diminuiu a migração induzida por PDGF nestas células, processo celular que envolve a ativação da Nox1 (Pescatore e col., 2012). A PDI pode estar envolvida na ativação de GTPase nas células vasculares, já que observou-se menor quantidade de RhoA e Rac1 ativas (ligadas à GTP) com o silenciamento da PDI durante o estímulo com PDGF. Ainda, observou-se que a perda de função da PDI altera o citosqueleto

das células musculares lisas, com menor formação de actina filamentosa e adesões focais (Pescatore e col., 2012). De fato, Sobierajska e colaboradores (2014) mostraram recentemente que a PDI interage fisicamente em megacariócitos com a β -actina (via cisteína 374 da β -actina) durante a adesão destas células em matriz de fibronectina. Assim, estes novos dados sugerem que a PDI tem papel importante na reorganização do citoesqueleto celular, com implicações em processos celulares com migração e adesão.

O conhecimento acumulado tanto de estrutura (parte 1 desta Introdução) quanto de função (partes 2 e 3 desta Introdução) baseiam-se nas mais diversificadas estratégias experimentais, e incluem medidas das atividades da PDI *in vitro*. Nestes ensaios reducionistas, geralmente as atividades são medidas com PDI purificada, domínios isolados ou quimeras de diferentes domínios da PDI. Dos diversos ensaios para medir a atividade da PDI alguns são mais específicos para uma atividade da PDI em particular (como a redução de dissulfetos), enquanto outros permitem a medida da atividade isomerase, que é a atividade autêntica da família das PDIs. Geralmente a atividade da PDI é medida experimentalmente para 3 fins distintos: i) estudo do enovelamento de proteínas pela PDI, com a identificação dos intermediários formados por espectroscopia de massas, o que requer uma análise mais elaborada e métodos mais sofisticados e custosos em tempo; ii) triagem de substratos ou inibidores da PDI, que exige testes rápidos e de baixo custo para serem preferencialmente adotados para plataformas de *high-through-put-screening* (HTPS); e iii) estudos de função da PDI em contextos fisio(pato)lógicos por comparação da atividade da PDI em diferentes condições experimentais em amostras biológicas. Enquanto existem proteínas que podem ser utilizadas tanto como substratos para estudos de enovelamento oxidativo mediado pela PDI *in vitro* (como o inibidor de tripsina pancreática bovina, BPTI e a ribonuclease T1, RNase T1) como substratos para automação em HTPS como a insulina. No entanto, ensaios da medida da atividade da PDI em amostras biológicas são um desafio considerável. Alguns substratos normalmente utilizados para ensaios de PDI purificada (insulina ou GSSG fluorescente) já foram utilizados em homogenatos celulares, mas a interpretação ainda é difícil devido a interferentes intrínsecos, como outros sistemas redutores presentes na amostra. Desta forma objetivou-se nesta dissertação revisar e discutir criticamente os diferentes métodos reportados para medir as atividades da PDI *in vitro* (redutase, enovelamento oxidativo, isomerase e chaperona), com ênfase no significado da medida de atividade da PDI em amostras biológicas. Ainda, aproveitando nossa experiência prévia com o ensaio redutase da PDI que utiliza insulina como substrato, buscamos otimizar as condições deste ensaio em amostras biológicas, isto é, em homogenatos de células vasculares.

2. OBJETIVOS

O **objetivo geral** deste trabalho é revisar e discutir criticamente os diferentes métodos reportados para medir as atividades da PDI *in vitro*: redutase, enovelamento oxidativo, isomerase e chaperona, com ênfase da PDI em amostras biológicas.

Como **objetivos específicos**:

- analisar se detergentes de classificações físico-químicas distintas poderiam ser potenciais interferentes na atividade redutase da PDI *in vitro*;
- otimizar condições experimentais para medir a atividade redutase da PDI em homogenatos de células vasculares.

3. MEDIDAS DAS ATIVIDADES DA DISSULFETO ISOMERASE PROTEÍCA

As atividades da PDI foram recentemente classificadas por Hatahet e Ruddock (2009) em três categorias: i) ensaios que se baseiam na medida de ganho de atividade do substrato, ii) ensaios que caracterizam alterações biofísicas no substrato e iii) ensaios baseados na imobilização das reações de trocas de dissulfetos (pelo uso de reagentes alquilantes de tióis) com subsequente caracterização do estado redox do substrato. Entretanto, como na literatura os métodos tem sido sistematicamente classificados quanto às atividades possíveis de se medir da PDI *in vitro* (redutase, oxidase, chaperona e isomerase), manteremos no decorrer desta revisão esta classificação mais tradicional. Para tal, é essencial observar o estado redox do material de partida, ou seja, do substrato escolhido para ser usado no ensaio da atividade da PDI.

Portanto, considerando o estado redox inicial do substrato, tem-se como medida da atividade **isomerase** da PDI ensaios em que a PDI catalisará a conversão de um substrato inicialmente contendo ligações dissulfeto em posições incorretas (*scrambled*) e desta forma, mal enovelado, para seu estado nativo com recuperação de sua atividade. O substrato mais comum usado em ensaios de atividade isomerase da PDI é a *scrambled* RNase, em que o ganho de atividade da RNase é medido pela hidrólise de RNA. Já quando o substrato utilizado no ensaio está totalmente reduzido, a PDI promoverá *in vitro* a reoxidação dos tióis (formando ligações dissulfeto) e concomitantemente, a isomerização das pontes dissulfeto que eventualmente foram formadas em posições incorretas. O mecanismo pelo qual a PDI isomeriza dissulfetos ainda não está esclarecido; são propostos ciclos subsequentes de oxidação e redução ou isomerização direta (sem haver liberação do substrato pela PDI durante o ciclo catalítico) (Fig. 6). Desta forma, considerando que o substrato inicial está totalmente reduzido e será necessariamente oxidado para recuperar sua atividade, estes ensaios são classificados como **enovelamento oxidativo**. A própria RNase é também utilizada como substrato nestes ensaios; neste caso, ela está reduzida ao invés de ter ligações dissulfeto em posições incorretas.

Ensaio de atividade **oxidase** da PDI são mais escassos na literatura, e baseiam-se em peptídeos reduzidos que são oxidados pela PDI (e muitas vezes são também utilizados para medir a atividade inversa, redutase).

Os ensaios de **redução** de ligações dissulfeto pela PDI são, sem dúvida, os mais populares na literatura por serem de fácil execução e baixo custo. Geralmente observa-se nestes ensaios mudanças biofísicas no substrato, como aumento de turbidez ou alterações na fluorescência. O substrato mais comum é a insulina, que contém 3 pontes dissulfetos estruturais, e com a redução das mesmas torna-se insolúvel em ambiente aquosos por tornar acessível

regiões hidrofóbicas (Fig. 7). Desta forma observa-se aumento da turbidez na presença de agentes redutores, mas quando PDI é adicionada, a turbidez ocorre mais rápido. Note, no entanto, que as alterações físico-químicas podem não refletir ganho de atividade do substrato, ao contrário dos ensaios isomerase e enovelamento oxidativo discutidos anteriormente.

Figura 6: Isomerização de ligações dissulfeto em substratos catalisada pela PDI (Hatahet e Ruddock 2009).

Figura 7: Redução da insulina mediada pela PDI. À direita: Estrutura tridimensional da insulina de larva, com as 3 ligações dissulfeto mostradas na imagem (Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Insulin_worm_bw.jpg). À esquerda: redução das ligações dissulfeto catalisada pela PDI, em que observa-se a precipitação da cadeia B da insulina a 600 nm.

Finalmente, quando o substrato inicial é uma proteína que não contém pontes dissulfeto e está desenovalado, pode-se medir o ganho de atividade do substrato pelo enovelamento mediado pela PDI, que é a atividade *chaperona*. Uma forma mais simples de executar é medir alterações biofísicas do substrato durante o ensaio chaperona, em que geralmente o substrato desenovalado está agregado (pouco solúvel em soluções aquosas), portanto a turbidez inicial do substrato é diminuída na presença da PDI. Novamente vale ressaltar que nem sempre as alterações biofísicas refletem ganho de atividade.

Ao medir um ensaio de atividade de PDI é importante ter em mente que a PDI não tem um grupo preferencial de substratos, ao contrário da Erp57 que preferencialmente enovela proteínas glicosiladas (Jessop e col., 2007), e que os substratos utilizados nestes ensaios não foram até o momento descritos como substratos fisiológicos PDI. Além disso, sendo a concentração de PDI no lúmen do RE estimada em 0,2-0,5 mM (Lyles e Gilbert, 1991), a PDI está em excesso em relação aos substratos, uma situação que não é geralmente reproduzida nos ensaios de atividade da PDI (geralmente o substrato está em excesso em relação à PDI). Ainda, características essenciais para atividade catalítica *in vivo* não são consideradas nestes ensaios, como a compartimentalização celular da PDI, a aglomeração molecular dentro das células que afeta o enovelamento de proteínas (van der Berg e col., 1999), e a reciclagem oxidativa da PDI após enovelar substratos no lúmen do RE, promovida por exemplo, pela oxidase do retículo endoplasmático 1- Ero1 (Rancy & Thorpe, 2008) ou pela peroxirredoxina 4 oxidada - Prdx4 (Zito e col., 2010). Outra questão importante é que, embora *in vitro* seja possível medir separadamente as atividades chaperona e isomerase da PDI, *in vivo* o enovelamento oxidativo da PDI não deve discriminar entre as duas atividades; ao contrário, possivelmente ocorre um sinergismo entre as atividades isomerase e chaperona (Laurindo e col., 2012). Assim, os resultados obtidos a partir de ensaios *in vitro* também devem ser interpretados levando-se em conta as suas limitações em decorrência do desenho experimental reducionista. Uma maneira de minimizar tais limitações é combinar os resultados dos ensaios de atividade da PDI com dados experimentais *in vivo*, contextualizando-os no meio fisiológico específico que está sendo investigado.

A seguir serão abordados mais especificamente os ensaios de atividade da PDI: isomerase, enovelamento oxidativo, redutase, oxidase e chaperona.

3.1 Ensaio para medir atividade isomerase da PDI

Conforme discutido acima, ensaios para medir a atividade isomerase da PDI são baseados no ganho de função de um substrato que contém as ligações dissulfetos inseridas em

posições incorretas (*scrambled*), de modo que está inativo. Na presença da PDI, as ligações dissulfetos são reordenadas nas posições corretas, que permite medir a atividade recuperada do substrato. Duas enzimas são mais comumente empregadas: *scrambled* RNase (scRNase, 4 ligações dissulfeto) e proteína de ligação de riboflavina (RfBP; 9 ligações dissulfeto).

Figura 8: Esquema de uso da RNase para medidas de atividades da PDI. A RNase pode ser utilizada com substrato inicial para a PDI com seus tióis totalmente reduzidos ou com as ligações dissulfeto em posições incorretas (*scrambled*), para respectivamente ensaios de enovelamento oxidativo ou isomerização. O ganho de atividade da RNase é medido posteriormente pela hidrólise de seus substratos, RNA ou CMP cíclico.

Para a RNase (que é reduzida primeiramente em condições desnaturantes e depois é mantida em temperatura ambiente para ser oxidada pelo oxigênio molecular dissolvido na solução, que gera ligações dissulfeto ao acaso; Fig. 8), alíquotas são removidas durante a incubação com PDI para medir a recuperação da atividade da RNase. É possível medir a hidrólise de dois substratos diferentes: RNA de alto peso molecular (que absorve a 240 nm) (Hillson e col., 1984) ou citidina monofosfato cíclica (cCMP, que absorve a 296nm; Lyles e Gilbert, 1991). O segundo fornece maiores aumentos na absorção, mas requer correção devido à depleção de cCMP ao longo do tempo e à inibição da RNase medida pelo cCMP (Lyles e Gilbert, 1991). O tampão usado no ensaio contém geralmente o par redox GSH/GSSG para assegurar a catálise da PDI. Uma desvantagem deste método é que o ideal é obter todos os resultados experimentais a partir do mesmo lote scRNase pois, devido à heterogeneidade entre as preparações de scRNase, é difícil ter resultados reproduzíveis, independentemente se a

scRNase foi preparada no laboratório ou obtida comercialmente (Hatahet e Ruddock, 2009). Este método tem sido amplamente empregado para estudos mecanísticos da PDI. Ele também pode ser aplicado em algumas preparações celulares, tais como fração enriquecida em membranas de células vasculares (Janiszewski e col., 2005), que não contêm os sistemas de redução da tioredoxina ou glutaredoxina (pois são citossólicos), mas reflete apenas a atividade da PDI em membranas celulares.

O ensaio com RfBP baseia-se na extinção da fluorescência da riboflavina livre, devido à sua ligação à apoRfBP (a apo RfBP é obtida pela redução da RfBP em condições desnaturante para liberar a riboflavina, seguida de oxidação com ferricianeto) (Rancy e Thorpe, 2008). ApoRfBP é misturada com riboflavina na presença de PDI, e a fluorescência da riboflavina é medida diretamente. É um ensaio ainda pouco utilizado mas potencialmente promissor, pois é mais simples de executar que o ensaio com scRNase e mais sensível por detectar fluorescência ao invés de absorbância. Outra vantagem é que a PDI é mantida em excesso em relação ao substrato (30 vezes), mimetizando de forma mais fidedigna as proporções PDI:substrato no lúmen do RE. Mas não se trata de uma medida de ganho de função do substrato, valendo a crítica da eventual não relação alteração biofísica/atividade (Hatahet e Ruddock, 2009). Este ensaio ainda não foi testado em amostras biológicas, somente com PDI purificada, então experimentos controles devem ser desenvolvidos a fim de confirmar se, por exemplo, flavoenzimas endógenas em células podem interferir na análise.

