

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE BIOMEDICINA  
CELINA JEANNE LOMAN



CELINA JEANNE LOMAN

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE QSOX1 E INTEGRINA  $\alpha 7\beta 1$**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado para  
obtenção de grau de Bacharel em Biomedicina pela  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Lia S. Nakao

CURITIBA

2021

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por guiar meu caminho, por me dar paciência, sabedoria e por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Katia e Leonard, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

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

A minha orientadora Dra. Lia S. Nakao, por seus ensinamentos, sua paciência, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

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

A minha amiga Pierina e Soraia, pela ajuda diária, pelos bons conselhos, ensinamentos e sempre dispostas a me ajudar.

À instituição de ensino Universidade Federal do Paraná, essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

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

## RESUMO

A quiescina/sulfidril oxidase (QSOX) é uma proteína com atividade redox, que catalisa a oxidação de tióis para dissulfeto, reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio. Muitos estudos relacionam a QSOX1 com câncer e doenças cardiovasculares. A integrina  $\alpha7\beta1$  pode ser ativada pela formação de uma ponte dissulfeto na região *hinge* da subunidade  $\alpha$ , o que aumenta sua adesão a laminina e a migração celular. Como a QSOX1 introduz dissulfetos em proteínas, neste projeto foi avaliada a interação entre a integrina  $\alpha7\beta1$  e a QSOX1 em um modelo de fibrossarcoma superexpressando constitutivamente a  $\alpha7\beta1$  e submetido a transfecção para superexpressão de QSOX1. Com o estudo foi observado que preliminarmente não há uma interação física entre a QSOX1 e a Integrina  $\alpha7\beta1$ , apesar disso essa interação ainda possa acontecer indiretamente entre as duas proteínas de outra forma, porém ainda não descoberto.

**Palavras-chave:** QSOX1, integrina  $\alpha7\beta1$ , câncer, adesão, purificação por afinidade, imunofluorescência indireta

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação dos domínios das isoformas longa e curta da QSOX1.....	Pg 8
FIGURA 2 - Fluxo de equivalentes de redução entre os centros redox no QSOX.....	Pg 9
FIGURA 3 - Imagem ilustrativa da integrina $\alpha\beta$ em conformações diferentes, <i>hinge</i> aberta.....	Pg 11
FIGURA 4 - Figura ilustrativa das alterações conformacionais mediada pela troca de tióis na integrina $\alpha7\beta1$ .....	Pg 12
FIGURA 5 - Morfologia das células HT1080 wt.....	Pg 14
FIGURA 6 - Imunofluorescência indireta de células HT1080wt transfectadas com vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) contendo a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal ou com o vetor vazio.....	Pg 19
FIGURA 7 - Imagem adquirida pelo Image J com zoom para a melhor identificação de QSOX-HA nas células HT1080wt.....	Pg 20
FIGURA 8 – Western blotting para avaliar o anticorpo anti-HA e anti- $\beta1$ .....	Pg 20 e 21
FIGURA 9 - Experimento de Imunoprecipitação 1 .....	Pg 22
FIGURA 10 - Experimento de Imunoprecipitação 2.....	Pg 23
FIGURA 11 - Experimento de Imunoprecipitação 3.....	Pg 24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1 Regulação redox.....	7
1.2 QSOX1 .....	7
1.3 Doenças e QSOX1 .....	10
1.4. Integrinas .....	11
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
3.1 Objetivo geral .....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
4.1 Cultura de células HT1080wt .....	14
4.2 Imunofluorescência indireta.....	14
4.3 Imunoprecipitação .....	16
4.3.1 Transfecção .....	16
4.3.2 Fixação e bloqueio .....	16
4.3.3 Lisado celular .....	16
4.3.4 Determinação da concentração proteica.....	17
4.3.5 Imunoprecipitação.....	17
4.3.6 SDS-PAGE e Western Blotting .....	17
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
5.1 Avaliação da superexpressão de QSOX-HA nas células HT1080wt por imunofluorescência indireta.....	18
5.2 Avaliação dos anticorpos ANTI-HA e anti- $\beta$ 1 por western blotting .....	20
5.4 Experimento de imunoprecipitação 1 .....	21
5.5 Experimento de imunoprecipitação 2 .....	22
5.6 Experimento de imunoprecipitação 3 .....	24
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Regulação redox

Os processos redox são essenciais para a célula, pois medeiam praticamente todos os meios fundamentais para a célula viver, como mecanismos metabólicos, enzimáticos, sinalização e transcrição de genes (SIES; JONES, 2020). Vários compartimentos operam transferindo elétrons simultaneamente tanto dentro como fora da célula a fim de determinar essa condição (HELMUT SIES, CARSTEN BERNDT, 2017). Para o estado fisiológico normal é fundamental haver a homeostase redox, estado de equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, balanceado por reações de feedback, relatado também como “o caminho de ouro de uma vida saudável” (URSINI; MAIORINO; FORMAN, 2016).

O estresse oxidativo reflete “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, levando a uma perturbação da sinalização e controle redox e/ou danos moleculares” (HELMUT SIES, CARSTEN BERNDT, 2017). Quando há uma elevada produção espécies oxidativas reativas (ROS), essas atingem alvos específicos que interrompem a sinalização redox promovendo doenças (SIES, 2020).

Os tóis, importantes da regulação redox, são grupos redutores presentes em resíduos de cisteína, os quais apresentam funções estruturais na proteína quando na forma de dissulfetos não reativos, ou funções de sinalização quando sofrem oxidações reversíveis (FORMAN; MAIORINO; URSINI, 2010). Por exemplo, uma troca de dissulfetos ou uma nitroação em um resíduo crítico podem interferir na estrutura proteica e sinalizar vários processos celulares (JONES; GO, 2010)

### 1.2 QSOX1

As quiescina/sulfidril oxidases (QSOX) foram encontradas primeiramente no leite bovino e líquido seminal na década de 70. Em 1993, foi encontrada em fibroblastos e identificada como quiescina por Coppock *et al.*, (THORPE, COLIN; COPPOCK, 2007) e foi denominada como QSOX. Os seres

humanos possuem dois genes para QSOX, a forma QSOX1 (mais abundante) e a forma QSOX2 (QSOXN) (THORPE, COLIN; COPPOCK, 2010).

A QSOX1 é um proteína dependente de FAD que catalisa a oxidação de tióis para dissulfeto, reduzindo o oxigênio a peróxido de hidrogênio, (COPPOCK, D. *et al.*, 1993), como mostra a reação a seguir:



Nos humanos, a QSOX1 é codificada pelo gene QSOX1, encontrada no cromossomo 1q25.2 (COPPOCK, D. L.; CINA-POPPE; GILLERAN, 1998), contendo 12 éxons. Em *splicing* alternativo, os 12 éxons se tornam dois mRNAs: QSOX1a (isoforma longa, 74 kDa) que possui um domínio transmembrânico e é detectada principalmente no complexo de Golgi, retículo endoplasmático e vesículas secretoras, e a QSOX1b (isoforma curta, 65 kDa), que encontra-se no Golgi mas é predominantemente secretada (KODALI; THORPE, 2010) (THORPE, C. *et al.*, 2002).

