

LUCIANA PESCATORE ALVES

**Papel da dissulfeto isomerase proteica (PDI) na migração de
células musculares lisas vasculares: possível envolvimento de
Nox1 NADPH oxidase e RhoGTPases**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo, para obtenção
de título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael
Martins Laurindo

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pescatore-Alves, Luciana

Papel da dissulfeto isomerase protéica (PDI) na migração de células musculares lisas vasculares : possível envolvimento de Nox1 NADPH oxidase e RhoGTPases / Luciana Pescatore Alves. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.Isomerase de dissulfetos de proteínas 2.NADPH oxidase
3.Proteínas rho de ligação ao GTP 4.Movimento celular 5.Fator de crescimento derivado de plaquetas 6.Retículo endoplasmático 7.Espécies de oxigênio reativas
8.Superóxidos 9.Peróxido de hidrogênio

USP/FM/DBD-358/11

*Aos meus pais que nunca mediram esforços
para me apoiar em todas as minhas
decisões com carinho e amor
incondicional.*

*Aos meus irmãos, Adriana e Daniel,
pela intensa torcida.*

*Ao Cristiano, pela compreensão,
paciência e dedicação.*

Agradecimentos

Ao longo dos últimos quatro anos me envolvi intensamente na realização desta tese. O que me motivou neste percurso, além do prazer pela aquisição do saber, foram as relações que estabeleci, tanto com “amores” antigos como os novos que conquistei. Sou grata a todos os que de uma forma ou de outra contribuíram com esta trajetória.

Ao Professor Francisco Laurindo, dedico respeito e admiração pelo exemplo de pessoa e cientista, que me ensinou muito mais do que realizar uma tese, mas como superar limites.

Aos meus colegas de laboratório que compartilharam resultados, angustias e alegrias, retribuo o carinho dedicado, em especial Ana Lucia, Denise, João, Maria e Victor por transcenderem os limites de colega.

Ao Professor Fabio Forti agradeço pela colaboração que trouxe importante contribuição a este trabalho.

Ao Professor Diego Bonatto, pela colaboração com a metodologia de biologia de sistemas que guiaram o final deste trabalho.

To Professor Hervé K, my gratitude for supervising my work even after I came back to Brazil. Your contributions were very important for the final version of our study. It was a pleasure to learn Science in a wonderful city.

I would also like to acknowledge the colleagues in Université de la Méditerranée, Marseille, France. Thank you for sharing scientific and non scientific experiences with me.

To Amin and Salma, my huge gratefulness for been much more than just friends in this journey.

Aos meus amigos queridos, em especial Ana Carolina, Carolina, Cristiane e Gabriela que ao compartilharem bons e maus momentos me cativaram para sempre. Ter amigas para todos os momentos os momentos é um raro privilégio.

Aos meus familiares pela intensa torcida, meu eterno carinho.

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processos 2007/53171-6 (bolsa de doutorado), 2004/13683-0 e 2009/54764-6 (projetos temáticos); INCT de Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma); e ARCUS program-French MAEE.

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução	11
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo geral	30
2.1. Objetivo específico	30
3. Métodos	31
3.1. Cultura de células	32
3.2. Transformação de bactérias e purificação do DNA plasmideal	33
3.3. Transfecção em VSMC	33
3.3.1. Lipofectamina®	33
3.3.2. Kit Nucleofactor Amaxa®	34
3.4. Atividade do complexo NADPH oxidase	34
3.5. Produção total de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	34
3.6. Migração Celular	35
3.6.1. Câmara de <i>Boyden</i>	35
3.6.2. <i>Wound Healing</i>	36
3.6.3. <i>Single cell Migration</i>	36
3.7. Atividade RhoA e Rac1	37
3.7.1. Preparação dos <i>beads</i> ligados à RBD-GST ou PBD-GST	37
3.7.2. <i>Pull-down</i> com proteína de fusão	38
3.8. Análise Western	38
3.9. Prospecção de potenciais interações da PDI por métodos de Biologia de Sistemas	38
3.9.1 Desenho da rede de interação proteína-proteína (PPPI) e análise topológica global	38
3.9.2. Centralidade das redes e análise topológica	39

3.10. Análise Confocal	39
3.11. Imunoprecipitação	40
3.12. Análise estatística	40
4. Resultados	41
4.1. Efeito de curva dose-resposta de PDGF na migração de VSMC	42
4.2. Produção de ROS e atividade NADPH oxidase em VSMC após curva tempo-resposta de PDGF	42
4.3. Efeito do difenileno-iodônio na migração celular de VSMC	42
4.4. Expressão/localização de PDI após estímulo com PDGF	42
4.6. Produção total de ROS em VSMC após silenciamento da PDI	47
4.7. Expressão de mRNA Nox1 e Nox4 em VSMC com silenciamento da PDI	47
4.8. Efeito do silenciamento da PDI na migração celular em <i>Câmara de Boyden e Wound Healing</i>	47
4.9. Efeito do silenciamento da PDI na persistência direcional da migração de VSMC pelo modelo de <i>Single cell Migration</i>	50
4.10. Efeito da superexpressão de PDI na migração celular de VSMC	52
4.11. Estudos do interatoma da PDI por meio de mapas de interação proteína-proteína por métodos de Biologia de Sistemas	54
4.12. Efeito do silenciamento da PDI na atividade de RhoA e Rac1	58
4.13. Análise da co-localização entre PDI e RhoGTPases por microscopia confocal	58
4.14. Análise da interação física entre PDI e Rac1, RhoA ou RhoGDI por ensaios de co-imunoprecipitação (co-IP)	60
4.15. Efeito do silenciamento da PDI na formação de estruturas de adesão em VSMC	65
4. Discussão	69
5. Conclusão	76
6. Referências	78