3.2 Ensaio para medir enovelamento oxidativo da PDI

Várias proteínas totalmente reduzidas podem ser usadas como substrato para PDI em ensaios de enovelamento oxidativo, mas apenas a RNase e o BPTI (3 ligações dissulfeto) são considerados modelos de estudos do processo de enovelamento oxidativo. Para ambas as enzimas, os intermediários formados durante o enovelamento oxidativo mediado pela PDI são conhecidos, com base na caracterização dos mesmos por espectroscopia de massas, após a alquilação dos tióis (Irvine e col., 2014). Embora demorada, esta estratégia experimental é a melhor para estimar as constantes das etapas limitantes do processo de enovelamento (Hatahet e Ruddock, 2009). Outros substratos para PDI, que também têm os intermediários formados identificados durante o processo de enovelamento são lisozima (4 ligações dissulfeto) (van den Berg e col., 1999) e as RNases modificadas, RNaseT1 (2 ligações dissulfeto; Fig. 9) e RNaseT1 glutationilada (RNaseT1-GS) (Ruoppolo e Freedman, 1995; Ruoppolo e col., 1996). A RNaseT1 reduzida se comporta no ensaio de forma similar à RNase reduzida, enquanto que a RNaseT1-GS tem que ser deglutationilada em um primeiro passo, que também pode ser mediada pela PDI (Reinhardt e col., 2008; Townsend e col., 2009). A transposição destes

ensaios de enovelamento oxidativo feitos *in vitro*, com PDI purificada, para amostras biológicas conta com as mesmas dificuldades que os de atividade isomerase discutido anteriormente.

Figura 9: Comparação das estruturas da RNase bovina e RNase T1. A RNase apresenta 124 aminoácidos e 4 ligações dissulfetos (Cys26-Cys84, Cys58-110, Cys40-95 and Cys65-72; em amarelo na imagem acima, http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ribonuclease_A_7rsa.png) enquanto que a RNase T1 contém 104 resíduos e 2 ligações dissulfeto (Cys2-Cys10 and Cys6-Cys103, Ruoppolo e Freedman, 1995).

3.3 Ensaios para medir atividade redutase da PDI

Nos ensaios de atividade redutase da PDI, a PDI catalisa a redução de ligações dissulfeto dos substratos inicialmente oxidados, levando à alterações em suas características físico-químicas. O substrato mais popular devido à facilidade de execução do métodos, baixo tempo de ensaio e custo, é a insulina. A redução da insulina promove a agregação da cadeia B da insulina (Fig 7), que causa um aumento da turbidez na solução. Melhores curvas de agregação são obtidas se somente a cadeia B da insulina for utilizada como substrato, pois a interferência da cadeia A da insulina é removida (Karala e Ruddock , 2010). Neste ensaio a PDI é adicionada à uma solução de insulina límpida, preparada na presença de um agente redutor (ditiotreitól ou GSH) (Holmgren e col., 1979). A cinética da redução da insulina gera dois parâmetros: o tempo de latência (*lag time*, o tempo para o início da precipitação, o que pode ser definido como um aumento na absorbância de 0,02 ao longo da linha de base) e a taxa de precipitação (o aumento máximo de absorbância por minuto, $\Delta\text{absorbância} \times \text{min}^{-1}$). Ambos parâmetros são usados para análise relativa da adição de interferentes durante a catálise mediada pela PDI. Este ensaio é o método eleito para a triagem de inibidores PDI em diferentes abordagens experimentais (Jasuja e col., 2012; Khan e col. , 2011; Paes e col., 2011) e pode ser

otimizado para HTPS (Smith e col., 2004) ou derivatizado com fluoróforo como encontrado em kits comerciais (*ProteoStat™ PDI Assay Kit* da empresa Enzo Life Sciences e *PDI Inibidor Kit Screening Assay* da empresa Abcam). O ensaio da redução da insulina já foi utilizado em homogenatos celulares, e será discutido na seção 4 desta Dissertação. Para aumentar a sensibilidade deste ensaio, insulina fluorescente (FITC-insulina) pode ser utilizada a fim de obter parâmetros mais quantitativos. Outra possibilidade para obter parâmetros mais quantitativos é acoplar a redução da insulina ao consumo de NADPH através da glutathiona redutase ou tiorredoxina redutase (Figura 10). Neste caso, uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de PDI que catalisa a formação de GSSG por minuto, e parâmetros cinéticos como velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (K_{obs}), e constante de inibição (K_i) podem ser calculados. No entanto, as condições de reação tem que ser otimizadas de forma que a agregação de insulina não interfira com a absorbância de NADPH (Morjana e Gilbert, 1991).

Figura 10: Acoplamento da redução da insulina com o consumo NADPH. GR= glutathiona redutase; Trx= tiorredoxina; TR= tiorredoxina redutase.

Outro composto utilizado no ensaio de redução de PDI é GSSG, apesar de GSSG não ser um bom substrato da PDI (Hatahet e Ruddock, 2009). Neste caso utiliza-se GSSG fluorescente, através da ligação covalente com eosina (Di-E-GSSG), que proporciona boa sensibilidade para o ensaio, da ordem de nanomolar de PDI (Raturi e Mutus, 2007). A Di-E-GSSG não é fluorescente *per se*, devido ao efeito de *quenching* da fluorescência pela proximidade das duas eosinas quando a glutathiona está oxidada, mas após a redução da

glutathiona, ocorre um aumento de cerca de 70 vezes na fluorescência. Este método tem sido utilizado em amostras biológicas, tais como em homogenatos de células endoteliais da microvasculatura (HMEC-1) (Muller e col., 2013) e em amostras de plasma (Prado e col.; 2013). Outro método também já utilizado em células, neste caso, células intactas (mielóides e eritrócitos) é a medida radioativa da I¹²⁵-tiramina-SH liberada após clivagem do substrato I¹²⁵ - tiramina-SS-poli-(D-lisina) ligada à superfície aniônica das células (Gallina e col., 2002). Este ensaio permite medir a atividade redutase especificamente da PDI de superfície, mas pode ser superestimada pela possível presença de proteases encontradas na membrana capazes de clivar também o peptídeo radioativo (Xu e col., 2013).

3.4 Ensaio que utilizam peptídeos como substrato para medir atividades da PDI (redutase/oxidase/isomerase)

Alguns peptídeos que foram desenvolvidos para medir as atividades PDI *in vitro* podem apresentar resultados promissores se testados em amostras biológicas, utilizando-se os controles apropriados. Logicamente, em homogenatos celulares não é possível utilizar peptídeos cuja medida é a fluorescência intrínseca do triptofano, devido à interferência de qualquer proteína do homogenato que contenha triptofano. Mas peptídeos ligados a grupos fluorescentes permitem alta sensibilidade e medição direta de fluorescência nas amostras. Um exemplo é o peptídeo baseado na taquiplesina I (TI), um peptídeo antimicrobiano de 17 resíduos que atravessa membranas, e foi utilizado para medir a atividade isomerase da PDI purificada (Kersteen e col., 2005). A PDI catalisa a isomerização do peptídeo TI com ligações dissulfeto em posições incorretas (*scrambled* TI, 4 cisteínas) para sua conformação "nativa" (mais estável); nesta conformação o triptofano 2 interage fisicamente por proximidade com a lisina 17 que está ligada ao grupo dansila, e assim ocorre a transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) (Fig. 11). Outro peptídeo que pode ser utilizado para ensaios de redução ou oxidação da PDI, dependendo de seu estado redox inicial, contém duas cisteínas separadas por um espaçador nonaetilenoglicol (Christiansen e col., 2004; Fig.11). Quando reduzido, este peptídeo apresenta fluorescência graças ao grupo orto-aminobenzoil na porção N -terminal; uma vez oxidado, a fluorescência do grupo orto-aminobenzoil é extinta pela proximidade com a nitrotirosina na região C-terminal do peptídeo. O peptídeo controle usado nestes experimentos é o peptídeo mutado nas cisteínas (substituição por serina). O uso destes peptídeos apresenta vantagens pela homogeneidade no material de partida (ao contrário das proteínas *scrambled*, como discutido anteriormente) e pela medição direta da fluorescência nas amostras; uma desvantagem é que eles não estão disponíveis comercialmente sendo, em geral, sintetizados por métodos de fase sólida no próprio laboratório.

Figura 11. Estruturas do peptídeo TI dansilado e dos peptídeos peguilados. (adaptado de Kersteen e col., 2005; e Christiansen e col., 2004)

3.5 Ensaios para medir atividade chaperona da PDI

Ensaios para a atividade chaperona da PDI se baseiam na catálise pela PDI do processo de enovelamento do substrato completamente desnaturado, que não tenha ligações dissulfeto estruturais. O primeiro método proposto para medir a atividade chaperona da PDI, com o intuito de distinguir esta atividade das atividades que envolvem oxidação/redução de dissulfetos pela PDI, utilizou D-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase como substrato (Cai e col., 1994). Outros substratos que também podem ser utilizados são: lactato desidrogenase, rodanase, citrato sintase, e álcool desidrogenase (Primm e col., 1996) (Taguchi e col., 1994). Resumidamente, a proteína desnaturada é diluída no tampão de enovelamento, na presença de excesso de PDI (de 5 a 10 vezes), e as alterações na agregação são acompanhados por dispersão de luz ou turbidez. Como discutido acima, uma vez que mudanças na agregação pode não se correlacionar com o ganho de atividade do substrato, muitos autores também medem a reativação do substrato, o que exige a dissociação prévia do complexo PDI:substrato e a otimização das condições experimentais do ensaio de atividade do substrato. Um ensaio recentemente descrito usa a proteína fluorescente verde (GFP) como substrato da PDI, e desta forma, apresenta boa sensibilidade no método (Mares e col., 2011). No entanto, é importante notar que a oxidação dos sítios redox da PDI alteram sua conformação e interferem em sua atividade chaperona (Wang e col., 2012).

4. INTERFERENTES NA ATIVIDADE REDUTASE DA PDI: INIBIDORES ESPÚRIOS E SURFACTANTES

4.1 Resultados

Com objetivo de otimizar as condições experimentais da atividade redutase da PDI em homogenatos celulares, escolhemos como método a redução das ligações dissulfeto da insulina, com detecção da turbidez a 540 nm, que já vinha sendo utilizado em nosso laboratório com PDI purificada (Paes e col., 2010). Apesar de este ensaio ser bastante utilizado em estudos estruturais da PDI (mutantes, quimeras, domínios isolados) ou na busca por inibidores da PDI (Jasuja e col., 2012; Xu e col., 2012), como discutido na seção anterior, poucos trabalhos utilizaram este ensaio em homogenatos celulares.

Figura 12: Atividade redutase da PDI utilizando-se como substrato a insulina. Efeito do aumento da concentração da PDI e inibição por Triton 0,5%. A partir da cinética de redução da insulina calcula-se o lag time para confecção do gráfico em barras; o lag time é o tempo necessário para a absorbância a 540 nm chegar a 0,05 unidades. Albumina (BSA, 1,5μM) foi utilizada como controle negativo.

Nossos primeiros ensaios foram com homogenatos de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), que não apresentaram nenhum aumento da turbidez ao longo de 1h, mesmo com a presença de inibidores de protease, fosfatase e do proteassoma, além de altas quantidades de proteína total adicionada (até 15µg). Como o tampão de lise celular apresenta em sua composição o detergente Triton X-100 (1%), que tem sido utilizado como inibidor da PDI neste ensaio por outros grupos (por ex., Karala e col., 2010), testamos a interferência deste detergente em nossas condições experimentais. De fato, a adição de Triton X-100 0,5% à PDI purificada inibiu a precipitação da insulina e portanto, aumentou o *lag time* em 3,5 vezes (tempo necessário para a absorbância a 540 nm chegar a 0,05) (Fig.12). Mesmo diminuindo a concentração de Triton X-100 100 vezes (para 0,01%), observamos inibição a atividade redutase da PDI *in vitro*.

Na tentativa de encontrar um detergente que pudesse ser adicionado ao tampão de lise e que não interferisse na atividade redutase da PDI, escolhemos detergentes de diferentes classes químicas (Tabela 1) e os testamos em concentrações equimolares em relação à PDI. Para isso adicionamos 1 molécula de detergente para 1 molécula de PDI (1:1), ou PDI em excesso de 10 vezes em relação ao detergente (1:10) ou detergente em excesso à PDI (10:1 e 100:1). Estas concentrações são muito menores das comumente utilizadas em tampões de lise em laboratório; conforme Tabela 2, podemos ver que a concentração de 1% corresponde à concentração equimolar (1:1; 1,5µM) utilizada no ensaio da atividade redutase da PDI. Em comparação à PDI controle (sem adição de detergentes; barra preta, Fig.13) todos os detergentes aumentaram a atividade redutase quando em menor concentração que a PDI. Possivelmente a presença de baixas concentrações de detergente promove um pequeno desenovelamento da PDI que permite maior acesso do substrato ao sítio hidrofóbico b' da PDI. Em contrapartida, todos os detergentes, quando em excesso em relação à PDI, diminuíram a atividade redutase da PDI (e portanto, aumentaram o *lag time*). Enquanto os detergentes Triton X-100, NP-40 e SDS apresentaram um comportamento de nenhuma inibição ou completa inibição (“tudo ou nada”), os detergentes CHAPS e DOC exibiram uma inibição dose-dependente.

Estas diferenças na inibição da atividade redutase parecem estar associadas às diferenças estruturais destes detergentes; Triton X-100, NP-40 e SDS apresentam cadeias longas de carbonos ou éter enquanto CHAPS e DOC contêm o ciclopentanoperidrofantreno. Estudos estruturais mais específicos, como dicroísmo circular e SAXS permitiriam o entendimento das alterações sofridas pela PDI na presença destas baixas concentrações de detergentes.

Considerando que a estrutura do ciclopentanoperidrofantreno que CHAPS e DOC contém é a mesma que encontramos no estrógeno, que é um ligante conhecido da PDI (Tsibris,

1989) e o estrógeno é o precursor do colesterol, que mantém em sua estrutura este ciclopentanoperidrofantreno, testamos se o colesterol poderia alterar a atividade redutase da PDI *in vitro*. Devido à sua baixa solubilidade em soluções aquosas, conseguimos alcançar excesso de 6 vezes em relação à PDI, mas que não mostrou alteração na atividade redutase (Fig.14).

Em resumo, a presença de detergentes em tampão de lise, mesmo em concentrações extremamente baixas, inibe a PDI e não permite a medida da atividade redutase nestas amostras.

Tabela 1: Características dos diferentes detergentes utilizados neste trabalho.

Detergente	Estrutura	Características
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1- propanesulfonate)		zwiteriônico
Deoxicol.ato de sódio (DOC)		aniônico
Saponina		
Dodecil sulfato de sódio (SDS)		aniônico
Nonidet-P40 (octilfenoxipolietóxiletanol)		não iônico
Triton X-100 (polietileno glicol. p-(1,1,3,3- tetrametilbutil)-fenil éter)		não iônico

Figura 13: Lag time da atividade redutase da PDI medida na presença de diversos detergentes (conforme tabela 1). PDI (1.5 μ M) foi incubada com os respectivos detergentes por 10 minutos a 22°C em DTT/tampão fosfato, e a cinética foi acompanhada após a adição da insulina. (n $\geq$ 6, SD)

Tabela 2: Correlação entre solução em % e a concentração em molar de detergentes utilizados corriqueiramente em tampões de lise.

