

Thayna Meirelles Santos

**Processamento intracelular da fibrilina-1
mutada na síndrome de Marfan: escape do
controle de qualidade pela dissulfeto isomerase
proteica**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

SÃO PAULO

2014

*À minha irmã por sempre ter acreditado
incondicionalmente nos meus sonhos...*

*À minha mãe por ter nos permitido sonhar...
e ir cada vez mais longe...*

Amo vocês

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Doutor Francisco Rafael Martins Laurindo, pela confiança no meu potencial e no meu trabalho, pela dedicação e disponibilidade quase infinita, apesar de tantos compromissos, e pela cordialidade e gentileza tão características suas. Muito obrigada...

À minha amiga e companheira de laboratório Thaís Araujo pelas contribuições diretas a este trabalho, seja na bancada, nas discussões, nas inúmeras correções, etc. e também nas indiretas, pelo apoio, animação e otimismo que lhe transbordam. Sem a sua ajuda certamente teria sido muito mais difícil. Muito obrigada...

Aos companheiros de laboratório Maria Carolina Guido, Victor Debbas e Patrícia Nolasco pela ajuda na realização de experimentos e discussões tão importantes para conclusão deste trabalho.

Às amigas e companheiras de laboratório Ana Moretti e Jéssyca Pavanelli por terem chegado em um momento tão importante e tornado o dia-a-dia mais leve, mais comunicativo e mais alegre. Muito obrigada...

À Prof. Dra. Lygia Pereira da Veiga pela colaboração e doação do modelo de camundongo da Síndrome de Marfan, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

À Dra. Lynn Sakai, da *Oregon Health and Science University* pela gentil e imprescindível doação do anticorpo específico para a fibrilina-1 utilizado ao longo deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental para o prosseguimento dos experimentos, após 6 meses exaustivos de frustração com os anticorpos comerciais...

A todos os demais companheiros de laboratório, Léo, Thalita, Andréa, Luciana, Denise, João, Renata... pelos momentos compartilhados e pela ajuda em algum momento...

Aos todos os amigos que tornaram estes 3 anos em São Paulo possíveis de serem vividos, especialmente a Ju, Ana, Mau, Rita, Gil e Mel...Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Gustavo Egea, supervisor do estágio no exterior que realizei em seu laboratório na Universidade de Barcelona, pela sua humildade, pela confiança, pelo entusiasmo, pela amizade construída... Muito obrigada.

A todos os companheiros de laboratório da Universidade de Barcelona, especialmente a amiga Dasha, por terem feito parte desta experiência incrível tanto a nível profissional quanto pessoal.

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo), processos 2010/50978-9 (bolsa de doutorado), 12/23490-0 (bolsa de estágio e pesquisa no exterior) e 2009/54764-6 (projeto temático); *CEPID de Processos Redox em Biomedicina* (2013/07937-8) e pelo *INCT de Processos Redox em Biomedicina* (Redoxoma) (CNPq e Fapesp).

“O único homem que se educa é aquele que aprendeu como aprender: que aprendeu como se adaptar e mudar; que se capacitou de que nenhum conhecimento é seguro, que nenhum processo de buscar conhecimento oferece uma base de segurança”

Carl Rogers

Sumário

Lista de siglas

Resumo

Summary

1.	Introdução.....	1
1.1.	Síndrome de Marfan	2
1.2.	Fibrilina-1	4
1.3.	Enovelamento proteico e homeostase do RE.....	6
1.4.	Resposta adaptativa ao estresse do RE.....	10
1.5.	Proposto envolvimento do estresse do RE na patologia da SMF.....	13
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
3.1.	Células.....	18
3.2.	Mutações na fibrilina-1.....	18
3.2.1.	Mg $\Delta^{loxpneo}$	18
3.2.2.	C1039G	20
3.3.	Extração e cultura de fibroblastos embrionários de camundongos.....	21
3.4.	Mecanismos adaptativos associados à indução de estresse do RE e ativação da ERAD.....	23
3.4.1.	Expressão proteica de marcadores da UPR por Western-blot.....	23
3.4.2.	Dosagem da produção total de H ₂ O ₂ por <i>Amplex red</i>	25
3.4.3.	Expressão gênica de NOX4	26
3.4.4.	Comparação da resposta dos MEFs WT e SMF à indução de estresse do RE ...	27
3.4.5.	Regulação da via ERAD	27
3.4.5.1.	Atividades proteolíticas associadas ao proteassoma.....	28
3.4.5.2.	Ensaio de morte celular após inibição do proteassoma.....	28
3.5.	Efeito do processamento intracelular da fibrilina-1 mutada sobre a secreção da proteína	29
3.5.1.	Expressão gênica de fibrilina-1	29
3.5.2.	Dot-blot para quantificação de fibrilina-1 secretada	30
3.5.3.	Comparação dos níveis de secreção da fibrilina-1 após indução de estresse do RE ou bloqueio da via secretória.....	31
3.5.4.	Distribuição intracelular da fibrilina-1 por microscopia confocal.....	32
3.6.	Função da PDI no processamento da fibrilina-1.....	33
3.6.1.	Co-localização da PDI e fibrilina-1 por microscopia confocal.....	33
3.6.2.	Ensaio de duplo híbrido em levedura	33
3.6.3.	Perda de função da PDI por RNA interferente	36

3.7.	Investigação da ocorrência de estresse do RE <i>in vivo</i>	37
3.8.	Análise estatística	38
4.	Resultados	39
4.1.	Investigação de marcadores de estresse do RE e ativação da ERAD.....	40
4.2.	Investigação do efeito do processamento intracelular da fibrilina-1 mutada sobre a secreção da proteína	45
4.3.	Investigação da função da PDI no processamento da fibrilina-1.....	50
4.4.	Investigação da ocorrência de estresse do RE na SMF <i>in vivo</i>	59
5.	Discussão	61
6.	Conclusões	70
7.	Referências	72

Apêndice

Súmula curricular

Lista de siglas

BSA – albumina bovina

Cappesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas – FMUSP

cEGF – do inglês, *calcium-binding epidermal growth factor*

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ECM – Matriz extracelular, do inglês *extracellular matrix*

EDTA – do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*

EGF – do inglês, *epidermal growth factor*

EGTA – do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*

ERAD – Via de degradação associada ao RE, do inglês *ER-associated degradation*

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HEPES – do inglês *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HRP – do inglês *horseradish peroxidase*

MEFs – Fibroblastos embrionários de camundongos, do inglês *mouse embryonic fibroblasts*

NOX4 – NADPH oxidase, isoforma 4

PBS – Tampão Salina - Fosfato

PBS-T – Tampão Salina - Fosfato com 0,05% de *Tween 20*

PCR – Reação em cadeia da polimerase (- do inglês, *polymerase chain reaction*)

PDI – Proteína dissulfeto isomerase

SMF – Síndrome de Marfan

TB – do inglês *TGF- β binding protein-like*

TBS-T – Tampão tris salina contendo 0,05% de *Tween 20*

TGF- β – do inglês *transforming growth factor beta*

RE – Retículo endoplasmático

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

T.A – temperatura ambiente

UPR – Resposta a proteínas mal-enoveladas, do inglês *unfolded protein response*

VSMCs – Células musculares lisas vasculares, do inglês *vascular smooth muscle cells*

Resumo

2014 Santos T M. Processamento intracelular da fibrilina-1 mutada na Síndrome de Marfan: escape do controle de qualidade pela dissulfeto isomerase proteica [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A Síndrome de Marfan (SMF) é a enfermidade hereditária mais comum dentre as que afetam o sistema conjuntivo, causada por mutações da glicoproteína fibrilina-1, o principal componente estrutural das microfibrilas elásticas da matriz extracelular. As manifestações fenotípicas da SMF são sistêmicas e acometem tipicamente os sistemas ocular, esquelético e cardiovascular, esta uma importante causa de morbi-mortalidade. Entretanto, não está claro como a mutação induz a doença. Estudos anteriores sugerem anomalias morfológicas do retículo endoplasmático (RE) ou retenção intracelular da fibrilina-1 nos estágios avançados da SMF. Entretanto, a contribuição do enovelamento da fibrilina-1 mutada e do estresse do RE na fisiopatologia celular da SMF não é conhecida. Proteínas mal-enoveladas podem levar à retenção intracelular e/ou aumento da degradação através da via de degradação associada ao RE (ERAD), além da indução da resposta a proteínas mal-enoveladas (UPR), ambas com potencial contribuição à fisiopatologia de doenças, incluindo a SMF. Assim, estudamos em fibroblastos embrionários isolados de camundongos (MEFs) com SMF se a fibrilina-1 mutada é reconhecida pelo controle de qualidade do RE pelo seu mal-enovelamento e induz estresse do RE por sua retenção intracelular. Demonstramos que a mutação na fibrilina-1 per se não promoveu chaperonas marcadoras de UPR ou geração de oxidantes. Além disso, não levou a uma maior sensibilização das células à indução exógena de estresse do RE, nem promoveu maior morte celular após inibição do proteassoma. Além disso, não foi observada retenção intracelular da fibrilina-1 nas células SMF, e mesmo após inibição da via secretora ou indução de estresse do RE, a inibição da secreção da fibrilina-1 foi similar nos MEFs SMF e *wild-type* (WT). A dissulfeto isomerase proteica (PDI), uma importante chaperona redox do RE, interage com fibrilina-1, e seu silenciamento levou a um aumento na secreção da fibrilina-1 pelos MEFs WT, mas não SMF. Além disso, o silenciamento da PDI promoveu a desorganização da matriz extracelular depositada de fibrilina-1 nos MEFs WT, enquanto nos MEFs SMF, a desorganização basal da matriz não foi adicionalmente alterada. Em paralelo, investigações *in vivo* mostraram que o estresse do RE não é induzido em camundongos SMF com 1 ou 3 meses de idade, apesar de manifestações fenotípicas evidentes. Entretanto, concomitante à progressão da doença, detectamos a ocorrência de estresse do RE nas aortas ascendentes dos camundongos aos 6 meses. Esta detecção foi exclusiva desta região da aorta e não ocorreu em outros órgãos afetados ou

não afetados pela SMF. Assim, a manifestação do fenótipo clássico da SMF não requer uma perda da homeostase do RE diretamente induzida pela fibrilina-1 mutada. Ao contrário, esta é capaz de evadir mecanismos de controle de qualidade mediados pela PDI, sendo secretada normalmente. Assim, esta evasão do controle de qualidade pela PDI é uma condição permissiva essencial para o fenótipo da SMF. Por outro lado, o estresse do RE é uma característica evolutiva do aneurisma da aorta ascendente na SMF concomitante ao agravamento do fenótipo neste tecido.

Descritores: 1.Síndrome de Marfan 2.Fibrilina 1 3.Dobramento de proteína
4.Estresse do retículo endoplasmático 5.Isomerase de dissulfetos de proteínas
6.Camundongos mutantes

Summary

Santos T M. Mutated fibrillin-1 intracellular processing in Marfan syndrome: bypass of a protein disulfide isomerase-mediated quality control. [Thesis] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Marfan syndrome (MFS) is the most common connective tissue hereditary disease, caused by mutations in the glycoprotein fibrillin-1, the main structural component of extracellular matrix elastic microfibrils. MFS phenotypic manifestations are systemic and typically involve the ocular, skeletal and cardiovascular systems, the latter a major cause of morbidity/mortality. However, how gene mutation induces disease is yet unclear. Previous studies suggest endoplasmic reticulum (ER) morphological abnormalities or fibrillin-1 intracellular retention in advanced MFS stages. However, the contribution of mutated fibrillin-1 folding and ER stress to MFS cellular pathophysiology is unknown. Un/misfolded proteins may associate with their intracellular retention and/or increased degradation through ER-associated degradation (ERAD), in addition to inducing the unfolded protein response (UPR), both sharing potential contributions to disease pathophysiology, including MFS. Thus, we studied in embryonic fibroblasts (MEFs) isolated from WT and MFS mice, if mutated fibrillin-1 can be recognized by ER quality control as a misfolded protein, able to induce ER stress due to its intracellular retention. We showed that fibrillin-1 mutation by itself did not promote UPR chaperone markers or oxidant generation. Moreover, it did not sensitize cells to exogenous ER stress nor affected cell survival curves after proteasome inhibition. Furthermore, no intracellular retention of fibrillin-1 was observed in MFS cells, and even after secretory pathway inhibition or ER stress induction, fibrillin-1 secretion inhibition was similar in MFS and wild-type (WT) MEFs. Protein disulfide isomerase (PDI), an important ER redox chaperone, interacts with fibrillin-1 and its silencing induced an increased fibrillin-1 secretion in WT, but not MFS MEFs. Besides, PDI silencing promoted fibrillin-1 extracellular matrix disorganization in WT MEFs, whereas in MFS MEFs, the basal matrix disorganization was not further modified. Parallel *in vivo* evaluations demonstrated that ER stress is also not induced in 1 and 3 month-old mice MFS, despite evident phenotypical manifestations. However, concomitant to accelerated disease progression at 6 months, ER stress was detectable in ascendant aorta, but not in other disease-affected or unaffected organs. Thus, classic MFS phenotype manifestations do not require loss of ER homeostasis directly induced by mutated fibrillin-1. Contrarily, the latter can evade a PDI-mediated quality control mechanism to be normally secreted. Therefore, evading such PDI-mediated quality control is an essential permissive condition for enabling the MFS phenotype. On the other hand, ER stress is an evolutive feature of MFS ascendant aorta aneurysm concomitant to phenotype progression in this tissue.

Descriptors: 1. Marfan syndrome 2.Fibrillin 1 3.Protein folding 4. Endoplasmic Reticulum Stress 5. Protein Disulfide-Isomerases 6. Mice, Mutant Strains

1. Introdução

1.1. Síndrome de Marfan

A Síndrome de Marfan (SMF) é a enfermidade hereditária mais comum dentre as que afetam o sistema conjuntivo, causada por mutações no gene que codifica a síntese da fibrilina-1¹, uma glicoproteína, principal componente estrutural das microfibrilas da matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*). A manifestação fenotípica da SMF é sistêmica e acomete tipicamente os sistemas ocular, esquelético e cardiovascular. A SMF possui distribuição mundial, sem predileção por gênero ou grupo étnico ou racial, e sua prevalência estimada é de 2-3: 10000^{2; 3}, sendo esta subestimada pela inexistência de um exame molecular eficiente e de rotina, e, portanto, dependente das manifestações clínicas para seu diagnóstico².

Várias anormalidades músculo-esqueléticas podem se desenvolver em pacientes com SMF, incluindo cifose, escoliose, deformidades da parede torácica, estatura elevada e frouxidão ligamentar, dentre outras. A ectopia do cristalino é a alteração mais comum dentre as oftalmológicas³. As manifestações cardiovasculares incluem disfunções valvares, cardiomiopatia dilatada⁴ e particularmente o alargamento progressivo da raiz da aorta e da aorta ascendente, caracterizando o desenvolvimento de aneurismas aórticos, sendo estas manifestações as principais causas de morbidade e mortalidade precoce^{3; 5}.