Estruturalmente a QSOX em suas duas isoformas, possui domínios de tiorredoxina (Trx) na porção N-terminal, acompanhado de um domínio específico da QSOX rico em hélices (HRR) (COPPOCK, D. L.; CINA-POPPE; GILLERAN, 1998). Na porção C-terminal o domínio ERV/ALR representa o motor catalítico da QSOX (Fig 1), uma vez que recebe os equivalentes redutores do domínio Trx para o motivo CXXC, depois para FAD e finalmente para o O<sub>2</sub> (Fig 2) (KODALI; THORPE, 2010).

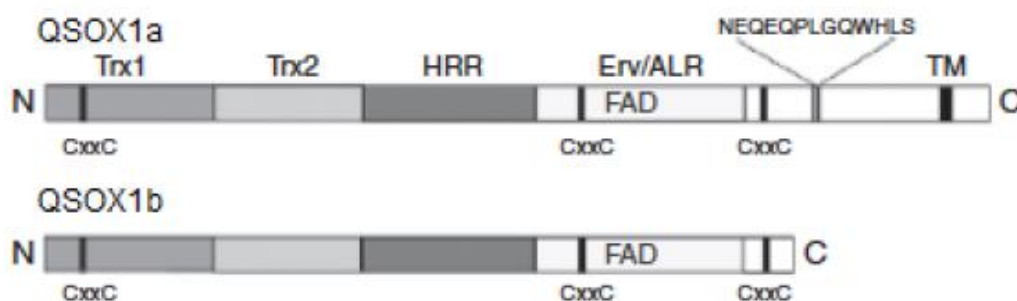


FIGURA 1: Representação dos domínios das isoformas longa e curta da QSOX1. As estruturas mostram os domínios Trx1, Trx2, HRR e ERV/ALR. Os 3 motivos CxxC, a região de ligação do FAD e o domínio transmembrânico (TM) são também representados.  
 FONTE: Figura adaptada de KODALI & THORPE (2010).

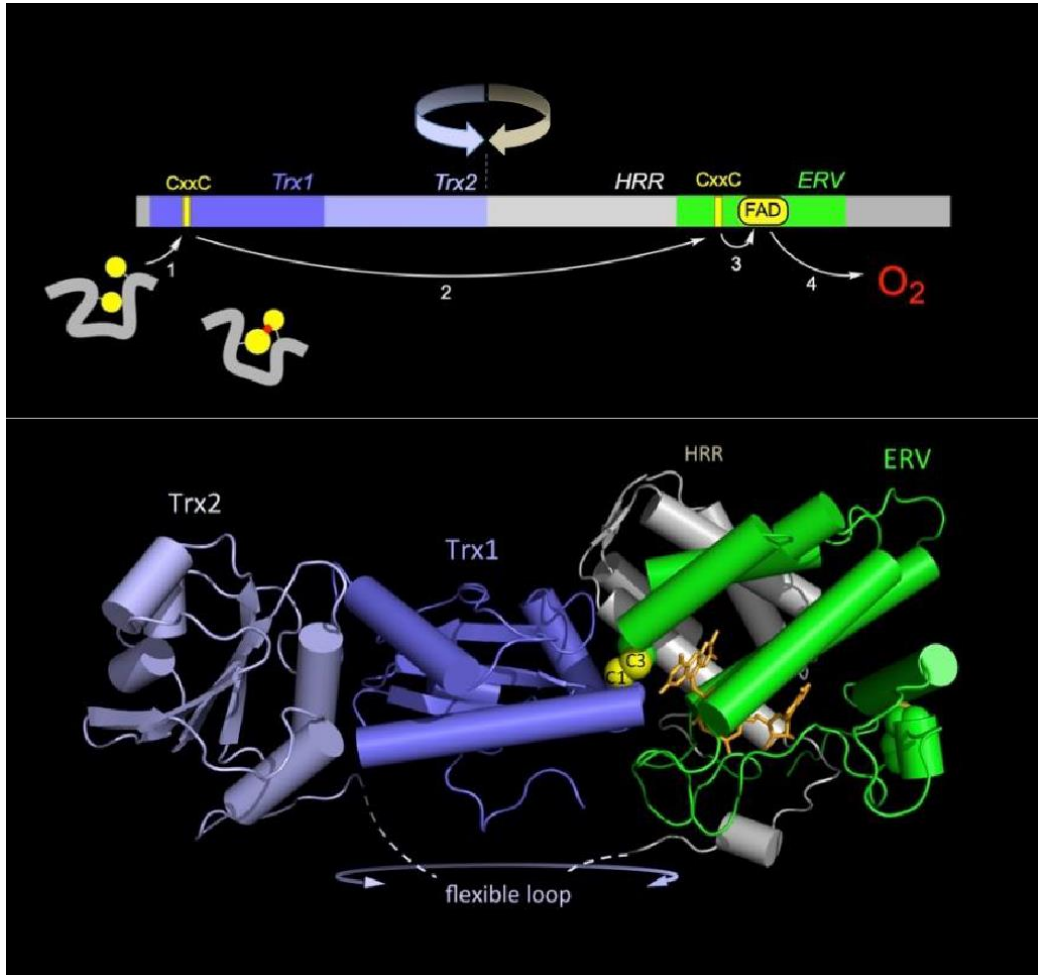


FIGURA 2 - Fluxo de equivalentes de redução entre os centros redox no QSOX. O fluxo de equivalentes redutores de um substrato (seta 1) segue através dos dois motivos CxxC redox-ativos (seta 2), do anel de flavina (seta 3) chegando ao oxigênio molecular (seta 4). Embaixo, reorientação dos domínios TRX1 e ALR/Ver para permitir o fluxo de elétrons. FONTE: THORPE LAB (2016).

É encontrada intracelularmente no complexo de Golgi, no retículo endoplasmático e em vesículas secretoras (KODALI; THORPE, 2010). Entretanto a maior parte é processada e secretada para o meio extracelular, (RUDOLF; PRINGLE; BULLEID, 2013).

Alguns estudos indicam que a QSOX1 possa estar ligada a processos de dobramento oxidativo de proteínas, devido a sua localização intracelular, bem

como na organização da matriz extracelular. (KODALI; THORPE, 2010; RUDOLF; PRINGLE; BULLEID, 2013).

### 1.3 Doenças e QSOX1

A QSOX1 já foi associada a algumas condições patológicas como câncer e doenças cardiovasculares. Até hoje foi demonstrado um aumento na expressão da QSOX1 em câncer de células tumorais de próstata (OUYANG *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2009), mama (KATCHMAN *et al.*, 2018; KNUTSVIK *et al.*, 2016; PERNODET *et al.*, 2012; SOLOVIEV *et al.*, 2013), pâncreas (ANTWI *et al.*, 2009; KATCHMAN *et al.*, 2011), fígado (ZHANG *et al.*, 2016) e neuroblastoma (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos mostram que o aumento da expressão da QSOX1 pode estar associado a ativação de metaloproteases, o que facilitaria a migração das células tumorais; assim a QSOX desempenha um papel importante na invasão e metástase no câncer (LAKE; FAIGEL, 2014). Foi demonstrado também que a QSOX1 possui um papel protetor a apoptose, pois as células MCF-7 que superexpressavam QSOX1 eram mais resistentes à morte celular por estresse oxidativo (MOREL *et al.*, 2007). Observou-se também que em células pulmonares tumorais houve uma diminuição da migração e invasão destas células quando a QSOX1 foi silenciada (SUNG *et al.*, 2018).