Detergente	0,01% corresponde a	0,5% corresponde a
CHAPS	160 μ M	8.0 mM
SDS	347 μ M	17 mM
NP-40	162 μ M	8.1 mM
Triton X-100	155 μ M	7.8 mM
DOC	241 μ M	12 mM
Saponin	241 μ M	12 mM

Figura 14: Atividade redutase da PDI em presença de colesterol. Colesterol, apesar de apresentar o ciclopentanoperidrofentreno similar ao dos detergentes CHAPS e DOC, não inibiu a atividade redutase da PDI *in vitro*.

Como todos os detergentes testados, em concentrações maiores que a concentração de PDI, inibiram a atividade redutase da PDI *in vitro*, os homogenatos celulares para medir a atividade redutase da PDI foram obtidos por lise mecânica (sonicação) em tampão sem a presença de detergentes. Vale ressaltar que adicionamos ao tampão os inibidores de protease, de fosfatase e do proteassomo, além de quelantes de metais de transição (EDTA) e de cálcio (EGTA).

Mesmo na ausência de detergente não foi possível observar aumento da turbidez no ensaio da atividade redutase em homogenatos de células endoteliais ou em fração enriquecida de membranas (“fração 100.000 g”), utilizando-se até 300 µg de proteína total. Para melhorar a sensibilidade do método, adicionamos PDI purificada (exógena; 1,5µM) ao homogenato, o que permitiu que acompanhássemos a cinética redução da insulina (Fig. 15A). Curiosamente, o homogenato celular inibe a atividade redutase da PDI exógena e possivelmente inibidor(s) endógeno(s) tornam difícil a medida da atividade da PDI endógena. A medida da turbidez a insulina em homogenatos que continham apenas proteínas maiores que 5 kDa (após separação com filtro de corte de 5 kDa) não se alterou vs. homogenato total, sugerindo que esta inibição ocorre por biomoléculas maiores que 5 kDa.

Figura 15: Ensaio de redução da insulina em homogenatos de células vasculares. Lag time da atividade redutase da PDI medida na presença de várias quantidades de PDI em 150ug de lisado total de RAECs para. PDI (1.5 μ M) foi incubada com os extratos por 10 minutos a 22°C em DTT/tampão fosfato, e a cinética foi acompanhada após a adição da insulina. (n $\geq$ 6, SD)

Desta forma, para nos certificarmos que estávamos medindo a redução da insulina catalisada pela PDI endógena, utilizamos homogenatos de células musculares lisas que superexpressavam ou foram silenciadas para PDI conforme protocolos de transfecção previamente otimizados no laboratório. VSMC foram lisadas após 24h da transfecção com plasmídeo codificante da PDI selvagem (aumento de cerca 2,5 vezes de expressão da PDI) ou após 72h da transfecção com siRNA contra PDI (silenciamento de cerca 70%). Como já observado anteriormente, ocorreu uma redução da turbidez da insulina nos homogenatos

controles vs. PDI purificada (~55%, mock vs. PDI, Fig. 15B). Apesar do silenciamento da PDI não alterar a medida da turbidez da insulina, a superexpressão da PDI acelerou a redução da insulina em 33%. O tratamento com tunicamicina, um estressor do retículo endoplasmático, que aumenta levemente a expressão da PDI (Santos e col., 2009) não alterou a redução da insulina vs. homogenatos controles.

4.2 Discussão

Todos os ensaios descritos para medir as atividades da PDI, podem, em tese, ser aplicados em amostras biológicas que contêm grandes quantidades de PDI (da ordem de mM). Com a combinação de inibidores específicos contra a PDI, poder-se-ia garantir que a atividade medida nas amostras biológicas é, de fato, devido à PDI e não a outras redutases ou sistemas de redução. No entanto, na prática, não é tão simples assim. Até o presente momento apenas ensaios redutase foram transpostos para amostras celulares. O ensaio menos propenso a interferentes endógenos é a medida da atividade redutase da PDI encontrada na superfície celular, especialmente se combinada com o controle com o anticorpo neutralizante contra a PDI RL90 (Langer e col., 2013; Raturi e Mutus, 2007). Em homogenatos celulares, o ensaio da atividade redutase da PDI sofrerá interferência de outros sistemas redutase como tioredoxina ou glutarredoxina. De fato, o método da redução de Di-E-GSSG foi recentemente utilizado para medir a atividade redutase da tioredoxina em soro, plasma e lisado de linfócitos humanos K562 (Montano e col., 2014). Além disso, as amostras biológicas podem ter inibidores endógenos da PDI ainda desconhecidos, como sugerido pelos nossos resultados, que mostraram maior *lag time* na redução da insulina, quando a PDI exógena é adicionada ao homogenato celular, comparado com o *lag time* da PDI exógena (Fig. 15). Estas observações reforçam a utilização de inibidores específicos contra a PDI e/ou o uso de estratégias de ganho/perda de função da PDI para obter resultados de ensaios de atividade da PDI *in vivo* mais confiáveis. Por exemplo, em células endoteliais (HMEC-1), a superexpressão da PDI selvagem aumentou em 2 vezes a atividade redutase da PDI, sem alterar a atividade quando a superexpressão da PDI mutada nos 4 tióis redox da PDI (Muller e col., 2013). O mesmo foi observado em homogenatos de linhagem de células de melanoma (Lovat e col., 2008). Nossos dados mostraram que em células vasculares a superexpressão da PDI diminuiu o *lag time* da cinética de redução da insulina, embora o silenciamento da PDI não (Fig. 15). Estes dados, tomados em conjunto, sugerem que em amostras complexas como são os homogenatos celulares, os resultados obtidos com os ensaios de atividade da PDI podem refletir principalmente os níveis de expressão da PDI ao invés de refletir a atividade isomerase 'real' da PDI isomerase dentro da célula.

Um outro ponto de caráter técnico mas bastante importante é o tampão utilizado para a lise celular ou de tecidos, que vão gerar os homogenatos para os ensaios de atividade da PDI. Em geral estes tampões contêm um ou mais surfactantes, que são usados para a ruptura das membranas celulares. Por exemplo, o tampão de lise RIPA contém em sua composição os surfactantes NP-40 (1 %), deoxicolato de sódio (0,5 %) e dodecil sulfato de sódio (0,1 %) (conforme Cold Spring Harbor Protocolos) o que dá, respectivamente, as concentrações finais de 16, 12 e 3,5mM). No entanto, Klappa e colaboradores (1998) demonstraram que Triton X-100 se liga ao domínio b' da PDI e inibe fortemente sua atividade redutase, tanto que Karala e Ruddock (2010) utilizaram Triton X-100 a 0,05 % (0,77mM) como controle negativo, para inibir a PDI purificada no ensaio de redução da cadeia B da insulina. De fato, nossos resultados indicam que surfactantes com propriedades físico-químicas distintas alteraram significativamente a atividade redutase da PDI *in vitro* (Fig. 13). A inibição ou mesmo um pequeno aumento de redução de insulina mediada pela PDI depende da proporção estequiométrica entre moléculas de PDI e detergente (Fig. 13). Assim, o cenário ideal é obter homogenatos por lise mecânica em tampões livre de detergente para ensaios de atividade da PDI.

4.3 Conclusões

A compreensão do papel da PDI como chaperona redox em situações fisiológicas ou fisiopatológicas associadas a doenças prescinde ensaios de atividade de PDI. Atualmente, um grande desafio é realmente medir a atividade isomerase PDI em células e tecidos, e não apenas uma etapa da inserção de ligações dissulfetos (como oxidação ou redução de tióis). Além disso, o ensaio deve ser realizado de preferência *in situ*, uma vez que a atividade da PDI pode mudar dependendo do compartimento celular ou do estado redox deste compartimento. Como ainda não existe um ensaio ideal para atividade isomerase da PDI para amostras de células e tecidos, atualmente a atividade redutase da PDI tem sido medida para a PDI encontrada na superfície celular em células intactas e para a PDI em homogenatos celulares, apesar de algumas dificuldades na interpretação de tais resultados. Melhorias na confiabilidade dos resultados obtidos nestes ensaios provavelmente serão alcançadas por aumento de sensibilidade e especificidade, mas também pela otimização de controles, (como os atuais anticorpo RL90 contra PDI ou futuros inibidores mais específicos para PDI) e pela otimização de protocolos de fracionamento celular para remoção de outros sistemas redutases. A otimização dos ensaios de atividade de PDI utilizando peptídeos fluorescentes parece ser uma abordagem promissora futura para amostras biológicas.

Nossos dados experimentais permitem concluir que:

- detergentes são potenciais interferentes para medida da atividade redutase da PDI e devem ser evitados no procedimento de obtenção de homogenatos biológicos;
- amostras biológicas podem ter inibidores endógenos da PDI ainda desconhecidos que interferem em medidas de atividade da PDI
- ensaios de atividade da PDI podem refletir principalmente os níveis de expressão da PDI ao invés de refletir a atividade isomerase 'real' da PDI isomerase dentro da célula

4.4 Materiais e Métodos

Reagentes foram adquiridos da Merck, Sigma ou Calbiochem e apresentavam grau analítico ou superior. As soluções foram preparadas em água MilliQ e tratadas com resina Chelex-100 para remoção de metais de transição contaminantes. A dosagem de proteína em homogenatos foi realizada com kit Protein Assay (BioRad) baseando-se em curva de calibração realizada com solução de albumina de concentração conhecida. As soluções detergentes e de colesterol foram preparadas a cada experimento, armazenadas em frasco âmbar e não foram utilizadas soluções estoque.

Purificação da PDI: O plasmídeo contendo a sequência da PDI (cedido pelo Dr. Bulent Mutus, da Universidade de Windsor, Canadá) foi superexpresso em bactérias *E. coli* competentes, após indução com IPTG. Após lise bacteriana, a purificação da PDI foi realizada por separação em coluna de cobalto (TALON, Clontech), com eluição com imidazol (100 mM), pois a proteína recombinante apresenta cauda His6. A PDI purificada (10 μ M) foi reduzida pela incubação com DTT (100 μ M) por 30 min a temperatura ambiente.

Atividade redutase da PDI: O homogenato total (150 μ g) das células endoteliais foi incubado em uma solução PBS com DTT (1,5 μ M), a temperatura ambiente por 5 min. Após incubação, foi adicionado insulina (1 mg/mL). O cálculo da atividade baseou-se na curva cinética, acompanhada em 540 nm, a cada 5 minutos, a 22°C em espectrofotômetro de placa.

Cultura celular: As linhagens imortalizadas de células musculares lisas de aorta de coelho e células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) foram mantidas em meio F12 suplementado com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100 μ M) e penicilina (100 U/mL). O homogenato total foi obtido pela lise mecânica das células em tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,4, aprotinina 10 μ g/mL, leupeptina 10 μ g/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM), seguido de sonicação (3 ciclos de 10seg, a 8W), e retirada de debris (1000g por 5 min). Fração de membrana foi preparada a partir do homogenato total: após centrifugação para retirada de núcleos e mitocôndrias (18.000g por 15 min a 4°C), o sobrenadante foi centrifugado a 100.000g por 1h (Laurindo e col., 2002). A fração de membrana foi ressuspensa em 100 μ L de tampão de lise e o sobrenadante foi denominado “fração solúvel”. A dosagem de proteína foi realizada com reagente Bradford (BioRad), comparando-se com solução padrão de albumina (1mg/mL).

Transfecção transitória: As RAEC foram crescidas a 1×10^6 células em placas de cultura de 10cm de diâmetro. Após 48h substituiu-se o meio de cultura por 10 mL de meio de transfecção (F12 contendo SFB 10%, 12 μ g de plasmídeo e 30 μ L de Lipofectamina®, Invitrogen). Após 8h, o meio de transfecção foi substituído pelo meio de cultura. Os plasmídeos da PDI- wt e PDI- mut (clonados em pCR3.1, Invitrogen) foram cedidos pelo Dr. Tomohiro Nakamura. Os plasmídeos foram superexpressos em *E. coli* DH5 α competentes e purificados com kit MaxiPrep (Qiagen). Para o silenciamento foram sintetizadas pela Invitrogen com as seguintes sequências: PDI siRNA1, 5' GACGACAUUGUGAACUGGCGUAAGA 3', 5' UCUUCAGCCAGUUCACAAUGU CGUC 3, PDI siRNA2, 5' GAGGUGGCCUUUGACGAGAAGAAGA 3', 5' UCUUCUUCUCG UCAAAGGCCACCUC 3'

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appenzeller-Herzog C. Glutathione-and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 124: 847 - 855, 2011.
- Banerjee R, Pace NJ, Brown DR, Weerapana E. 1,3,5-Triazine as a modular scaffold for covalent inhibitors with streamlined target identification. *J Am Chem Soc.* 135: 2497-500, 2013.
- Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 10650 -10655, 2011.
- Buonassisi V, Venter JC. Hormone and neurotransmitter receptors in a established endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 1612-1616, 1976.
- Cai H, Wang CC, Tsou CL. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem* 269: 24550 – 24552, 1994.
- Christiansen C, St Hilaire PM, Winther JR. Fluorometric polyethyleneglycol-peptide hybrid substrates for quantitative assay of protein disulfide isomerase. *Anal Biochem* 333: 148-55, 2004.
- 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.* 484:197-204, 2009.
- Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, Ryser HJ. Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem* 277: 50579-88, 2002.
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci* 8: 455-464, 2006.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Londres, Oxford University Press. 2007.
- Hatahet F, Ruddock LW. Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation. *Antioxid. Redox Signal.* 11:2807–2850, 2009.
- Hillson DA, Lambert N, Freedman RB. Formation and isomerization of disulfide bonds in proteins: protein disulfide-isomerase. *Methods Enzymol*, 107: 281-294, 1984.
- Hoffstrom BG, Kaplan A, Letso R, Schmid RS, Turmel GJ, Lo DC, Stockwell BR. Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol* 6: 900-6, 2010.
- Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 254: 9627 - 32, 1979.
- Irvine AG, Wallis AK, Sanghera N, Rowe ML, Ruddock LW, Howard MJ, Williamson RA, Blindauer CA, Freedman RB. Protein disulfide-isomerase interacts with a substrate protein at all stages along its folding pathway. *PLoS One* 9: e82511, 2014.
- Janiszewski M, Lopes L, Carmo A, Lima T, Pedro M, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase acts as a novel regulatory subunit of vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase. *J Biol Chem* 280:40813-40819, 2005.
- Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, Bowley SR, Joshi SS, Dilks JR, Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest* 122: 2104-13, 2012.

