

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI

INTERAÇÃO DA QSOX1b EXTRACELULAR COM A MEMBRANA PLASMÁTICA DE  
CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA



CURITIBA

2018

PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI

INTERAÇÃO DA QSOX1b EXTRACELULAR COM A MEMBRANA PLASMÁTICA DE  
CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular,  
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2018



# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná

ATA Nº432

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos vinte e dois dias do mês de março de dois mil e dezoito, às 09h00min, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas (Anfiteatro 03), reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs. Drs. Lia Sumie Nakao, Orientadora e presidente da banca examinadora (UFPR), Sheila Maria Brochado Winnischofer (UFPR) e Juliano Bordignon (ICC), com a finalidade de julgar a Dissertação da candidata **PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI**, Intitulada: **“INTERAÇÃO DA QSOX1b EXTRACELULAR COM A MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA”**, para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. Dando início à sessão, a presidência passou a palavra à discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca examinadora então reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela “aprovação” da aluna. A Mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de Mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados pelo regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, Lia Sumie Nakao lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.  
Curitiba, 22 de março de 2018.

Examinador/Afiliação

Parecer

Assinatura

**Profa. Dra. Lia Sumie Nakao**  
Orientadora e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador interno)

aprovada

Lia Nakao

**Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer**  
Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador externo)

aprovada

Sheila Winnischofer

**Prof. Dr. Juliano Bordignon**  
Universidade ICC-Fiocruz/PR (avaliador externo)

APROVADA

Juliano Bordignon





## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI** intitulada “**INTERAÇÃO DA QSOX1b EXTRACELULAR COM A MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA**”, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de março de 2018.

**Profa. Dra. Lia Sumie Nakao**  
Orientadora e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador interno)

**Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer**  
UFPR (avaliador externo)

**Prof. Dr. Juliano Bordignon**  
ICC-Fiocruz/PR (avaliador externo)



*Dedico este trabalho aos meus pais Titto e Nelly,  
porque seu amor é meu suporte diário para continuar.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por seu amor infinito, por guiar meu caminho, por me dar paciência, sabedoria e força para não desistir.

Aos meus pais Titto e Nelly, por serem meu apoio constante e incondicional, por crer em mim.

A minha família, por me motivar e apoiar mesmo na distância.

A minha orientadora Dra. Lia Sumie Nakao, por seus ensinamentos, sua paciência, sua amizade e por confiar em mim desde o começo.

Aos professores Silvio Marques Zanata e Adriana Mercadante, pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

A minha amiga Sze, pela ajuda diária, pelas conversas, pelos bons conselhos, pela companhia e suporte nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Grécia e Erick, pela boa convivência durante esses dois anos que temos caminhado juntos.

Às minhas amigas Carla e Carol, por todos os bons momentos que temos compartilhado, pelos conselhos, risadas e bons ânimos sempre.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, Susumu, Valentin, Silvia, Karime, Soraia, Sabrina, Tassiana, Larissa, Ingrid, Juliana, Fernanda, pela boa companhia no laboratório, e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

A todos os irmãos da Família de Deus, pelos bons momentos juntos, pela ajuda e suporte espiritual.

À Organização dos Estados Americanos, a CAPES e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por terem me escolhido para realizar o mestrado.

Ao pessoal do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência do Setor de Ciências Biológicas, pela assistência na microscopia confocal.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas que no percurso deste caminho tem contribuído positivamente no meu crescimento acadêmico e pessoal.

## RESUMO

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) é uma flavoproteína predominantemente secretada cuja função biológica é pouco compreendida. Por ser extracelular, foi demonstrado que ela pode atuar na organização dos trímeros de laminina, modular a adesão e a migração de células tumorais e de fibroblastos. Nós recentemente mostramos que QSOX1 extracelular (QSOX1b) estimula a proliferação e a migração de células musculares lisas de aorta (VSMC) de rato. A proliferação independe da atividade sulfidril oxidase, diferentemente da migração, que só ocorre na presença da QSOX1b ativa. Neste contexto, nossa hipótese é que a QSOX1b se liga a proteínas na superfície celular e ativa as sinalizações que levam a estes dois processos. Neste trabalho, padronizamos condições experimentais para realizar o *crosslink* entre a QSOX1b e proteínas da VSMC. Utilizamos formaldeído como um agente estabilizador dos complexos de QSOX1b recombinante com seus possíveis ligantes, permitindo assim a captura da ligação da recombinante selvagem na membrana das VSMC (1% formaldeído, 10 min, 37°C, 1 µM). Mostramos a presença da QSOX1b recombinante selvagem nos eluatos de extratos de VSMC incubadas com a recombinante e enriquecidos em resina de Ni-NTA, após a separação eletroforética das proteínas. Para avaliar se a QSOX1b recombinante estaria interagindo com alguma proteína de membrana plasmática, o mesmo ensaio foi repetido acrescido de uma etapa de isolamento de fração de membrana celular. Os extratos de fração de membrana foram analisados por western blotting. Os resultados mostraram que o extrato das VSMC incubadas com QSOX1b selvagem, mas não das tratadas com QSOX1b mutada ou não tratadas, continha QSOX1b selvagem, indicando sua ligação a algum componente de membrana. A ligação à superfície celular também foi demonstrada por imunofluorescência indireta. VSMC aderidas ou em suspensão incubadas com QSOX1b recombinante selvagem apresentaram uma imunomarcagem positiva com anticorpo anti-QSOX. As imagens adquiridas no microscópio confocal mostraram uma marcação intensa e diferenciada nas bordas e no meio intracelular das células incubadas com 1µM de QSOX1b recombinante selvagem. Esta marcação estava ausente nas células não tratadas com QSOX1b ou tratadas com QSOX1b mutada, sugerindo que a QSOX1b extracelular seja incorporada pela VSMC, por mecanismo ainda incerto. A imunomarcagem da QSOX1 estava ausente quando a incubação era feita a 4°C. Em conjunto, estes dados evidenciam que a QSOX1b interage com moléculas da superfície celular, e parece ser internalizada de forma dependente da atividade oxidase.

Palavras chave: Quiescina sulfidril oxidase, célula muscular lisa vascular, *cross-linking*, formaldeído, superfície celular.

## ABSTRACT

Quiescin/sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) is a predominantly secreted flavoprotein whose biological function is poorly understood. Due to its extracellular localization, QSOX1b was demonstrated to act in the organization of laminin, to modulate the adhesion and migration of tumor cells and fibroblasts. We recently showed that extracellular QSOX1b stimulates proliferation and migration of rat aortic smooth muscle cells (VSMC). While proliferation is independent of its sulfhydryl oxidase activity, migration occurs only in the presence of active QSOX1. In this context, our hypothesis is that QSOX1b binds to a protein on the cell surface and activates signals that induces these two processes. In this work, we determined the experimental conditions to carry out the crosslink between QSOX1b and proteins from VSMC. We employed formaldehyde as stabilizing agent for the recombinant QSOX1b complexes with their possible ligands, thereby capturing wild-type recombinant binding on the VSMC membrane (1% formaldehyde, 10 min, 37°C, 1  $\mu$ M). We showed the presence of recombinant QSOX1b in eluates of VSMC (previously incubated with the QSOX1b) extracts and enriched by Ni-NTA resin, after an electrophoretic separation. To assess if QSOX1b was interacting with some plasma membrane protein, the same assay was done, with the inclusion of a membrane fraction isolation step. The membrane fraction's extracts were analyzed by western blotting. Results showed that the extracts from VSMC incubated with QSOX1b wt, but not with QSOX1b mut or non-treated, presented QSOX1wt, indicating its interaction with some membrane component. QSOX1b binding to cell surface was also demonstrated by indirect immunofluorescence. Adhered or suspended VSMC were incubated with QSOX1b wt and presented a positive immunostaining with anti-QSOX1 antibody. The images, acquired in a confocal microscope, showed an intense intracellular and edge staining in cells incubated with 1  $\mu$ M QSOX1b wt. This intracellular staining was absent in cells treated with QSOX1b mut or non-treated cells, suggesting that extracellular QSOX1b is incorporated into VSMC, but by an unknown mechanism. The immunostaining was absent when incubations were done at 4C. Taken together, these data indicate that QSOX1 interacts with molecules present at the cell surface, and seems to be uptaken in an activity-dependent manner.

Keywords: Quiescin-sulfhydryl oxidase, vascular smooth muscle cell, cross-linking, formaldehyde, cell surface.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS ISOFORMAS LONGA E CURTA DA QSOX1 .....	11
FIGURA 2. FLUXO DE EQUIVALENTES REDUTORES NOS CENTROS REDOX EM QSOX.....	13
FIGURA 3. REAÇÕES QUÍMICAS OCORRIDAS DURANTE O CROSS-LINKING DE BIOMOLÉCULAS COM FORMALDEÍDO .....	16
FIGURA 4. ESQUEMA DA SUBCLONAGEM DE QSOX1b MUTADA NO VETOR pET-32a .....	22
FIGURA 5. IMAGEM DA MIGRAÇÃO CELULAR A PARTIR DO TECIDO DE ARTÉRIA AORTA TORÁCICA DE RATOS WISTAR .....	27
FIGURA 6. IDENTIFICAÇÃO DAS VSMC POR IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	28
FIGURA 7. MINI EXPRESSÃO DA QSOX1b SELVAGEM (A) E QSOX1b MUTADA (B) EM 4 CLONES DE AD494 .....	29
FIGURA 8. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1b (MUTADA E SELVAGEM).....	29
FIGURA 9. SEQUENCIAMENTO DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-32a/mQSOX C455S .....	30
FIGURA 10. REAÇÕES DO MÉTODO INDIRETO DE QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE QUIESCINA SULFIDRIL OXIDASE POR FLUORESCÊNCIA CONTÍNUA.	31
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PELA OXIDAÇÃO DE DTT PELAS ENZIMAS QSOX1b SELVAGEM E QSOX1b MUTADA ...	31
FIGURA 12. PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE CÉLULAS ADERIDAS INCUBADAS COM QSOX1b E FORMALDEÍDO COMO AGENTE CROSS-LIGANTE.....	32
FIGURA 13. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO INCUBADAS COM QSOX1b (5 E 15 MINUTOS) E CROSS-LIGADAS COM FORMALDEÍDO .....	33
FIGURA 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO INCUBADAS COM QSOX1b (5 MINUTOS) E CROSS-LIGADAS COM FORMALDEÍDO .....	34

FIGURA 15. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO INCUBADAS COM QSOX1b (15 MINUTOS) E CROSS-LIGADAS COM FORMALDEÍDO .....	35
FIGURA 16. FRAÇÃO DE MEMBRANA DE VSMC PURIFICADA APÓS O CROSS-LINKING COM FORMALDEÍDO .....	36
FIGURA 17. PRESENÇA DE QSOX1b RECOMBINANTE SELVAGEM LIGADA NA MEMBRANA CELULAR FOI CONFIRMADA POR WESTERN BLOT .....	36
FIGURA 18. DETECÇÃO INTRACELULAR DE QSOX1b RECOMBINANTE.....	38
FIGURA 19. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE SELVAGEM NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS ADERIDAS.....	39
FIGURA 20. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE SELVAGEM NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO .....	39
FIGURA 21. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE NA MEMBRANA CELULAR .....	40
FIGURA 22. GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS 30 MIN DE INCUBAÇÃO COM QSOX1b RECOMBINANTES .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALR	<i>Augmenter of Liver Regeneration</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DTT	Ditiotreitol
DCFH-DA	2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
Ero	<i>Endoplasmic reticulum oxidase</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Erv	<i>Essencial for Respiration and Viability</i>
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HVA	<i>Homovanillic acid</i>
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilo Dalton
LB	Meio Luria-Bertani
MMP	Metaloprotease
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase
QSOX1a	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, isoforma longa
QSOX1b	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, isoforma curta
QSOX1b wt	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, recombinante selvagem
QSOX1b mut	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, recombinante mutada
RE	Retículo endoplasmático
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBST	Salina tamponada com Tris contendo Tween-20
TRX	Tiorredoxina
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cells</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo geral .....	17
2.2	Objetivos específicos .....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1	Reagentes.....	18
3.2	Preparo da solução de formaldeído.....	18
3.3	Cultivo primário de VSMC.....	18
3.4	Expressão e purificação de QSOX1b recombinante selvagem .....	19
3.5	Subclonagem da QSOX1b mutada.....	21
3.6	Determinação da atividade enzimática da QSOX1b recombinante selvagem e mutada .....	22
3.7	Padronização do ensaio de <i>cross-linking</i> com formaldeído.....	23
3.8	Detecção de QSOX1b por imunofluorescência indireta.....	24
3.9	Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio por Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA).....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1	Obtenção e caracterização da cultura primária de células musculares lisas vasculares .....	27
4.2	Expressão e purificação das proteínas recombinantes .....	28
4.3	Subclonagem da QSOX1b mutada no vetor pET-32a .....	30
4.4	Determinação da atividade enzimática da QSOX1b .....	30
4.5	Ensaio de <i>cross-linking</i> com formaldeído.....	32
4.6	Detecção de QSOX1b recombinante selvagem por imunofluorescência .....	36

<b>4.7 Determinação da produção de EROS pela sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA).....</b>	<b>41</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>APENDICE 1: Padrão eletroforético de VSMC aderidas submetidas ao <i>cross-linking</i> com formaldeído .....</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICE 2: Análise dos lisados proteicos após o <i>cross-linking</i> .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) é uma flavoenzima que possui atividade tioroxidase, ou seja, catalisa a oxidação de tióis a dissulfeto reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (reação 1):

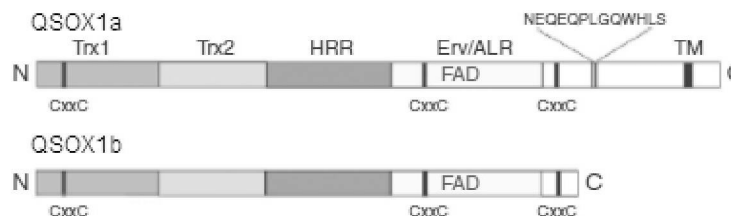


**Reação 1:** Oxidação de grupos sulfidril a dissulfetos com redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio.

FONTE: COPPOCK & THORPE (2006)

Ela é codificada pelo gene *QSOX1*, que pode sofrer processamento alternativo do transcrito, originando duas isoformas da proteína QSOX1; uma isoforma longa (QSOX1a), que possui um domínio transmembrânico na porção C-terminal (Chakravarthi *et al*, 2007), e uma isoforma curta (QSOX1b) (Radom *et al*, 2006), que é secretada. Em humanos, a isoforma QSOX1a contém 747 aminoácidos e a isoforma QSOX1b, 604 aminoácidos (Coppock & Thorpe, 2006; Kodali & Thorpe, 2010). Estruturalmente, as duas são resultado da fusão de duas grandes superfamílias: tiorredoxina (Trx) e *essential for respiration and vegetative growth* (ERV). A sequência primária da QSOX1 consiste em um domínio Trx1 na porção N-terminal, seguido de um domínio Trx2 e um domínio rico em hélices (HRR), que é exclusivo das QSOX (Coppock *et al.*, 1998). Entanto que a porção C-terminal consiste no domínio ALR/ERV (Figura 1).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS ISOFORMAS LONGA E CURTA DA QSOX1

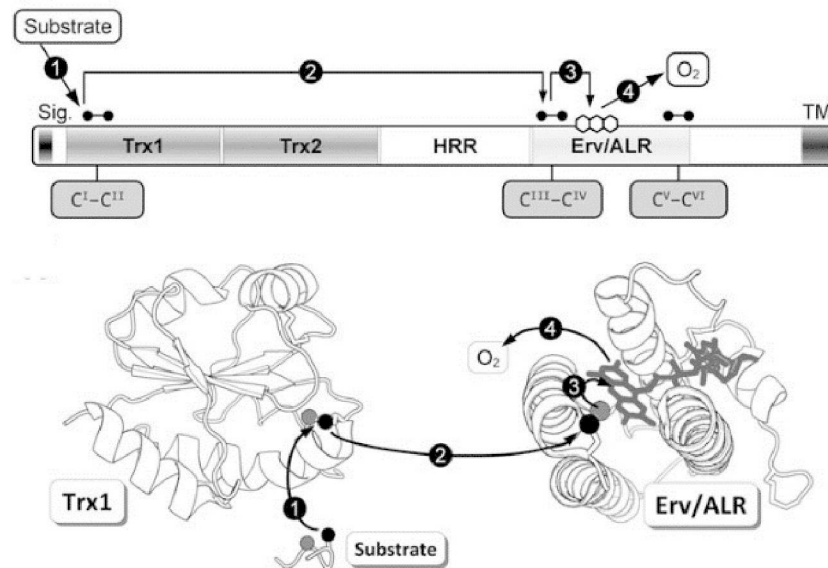


Nota: As estruturas mostram os domínios Trx1, Trx2, HRR (helix rich domain) e ERV/ALR. Os 3 motivos CxxC, a região de ligação do FAD e o domínio transmembrânico (TM) são também representados. FONTE: Figura adaptada de KODALI & THORPE (2010).