Entretanto, foi observado no câncer de mama uma regulação negativa da QSOX, ou seja, a superexpressão de QSOX1 diminui a progressão desse câncer, com redução do potencial invasivo e da migração celular (PERNODET *et al.*, 2012). Similarmente em outro estudo em câncer de mama foi observado que a QSOX inibe a autofagia através da inibição da fusão do autofagossomo/lisossomo (POILLET *et al.*, 2014). Estas evidências sugerem o papel da QSOX1 como um bom prognóstico do câncer.

Portanto a função da QSOX1 no câncer ainda não está bem esclarecida, dependendo muito do estágio e do tipo do câncer.

Em células musculares lisas (VSMC) a QSOX aumenta a proliferação e migração (BORGES *et al.*, 2015). A enzima já foi identificada em alta expressão na neointima de carótidas de rato (BORGES *et al.*, 2015), detectada na área



FIGURA 3: Imagem ilustrativa da integrina  $\alpha\beta$  em conformações diferentes, *hinge* aberta (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011).

As integrinas possuem papel na organização tecidual e desenvolvimento celular além de importante papel na transdução de sinal, tanto intracelularmente como extracelularmente (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011).

A integrina  $\alpha7\beta1$  é considerada um marcador oncogênico pela mudança de expressão durante a tumorigênese de glioblastoma e melanoma (BARRY L. ZIOBER, YAO QI CHEN, DANIEL M. RAMOS, NAHID WALEH, 1999). Assim como as integrinas em geral, a  $\alpha7\beta1$  na conformação *hinge* da subunidade alfa, conta com um par de cisteínas que pode formar uma ponte dissulfeto. Segundo os autores (BERGERHAUSEN *et al.*, 2020), o par de cisteínas encontrado na sequência da  $\alpha7\beta1$  na conformação *hinge* é oxidado por  $H_2O_2$  a dissulfeto, levando a uma conformação estendida (aberta) da integrina, portanto ativa. Quando o dissulfeto é reduzido por Trx1, volta-se a conformação dobrada da integrina, como demonstrado na Figura 4.

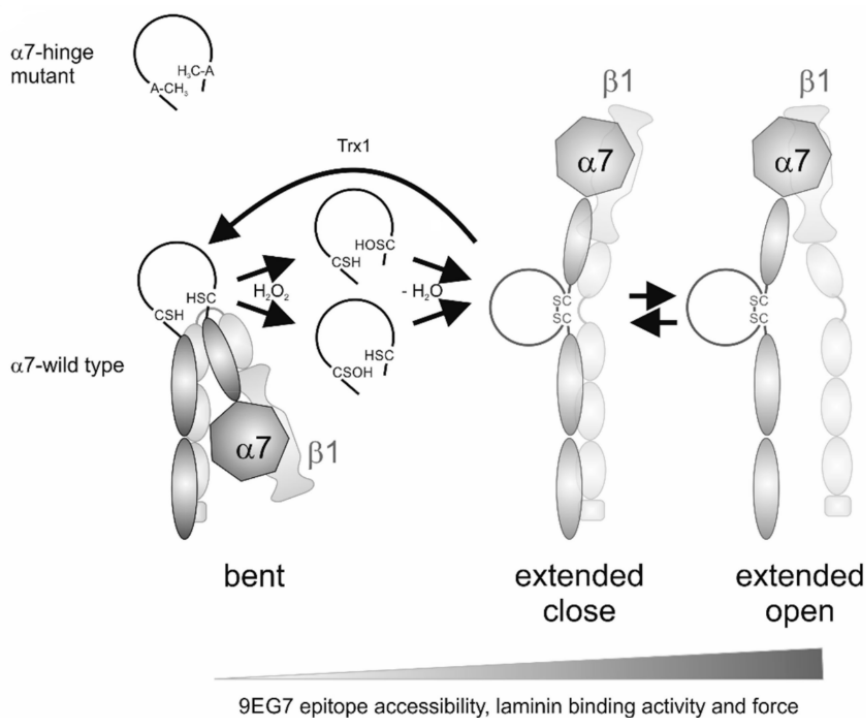


FIGURA 4: Figura ilustrativa das alterações conformacionais mediada pela troca de tióis na integrina  $\alpha 7\beta 1$ . A rotação na articulação da integrina garante o equilíbrio conformacional entre a forma aberta e *hinge*. O par de cisteínas na articulação da região  $\alpha 7$  é oxidada por  $H_2O_2$  e derivados do ácido cisteína mono sulfônico formam a ligação de dissulfeto. Esta ligação estabiliza a conformação aberta, que também pode ser reduzida a Trx1 extracelular. FONTE:BERGERHAUSEN ET AL., 2020.

Assim essas mudanças de conformações nas integrinas dependentes de tiol se associam com migração celular e ligações celulares (BERGERHAUSEN *et al.*, 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

Baseado nos dados de Bergerhausen *et al.* publicado no ano de 2020, em que a  $\alpha 7\beta 1$  é ativada por oxidação por  $H_2O_2$ , formando possivelmente uma ponte de dissulfeto, e considerando que a QSOX1 catalisa a formação de dissulfetos, a hipótese deste trabalho foi que a subunidade alfa da integrina  $\alpha 7\beta 1$  pudesse ser também oxidada pela QSOX.

Diante disso, uma interação entre a integrina  $\alpha 7\beta 1$  e a QSOX1 poderia modular a atividade da integrina  $\alpha 7\beta 1$ , promovendo alteração na adesão e migração celular.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Analisar se QSOX1 interage fisicamente com a integrina  $\alpha 7\beta 1$ .

### 3.2 Objetivos específicos

- Super-expressar QSOX1 em células HT1080 que super-expressam  $\alpha 7\beta 1$  por transfecção transiente.
- Avaliar a superexpressão de QSOX1 nestas células por imunofluorescência indireta e por Western blotting.

- Avaliar a interação entre a integrina  $\alpha 7\beta 1$  com a QSOX1 por ensaios de imunoprecipitação.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultura de células HT1080wt

Foi utilizada uma linhagem de células derivadas de fibrossarcoma humano (HT1080) (FIGURA 5), já transfectadas e expressando permanentemente a integrina  $\alpha 7\beta 1$  (HT1080 wt type) (BERGERHAUSEN *et al.*, 2020). As células foram cultivadas em meio DMEM alta glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina e o antibiótico G418 (0,4 mg/ml). Este antibiótico tem como objetivo manter a linhagem HT1080 wt, com a sua transfecção transiente, para os experimentos.