Tradicionalmente, a SMF foi considerada uma doença da arquitetura do tecido conjuntivo que apenas refletia o defeito estrutural causado pela perda das fibras elásticas (McKusick V, 1955* apud Judge e Dietz, 2008). Sob esta visão, as manifestações clínicas estariam relacionadas à insuficiência estrutural

* McKusick VA. 1955. The cardiovascular aspects of Marfan's syndrome. *Circulation* 11:321

dos órgãos acometidos diante de estresses, como por exemplo, forças biomecânicas. Após o reconhecimento que mutações no gene FBN1 eram a causa da SMF¹, as alterações estruturais foram atribuídas à perda da fibrilina-1 na ECM. A partir de então, foram propostos dois modelos para o entendimento da questão essencial de como a mutação na fibrilina-1 interfere na montagem e organização da ECM.

O efeito dominante negativo, proposto com base no padrão de herança dominante da doença, sugere que a secreção da proteína mutada interfere na deposição, estabilidade e função da proteína normal na ECM; enquanto a haploinsuficiência propõe que a produção insuficiente da proteína normal seria a principal responsável pela perda de função da ECM e consequente desenvolvimento das manifestações^{3; 6}.

A visão mais atual dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da SMF associa a desestruturação da ECM com uma falha no sequestro do complexo inativo do TGF- β (do inglês *transforming growth factor beta*), levando a um aumento da sinalização mediada por esta citocina^{7; 8} cujos efeitos canônicos são proliferação celular e fibrose. Formas mutantes da fibrilina-1 promoveriam a liberação do TGF- β da ECM, aumentando sua disponibilidade na forma ativa, o que contribuiria para a patogênese da SMF⁹.

Entretanto, as bases celulares e moleculares da etiologia dos fenótipos associados à SMF permanecem insuficientemente conhecidas¹⁰. O que se sabe está baseado essencialmente em estudos com fibroblastos isolados da pele de pacientes com SMF, que por sua vez, apresentam uma variedade de defeitos na síntese, secreção e/ou incorporação da fibrilina-1 na ECM^{11; 12; 13}. Esta amplitude de defeitos na fibrilina-1 está associada à grande variabilidade

de fenótipos da doença ^{13, 10}, indicando a participação de diferentes mecanismos associado às mutações da fibrilina-1 na geração do fenótipo clínico na SMF.

1.2. Fibrilina-1

A fibrilina-1 é uma glicoproteína de alto peso molecular que constitui o principal componente estrutural das microfibrilas da matriz elástica extracelular. Nos tecidos como pele, músculo liso vascular e pulmões, as microfibrilas se associam com a elastina formando as fibras elásticas, estruturas que conferem a elasticidade e extensibilidade característica destes tecidos ¹⁴.

A fibrilina-1 apresenta uma estrutura proteica modular, composta predominantemente por três tipos de domínios enriquecidos em pontes dissulfeto (Figura 1). O domínio TB (do inglês *TGF- β binding protein-like*) ocorre 7 vezes ao longo da proteína e contém 8 cisteínas que formam 4 pontes dissulfeto bem caracterizadas. O domínio EGF (do inglês, *epidermal growth factor*) ocorre 47 vezes e é caracterizado por 6 resíduos de cisteína altamente conservados. O domínio híbrido ocorre duas vezes e assim como os domínios TB também possui 8 cisteínas ¹⁴.

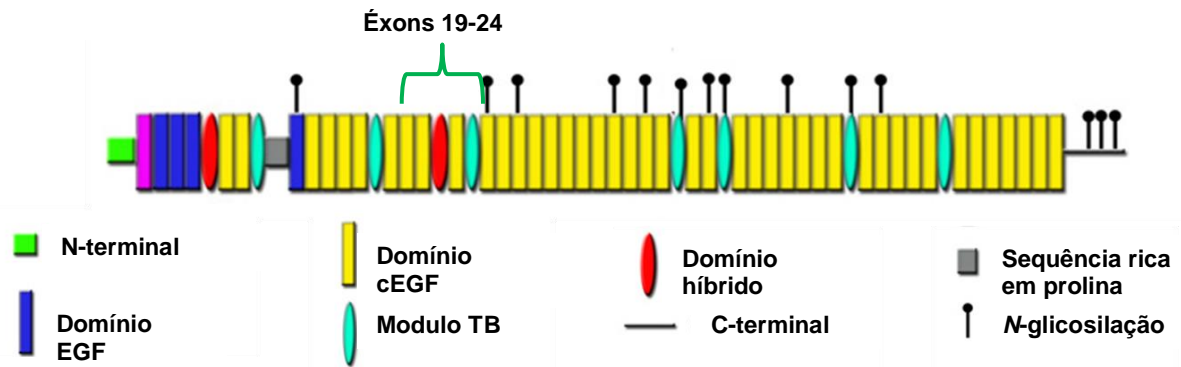


Figura 1. Estrutura modular da fibrilina-1. Modificado de Strydom et al, Archives for oral biology, 2012¹⁵.

Mais de 1000 diferentes mutações na fibrilina-1 já foram identificadas em associação com a SMF ¹⁶, sendo três categorias de mutações bastante comuns: (i) mutações de “troca de sentido” (*missense*), incluindo substituições de resíduos de aminoácidos, pequenas deleções e inserções *in frame*; (ii) mutações que resultam na terminação prematura da tradução; e (iii) mutações que levam a omissão (*exon-skipping*) ou deleção de éxons resultando na perda de domínios inteiros da proteína ¹⁷. Estas mutações podem afetar resíduos essenciais para obtenção das estruturas terciária e quaternária corretas dos domínios da fibrilina-1 ³.

A fibrilina-1 é sintetizada como um pro-peptídeo de 350 kDa, a profibrilina-1, secretada e clivada extracelularmente na sua forma madura de 320 kDa, que é então incorporada às microfibrilas da ECM. Este processamento extracelular da profibrilina-1 foi bem estudado e a furina foi reconhecida como a protease responsável por esta clivagem ^{18; 19}. Por ser uma glicoproteína extracelular, é assumido que a secreção da fibrilina-1 ocorre,

similar à maioria das proteínas secretadas, pela via clássica de secreção, que compreende enovelamento no retículo endoplasmático (RE), processamento de glicoproteínas no RE e/ou complexo de Golgi e transporte através de vesículas secretórias até o espaço extracelular ²⁰.

Além disso, sabe-se que a fibrilina-1 sofre uma série de modificações pós-traducionais, incluindo: formação de pontes dissulfeto, *N*-glicosilação, β -hidroxilação e incorporação de cálcio pelos domínios cEGF de ligação ao cálcio ²¹. Entretanto, pouco é conhecido sobre as proteínas residentes do RE envolvidas no enovelamento e processamento da fibrilina-1, bem como suas funções durante este processo. Apenas as chaperonas GRP78 e GRP94 foram previamente identificadas como capazes de interagir com a fibrilina-1 no ambiente intracelular, sugerindo um papel destas proteínas no enovelamento da fibrilina-1 ²².

1.3. Enovelamento proteico e homeostase do RE

A estrutura tridimensional correta de uma proteína é essencial para a sua funcionalidade, e, portanto o processo de enovelamento proteico no qual a estrutura nativa de uma proteína é obtida constitui-se em um processo intracelular bastante especializado. O RE é o principal compartimento subcelular em que ocorre o enovelamento e maturação de proteínas residentes do sistema de endomembranas e proteínas destinadas à secreção, em geral correspondendo a cerca de um terço de todas as proteínas sintetizadas na célula. No RE, o enovelamento proteico é assistido por um grupo especializado de proteínas, as chaperonas e óxido-redutases, que interagem com as

proteínas recém-sintetizadas, até que estas adquiram sua conformação estrutural adequada^{20; 23; 24}.

A GRP78 (também chamada de BiP) e a GRP94 destacam-se por sua abundância e função dentre as chaperonas residentes do RE. Como chaperonas exercem sua função evitando a agregação e conferindo estabilidade às proteínas recém-sintetizadas por interagirem com os sítios hidrofóbicos dos peptídeos nascentes. A GRP78 tem a capacidade de interagir com uma ampla variedade de proteínas “clientes”, atuando inicialmente em cadeias recém-sintetizadas, enquanto a GRP94 apresenta maior especificidade nas interações proteicas. Além disso, a GRP94 apresenta alta capacidade de ligação ao cálcio, e, portanto, realiza também uma importante função como tamponante de cálcio do lúmen do RE²⁰.

A formação de pontes dissulfeto e a *N*-glicosilação de resíduos também são processos fundamentais para a estabilização e obtenção da conformação nativa de uma proteína durante seu enovelamento no RE^{20, 25}. A formação das pontes dissulfeto no RE consiste na oxidação de resíduos de cisteína e é catalisada por tiol óxido-redutases da família da **dissulfeto isomerase proteica (PDI)**, sendo a PDI (PDIA1 ou P4HB) membro fundador da família e a principal representante a exercer tal função²⁶. Neste contexto, a PDI oxida cisteínas formando pontes dissulfeto e particularmente catalisa o rearranjo de pontes dissulfeto incorretas nas proteínas, processo conhecido como isomerização, que é a atividade específica e característica dessa família.

A PDI tem quatro domínios, dois domínios estruturais b e b' e dois domínios catalíticos a e a'. Os dois domínios catalíticos tem um motivo conservado CXXC, que é o sítio redox-ativo característico da super-família das

tioredoxinas. Os sítios b e b' têm um enovelamento análogo ao da tioredoxina, sendo esta uma característica importante da família das PDIs. Quando a PDI atua como oxidase, as duas cisteínas formam uma ponte dissulfeto, que é transferida para o substrato (Figura 2). É importante destacar que a PDI também possui atividade como chaperona centrada no domínio b', uma função que não está necessariamente acoplada à sua atividade óxido-redutase.

A *N*-glicosilação de proteínas é o processo de adição de carboidratos/glicanos a resíduos proteicos e tem início assim que a proteína nascente entra no lúmen do RE. Os glicanos conferem hidrofobicidade às proteínas e têm papel fundamental durante o enovelamento proteico por serem sítios específicos de interação com chaperonas do tipo lectina, como calnexina e calreticulina. Alguns membros da família da PDI, como a ERP57 e a ERP72, se destacam por sua íntima associação com estas chaperonas, sendo, portanto especializados no enovelamento de glicoproteínas^{20; 25}.

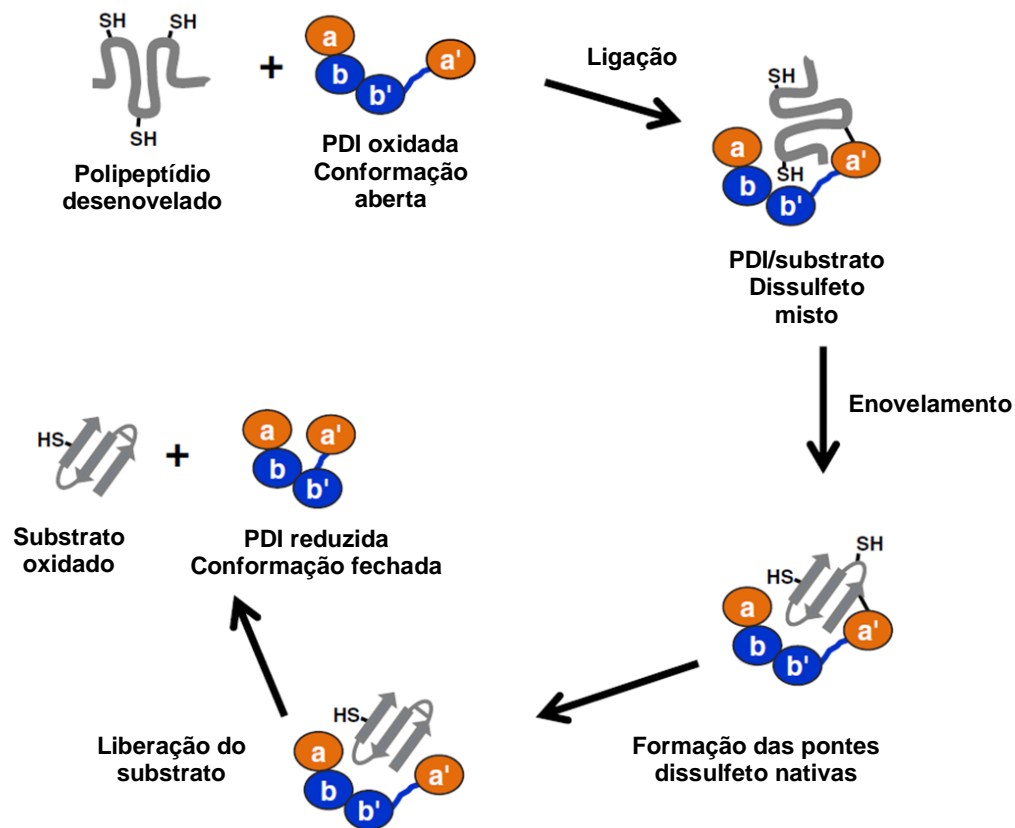


Figura 2. Atividade oxidase da PDI. A PDI oxidada se associa à proteína-cliente reduzida e há formação de uma ponte dissulfeto mista entre uma cisteína do sítio catalítico da PDI e uma cisteína livre do substrato a ser oxidado. Durante o enovelamento proteico (*folding*) as cisteínas que deverão formar as pontes dissulfeto nativas se aproximam e a PDI então catalisa a formação destas pontes. Em consequência, há liberação do substrato oxidado pela PDI, agora reduzida. Modificada de Oka & Bulleid, *Biochim Biophys Acta*, 2013²⁷.

Após o enovelamento proteico bem sucedido no RE, a proteína deixa este compartimento e segue a via secretória até seu destino final. Entretanto, se há alguma falha neste processo, a proteína não se estabiliza e mantém a interação com chaperonas e óxido-redutases no RE até que adquira sua estrutura correta. Este mecanismo faz parte do controle de qualidade do RE que visa a manter a homeostase, garantindo que apenas proteínas corretamente enoveladas mantenham-se íntegras e funcionalmente capacitadas. Outros mecanismos integram o controle de qualidade do RE,

como o reconhecimento de proteínas mal-enoveladas que porventura chegam ao Golgi, seguinte compartimento da via secretória, e são transportadas de volta ao RE. Se a proteína não pode adquirir sua conformação nativa ela é transportada ao citoplasma para ser degradada pela via de degradação associada ao RE (ERAD, do inglês *ER-associated degradation*)^{20; 28; 29}.

Durante o processamento proteico normal, ocorrem falhas de enovelamento e os mecanismos de controle de qualidade do RE são suficientes para solucioná-las. Entretanto, algumas perturbações podem comprometer a funcionalidade do RE quanto a sua capacidade de processamento levando a uma situação de estresse conhecido como estresse do RE. Isto ocorre quando a demanda por enovelamento proteico é maior que a capacidade de processamento do RE.