O domínio Trx1 possui um motivo CxxC (2 resíduos de cisteína flanqueando 2 resíduos de aminoácidos) conservado e redox-ativo, enquanto o domínio Trx2 apresenta pouca semelhança com a superfamília Trx (Coppock & Thorpe, 2006). Por outro lado, o domínio ERV/ALR é um módulo proteico de cerca de 80-100 aminoácidos, que possui atividade sulfidril oxidase devido à presença de um motivo CxxC conservado e um local de ligação do grupo prostético FAD. Entre as proteínas que possuem domínio ERV/ALR estão as proteínas de levedura Erv1 e Erv2, a proteína homóloga de mamíferos *augmenter of liver regeneration* ou hepatopietina (ALR ou HPO) e a proteína *endoplasmic reticulum oxidase 1* (Ero1p) (Coppock & Thorpe, 2006). A proteína Erv1p é essencial para leveduras, está presente no espaço intermembrana mitocondrial e é importante na biogênese mitocondrial. Entanto que Erv2p não é essencial para a sobrevivência da levedura, encontra-se no retículo endoplasmático (RE) e juntamente com a Ero1p, parecem participar no dobramento oxidativo no lúmen do RE (Sevier, 2012). A proteína ALR, inicialmente caracterizada como um fator importante no processo de regeneração hepática, encontra-se em diversos compartimentos celulares, como no espaço intermembrana mitocondrial (Lange *et al.*, 2001), no citossol (Hofhaus *et al.*, 1999), no núcleo (Wang *et al.*, 2004) e no meio extracelular (Wang *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000), entre suas funções, destacam-se a participação na biogênese mitocondrial (Lange *et al.*, 2001) e o estímulo mitogênico pela ALR extracelular após hepatectomia (Gandhi *et al.*, 1999), sendo este efeito específico em células hepáticas. Foi demonstrado que ALR estimula a proliferação de células de hepatoma, sinal que é iniciado por um receptor de superfície celular (Wang *et al.*, 1999), levando posteriormente à fosforilação precoce de MEK e Erk (Li *et al.*, 2000).

A atividade sulfidril oxidase está diretamente relacionada à presença dos motivos CxxC. Estudos com a QSOX1b humana recombinante mostraram que, enquanto o terceiro motivo CxxC é redox-inativo, o primeiro (C<sub>70</sub>xxC<sub>73</sub>) e o segundo (C<sub>449</sub>xxC<sub>452</sub>) motivos, localizados nos domínios TRX1 e ALR/ERV, respectivamente, são essenciais para a atividade enzimática. Sendo a transferência dos dois elétrons do substrato reduzido (tióis) na seguinte ordem: substrato reduzido → C<sub>70</sub>xxC<sub>73</sub> → C<sub>449</sub>xxC<sub>452</sub> → FAD → O<sub>2</sub> (Figura 2). Através de estudos cristalográficos foi determinado que no estado basal, a distância entre o primeiro e o segundo motivo é grande (40Å), impossibilitando uma transferência eletrônica. Mas, durante a catálise, os domínios TRX1 e ALR/ERV são reorientados e aproximados, permitindo assim a reação redox entre os resíduos de cisteínas (Alon *et al.*, 2012). Foi mostrado também que formas truncadas da QSOX1b humana recombinante, sem algumas regiões do domínio HRR ou sem a região *downstream* do terceiro motivo CxxC, perdem a capacidade de ligar FAD, e portanto, perdem sua atividade catalítica (Zheng *et al.*, 2012).

FIGURA 2. FLUXO DE EQUIVALENTES REDUTORES NOS CENTROS REDOX EM QSOX



Nota: O fluxo de equivalentes redutores de um substrato (seta 1) segue através dos dois motivos CxxC redox-ativos (seta 2), do anel de flavina (seta 3) chegando ao oxigênio molecular (seta 4). FONTE: KODALI & THORPE (2010).

Com exceção de fungos e leveduras, a QSOX1 parece estar expressa em muitos outros organismos, como *C. elegans* (Coppock *et al.*, 1998), insetos (Magalhães *et al.*, 2008), mamíferos, aves, *T. brucei* (Thorpe & Coppock, 2007), *A. thaliana* (Limor-Waisberg *et al.*, 2012; Sevier, 2012). Sua expressão também foi demonstrada em diversos locais, como trato reprodutor masculino (Ostrowski e Kestler, 1980; Benayoun *et al.*, 2001), tecido uterino (Musard *et al.*, 2001), fibroblastos de pulmão (Coppock *et al.*, 1993), ilhotas de Langerhans, glândula parótida, glândulas apócrinas da pele, células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (Coppock e Thorpe, 2006), epiderme (Matsuba *et al.*, 2002), encéfalo (Mairet-Coello *et al.*, 2004; 2005), glândula sebácea, placenta (Thorpe e Coppock, 2007) e leite bovino (Jaje *et al.*, 2007).

A nível intracelular QSOX1 foi descrita no retículo endoplasmático (mesmo quando não tem sequência de retenção no RE), complexo de Golgi e vesículas secretoras (Kodali & Thorpe, 2010). Por ter um domínio transmembrânico, a QSOX1a localiza-se no complexo de Golgi e parece participar do dobramento oxidativo intracelular de proteínas com destino extracelular (Chakravarthi *et al.*, 2007). Contudo, esta isoforma também pode sofrer um processamento proteolítico e ser secretada da célula (Rudolf *et al.*, 2013). Entanto que a QSOX1b apresenta-se no Golgi, mas predominantemente no meio extracelular, como demonstrado no líquido seminal

de rato (Benayoun *et al.*, 2001), pela presença (Zanata *et al.*, 2005) e atividade (Israel *et al.*, 2014) em soro de mamífero.

A presença da QSOX1 foi também demonstrada em células tumorais de próstata (Ouyang *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009), mama (Pernodet *et al.*, 2012; Katchman *et al.*, 2013; Soloviev *et al.*, 2013; Knutsvik *et al.*, 2016), pâncreas (Antwi *et al.*, 2009; Katchman *et al.*, 2011), fígado (Zhang *et al.*, 2016) e neuroblastoma (Araújo *et al.*, 2014). Hanavan e colaboradores (2015) observaram uma diminuição significativa da invasão de células tumorais de pâncreas (*in vitro*) e redução de tumor em rim (*in vivo*) quando a atividade enzimática da QSOX1 foi inibida com Ebselen, um composto de organoselênio de conhecida atividade anti-inflamatória e antioxidante. A sua alta expressão nesses tipos celulares indica que QSOX1 está relacionada diretamente com a progressão tumoral, devido à ativação da proliferação celular e de metaloproteases (Katchman *et al.*, 2011; 2013). Porém artigos anteriores demonstraram que a QSOX1 regula negativamente o ciclo celular (Coppock *et al.*, 1993; 2000; Musard *et al.*, 2001; Hellebreckers *et al.*, 2007). Também foi levantada a hipótese da QSOX1 inibir a autofagia e em consequência reduzir a invasão celular e crescimento tumoral (Poilet *et al.*, 2014). Portanto o papel da QSOX1 no câncer ainda não está bem esclarecido e sua função pode ser diferente dependendo do tipo e estágio do tumor. Acredita-se que a isoforma predominante nestes locais seja a QSOX1b, pois parece que a expressão da QSOX1a é exclusiva do tecido cerebral (Radom *et al.*, 2006).

Nosso grupo mostrou que a QSOX1 está presente em tecidos fetais, como soro (Zanata *et al.*, 2005) e aqueles derivados dos folhetos mesodérmico e ectodérmico (Portes *et al.*, 2008). Nesse trabalho, mostramos ainda que a expressão desta enzima em tecidos epiteliais aumenta durante o desenvolvimento fetal, indicando um papel regulatório na programação embriogênica.

Todos esses dados de atividade e expressão não conseguem esclarecer as possíveis funções da QSOX1. Devido a atividade sulfidril oxidase, acredita-se que o dobramento oxidativo de proteínas secretadas seja um papel importante da QSOX1, mas poucas evidências experimentais mostraram de forma clara esta função. Foi demonstrado também que QSOX1 recombinante extracelular é importante para incorporar trímeros solúveis de laminina na matriz extracelular, em um processo que depende da atividade sulfidril oxidase (Ilani *et al.*, 2013).

A QSOX1 tem sido descrita no sistema cardiovascular, foi detectada em sobrenadantes de células musculares lisas e células progenitoras de músculo liso em abordagens proteômicas (Simper *et al.*, 2010), na área necrótica de placas ateroscleróticas (de Andrade *et al.*, 2011) e é considerada como possível marcador de insuficiência cardíaca (Mebazaa *et al.*, 2012). Além disso, foi mostrado que a proteína dissulfeto isomerase (PDI), que junto com QSOX1 participa no

dobramento oxidativo e isomerização de proteínas, (Rancy e Thorpe, 2008), regula também a atividade da NADPH oxidase vascular (Janiszewski *et al.*, 2005), que é uma proteína chave no processo de reparo vascular após lesão por cateter balão (Szocs *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009). Neste contexto, nosso grupo reportou que a expressão da QSOX1 é alta no tecido neointimal produzido após lesão por cateter-balão em carótidas de rato, sendo parcialmente responsável pelo crescimento da neointima (Borges, 2015). Os estudos *in vitro*, com células musculares lisas vasculares (VSMC), mostraram que a QSOX1 extracelular induz um aumento na proliferação e na migração destas células, através de processos independente e dependente da atividade sulfidril oxidase, respectivamente (Borges, 2015).

A identificação de interações proteína-proteína é um primeiro passo para revelar os mecanismos subjacentes aos processos biológicos. Sabe-se que poucas proteínas funcionam sozinhas, e a maioria requer interação com outras proteínas, na forma de complexos proteicos transientes ou estáveis. As proteínas tendem a formar vários complexos que estão constantemente se associando e dissociando. Essas interações transientes proteína-proteína, tais como a ligação reversível de enzima-substrato e as interações do ligante-receptor, são fundamentais a muitos processos biológicos (Zhu *et al.*, 2014).

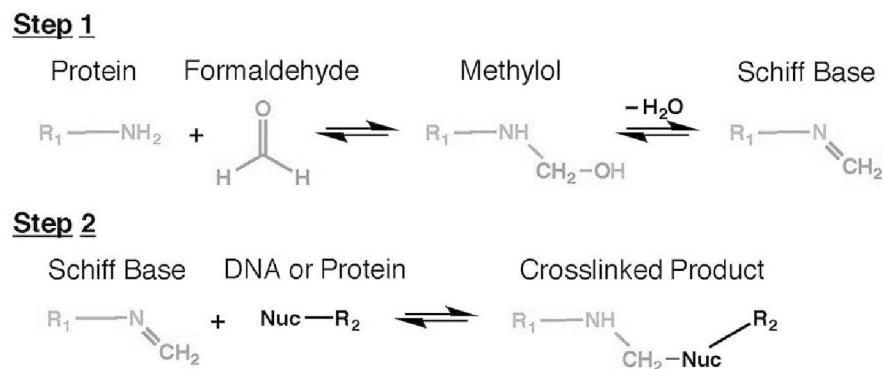
O *cross-linking* com formaldeído é um método de alto rendimento, útil para estudar interações proteína-proteína *in situ* e para capturar interações fracas e transientes (Zhu *et al.*, 2014).

Além de ser simples e barato, muitas outras características fazem do formaldeído um reagente útil para a detecção de interações proteína-proteína. Em primeiro lugar, os *cross-links* tem uma curta distância (2 Å), de modo que as proteínas que estão ligadas devem estar em estreita proximidade física. Em segundo lugar, o formaldeído permeia a membrana celular e é bastante inespecífico, tornando-o útil para detectar uma grande variedade de interações. Em terceiro lugar, é sabido que o formaldeído inativa as enzimas quase imediatamente depois da adição às células, o que forneceria uma captura instantânea das interações no momento da adição. Em quarto lugar, uma vez que a reação de ligação foi completada, o produto pode ser submetido a condições não fisiológicas e ainda manter sua integridade estrutural. Finalmente, os *cross-links* são reversíveis, permitindo uma análise posterior dos componentes dentro de um complexo (Vasilescu *et al.*, 2004).

O formaldeído reage com macromoléculas em várias etapas (Figura 3). Em um primeiro passo, um grupo nucleófilo, um aminoácido ou em uma base de DNA forma uma ligação covalente com formaldeído, resultando em um aduto de metilol, que logo é convertido em uma base de Schiff. Metilóis e bases de Schiff podem se decompor rapidamente ou podem ser

estabilizados em um segundo passo químico envolvendo outro grupo funcional, muitas vezes em outra molécula, levando à formação de uma ponte metileno. Pode se formar uma ponte de metileno entre um grupo exposto numa macromolécula e uma molécula pequena em solução tal como glicina, que é frequentemente utilizada como um agente bloqueador de formaldeído. Alternativamente, também pode se formar uma ligação covalente ligando grupos funcionais em duas macromoléculas diferentes (Hoffman *et al.*, 2015).

FIGURA 3. REAÇÕES QUÍMICAS OCORRIDAS DURANTE O CROSS-LINKING DE BIOMOLÉCULAS COM FORMALDEÍDO



Nota: O cross-linking com formaldeído ocorre em duas etapas. Em primeiro lugar, o formaldeído reage com um nucleófilo relativamente forte, mais comumente uma lisina de uma proteína. Esta reação forma um intermediário de metilol que pode perder água para produzir uma base de Schiff (uma imina). Em segundo lugar, a base de Schiff reage com outro nucleófilo, que pode ser outra proteína ou um grupo amino de uma base de DNA, para gerar um produto cross-ligado. FONTE: HOFFMAN *et al.*, (2015).

Diferentes trabalhos demonstraram a eficiência do formaldeído como agente *cross*-ligante de interações transientes proteína-proteína, identificando ligantes novos e confirmando outros já descritos de proteínas M-Ras (Vasilescu *et al.*, 2004), albumina de soro humano (Zhu *et al.*, 2014), integrina  $\beta 1$  (Klockenbusch & Kast, 2010), proteínas associadas a nucleóides (Rajala *et al.*, 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a interação de QSOX1 recombinante exógena com proteínas de células musculares lisas de aorta.

### 2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o ensaio de *cross-linking* químico com formaldeído.
- Avaliar a detecção de interações da QSOX1b recombinante e proteínas da superfície de células musculares lisas através do ensaio de *cross-linking* químico.
- Detectar a ligação de QSOX1b recombinante através de ensaios de imunofluorescência indireta.
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pela sonda diclorofluoresceína diacetato

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Para cultura celular utilizaram-se Tripsina-EDTA 0,05%, DMEM alta glicose, soro fetal bovino todos obtidos da Gibco Life Technologies. Os anticorpos utilizados para imunofluorescência e western blot foram anti-actina de musculo liso (Sigma-Aldrich A5228), anti-QSOX (soro hiperimune de coelho) (descrito em Portes *et al.*, 2008), anti-mouse Alexa flúor 488 (Molecular Probes A11001), anti-coelho Alexa flúor 488 (Molecular Probes A11003), anti-coelho HRP (Sigma-Aldrich A0545), e os marcadores fluorescentes DAPI (Sigma-Aldrich D9542, estoque 1 mg/mL) e Lectina WGA (Thermo Fisher) (doado pelo Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados). Para determinar atividade enzimática, os reagentes utilizados foram ácido homovanílico (HVA), peroxidase de raiz forte (HRP) ditioneitol (DTT) e peróxido de hidrogênio, todos obtidos da Sigma-Aldrich. Os kits para extração de DNA foram GeneJET Gel Extraction e GeneJET Plasmid Miniprep da Fermentas. As cepas bacterianas utilizadas foram Nova Blue e AD494 da Novagen. Para purificar as proteínas com His-Tag foram utilizadas resinas de Níquel-NTA agarose da Qiagen. Os géis foram corados usando o Kit Pierce Silver Stain (Thermo Fisher). A sonda 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato foi obtida da Sigma-Aldrich.

#### 3.2 Preparo da solução de formaldeído

A solução de formaldeído foi preparada dissolvendo 4% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) em PBS a 60°C durante 2 horas sob agitação. Após o pH ter sido ajustado a 7,2, a solução foi filtrada (0,2 µm) e estocada em -20°C, protegido da luz, no máximo por 4 semanas.