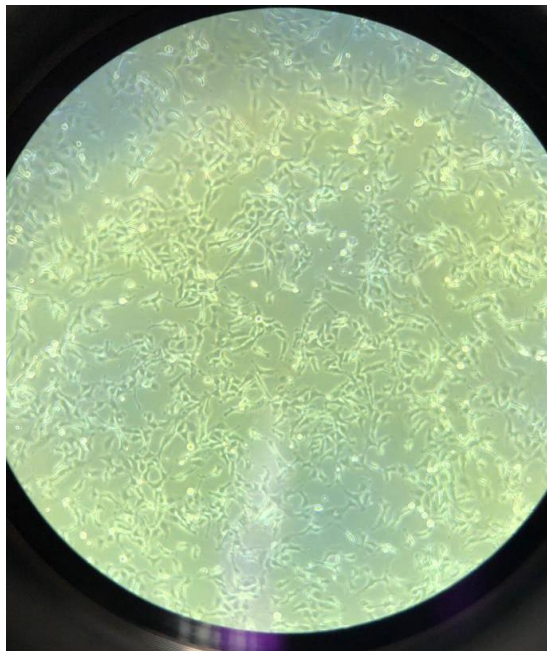


FIGURA 5: morfologia das células HT1080wt cultivadas em meio DMEM alta glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina e o antibiótico G418 (0,4 mg/ml). Objetiva de 40x. FONTE: a autora.

### 4.2 Imunofluorescência indireta

As células HT1080wt foram plaqueadas ( $3 \times 10^4$  células) em lamínulas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços. No dia seguinte as células foram transfectadas com vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) contendo a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal (FRANÇA *et al.*, 2020) ou com vetor vazio, empregando Polietilenoimina (PEI). Para a transfecção com PEI foram feitas duas soluções de 1ug plasmídeo:3 ug de PEI diluídos no meio de cultura Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific-Waltham, EUA), uma contendo vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) com a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal (FRANÇA *et al.*, 2020) e outra com o vetor vazio. Após rápida homogeneização em vortex e spin, as soluções foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 15 min, para a formação dos complexos, em seguida a solução foi adicionada nos seus respectivos poços. Após 12 horas de transfecção houve a troca do meio de cultura para meio DMEM alta glicose, 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina sem antibiótico.

Após 24 horas de transfecção foram feitas três lavagens com PBS. Em seguida as células foram fixadas com 2% de formaldeído por 20 min e os grupos aldeídos bloqueados com 125 mM de glicina por 10 min, para o *crosslinking* (ZHU *et al.*, 2014). O bloqueio e permeabilização foram feitos com 1% BSA e 0.01% saponina, respectivamente, ambos em PBS, por 20 min.

Após a incubação *overnight* com anticorpo primário anti-HA 1:500 (Cell Signaling Technology), as células foram lavadas 3 vezes com 0.01% saponina em PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho 1:500 (Alexa Fluor 568), por 50 min na solução de bloqueio. Finalmente foram realizadas 3 lavagens com PBS e a lamínula foi mergulhada em água e montada com solução de DAPI – glicerol (1:1000 – 50% glicerol), para marcação do núcleo. Foi realizado também um controle negativo para a reação para o qual esta transfecção foi feita com pcDNA3.1(-) (Invitrogen) contendo a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal e não foi incubado com o anticorpo primário, somente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho 1:500, a fim de validar a transfecção. As imagens foram adquiridas no microscópio a laser confocal marca Nikon (NIKON Instruments Inc., Tóquio, Japão), utilizando objetiva de 40x e posteriormente foram analisadas usando o software Image J.

## **4.3 Imunoprecipitação**

### **4.3.1 Transfecção**

As células HT1080wt foram plaqueadas ( $91 \times 10^4$  células) em placa 100 mm. No dia seguinte as células foram transfectadas com vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) contendo a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal (FRANÇA *et al.*, 2020) ou com vetor vazio, empregando Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific - Waltham, EUA), seguindo as instruções do fabricante: em duas soluções, no primeiro tubo com meio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific-Waltham, EUA) e Lipofectamine 3000; no segundo tubo os vetores (2,5 µg de DNA) foram diluídos em meio Opti-MEM e P3000 (2 µl/ µg de DNA). Em seguida após a junção das soluções manteve-se em repouso por 5 min em temperatura ambiente, logo as soluções foram adicionadas em suas respectivas placas. Após 4-6 horas de transfecção houve a troca de meio para meio DMEM alta glicose e incubação em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h.

### **4.3.2 Fixação e bloqueio**

Após 24 horas de transfecção, as células foram lavadas três vezes com PBS, as interações proteicas foram estabilizadas por ligação covalente usando 2% de formaldeído (ZHU *et al.*, 2014) por 20 min e os grupos aldeídos bloqueados com 125 mM de glicina por 10 min.

### **4.3.3 Lisado celular**

Após fixação e bloqueio as células foram novamente lavadas com PBS e coletadas com ajuda de um scraper. Em seguida, foram centrifugadas e lisadas com tampão de lise (25 mM Tris, pH 7.4, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0.3% Triton X-100, 20 mM N-etilmaleimida and Roche inibidor de protease sem EDTA). Após 10 min no gelo, a suspensão foi centrifugada (12000 g, 4°C, 12 min) e o sobrenadante (lisado) foi coletado e armazenado a -20°C.

#### **4.3.4 Determinação da concentração proteica**

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Aplica-se o reagente de Bradford em cada poço em uma placa. Para obter uma curva padrão foi utilizado BSA (0,93mg/ml) em 10 poços, 0µg, 1µg, 2µg, 3µg e 4µg, em duplicata, e nos restantes foi aplicada a amostra de interesse, mais 120 µL do Reagente de Bradford. Em seguida, as absorbâncias foram determinadas em um leitor de placa em 595 nm.

#### **4.3.5 Imunoprecipitação**

Para a purificação por afinidade, foram obtidos os lisados em tampão de lise das seguintes condições:

HT1080 wt+ pCDNA3.1(-)

HT1080wt +QSOX wt

Os lisados celulares (com 500-800 ug de proteína) foram incubados com 30 ul de resina anti-HA-agarose (Sigma clone HA-7) por 50 min, 4°C, sob agitação. O meio de cultura foi concentrado e enriquecida com 5 ul de resina anti-HA-agarose (Sigma clone HA-7) também por 50 min, 4°C, sob agitação. Após este tempo, o lisado foi coletado e as beads foram lavadas com 1ml de tampão de lise cinco vezes e incubadas em tampão de amostra redutor a 95°C, por 5 min (NAKAO *et al.*, 2015). O volume total do sobrenadante foi submetido a SDS-PAGE.

#### **4.3.6 SDS-PAGE e Western Blotting**

As amostras foram separadas gel de poliacrilamida 10, 8 e 6%, sendo elas lisado QSOX wt, lisado vetor vazio, meio de cultura concentrado e enriquecido com a resina de anti-HA-agarose, void é o primeiro sobrenadante após a incubação com as beads de anti-HA-agarose, pc DNA 3.1 (-) + beads e QSOX-HA + beads são os lisados incubados com as beads de anti-HA-agarose. As proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose em cuba semi-dry. A transferência foi verificada pela coloração da membrana com vermelho de Ponceau.