- Jeon GS, Nakamura T, Lee JS, Choi WJ, Ahn SW, Lee KW, Sung JJ, Lipton AS. Potential effect of S-nitrosylated protein disulfide isomerase on mutant SOD1 aggregation and neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 49: 796-807, 2014.
- Jessop CE, Chakravarthi S, Garbi N, Hämmerling GJ, Lovell S, Bulleid NJ. ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J* 26: 28-40, 2007.
- Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 274: 2416-2423, 1999.
- Karala AR, Lappi AK, Saaranen MJ, Ruddock LW. Efficient peroxide-mediated oxidative refolding of a protein at physiological pH and implications for oxidative folding in the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal* 5: 963-70, 2009.
- Karala AR, Ruddock LW. Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase. *FEBS J* 277: 2454-62, 2010.
- Kersteen EA, Barrows SR, Raines RT. Catalysis of protein disulfide bond isomerization in a homogeneous substrate. *Biochemistry* 44: 12168-78, 2005.
- Khan MM, Simizu S, Lai NS, Kawatani M, Shimizu T, Osada H. Discovery of a small molecule PDI inhibitor that inhibits reduction of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *ACS Chem Biol*. 6: 245-51, 2011.
- Kim K, Hahm E, Li J, Holbrook LM, Sasikumar P, Stanley RG, Ushio-Fukai M, Gibbins JM, Cho J. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood* 122:1052-61, 2013.
- Klappa P, Ruddock LW, Darby NJ, Freedman RB. The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *EMBO J*. 17: 927-35, 1998.
- Kumsta C, Jakob U. Redox-regulated chaperones. *Biochemistry* 48: 4666-76, 2009.
- Lahav J, Karniel E, Bagoly Z, Sheptovitsky V, Dardik R, Inbal A. Coagulation factor XIII serves as protein disulfide isomerase. *Thromb Haemost* 101: 840-4, 2009.
- Langer F, Spath B, Fischer C, Stolz M, Ayuk FA, Kröger N, Bokemeyer C, Ruf W. Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood* 121: 2324-35, 2013.
- Lappi AK, Lensink MF, Alanen HI, Salo KE, Lobell M, Juffer AH, Ruddock LW. A conserved arginine plays a role in the catalytic cycle of the protein disulfide isomerases. *J Mol Biol* 335: 283-295, 2004.
- Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 110:1364-90, 2012.
- Laurindo FR, de Souza HP, Pedro Mde A, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol*. 352: 432-54, 2002.
- Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Santo CX. Novel role of protein disulfide isomerase in the implication of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. *Antioxid Redox Signal* 10: 1101-1113, 2008.
- Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes DC. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med* 52: 1954-69, 2012.
- Lyles MM, Gilbert HF. Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry* 30:613-619; 1991.

- Lovat PE, Corazzari M, Armstrong JL, Martin S, Pagliarini V, Hill D, Brown AM, Piacentini M, Birch-Machin MA, Redfern CP. Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res* 68: 5363-9, 2008.
- Manukyan D, von Bruehl ML, Massberg S, Engelmann B. Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation. *Thromb Res* 122: S19-22, 2008.
- Mares RE, Meléndez-López SG, Ramos MA. Acid-Denatured Green Fluorescent Protein (GFP) as Model Substrate to Study the Chaperone Activity of Protein Disulfide Isomerase. *Int J Mol Sci* 12: 4625-36, 2011.
- Montano SJ, Lu J, Gustafsson TN, Holmgren A. Activity assays of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase: fluorescent disulfide substrates, mechanisms, and use with tissue samples. *Anal. Biochem* 449: 139-46, 2014.
- Morjana NA, Gilbert HF. Effect of protein and peptide inhibitors on the activity of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 30: 4985-90, 1991.
- Muller C, Bandemer J, Vindis C, Camaré C, Mucher E, Guéraud F, Larroque-Cardoso P, Bernis C, Auge N, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxid. Redox Signal* 18: 731-42, 2013.
- Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, Alanen HI, Salo KE, Wang CC, Ruddock L. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J Mol Biol* 406: 503-15, 2011.
- Paes AM, Veríssimo-Filho S, Guimarães LL, Silva AC, Takiuti JT, Santos CX, Janiszewski M, Laurindo FR, Lopes LR. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol* 90: 799-810, 2011.
- Pescatore L.A., Bonatto D., Forti F. L., Sadok A., Kovacic H., Laurindo FR. Protein Disulfide Isomerase Is Required for Platelet-derived Growth Factor-induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration, Nox1 NADPH Oxidase Expression, and RhoGTPase Activation. *J Biol Chem* 287: 29290-300, 2012.
- Prado GN, Romero JR, Rivera A. Endothelin-1 receptor antagonists regulate cell surface-associated protein disulfide isomerase in sickle cell disease. *FASEB J* 27: 4619-29, 2013.
- Primm TP, Walker KW, Gilbert HF. Facilitated protein aggregation. Effects of calcium on the chaperone and anti-chaperone activity of protein disulfide-isomerase. *J Biol Chem* 271: 33664-9, 1996.
- Puig A, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and antichaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. *J Biol Chem* 269: 7764-7771, 1994.
- Rancy PC, Thorpe C. Oxidative protein folding in vitro: a study of the cooperation between quiescinsulfhydryl oxidase and protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 47: 12047-56, 2008.
- Raturi A, Mutus B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic Biol Med* 43: 62-70, 2007.
- Reinhardt C, von Brüh ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschielt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 118: 1110-22, 2008.

- Ruddock LW, Hirst TR, Freedman RB. pH-dependence of the dithioloxidizing activity of DsbA (a periplasmic protein thiol:disulphide oxidoreductase) and protein disulphide-isomerase: studies with a novel simple peptide substrate. *Biochem J* 315: 1001–1005, 1996.
- Ruoppolo M, Freedman RB. Refolding by disulfide isomerization: the mixed disulfide between ribonuclease T1 and glutathione as a model refolding substrate. *Biochemistry* 34: 9380-8, 1995.
- Ruoppolo M, Freedman RB, Pucci P, Marino G. Glutathione-dependent pathways of refolding of RNase T1 by oxidation and disulfide isomerization: catalysis by protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 35: 13636-46, 1996.
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 4: e374, 2006.
- Santos CX, Stolf BS, Takemoto PV, Amanso AM, Lopes LR, Souza EB, Goto H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and isrequired for phagocytosis of *Leishmania . chagasi* promastigotes by macrophages. *JLeukoc Biol.* 86:989-998, 2009.
- Smith AM, Chan J, Oksenberg D, Urfer R, Wexler DS, Ow A, Gao L, McAlorum A, Huang SG. A high-throughput turbidometric assay for screening inhibitors of protein disulfide isomerase activity. *J Biomol Screen* 9: 614-20, 2004.
- Sobierajska K, Skurzynski S, Stasiak M, Kryczka J, Cierniewski CS, Swiatkowska M. Protein disulfide isomerase directly interacts with β -actin Cys374 and regulates cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* 289: 5758-73, 2014.
- Taguchi H, Makino Y, Yoshida M. Monomeric chaperonin-60 and its 50-kDa fragment possess the ability to interact with non-native proteins, to suppress aggregation, and to promote protein folding. *J Biol Chem* 269: 8529-34, 1994.
- Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 270: 20410-6,1995.
- Tian G, Xiang S, Noiva R, Lennarz WJ, Schindelin H. The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell* 124: 61-73, 2006.
- Tian G, Kober FX, Lewandrowski U, Sickmann A, Lennarz WJ, Schindelin H. The catalytic activity of protein-disulfide isomerase requires a conformationally flexible molecule. *J Biol Chem* 283: 33630-40, 2008.
- Townsend DM, Manevich Y, He L, Xiong Y, Bowers RRJr, Hutchens S, Tew KD. Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res* 69: 7626-34, 2009.
- Tsibris JCM, Hunt LT, Ballejo G, Barker WC, Toney LJ, Spellacy WN. Selective inhibition of protein disulfide isomerase by estrogens. *J Biol Chem* 264: 13967–13970, 1989
- 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* 441:513-517, 2006.
- Ushio–Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE* 349: 1–6, 2006.
- van den Berg B, Chung EW, Robinson CV, Mateo PL, Dobson CM. The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *EMBO J* 18: 4794-803, 1999.
- Xu S, Sankar S, Neamati N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today* 19: 222-40, 2014.

- Xu S, Butkevich AN, Yamada R, Zhou Y, Debnath B, Duncan R, Zandi E, Petasis NA, Neamati N. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 16348-53, 2012.
- Wang C, Yu J, Huo L, Wang L, Feng W, Wang CC. Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'. *J Biol Chem* 287: 1139-49, 2012.
- Wang C, Chen S, Wang X, Wang L, Wallis AK, Freedman RB, Wang CC. Plasticity of human protein disulfide isomerase: evidence for mobility around the X-linker region and its functional significance. *J. Biol. Chem* 285: 26788–26797, 2010.
- Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys Acta* 1699: 35–44, 2004.
- Zapun A, Creighton TE, Rowling PJ, Freedman RB. Folding in vitro of bovine pancreatic trypsin inhibitor in the presence of proteins of the endoplasmic reticulum. *Proteins* 14: 10–15, 1992.
- Zito E, Melo EP, Yang Y, Wahlander A, Neubert TA, Ron D. Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. *Mol Cell* 40: 787–97, 2010.

ANEXO I

Mini Review

Methods for measuring Protein Disulfide Isomerase activities: a critical overview

Monica M. Watanabe

Francisco R. M. Laurindo

Denise C. Fernandes*

Affiliation: Vascular Biology Laboratory, Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Running head: Methods for PDI activities

*Corresponding Author:

Denise C. Fernandes

Vascular Biology Laboratory

Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine

Av Eneas C Aguiar, 44, 9th floor

CEP 05403-000, São Paulo, Brazil

denisef@usp.br

Abstract

Protein disulfide isomerase is an essential redox chaperone from endoplasmic reticulum, responsible for correct disulfide bond insertion in nascent proteins. At the endoplasmic reticulum and other locations including the cell surface, PDI accounts for redox homeostasis and signaling. Knowledge about PDI structure and function evolved substantially from in vitro studies using purified PDI and chimeras. In these experimental scenarios, PDI reductase and chaperone activities are readily approachable. However, isomerase activity, the hallmark of PDI family, is significantly more complex. Assessment of PDI roles in cells and tissues mainly relies on gain- or loss-of-function experiments. However, there is limited information regarding correlation of these results with PDI activities. In this mini-review, we put together the main methods described for measuring the four PDI activities: thiol reductase, thiol oxidase, thiol isomerase and chaperone, with emphasis on controls and critical interferents, such as detergent-containing buffers. We also discuss the transposition of these methods from purified PDI to cellular or in vivo samples, with critical thoughts about the interpretation of results.

Keywords: Protein disulfide isomerase – Chaperone - Thiols - Reduction - Isomerization - Oxidation -Redox signaling

Protein disulfide isomerase is an essential redox chaperone that catalyzes the introduction of disulfide and the rearrangement of incorrect disulfides in nascent proteins into endoplasmic reticulum. PDI was the first folding protein described in the literature (Goldberger et al., 1964), and thus is the founder of the mammalian PDI family, currently displaying 20 or more members containing at least one PDI domain. PDI is formed by four thioredoxin-like structural domains, where only two contain the CGHC catalytic motif capable of catalyzing sulfhydryl oxidation and isomerization of disulfide bonds (Hatahet and Ruddock, 2009; Appenzeller-Herzog and Ellgaard, 2008). PDI also prevents protein aggregation, a chaperone effect that is not directly related to its redox thiols, and strictly related to the hydrophobic pocket found in one non-redox domain (Hatahet and Ruddock, 2009). PDI is a flexible molecule showing a mobile region that can open/close substrate access to PDI hydrophobic core depending on PDI redox state (Wang et al., 2013). PDI binds in vitro to a variety of molecules, from small peptides to proteins, but in vivo few client proteins were shown so far (Hatahet and Ruddock, 2009). In plasma membrane and pericellular compartments, PDI is involved in important events such as thrombus formation, platelet aggregation, cell adhesion, tissue factor regulation, virus internalization, etc. The multiple PDI cellular redox effects and its versatility in binding several proteins implicate PDI as an emerging redox cell signaling adaptor (Laurindo et al., 2012) and a promising therapeutic target for some diseases (Xu et al., 2013).

There are several assays to measure PDI activity; some of them are more specific to one particular PDI activity (such as thiol reduction), while others allow the measurement of PDI isomerase activity, the hallmark of PDI family. Methods for PDI activity in general are employed for 3 main purposes: a) the study of protein folding by PDI with identification of substrate intermediates, which requires more elaborated analysis and detection of intermediates by mass spectroscopy; b) screening of PDI substrates or inhibitors, which demands fast and low-cost assays to be preferentially adopted for high-throughput system (HTPS) platforms; c) understanding PDI function in (patho)physiological contexts by comparison of PDI activity in different experimental conditions in biological samples. Proteins such as bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) and ribonuclease T1 (RNaseT1) fit the requirements for studies of PDI-mediated protein folding, while insulin has been chosen for HTPS automation. However, PDI assays in biological samples are a considerable challenge. Some substrates commonly used for purified PDI assays (insulin or fluorescent GSSG) were already used in cell homogenates, but the interpretation is still difficult due to intrinsic interferents such as other reductants present in the sample. The purpose of this review is to critically discuss different methods for measuring PDI activities (reductase, oxidative refolding, isomerase, chaperone), with emphasis on PDI within biological samples.