Estresse do RE pode ser desencadeado por múltiplos mecanismos, incluindo superexpressão de proteínas grandes e com muitas modificações pós-traducionais, por processos biológicos que aumentam a demanda da maquinaria de produção proteica, tais como infecções virais, e especialmente pela expressão de proteínas mutadas³⁰. As mutações genéticas levam ao estresse do RE pela produção de proteínas que não podem adquirir sua conformação correta durante o enovelamento proteico e conseqüentemente podem se acumular no RE como proteínas mal-enoveladas³⁰.

1.4. Resposta adaptativa ao estresse do RE

A UPR (do inglês *unfolded protein response*) é uma rede de sinalização desencadeada em resposta ao estresse do RE, que integra vias adaptativas com o objetivo de melhorar a capacidade de processamento proteico e

secreção do RE e a degradação das proteínas mal-enoveladas. Se o dano causado pelo estresse do RE for exacerbado e/ou a homeostase celular não puder ser reestabelecida, mecanismos de morte celular são induzidos^{30; 31} (Figura 3).

As vias adaptativas da UPR convergem para a expansão do volume do RE³¹ e o aumento da expressão das chaperonas e outras enzimas residentes do RE implicadas no enovelamento proteico, com o objetivo de aumentar a capacidade de processamento proteico. As proteínas GRP78, GRP94 e calreticulina são as principais chaperonas que têm sua expressão aumentada durante a UPR e, portanto, atuam como marcadores de UPR^{26; 32}. Pela sua função no enovelamento proteico, a PDI também exerce um papel protetor em diferentes contextos envolvendo indução de estresse do RE, exercendo, portanto uma função no controle de qualidade do RE²⁹.

Além disto, a UPR sinaliza uma redução da tradução proteica total, possivelmente como resposta inespecífica destinada a aliviar a carga de proteínas para o RE. Em particular, há também aumento da atividade de remoção das proteínas mal-enoveladas por meio da ERAD, na tentativa de diminuir a demanda pelo processamento proteico³⁰. Esta via de degradação envolve a translocação das proteínas mal-enoveladas para o citosol, onde são ubiquitinadas e degradadas pelo proteassoma³³. O proteassoma (chamado também de proteassoma 26S) é um complexo proteico formado por uma estrutura central 20S que possui atividade proteolítica e dois complexos 19S com atividade regulatória³⁴. Durante a UPR, tanto a atividade quanto a expressão de fatores associados a esta via são induzidos³⁵.

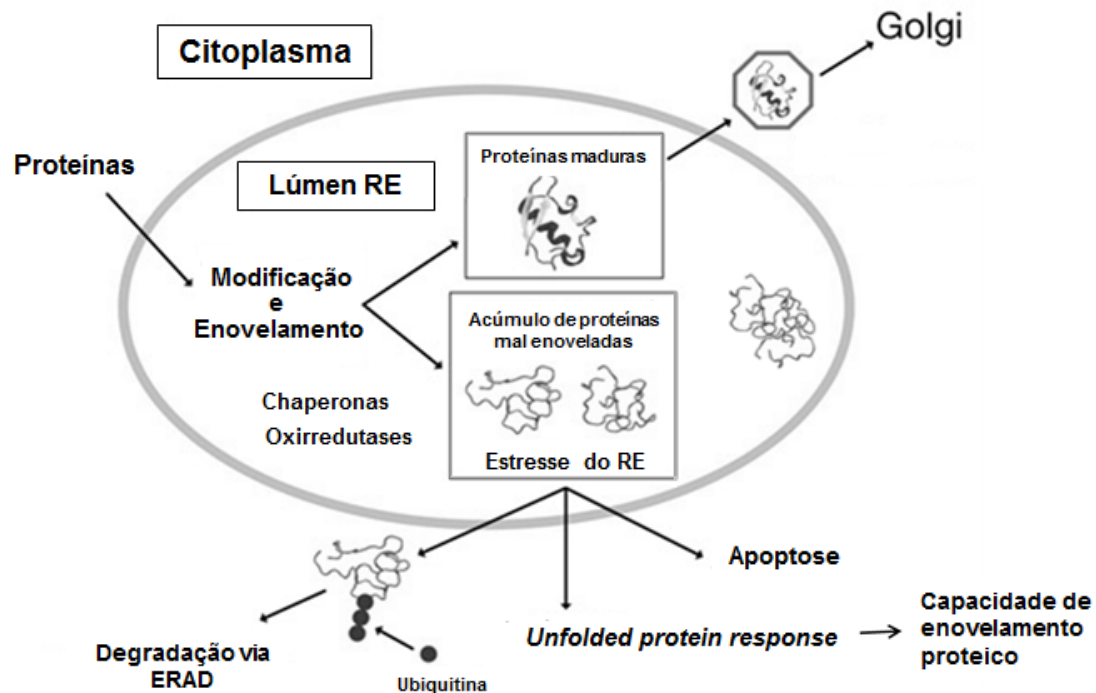


Figura 3. Estresse do RE induz resposta adaptativa a falha no enovelamento proteico. O enovelamento proteico é auxiliado por chaperonas e óxido-redutases. Se o enovelamento é bem sucedido, a proteína madura está apta a seguir pela via secretória. No caso de mau enovelamento, causado, por exemplo, por mutações, as proteínas podem se acumular levando ao estresse do RE, que por sua vez, induz a resposta a proteínas mal-enoveladas (*Unfolded protein response*). Esta resposta visa o aumento da capacidade de enovelamento proteico pelo retículo e a degradação das proteínas mal-enoveladas. Se apesar destas medidas, a homeostase não for reestabelecida, mecanismos de apoptose são induzidos. Modificado de: http://www.pdbj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A2RIO.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) também é induzida durante a UPR, ocorrendo tanto em estágios iniciais quanto tardios, caracterizando uma convergência entre estresse do RE e estresse oxidativo. Esta produção ocorre por diferentes mecanismos, incluindo oxidases do lúmen do RE (Ero1 e PDI), a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e o complexo NADPH oxidase ^{26; 32}.

Dentre as NADPH oxidases, a isoforma 4 (Nox4) se destaca por sua regulação durante a indução da UPR resultando na produção de peróxido de hidrogênio^{36; 37}.

1.5. Proposto envolvimento do estresse do RE na patologia da SMF

O estresse do RE e a ativação da UPR estão associados com o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo isquemia cardíaca³⁸, aterosclerose³⁹, câncer, diabetes, doenças autoimunes, doenças do fígado, obesidade e enfermidades neurodegenerativas⁴⁰. Os mecanismos pelos quais as vias da UPR influenciam na progressão de doença são muito variáveis^{28; 40}. Em alguns casos, como nas chamadas doenças de proteínas mal-enoveladas, a expressão de proteínas mutadas resulta no acúmulo de agregados proteicos no RE o que está diretamente associado com o aumento dos marcadores de estresse do RE. Entretanto, as vias de UPR afetam diferentes processos fisiológicos, inclusive alguns não diretamente relacionados a enovelamento proteico, como inflamação e diferenciação celular⁴⁰ e parecem específicos para cada tipo de doença⁴¹.

Distintos trabalhos têm fornecido evidências de que uma possível retenção intracelular da fibrilina-1 pode ocorrer na SMF. Por exemplo, em células isoladas de pacientes diagnosticados com SMF foram descritas falhas na secreção da fibrilina-1^{11; 12; 13}. Além disso, foi mostrada a maior marcação intracelular da fibrilina-1 em comparação a células controle, concomitante a menor marcação extracelular⁴². Análises morfológicas por microscopia eletrônica demonstraram aumento do volume do RE em células musculares

lisas isoladas de camundongos com SMF⁴³, sugerindo, portanto, que uma disfunção do RE também pode estar associada à SMF.

Assim, além das consequências da perda de função da fibrilina-1 pela mutação na patogenia da SMF, a proteína mutada por se poderia induzir, mediante perda da homeostase proteica do RE, disfunção celular e potencialmente contribuir para o fenótipo da doença. Neste trabalho, nós investigamos o efeito do processamento da fibrilina-1 mutada sobre a homeostase celular associada ao RE. Avaliamos se o reconhecimento da proteína mutada mal-enovelada pelo controle de qualidade do RE poderia levar à retenção da proteína no RE e/ou aumento de degradação através de ERAD e induzir a UPR, resultando na ativação de vias de sinalização que potencialmente poderiam contribuir para a patogênese da SMF. Neste contexto, investigamos o papel da PDI no processamento da fibrilina-1 normal e mutada.

2.Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar se a fibrilina-1 mutada, capaz de induzir o fenótipo da síndrome de Marfan, afeta a homeostase celular associada ao retículo endoplasmático (RE) e se a chaperona do RE PDI está envolvida no processamento da fibrilina-1.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar se o processamento intracelular da fibrilina-1 mutada resulta na ativação de mecanismos adaptativos associados a estresse do RE e/ou ativação de ERAD.
- Investigar se a mutação na fibrilina-1 per se e/ou se a quebra da homeostase celular afeta sua secreção.
- Investigar a função da PDI no processamento da fibrilina-1 normal e mutada no RE.
- Investigar a ocorrência de estresse do RE na SMF *in vivo*.

3. Métodos

3.1. Células

Focamos em um modelo celular que nos permitisse investigar as propostas relações causa-efeito entre a mutação da fibrilina-1 vs. homeostase da função do RE. Neste contexto, fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs, do inglês *mouse embryonic fibroblasts*) isolados de camundongos com mutação na fibrilina-1 são um modelo bastante relevante. Estas células são amplamente utilizadas em estudos que visam investigar o efeito direto de mutações proteicas sobre fenômenos e mecanismos celulares diversos^{44; 45}.

3.2. Mutações na fibrilina-1

MEFs foram derivados de dois diferentes modelos animais para SMF e, portanto, portadores de duas diferentes mutações na fibrilina-1. Ambas as mutações resultam no desenvolvimento da doença em camundongos. Foram utilizados MEFs derivados do modelo animal $Mg\Delta^{loxpneo}$ e MEFs derivados do modelo C1039G, sendo os últimos utilizados em alguns experimentos para avaliar se os efeitos demonstrados para a mutação $Mg\Delta^{loxpneo}$ eram específicos deste tipo de mutação.

3.2.1. $Mg\Delta^{loxpneo}$

Este modelo de camundongo para SMF foi desenvolvido no background genético-linhagem C129/sv pelo grupo da Profa. Lygia da Veiga Pereira do Instituto de Biociências – USP. Estes animais possuem um alelo mutante para fibrilina-1, que apresenta uma deleção dos éxons 19 ao 24 no gene FBN1 substituídos por um cassete de expressão do gene de resistência à neomicina. Esta mutação possui efeito dominante, assim como na SMF em

humanos e, portanto, os animais apresentam fenótipos cardiovasculares, esqueléticos e respiratórios, classicamente associados à SMF, quando em heterozigose (dados não publicados do nosso laboratório)⁴⁶. Além disso, este modelo reproduz a variabilidade fenotípica encontrada nos pacientes com SMF⁴⁶. Os embriões homozigotos dominantes são inviáveis.

Quanto à proteína, esta deleção resulta na perda de 5 domínios inteiros na fibrilina-1 mutada⁴⁶, três domínios cEGF (do inglês, *calcium-binding epidermal growth factor*), um domínio TB e um domínio híbrido (Figura 4), resultando na síntese de uma proteína menor. Este tipo de mutação por deleção de éxons está associado a fenótipos mais graves da SMF em humanos. Este modelo apresenta, como característica específica, frequentes desfechos clínicos, com óbito dos camundongos em torno dos 8-9 meses de idade, aparentemente por complicações cardiovasculares e provável dissecação da aorta, em paralelo ao que ocorre com os pacientes.

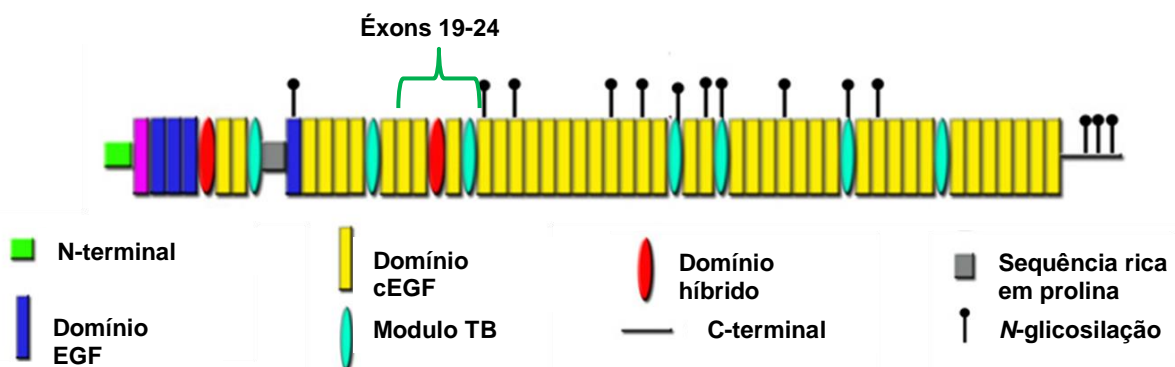


Figura 4. Representação dos domínios deletados na fibrilina-1 pela mutação $Mg\Delta^{loxpneo}$. O alelo portador da mutação $Mg\Delta^{loxpneo}$ apresenta uma deleção dos éxons 19 ao 24 no gene FBN1 substituídos por um cassete de expressão do gene de resistência à neomicina, o que resulta na perda de 5 domínios inteiros na proteína mutada sintetizada: três domínios cEGF, um domínio TB e um domínio híbrido (destacados em verde)⁴⁶. Modificado de Strydom et al, Archives for oral biology, 2012¹⁵.

3.2.2. C1039G

O modelo animal para SMF, C1039G foi desenvolvido pelo grupo do Dr. Hall Dietz (2004) ⁴⁷ e atualmente é comercializado pela empresa *The Jackson laboratory*, onde foram adquiridos. A mutação presente no gene da fibrilina-1 é a substituição da cisteína 1039 por uma glicina, em um domínio cEGF do éxon 25, correspondendo a uma mutação existente em humanos (C1039Y) que está associada a um fenótipo clássico da SMF. A substituição de resíduos de cisteína por outros aminoácidos é o tipo de mutação mais comumente encontrada na SMF ^{3; 13}. Neste modelo, o fenótipo também se manifesta em heterozigose e é caracterizado por anormalidades cardiovasculares e esqueléticas ⁴⁷. Entretanto, diferente do modelo $Mg\Delta^{loxpneo}$, os camundongos C1039G apresentam uma sobrevida normal. Quanto à proteína, a substituição de uma cisteína em um domínio cEGF resulta na impossibilidade de formação de uma ponte dissulfeto no interior do domínio. Os domínios conservados de um típico domínio cEGF da fibrilina-1 estão representados na figura 5.