Após a membrana ser lavada com tampão TBS-T, feito o bloqueio com Blotting-Grade Blocker (BIO-RAD) *nonfat dry milk* diluído a 10% por 2 h. A incubação com o anticorpo primário anti-HA (Santa Cruz), overnight, de concentração 1:500 e também separadamente foi usado o ANTI- $\beta$ 1 (anticorpo policlonal produzido em coelho, doado pelo grupo do Professor J. Eble, Universidade de Muenster, Alemanha). Para o bloqueio com o anticorpo secundário foi usado ANTI-RABBIT A0545 (Sigma), 1:10.000. Logo depois de lavado foi revelado em filme com o substrato SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação da superexpressão de QSOX-HA nas células HT1080wt por imunofluorescência indireta**

As imagens de microscopia de fluorescência mostram que a transfecção com o vetor da QSOX-HA foi eficiente e específica (Fig 6). O controle negativo, como almejado não se observou marcação vermelha pois não houve a incubação com o anticorpo primário ANTI-HA. Na transfecção com o vetor vazio não houve a detecção de QSOX-HA mesmo com a incubação com o anticorpo, como esperado.

A ampliação da imagem permite observar uma imunomarcação citossólica com uma maior expressão perinuclear (Fig 7), o que está de acordo com a expressão em Golgi (KODALI; THORPE, 2010).

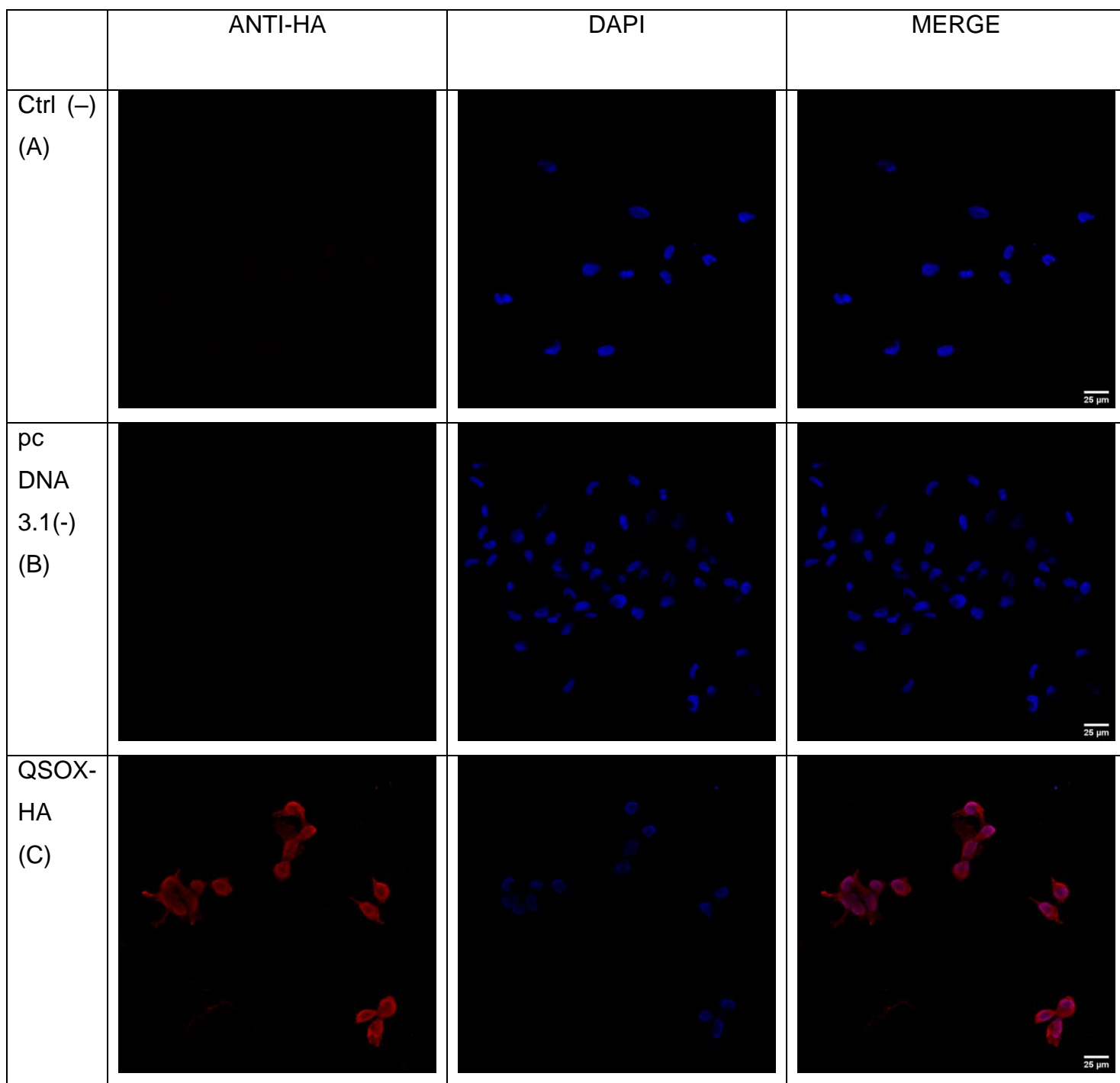


FIGURA 6: Imunofluorescência indireta de células HT1080wt transfectadas com vetor vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) contendo a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal ou com o vetor vazio. A marcação vermelha detecta QSOX-HA; em azul o núcleo corado com DAPI. (A) no controle negativo observa-se somente a marcação no núcleo com DAPI. (B) As células tranfectadas com o vetor vazio não nota-se a detecção de QSOX-HA, houve incubação com anticorpo primário e secundário (C) Enquanto que a transfecção com o vetor de QSOX wt, incubado com anticorpo primário e secundário observa-se a detecção de ANTI-HA e marcação do núcleo com DAPI.

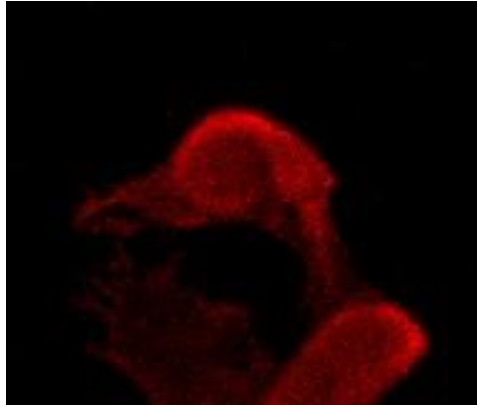
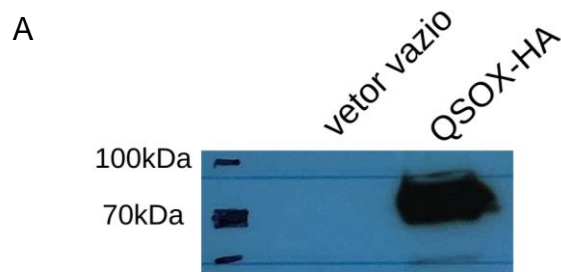


FIGURA 7: imagem adquirida pelo Image J com zoom para a melhor identificação de QSOX-HA nas células HT1080wt, ao redor do núcleo há uma marcação de coração vermelha mais evidente.