An overview of PDI activity assays

Depending on the starting material, i.e. the 'substrate' for PDI, one PDI activity will be preferentially measured over others activities. Thus, PDI assays can be classified based on the initial redox state of this substrate; when the substrate of a protein that contains scrambled disulfides and PDI catalyzes its conversion to native state (and recovers substrate activity), this assay is named 'isomerase assay'. In the case of a thiolprotein totally reduced, PDI will promote its 'oxidative refolding', a series of thiol oxidation/reduction cycles and possibly isomerization reactions to promote substrate gain-of-function. PDI 'reduction assays' are easier to perform and are the most popular in the literature, and according to substrate it is followed by turbidimetry or fluorescence changes; however, it is important to note that physicochemical changes may not reflect substrate gain-of-activity. Finally, using proteins that do not contain disulfide bonds as substrates, one can measure PDI 'chaperone' activity, by recovery of substrate activity and/or changes in its aggregation.

When developing a PDI assay, it is important to keep in mind that PDI does not have a preferential group of substrates (such as Erp57, that preferentially folds glycosylated proteins, Jessop et al., 2007) and substrates employed in PDI assays were not so far proven to be physiological PDI substrates. Also, PDI concentration at ER lumen is estimated around 0.2-0.5mM (Lyles and Gilbert, 1991), so PDI would be in excess over substrates, a situation that is not generally mimicked in these assays. Many in vivo conditions are not considered in such PDI reductase activity assays: PDI cellular compartmentalization, molecular crowding inside cells (that affects protein folding, van der Berg et al., 1999), and PDI recycling after substrate folding – promoted by PDI partners (e.g., endoplasmic reticulum oxidase-Ero1, Rancy & Thorpe, 2008 or oxidized peroxiredoxin-Prx4, Zito et al., 2010). Finally, other important issue is that although in vitro PDI chaperone and isomerase activities can be measured separately, in vivo PDI redox folding will not discriminate between both activities and, contrarily, seems to require isomerase and chaperone activities acting together (Laurindo et al., 2012). Thus, results obtained from in vitro assays should also be interpreted taking into account their limitations due to reductionism design. A way to partially overcome such limitations is to preferentially combine measurement of PDI activity with in vivo data, discussed in the context of the specific physiological milieu being investigated.

Isomerase assays - Assays for isomerase activity are based on gain-of-function of a protein substrate that contains disulfides inserted in wrong positions (scrambled), so it is inactive. In the presence of PDI, disulfides will be reordered in correct positions, allowing the measurement of

recovered substrate activity. Two enzymes are more commonly employed: scrambled RNase (scRNase, 4 disulfides) and riboflavin-binding protein (RfBP; 9 disulfides).

For RNase, which is reduced in denaturing conditions and then is allowed to oxidize under air at room temperature to get random disulfide bonds (Fig.1), aliquots are removed to measure substrate activity recovery during incubation with PDI. It is possible to measure the hydrolysis of 2 different RNase substrates: high-molecular-weight RNA (Hillson et al., 1984) or cyclic cytidine monophosphate (cCMP). The second provides higher increases in absorbance, but requires correction due to cCMP depletion over time and CMP-mediated RNase inhibition (Lyles and Gilbert, 1991). The assay buffer generally contains the redox pair GSH/GSSG, to ensure PDI catalysis. One disadvantage of this method is that the ideal is to obtain all experimental results from the same scRNase batch; due to heterogeneity of scRNase among preparations, it is difficult to have reproducible results, independently if it is home-made or commercial (Hatahet and Ruddock, 2009). This method has been extensively employed for PDI mechanistic studies. It can also be applied in some particular cellular preparations, such as enriched-membrane fraction of vascular cells (Janiszewski et al., 2005), which does not contain soluble thioredoxin or glutaredoxin reductase systems, but reflects only PDI activity in cell membranes.

The assay with RfBP is based on fluorescence quenching of free riboflavin due to its binding to apoRfBP (RfBP previously reduced under denaturing conditions to release riboflavin, followed by ferricyanide oxidation) (Rancy and Thorpe, 2008). ApoRfBP is mixed with riboflavin in the presence of PDI, and riboflavin fluorescence is measured directly. It is a potential powerful assay, in which PDI is in excess over substrate (30-fold), but is not a measurement of gain-of-function (Hatahet and Ruddock, 2009). This assay was not yet reportedly tested in biological samples, thus controls experiments should be developed in order to confirm whether the high quantity of endogenous flavoenzymes in cells might interfere with analysis.

Oxidative refolding assays - Several fully reduced proteins can be used as substrate for PDI mediated-oxidative refolding, but only RNase and BPTI (3 disulfides) are considered models for oxidative folding process studies. For both enzymes, the intermediates formed during PDI-mediated oxidative folding are known based on their characterization by mass spectroscopy after thiol alkylation (Irvine et al., 2014). Although time-consuming, this experimental strategy is the best to estimate constants of rate-determining steps of the folding pathway (Hatahet and Ruddock, 2009). Other substrates for PDI that also have their intermediates identified are lysozyme (4 disulfides) (van den Berg, B et al., 1999) and 2 modified RNases, RNaseT1 (2

disulfides) and glutathionylated RNaseT1, (Ruoppolo and Freedman, 1995; Ruoppolo et al., 1996). Reduced RNaseT1 behaves in the assay as reduced RNase, while the glutathionylated substrate has to be deglutathionylated in the first step, which may also be mediated by PDI (Reinhardt et al., 2008; Townsend et al., 2009). Transposition of oxidative refolding assays to biological samples relies on the same difficulties as those of isomerase activity discussed previously.

Reduction assays - In these assays, PDI will reduce substrate disulfides, leading to alterations in their physicochemical characteristics. The most popular substrate due to technical simplicity, low assay time and cost, is insulin. The reduction of insulin promotes the aggregation of insulin B chain, that is followed by increase in turbidity. PDI is incubated with freshly prepared clear insulin solution in the presence of a reductant (DTT or GSH) (Holmgren et al., 1979). Better aggregation curves are obtained if B chain of insulin is used as substrate because interference of A insulin chain will be removed (Karala and Ruddock, 2010). The kinetics of insulin reduction generates two parameters that can be used for relative quantification of different catalysts: the lag time (the time for the start of precipitation, which can be set as an increase by 0.02 in absorbance over the baseline) and the rate of precipitation (the maximal absorbance increase per minute,

Table 1 is the method elected for screening PDI inhibitors in different experimental setups (Jasuja et al., 2012; Khan et al., 2011, Paes et al., 2011), and can be optimized for HTPS (Smith et al., 2004) or coupled to fluorogenic dye in commercial kits (ProteoStat™ PDI Assay Kit from Enzo Life Sciences and PDI Inhibitor Screening Assay Kit from AbCam). It was also employed in cellular homogenates, to be discussed in next section. To increase assay sensitivity, fluorescent insulin (FITC-insulin) can be used and in order to obtain more quantitative parameters; to this end, it is also possible to couple insulin reduction with NADPH consumption by coupling with GSSG (or thioredoxin reductase, Fig.1). In this case, one enzyme unit is defined as the amount of PDI that catalyzes the formation of GSSG per min, and kinetic parameters can be quantified (V_{max} , K_{obs} , K_i); however, reaction conditions have to be optimized in a way that insulin aggregation does not interfere with NADPH absorbance (Morjana and Gilbert, 1991).

Other compound used for PDI reduction assay is GSSG, although GSSG is a poor substrate for PDI (Hatahet and Ruddock, 2009). GSSG is covalently attached to eosin (Di-E-GSSG), providing good sensitivity to the assay, able to detect around nM PDI (Raturi and Mutus, 2007). Di-E-GSSG is non-fluorescent due to self-quenching of two proximal eosin moieties, but after reduction the probe shows ~70-fold increase in fluorescence. This method has been already used for biological samples, such as endothelial cell (HMEC-1) homogenates (Muller et al., 2013) and plasma (Prado et al; 2013). Another method is the release of

radioactive I125-tyramine-SH using as substrate I125-tyramine-SS-poly-(D-lysine) bound to anionic cell surface; this method was employed in intact cells (myeloid and erythrocytes) to measure cell surface PDI reductase activity (Gallina et al., 2002), although confounding effects can potentially occur due to activity of proteases able to cleave the substrate (Xu et al., 2013).

Peptides as PDI substrates - Some peptides that were developed to measure PDI activities in vitro maybe will have promising results when tested in biological samples, with appropriated controls. Logically, for homogenates it is not possible to employ peptides whose readout is the tryptophan intrinsic fluorescence, due to interference of any protein that contains tryptophan. But peptides linked to fluorescent moieties allow high sensitivity and direct measurement of fluorescence from samples. One example is a peptide based on tachyplesin I (TI), a 17-residue antimicrobial peptide that crosses membranes (Kersteen et al., 2005). Scrambled TI (4 cysteines) is isomerized by PDI to its 'native' conformation (more stable) in which tryptophan² and a dansyl-linked lysine¹⁷ physically interact, allowing fluorescence resonance energy transference (FRET). Another peptide, which can be used for reduction or oxidation PDI assays, depending on initial peptide redox state, contains two cysteines separated by a nonaethyleneglycol spacer (Christiansen et al., 2004). When reduced, this peptide is fluorescent due to o-aminobenzoyl group in the N-terminal region; upon oxidation, o-aminobenzoyl fluorescence is quenched by proximity with nitrotyrosine in the C-terminal segment. As control is used a mutated peptide (cysteine by serine). Advantages of both peptides are the enhanced homogeneity as starting materials compared to scrambled thiolproteins, and direct measurement of fluorescence within samples; a disadvantage is that they are not commercially available and in general have to be synthesized by solid phase methods.

Chaperone assays - Assays for chaperone-like activity of PDI are based on the catalysis by PDI of the self-refolding process of completely denatured substrate, which does not require disulfide bonds for folding. The first method for chaperone-like PDI activity was proposed to distinguish PDI chaperone from disulfide isomerase activity, using D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as substrate (Cai et al, 1994). Other substrates that can be employed are lactate dehydrogenase, rhodanese-chemically denatured (Taguchi et al., 1994), or citrate synthase, alcohol dehydrogenase-thermally denatured (Primm et al., 1996). Briefly, denatured protein is diluted in the refolding buffer, in the presence of excess PDI (5 to 10-fold) and changes in aggregation are followed by light scattering or turbidity. As discussed above, since changes in aggregation may not correlate with efficient substrate gain-of-function, many authors also measure substrate reactivation, which requires the dissociation of PDI:substrate complex and optimization of substrate reactivation assay. One recently-reported assay uses green fluorescent protein as PDI substrate to increase sensitivity (Mares et al., 2011). However, it is important to

note that oxidation can switch PDI conformation and interfere with its chaperone function (Wang et al., 2012).

Critical thoughts about the measurement of PDI activity in biological samples

All the assays discussed above might, in theory, be applied in biological samples since in general they contain high amounts of PDI. With the combination of specific PDI inhibitors, one may guarantee that the activity measured in the whole homogenates is in fact due to PDI and no other reductase or reduction systems. However, in practice it is not as simple as that. Indeed, so far only reductase assays were reportedly transposed to cellular samples. Measurement of reductase PDI activity in cell surface is less prone to endogenous interferences, and the assay can be combined with the PDI neutralizing antibody RL90 (Langer et al., 2013; Raturi and Mutus, 2007). In whole cell homogenates, reductase assay will be affected by other reductase systems such as thioredoxin or glutaredoxin. Indeed, the fluorescent Di-E-GSSG was recently employed to measure thioredoxin reductase activity in serum, plasma and lymphocyte lysate (Montano et al., 2014). Furthermore, biological samples might have endogenous unknown PDI inhibitors, as suggested by the observations from our laboratory indicating higher lag time for insulin reduction when exogenous PDI is incubated together with homogenates, as compared to exogenous PDI alone (Fig.2A). These observations reinforce the use of specific PDI inhibitors and/or the strategy of PDI gain/loss-of-function to provide reliable results for PDI activity assays. For example, in endothelial cells (HMEC-1), wild-type PDI overexpression increased PDI reductase activity by 2-fold, with no changes in redox thiols-mutated PDI-overexpressing cells (Muller et al., 2013). The same was observed in homogenates of melanoma cell line (Lovat et al., 2008). In vascular cells PDI overexpression decreased the lag time of insulin reduction kinetics, although PDI silencing did not (Fig.2A). These data also suggest that in complex samples, results obtained with PDI reduction assays might significantly reflect PDI expression levels rather than 'real' PDI isomerase activity within cell.

Recently some small molecules were shown to inhibit PDI in some particular experimental conditions, such as reversible PDI inhibitors derived from plants, juniferdin (Khan et al., 2011) and quercetin-3-rutinoside (Jasuja et al., 2012); as well as synthetic compounds that irreversibly inhibit PDI, 16F16 (Hoffstrom et al., 2010), RB-11-ca (Banerjee et al., 2013) and PACMA31 (Xu et al., 2012). These compounds may be used as additional controls in PDI activity assays, although no one to date was shown to specifically inhibit PDI towards others targets in biological systems.

Another important experimental topic is the buffer employed for cellular or tissue lysis for PDI activity assays. In general they contain one or more surfactants, necessarily for rupture of cell membranes. For example, the widely used RIPA lysis buffer contains NP-40 (1%, 16mM), sodium deoxycholate (0.5%, 12mM) and sodium dodecyl sulfate (0.1%, 3.5mM) (Cold Spring Harbor Protocols). However, Triton was already shown to bind and strongly inhibit PDI b' domain (Klappa et al. 1998), and was used at 0.05% (0.77mM) to inhibit purified PDI in reduction assay (Karala and Ruddock, 2010). Indeed, results from our laboratory indicate that surfactants with distinct physicochemical properties significantly alter PDI reductase activity in vitro (Fig.2B, same for NP40, CHAPS and saponin). Inhibition or an even a small increase of PDI-mediated insulin reduction depends on proportion between PDI and detergent molecules (Fig.2B). Thus, the ideal scenario is to obtain homogenates by mechanical lysis in detergent-free buffers for PDI activity assays.

Conclusions and perspectives

Comprehension of PDI role as a homeostatic redox chaperone physiologically or in disease pathophysiology will require assays for PDI activity. Currently, a major challenge is to really measure PDI isomerase activity in cells and tissues, and not only one step of thiol rearrangement (oxidation or reduction). In addition, the assay should be performed preferentially in situ, since PDI activity may change depending on cell location or redox status. Inasmuch the ideal PDI isomerase assay is not available for cells and tissues, currently PDI reductase activity has been measured in cell surface PDI in intact cells and cell homogenates, despite some difficulties in interpreting such results. Improvements in assay reliability will probably require not only advances into sensitivity and specificity, but optimization of controls as well (neutralizing PDI antibodies or more specific emerging PDI inhibitors), or even cell fractioning to removal of other reductase systems. Optimization of assays with fluorescent peptides for biological samples seems to be a forthcoming promising approach.