A aquisição dos camundongos C1039G, a extração dos MEFs a partir destes animais, e todos os experimentos referentes à utilização destas células foram realizados durante estágio da doutoranda no exterior. Este estágio foi realizado no departamento de Biologia Celular, Imunologia e Neurociências da Universidade de Barcelona, Espanha, sob a supervisão do Prof.Dr. Gustavo Egea como parte integrante da experiência e capacitação da estudante e financiado pela Fapesp – processo 12/23490-0 (bolsa de estágio e pesquisa no exterior).

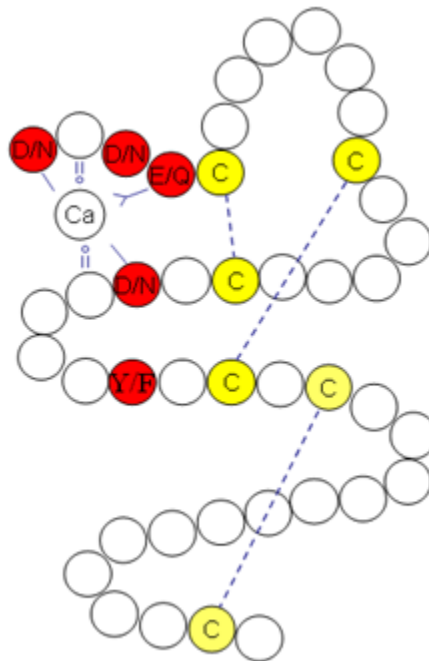


Figura 5. Resíduos conservados dentro de um domínio cbEGF da fibrilina-1. Os resíduos de cisteína estão representados em amarelo. As linhas tracejadas representam as pontes dissulfeto formadas entre cisteínas essenciais para a conformação nativa do domínio e portanto, da proteína. Imagem extraída de <http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/index.asp?pageid=579>.

3.3. Extração e cultura de fibroblastos embrionários de camundongos

Para o estabelecimento das culturas de MEFs, camundongos fêmeas *wild-type* (WT) e machos portadores da mutação para fibrilina-1 ($Mg\Delta^{lox\text{pneo}}$ ou C1039G) em heterozigose (descritas no tópico 3.2) foram acasalados, e os embriões resultantes foram utilizados para a extração dos MEFs. Após montagem dos acasalamentos, as fêmeas foram checadas nos dias seguintes para verificação da formação do “plug vaginal” (anuncia o acasalamento). Depois de decorridos 13-14 dias do acasalamento, as fêmeas foram submetidas à eutanásia por anestesia com uma mistura de xilazina (3,5mg/Kg) e ketamina (30mg/Kg) seguida de deslocamento cervical.

O útero foi removido para coleta dos embriões. Em condições estéreis, os embriões foram isolados e lavados com tampão salina fosfato (PBS) estéril. Em seguida, as vísceras visíveis e olhos foram removidos e os embriões foram macerados (cada embrião separadamente) e submetidos à digestão enzimática com solução de tripsina 0,25% + ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*) 0,02%, por 30 minutos a 37°C. A digestão foi interrompida pela adição de meio de cultivo DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *low glucose* suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (400U/mL) e estreptomicina (50mg/mL).

As soluções contendo os MEFs foram transferidas para garrafas de cultura 75cm³ (uma garrafa/embrião) e mantidas na estufa a 37°C (5% de CO₂) por 16 horas. Após este tempo, o meio foi substituído, e as células mantidas na estufa 37°C (5% de CO₂) para permitir o crescimento celular. Posteriormente, uma amostra das células provenientes de cada embrião foi submetida à genotipagem para identificar a presença (heterozigose) ou ausência (homozigose recessiva) dos alelos mutantes. Os MEFs heterozigotos para as mutações foram nomeados como: células SMF para a mutação $Mg\Delta^{loxpneo}$ e células SMF-2 para as portadoras da mutação C1039; as células apresentando os alelos em homozigose recessiva (alelos selvagens) são as células *wild-type* (WT).

A genotipagem das células provenientes do modelo $Mg\Delta^{loxpneo}$ foi realizada no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde os animais foram mantidos durante o estudo. A genotipagem das células provenientes do modelo C1039G foi realizada por reação em

cadeia da polimerase (PCR - do inglês, *polymerase chain reaction*) convencional utilizando os primers: Forward: CTCATCATTTTTGGCCAGTTG; Reverse: GCACTTGATGCACATTCACA. Todos os procedimentos e a realização do estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas – FMUSP (Cappesq).

3.4. Mecanismos adaptativos associados à indução de estresse do RE e ativação de ERAD

3.4.1. Expressão proteica de marcadores da UPR por Western-blot

A expressão proteica das chaperonas marcadoras de UPR (GRP78, GRP94 e calreticulina) e da Nox4 foi avaliada por Western-blot. Lisados totais dos MEFs foram preparados por lise celular com tampão de lise contendo: HEPES (20mM), NaCl (150mM), glicerol (10%), Triton (1%), EGTA (do inglês, *ethylene glycol tetraacetic acid*) (1mM) e MgCl₂ (1,5mM) acrescido de inibidores de protease (aprotinina 1µg/ml, leupeptina 1 µg/ml e fenil-metil-sulfonil 10 mM) e fosfatase (ortovanato de sódio 2mM) e submetidos a sonicação. Os lisados foram submetidos a centrifugação (15000g por 20 minutos) e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C até a realização das análises. A dosagem de proteínas dos lisados foi realizada pelo método de Bradford. As amostras foram diluídas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10 mM e dodecil sulfato de sódio 10% e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida

utilizando sistema *Hoefler Dual Gel Caster* (GE). A concentração de acrilamida foi 10% em todos os experimentos.

A transferência foi feita para membranas de nitrocelulose utilizando o sistema semi-seco *Semi-dry transfer unit TE70* (GE). O bloqueio foi realizado com uma solução de leite desnatado a 5% em tampão tris salina (tris base 50mM, NaCl 150mM) contendo 0,05% de Tween, pH7.4 (TBS-T). A detecção das proteínas foi feita pela incubação com os anticorpos primários específicos por 16h a 4°C, seguida de uma incubação com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase por 2h a temperatura ambiente (T.A).

Anticorpos primários utilizados: anti-KDEL monoclonal obtido em camundongo (SPA 827/Enzo Life Sciences); anti-calreticulina policlonal obtido em galinha (PAI-903/Thermo Scientific) e anti-Nox4 policlonal obtido em coelho (3187-1/Epitomics). Anticorpos secundários utilizados: anti-camundongo (401215), anti-coelho (401393) e anti-galinha (401520) conjugados à peroxidase HRP (do inglês *horseradish peroxidase*) (Calbiochem); anti-camundongo (926-32212) conjugado a IRDye® 800CW e anti-coelho (926-68073) conjugado ao IRDye® 680RD (LI-COR).

A revelação foi feita por quimioluminescência ou sistema *Odyssey imaging system* (LI-COR Biosciences) a depender do experimento. Para o método quimioluminescente (peroxidase-H₂O₂-luminol) usamos o kit ECL (GE), com exposição da membrana a um filme radiográfico e revelação em equipamento automatizado (Kodak). A densitometria das bandas foi realizada no programa Image J.

3.4.2. Dosagem da produção total de H₂O₂ por Amplex Red

Avaliamos a produção total de H₂O₂ por MEFs WT e SMF por meio do ensaio de oxidação do *Amplex Red*. Neste ensaio, o *Amplex red* reage com o H₂O₂, na presença de peroxidase, sendo oxidado a resorufina, um produto que emite fluorescência vermelha ⁴⁸, e, portanto, o sinal de fluorescência emitido reflete a quantidade de H₂O₂ produzido. Para realização deste ensaio, os MEFs foram plaqueados em placa de 6 poços (1,5x10⁵/poço) e mantidos em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 48h. Após este período, as células foram colocadas em suspensão pelo tratamento com solução de tripsina 0,25% + EDTA 0,02%, por 2 minutos a 37°C. Em seguida, foram lavadas 1X em tampão Krebs (NaCl 120mM, KCl 4,7mM, CaCl₂ 1,9mM, MgSO₄ 1,2mM, KH₂PO₄ 1,05 mM, NaHCO₃ 25mM, glicose 1,1 mM, ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico (HEPES) 20mM, pH 7,4) e ressuspensas em 100µL do mesmo tampão.

O ensaio prosseguiu pela incubação dos MEFs com *Amplex Red* (0.1 mM) (A12222/Invitrogen) e HRP (1U/mL) na presença ou não de catalase (enzima que catalisa a decomposição de H₂O₂ a água e oxigênio - 120 U/poço) (Boehringer) em tampão Krebs por 60 minutos (200µL – volume total). A fluorescência total foi mensurada em espectrofluorímetro *SpectraMax M5* (Molecular Devices) no modo intensidade de fluorescência (excitação a 560nm, emissão a 590nm). A produção total de H₂O₂ foi calculada pelo seu acúmulo extracelular após 60 minutos de leitura, como a diferença entre os valores produzidos pelas células na ausência e presença de catalase. O ensaio foi realizado três vezes independentes com MEFs provenientes de três ninhadas

diferentes e os resultados foram comparados entre MEFs WT e SMF em cada ensaio/ninhada.

3.4.3. Expressão gênica de Nox4

A atividade de Nox4 é nitidamente regulada por seus níveis de expressão uma vez que esta enzima é constitutivamente ativa ⁴⁹, portanto, estudamos tanto a expressão proteica como do mRNA da Nox4. O mRNA dos MEFs foi isolado pelo kit *Oligotex Direct mRNA purification* (Qiagen) e convertido a cDNA (150ng) por incubação com 25ng/mL OligodT(12-18), 500µM (cada) dNTP, 5µM dithiothreitol e *SuperScript II* (Invitrogen) a 42°C por 50 min. O mRNA da Nox4 foi mensurado por PCR em tempo real, as reações foram realizadas em termociclador *StepOne Plus*, (Applied Biosystems). Expressão de GAPDH (do inglês *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) foi usada como gene normalizador. Sequência dos primers utilizados:

- 1) Nox4:
forward: CCAGAATGAGGATCCCAGAA
reverse: ACCACCTGAAACATGCAACA
- 2) GAPDH:
forward: GCAAAGTGGAGATTGTTGCCAT
reverse: CCTTGACTGTGCCGTTGAATTT

3.4.4. Comparação da resposta dos MEFs WT e SMF à indução de estresse do RE

Para avaliar se a presença da fibrilina-1 mutada alteraria a resposta celular mediante a indução do estresse do RE com tunicamicina, os MEFs foram mantidos e cultura em placa de 6 poços por 24h seguido do tratamento com tunicamicina 2 ou 4 µg/mL ou com veículo dimetilsulfóxido por 16h em 1% SFB. As células foram então lisadas e Western-blot para GRP78 realizado conforme descrição no item 3.4.1. O sobrenadante (meio condicionado) dessas células também foi coletado e analisado por Dot-blot para detecção de fibrilina-1 solúvel.

3.4.5. Regulação da via de degradação associada ao RE – ERAD

Conforme descrito à introdução, a via de degradação associada ao RE envolve a degradação de proteínas mal-enoveladas pelo sistema ubiquitina-proteassoma³³. A UPR induz tanto a atividade quanto a expressão de fatores associados à ERAD. A ERAD também pode ser ativada anteriormente e mitigar a indução da UPR pela degradação eficaz das proteínas mal-enoveladas²⁸. A inibição da atividade do proteassoma também é capaz de induzir estresse do RE e induz morte celular por vários mecanismos⁵⁰.

3.4.5.1. Atividades proteolíticas associadas ao proteassoma

As atividades proteolíticas associadas ao proteassoma: tripsina-*like*, quimiotripsina-*like* e caspase-*like* foram mensuradas com os ensaios bioluminescentes *Proteasome-Glo™ 3-Substrate System* (Promega Corporation) específicos para cada atividade. Os MEFs foram cultivados em placa de 96 poços (10⁴/poço) em 100µL de DMEM com 10% SBF. Após 24h, o meio foi removido e substituído por 200µL de DMEM com 1% de BSA ou 100µL de DMEM com 1% de BSA contendo 1µM de MG132 (inibidor da atividade do proteassoma). Após incubação a 37°C em estufa de CO₂ por 16h, o meio foi removido e substituído por tampão de reação contendo 40µg/mL de digitonina para permeabilizar a membrana plasmática e permitir o acesso dos substratos ao proteassoma⁵¹. O protocolo seguiu conforme recomendações do fabricante. Como controle positivo nos ensaios, utilizamos extrato de proteassoma isolado de MEF WT, conforme protocolo descrito por⁵².

3.4.5.2. Ensaio de morte celular após inibição do proteassoma

Os MEFs foram plaqueados em placa de 96 poços (10⁴/poço) em 100µL de DMEM com 10% SBF e cultivados a 5% CO₂, 37°C. Após 24h, o meio foi removido e substituído por 100µL de DMEM com 1% de BSA + 100uL das soluções de MG132 ou lactacistina. Concentração final nos poços: 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0µM. Após incubação a 37°C em estufa de CO₂ por 16h, o sobrenadante foi coletado (100µL) e transferido para outra placa para realização do ensaio de morte celular com o uso do kit *Citotoxicity Detection kit*

LDH (Roche). Neste ensaio, a concentração de lactato desidrogenase (LDH) liberada do citoplasma para o meio após lise celular é mensurada e reflete a quantidade de células lisadas, logo, a morte celular. O protocolo seguiu conforme recomendações do fabricante.

3.5. Efeito do processamento intracelular da fibrilina-1 mutada sobre a secreção da proteína

Para investigar uma possível retenção da fibrilina-1 no RE causada por distúrbios no enovelamento da proteína mutada, mensuramos as taxas de secreção da fibrilina-1 para o meio extracelular por análises de Dot-blot, tanto em condições basais, quanto após o bloqueio da via secretória ou indução de estresse do RE nas células SMF e WT. Em paralelo, comparamos a distribuição intracelular e a possível formação de agregados da fibrilina-1 por microscopia confocal.

3.5.1. Expressão gênica de fibrilina-1

Para tornar possível a associação das taxas de secreção da fibrilina-1 a uma possível retenção da proteína mutada nas células SMF, era necessário excluir que os resultados encontrados fossem devido à alteração na expressão gênica da fibrilina-1 pelo alelo mutante em comparação com a expressão nas células WT. Embora Lima e colaboradores (2010) ⁴⁶ tenham descrito que a mutação $Mg\Delta^{loxPneo}$ leva a uma redução de 20% na expressão global da fibrilina-1, necessitávamos validar este resultado condições utilizadas no

presente estudo, e, portanto, comparamos os níveis de expressão gênica total da fibrilina-1 nos MEFs WT e SMF. O protocolo para extração do mRNA, PCR em tempo real e normalização seguiram conforme descrito no item 3.4.3.