## 5.2 Avaliação dos anticorpos ANTI-HA e anti- $\beta$ 1 por western blotting

A funcionalidade dos anticorpos anti-HA e anti- $\beta$ 1 disponíveis foram avaliados por western blotting, uma vez que a imunoprecipitação foi analisada por esta técnica. O resultado obtido confirmou a super-expressão e a possibilidade de se utilizar tanto o anticorpo anti-HA (FIGURA 8) como o anticorpo anti- $\beta$ 1 (FIGURA 9), ambos experimentos foram realizados em placa de cultura P35. Como esperado, HA só foi detectado no lisado de células transfectadas com QSOX-HA, enquanto que  $\beta$ 1 foi detectada em ambos os lisados, uma vez que esta linhagem super-expressa  $\alpha$ 7 $\beta$ 1.



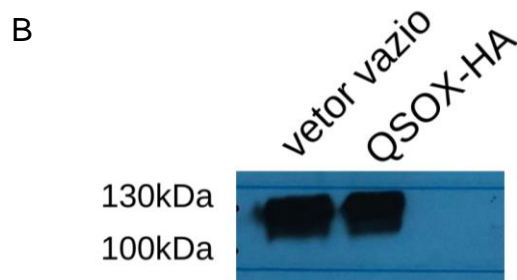


FIGURA 8: **Western blotting para avaliar o anticorpo anti-HA e anti- $\beta$ 1.** Corrida de SDS-Page em gel de 8%. Aplicando DNA 3.1 (-) e QSOX-HA que são lisados (25 ug de cada). (A) Western blotting 1 de células HT1080wt transfetadas com vetor vazio e vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) contendo a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal, QSOX possui tamanho molecular de 66kDa. (B) Western blotting 2 de células HT1080wt transfetadas com vetor vazio e vetor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) contendo a sequência de QSOX1 wt de camundongo, com uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal, Integrina  $\beta$ 1 possui tamanho molecular de 130kDa.

#### 5.4 Experimento de imunoprecipitação 1

A fim de demonstrar a possível ligação entre QSOX1 e integrina  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 foi feito o experimento de imunoprecipitação. Experimento realizado a partir de uma placa de cultura P100, e por conseguinte a Imunoprecipitação foi realizada com 726 ug de proteína total (FIGURA 9). Neste ensaio não foi realizado o crosslinking com formaldeído.

O Western blotting revelou a presença de  $\beta$ 1 nos lisados e no void (130 kDa). Nas beads incubadas com o lisado de células superexpressando QSOX-HA observa-se uma marcação difusa, com uma possível banda na altura esperada. Contudo, não é possível afirmar com certeza se trata-se da  $\beta$ 1 (FIGURA 9A). A expressão de QSOX-HA foi avaliada. Ela está claramente presente nas beads incubadas com o lisado superexpressando QSOX-HA, está ausente nas beads incubadas com lisado controle, mas também não foi detectada no lisado total (FIGURA 9B). Portanto, este primeiro ensaio foi desconsiderado.

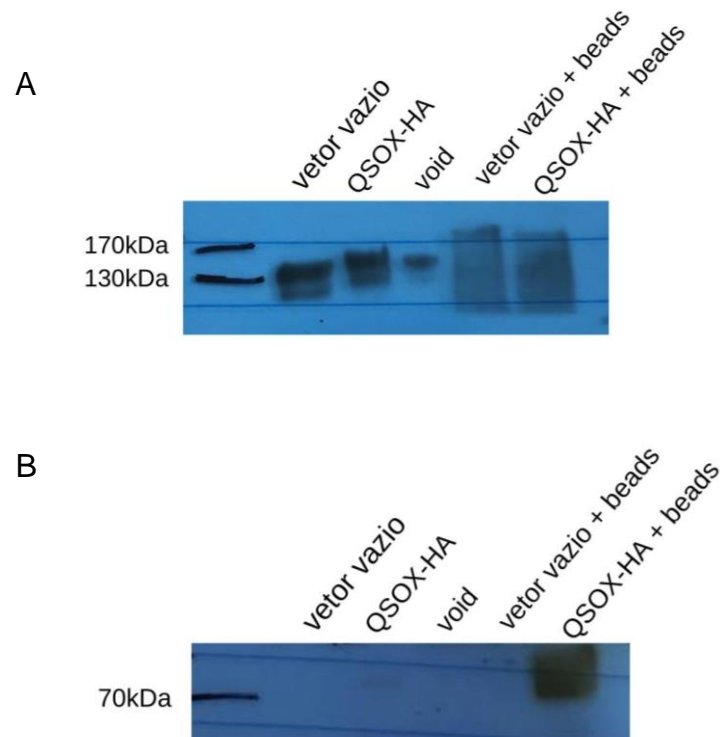


FIGURA 9: **Western blotting para avaliar o anticorpo anti-HA e anti-  $\beta$ 1**. Aplicando vetor vazio e QSOX-HA que são lisados (25  $\mu$ g de cada), void é o primeiro sobrenadante após a incubação com as beads de anti-HA-agarose, vetor vazio + beads e QSOX-HA + beads são os lisados incubados com as beads de anti-HA-agarose. A mesma membrana foi cortada para que pudesse ser incubada com dois anticorpos diferentes. (A) Western blotting 3 utilizado anticorpo primário ANTI- $\beta$ 1 1:1000 para incubação e ANTI-RABBIT 1:10000 como anticorpo secundário. (B) Western blotting 4 utilizado anticorpo primário ANTI-HA 1:500 para incubação e ANTI-RABBIT 1:10000 como anticorpo secundário.

## 5.5 Experimento de imunoprecipitação 2

A fim de demonstrar a possível ligação entre QSOX1 e integrina  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 foi feito mais um experimento de imunoprecipitação. Experimento realizado a partir de uma placa de cultura P100, e, por conseguinte a Imunoprecipitação foi realizada com 303  $\mu$ g de proteína total (FIGURA 10) e crosslinking com formaldeído seguido de bloqueio com glicina.

O Western Blotting indicou que a expressão de QSOX-HA foi mostrada no lisado de QSOX-HA, no meio de cultura incubado com as beads e nas beads incubadas com o lisado superexpressando QSOX-HA, e está ausente nas beads incubadas com lisado controle (FIGURA 10A). Não foi possível detectar  $\beta$ 1 (130 kDa) nas amostras de lisado celular. Portanto não é possível confirmar a ligação

da integrina nas beads de anti-HA-agarose (FIGURA 10B). Com a intenção de encontrar um possível ligante de QSOX1 foi feito Western Blotting com anti-filamina (FIGURA 10C). Porém foi observado a filamina em todas canaletas, podendo confirmar assim que a filamina não é um possível ligante de QSOX1.