#### 3.3 Cultivo primário de VSMC

Células musculares lisas de aorta de rato (VSMC) foram obtidas pelo método de explante (adaptado de Kirschenlohr *et al.*, 1996), a partir de ratos Wistar machos com 200 g (cerca de 2 meses de idade). A aorta foi coletada e transferida para um tubo contendo PBS e antibiótico gentamicina 40 µg/mL. Após a remoção da camada adventícia, a artéria foi cortada longitudinalmente e as células endoteliais removidas mecanicamente. Em seguida, foi cortada em fragmentos de 1 mm<sup>2</sup>, e cerca de 2-5 explantes foram plaqueados em placas de 24 poços (com inibidor de fibroblastos, Falcon 3847) e cobertos com gotas de meio DMEM alta glicose contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina 40 µg/mL. Após o período de 6 horas,

foi acrescentado 0,2 mL de meio completo. A cada 3 dias, aproximadamente 0,1 mL do meio foi removido e repostado com meio fresco até à migração das VSMC para a placa, o que levou cerca de 3 a 5 dias. Quando uma alta confluência foi atingida ao redor dos explantes (cerca de 7 dias), as células foram coletadas com tripsina e replaqueadas em placas de 60 ou 100 mm de diâmetro. A partir daqui, o cultivo seguiu como de rotina, usando DMEM com 10% SFB e gentamicina. As células foram utilizadas nos ensaios até a passagem 7. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná com o protocolo N° 1053/2017.

A identidade das VSMC foi confirmada através do ensaio de imunofluorescência pela detecção da expressão de actina de músculo liso. Para isso, foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células em lamínulas de 13 mm diâmetro (Knittel). No dia seguinte, foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min. Os grupos aldeídos foram bloqueados com glicina 0,1 M por 5 minutos e a permeabilização da membrana foi feita juntamente com o bloqueio (saponina 0,01% e albumina bovina 1% em PBS) por 1 h. Após a incubação com anticorpo primário actina de músculo liso (1:250) na solução de bloqueio por 1 h, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado a um fluoróforo (anti-mouse Alexa flúor 488, Molecular Probes ab150113) por 50 min na solução de bloqueio. Após 3 lavagens com PBS, os núcleos foram corados e a lâmina foi montada com DAPI (1:1000 – glicerol 50% em PBS). As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal multifóton, modelo A1 MP+, marca Nikon (NIKON Instruments Inc., Tóquio, Japão) utilizando objetiva de 20x e 60x (com abertura numérica de 0.75). Os filtros utilizados para FITC foram: excitação de 525/50 nm e emissão com intervalo entre 500-550 nm; já para DAPI foram: excitação de 450/50 nm e emissão com intervalo entre 425-475 nm.

### **3.4 Expressão e purificação de QSOX1b recombinante selvagem**

Bactérias eletrocompetentes da cepa AD494 foram transformadas por eletroporação com o vetor pET-32a QSOX, contendo o inserto para a forma selvagem (Borges *et al.*, 2015). Após a eletroporação, as bactérias foram recuperadas em 1 mL de meio SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM e glicose 20 mM) sem antibiótico e então incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB/Agar (extrato de levedura 5 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, ágar 15 g/L, pH 7,4) contendo canamicina 30 µg/mL e ampicilina 30 µg/mL.

Das colônias que cresceram no meio sólido, foram selecionadas 4 colônias isoladas e inoculadas em 10 mL do meio LB com canamicina (30 µg/mL) e ampicilina 30 (µg/mL). As culturas foram incubadas por 16 horas a 37°C sob agitação. A cultura saturada foi diluída 1:50 em 10 mL de meio LB e incubadas a 37°C sob agitação constante até atingirem uma densidade ótica (D.O.) de 0,4 - 0,6 em 550 nm. Após atingirem a absorvância desejada, foi separado 1 mL para controle não-induzido da expressão e foi adicionado no restante IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,1 mM para a indução da expressão da proteína recombinante, por 4 horas a 30°C. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram separadas em SDS-PAGE e o gel corado com azul de Coomassie. Após análise dos géis, o clone com maior expressão foi selecionado e utilizado para a expressão em larga escala.

A colônia de interesse foi pré-inoculada em 15 mL de meio LB e incubado por 16 horas a 37°C sob agitação. Dessa cultura saturada, foi realizada a inoculação em uma diluição 1:50 em meio LB novo e quando as culturas bacterianas atingiram a D.O.<sub>600nm</sub> entre 0,4-0,6 a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de IPTG na concentração final de 0,1 mM por 16 horas a 20°C. Seguindo o período de indução, a cultura resultante (1 litro) da expressão foi sedimentada por centrifugação a 4000 xg por 30 minutos e o pellet lavado duas vezes por centrifugação com água deionizada gelada. Após as lavagens, o sedimento de bactérias foi armazenado em -80° C.

As bactérias foram ressuspendidas e lisadas em tampão de lise nativo gelado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0; acrescido de PMSF 1 mM e FAD 50 µM) em prensa de French (1000 psi). Em seguida o lisado bacteriano foi submetido à centrifugação a 30000 rpm, 4°C por 30 minutos para clareamento. A purificação da proteína recombinante foi feita por IMAC em coluna de Ni-NTA agarose (Qiagen) previamente equilibrada em tampão nativo contendo imidazol 10 mM. O lisado clareado foi passado pela coluna de Ni<sup>2+</sup>. O lisado que passou pela coluna foi coletado e chamado de void. A coluna foi então lavada três vezes com tampão nativo contendo 20 mM de imidazol (3 mL/lavagem). Finalmente, a proteína foi eluída da resina com 3 mL tampão nativo contendo 250 mM de imidazol. Alíquotas de todas as etapas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 10% e o gel corado com azul de comassie.

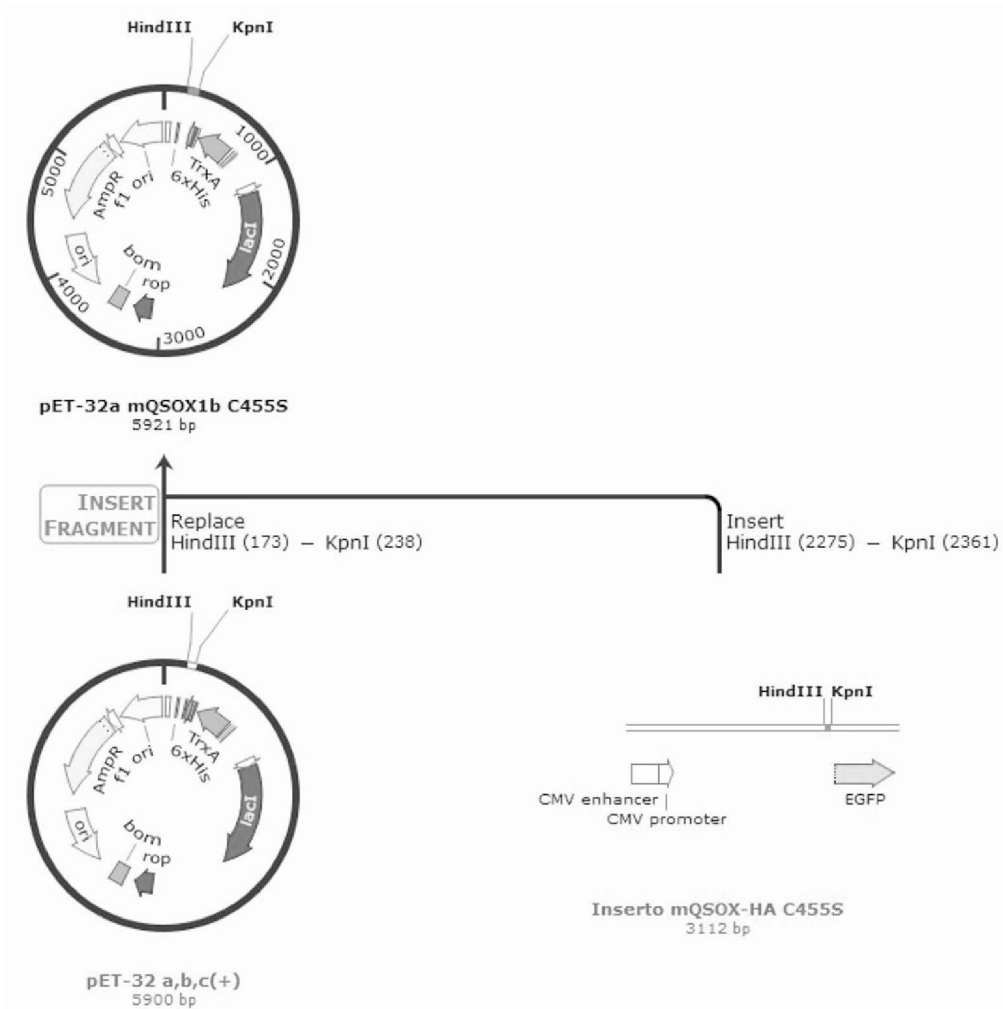
A proteína recombinante foi dialisada com PBS 0,1x e sua concentração foi determinada através da absorvância em 456 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{456nm} = 12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Heckler *et al.*, 2008a). A funcionalidade da proteína foi avaliada por sua atividade DTT oxidase (Raje *et al.*, 2002). Alíquotas da proteína wtQSOX foram estocadas a -80°C em 10% de glicerol e a cada nova preparação, ou caso a proteína ficasse estocadas por mais de 1 mês, ela passou por análise de atividade enzimática.

### 3.5 Subclonagem da QSOX1b mutada

A mutação da QSOX1b substituindo um resíduo de serina pela cisteína da posição 455 em camundongo (ou equivalente à 452 em humano) gera a perda da atividade sulfidril oxidase. O plasmídeo de QSOX1b recombinante de camundongo C455S (CxxS), foi obtido através da subclonagem do inserto amplificado de pcDNA 3.1/mQSOX-HA C455S (utilizado para expressão em eucariotos) (Lo, 2013; dados não publicados) usando os primers específicos 5'-GGGGTACCTACTCGTCCTCTGAC-3' (sense) e 5'-CCCAAGCTTTCAAGAAGAGTCTATGACGAT-3' (antisense), no vetor pET-32a (para expressão em procariotos).

O vetor pET32a e o inserto mutado foram submetidos a dupla digestão com as enzimas de restrição *Kpn-I* e *Hind-III*. Os produtos de ambas as digestões foram submetidos à corrida eletrofóretica em gel de agarose 1%. As bandas correspondentes foram extraídas com o kit GeneJET Gel Extraction. A reação de ligação do inserto mQSOX C455S no vetor pET 32a+ foi realizada seguindo protocolo estabelecido no pET System Manual (Novagen). Para isso, 1pmol do vetor e 5pmol do inserto foram incubados a temperatura ambiente por 1 hora com T4 DNA ligase obtendo-se assim o vetor de expressão pET32a/mQSOX C455S. Desta mistura reacional foram usados 10 µL para transformar a cepa Nova Blue quimiocompetente. Estas bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido contendo canamicina e então 4 colônias foram inoculadas em meio líquido. O DNA foi isolado com o kit GeneJET Plasmid Miniprep. Posteriormente, depois de confirmar a clonagem por sequenciamento, as bactérias eletrocompetentes da cepa AD494 foram transformadas por eletroporação com este vetor e a purificação da QSOX1b recombinante mutada foi realizada conforme o protocolo já descrito no item anterior.

FIGURA 4. ESQUEMA DA SUBCLONAGEM DE QSOX1b MUTADA NO VETOR pET-32a



Nota: Inserto mQSOX-HA C455S amplificado a partir do vetor pCDNA 3.1, digestão com enzimas *Hind-III* e *Kpn-I* do inserto e do plasmídeo pET32a. Ligação formando o vetor pET32a mQSOX-HA C455S, posteriormente sequenciado e transformado na cepa AD494 para purificação da proteína recombinante. Imagem desenhada no software Snapgene 4.0.5. FONTE: O autor (2017).

### 3.6 Determinação da atividade enzimática da QSOX1b recombinante selvagem e mutada

Foi utilizado um método fluorescente, já descrito para medir atividade de QSOX (Raje *et al.*, 2002). Ele se baseia na oxidação do ácido homovanílico a um dímero fluorescente, pela peroxidase de raiz forte (HRP) na presença de peróxido de hidrogênio. Como a atividade sulfidril oxidase gera peróxido de hidrogênio, a taxa de formação do dímero fluorescente se relaciona com a taxa de formação do peróxido.

Este ensaio foi realizado em microplacas, conforme descrito em Borges e colaboradores (2015), no qual as proteínas recombinantes de QSOX1b selvagem e mutada (CxxS e SxxC) foram adicionadas (em concentração final de 0,2  $\mu\text{M}$ ) a uma mistura reacional que consistiu de tampão fosfato 50 mM, EDTA 0,3 mM, pH 7,4 e um mix contendo ácido homovanílico (HVA) 1 mM, peroxidase de raiz forte (HRP) 1,4  $\mu\text{M}$  e o substrato ditioneitol (DTT) 0,15 mM. A fluorescência da reação foi monitorada pelo espectrofluorímetro Tecan i-control M-200, utilizando os seguintes parâmetros:  $\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 320\text{nm}$ , 27°C. A partir de uma curva padrão de calibração com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6  $\mu\text{M}$ ), foi calculada a velocidade de produção de peróxido de hidrogênio.

### 3.7 Padronização do ensaio de *cross-linking* com formaldeído

Seguindo os protocolos de *cross-linking* químico propostos por Vasilescu e colaboradores (2004) e Klockenbusch & Kast (2010), a padronização foi iniciada testando diferentes concentrações e tempos de incubação com a proteína recombinante e o reagente *cross*-ligante.

Os primeiros testes foram feitos com células aderidas. Para isso,  $10^5$  células foram plaqueadas em placas de cultura de 35 mm um dia antes do ensaio em meio completo. No dia seguinte, depois de duas lavagens com PBS aquecido, as células foram incubadas com 1 mL de 200, 500 e 1000 nM de QSOX1b selvagem ou outras proteínas irrelevantes como controle negativo nas mesmas concentrações, por 1, 5, 10, 15 ou 30 min a 37°C. Após estes tempos, formaldeído em concentração final de 0,8% foi adicionado à solução de QSOX1b e incubado por 10 ou 15 min a 37 °C. Após três lavagens com PBS aquecido, a reação foi bloqueada com glicina 125 mM durante 5 min. Finalmente as células foram desaderidas da placa com ajuda de um raspador e lisadas com 1 mL de tampão RIPA (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, deoxicolato de sódio 0,5%) acrescido de ureia 6M, imidazol 20 mM e PMSF 1 mM, por 50 minutos no gelo. Após centrifugação em microcentrífuga (13000 rpm, 30 min, 4°C), o lisado celular foi transferido para novo microtubo. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford. Quantidades iguais de massa de proteína (50  $\mu\text{g}$ ) foram incubadas com (12,5  $\mu\text{L}$ ) resinas de  $\text{Ni}^{2+}$  por 2 h a 4°C sob leve agitação. As resinas foram então lavadas cinco vezes com tampão RIPA, e incubadas com tampão de amostra. As suspensões foram fervidas ou não e os sobrenadantes foram submetidos à separação eletroforética em geis de poliacrilamida 10% no sistema MiniProtean3 (BioRad). A separação foi obtida aplicando-se uma corrente constante de

15 mA até a entrada das proteínas no gel de separação, a partir do qual a corrente foi aumentada para 25 mA. As bandas foram coradas com prata, usando o kit Silver Stain.

Os testes posteriores foram realizados com células em suspensão. As células plaqueadas em placas de 100 mm com confluência aproximada de 80% foram lavadas duas vezes com PBS aquecido e incubadas com PBS contendo EDTA 10 mM por 5 min a 37°C. Após esse tempo e com ajuda de um raspador, as células foram desaderidas das placas, lavadas duas vezes com PBS por centrifugação e foram deixadas na incubadora durante 1 hora para sua recuperação. Depois da contagem em câmara de Neubauer,  $10^5$  células foram incubadas com 250 e 500 nM de QSOX1 recombinante selvagem ou com uma proteína irrelevante como albumina bovina, por 5 e 15 min em PBS a 37°C. Após este período, formaldeído foi imediatamente adicionado à suspensão em uma concentração final de 1% e incubado por 10 min sob leve agitação. A reação foi imediatamente bloqueada com glicina em concentração final de 125 mM. As células foram lavadas com PBS gelado três vezes e lisadas com tampão RIPA. A partir daí o protocolo foi feito como é descrito acima.