Sequência dos primers utilizados para fibrilina-1:

- 1) FBN1 (amplifica região comum a fibrilina-1 normal e mutada): forward: AGCCAGAACCTTCACATCATGGT
reverse: GCCTGAGAAAGTGGTTGGTTGA

3.5.2. Dot-blot para quantificação de fibrilina-1 secretada

Os MEFs foram plaqueados em placas de 6 poços (2×10^5 /poço) e cultivados a 5% CO₂, 37°C. Após 24h, o meio de cultura foi substituído por meio novo que foi coletado após 4,5h (sobrenadante ou meio condicionado) em contato com as células e congelado a -80°C até a realização do Dot-blot. O mesmo volume de sobrenadante de cada amostra (em cada experimento) foi aplicado por poço para a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, utilizando o sistema *96 well Dot-blot System – Minifold I* (Whatman). Após a adsorção das amostras na membrana, esta foi corada usando vermelho de Ponceau para confirmar a aplicação de quantidade similar de proteína total por poço. Apenas meio de cultivo puro sem contato prévio com células foi pipetado em alguns poços como controle em todos os experimentos.

O bloqueio foi realizado com uma solução de leite desnatado a 5% em TBS-T. A detecção da fibrilina-1 foi feita pela incubação com o anticorpo primário específico anti-fibrilina-1 (pAb 9543 – policlonal obtido em coelho)

(gentilmente doado pela Profa. Lynn Sakai, da *Oregon Health and Science University*) diluído 1:1000 em TBS-T por 16h a 4°C, seguida de uma incubação com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à HRP (401393/Calbiochem) diluído 1:2000 em TBS-T por 2h a T.A. A revelação foi feita por método quimioluminescente (peroxidase-H₂O₂-luminol) com o kit ECL (Amersham), com exposição da membrana a um filme radiográfico e revelação em equipamento automatizado (Kodak). A densitometria dos dots foi realizada no programa Image J.

3.5.3. Comparação dos níveis de secreção da fibrilina-1 após indução de estresse do RE ou bloqueio da via secretória

A indução de estresse do RE foi realizada conforme descrito no item 3.4.4. O bloqueio da via secretória foi induzido pelo tratamento dos MEFs com Brefeldina-A (BFA) ou monensina de sódio (ambas a 10 µM) por 4,5h em DMEM sem SBF. BFA atua no bloqueio do transporte no início da via secretória, ou seja, do bloqueio do transporte das proteínas do RE para o Golgi e consequente transporte retrógrado, levando à retenção das proteínas recém-sintetizadas no RE ⁵³. Por outro lado, a monensina atrasa o transporte proteico através do complexo de Golgi, levando ao acúmulo intracelular de proteínas secretadas neste compartimento ⁵⁴. Após o tratamento, os sobrenadantes foram coletados e submetidos ao Dot-blot conforme descrito no item 3.5.2.

3.5.4. Distribuição intracelular da fibrilina-1 por imunofluorescência em microscopia confocal

Os MEFs foram cultivados em lamínulas de vidro tratadas com poli-L-lisina em placa de 24 poços (10^4 /poço), a 5% CO_2 , 37°C. Após 20h, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído (4%) por 20min a T.A. e então permeabilizados com PBS contendo Nonidet p40 (detergente) 0,1%, por 30 min a 37°C. O bloqueio foi realizado com PBS contendo 2% de albumina bovina (BSA) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, os MEFs foram incubados com anti-fibrilina-1 (pAb 9543) (diluído 1:200 em PBS contendo 1% de BSA) por 16h, a 4°C. Os núcleos foram corados com DAPI (Invitrogen, 1:200) ou Hoechst 33258 (1:200).

A marcação com GM130, um marcador específico para o complexo de Golgi, porção cis-Golgi, foi utilizada para confirmar este compartimento como localização intracelular da fibrilina-1 após o tratamento com monensina. Neste experimento, o anticorpo primário anti-GM130 (35/GM130/BD Transduction Laboratories) (diluído 1:200 em PBS contendo 1% de BSA) foi utilizado.

Os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 anti-coelho para fibrilina-1 ou Alexa 546 anti-camundongo (Invitrogen) para GM130 foram incubados por 1,5h a T.A (diluído 1:200 em PBS contendo 1% de BSA) e as lâminas foram montadas com PBS contendo glicerol (2:1, v/v). As células foram observadas em um microscópio confocal (Zeiss LSM510-Meta) – Multiusuários Fapesp 04/08908-2 - Rede premium/FMUSP. As imagens de co-localização representam a soma de 5-7 cortes de imagem (*slices* - 0,5 μm de espessura cada) e foram processadas usando os softwares LSM Image Browser ou Image J.

3.6. Função da PDI no processamento da fibrilina-1

3.6.1. Co-localização da PDI e fibrilina-1 por microscopia confocal

O processamento das células e protocolo de imunofluorescência foi realizado conforme descrito no item 3.5.4. Entretanto, o anticorpos para fibrilina-1 e um anti-PDI monoclonal obtido em camundongo (SPA891/Enzo Life Sciences) foram incubados ao mesmo tempo com as células para permitir a dupla marcação e análise e quantificação da co-localização entre estas proteínas. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para estimar a co-localização entre os canais vermelho e verde representando a marcação para a fibrilina-1 e a PDI, respectivamente. A co-localização foi calculada por área (selecionando a área total da célula) utilizando o software LSM 510 no modo *expert*. Para cada experimento, o índice foi calculado como a média de cinco imagens distintas para cada condição.

3.6.2. Ensaio de duplo híbrido em levedura

O ensaio de duplo híbrido em levedura foi desenvolvido para identificar alvos proteicos de interação com a PDI. O sistema duplo-híbrido em levedura é um teste molecular indicado na identificação de proteínas que possuem interação biologicamente significativa com uma proteína de interesse ⁵⁵. O sistema, desenvolvido em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fundamenta-se na ativação da transcrição de um gene repórter induzida pela interação da proteína de interesse com seus alvos. As leveduras são transfectadas com dois plasmídeos, um que expressa um domínio de ligação ao DNA fusionado à

sequência da proteína conhecida, cujas interações se quer investigar (chamada de isca) e outro plasmídeo que expressa um domínio de ativação da transcrição fusionado a uma biblioteca de cDNA (chamada genericamente de presa).

A interação entre as proteínas “isca” e “presa” causa interação entre os domínios de ligação ao DNA e o de ativação da transcrição, resultando na transcrição do gene repórter (Figura 6). Esta transcrição resulta num fenótipo da levedura que permite a seleção das colônias em cultura e recuperação do gene que codifica para a proteína que está interagindo com a isca. A habilidade do sistema de duplo-híbrido em detectar as proteínas que estão interagindo e os genes que codificam para elas torna-o um sistema bastante poderoso no estudo das interações⁵⁵. No nosso ensaio, realizado pela empresa *Hybrigenics Company*, vetores plasmidiais contendo a sequência de DNA da PDI humana foram utilizados como isca e testados contra presas constituídas de uma biblioteca de cDNA de fibroblastos humanos.

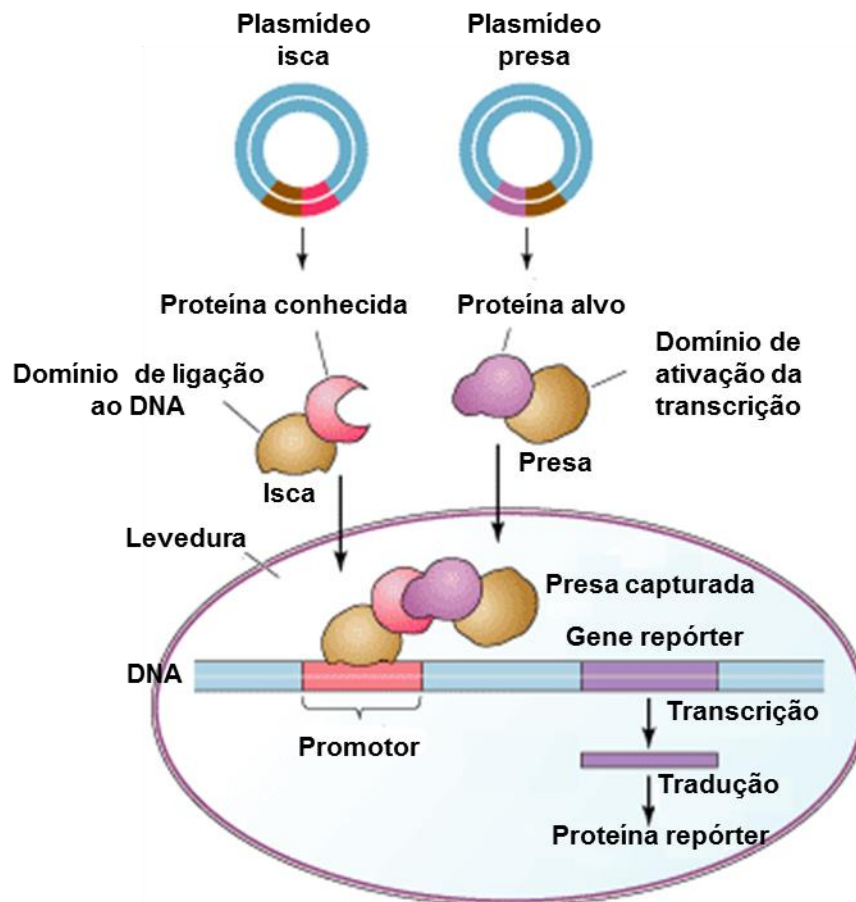


Figura 6. Ensaio de duplo híbrido em levedura para identificação de interações proteína-proteína. O sistema se fundamenta na ativação da transcrição de um gene repórter induzida pela interação da proteína de interesse com seus alvos. As leveduras são transfectadas com dois plasmídeos, um que expressa um domínio de ligação ao DNA fusionado à sequência da proteína conhecida, cujas interações se quer investigar (chamada de isca) e outro plasmídeo que expressa um domínio de ativação da transcrição fusionado a uma biblioteca de cDNA (chamada genericamente de presa). A interação entre as proteínas “isca” fusionada a um domínio de ligação e a “presa” fusionada a um domínio de ativação da transcrição, causa interação entre os domínios de ligação ao DNA e o de ativação da transcrição, resultando na transcrição do gene repórter e produção da proteína repórter. Imagem adaptada de <http://bcs.whfreeman.com/thelifewire/content/chp16/1604009.html>. Acesso em 21/07/2014.

3.6.3. Perda de função da PDI por RNA interferente

A transfecção dos MEFs com o siRNA da PDI (500nM) ou uma sequência controle negativo (*Scrambled*) (500nM), foi feita utilizando a tecnologia *AMAXA nucleofactor system* (Lonza) conforme recomendação do fabricante. Cerca de 2×10^6 células/tubo foram utilizadas em cada experimento e em todos os experimentos havia 4 grupos de células: WTscr, WTsiPDI, SMFscr e SMFsiPDI. As células foram centrifugadas e após remoção de todo excesso de meio, ressuspensas em 100µL de *Nucleofactor solution* do kit V (*AMAXA nucleofactor*) (Lonza) a T.A. O volume correspondente das sequências de siRNA da PDI ou *Scrambled* foram adicionadas e as células submetidas à eletroporação utilizando o programa T-20. Sequências utilizadas:

- 1) siRNA da PDI: senso:UUCUCAUGAUCCUUGUAUGUCUCUC
antisenso: GAGAGACAUACAAGGAUCAUGAGAA
- 2) *Scrambled*: senso: GAGCAUACAAAGGUAACGUAGAGAA
antisenso: UUCUCUACGUUACCUUUGUAUGCUC

Após 24h de transfecção, as células foram replaqueadas para os ensaios. Após 48h do silenciamento, lisados totais foram preparados, dosados e submetidos à avaliação da expressão da PDI e GRP78 por Western-blot conforme protocolo descrito no item 3.4.1. Além dos anticorpos anteriormente descritos, anticorpos primários anti-PDI monoclonais obtidos em camundongo (SPA891/Enzo Life Sciences e 34/PDI/BD Transduction Laboratories) foram utilizados. Lisados celulares também foram preparados e a expressão da PDI avaliada após 96 e 120h para avaliar a manutenção do silenciamento da PDI pelo protocolo utilizado, importante pelo tempo de avaliação do ensaio de deposição da fibrilina-1 na ECM.

Para avaliação do efeito do silenciamento da PDI sobre a secreção da fibrilina-1, o protocolo seguiu conforme descrito no item 3.5.2. O processamento para avaliação da localização intracelular da fibrilina-1 foi realizada conforme item 3.5.4. Para avaliação da fibrilina-1 depositada na ECM em cultura, os MEFs foram cultivados em *chamber slides* tratadas com *permanox* (Nunc® Lab-Tek®) (5x10⁴/poço – área do poço: 0,7cm²), a 5% CO₂, 37°C. O meio de cultura foi substituído 24h e 72h após o plaqueamento. Após 120h de cultivo, as células foram fixadas com metanol a 4° C por 10 minutos e em seguida, reidratadas com PBS por 10 minutos. O bloqueio foi realizado com PBS-BSA 2% por 1,5h a 37°C. Em seguida, os MEFs foram incubados com anticorpo anti-fibrilina-1 (pAb 9543) (diluído em PBS-BSA 1%) por 16 h, a 4°C. Após incubação com anticorpo secundário Alexa 546 (1:200) e Hoechst (1:200) por 2h a T.A., a lâmina foi montada com PBS contendo glicerol (1:2, v/v). A análise foi realizada em microscópio confocal (Zeiss LSM510-Meta) – Multiusuários Fapesp 04/08908-2 - Rede premium/FMUSP.

3.7. Investigação da ocorrência de estresse do RE *in vivo*

Paralelo ao estudo com as células, avaliamos a ocorrência de estresse do RE na progressão da SMF *in vivo*. Para tanto, coletamos órgãos fenotipicamente afetados: aorta, coração e pulmão; e não afetados: rim e fígado de camundongos WT e SMF, modelo MgΔ^{lox^pneo}, com 1, 3 e 6 meses de idade e avaliamos a expressão de GRP78 por Western-blot. Os órgãos foram coletados após eutanásia dos animais utilizando uma mistura de xilazina (3,5mg/Kg) e ketamina (30mg/Kg) seguida de deslocamento cervical. As aortas foram separadas em três regiões: ascendente, torácica e abdominal.

Fragmentos de cerca de 50 mg de coração, pulmão, fígado e rim, foram mecanicamente lisados com auxílio de um macerador em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1% de dodecil sulfato de sódio, 1% de sódio desoxicolato e 1% de nonidet-P40), na presença de inibidores de protease (1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo e 1 ug / ml de aprotinina, pepstatina e leupeptina). As porções de aorta foram maceradas com o mesmo tampão, após congelamento com nitrogênio líquido. Os lisados foram centrifugados (15000g por 20 minutos) e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C. A dosagem de proteínas e Western-blot seguiram conforme descrito no item 3.4.1.

3.8. Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. O tipo de distribuição e a hipótese de igualdade das variáveis foram testados em todos os casos. A análise de variância (para comparação de três ou mais grupos) ou o test-t (para comparação de dois grupos) foram utilizados. O teste de Tukey para comparação múltipla de médias foi utilizado como pós-teste no caso de resultado significativo na análise de variância para comparação dos grupos. O nível de significância foi 5%.