Acknowledgements: Work supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #09/54764-6), Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão FAPESP (CEPID “Processos Redox em Biomedicina”, Grant #13/07937-8) and Fundação Zerbini.

References

- Goldberger, R.F., Epstein, C.J., Anfinsen, C.B. (1964) Purification and properties of a microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysozyme. *J Biol Chem.* 239, 1406-10.
- Hatahet, F., Ruddock, L.W. (2009) Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal.* 11(11), 2807-50. doi: 10.1089/ARS.2009.2466.

- Appenzeller-Herzog, C., Ellgaard, L. (2008) The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*.1783(4), 535-48.
- Wang, C., Li, W., Ren, J., Fang, J., Ke, H., Gong, W., Feng, W., Wang, C.C. (2013) Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. *Antioxid Redox Signal*. 19(1), 36-45. doi: 10.1089/ars.2012.4630.
- Laurindo, F.R., Pescatore, L.A., Fernandes, D.C. (2012) Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 52(9), 1954-69. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.037.
- Xu, S., Sankar, S., Neamati, N. (2014) Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today* 19(3), 222-40. doi: 10.1016/j.drudis.2013.10.017.
- Jessop, C.E., Chakravarthi, S., Garbi, N., Hämmerling, G.J., Lovell, S., Bulleid, N.J. (2007) ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J*. 26(1), 28-40.
- Lyles, M.M., Gilbert, H.F. (1991) Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry* 30(3), 613-9.
- van den Berg, B., Ellis, R.J., Dobson, C. M. (1999) Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J*. 18(24), 6927-33.
- Rancy, P.C., Thorpe, C. (2008) Oxidative protein folding in vitro: a study of the cooperation between quiescin-sulphydryl oxidase and protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 47(46), 12047-56. doi: 10.1021/bi801604x.
- Zito, E., Melo, E.P., Yang, Y., Wahlander, A., Neubert, T.A., Ron, D. (2010) Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. *Mol. Cell* 40, 787-97. *Mol Cell*. 2010 doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.010.
- Hillson, D.A., Lambert, N., Freedman, R.B. (1984) Formation and isomerization of disulfide bonds in proteins: protein disulfide-isomerase. *Methods Enzymol*. 107, 281-94.
- Janiszewski, M., Lopes, L.R., Carmo, A.O., Pedro, M.A., Brandes, R.P., Santos, C.X., Laurindo, F.R. (2005) Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 280(49), 40813-9.
- van den Berg, B., Chung, E.W., Robinson, C.V., Mateo, P.L., Dobson, C.M. (1999) The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *EMBO J*. 18(17), 4794-803.
- Irvine, A.G., Wallis, A.K., Sanghera, N., Rowe, M.L., Ruddock, L.W., Howard, M.J., Williamson, R.A., Blindauer, C.A., Freedman, R.B. (2014) Protein disulfide-isomerase interacts with a substrate protein at all stages along its folding pathway. *PLoS One* 9(1), e82511. doi: 10.1371/journal.pone.0082511.
- Ruoppolo, M., Freedman, R.B. (1995) Refolding by disulfide isomerization: the mixed disulfide between ribonuclease T1 and glutathione as a model refolding substrate. *Biochemistry* 34(29), 9380-8.
- Ruoppolo, M., Freedman, R.B., Pucci, P., Marino, G. (1996) Glutathione-dependent pathways of refolding of RNase T1 by oxidation and disulfide isomerization: catalysis by protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 35(42), 13636-46.
- Reinhardt, C., von Brüh, M.L., Manukyan, D., Grahl, L., Lorenz, M., Altmann, B., Dlugai, S., Hess, S., Konrad, I., Orschiedt, L., Mackman, N., Ruddock, L., Massberg, S., Engelmann, B. (2008) Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest*.118(3), 1110-22. doi: 10.1172/JCI32376.
- Townsend, D.M., Manevich, Y., He, L., Xiong, Y., Bowers, R.R. Jr., Hutchens, S., Tew, K.D. (2009) Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res*. 69(19), 7626-34. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0493.
- Holmgren, A. (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem*. 254(19), 9627-32.
- Karala, A.R., Ruddock, L.W. (2010) Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase. *FEBS J*. 277(11): 2454-62. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07660.x.
- Jasuja, R., Passam, F.H., Kennedy, D.R., Kim, S.H., van Hessem, L., Lin, L., Bowley, S.R., Joshi, S.S., Dilks, J.R., Furie, B., Furie, B.C., Flaumenhaft, R. (2012) Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest*. 122(6), 2104-13. doi: 10.1172/JCI61228.
- Khan, M.M.G., Simizu, S., Lai N.S., Kawatani, M., Shimizu, T., Osada, H. (2011) Discovery of a Small Molecule PDI Inhibitor That Inhibits Reduction of HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120. *ACS Chem. Biol*. 6(3), 245-251. doi: 10.1021/cb100387r
- Paes, A.M., Veríssimo-Filho, S., Guimarães, L.L., Silva, A.C., Takiuti, J.T., Santos, C.X., Janiszewski, M., Laurindo, F.R., Lopes, L.R. (2011) Protein disulfide isomerase redox-dependent association with

- p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol.* 90(4), 799-810. doi: 10.1189/jlb.0610324.
- Smith, A.M., Chan, J., Oksenberg, D., Urfer, R., Wexler, D.S., Ow, A., Gao, L., McAlorum, A., Huang, S.G. (2004) A high-throughput turbidometric assay for screening inhibitors of protein disulfide isomerase activity. *J. Biomol. Screen.* 9(7), 614-20.
- Morjana, N.A., Gilbert, H.F. (1991) Effect of protein and peptide inhibitors on the activity of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 30(20):4985-90.
- Raturi, A., Mutus, B. (2007) Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic. Biol. Med.* 43(1), 62-70.
- Muller, C., Bandemer, J., Vindis, C., Camaré, C., Mucher, E., Guéraud, F., Larroque-Cardoso, P., Bernis, C., Auge, N., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. (2013) Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxid. Redox Signal.* 18(7),731-42. doi: 10.1089/ars.2012.4577.
- Prado, G.N., Romero, J.R., Rivera, A. (2013) Endothelin-1 receptor antagonists regulate cell surface-associated protein disulfide isomerase in sickle cell disease. *FASEB J.* 27(11), 4619-29. doi: 10.1096/fj.13-228577.
- Gallina, A., Hanley, T.M., Mandel, R., Trahey, M., Broder, C.C., Viglianti, G.A., Ryser, H.J.(2002) Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem.* 277(52), 50579-88.
- Kersteen, E.A., Barrows, S.R., Raines, R.T. (2005) Catalysis of protein disulfide bond isomerization in a homogeneous substrate. *Biochemistry* 44(36), 12168-78.
- Christiansen, C., St Hilaire, P.M., Winther, J.R. (2004) Fluorometric polyethyleneglycol-peptide hybrid substrates for quantitative assay of protein disulfide isomerase. *Anal. Biochem.* 333(1), 148-55.
- Cai, H., Wang, C.C., Tsou, C.L.(1994) Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem.* 269(40), 24550-2.
- Taguchi, H., Makino, Y., Yoshida, M. (1994) Monomeric chaperonin-60 and its 50-kDa fragment possess the ability to interact with non-native proteins, to suppress aggregation, and to promote protein folding. *J Biol Chem.* 1994 Mar 18;269(11):8529-34.
- Pimm, T.P., Walker, K.W., Gilbert, H.F. (1996) Facilitated protein aggregation. Effects of calcium on the chaperone and anti-chaperone activity of protein disulfide-isomerase. *J Biol Chem.* 271(52), 33664-9.
- Mares, R.E., Meléndez-López, S.G., Ramos, M.A.(2011) Acid-Denatured Green Fluorescent Protein (GFP) as Model Substrate to Study the Chaperone Activity of Protein Disulfide Isomerase. *Int J Mol Sci.* 12(7), 4625-36. doi: 10.3390/ijms12074625.
- Langer, F., Spath, B., Fischer, C., Stolz, M., Ayuk, F.A., Kröger, N., Bokemeyer, C., Ruf, W. (2013) Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood* 121(12), 2324-35. doi: 10.1182/blood-2012-10-460493.
- Montano, S.J., Lu, J., Gustafsson, T.N., Holmgren, A. (2014) Activity assays of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase: fluorescent disulfide substrates, mechanisms, and use with tissue samples. *Anal. Biochem.* 449, 139-46. doi: 10.1016/j.ab.2013.12.025.
- Lovat, P.E., Corazzari, M., Armstrong, J.L., Martin, S., Pagliarini, V., Hill, D., Brown, A.M., Piacentini, M., Birch-Machin, M.A., Redfern, C.P. (2008) Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 68(13), 5363-9. doi: 10.1158/0008-5472.
- Hoffstrom, B.G., Kaplan, A., Letso, R., Schmid, R.S., Turmel, G.J., Lo, D.C., Stockwell, B.R. (2010) Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol.* 2010 Dec;6(12):900-6. doi: 10.1038/nchembio.467. Epub 2010 Oct 31.
- Banerjee, R., Pace, N.J., Brown, D.R., Weerapana, E. (2013) 1,3,5-Triazine as a modular scaffold for covalent inhibitors with streamlined target identification. *J Am Chem Soc.* 135(7), 2497-500. doi:10.1021/ja400427e.
- Xu, S., Butkevich, A.N., Yamada, R., Zhou, Y., Debnath, B., Duncan, R., Zandi, E., Petasis, N.A., Neamati, N. (2012) Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(40), 16348-53. doi:10.1073/pnas.1205226109.
- Klappa, P., Ruddock, L.W., Darby, N.J., Freedman, R.B. (1998) The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *EMBO J.* 17(4), 927-35.

Figure Legends

Figure 1. Scheme of some PDI activity assays. RNase can be used as initial substrate for PDI with its thiols in scrambled condition for PDI isomerase assay or totally reduced for PDI-mediated oxidative refolding assay. RNase gain-of-activity is measured by hydrolysis of its substrates, RNA or cyclic CMP. PDI reduction assay is usually performed with insulin as substrate, which precipitates upon reduction of its B chain thiols. Coupling insulin reduction with NADPH consumption (using thioredoxin or glutaredoxin reductase systems) provides more precise quantitative results. Peptides can be used for oxidation, reduction or isomerization PDI assays, based on energy transfer from a donor to an acceptor residue with changes in fluorescence intensity. See text for details.

Figure 2. Spurious inhibitors and detergents as PDI reductase assay interferents in biological samples. A) PDI overexpression (3-fold increase vs. endogenous PDI) increased while PDI silencing (70%) did not change insulin reduction in endothelial cell homogenates. Freshly prepared homogenates (150µg) obtained by mechanical lysis (in the absence of detergents) were incubated with insulin (1 mg/mL) and PDI (1.5µM) in the presence of DTT (1.5mM) and insulin turbidity appearance was measured at 540nm. pPDI = purified PDI; mock = cells treated with transfection reagent; wtPDI = cells transfected with wild type PDI; siRNA = cells transfected with siRNA against PDI. Cells were lysed 24h after transfection procedure. Note the higher lag time for insulin reduction when exogenous PDI is incubated together with homogenates (mock), as compared to exogenous PDI alone (pPDI), suggesting that biological samples might have endogenous unknown PDI inhibitors. B) Detergents commonly used in buffers in different experimental protocols can inhibit or increase insulin reduction mediated by PDI in vitro, depending on its concentration. PDI (1.5µM) was incubated with insulin at same experimental conditions of (A). Detergents (nonionic Triton X-100, anionic sodium dodecyl sulfate or anionic sodium deoxycholate) were added at concentrations of 100-fold (150µM) to 0.1-fold (0.15µM) vs. PDI concentration. Lag time was calculated as time for absorbance reaching 0.1 unit.

Figure 1

Figure 2

ANEXO II

ANEXO II: EFEITO DA PERDA DE FUNÇÃO DA PDI DURANTE SHEAR LAMINAR SUSTENTADO: PARTICIPAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

Resumo

Enquanto os efeitos anti-aterogênicos do shear laminar sustentado (LS) envolvem a produção de óxido nítrico (NO) pela eNOS, incrementos no estímulo mecânico levam a um aumento transitório da produção de ânion radical superóxido pelo complexo NADPH oxidase. Como a NADPH oxidase é regulada pela chaperona da superfamília da tiorredoxina Dissulfeto Isomerase Proteica (PDI), investigamos se a perda de função da PDI poderia afetar a produção de óxido nítrico bioativo durante o shear laminar sustentado. Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) silenciadas para PDI (diminuição ~ 70% da expressão proteica) foram submetidas a shear laminar (15 dinas/cm²) em sistema cone-e-placa. Após 1h de shear laminar, o silenciamento da PDI diminuiu tanto a fosforilação da eNOS-Ser¹¹⁷⁷ quanto da quinase Akt-Ser⁴⁷³. Em contrapartida, após 18h de shear (shear laminar sustentado), a perda de função da PDI implicou em maior acúmulo de nitrito (44%, medida indireta da produção de óxido nítrico bioativo), menor produção de superóxido intracelular e nitração total de proteínas, sem alterar os níveis de mRNA da NADPH oxidase (isoformas Nox1 e Nox4). Estes resultados sugerem que os efeitos da PDI durante o shear laminar envolvam uma regulação fina entre a produção de óxido nítrico e ânion superóxido.

1. INTRODUÇÃO

1. Produção de oxidantes pelo estímulo mecânico de estresse de cisalhamento (*shear stress*)

O estresse de cisalhamento (*shear stress*) é a força de fricção gerada do fluxo sanguíneo sobre o endotélio vascular (Fig.16). O shear stress laminar exibe efeitos ateroprotetores, tais como ativação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), produção de óxido nítrico, vasodilatação, além de inibição da apoptose e da adesão de monócitos (Berk et al, 1998). De fato, o shear laminar é o principal agonista fisiológico da produção endotelial de •NO. Entretanto, regiões de vasos que apresentam alterações no padrão do shear stress, que causam distúrbios no fluxo, como o padrão de shear turbulento ou oscilatório, são associadas à predisposição para formação de placa aterosclerótica (Gimbrone et al., 2000). Os mecanismos pelos quais o shear laminar age como ateroprotetor e o shear oscilatório inicia ou contribui para aterogênese ainda estão sob debate. Tanto shear laminar quanto shear oscilatório regulam a produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em células endoteliais, mas de forma diferenciada: enquanto o shear oscilatório aumenta a produção de superóxido pela isoforma Nox1 do complexo NADPH oxidase, o shear laminar gera um aumento transiente da produção superóxido seguido de forte inibição (Hwang et al., 2003; Laurindo e col., 1994). Desta forma, a produção de superóxido por shear stress pode ter um papel sinalizador das adaptações vasculares relacionadas às diferentes forças mecânicas.