Finalmente, também analisamos as frações de membrana isoladas de células em suspensão incubadas com QSOX1b recombinante e com formaldeído como descrito acima. Para isso, após o *cross-linking*, bloqueio e lavagens, o *pellet* celular foi ressuscitado em tampão de lise (Tris 50 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, PMSF 1mM) e submetido a cinco ciclos de sonicação de 15 segundos cada. O lisado foi centrifugado por 15 min a 18000 xg a 4°C e logo de coletar o sobrenadante, este foi centrifugado a 100.000 xg por 1 hora, 4°C. O *pellet* obtido correspondente a fração de membrana foi ressuscitado no mesmo tampão de lise e a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blot para detectar se QSOX1b recombinante estava ligada à fração de membrana. Os anticorpos utilizados foram, primário: Anti-QSOX (1:500) e secundário: Anti-coelho conjugado com HRP (1:4000).

### 3.8 Detecção de QSOX1b por imunofluorescência indireta

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em células musculares lisas de aorta, tanto aderidas em lamínulas quanto em suspensão. No ensaio com células aderidas, foram plaqueadas  $2,5 \times 10^4$  células em lamínulas de 13 mm diâmetro e no dia seguinte foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 1  $\mu$ M de QSOX1b recombinante, por 5 min a 37°C ou 4°C. Após uma lavagem com PBS, foram fixadas com formaldeído 2% por 20 min e os grupos aldeídos bloqueados com glicina 125 mM por 5 min. O bloqueio foi feito com 1% BSA – PBS por

1 h. Após a incubação com anticorpo primário Anti-QSOX (descrito em Portes *et al.*, 2008) 1:250 na solução de bloqueio por 1 h, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas mais uma vez por 1 h. Depois foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, acoplado a um fluoróforo (1:500), por 50 min na solução de bloqueio. Após três lavagens com PBS, a lamínula foi montada com DAPI (1:1000 – glicerol 50%). Como controle de marcação de membrana plasmática, foi utilizada lectina de germen de trigo conjugada ao fluoróforo TRITC (WGA) em concentração 1:400. A incubação foi feita por 30 min após da incubação com o anticorpo secundário.

Para os ensaios com células em suspensão, as células aderidas na placa foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com PBS contendo EDTA 10 mM por 5 min a 37°C. Após esse tempo e com ajuda de um raspador, as células foram desaderidas e lavadas por centrifugação duas vezes com PBS aquecido. Depois da contagem em câmara de Neubauer,  $7 \times 10^4$  células foram incubadas com 1  $\mu$ M de QSOX1b recombinante por 5 min em PBS a 37°C. Formaldeído (solução estoque 4%) foi imediatamente adicionado à suspensão em uma concentração final de 1% e incubado por 10 min sob agitação. A reação foi imediatamente bloqueada com glicina em concentração final de 125 mM. Após duas lavagens com PBS por centrifugação, o pellet celular foi ressuspenso em 4% BSA – PBS e centrifugado 2 min na citocentrífuga Cytopro Rotor para deixar as células aderidas na lâmina. Após nova fixação com formaldeído 2% por 20 min, as lâminas foram bloqueadas com glicina 125 mM seguida de 1% BSA – PBS por 1 h. A incubação com os anticorpos e montagem foram realizadas como descrito com as células aderidas.

As imagens foram adquiridas em um microscópio a laser confocal multifóton, modelo A1 MP+, marca Nikon (NIKON Instruments Inc., Tóquio, Japão) utilizando objetiva de 60x. Os filtros utilizados para FITC foram com excitação de 525/50 nm e emissão com intervalo entre 500 – 550 nm; já para DAPI excitação de 450/50 nm e emissão com intervalo entre 425 – 475 nm.

### **3.9 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio por Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)**

A sonda 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) é inicialmente lipofílica não fluorescente. Após difundir e atravessar a membrana celular, é desacetilada pelas esterases intracelulares tornando-se impermeável à membrana celular e ficando disponível para reagir com espécies oxidantes. Uma vez oxidada gera diclorofluoresceína fluorescente, com comprimentos de onda de excitação em 485 nm e emissão em 530 nm (Chen *et al.*, 2010).

Para este ensaio, foram plaqueadas como de rotina  $2 \times 10^4$  células/poço em placas pretas de 96 poços. As células aderidas foram carenciadas com meio DMEM contendo 0.1% de

soro fetal bovino *overnight* antes do ensaio. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com 10  $\mu$ M DCFH-DA em PBS, por 30 minutos a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub> na ausência de luz. As células foram lavadas com PBS aquecido por três vezes para remover DCFH-DA extracelular e incubadas com 100 e 200 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada em PBS. A fluorescência dos poços foi imediatamente monitorada pelo espectrofluorímetro Tecan i-control M-200 a 37° C, nos comprimentos antes indicados.

Como controle positivo, as células foram incubadas com PDGF 20 ng/ml (PeproTech) e DCFH-DA ou 100 e 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e DCFH-DA. Células em PBS e DCFH-DA foram controle negativo ou basal. Cada amostra foi analisada por triplicata. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA com *pos-hoc* Dunnett, com  $p > 0.05$ , no software GraphPad Prism 6.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtenção e caracterização da cultura primária de células musculares lisas vasculares

O primeiro passo para iniciarmos os experimentos foi a obtenção das células musculares lisas da artéria aorta de ratos Wistar. Entre o terceiro e quinto dia após o plaqueamento dos explantes, as células começam a migrar do explante para a placa, como se observa na figura 5.

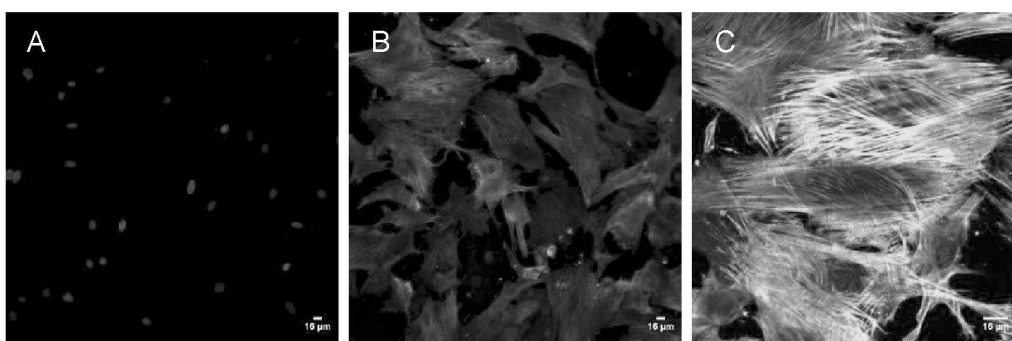
FIGURA 5. IMAGEM DA MIGRAÇÃO CELULAR A PARTIR DO TECIDO DE ARTÉRIA AORTA TORÁCICA DE RATOS WISTAR



Nota: Imagem do microscópio óptico, na objetiva de 10x. Seta: explante do tecido muscular da aorta de rato. FONTE: O autor, 2016.

A identidade das células musculares lisas em culturas primárias de aorta de rato foi confirmada pelo método de imunofluorescência indireta para marcação da proteína contrátil alfa-actina de músculo liso. A imunomarcação observada na figura 6 mostra em verde as fibras de alfa actina de músculo liso e em azul os núcleos corados por DAPI. Desse modo, foi possível verificar a homogeneidade celular encontrada nas culturas primárias, sendo apropriado o emprego das mesmas neste estudo.

FIGURA 6. IDENTIFICAÇÃO DAS VSMC POR IMUNOFLUORESCÊNCIA



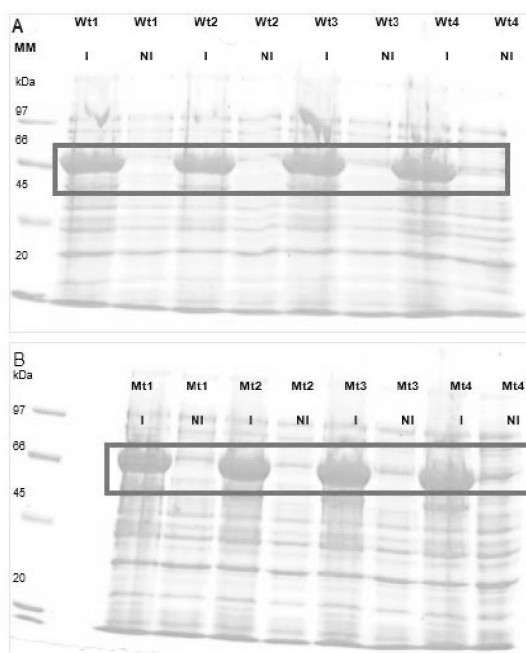
Nota: A identidade das VSMC foi confirmada pela detecção de alfa actina de músculo liso. Os anticorpos utilizados foram: primário: monoclonal anti alfa-actina de músculo liso (1:250) e secundário: anti-IgG de camundongo acoplado a um fluoróforo (1:500). As imagens foram captadas no microscópio a laser confocal, com objetivas de 20x (A, B) e 60x (C). A imagem do lado esquerdo é o controle negativo, incubada apenas com anticorpo secundário e corado com DAPI. FONTE: O autor, 2016.

#### 4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As bactérias eletrocompetentes da cepa AD494 foram transformadas com o vetor pET-32a QSOX, contendo o inserto para a forma selvagem, e com o vetor pET-32a QSOX mut452 (SxxC) ou pET-32a QSOX mut455 (CxxS) contendo o inserto para a forma inativa da proteína de camundongo. Os resultados da expressão em pequena escala (mini expressão) mostraram que todos os clones apresentaram uma boa expressão da proteína QSOX1b (Figura 7). Portanto, foram escolhidos um clone aleatório de cada proteína recombinante para a expressão em larga escala.

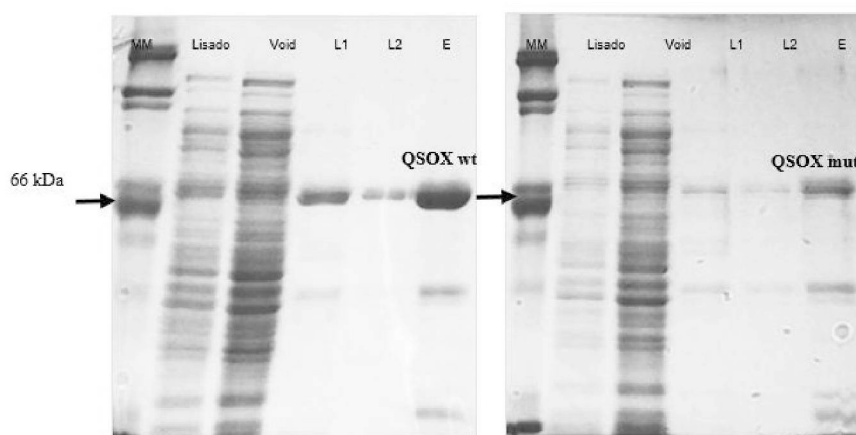
Após a lise em prensa de French, foi feita a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). Amostras das diversas etapas do processo de purificação das proteínas recombinantes QSOX1b selvagem e QSOX1b mutada foram coletadas e separadas em gel SDS-PAGE 10%, os quais foram corados com azul de Coomassie (Figura 8). É possível verificar que os eluatos apresentam majoritariamente bandas com as massas moleculares esperadas para as proteínas recombinantes. As concentrações médias encontradas por espectrofotometria foram de 20 e 25  $\mu$ M para as formas selvagem e mutada, respectivamente. Foi observado também que as concentrações médias obtidas por fotometria (no comprimento de onda de absorção do grupo FAD) foram consistentemente 30% mais altas que as concentrações determinadas por Bradford.

FIGURA 7. MINI EXPRESSÃO DA QSOX1b SELVAGEM (A) E QSOX1b MUTADA (B) EM 4 CLONES DE AD494



Nota: Pode-se observar que logo de 4 horas de indução com IPTG 0,1 mM, todos os clones mostram uma alta taxa de expressão da QSOX1b em comparação com os que não foram induzidos. A recombinante QSOX1b mutada representa a mutação CxxS. I: induzido; NI: não induzido (pré-indução). FONTE: O autor, 2016

FIGURA 8. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1b (MUTADA E SELVAGEM)



Nota: Bactérias eletrocompetentes AD494 foram transformadas com o vetor para a expressão da proteína recombinante QSOX1b (mutada e selvagem) e induzidas a expressar a proteína com 0,1mM de IPTG por 16 horas a 30°C. As bactérias foram lisadas em prensa de French com tampão de lise nativo (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) e, em seguida, purificadas por cromatografia de afinidade a resina Ni-NTA agarose. O lisado, void, lavagens (L1 e L2) e eluato (E) das duas proteínas foram submetidos a SDS-PAGE 10% e corados com azul de Comassie. FONTE: O autor, 2016.

### 4.3 Subclonagem da QSOX1b mutada no vetor pET-32a

QSOX1b com uma mutação na segunda cisteína do segundo motivo CxxC foi subclonado em vetor pET32a. Para isso, QSOX1b CxxS no vetor pcDNA3.1 foi amplificada e inserida no vetor pET32a, obtendo-se assim o vetor de expressão pET32a/mQSOX C455S. Após o sequenciamento (Figura 9), foi possível verificar o resíduo de serina substituindo a cisteína da posição 455. Essa subclonagem foi realizada para fazer a expressão em procaríoto, permitindo assim, a produção da proteína recombinante mutada, que, segundo Heckler *et al.* (2008) não possui atividade sulfidril oxidase residual.

FIGURA 9. SEQUENCIAMENTO DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-32a/mQSOX C455S

QSOX_WT	CACTTCCGGGGTTTCCCTGCTCACTGTGGGTCCTCTTCCACTTCCTGACGGTGCAGGCA	1611
T7rev	CACTTCCGGGGTTTCCCTGCTCACTGTGGGTCCTCTTCCACTTCCTGACGGTGCAGGCA	657
*****		
QSOX_WT	AACCGATATAGTGAGGCCCAACCACAGGAACCAGCTGATGGCCAGGAGGTCCCTCCAAGCC	1671
T7rev	AACCGATATAGTGAGGCCCAACCACAGGAACCAGCTGATGGCCAGGAGGTCCCTCCAAGCC	717
*****		
QSOX_WT	ATGAGGAGCTATGTTTCAGTTCCTCTTTGGCAGTCGTGACTGTGCGGACCATTTTGAGCAG	1731
T7rev	ATGAGGAGCTATGTTTCAGTTCCTCTTTGGCAGTCGTGACTGTGCGGACCATTTTGAGCAG	777
*****		
QSOX_WT	ATGGCTGCAGCGTCCATGCACCAAGTGAGAAGTCCAGTAATGCGATTCTTTGGCTCTGG	1791
T7rev	ATGGCTGCAGCGTCCATGCACCAAGTGAGAAGTCCAGTAATGCGATTCTTTGGCTCTGG	837
*****		
QSOX_WT	ACTAGCCACAACAGGGTTAACGCTCGCCTCTCAGGTGCTCTGAGTGAGGACCCCACTTC	1851
T7rev	WCTAGCCACAACAGGGTTAACGCTCGCCTCTCAGGTGCTCTGAGTGAGGACCCCACTTC	897
*****		
QSOX_WT	CCCAAGGTGCAGTGGCCTCCCGTGAGCTGTGTTCTGCCTGCCATAATGAACTCAACGGA	1911
T7rev	CCCAAGGTGCAGTGGCCTCCCGTGAGCTGTGTTCTGCCTGCCATAATGAACTCAACGGA	957
*****		

Nota: Se observa o alinhamento do iniciador T7 reverso sobre a sequência correspondente a região codificadora da QSOX1b selvagem de murino através do ClustalW 2.1. Em vermelho se observa a mutação de substituição de timina (T) (códon TGT), por uma adenina (A) (códon AGT), fazendo assim a conversão de um aminoácido cisteína (C) para um aminoácido serina (S).

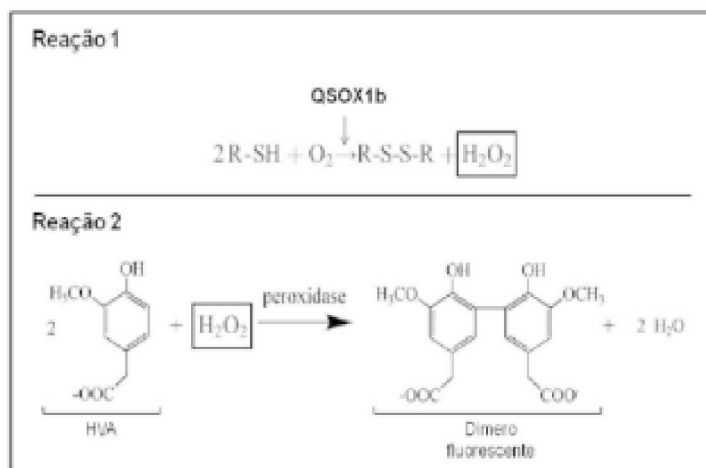
### 4.4 Determinação da atividade enzimática da QSOX1b

Para determinar a atividade enzimática da proteína recombinante selvagem, foi realizado o método indireto utilizando DTT, conhecido substrato artificial da QSOX1. A atividade DTT oxidase forma peróxido de hidrogênio, que juntamente com a peroxidase de raiz forte, oxida o ácido homovanílico a um dímero fluorescente (Figura 10).