4. Resultados

4.1. Investigação de marcadores de estresse do RE e ativação da ERAD

Para estudar o efeito do processamento/maturação da fibrilina-1 mutada sobre a função do RE, comparamos mecanismos adaptativos associados à UPR nos MEFs *wild-type* (WT) e portadores do alelo mutante $Mg\Delta^{loxpneo}$ (SMF) para a fibrilina-1, conforme descrito no item material e métodos (item 3.3). A expressão proteica das chaperonas marcadoras de UPR: GRP78, GRP94 e calreticulina foi similar nas células WT e SMF (Figura 7A). Resultado semelhante foi obtido para GRP78 e GRP94 comparando MEFs WT e SMF-2 (portadores da mutação C1039G) (Figura 7B). A produção de peróxido de hidrogénio, medido por oxidação do *Amplex Red*, e ambas as expressões, gênica e proteica de Nox4, também foram similares comparando as células WT e SMF (Figuras 8A, B e C, respectivamente).

A ausência de marcadores UPR nestas células nos instigou a avaliar se as células SMF e WT respondiam de maneira diferente à indução de estresse do RE por tunicamicina, um composto que inibe o enovelamento proteico no RE por inibir a glicosilação das proteínas neste compartimento. A indução de estresse do RE foi confirmada pelo aumento da expressão de Grp78 em ambas as células após o tratamento. Entretanto, o aumento desta expressão foi similar nos MEFs WT e SMF, independentemente da concentração de tunicamicina utilizada, indicando indução semelhante de estresse do RE (Figura 9).

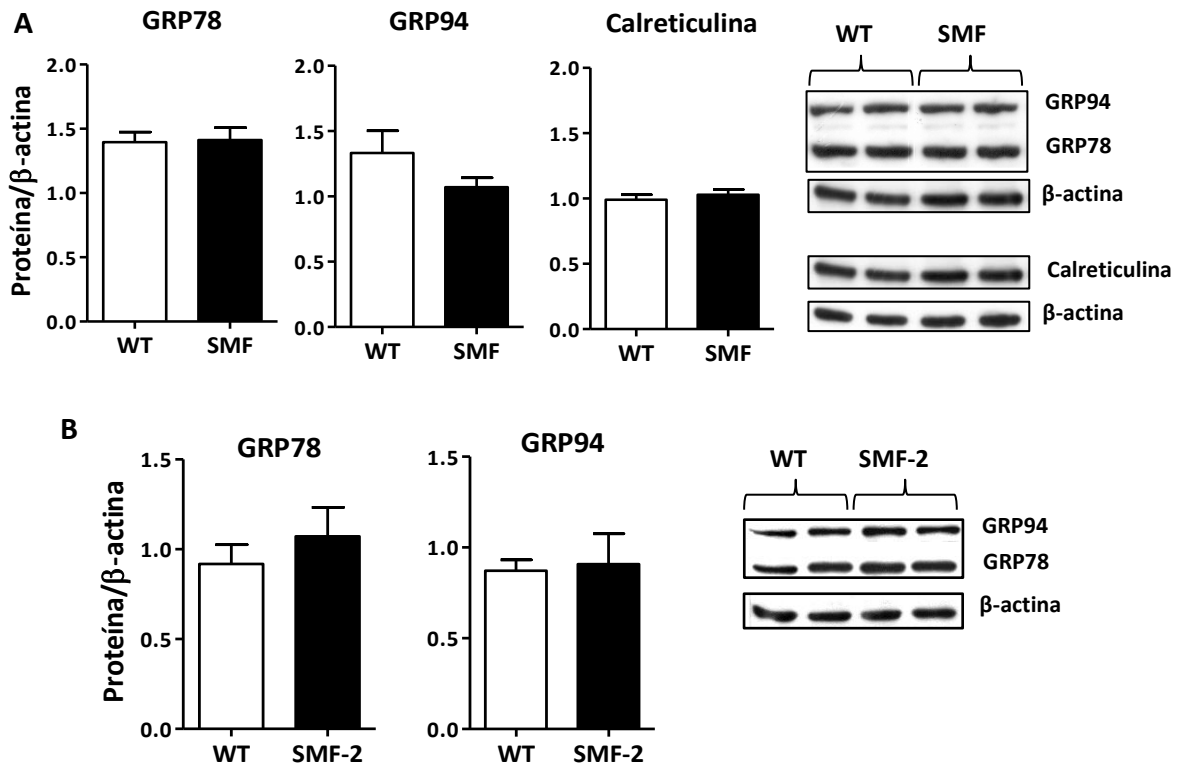


Figura 7. Expressão das chaperonas marcadoras de UPR. A expressão das chaperonas do retículo endoplasmático, GRP78, GRP74 e calreticulina foi avaliada por Western-blot nos lisados de MEFs. A expressão de GRP78 e GRP94 foi detectada pela marcação com anticorpo específico para sequência de retenção no RE: KDEL, sendo a expressão de cada uma das chaperonas diferenciada pelo peso molecular da imunomarcação específica para KDEL no Western-blot. A expressão de calreticulina foi detectada por anticorpo específico. A comparação da expressão das chaperonas foi realizada para MEFs WT e SMF, portadores da mutação $MGA^{lox^{pneo}}$ (A) ou WT e SMF-2, portadores do alelo mutante C1039G (B). As barras representam as médias + SEM (n=6-9 em cada grupo).

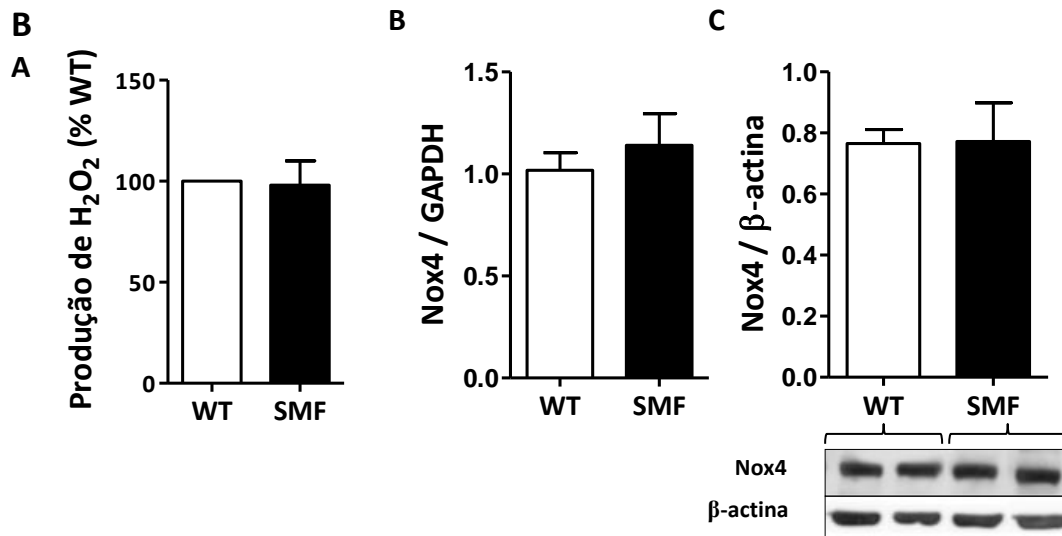


Figura 8. Produção total de peróxido de hidrogênio e expressão gênica e proteica da isoforma Nox4 da NADPH oxidase em MEFs WT e SMF. (A) A produção total de H₂O₂ foi mensurada pelo método de oxidação do *Amplex Red* e calculada pelo acúmulo extracelular após 60 minutos de leitura, considerando os valores produzidos pelas células na ausência de catalase subtraído dos valores produzidos pelas células na presença de catalase. O ensaio foi realizado três vezes independentes com MEFs provenientes de três ninhadas diferentes e os resultados foram comparados entre MEFs WT e SMF em cada ensaio/ninhada. As barras representam as médias + SEM destes experimentos. (B) A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real e corrigida pelo mRNA total do GAPDH. n=9 amostras em cada grupo. (C) A expressão proteica da Nox4 foi mensurada por Western-blot utilizando anticorpo específico. n=4-5 amostras em cada grupo. As barras representam as médias + SEM.

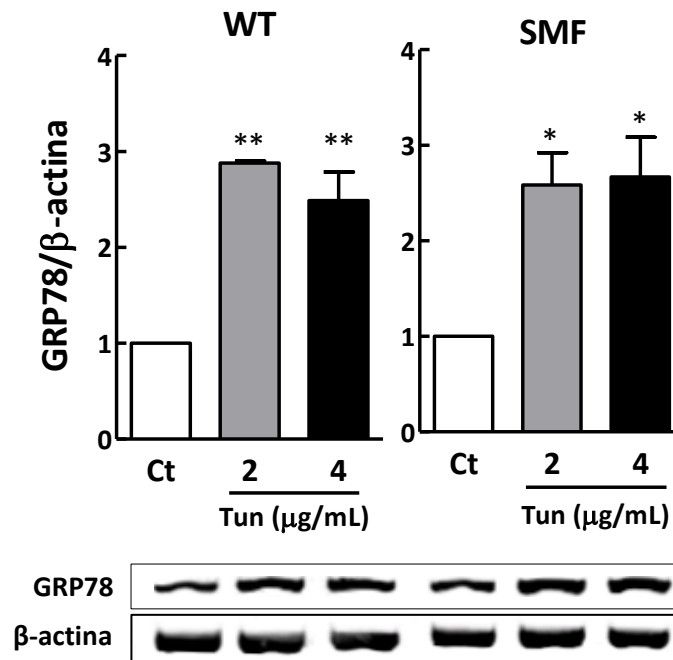


Figura 9. Expressão da chaperona de RE GRP78 nos MEFs WT e SMF em resposta ao estressor do RE tunicamicina. MEFs não tratados = Ct. MEFs tratados com tunicamicina a 2 ou 4μg/mL=Tun 2 e 4. A expressão de GRP78 foi mensurada após 16h de tratamento por Western-blot. As barras representam as médias + SEM (n=3 em cada grupo, exceto Tun2 – n=2). Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey; * P <0,05 vs. Ct; ** P <0,01 vs.Ct.

A seguir, investigamos a possibilidade de ativação do proteassoma como via adaptativa a um potencial desequilíbrio da homeostase proteica do RE pela fibrilina-1 mutada mal-enovelada. Comparamos a ativação basal da ERAD através da mensuração das atividades enzimáticas do proteassoma nas células SMF e WT não tratadas ou após tratamento com o inibidor do proteassoma MG132. As três atividades, quimiotripsina-*like*, caspase-*like* e tripsina-*like* foram semelhantes em ambas às células (Figura. 10A), indicando não haver diferenças na atividade basal da ERAD. Além disso, avaliamos curvas de morte celular após doses crescentes de inibidores do proteassoma. O

tratamento das células com os inibidores MG132 ou lactacistina induziu morte celular de modo semelhantes nas células WT e SMF (Figura. 10B).

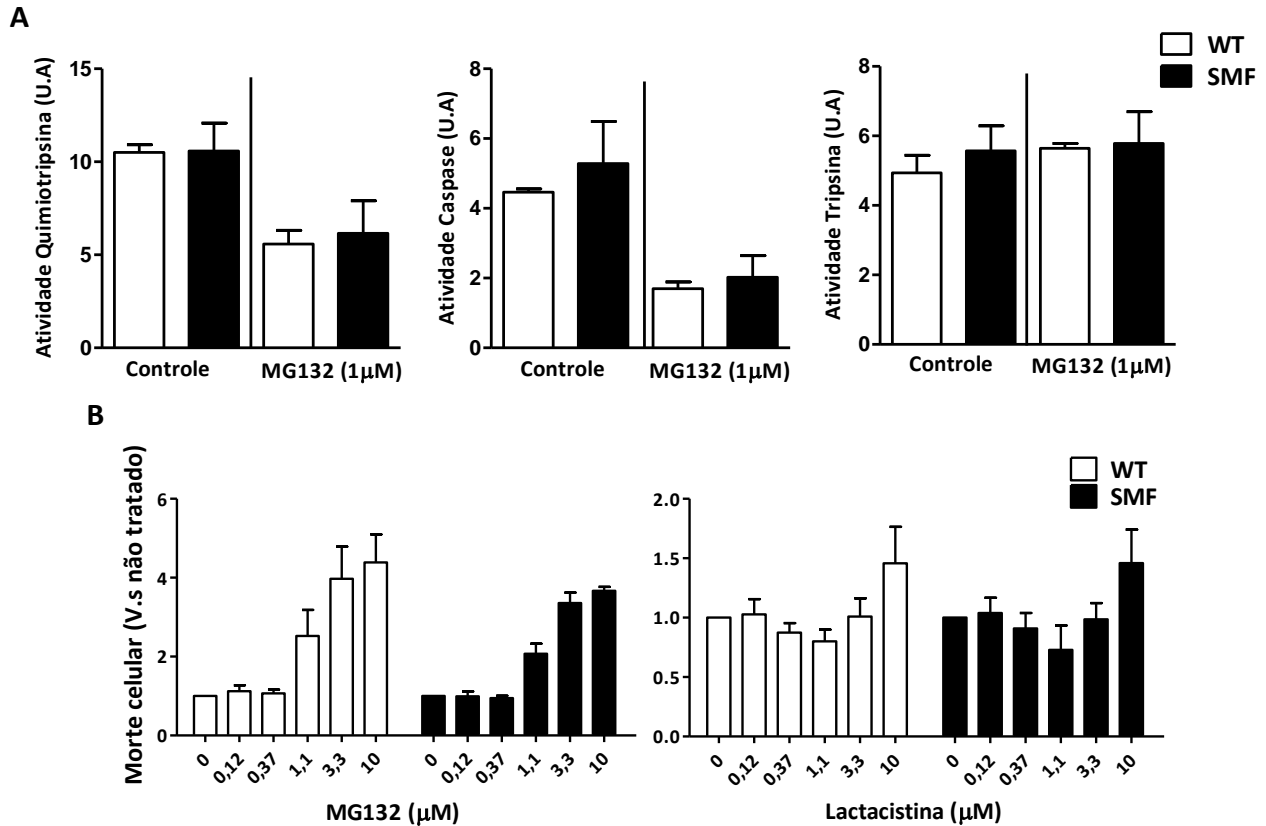


Figura 10. Atividades proteolíticas do proteassoma e curva de morte após inibição dose-dependente do proteassoma por MG132 ou lactacistina nos MEFs WT e SMF. (A) Atividades enzimáticas basais do proteassoma: quimiotripsina-like, caspase-like e tripsina-like foram mensuradas em células não tratadas ou após inibição do proteassoma por MG132. As barras representam as médias + SEM de três experimentos realizados independentemente. (B) Morte celular em resposta ao tratamento com os inibidores específicos do proteassoma: MG132 ou lactacistina, nas concentrações apresentadas. Morte celular foi avaliada pelo ensaio de citotoxicidade DHL. As barras representam as médias + SEM de três experimentos realizados independentemente.