A isoforma da NADPH oxidase predominante em células endoteliais é a Nox4 (produção constitutiva de ânion superóxido/ H_2O_2) enquanto que as isoformas Nox1 e Nox2 são ativadas em determinadas situações/estímulos, e podem apresentar atividade enzimática maior que da Nox4 (Ushio-Fukai, 2006; Lassegue e col., 2012). A localização subcelular preferencial difere para as isoformas Nox1, que se distribui em cavéolas, e Nox4, que migra do retículo endoplasmático para complexos de adesão focal (Hilenski et al., 2004; Ushio-Fukai, 2006). Considerando que ambos os subcompartimentos têm papel específico conhecido na mecanotransdução (Ushio-Fukai, 2006), é possível que a interação destes com as correspondentes isoformas da Nox tenha papel na adaptação de células vasculares a distintos padrões de shear stress.

Figura 16: Diferentes efeitos do shear laminar e oscilatório na função celular e aterosclerose. O padrão de shear stress é reconhecido pela célula endotelial por sistemas mecanosensores como o citoesqueleto (linhas pontilhadas), integrinas, junções célula-célula, cavéolas, glicocálix da superfície celular, proteínas G, e canais iônicos. Os mecanosinais iniciam cascatas de sinalização que regulam a produção de fatores vasoativos. Enquanto o shear laminar estimula a produção de fatores ateroprotetores, o shear oscilatório estimula a produção de fatores aterogênicos; e o balanço destes fatores determina a propensão do vaso de se manter sadio ou desenvolver placas ateroscleróticas. PGI2= prostaciclina; TM= trombomodulina; TGFβ= fator de crescimento de transformação β; PDGF= fator de crescimento derivado de plaquetas; ET-1= endotelina-1; BMP4= proteína morfogênica óssea 4 (adaptado de Jo et al., 2006).

2. PDI e óxido nítrico

Na superfície celular, a PDI age principalmente como redutora de tióis protéicos (Jiang e col., 1999), e apresenta importante papel na internalização de óxido nítrico exógeno (oriundo de nitrosotióis) via reações de transnitrosação (Zai e col., 1999). Neste caso, a redução dos níveis de PDI (após transfecção com antisenso da PDI) diminuiu em 70% a formação intracelular de GMP cíclico em células eritroleucêmicas, sugerindo ser esta via importante fisiologicamente para o transporte do óxido nítrico (Zai e col., 1999; Ramachandram e col., 2001). Desta forma, a PDI pode ser um importante fator de regulação do balanço entre NO e superóxido durante shear laminar em células endoteliais.

Uma vez nitrosada, a PDI apresenta, pelo menos *in vitro*, redução de suas atividades

isomerase e chaperona (Sliskovic e col., 2005; Uehara e col., 2006). Consequentemente, a formação da PDI nitrosada *in vivo* (em células neuronais) foi associada à neurotoxicidade, uma vez que a exposição ao doador de óxido nítrico S-nitrosocisteína causou um acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático em células transfectadas com a PDI selvagem, não observado nas células transfectadas com PDI mutada nas cisteínas do sítio redox (substituição por serina das cisteínas C36, C39, C383, C386) (Uehara e col., 2006). O acúmulo de proteínas mal-formadas gera uma resposta de estresse do retículo endoplasmático, que por meio de uma cascata de sinais denominado “resposta a proteínas mal enoveladas” (ou UPR), culmina na inibição das vias de tradução de proteínas nascentes e super expressão de chaperonas residentes do retículo endoplasmático (Grp78, Grp94, calrreticulina), e pode evoluir para apoptose celular (Rutkowski e col., 2006).

Resultados preliminares do laboratório indicam que os achados obtidos previamente em VSMC e macrófagos com respeito à interação entre PDI e NADPH oxidase são reproduzidos em células endoteliais (linhagem de células endoteliais de aorta de coelho), com a PDI apresentando co-imunoprecipitação com a subunidade p22phox da NADPH oxidase e modulando funcionalmente a atividade da NADPH oxidase. Ainda, experimentos de ganho de função da PDI (superexpressão transitória da PDI) não mostraram alterações nos níveis de produção de óxido nítrico ou oxidantes em células endoteliais submetidas a shear laminar sustentado (Fig.17). Por outro lado, a superexpressão da PDI mutada das quatro cisteínas redox, ou seja, um dominante negativo, aumentou a produção tanto de óxido nítrico quanto oxidantes nas após shear laminar por 18h. Estes resultados indicam que a ausência dos tióis da PDI promove aumento da liberação de NO. *Nossa hipótese é que a PDI possa exercer regulação co-direcional em paralelo de superóxido e óxido nítrico por meio de vias envolvendo ativação de eNOS mediada por Rac1 ou Akt, por sua vez ativados no contexto da NADPH oxidase.* Este mecanismo poderá identificar uma mudança do paradigma usual de que óxido nítrico e superóxido uniformemente se regulam por auto-eliminação na célula endotelial. Neste sub-projeto em particular, buscamos analisar os efeitos de perda de função da PDI na produção de oxidantes durante o shear laminar.

Figura 17. Efeito da transfecção da PDI selvagem (*wild-type*) e mutada em seus 4 resíduos redox-ativos de cisteína na liberação de nitrito no meio de cultura de células endoteliais de aorta de coelho submetidas a shear stress laminar por 18 horas. A ausência dos tíóis redox-ativos da PDI promoveu aumento da liberação de óxido nítrico.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste sub-projeto é analisar o efeito da perda de função da Dissulfeto Isomerase Protéica na produção de óxido nítrico e superóxido durante shear stress laminar em células endoteliais. Para tal, os objetivos específicos são avaliar, em células endoteliais submetidas a shear laminar:

1. O efeito do silenciamento da PDI total na produção de óxido nítrico
2. O efeito do silenciamento da PDI total na produção de ânion superóxido

3. RESULTADOS

Inicialmente avaliamos o efeito do silenciamento da PDI em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), na condição basal e após shear laminar. O estímulo mecânico de shear laminar sob as células endoteliais foi realizado utilizando-se o sistema cone-e-placa (Fig.18). Duas sequências de siRNA contra a PDI foram testadas (PDI siRNA1 ou PDI siRNA2), ambas com boa eficiência no silenciamento (Fig.19), tanto na condição estática, após 1h (Fig.19) e após 18h de shear laminar (dado não mostrado). Nos experimentos utilizamos as duas sequências de siRNA ou somente a sequência #2.

Como a produção de óxido nítrico bioativo durante o shear laminar sustentado está intimamente relacionado à ativação da eNOS no início do estímulo mecânico, analisamos a fosforilação da eNOS após 1h de shear laminar e da quinase proximal Akt, em RAEC carenciadas por 16h. Interessante, nas células silenciadas para PDI observamos menor fosforilação tanto da eNOS quanto da Akt (apesar do silenciamento da PDI ter diminuído a fosforilação basal da Akt nas células na condição estática) (Fig.19).

Figura 18: Representação esquemática do sistema cone-e-placa para estudo de shear stress em células em cultura. RAEC foram expostas a shear stress (laminar, fluxo unidirecional de 15 dinas/cm²), pela rotação do cone de teflon (com ângulo de 0,5° do centro do cone para as bordas) sobre o meio de cultura. A temperatura (37°C±1°C) e a concentração de CO₂ (5%) foram mantidas constantes. O shear stress gerado é calculado considerando-se as dimensões da placa de cultura de células (Falcon®) e a viscosidade do meio de cultura (F-12 contendo 10% de soro fetal bovino) (adaptado de Jo et al., 2006).

Figura 19: A fosforilação da Akt e eNOS foi menor nas RAEC silenciadas para PDI após shear laminar por 18h que na condição estática.

Apesar do efeito inibitório da fosforilação da eNOS pela perda de função da PDI no início do estímulo por shear laminar, quando as células foram estimuladas por 18h no sistema cone-e-placa, observamos um acúmulo de nitrito no meio de cultura (medida indireta da produção de óxido nítrico pelas RAEC) nas células silenciadas para PDI (Fig.20). O aumento de óxido nítrico bioativo poderia ser uma consequência de menor produção de ânion radical superóxido, já que estas duas moléculas, quando produzidas concomitantemente reagem rapidamente ($k \sim 10^9$, Radi e Beckman, 1991), produzindo peroxinitrito. A principal fonte de superóxido em células vasculares para fins de sinalização é complexo NADPH oxidase (Lassegue e col., 2012). Entretanto, conforme já descrito por nosso grupo, não é possível medir a atividade NADPH oxidase em fração de membrana de células endoteliais submetidas a shear laminar pois ocorre uma interferência pela maior expressão da eNOS (a eNOS também produz superóxido pois deve ficar desacoplada nas condições experimentais do ensaio de medida da atividade NADPH oxidase) (Laurindo e col., 2008). Desta forma, medimos os níveis de transcritos das isoformas Nox1 e Nox4 presentes na célula endotelial após silenciamento da PDI e submetidas a shear laminar. De fato, o shear laminar diminuiu a expressão das Noxes (Fig.21), como já observado por outros grupos anteriormente (Hwang e col., 2003). O silenciamento da PDI diminuiu somente a isoforma Nox1 na condição estática, em analogia ao que já foi observado em nosso grupo em VSMC (Fernandes e col., 2009). Entretanto, após shear laminar o silenciamento da PDI não teve efeito na já menor expressão das Noxes (Fig. 6).

Figura 20: O silenciamento da PDI aumenta a produção de nitrito em meio de cultura após shear laminar por 18h em RAEC. $n \geq 3$, * $P < 0.05$ vs. sc siRNA (LS18h); ** $P < 0.05$ vs. basal (controle estático).

Como não medimos a atividade da NADPH oxidase, avaliamos a produção intracelular de ânion radical superóxido pela oxidação intracelular da *probe* dihidroetídio. Esta *probe*, após reagir especificamente com superóxido, gera o composto 2-hidroxi-etídio que é posteriormente quantificado por HPLC (Fernandes e col., 2007). O shear laminar sustentado diminui a produção total de oxidantes em células endoteliais, conforme dados anteriores do laboratório (Fernandes Tese de Doutorado FMUSP) e Hwang e colaboradores (2003). Entretanto, não observamos diferenças na produção de oxidantes nas células tratadas com lipofectamina (controle mock, Fig.22) submetidas a shear laminar vs. controle estático, o que poderia ser uma consequência do procedimento de transfecção que *per se*, que de fato aumenta a produção intracelular de ROS em células musculares lisas (Fernandes e col., 2007). Mesmo assim, foi possível verificarmos uma diminuição da produção de ânion radical superóxido intracelular nas células silenciadas para PDI após shear (vs. controle estático), conforme a menor produção de 2-hidroxi-etídio. Já a produção de outros oxidantes (principalmente peróxido de hidrogênio) não foi alterada (conforme quantificação de etídio).

Figura 21: O silenciamento da PDI não alterou os níveis de mRNA de Nox1 e Nox4 após shear laminar por 18h em RAEC. $n \geq 3$, * $P < 0.05$ vs. sc siRNA (LS18h); ** $P < 0.05$ vs. basal (controle estático).

Figura 22: O silenciamento da PDI diminuiu somente a produção de ânion radical superóxido intracelular após shear laminar por 18h em RAEC.

Neste estudo do balanço da produção de óxido nítrico e ânion superóxido pelas RAEC silenciadas para PDI e submetidas a LS18h, medimos a nitração total de proteínas, que pode ocorrer pela maior formação de peroxinitrito e/ou produção de $\cdot\text{NO}_2$ em presença de peroxidases e H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 2007). Observamos que o silenciamento da PDI diminuiu a nitração de proteínas após LS18h (Fig.23), dado que corrobora com a menor produção de ânion superóxido intracelular (Fig.22). Estes dados sugerem que a expressão da PDI, na condição de LS18h, correlaciona-se principalmente com a produção de óxido nítrico (em detrimento à produção de superóxido).

Figura 23: A nitração total de proteínas foi menor nas RAEC silenciadas para PDI após shear laminar por 18h.

Para distinguir entre a contribuição da PDI de superfície celular nos efeitos da produção de oxidantes durante shear laminar, utilizamos o anticorpo neutralizante da PDI RL90 (ThermoPierce) que reconhece e liga-se à região do sítio ativo redox da PDI e inibe a atividade da PDI (Kim e col., 2013). As RAEC foram incubadas por 1h com 1μg/mL de anti-PDI antes de iniciar o shear laminar. Conforme Fig.24 não observamos alterações na produção de óxido nítrico bioativo nem na produção de ânion superóxido intracelular, após shear laminar de 18h, quando a PDI de superfície foi neutralizada. Desta forma, os resultados observados na produção de superóxido e óxido nítrico durante o silenciamento da PDI parecem ser, predominantemente, consequência das ações da PDI intracelular.

Figura 24: A neutralização da PDI de superfície (pelo anti-PDI RL90) não alterou a produção de óxido nítrico bioativo (A) ou a produção de oxidantes intracelulares (B) durante shear laminar sustentado. (n ≥ 4)

4. DISCUSSÃO

Enquanto a perda de função da PDI em células endoteliais diminuiu a fosforilação da Akt e eNOS durante o início do estímulo mecânico (shear por 1h), após shear laminar sustentado (por 18h) observamos menor produção de ânion superóxido intracelular, nitração total de proteínas e maior produção de óxido nítrico bioativo (medido pelo acúmulo de nitrito no meio de cultura). Estes dados, somados aos dados anteriores do grupo de ganho de função da PDI neste mesmo modelo de shear laminar (dados não publicados), sugerem um complexo envolvimento da PDI na produção destas duas espécies (NO e superóxido) durante o shear laminar.