Inicialmente, foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 µM). Então, foi realizado o monitoramento da fluorescência das recombinantes (selvagem e mutada) que evidenciou um aumento na formação do peróxido de hidrogênio em relação ao tempo nas reações com QSOX1b selvagem, com

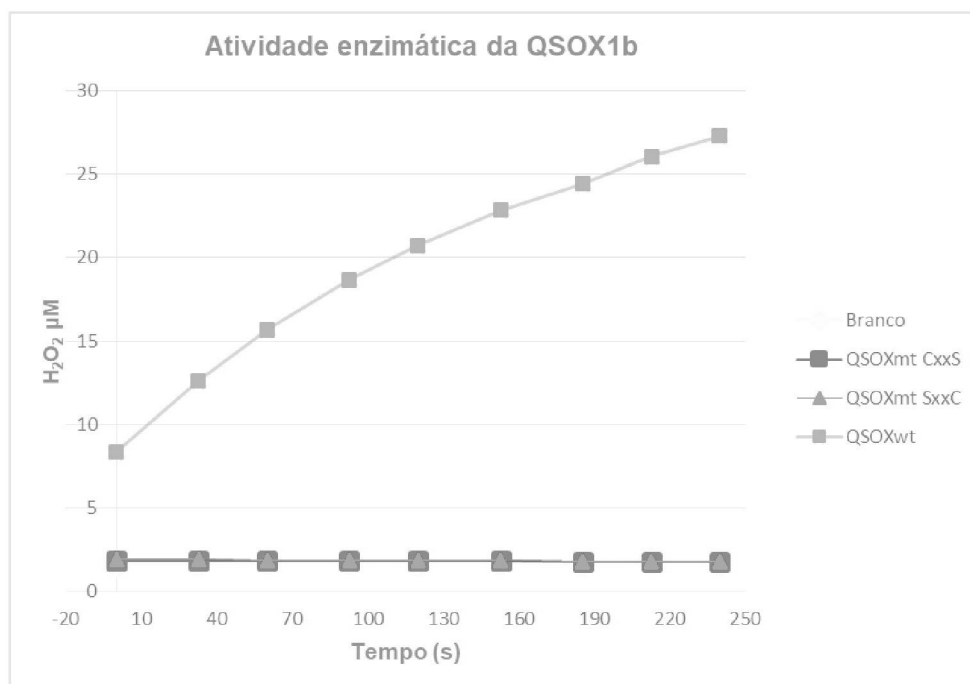
uma atividade média produzida de 300 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ min / mg de proteína. Já as proteínas mutantes (CxxS e SxxC) mostraram-se completamente inativas (Figura 11).

FIGURA 10. REAÇÕES DO MÉTODO INDIRETO DE QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE QUIESCINA SULFIDRIL OXIDASE POR FLUORESCÊNCIA CONTÍNUA



Nota: A reação 1 mostra demonstra a atividade sulfidrila oxidase produzindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na reação 2, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado pela reação 1 é utilizado como substrato pela peroxidase (HRP) para a dimerização de dois ácidos homovanílico (HVA). FONTE: adaptado de Raje (2002) e Heckler (2008).

FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PELA OXIDAÇÃO DE DTT PELAS ENZIMAS QSOX1b SELVAGEM E QSOX1b MUTADA

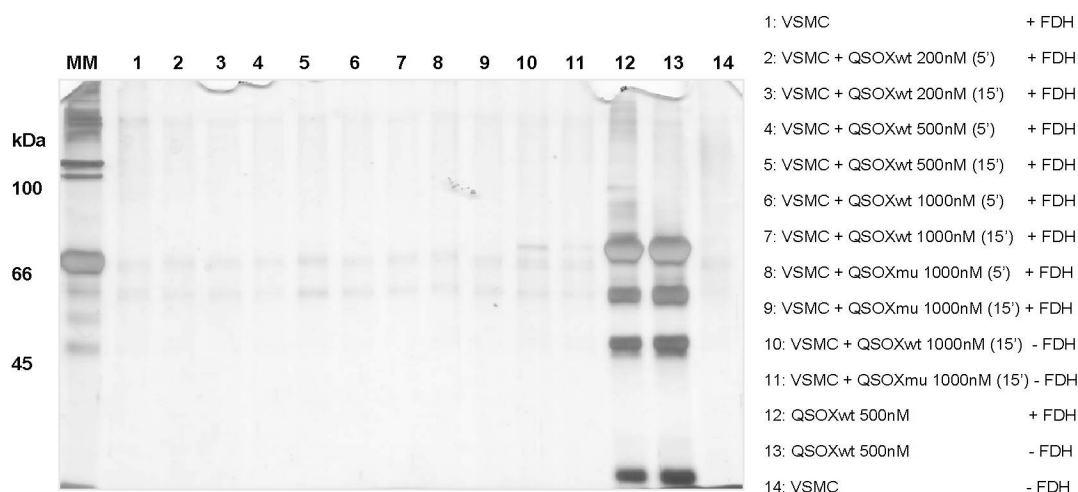


Nota: Observa-se que a QSOX1b selvagem (wt) produz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao longo do tempo, devido a sua atividade enzimática mas as QSOX1b mutadas CxxS e SxxC não geram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Branco corresponde ao mix de reagentes sem enzima. FONTE: O autor (2017).

#### 4.5 Ensaio de *cross-linking* com formaldeído

Usando células aderidas, testamos várias condições experimentais. Em todos esses ensaios, não houve diferenças no padrão de bandas, em gel de SDS-PAGE corado com prata, quando comparamos as amostras tratadas com QSOX1b recombinante com as amostras controles negativos, como células não incubadas com QSOX1b recombinante (Figura 12). Visto que nenhuma banda na altura da proteína QSOX1b (~ 74 kDa) apareceu nos géis, concluímos que a proteína não foi ligada à superfície das células. Ainda assim, para descartar que a ausência de QSOX1b deva-se a um problema *downstream* à lise, foram analisados também os lisados proteicos onde também não foi detectada a proteína recombinante (Apêndice 2). As proteínas recombinantes com o sem formaldeído também foram analisadas (Figura 12: canaletas 12 e 13) mostrando que este reagente não atrapalha a ligação destas nas resinas de Ni<sup>+2</sup>.

FIGURA 12. PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE CÉLULAS ADERIDAS INCUBADAS COM QSOX1b E FORMALDEÍDO COMO AGENTE CROSS-LIGANTE



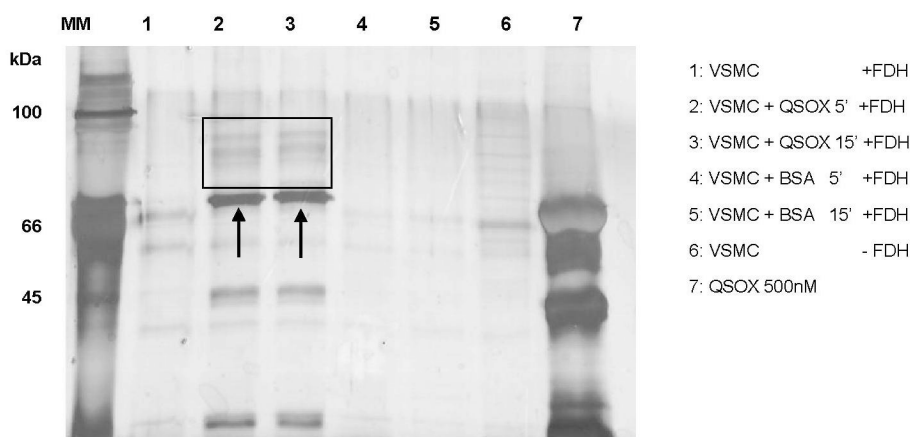
Nota: As VSMC foram tratadas com 200, 500 e 1000 nM de QSOX1b wt e QSOX1b mut (SxxC) por 5 e 15 min. O crosslinking foi feito com formaldeído (FDH) em concentração de 0,8% por 10 minutos. Os lisados em tampão RIPA foram incubados com resina de Ni-NTA e os eluatos foram analisados por SDS-PAGE. Não se observa diferenças no padrão de bandas entre as amostras tratadas e os controles negativos (canaleta 1). Nas canaletas 12 e 13 se apresenta somente proteína recombinante com e sem formaldeído, mostrando que este reagente não interfere na ligação da proteína com as resinas de Ni. Células sem tratamento e sem formaldeído também foram analisadas.

Na tentativa de otimizar a ligação da QSOX1b à superfície celular, decidiu-se repetir os ensaios com as células em suspensão, pois toda a superfície da célula ficaria exposta. Além disso, as etapas de incubação das células com a recombinante e com

formaldeído foram feitas sob agitação para facilitar a reação de *cross-linking*. Diferentes tempos de incubação e concentrações também foram testados.

Já desde o primeiro ensaio feito com células em suspensão e as modificações acima mencionadas, nas amostras de células incubadas com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem foi possível detectar uma banda com a mesma migração eletroforética da QSOX1 recombinante (Figura 13), mostrando que houve a ligação da QSOX1 com alguma molécula da VSMC. Além disso, observam-se algumas bandas de massa molecular maior que a QSOX1 e que não aparecem nos controles negativos (Figuras 13, 14 e 15). Embora não demonstrado, estas proteínas representam potenciais candidatos de serem as proteínas ligantes da QSOX1.

FIGURA 13. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO INCUBADAS COM QSOX1b (5 E 15 MINUTOS) E *CROSS-LIGADAS* COM FORMALDEÍDO



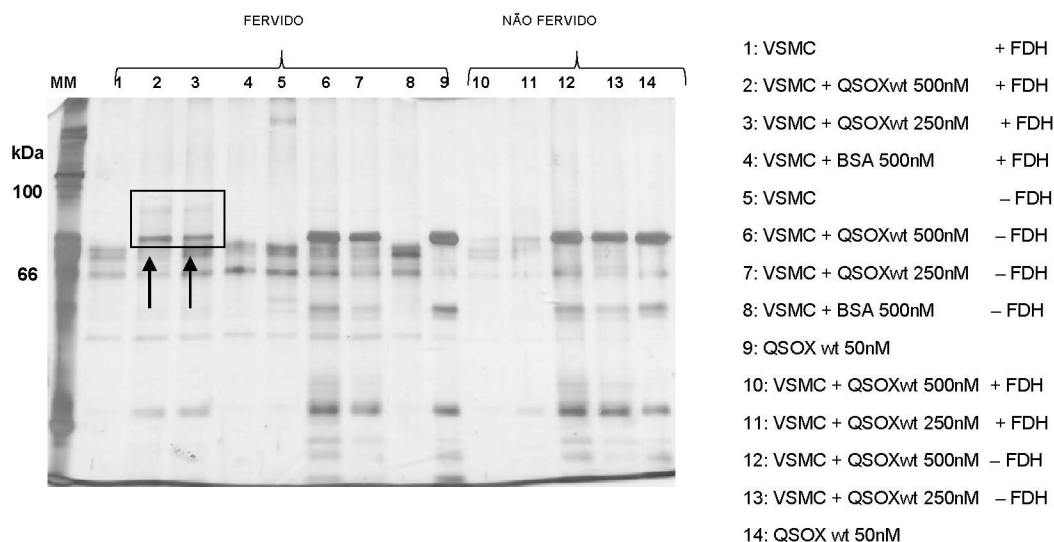
Nota: As VSMC em suspensão foram tratadas com 500 nM de QSOX1b selvagem ou BSA por 5 e 15 minutos e logo incubadas com 1% de formaldeído por 10 min, sob agitação a 37 °C. Nas canaletas 2 e 3 se confirma a presença de QSOX1b wt (setas) e acima desta se observam algumas bandas diferentes aos controles negativos, as quais poderiam ser as ligantes da QSOX1b.

O ensaio foi repetido (Figuras 14 e 15) incubando as VSMC com 250 e 500 nM de QSOX1b selvagem por 5 e 15 minutos. Nos géis pode-se observar a presença de QSOX1b e novamente aparecem umas bandas mais fracas acima desta. A recombinante também foi observada nas amostras que não foram submetidas ao *cross-linking* (sem formaldeído), indicando que a QSOX1 pode se ligar de forma não tão transiente a biomoléculas ou que pode haver sido internalizada como será discutido mais adiante. Porém nestas amostras não se observam outras bandas diferentes aos dos controles negativos. O aquecimento desfaz o *cross-link*. Portanto, para avaliar a presença dos complexos de QSOX1b selvagem, analisamos também amostras não fervidas. Nestas, as bandas correspondentes a QSOX1b são pouco visíveis e as bandas

das suas supostas ligantes não aparecem nos géis. De uma forma geral, a quantidade de proteínas nestas amostras foi consistentemente menor que nas amostras fervidas, o que pode significar que o complexo proteico formado pela QSOX1b selvagem e as supostas ligantes seja tão grande em massa que não consegue entrar no gel e por isso não seja detectado. Curiosamente, na condição não fervida, a recombinante só foi detectada nas amostras que não foram submetidas ao *cross-linking*, o que corrobora ainda mais a hipótese de a QSOX1, na presença de formaldeído, é *cross*-ligada a proteínas formando grandes complexos proteicos.

Assim, o conjunto de dados obtidos até o momento indicam que a QSOX1b interage com alguma(s) molécula(s) presente(s) na célula e que o formaldeído estabilize esta(s) interações. A detecção de uma banda com a mesma migração eletroforética que a QSOX1b recombinante sugere fortemente que a QSOX1b adicionada esteja presente nos eluatos das células expostas à recombinante e ao formaldeído. Também, o fato de haver menos proteínas nas canaletas dos eluatos não fervidos está de acordo com a possibilidade dos complexos *cross*-ligados da QSOX1b serem grandes e não entrarem na malha do gel. E embora ainda preliminares, os resultados sugerem que algumas proteínas de massa molecular maior que a da QSOX1b possam ser possíveis proteínas ligantes.

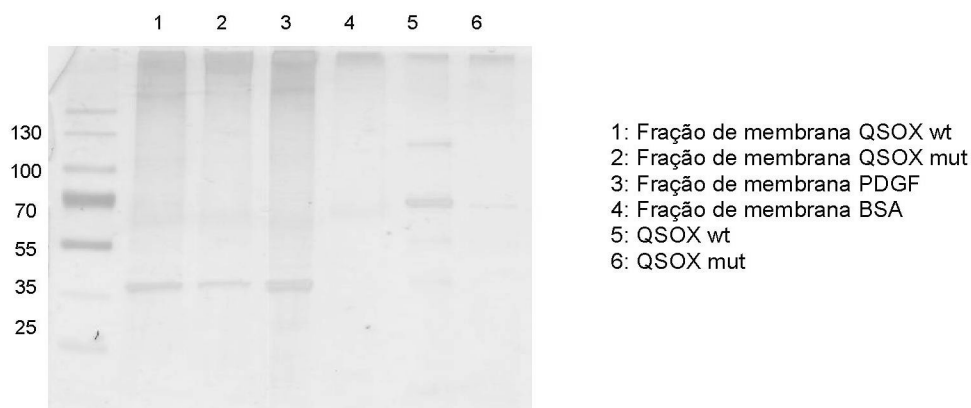
FIGURA 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO INCUBADAS COM QSOX1b (5 MINUTOS) E *CROSS*-LIGADAS COM FORMALDEÍDO



Nota: As VSMC em suspensão foram tratadas com 250 e 500 nM de QSOX1b wt ou BSA por 5 min e logo incubadas com 1% de formaldeído por 10 min, sob agitação a 37 °C. Nas canaletas 2 e 3 se confirma a presença de QSOX1b wt (setas) e acima desta se observam algumas bandas diferentes aos controles negativos, as quais poderiam ser as ligantes da QSOX1b. Foram analisadas amostras desnaturadas (fervidas) e não desnaturadas (não fervidas). Nas amostras não fervidas, a intensidade da banda da nossa recombinante é muito fraca e as supostas bandas das suas ligantes não são observadas.