4.2. Investigação do efeito do processamento intracelular da fibrilina-1 mutada sobre a secreção da proteína

Para investigar a possível retenção da fibrilina-1 no RE causada pela proteína mutada mal-enovelada, mensuramos a secreção total da fibrilina-1 para o meio extracelular em cultivos de células SMF e WT. Entretanto, inicialmente mensuramos a expressão gênica total da fibrilina-1 para permitir a posterior interpretação dos resultados das taxas de secreção da fibrilina-1 em relação a uma possível retenção da proteína mutada nas células SMF. Conforme demonstrado na Figura 11A, a expressão da fibrilina-1 foi reduzida em cerca de 20% nas células SMF. Em seguida, comparamos as taxas de secreção da fibrilina-1 nas células em condições basais, e apesar da redução na expressão gênica nas células SMF, a taxa de secreção da fibrilina-1 foi similar em ambas as células (Figura 11B). Resultado similar foi encontrado comparando a secreção da fibrilina-1 por células SMF-2 e WT (Figura 11C).

Em seguida, avaliamos as taxas de secreção da fibrilina-1 após o bloqueio da via secretória com brefeldina-A (BFA) ou monensina, com o intuito de investigar a hipótese um possível controle de qualidade diferencial, entre RE e Golgi, da fibrilina-1 normal ou mutada. Ambos os tratamentos resultaram em uma redução esperada da secreção total da fibrilina-1 (Figura 12A), entretanto, a taxa de inibição após os tratamentos para as células SMF e WT em relação aos seus respectivos controles não tratados também foi semelhante (Figura 12B). Concluimos que os controles de qualidade do RE e Golgi estão igualmente preservados nas células SMF.

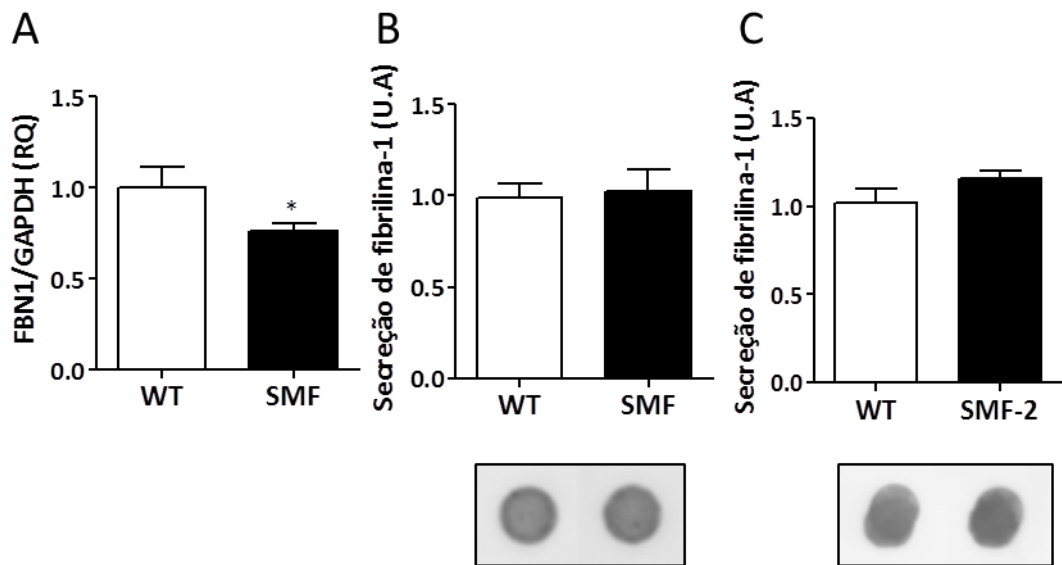


Figura 11. Comparação da síntese e secreção extracelular da fibrilina-1 em MEFs. (A) Expressão gênica total de FBN1 mensurada por PCR em tempo real comparando MEFs WT e SMF, portadoras do alelo mutante $MGA^{loxprneo}$. (B) Secreção da fibrilina-1 para meio de cultura comparando MEFs WT e SMF. (C) Secreção da fibrilina-1 para meio de cultura comparando MEFs WT e SMF-2, portadoras do alelo mutante C1039G. Em B e C, as células foram inicialmente cultivadas por 24h, o meio de cultivo foi substituído e coletado após 4h30min para quantificação da fibrilina-1 secretada durante este período de tempo por Dot-blot, utilizando anticorpo específico para fibrilina-1. Dots controle contendo meio de cultivo puro sem contato prévio com células foram utilizados como controle em todos os experimentos. Os dados foram plotados como média + SEM de três experimentos independentes e analisados por test T.* $P < 0,05$.

Para investigar a sensibilidade da secreção de fibrilina-1 a um estressor exógeno do RE, as células foram incubadas com tunicamicina. Após indução de estresse do RE (de modo semelhante nas células SMF e WT, cf. Figura 9), as taxas de secreção total da fibrilina-1 foram significativamente reduzidas em ambas as células (Figura 12C), embora com uma inibição ligeiramente aumentada nas células SMF em comparação com as células WT (Figura 12D).

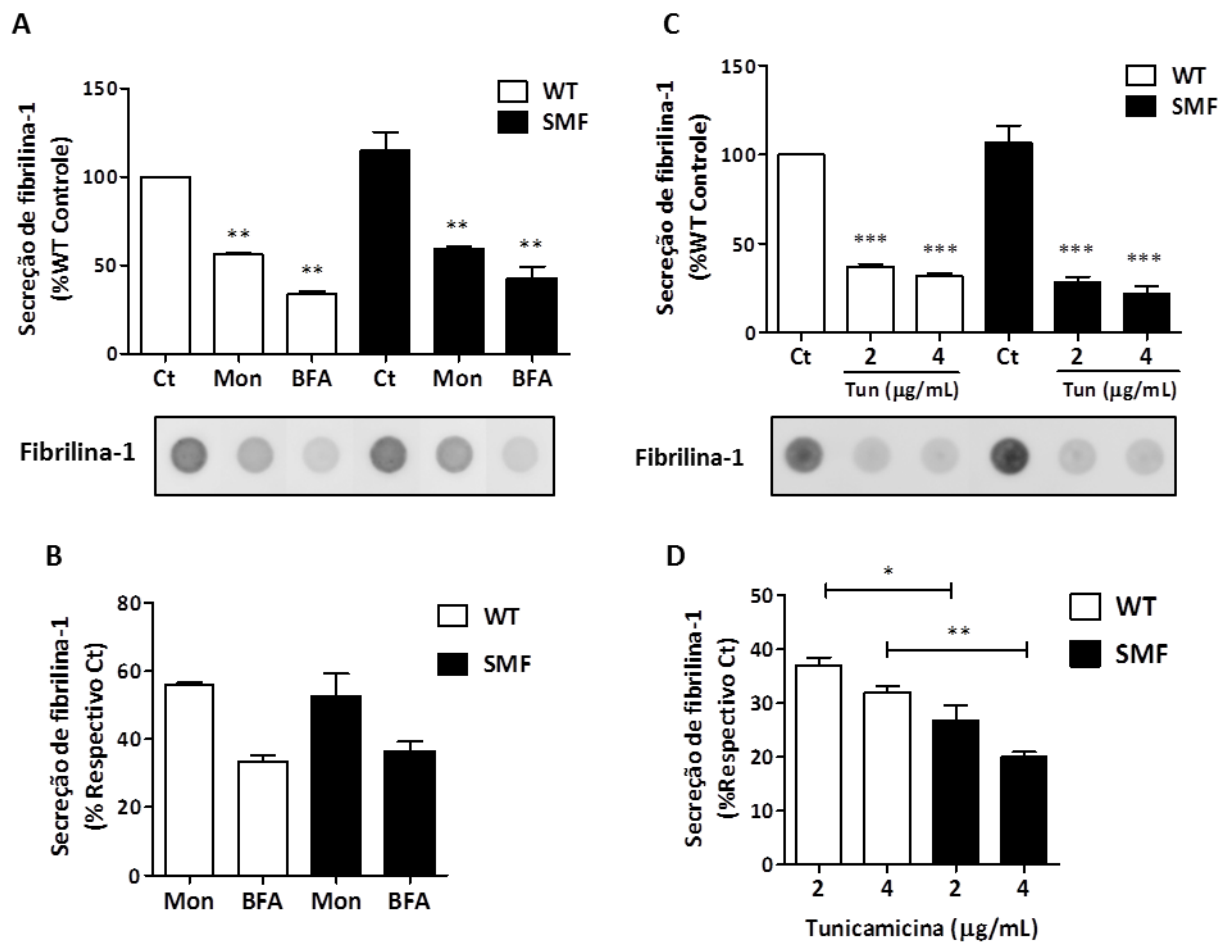


Figura 12. Secreção de fibrilina-1 antes e após inibição da via secretória ou indução de estresse do RE em MEFs WT e SMF. MEFs não tratados (Ct) ou tratados com monensina ou Brefeldina-A (BFA) a 10µM (A e B) ou tunicamicina (Tun) em 2 e 4µg / mL (C e D). As taxas de secreção de fibrilina-1 foram mensuradas por Dot-blot. As imagens são representativas de três experimentos realizados independentemente. Em B e D, os gráficos representam as taxas de secreção da fibrilina-1 após tratamentos em relação a cada respectivo controle não tratado. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey e plotados como média + SEM de três experimentos independentes; * P <0,05; ** P <0,01 vs. grupos Ct ou grupo indicado; ** P <0,01 vs. grupo indicado; *** P <0,001 vs. grupos Ct.

Em paralelo, comparamos a distribuição intracelular da fibrilina-1 nas células SMF e WT, e a possível formação de agregados de fibrilina-1 por imunofluorescência. As imagens das células não tratadas não sugeriu a formação de agregados nas células SMF, e não revelou redistribuição intracelular preferencial da fibrilina-1 em comparação às células WT (Figura 13A: controle WT x SMF). A incubação com BFA causou um padrão mais puntiforme e intenso de marcação para fibrilina-1, sem evidenciar diferenças entre as células WT e SMF. A indução de estresse do RE com tunicamicina evidenciou um padrão de marcação para fibrilina-1 mais intenso, mas sem padrão de redistribuição evidente. Novamente, a marcação fluorescente foi semelhante nas células WT vs. SMF (Figura 13A).

O tratamento com monensina induziu uma concentração intracelular da fibrilina-1 de maneira semelhante nas células SMF e WT, que foi demonstrada como enriquecimento da fibrilina-1 no complexo de Golgi, pela co-localização com GM-130, um marcador específico deste compartimento celular. Além disso, o Golgi das células tratadas com monensina se apresentou dilatado comparado com células não tratadas, sugerindo acúmulo de outras proteínas nesse compartimento (Figura 13B).

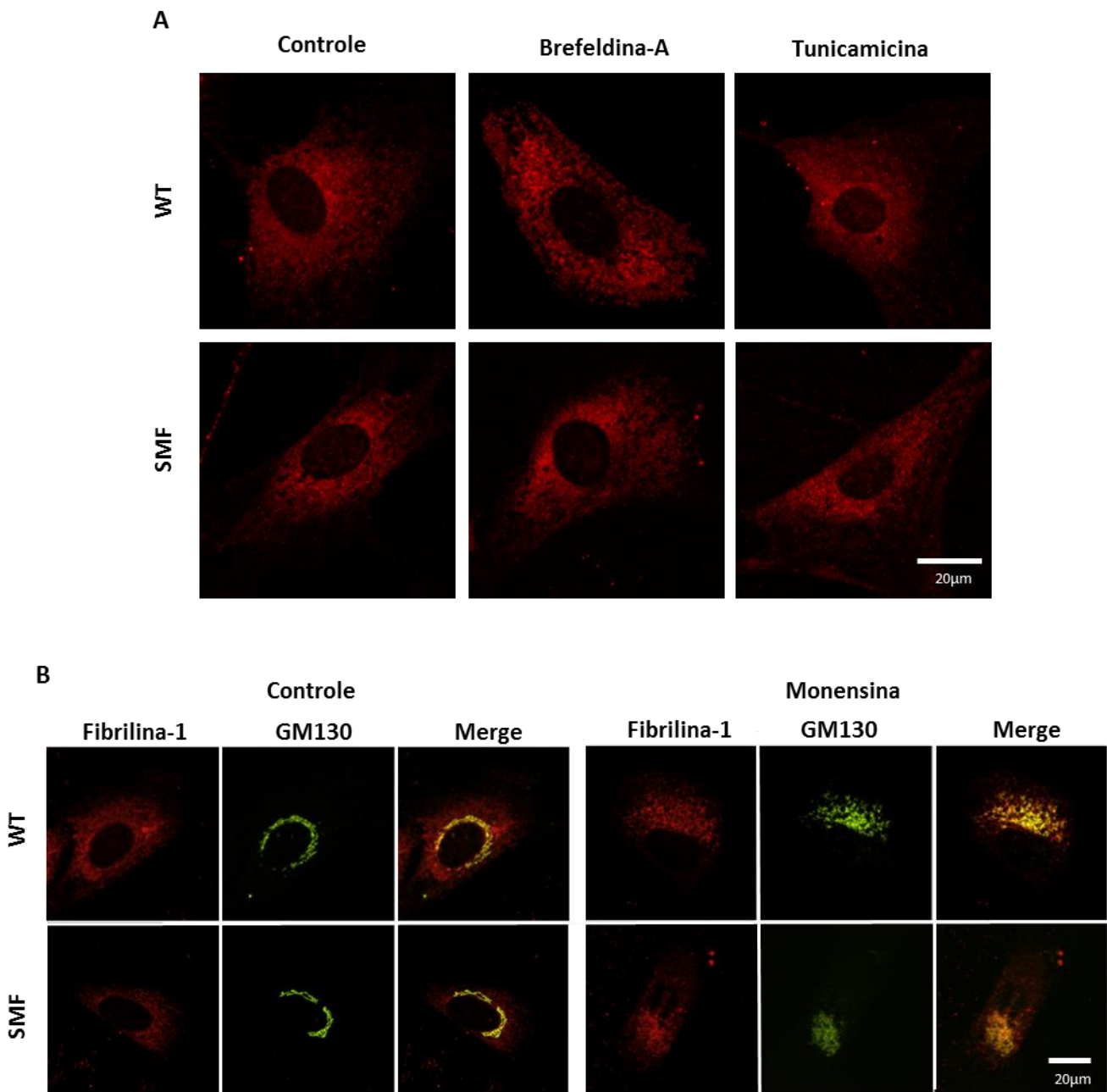


Figura 13. Distribuição intracelular da fibrilina-1. (A) MEFs WT e SMF não tratados (Controle) ou tratados com monensina ou brefeldina-A a 10 μ M ou tunicamicina a 2 μ g/mL foram submetidos a imunofluorescência para avaliação da compartimentalização intracelular da fibrilina-1 (vermelho). (B) A fibrilina-1 em células SMF e WT é igualmente enriquecida no complexo de Golgi das células SM e WT após o tratamento com monensina, detectada por co-localização entre fibrilina-1 (vermelho) e GM-130 (verde), um marcador específico do complexo de Golgi. As imagens são representativas de três experimentos independentes.