Apêndice

Curriculum Vitae

Lista de abreviaturas

AngII	angiotensina II
CH ₃ CN	acetonitrila
CO ₂	dióxido de carbono
DHE	dihidoretidina
DPI	difenileno-iodônio
DTPA	N,N,N',N''-penta-acetato-dietilenotriamina
DTT	dithiothreitol
E	etídio
EDTA	etilenodiaminatetraacetato de sódiodihidratado
EGTA	etileno-bis (oxietilenonitrila) tetraacetato de sódio
EOH	2-hidróxido de etídio
Ero-1	Endoplasmic reticulum oxidase-1
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GAP	<i>GTPase-activating proteins</i>
GDP	guanosina difosfato
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
GTP	guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	cromatografia de alta performance
HRP	peroxidase de rabanete
NAC	N-Acetil-L-cisteína
Nox	isoforma da NADPH oxidase (<i>Non-phagocytic oxidase</i>)
PBS	salina pH 7,4
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDI	Dissulfeto Isomerase Proteica
PPPI	interação física proteína-proteína (Physical protein-protein interaction)
RE	retículo endoplasmático
RhoGDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS	dodecil sulfato de sodio
VSMC	células musculares lisas vasculares (<i>vascular smooth muscle cells</i>)

Resumo

Pescatore LA, Papel da dissulfeto isomerase proteica (PDI) na migração de células musculares lisas vasculares: possível envolvimento de Nox1 NADPH oxidase e RhoGTPases [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011. 89p.

A migração de células musculares lisas (VSMC) da camada média do vaso para a íntima é essencial para vasculogênese e contribui para o processo de aterosclerose e estenose após lesão por cateter-balão, caracterizando-se como um importante alvo terapêutico. Diversos trabalhos já demonstraram que fatores de crescimento (como PDGF e FGF) estimulam a migração de VSMC, inclusive, muitos desses fatores de crescimento induzem sinalização redox associadas à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ex. Nox1 NADPH oxidase). Nosso grupo já descreveu interações físicas e regulação funcional da NADPH oxidase por uma chaperona redox do retículo endoplasmático, a Dissulfeto Isomerase Protéica (PDI). Contudo, tanto a relevância fisiológica como os mecanismos desta interação ainda não estão claros. O objetivo geral do presente trabalho é investigar por meio de experimentos de perda e ganho de função da PDI, a importância da PDI na migração celular associada à ativação do complexo NADPH oxidase, bem como possíveis mecanismos envolvidos na interação entre a PDI e esse complexo enzimático durante a migração celular. Os objetivos específicos são: *i*) avaliar o efeito do silenciamento da PDI, bem como da expressão forçada de PDI “wild type” na migração de VSMC *in vitro*; *ii*) analisar o efeito da transfecção de siRNA da PDI atividade e expressão de distintas isoformas da NADPH oxidase vascular e produção de ROS induzida por PDGF; *iii*) investigar o envolvimento de RhoGTPases na regulação do complexo NADPH oxidase pela PDI. No presente trabalho, mostramos que o PDGF induz redistribuição da PDI e aumento da produção de ROS. O silenciamento da PDI inibe a produção de ROS e a expressão do mRNA da Nox1, sem alterar a expressão do mRNA da Nox4. Mais ainda, o silenciamento da PDI reduz a migração celular induzida por PDGF, em diferentes modelos de migração, enquanto a super-expressão da PDI induz aumento espontâneo da migração na condição basal. Análise utilizando métodos de Biologia de Sistemas de redes de interação física proteína-proteína em bancos de dados e técnicas de análise de centralidade, topologia e ontologia gênica indicou forte convergência entre PDI e proteínas da família das pequenas RhoGTPases e seus reguladores. Em VSMC com silenciamento da PDI, a presença do PDGF induziu uma redução na atividade de Rac1 e RhoA, sem alterar a expressão total destas proteínas. Estudos mostraram que a PDI co-localiza com Rac1 na região perinuclear e co-imunoprecipita com Rac1 e RhoA, tanto na presença como na ausência de PDGF. Além disso, ocorreu a interação entre PDI e o regulador de GTPases RhoGDI (inibidor da dissociação da guanina) na condição basal (por microscopia confocal e co-imunoprecipitação), diminuída após estímulo com PDGF. O silenciamento da PDI induziu ainda alterações em estrutura de citoesqueleto: desorganização das fibras de estresse, e redução no número e tamanho de adesões focais e vesículas de adesão marcadas por RhoGDI e Rac1. Assim, os dados apresentados no presente trabalho sugerem que a PDI sustenta a migração de VSMC dependente de sinalização redox e RhoGTPases. Além disso, RhoGTPases podem ser um alvo proximal importante mediando a convergência entre PDI e o complexo NADPH oxidase.

Descritores: 1.Isomerase de dissulfetos de proteínas 2.NADPH oxidase 3.Proteínas rho de ligação ao GTP 4.Movimento celular 5.Fator de crescimento derivado de plaquetas 6.Retículo endoplasmático 7.Espécies de oxigênio reativas 8.Superóxidos 9.Peróxido de hidrogênio

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