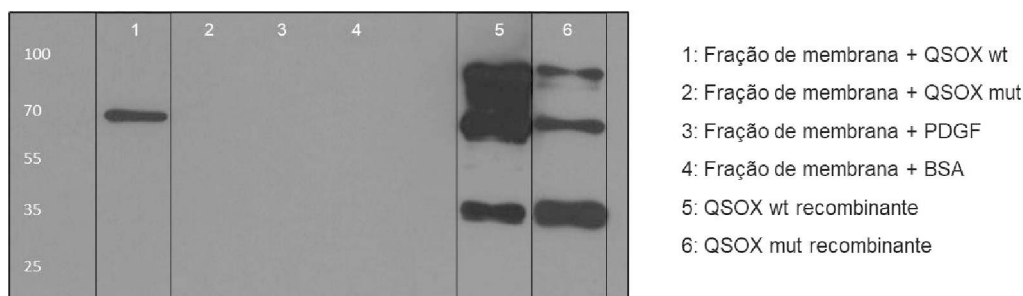


FIGURA 16. FRAÇÃO DE MEMBRANA DE VSMC PURIFICADA APÓS O CROSS-LINKING COM FORMALDEÍDO



Nota: Nas canaletas 1 e 2 não foram visíveis as bandas correspondentes a QSOX1b selvagem e mutada (SxxC) que tenham sido ligadas à membrana celular.

FIGURA 17. PRESENÇA DE QSOX1b RECOMBINANTE SELVAGEM LIGADA NA MEMBRANA CELULAR FOI CONFIRMADA POR WESTERN BLOT



Nota: A detecção da QSOX1b selvagem confirma a ligação desta na membrana das VSMC, interação que é capturada através de cross-linking com formaldeído. Os anticorpos utilizados foram, primário: Anti-QSOX (1:500) e secundário: Anti-coelho conjugado com HRP (1:4000).

#### 4.6 Detecção de QSOX1b recombinante selvagem por imunofluorescência

A ligação da QSOX1b à superfície celular foi avaliada por outra técnica para complementar os dados de *cross-linking*. Foram feitos ensaios de imunofluorescência de VSMC aderidas e em suspensão, incubadas com 1  $\mu$ M de QSOX1b recombinante selvagem ou mutada (CxxS) por 5 min a 37°C ou 4°C.

Nas imagens obtidas no microscópio a laser confocal, foi observado que células tratadas com 1  $\mu$ M de QSOX1b recombinante selvagem a 37°C por 5 min apresentam uma imunomarcagem com anti-QSOX intensa intracelular. Esta marcação não ocorreu em células não tratadas com QSOX1b ou incubadas com QSOX1b mutada (Figura 18). A fraca marcação intracelular observada nestas condições deve ser devido a marcação

de QSOX1 endógena, pois o anticorpo anti-QSOX1 reconhece não apenas a proteína recombinante (contra a qual foi feita) como a proteína endógena.

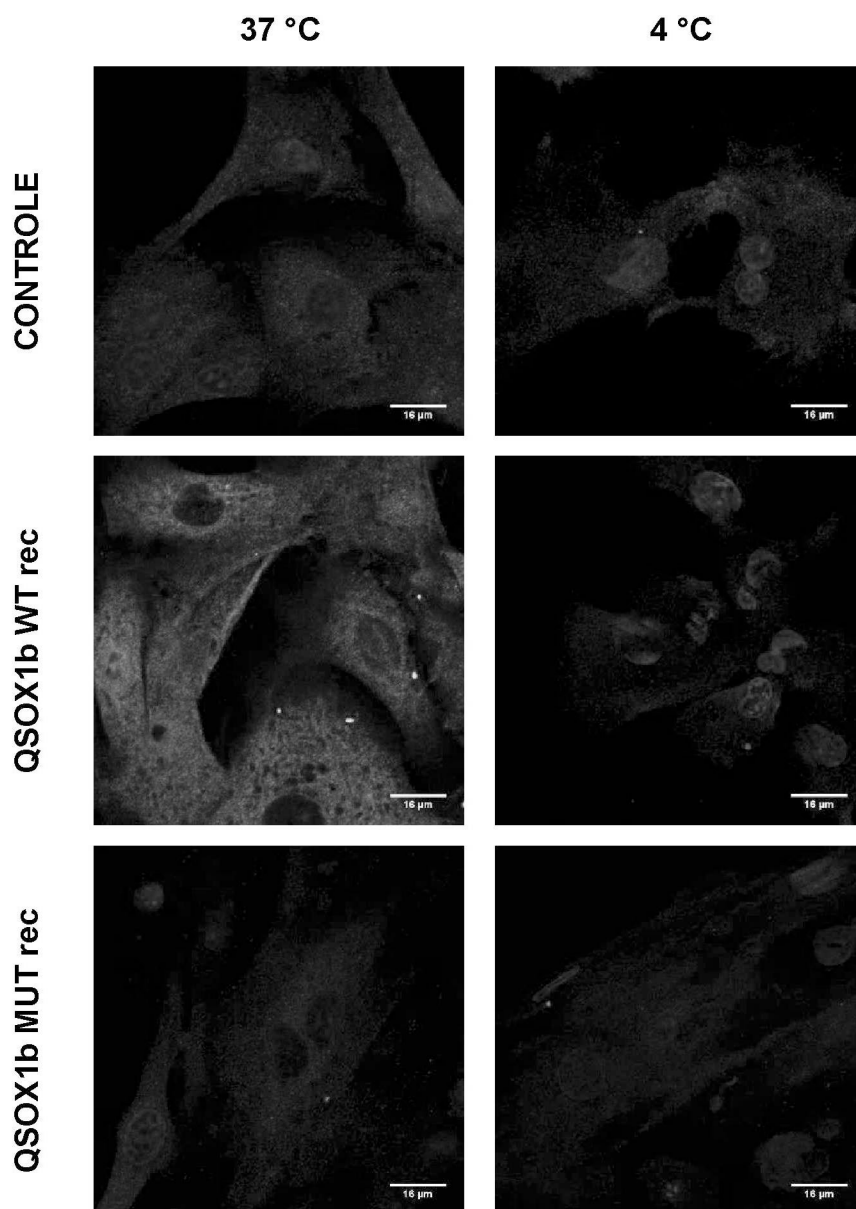
A imunomarcção intracelular sugere que a QSOX1b adicionada tenha sido incorporada ou transportada para dentro da célula. Como o tempo de exposição foi muito curto, 5 min, vislumbramos um transporte ativo, dependente de um transportador ou receptor. Para analisar a dependência da temperatura, realizamos o mesmo ensaio a 4°C. Neste caso, tanto na recombinante selvagem como mutada a marcação intracelular foi igual à do controle negativo, indicando que esta possível internalização seja dependente de um transporte ativo (Figura 18).

Para chegar ao meio intracelular, a QSOX1b deve necessariamente interagir com a membrana plasmática em algum momento. De fato, nossos dados de fração de membrana suportam esta hipótese. Para avaliar a presença da QSOX1b na superfície celular, utilizamos um recurso da microscopia confocal chamada visão ortogonal. Através desta visão ortogonal, pode-se notar também que existe marcação nas bordas das células, confirmando a ligação da QSOX1b recombinante selvagem a proteínas da superfície celular (Figuras 19 e 20). Essa marcação foi mais visível nas células em suspensão.

Para confirmar a co-localização da imunomarcção da QSOX1b recombinante com a membrana plasmática, utilizamos a lectina aglutinina de gérmen de trigo conjugada ao fluoróforo TRITC. Esta lectina liga-se a resíduos de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil na superfície celular. Os resultados de microscopia indicam uma possível co-localização da QSOX1b selvagem com a lectina na membrana das células na condição de 37°C, mas não a 4°C (Figura 21).

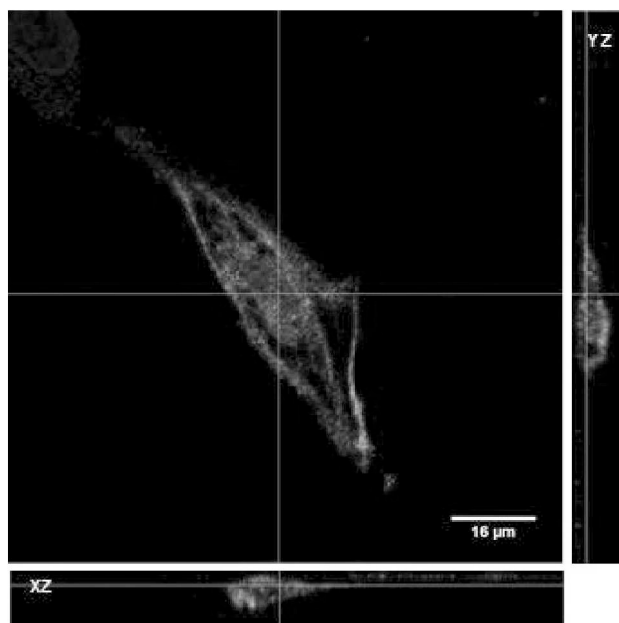
No conjunto, os dados de imagem corroboram os dados de *cross-link*, mostrando que a QSOX1b selvagem interage com a membrana plasmática de VSMC. Esta interação deve permitir a entrada da QSOX1b na célula, de forma dependente da temperatura de incubação e da atividade enzimática.

FIGURA 18. DETECÇÃO INTRACELULAR DE QSOX1b RECOMBINANTE



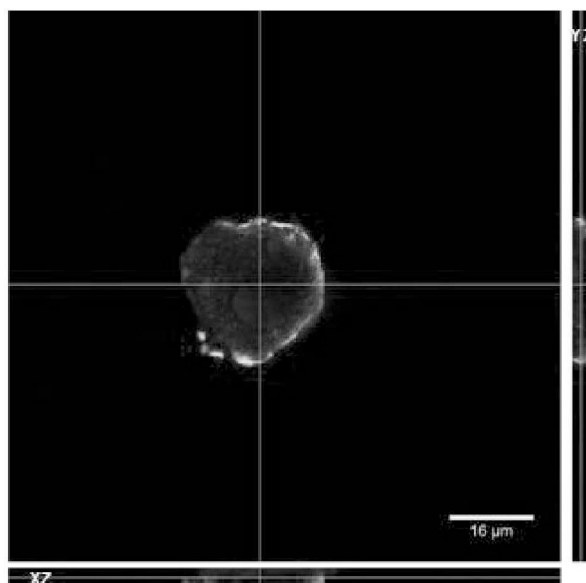
Nota: Imagem de microscopia confocal de VSMC aderidas, na ausência (controle) ou presença de 1µM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada (CxxS) por 5 min a 37 °C e 4 °C em PBS. A marcação verde detecta QSOX; em azul o núcleo corado com DAPI. Os anticorpos utilizados foram, primário: Anti-QSOX (1:250) e secundário: Anti-coelho conjugado com Alexa-Fluor 488 (1:500). As imagens foram captadas no microscópio a laser confocal, com objetiva de 60X e analisadas com o software Image J.

FIGURA 19. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE SELVAGEM NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS ADERIDAS



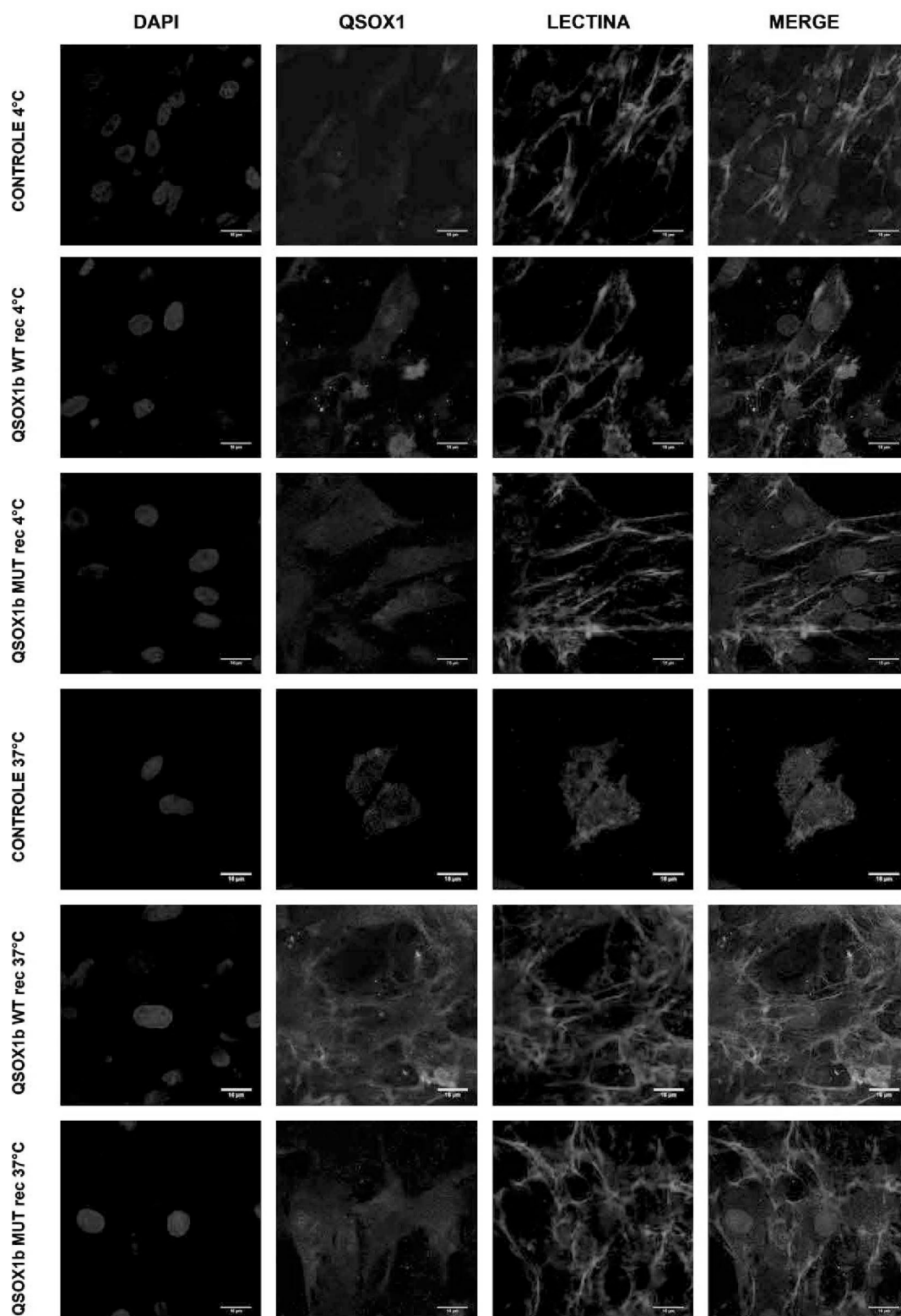
Nota: Imagem de microscopia confocal representando uma visão ortogonal (planos XZ e YZ) de VSMC aderidas, incubadas com  $1\mu\text{M}$  de QSOX1b recombinante selvagem por 5 min a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  em PBS. A marcação verde detecta QSOX; em azul o núcleo corado com DAPI. Os anticorpos utilizados foram, primário: Anti-QSOX (1:250) e secundário: Anti-coelho conjugado com Alexa-Flúor 488 (1:500). As imagens foram captadas no microscópio a laser confocal, com objetiva de 60X.

FIGURA 20. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE SELVAGEM NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO



Nota: Imagem de microscopia confocal representando uma visão ortogonal (planos XZ e YZ) de VSMC em suspensão incubadas com  $1\mu\text{M}$  de QSOX1b recombinante selvagem por 5 min a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  em PBS. A marcação verde detecta QSOX; em azul o núcleo corado com DAPI. Os anticorpos utilizados foram, primário: Anti-QSOX (1:250) e secundário: Anti-coelho conjugado com Alexa-Flúor 488 (1:500). As imagens foram captadas no microscópio a laser confocal, com objetiva de 60X e analisadas com o software Image J.

FIGURA 21. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE NA MEMBRANA CELULAR



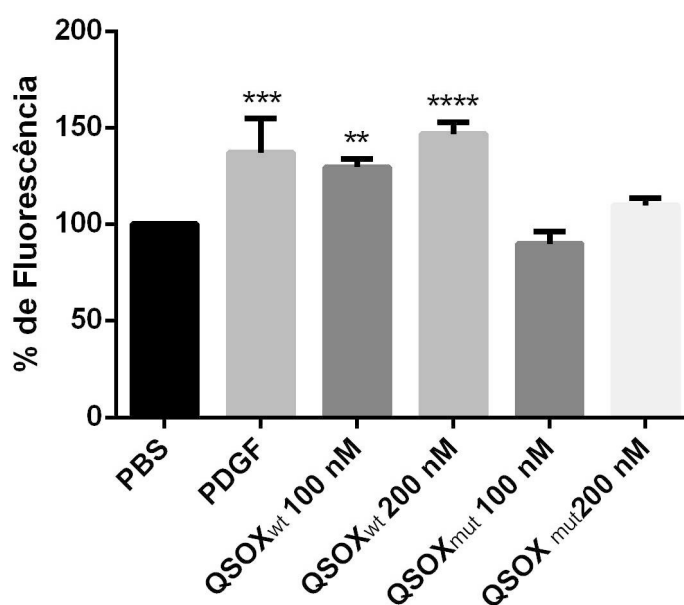
Nota: Imagem de microscopia confocal de VSMC aderidas, na ausência (controle) ou presença de 1 $\mu$ M de QSOX1b recombinante selvagem e mutada (CxxS) por 5 min a 37 °C e 4 °C em PBS. A marcação verde detecta QSOX; em azul o núcleo corado com DAPI; em vermelho marcação de membrana plasmática corada com lectinas conjugadas com TRITC.