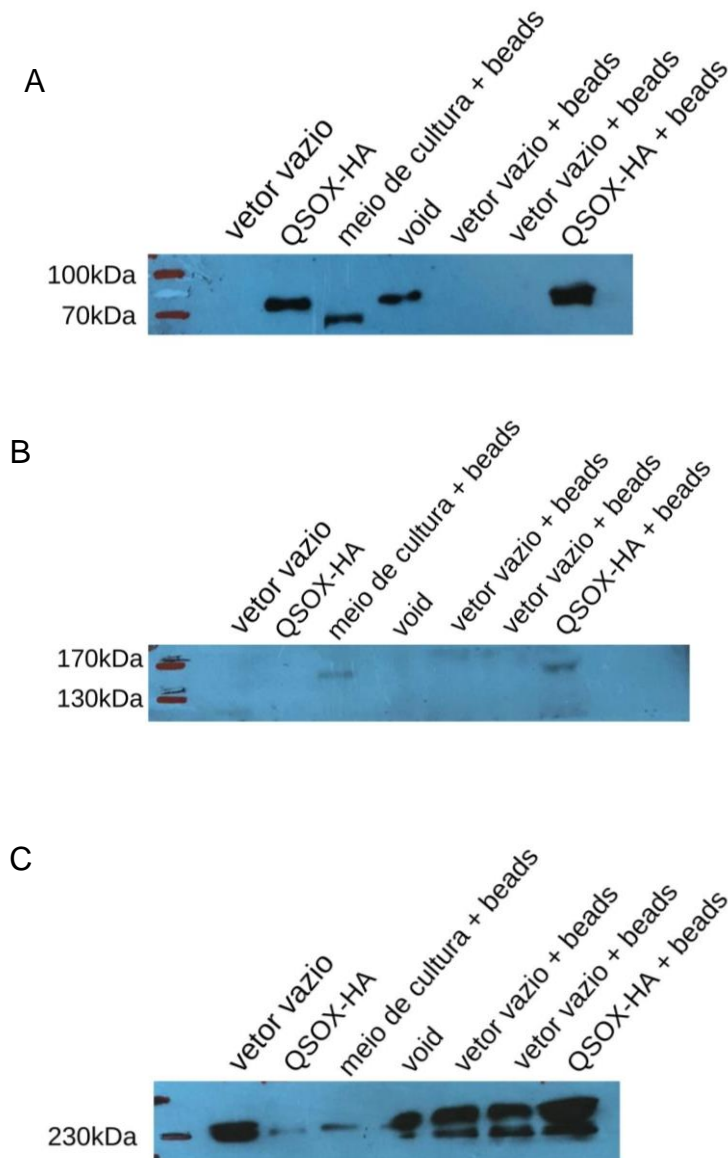


FIGURA 10: **Western blotting para avaliar o anticorpo anti-HA, anti-  $\beta$ 1 e anti-filamina.** Aplicando vetor vazio e QSOX-HA que são lisados (25 ug de cada), void é o primeiro sobrenadante após a incubação com as beads de anti-HA-agarose, meio de cultura concentrado e enriquecido com beads de anti-HA-agarose, vetor vazio + beads e QSOX-HA + beads são os lisados incubados com as beads de anti-HA-agarose. A mesma membrana foi cortada para que pudesse ser incubada com três anticorpos diferentes. (A) Western blotting 5 utilizado anticorpo primário ANTI-HA 1:500 para incubação e ANTI-RABBIT 1:10000 como anticorpo secundário. (B) Western blotting 6 utilizado anticorpo primário ANTI- $\beta$ 1 1:1000 para incubação e ANTI-RABBIT 1:10000 como anticorpo secundário. (C) Western blotting 7 utilizado anticorpo primário ANTI-filamine 1:1000 para incubação e ANTI-MOUSE 1:10000 como anticorpo secundário

## 5.6 Experimento de imunoprecipitação 3

Foi realizado mais um experimento de imunoprecipitação, em seguida western blotting incubando com dois anticorpos diferentes separadamente. Experimento realizado a partir de uma placa de cultura P100, e por conseguinte a Imunoprecipitação foi realizada com 535 ug de proteína total (FIGURA 11) e crosslinking com formaldeído seguido de bloqueio com glicina.

Por meio deste ensaio foi obtido mais dois resultados: a mesma membrana foi cortada para que pudesse ser incubada com dois anticorpos diferentes. Foi observada a presença da integrina  $\beta 1$  (FIGURA 11A) nas bandas equivalentes nos lisados e no void, porém não foi observado a integrina nas amostras de lisado incubadas com as beads de anti-HA-agarose e nem no meio de cultura incubados com as beads de anti-HA-agarose. No meio de cultura não se era esperando encontrar a integrina pelo fato de ela não ser secretada e sim mantida na membrana da célula, Logo não é possível confirmar a ligação da integrina nas beads de anti-HA-agarose. Os resultados com anti-HA reproduzem o resultado da imunoprecipitação 2: QSOX presente em seu lisado, no meio de cultura, void e no lisado incubado com as beads (FIGURA 11B)

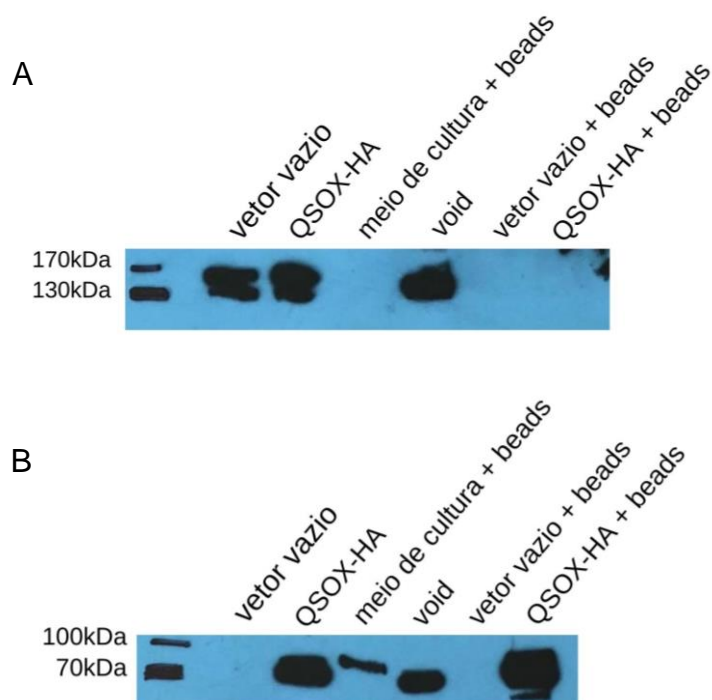


FIGURA 11: **Western blotting para avaliar o anticorpo anti-HA e anti-  $\beta$ 1**. Vetor vazio e QSOX-HA são lisados; meio de cultura + beads foi o meio de cultura coletado antes da lise e concentrado e incubado com as beads ; void é o primeiro sobrenadante após a incubação com as beads de anti-HA-agarose; vetor vazio + beads e QSOX-HA + beads são os seus respectivos lisados incubados com as beads de anti-HA-agarose (A) Western blotting 8 utilizado anticorpo primário ANTI- $\beta$ 1 1:1000 para incubação e ANTI-RABBIT 1:10000 como anticorpo secundário. (B) Western blotting 9 utilizado anticorpo primário ANTI-HA 1:500 para incubação e ANTI-RABBIT 1:10000 como anticorpo secundário.

## 6. DISCUSSÃO.

Os dados obtidos, ainda que preliminares, indicam que não há uma interação física entre QSOX1 e a integrina  $\alpha$ 7 $\beta$ 1. O estudo de Bergerhausen *et al.* 2020 demonstrou que a integrina  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 é ativada por oxidação de dois resíduos de cisteínas na subunidade alfa a dissulfeto. Portanto, segundo nossos dados, esta oxidação não depende da QSOX1 extracelular.