A superexpressão da PDI em RAEC (aumento de cerca de 2 vezes na expressão proteica) não alterou a produção intracelular de oxidantes, nem o acúmulo de nitrito no meio de cultura após 18h de shear laminar. Em contrapartida, a superexpressão de uma PDI mutada nas quatro cisteínas redox (por serina) aumentou tanto a produção de oxidantes, de nitrito e a nitração total de proteínas. Estes dados reforçam, juntamente com os dados de silenciamento descritos neste trabalho, o importante papel da PDI no balanço NO/ROS durante o shear laminar, mas ainda não esclarecem os mecanismos pelos quais a PDI altera a produção destas espécies.

Em relação à Akt, uma quinase *upstream* à eNOS, observamos após 1h de shear laminar uma ativação da Akt pela superexpressão da PDI mutada enquanto o silenciamento da PDI diminuiu sua fosforilação. A ativação da Akt pelo shear laminar agudo é redox sensível, já que a adição prévia de antioxidantes (SOD+Catalase) diminuiu sua fosforilação (dados não publicados). Estes dados estão de acordo com o suporte da PDI ao complexo NADPH oxidase; isto é, enquanto a superexpressão da PDI (selvagem ou mutada) aumenta a atividade da NADPH oxidase em VSMC (e a pAkt), o silenciamento tem efeito oposto (Fernandes e col., 2009; Janiszewski e col., 2005). Entretanto, os efeitos observados na ativação de Akt/eNOS não correlacionam-se com o acúmulo de NO após 18h de shear laminar nas células silenciadas para PDI, sugerindo que outros mecanismos, além do suporte ao complexo NADPH oxidase, de controle da produção de ROS/NO pela PDI.

O silenciamento da PDI em VSMC também diminuiu os níveis de mRNA da isoforma Nox1, tanto em células em condição basal mas principalmente estimuladas com o agonista da via do receptor AT1/Nox1, a angiotensina II (Fernandes e col., 2009). O mesmo não ocorreu neste modelo de shear em células endoteliais, onde o silenciamento da PDI não alterou os níveis de transcrito da NADPH oxidase após shear sustentado, que já são baixos em comparação ao

controle estático (Hwang e col., 2003; dados deste trabalho). Possivelmente as alterações nos níveis de NO no shear sustentado não refletem majoritariamente a produção de superóxido pelo complexo NADPH oxidase.

Em relação à nitração total de proteínas, utilizada como um indicador da produção concomitante de NO e superóxido, observamos uma correlação com a produção de ROS intracelular e não com a produção de NO. Após shear, a nitração total foi menor nas células silenciadas para PDI (menor produção de superóxido) e maior para as células transfectadas com PDI mutada (maior produção de oxidantes, dados não publicados). Estes dados sugerem que a produção de NO ocorra principalmente em compartimentos distintos da produção de superóxido, e reforçam a hipótese da PDI modular a produção de NO de forma independente da ativação da NADPH oxidase.

Embora a PDI de superfície catalise reações de transnitrosação na membrana celular (Jiang e col., 1999), e dados do nosso grupo de pesquisa também terem mostrado, mais recentemente, um importante papel da PDI de superfície na resposta de reparo na lesão vascular em modelo de angioplastia em coelhos (Tanaka e col., Tese de Doutorado FMUSP 2014), os efeitos da PDI na produção de óxido nítrico durante o shear laminar não foram afetados pela neutralização da PDI de superfície. Experimentos com maiores concentrações de anticorpo devem ser realizados para a exclusão definitiva da participação da PDI de superfície neste modelo.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos até o presente momento podem ser sumarizados como segue:

1. A perda de função da PDI diminui a pAkt e peNOS após 1h de shear.
2. A perda de função da PDI aumenta a produção de óxido nítrico após shear laminar sustentado, com leve diminuição da produção intracelular de superóxido e nitração de proteínas.
3. Os efeitos observados na produção de óxido nítrico bioativo/superóxido intracelular parecem ser mediados principalmente pela PDI intracelular, e não pela PDI de superfície.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Dihidroetidina, reagente AmplexRed® e Lipofectamina® foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Todos os outros reagentes, foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoque de DHE (10 mM) foram preparadas em DMSO e armazenadas sob nitrogênio líquido, no escuro, a -20°C. Todos os reagentes foram adquiridos da Merck, Sigma ou Calbiochem e apresentavam grau analítico ou superior. Todas as soluções foram preparadas em água MilliQ.

Cultura celular: As linhagens imortalizadas de células musculares lisas de aorta de coelho e células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) (Buonassisi & Venter, 1976) foram mantidas em meio F12 suplementado com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100 µM) e penicilina (100 U/mL). O homogenato total foi obtido pela lise mecânica das células em tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,4, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM), seguido de sonicação (3 ciclos de 10seg, a 8W), e retirada de debris (1000g por 5 min). A dosagem de proteína foi realizada com reagente Bradford (BioRad), comparando-se com solução padrão de albumina (1mg/mL).

Shear laminar: Em placas de cultura de 10 cm com 1 x 10⁶ RAEC foram crescidas. Após 72h aplicou-se o shear laminar, em estufa a (37 ± 1)°C e CO₂ 5%. Para tal, cones de teflon foram esterilizados (sob luz UV por 30 min) e colocados sobre o meio de cultura (10 mL) das placas e aplicou-se a rotação de 400 rpm, que corresponde a 15 dinas/cm². Os cones apresentam uma angulação de 0,5° (centro-borda) e baixa resistência a líquidos, ideal para simular o shear stress laminar no meio de cultura (Go e col., 1998). O controle estático foi mantido na mesma estufa.

Transfecção transitória: As RAEC foram crescidas a 1x10⁶ células em placas de cultura de 10cm de diâmetro (Falcon). Após 48h substituiu-se o meio de cultura por 10 mL de meio de transfecção (F12 contendo SFB 10%, 12ug de plasmídeo e 30µL de Lipofectamina®, Invitrogen). Após 8h, o meio de transfecção foi substituído pelo meio de cultura. Após 18h, iniciou-se o LS. Os plasmídeos da PDI- wt e PDI- mut (clonados em pCR3.1, Invitrogen) foram cedidos pelo Dr. Tomohiro Nakamura. Os plasmídeos foram superexpressos em E. coli DH5α competentes e purificados com kit MaxiPrep (Qiagen). Para o silenciamento foram sintetizadas pela Invitrogen com as seguintes sequências: PDI siRNA1, 5' GACGAC AUUGUGAACUGGCGUAAGA 3', 5' UCUUCAGCCAGUUCACA AUGUCGUC 3, PDI siRNA2, 5' GAGGUGGCCUUUGACGAGAAGAAGA 3', 5' UCUUCUUC UCGUCAAGGCCACCUC 3'

Dosagem de nitrito no meio de cultura: Pelo analisador de *NO (NO^{ATM} 280, Sievers) foram medidas as concentrações de nitrito; a solução na cela de reação era composta por KI/HAc (temperatura ambiente). Após injeção de 20µL de meio de cultura, a concentração de nitrito foi baseada em curvas de calibração feitas no mesmo dia com soluções padrões de NaNO₂ (0,5 - 7,5 µM). Os resultados estão apresentados como nmol NO₂/10⁶ células, a fim de corrigir eventuais diferenças no volume de meio de cultura após o shear laminar sustentado e número de células, especialmente nos experimentos que envolviam células transfectadas.

Western blot: Os homogenatos celulares ou fração de membrana (30µg de proteína) foram submetidos a separação em gel de poliacrilamida (10-12%), seguido de transferência para membrana de nitrocelulose e marcação com anticorpo primário overnight e marcação com anticorpo secundário por 1h. A imunomarcação foi revelada por reação quimiluminescente (kit ECL, Amersham). Os anticorpos primários usados foram: anti-PDI (Stressgen, 1:1000), anti-β-actina (Sigma, 1:10000), anti – Rac (Santa Cruz, 1:3000); anti – eNOS (upstate, 1:1000); anti – Akt (upstate, 1:1000) todos feitos em camundongo; anticorpo secundário anti-camundongo (Calbiochem) conjugado com HRP. A densitometria das bandas de peso molecular de 56 kDa (Akt), 135 kDa (eNOS) 57 kDa (PDI), 21kDa (Rac), 42 kDa (β-actina) foi realizada com o programa Scion®.

Oxidação da DHE intracelular: As RAEC foram incubadas em PBS/DTPA (0,5 mL) contendo dihidroetidina (50 µM). Após 30 min, as células foram lavadas com PBS para retirada da dihidroetidina que não foi incorporada, raspadas em presença de 0,5 mL de acetonitrila, e o extrato de células obtido foi centrifugado (12.000g por 10 min a 4°C) para retirada de debris. Os sobrenadantes dos extratos foram secos sob vácuo (Speed VacR Plus SC-110A, Thermo Savant) e os resíduos armazenados a -20°C no escuro até análise. As amostras foram ressuspensas em 120 µL de fase móvel (CH₃CH 10%, TFA 0,1%) e injetadas no sistema de HPLC (100 µL). Durante a separação cromatográfica, a quantificação de dihidroetidina remanescente (que não reagiu) foi utilizada como controle interno da extração orgânica. Desta forma, os dados foram expressos como 2-hidroietídio por dihidroetidina consumida (EOH/DHE) e etídio por dihidroetidina consumida (E/DHE). A dihidroetidina consumida foi calculada como a diferença entre a concentração inicial adicionada às células e a dihidroetidina remanescente no extrato celular quantificada por HPLC. Vale ressaltar que todas as etapas foram realizadas em ausência de luz.

Real time PCR: O mRNA total das RAEC foi purificado com o RNA SpinMini RNA isolation kit GE. A quantificação do mRNA foi feita por absorbância a 260nm e a pureza confirmada pela análise das bandas de rRNA em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio. O mRNA (3-5 µg) foi convertido em cDNA pela incubação com OligodT(12-18) (25 ng/µL), dNTP (500 µM de cada), DTT (5 µM), RNase OUT (2U/µL) e SuperScript II, a 42°C por 50 min. As reações de PCR continha primers (200 nM), cDNA (150 ng) e reagente Sybr MasterMix (Invitrogen) conforme especificações sugeridas pelo fabricante. Os primers utilizados foram: Nox1, forward CATCATGGAAGGAAGGAGA, reverse GCTTCCGGATAAACTCCACA; Nox 4, forward CCACAGACTTGGCTTTGGAT, reverse TACTGGCCAGGTCTTGCTTT; GAPDH, forward TCACCATCTTCCAGGAGCGA, reverse CACAATGCCGAAGTGGTCGT. As reações foram acompanhadas no equipamento de Real Time modelo RG 3000 (Corbett), e a quantificação se baseou em curva de calibração com plasmídeos de Nox1 ou Nox4 (10³ -10⁸ cópias/reacção).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berk C, Bradford C. Laminar Shear Stress. Mechanisms by Which Endothelial Cell Transduce an Atheroprotective Force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 677-685, 1998.
- 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* 484: 197-204, 2009.
- Fernandes DC, Wosniak J Jr, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, Santos CX. Analysis of dihydroethidium-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol- Cell Physiology* 292: C413-C422, 2007.
- Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 902: 230-239, 2000.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Londres, Oxford University Press. 2007.
- Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griending KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 677-683, 2004.
- Hwang J, Saha A, Boo YC, Sorescu GP, McNally JS, Holland SM, Dikalov S, Giddens DP, Griending 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* 278: 47291-47298, 2003.
- Jo H, Song H, Mowbray A. Role of NADPH oxidases in disturbed flow- and BMP4-induced inflammation and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 8: 1609-1619, 2006.
- Janiszewski M, Lopes L, Carmo A, Lima T, Pedro M, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase acts as a novel regulatory subunit of vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase. *J Biol Chem* 280: 40813-40819, 2005.
- Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 274: 2416-2423, 1999.
- Kim K, Hahm E, Li J, Holbrook LM, Sasikumar P, Stanley RG, Ushio-Fukai M, Gibbins JM, Cho J. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood* 122: 1052-61, 2013.
- Lassègue B, San Martín A, Griending KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 110: 1364-90, 2012.
- Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Santo CX. Novel role of protein disulfide isomerase in the implication of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. *Antioxid Redox Signal* 10: 1101-1113, 2008.
- Laurindo FR, de Souza HP, Pedro Mde A, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol* 352: 432-54, 2002.
- Laurindo F, Pedro MA, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL. Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res* 74: 700-709, 1994.
- Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9539-9544, 2001.

- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 4: e374, 2006.
- Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 280: 8733-8741, 2005.
- 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* 441: 513-517, 2006.
- Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE* 22:re8, 2006.
- Zai A, Rudd MA, ScribnerAW, Loscalzo J. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide *J Clin Invest* 103: 393–399, 1999.

CURRICULUM VITAE

Monica Massako Watanabe

Nascimento: 17 de fevereiro de 1983, São Paulo

Formação

Pós-Graduação – Mestrado (início: 2011)

Área: Fisiopatologia Experimental - FMUSP

Orientação: Dra. Denise de Castro Fernandes

Instituição: Laboratório de Biologia Vascular – InCor FMUSP

Graduação (2002-2007)

Curso: Graduação em Farmácia Bioquímica.

Instituição: Universidade de São Paulo, USP

Ocupação

2012 – Atual

Fleury SA

Analista de Planejamento Financeiro

2009 – 2012

Fleury SA

Analista de Laboratório (Métodos Moleculares)

2008-2009

Associação do Sanatório Sírio (HCor)

Analista de Laboratório de Análises Clínicas (Hematologia, Bioquímica - Gasometria, Urinálise e Parasitologia)

Bolsista – Iniciação Científica (2004 - 2006)

Agência Financiadora: CNPq

Orientação: Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu

Instituição: Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan

Publicações

Jesus, AA, Silva CA, Segundo GR, Aksentijevich I, Fujihira E, WATANABE MM, Carneiro-Sampaio M, Duarte AJS, Oliveira JB. Phenotype Genotype Analysis of Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes (CAPS): Description of a Rare Non-Exon 3 and a Novel CIAS1 Missense Mutation. *Journal of Clinical Immunology*, v. 28, p. 134-138, 2008.

Gomez R, Vieira M, Schattner M, Malaver E, WATANABE M, Barbosa A, Abreu P, Demorais Z, Cifuentes J, Atzingen M. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. *Microbial Pathogenesis*, v. 45, p. 315-322, 2008.

Barbosa AS, Abreu PAE, Neves FO, Atzingen MV, WATANABE MM, Vieira ML, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. *Infection and Immunity* (Print), v. 74, p. 6356-6364, 2006.