#### 4.7 Determinação da produção de EROS pela sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)

Este ensaio foi realizado para determinar se após curtos tempos de incubação das VSMC com QSOX1b recombinante produz-se rapidamente a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, as fluorescências foram lidas imediatamente depois que a QSOX1b recombinante foi adicionada nas células.

Considerando-se a fluorescência basal (células incubadas apenas com PBS) como 100%, após 30 min de leitura no espectrofluorímetro, pode-se observar que a geração de EROS aumentou significativamente em relação ao basal nas células incubadas com QSOX1b recombinante selvagem (100 e 200 nM) e PDGF (20 ng/ml). Já nas células incubadas com QSOX1b recombinante mutada (CxxS), não se observou diferença significativa (Figura 22). Como controle positivo do teste utilizou-se também peróxido de hidrogênio 100 e 500  $\mu$ M, que triplicou a fluorescência do basal (dados não mostrados).

FIGURA 22. GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS 30 MIN DE INCUBAÇÃO COM QSOX1b RECOMBINANTES



Nota: As células incubadas com QSOX1b recombinante selvagem mostraram um aumento significativo na geração de EROS em relação ao basal (\*\* $p < 0.05$  VS QSOX1b wt 100 nM. \*\*\* $p < 0.05$  VS QSOX1b wt 200 nM). O estímulo positivo PDGF também mostrou diferença significativa (\*\*\* $p < 0.05$ ). Não houve diferença significativa no aumento de EROS nas células incubadas com QSOX1b recombinante mutada (CxxS).

## 5 DISCUSSÃO

O estudo de interações proteína - proteína é a base para entender os mecanismos moleculares dos processos celulares, incluindo sinalização, síntese de proteína e metabolismo (Klockenbusch & Kast, 2010). Neste trabalho, identificar as interações da QSOX1b permitirá entender o mecanismo molecular da sinalização disparada pela QSOX1 extracelular na proliferação e migração das células musculares lisas vasculares.

Um método útil para estudar e capturar essas interações *in situ* é o *cross-linking* químico com formaldeído (Zhu *et al.*, 2014). Usar formaldeído como reagente cross-ligante tem várias vantagens: por seu pequeno tamanho, só pode ligar proteínas que estejam fisicamente muito próximas; por sua alta permeabilidade nas membranas celulares, permite o *cross-linking* na célula intacta sem precisar de outros solventes orgânicos; permite uma ligação muito rápida e estabiliza as interações transientes (Klockenbusch & Kast, 2010) e finalmente por seu baixo custo, está disponível em quase todos os laboratórios. Porém, o *cross-linking* com formaldeído ainda não é um método padrão estabelecido e sua otimização deve ser realizada para cada proteína de interesse. Além do entorno fisiológico da proteína, Klockenbusch & Kast (2010) mencionam três parâmetros principais que desempenham um papel crítico durante o *cross-linking*: a temperatura de reação, o tempo de incubação e a concentração de formaldeído. Em nossos primeiros experimentos diferentes concentrações e tempos de incubação de proteína recombinante e formaldeído foram testadas. No entanto, não houve diferenças significativas entre elas. De uma forma geral, os dados apontavam que a QSOX1b recombinante não estava se ligando à célula. Resultados mais interessantes foram obtidos quando utilizamos células em suspensão. O método de desaderir as células das placas baseava-se na quelatação de íons metálicos a EDTA (solução 10 mM EDTA) seguido de desadesão mecânica com raspador. Embora os artigos que mencionam a utilização de formaldeído como agente *cross-ligante* tenham empregado células em suspensão (Jurkat, plaquetas, SH-SY5Y, R6X), temos que considerar sempre o fato de que a superfície celular de células desaderidas, por desadesão enzimática, química ou física, está diferente da superfície original, o que pode produzir resultados artefatuais. Contudo, nos nossos experimentos após desaderir, deixamos as células incubando em suspensão por uma hora para que pudessem recuperar sua integridade. Três experimentos foram realizados e em todos visualizamos bandas nos géis que poderiam ser da QSOX1b recombinante selvagem e de proteínas ligantes da QSOX1b exógena.

Para complementar estes resultados, analisamos a presença de QSOX1b por imunofluorescência indireta. Nestes experimentos, realizados tanto com células aderidas como em suspensão, verificamos a presença de QSOX1b selvagem tanto na superfície celular como no meio intracelular. A QSOX1b mutada não foi capaz de ligar à célula. Estes resultados indicam que a QSOX1b recombinante se liga a superfície celular e é rapidamente (5 min) internalizada. Assim, as proteínas potencialmente ligantes da QSOX1 determinadas no gel de poliacrilamida poderiam ser proteínas tanto de superfície celular como intracelulares.

Além disso, quando comparamos a ligação da QSOX1b em células aderidas com a ligação em células em suspensão, observou-se nestas últimas que a marcação de QSOX1b na superfície das células foi ainda mais intensa que aquela mostrada nas células aderidas. Como foi mostrado por Coppock e colaboradores (1993), a desadesão celular, seja com tripsina ou mecanicamente com raspador, induz rapidamente a expressão do gene da QSOX (Q6) como uma resposta pós-transcricional à modificação externa das células quiescentes; Ilani e colaboradores (2013) demonstraram que QSOX1b recombinante é importante na adesão celular num processo dependente da sua atividade sulfidril oxidase. Essas evidências sugerem que as VSMC em suspensão tenham se ligado mais a QSOX1b devido a maior área superficial exposta para a ligação da QSOX1b recombinante, mas também pela necessidade de terem QSOX1b para sua readesão. Por outro lado, é conhecido que as trocas tiol-dissulfeto, entre a proteína dissulfeto isomerase (PDI) e integrinas, são importantes para a adesão celular mediante a ativação dessas últimas (Swiatkowska *et al.*, 2008; Mor-Cohen, 2016; Popielarski *et al.*, 2018), e que o bloqueio não só de PDI mas também de tiois livres, tem inibido processos de migração e adesão celular (Popielarski *et al.*, 2018). É provável então que a inativação de integrinas após a desadesão, leve QSOX1b realizar esse papel de oxido-redução para uma reativação das integrinas.

O experimento com fração de membrana confirmou a presença de QSOX1b na superfície celular. A fração de membrana foi purificada após a etapa do *cross-linking*, e foram analisadas por *western blot*. Detectamos a presença de QSOX1b nas amostras de fração de membrana incubadas com 1 $\mu$ M de QSOX1b recombinante selvagem, mas não com a QSOX1b recombinante mutada, por imunorreação. Interessantemente, a QSOX1b não foi detectada nos géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata. Estes dados indicam que as quantidades de QSOX1 recombinantes *cross*-ligadas com proteínas da fração de membrana eram muito baixas, em contraste com os resultados obtidos com os extratos celulares totais, onde bandas com a mesma migração eletroforética eram detectadas nos lisados de células incubadas com as QSOX1 recombinantes. De uma forma geral, os resultados são consistentes com os resultados

de imunofluorescência, que mostraram que uma alta proporção da QSOX1b exógena se encontra no meio intracelular após 5 minutos, que foi o tempo padrão usado na maioria dos ensaios aqui descritos.

Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que a QSOX1b estimula a proliferação e a migração de células musculares lisas (Borges *et al.*, 2015; Rodrigues, 2016). Em vários modelos experimentais, estes processos são dependentes de sinalização redox (Sundaresan *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1999; Finkel, 2011). Geralmente esta sinalização se inicia com a produção de radicais superóxido que se dismutam produzindo peróxido de hidrogênio. E este por sua vez, pode induzir de forma reversível e covalente modificações pós-traducionais de resíduos de tiolato de cisteína, resultando em mudanças na atividade e função de proteínas alvo, que são peças-chaves na ativação das vias proliferativas e migratórias (c-Src, PKC, PI3K, AKT, ERK, JNK, MAPK) (Byon, Heath e Chen, 2016). Portanto, analisamos se espécies oxidantes eram produzidas após a incubação das células musculares lisas com a QSOX1b, através do ensaio baseado na oxidação da diclorodihidrofluoresceína. Após 5 minutos de exposição não houve aumento significativo de oxidação da DCFH a DCF em nenhuma condição. Um aumento significativo de EROS gerados nas células tratadas com QSOX1b selvagem foi observado após 30 min de exposição, em comparação com as células não tratadas ou tratadas com QSOX1b mutada. Estes dados sugerem que a QSOX1b selvagem, ao interagir com algum componente da membrana plasmática ou intracelular, é capaz de gerar oxidantes intracelulares, possivelmente peróxido de hidrogênio, como acontece com sinalização baseado em agonista/receptor (Kim, Huang e Bokoch, 2009). Contudo, a sonda DCFH pode ser oxidada não apenas por peróxido de hidrogênio, mas também por vários outros oxidantes celulares, como peroxidases, íons metálicos, etc. (Forman *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2010). Portanto, é necessário ainda confirmar a identidade do oxidante induzido pela QSOX1b.

Em conjunto, todos os ensaios realizados até o momento mostram a interação entre QSOX1b recombinante selvagem e proteínas da superfície das VSMC e uma internalização muito rápida, sendo que essa interação depende da atividade sulfidril oxidase. O(s) alvo(s) da QSOX1b na célula muscular lisa permanece(m) ainda desconhecido(s). Devido à dependência da atividade enzimática, vislumbramos um possível alvo regulado pela formação de pontes dissulfeto ou ainda oxidado pelo peróxido de hidrogênio produzido durante a catálise. Estes dados abrem perspectivas de se identificar as proteínas oxidadas pela QSOX1b. De fato, pretendemos estender este estudo para identificar as proteínas presentes nos eluatos da resina de Ni-NTA por espectrometria de massa e caracterizar a cinética da ligação e incorporação da QSOX1b em VSMC.

## 6 CONCLUSÕES

- O ensaio de *cross-linking* químico entre QSOX1b recombinante e proteínas das VSMC foi padronizado, usando uma concentração final de 1% de formaldeído durante 10 min a 37°C sob agitação.
- Após o *cross-linking* químico, QSOX1b recombinante selvagem foi detectada na membrana plasmática e no extrato total das VSMC.
- Os ensaios de imunofluorescência confirmaram a marcação de QSOX1b recombinante selvagem na membrana celular e uma possível internalização nas células.
- Foi observada uma produção significativa de espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com QSOX1b recombinante selvagem em comparação às células tratadas com QSOX1b recombinante mutada ou não tratadas, após 30 min de incubação.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Identificar as proteínas ligantes da QSOX1b por espectrometria de massas
- Caracterizar a internalização da QSOX1b por microscopia de fluorescência

## REFERÊNCIAS

ALON A, GROSSMAN I, GAT Y, KODALI VK, DIMAIO F, MEHLMAN T, HARAN G, BAKER D, THORPE C, FASS D. The dynamic disulphide relay of quiescin sulphydryl oxidase. *Nature*. 2012 Aug 16;488(7411):414-8.

ARAÚJO DG, NAKAO L, GOZZO P, SOUZA CD, BALDERRAMA V, GUGELMIN ES, KUCZYNSKIAP, OLANDOSKI M, DE NORONHA L. Expression level of quiescin sulphydryl oxidase 1 (QSOX1) in neuroblastomas. *Eur J Histochem*. 2014 Mar 6;58(1):2228.

ANTWI, K., HOSTETTER, G., DEMEURE, M., KATCHMAN, B., DECKER, G., RUIZ, Y., SIELAFF, T., KOEP, L. AND LAKE, D. Analysis of the Plasma Peptidome from Pancreas Cancer Patients Connects a Peptide in Plasma to Overexpression of the Parent Protein in Tumors. *Journal of Proteome Research*. 2009. 8(10), pp.4722-4731.

BENAYOUN B, ESNARD-FÈVE A, CASTELLA S, COURTY Y, ESNARD F. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulphydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulphydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):13830-7.

BORGES, B., APPEL, M., COFRÉ, A., PRADO, M., STECLAN, C., ESNARD, F., ZANATA, S., LAURINDO, F. AND NAKAO, L. The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: Evidence for a role in neointima growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015. 1852(7), pp.1334-1346.

BROWN, M., MILLER, F., LI, W., ELLINGSON, A., MOZENA, J., CHATTERJEE, P., ENGELHARDT, J., ZWACKA, R., OBERLEY, L., FANG, X., SPECTOR, A. AND WEINTRAUB, N. Overexpression of Human Catalase Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*. 1999. 85(6), pp.524-533.

BYON, C., HEATH, J. AND CHEN, Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox Biology*. 2016. 9, pp.244-253.

CHAKRAVARTHI S, JESSOP CE, WILLER M, STIRLING CJ, BULLEID NJ. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulphydryl oxidase, QSOX1. *Biochem J*. 2007 Jun 15;404(3):403-11.

CHEN, X., ZHONG, Z., XU, Z., CHEN, L. AND WANG, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*. 2010. 44(6), pp.587-604.

COPPOCK DL, CINA-POPPE D, GILLERAN S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics*. 1998 Dec 15;54(3):460-8.

COPPOCK DL, KOPMAN C, SCANDALIS S, GILLERAN S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ*. 1993 Jun;4(6):483-93.

COPPOCK DL, THORPE C. Multidomain flavin-dependent sulphydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Mar-Apr;8(3-4):300-11.

DE ANDRADE CR, STOLF BS, DEBBAS V, ROSA DS, KALIL J, COELHO V, LAURINDO FR. Quiescin sulphydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: possible role in apoptosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011 Dec;47(10):716-27.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*. 2011. 194(1), pp.7-15.

FORMAN HJ, AUGUSTO O, BRIGELIUS-FLOHE R, DENNERY PA, KALYANARAMAN B, ISCHIROPOULOS H, MANN GE, RADI R, ROBERTS LJ, VINA J, DAVIES K. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radical Biology and Medicine* 78 (2015) 233–235

GANDHI CR, KUDDUS R, SUBBOTIN VM, PRELICH J, MURASE N, RAO AS, NALESNIK MA, WATKINS SC, DELEO A, TRUCCO M, STARZL TE. A fresh look at augments of liver regeneration in rats. *Hepatology*. 1999 May;29(5):1435-45.

HANAVAN, P., BORGES, C., KATCHMAN, B., FAIGEL, D., HO, T., MA, C., SERGIENKO, E., MEURICE, N., PETIT, J. AND LAKE, D. Ebselen inhibits QSOX1 enzymatic activity and suppresses invasion of pancreatic and renal cancer cell lines. *Oncotarget*. 2015. 6(21).

HECKLER EJ, ALON A, FASS D, THORPE C. Human quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX1: probing internal redox steps by mutagenesis. *Biochemistry*. 2008 Apr 29;47(17):4955-63

HELLEBREKERS DM, MELOTTE V, VIRÉ E, LANGENKAMP E, MOLEMA G, FUKS F, HERMAN JG, VAN CRIEKINGE W, GRIFFIOEN AW, VAN ENGELAND M. Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. *Cancer Res*. 2007 May 1;67(9):4138-48.

HOFHAUS G, STEIN G, POLIMENO L, FRANCAVILLA A, LISOWSKY T. Highly divergent amino termini of the homologous human ALR and yeast scERV1 gene products define species specific differences in cellular localization. *Eur J Cell Biol*. 1999 May;78(5):349-56.

HOOBER KL, GLYNN NM, BURNSIDE J, COPPOCK DL, THORPE C. Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):31759-62.

HOOBER KL, JONEJA B, WHITE HB, THORPE C. A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem*. 1996 Nov 29;271(48):30510-6.

HOOBER KL, SHEASLEY SL, GILBERT HF, THORPE C. Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. *J Biol Chem*. 1999 Aug 6;274(32):22147-50.

HOOBER KL, THORPE C. Egg white sulfhydryl oxidase: kinetic mechanism of the catalysis of disulfide bond formation. *Biochemistry*. 1999 Mar 9;38(10):3211-7.

HOFFMAN EA, FREY BL, SMITH LM. Formaldehyde Crosslinking: A Tool for the Study of Chromatin Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015, VOL. 290, NO. 44, pp. 26404–26411

ILANI T, ALON A, GROSSMAN I, HOROWITZ B, KARTVELISHVILY E, COHEN SR, FASS D. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. *Science*. 2013 Jul 5;341(6141):74-6.