Porém abrem-se alguns questionamentos a respeito de uma possível interação entre essas duas proteínas. As integrinas possuem variados mecanismos de regulação. Sendo uma proteína transmembrânica, ela é capaz de receber sinais tanto de dentro como de fora da célula, mecanismos de “inside out” e “outside in”. Sendo assim, tanto a QSOX1 intracelular ou extracelular poderiam regular a integrina de formas distintas. A QSOX1 secretada seria capaz de oxidar a integrina  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 sem a dependência de peróxido de hidrogênio, ou oxidar diretamente a cisteína da porção *hinge* da integrina. A QSOX1 intracelular poderia oxidar algum substrato dentro da célula gerando peróxido de hidrogênio, o qual poderia difundir para o meio extracelular e oxidar as cisteínas no domínio *hinge*. Além disso, a QSOX1 sem atividade, independente da sua função, poderia se ligar a cauda C-terminal da integrina  $\alpha$ 7 $\beta$ 1, intracelularmente e ativá-la.

## 7. CONCLUSÃO

As células HT8010wt poderiam ser um modelo para estudos de QSOX1 intracelular e secretada, por possuir alta eficiência na transfecção.

Apesar dos dados não confirmarem a hipótese de uma possível interação física entre QSOX1 e Integrina  $\alpha 7\beta 1$ , a regulação da  $\alpha 7\beta 1$  pela QSOX1 poderia acontecer de outras formas.

É possível afirmar que os ensaios cumpriram seus objetivos para a análise, porém seriam necessários mais experimentos para confirmar a hipótese. Ensaios como de colocalização com imunofluorescência indireta poderia facilitar e possivelmente confirmar a hipótese de interação entre QSOX1 e Integrina  $\alpha 7\beta 1$ .

## 6. REFERÊNCIAS

ANTWI, K. *et al.* 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*, v. 8, n. 10, p. 4722–4731, 2009.

ARAÚJO, D. G. B. *et al.* Expression level of quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) in neuroblastomas. *European Journal of Histochemistry*, v. 58, n. 1, p. 52–56, 2014.

BARRY L. ZIOBER, YAO QI CHEN, DANIEL M. RAMOS, NAHID WALEH, AND R. H. K. Expression of the  $\alpha 7\beta 1$  Laminin Receptor Suppresses Melanoma Growth and Metastatic Potential. *Cell Growth & Differentiation*, 1999.

BERGERHAUSEN, L. *et al.* Extracellular redox regulation of  $\alpha 7\beta$  integrin-mediated cell migration is signaled via a dominant thiol-switch. *Antioxidants*, v. 9, n. 3, p. 1–23, 2020.

BORGES, B. E. *et al.* The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: Evidence for a role in neointima growth. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1852, n. 7, p. 1334–1346, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.002>>.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Crop Journal*, v. 5, n. 5, p. 407–415, 1976.

CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, n. 3, p. 1–14, 2011.

- COPPOCK, D. *et al.* Regulation of the quiescence-induced genes: Quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 269, n. 2, p. 604–610, 1993.
- COPPOCK, D. L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The Quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: Thioredoxin and ERV1. *Genomics*, v. 54, n. 3, p. 460–468, 1998.
- DE ANDRADE, C. R. *et al.* Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: Possible role in apoptosis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, v. 47, n. 10, p. 716–727, 2011.
- FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, v. 49, n. 5, p. 835–842, 2010.
- FRANÇA, K. C. *et al.* Quiescin/sulfhydryl oxidase 1b (QSOX1b) induces migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by distinct redox pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 679, p. 108220, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108220>>.
- HELMUT SIES, CARSTEN BERNDT, AND D. P. J. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 2017.
- HUMPHRIES, J. D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M. J. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 19, p. 3901–3903, 2006.
- HYNES, R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, v. 69, n. 1, p. 11–25, 1992.
- HYNES, R. O. Integrins Bidirectional, Allosteric Signaling Machines Review. *Myelin Biology and Disorders*, v. 1, n. Table 1, p. 609–632, 2002.
- JONES, D. P.; GO, Y. M. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 12, n. SUPPL. 2, p. 116–125, 2010.
- KATCHMAN, B. A. *et al.* Correction: 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., 15, 2, (2013) (R28)] DOI: 10.1186/bcr3407. *Breast Cancer Research*, v. 20, n. 1, 2018.
- KATCHMAN, B. A. *et al.* Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic

tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. *Molecular Cancer Research*, v. 9, n. 12, p. 1621–1631, 2011.

KNUTSVIK, G. *et al.* QSOX1 expression is associated with aggressive tumor features and reduced survival in breast carcinomas. *Modern Pathology*, v. 29, n. 12, p. 1485–1491, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2016.148>>.

KODALI, V. K.; THORPE, C. Oxidative protein folding and the quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 13, n. 8, p. 1217–1230, 2010.

LAKE, D. F.; FAIGEL, D. O. The emerging role of qsox1 in cancer. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 21, n. 3, p. 485–496, 2014.

MEBAZAA, A. *et al.* Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: Identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure. *European Heart Journal*, v. 33, n. 18, p. 2317–2324, 2012.

MOREL, C. *et al.* Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, v. 313, n. 19, p. 3971–3982, 2007.

NAKAO, L. S. *et al.* Mechanism-based proteomic screening identifies targets of thioredoxin-like proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 9, p. 5685–5695, 2015.

OUYANG, X. *et al.* Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. *Cancer Research*, v. 65, n. 15, p. 6773–6779, 2005.

PERNODET, N. *et al.* High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, v. 14, n. 5, p. 1–15, 2012.

POILLET, L. *et al.* QSOX1 inhibits autophagic flux in breast cancer cells. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, 2014.

RUDOLF, J.; PRINGLE, M. A.; BULLEID, N. J. Proteolytic processing of QSOX1A ensures efficient secretion of a potent disulfide catalyst. *Biochemical Journal*, v. 454, n. 2, p. 181–190, 2013.

SIES, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*, v. 9, n. 9, p. 1–6, 2020.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>>.

SOLOVIEV, M. *et al.* Elevated Transcription of the Gene QSOX1 Encoding Quiescin Q6 Sulfhydryl Oxidase 1 in Breast Cancer. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, 2013.

SONG, H. *et al.* Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene*, v. 28, n. 37, p. 3307–3319, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.181>>.

SUNG, H. J. *et al.* Quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) secreted by lung cancer cells promotes cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 10, p. 1–15, 2018.

THORPE, C. *et al.* Sulfhydryl oxidases: Emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 405, n. 1, p. 1–12, 2002.

THORPE, COLIN; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: Emerging roles for a new flavoprotein family. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 19, p. 13929–13933, 2007.

THORPE, COLIN; COPPOCK, D. L. Multidomain Flavin-Dependent Sulfhydryl Oxidases. *Geographical Journal*, v. 176, n. 3, p. 267–269, 2010.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; FORMAN, H. J. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biology*, v. 8, p. 205–215, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.010>>.

ZHANG, L. *et al.* Serum thioredoxin reductase is highly increased in mice with hepatocellular carcinoma and its activity is restrained by several mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 99, p. 426–435, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.028>>.

ZHU, L. *et al.* Fast fixing and comprehensive identification to help improve real-time ligands discovery based on formaldehyde crosslinking, immunoprecipitation and SDS-

PAGE separation. *Proteome Science*, v. 12, n. 1, p. 6–13, 2014.