ISRAEL BA, JIANG L, GANNON SA, THORPE C. Disulfide bond generation in mammalian blood serum: detection and purification of quiescin-sulfhydryl oxidase. *Free Radic Biol Med*. 2014 Apr;69:129-35.

IWAI LK, PAYNE LS, LUCZYNSKI MT, CHANG F, XU H, CLINTON RW, PAUL A, ESPOSITO EA, GRIDLEY S, LEITINGER B, NAEGLE KM, HUANG PH. Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *Biochem J*. 2013 Sep 15;454(3):501-13.

JAJE J, WOLCOTT HN, FADUGBA O, CRIPPS D, YANG AJ, MATHER IH, THORPE C. A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. *Biochemistry*. 2007 Nov 13;46(45):13031-40.

JANISZEWSKI M, LOPES LR, CARMO AO, PEDRO MA, BRANDES RP, SANTOS CX, LAURINDO FR. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005 Dec 9;280(49):40813-9.

KATCHMAN BA, ANTWI K, HOSTETTER G, DEMEURE MJ, WATANABE A, DECKER GA, MILLER LJ, VON HOFF DD, LAKE DF. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. *Mol Cancer Res*. 2011 Dec;9(12):1621-31.

KATCHMAN BA, OCAL IT, CUNLIFFE HE, CHANG YH, HOSTETTER G, WATANABE A, LOBELLO J, LAKE DF. Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013 Mar 28;15(2):R28.

KIM, J., HUANG, T. AND BOKOCH, G. Reactive Oxygen Species Regulate a Slingshot-Cofilin Activation Pathway. *Molecular Biology of the Cell*. 2009. 20(11), pp.2650-2660.

KIRSCHENLOHR HL, METCALFE JC, GRAINGER DJ. Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta. *Methods in Molecular Medicine*, v. 2, p. 319-34, 1996.

KLOCKENBUSCH C, KAST J. Optimization of Formaldehyde Cross-Linking for Protein Interaction Analysis of Non-Tagged Integrin  $\beta$ 1. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2010, 13 pages.

KNUTSVIK, G., COLLETT, K., ARNES, J., AKSLEN, L. & STEFANSSON, I. QSOX1 expression is associated with aggressive tumor features and reduced survival in breast carcinomas. *Modern Pathology*. 2016. 29(12), pp.1485-1491.

KODALI VK, THORPE C. Oxidative protein folding and the Quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Oct;13(8):1217-30.

KODALI VK, THORPE C. Quiescin sulfhydryl oxidase from *Trypanosoma brucei*: catalytic activity and mechanism of a QSOX family member with a single thioredoxin domain. *Biochemistry*. 2010 Mar 9;49(9):2075-85.

LANGE H, LISOWSKY T, GERBER J, MÜHLENHOFF U, KISPAL G, LILL R. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase *Erv1p/ALR* in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep*. 2001 Aug;2(8):715-20.

LEE MY, SAN MARTIN A, MEHTA PK, DIKALOVA AE, GARRIDO AM, DATLA SR, LYONS E, KRAUSE KH, BANFI B, LAMBETH JD, LASSÈGUE B, GRIENDLING KK. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Apr;29(4):480-7.

LEVITAN A, DANON A, LISOWSKY T. Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):20002-8.

LI Y, LI M, XING G, HU Z, WANG Q, DONG C, WEI H, FAN G, CHEN J, YANG X, ZHAO S, CHEN H, GUAN K, WU C, ZHANG C, HE F. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. *J Biol Chem*. 2000 Dec 1;275(48):37443-7.

LIMOR-WAISBERG K, ALON A, MEHLMAN T, FASS D. Phylogenetics and enzymology of plant quiescin sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett*. 2012 Nov 30;586(23):4119-25.

LISOWSKY T, LEE JE, POLIMENO L, FRANCAVILLA A, HOFHAUS G. Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig Liver Dis*. 2001 Mar;33(2):173-80.

MAGALHAES T, BRACKNEY DE, BEIER JC, FOY BD. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2008 Jul;68(3):134-43.

MAIRET-COELLO G, TURY A, ESNARD-FEVE A, FELLMANN D, RISOLD PY, GRIFFOND B. FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 2004 May 31;473(3):334-63.

MAIRET-COELLO G, TURY A, FELLMANN D, RISOLD PY, GRIFFOND B. Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. *J Comp Neurol*. 2005 Apr 18;484(4):403-17.

MATSUBA S, SUGA Y, ISHIDOH K, HASHIMOTO Y, TAKAMORI K, KOMINAMI E, WILHELM B, SEITZ J, OGAWA H. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. *J Dermatol Sci*. 2002 Oct;30(1):50-62.

MEBAZAA A, VANPOUCKE G, THOMAS G, VERLEYSSEN K, COHEN-SOLAL A, VANDERHEYDEN M, BARTUNEK J, MUELLER C, LAUNAY JM, VAN LANDUYT N, D'HONDT F, VERSCHUERE E, VANHAUTE C, TUYTTEN R, VANNESTE L, DE CREMER K, WUYTS J, DAVIES H, MOERMAN P, LOGEART D, COLLET C, LORTAT-JACOB B, TAVARES M, LAROY W, JANUZZI JL, SAMUEL JL, KAS K. Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure. *Eur Heart J*. 2012 Sep;33(18):2317-24.

MOR-COHEN, R. Disulfide Bonds as Regulators of Integrin Function in Thrombosis and Hemostasis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016. 24(1), pp.16-31.

MUSARD JF, SALLOT M, DULIEU P, FRAÏCHARD A, ORDENER C, REMY-MARTIN JP, JOUVENOT M, ADAMI P. Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Sep 14;287(1):83-91.

OSTROWSKI MC, KISTLER WS. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry*. 1980 Jun 10;19(12):2639-45.

OUYANG X, DEWEESE TL, NELSON WG, ABATE-SHEN C. Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6773-9.

PERNODET N, HERMETET F, ADAMI P, VEJUX A, DESCOTES F, BORG C, ADAMS M, PALLANDRE JR, VIENNET G, ESNARD F, JOUVENOT M, DESPOUY G. High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2012 Oct 25;14(5):R136.

POILLET, L., PERNODET, N., BOYER-GUITTAUT, M., ADAMI, P., BORG, C., JOUVENOT, M., DELAGE-MOURROUX, R. AND DESPOUY, G. QSOX1 Inhibits Autophagic Flux in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2014. 9(1), p.e86641.

POPIELARSKI, M., PONAMARCZUK, H., STASIAK, M., MICHALEC, L., BEDNAREK, R., STUDZIAN, M., PULASKI, L. AND SWIATKOWSKA, M. The role of Protein Disulfide Isomerase and thiol bonds modifications in activation of integrin subunit alpha11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018. 495(2), pp.1635-1641.

PORTES KF, IKEGAMI CM, GETZ J, MARTINS AP, DE NORONHA L, ZISCHLER LF, KLASSEN G, CAMARGO AA, ZANATA SM, BEVILACQUA E, NAKAO LS. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. *J Mol Histol*. 2008 Apr;39(2):217-25.

RADOM J, COLIN D, THIEBAULT F, DOGNIN-BERGERET M, MAIRET-COELLO G, ESNARD-FEVE A, FELLMANN D, JOUVENOT M. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. *Biochim Biophys Acta*. 2006.

RAJALA, N., HENSEN, F., WESSELS, H., IVES, D., GLOERICH, J. AND SPELBRINK, J. Whole Cell Formaldehyde Cross-Linking Simplifies Purification of Mitochondrial Nucleoids and Associated Proteins Involved in Mitochondrial Gene Expression. *Plos One*. 2015. 10(2), p.e0116726.

RAJE S, GLYNN NM, THORPE C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. *Anal Biochem*. 2002 Aug 15;307(2):266-72.

RANCY PC, THORPE C. Oxidative protein folding in vitro: a study of the cooperation between quiescin-sulfhydryl oxidase and protein disulfide isomerase. *Biochemistry*. 2008 Nov 18;47(46):12047-56.

RODRIGUES ML. Proliferação de células musculares lisas por QSOX1 extracelular ativa e inativa. Tese de mestrado. PPG Microbiologia, Parasitologia e Patologia, UFPR, 2016.

RUDOLF J, PRINGLE MA, BULLEID NJ. Proteolytic processing of QSOX1A ensures efficient secretion of a potent disulfide catalyst. *Biochem J*. 2013 Sep 1;454(2):181-90.

SEVIER CS. Erv2 and quiescin sulfhydryl oxidases: Erv-domain enzymes associated with the secretory pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Apr 15;16(8):800-8.

SOLOVIEV M, ESTEVES MP, AMIRI F, CROMPTON MR, RIDER CC. Elevated transcription of the gene QSOX1 encoding quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 in breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(2):e57327

SONG H, ZHANG B, WATSON MA, HUMPHREY PA, LIM H, MILBRANDT J. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene*. 2009 Sep 17;28(37):3307-19.

SUNDARESAN, M., YU, Z., FERRANS, V., IRANI, K. AND FINKEL, T. Requirement for Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science*. 1995. 270(5234), pp.296-299.

SWIATKOWSKA, M., SZYMAŃSKI, J., PADULA, G. AND CIERNIEWSKI, C. Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin on endothelial cells. *FEBS Journal* 2008. 275(8), pp.1813-1823.

SZÖCS K, LASSÈGUE B, SORESCU D, HILENSKI LL, VALPPU L, COUSE TL, WILCOX JN, QUINN MT, LAMBETH JD, GRIENDLING KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Jan;22(1):21-7.

THORPE C, COPPOCK DL. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J Biol Chem*. 2007 May 11;282(19):13929-33.

THORPE C, HOOBER KL, RAJE S, GLYNN NM, BURNSIDE J, TURI GK, COPPOCK DL. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys*. 2002 Sep 1;405(1):1-12.

TURY A, MAIRET-COELLO G, ESNARD-FÈVE A, BENAYOUN B, RISOLD PY, GRIFFOND B, FELLMANN D. Cell-specific localization of the sulphhydryl oxidase QSOX in rat peripheral tissues. *Cell Tissue Res*. 2006 Jan;323(1):91-103.

VASILESCU J, GUO X, KAST J. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics*. 2004, 4, 3845-3854.

WANG G, YANG X, ZHANG Y, WANG Q, CHEN H, WEI H, XING G, XIE L, HU Z, ZHANG C, FANG D, WU C, HE F. Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11469-72.

WANG Y, LU C, WEI H, WANG N, CHEN X, ZHANG L, ZHAI Y, ZHU Y, LU Y, HE F. Hepatopoietin interacts directly with COP9 signalosome and regulates AP-1 activity. *FEBS Lett*. 2004 Aug 13;572(1-3):85-91.

ZANATA SM, HOVATTA I, ROHM B, PÜSCHEL AW. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J Neurosci*. 2002 Jan 15;22(2):471-7.

ZANATA SM, LUVIZON AC, BATISTA DF, IKEGAMI CM, PEDROSA FO, SOUZA EM, CHAVES DF, CARON LF, PELIZZARI JV, LAURINDO FR, NAKAO LS. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. *Redox Rep*. 2005;10(6):319-23.

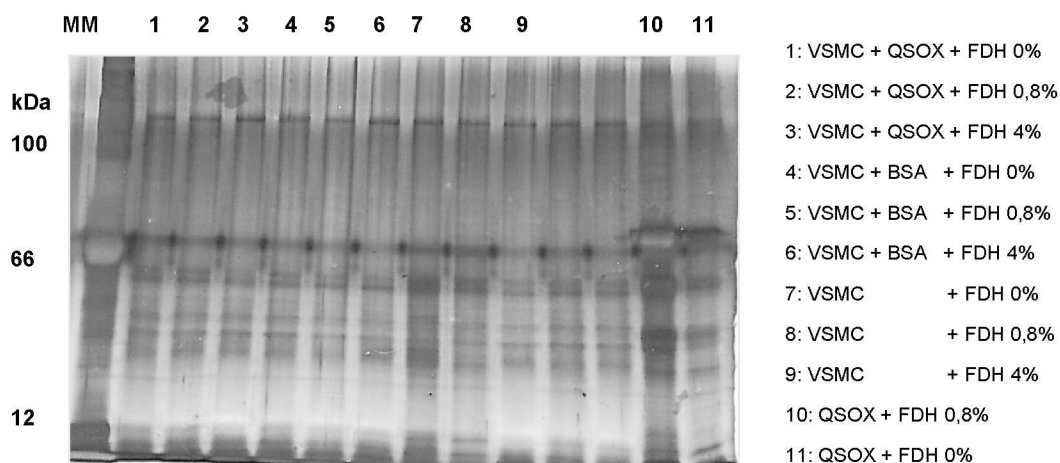
ZHANG B, SHAN H, LI D, LI ZR, ZHU KS, JIANG ZB, HUANG MS. Different methods of detaching adherent cells significantly affect the detection of TRAIL receptors. *Tumori*. 2012 Nov;98(6):800-3.

ZHANG, L., CHENG, Q., ZHANG, L., WANG, Y., MERRILL, G., ILANI, T., FASS, D., ARNÉR, E. AND ZHANG, J. Serum thioredoxin reductase is highly increased in mice with hepatocellular carcinoma and its activity is restrained by several mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016, 99, pp.426-435.

ZHENG W, ZHANG W, HU W, ZHANG C, YANG Y. Exploring the smallest active fragment of HsQSOX1b and finding a highly efficient oxidative engine. *PLoS One*. 2012;7(7):e40935

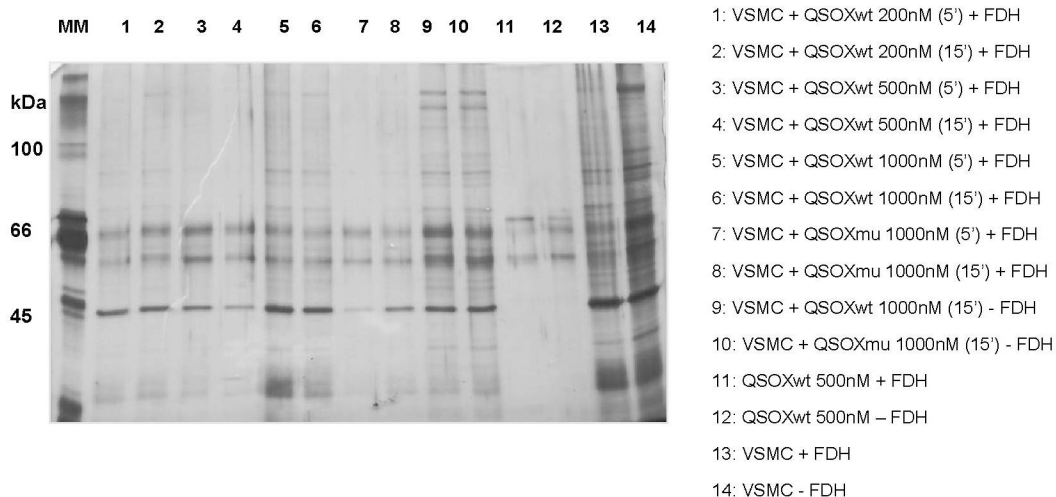
ZHU L, LI M, WEI L, LIU X, YIN J, GAO Y. Fast fixing and comprehensive identification to help improve real-time ligands discovery based on formaldehyde crosslinking, immunoprecipitation and SDS-PAGE separation. *Proteome Sci*. 2014 Feb 1;12(1):6.

**APENDICE 1: Padrão eletroforético de VSMC aderidas submetidas ao *cross-linking* com formaldeído**



**Ensaio de *cross-linking* com formaldeído 0,8% e 4% em VSMC aderidas incubadas com 1  $\mu$ M de QSOX1b selvagem e BSA por 10 min.** As VSMC foram tratadas com 1000 nM de QSOX1b recombinante selvagem e BSA por 10 min. O crosslinking foi feito com formaldeído em concentrações de 0,8% e 4% por 15 minutos. Não se observa diferenças no padrão de bandas entre as amostras tratadas e os controles negativos. Células sem tratamento e sem formaldeído também foram analisadas.

## APÊNDICE 2: Análise dos lisados proteicos após o *cross-linking*



**Lisados proteicos do ensaio de *cross-linking* com formaldeído (0,8%).** Para descartar uma possível perda da QSOX1b recombinante selvagem na fase *downstream* à lise, foram analisados os lisados proteicos das VSMC tratadas com 200, 500 e 1000 nM de wtQSOX1b e mutQSOX1b por 5 e 15 min. Não se observa presença de QSOX1b nos lisados, pelo que se infere que a proteína não está-se ligando na superfície celular ou que o *cross-linking* não está sendo efetivo.