4.3. Investigação da função da PDI no processamento da fibrilina-1

Como discutido na introdução, a fibrilina-1 é enriquecida em pontes dissulfeto, cuja formação correta é essencial para a estrutura terciária da proteína e, portanto, seu enovelamento funcional ¹³. Considerando que a PDI é o principal catalisador de pontes dissulfeto no RE, além de exercer várias outras ações na sinalização e homeostase redox, investigamos o possível papel da PDI na maturação da fibrilina-1 normal e mutada.

Inicialmente, investigamos por microscopia confocal, a ocorrência de interação entre estas proteínas. Houve forte co-localização entre a fibrilina-1 e a PDI, particularmente detectável em regiões com padrão sugestivo de retículo endoplasmático perinuclear. A quantificação expressa pelo coeficiente de Pearson confirmou a proximidade entre as duas proteínas, indicativa de interação em grau semelhante em ambas as células SMF e WT (Figura 14A e B).

Importante, após tratamento com BFA, ocorreu aumento da co-localização entre fibrilina-1 e PDI e do coeficiente de correlação de Pearson, comparados com a marcação nas células não tratadas (Figura 14A e B). O padrão de marcação reticular, bem como os efeitos conhecidos da brefeldina-A, corroboram que interação ocorreu no RE. Uma evidência adicional deste fato, ainda, foi a perda de co-localização entre fibrilina-1 e PDI após tratamento das células com monensina (Figura 14C), que induziu o acúmulo de fibrilina-1 no Golgi sem a presença da PDI. Em vários destes ensaios, detectamos pontos de secreção extracelular da fibrilina-1, desacompanhada da PDI, proporcionando uma significativa validação técnica do ensaio (Figura 15).

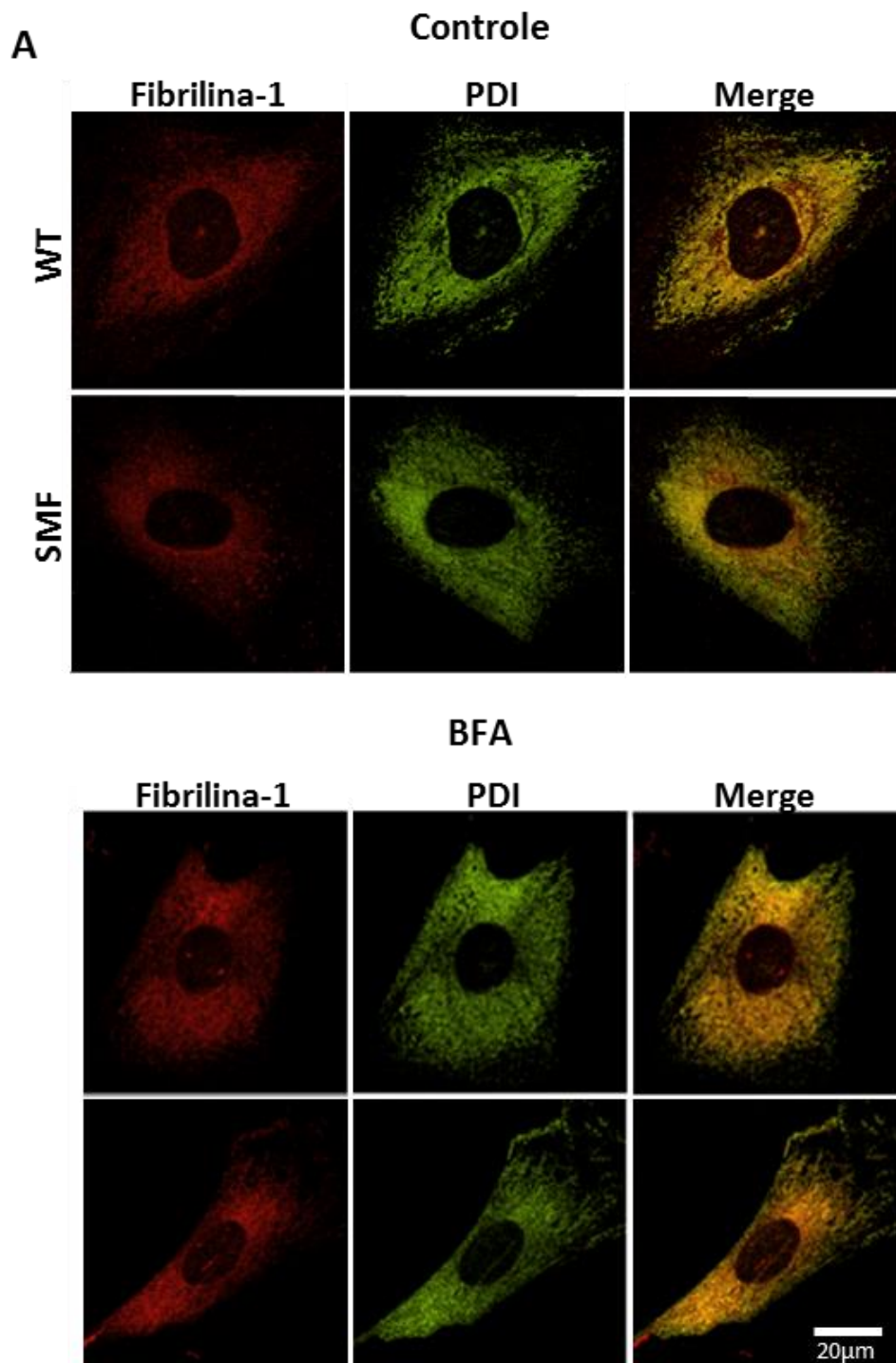


Figura 14 A. Interação entre a fibrilina-1 e a PDI no retículo endoplasmático. MEFs WT e SMF não tratados (Controle) ou tratados com Brefeldin-A (BFA) foram submetidos à imunofluorescência para avaliação da interação entre fibrilina-1 (vermelho) e dissulfeto isomerase proteica (PDI) (verde). A co-localização entre os canais verde e vermelho indica interação entre fibrilina-1 e PDI

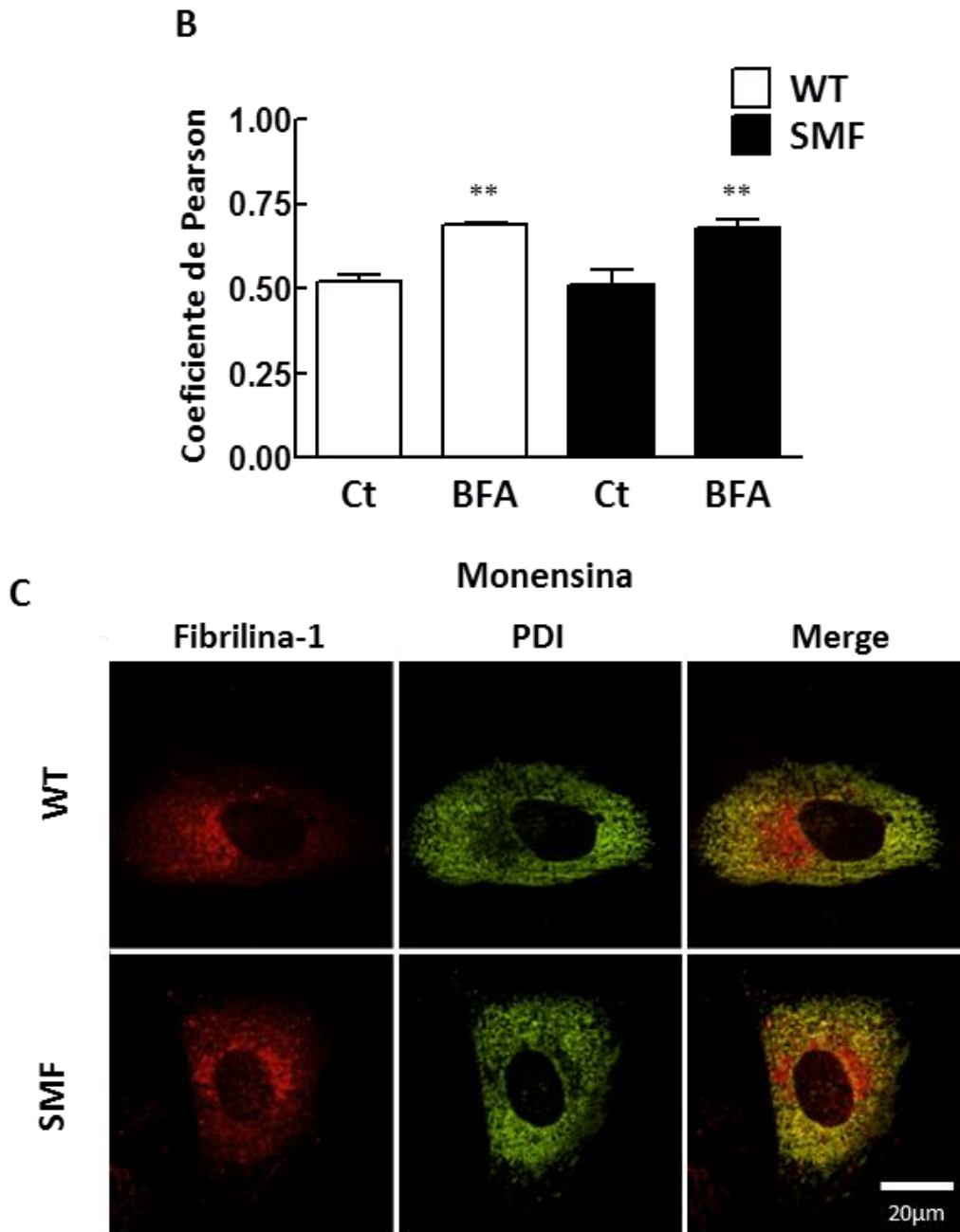


Figura 14 B e C. Interação entre a fibrilina-1 e a PDI no retículo endoplasmático. MEFs WT e SMF não tratados (Controle) ou tratados com Brefeldin-A (BFA) ou monensina foram submetidos à imunofluorescência para avaliação da interação entre fibrilina-1 (vermelho) e dissulfeto isomerase proteica (PDI) (verde). **(B)** Coeficiente de correlação de Pearson antes e após o tratamento com BFA demonstrando aumento da co-localização entre fibrilina-1 e PDI sugere interação destas proteínas no RE. Os dados analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey e plotados como média + SEM de três experimentos independentes; ** $P < 0,01$ vs. grupos Ct. **(C)** Perda de co-localização entre fibrilina-1 e PDI após tratamento com monensina, reforçando que a interação entre estas proteínas ocorre no RE. As imagens são representantes de três experimentos independentes.

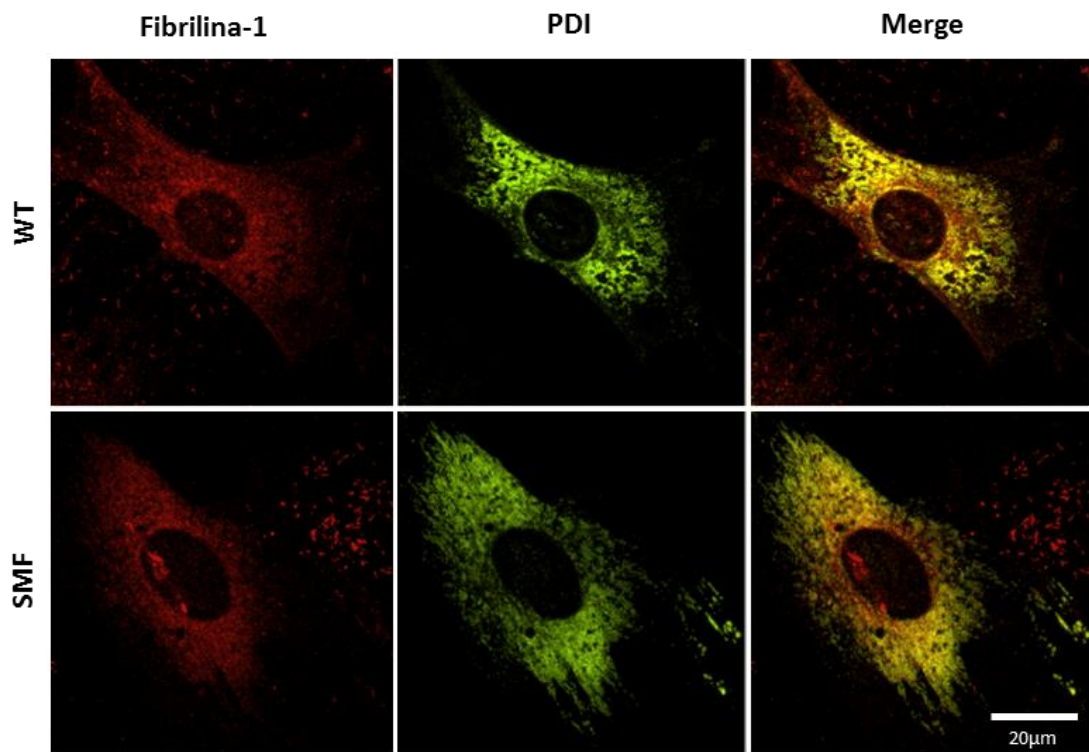


Figura 15. Fibrilina-1 e PDI não co-localizam no espaço extracelular. MEFs WT e SMF foram submetidos à imunofluorescência para avaliação da interação entre fibrilina-1 (vermelho) e dissulfeto isomerase proteica (PDI) (verde). Co-localização entre os canais verde e vermelho indica interação entre fibrilina-1 e PDI intracelular. A fibrilina-1 (vermelho) também é marcada no espaço extracelular, onde não co-localiza com a PDI.

Paralelamente, a interação entre PDI e fibrilina-1 foi confirmada por um ensaio de duplo híbrido em levedura desenvolvido para identificar proteínas que interagem com a PDI, conforme descrito na seção 3.6.2. Estes experimentos identificaram 24 clones positivos, 4 dos quais foram identificados como o gene da fibrilina-1, com alto grau de confiança, sugerindo não se tratar de falsos positivos. Portanto, estes resultados reforçaram nossa hipótese da PDI como candidata relevante no processamento oxidativo da fibrilina-1.

Após identificação da fibrilina-1 como potencial substrato da PDI, prosseguimos o estudo da função da PDI no enovelamento da fibrilina-1 normal e mutada, comparando, as células SMF e WT em experimentos de perda de

função da PDI. O silenciamento da PDI (em ca. 60-70%) foi induzido por RNA interferente específico e confirmado após 48h da transfecção por Western-blot (Figura 16A e 16B) e se manteve ao menos até 120h após a transfecção (tempo máximo avaliado) (Figura 16C).

O anticorpo específico anti-PDI (SPA891/Enzo Life Sciences) utilizado nos experimentos representados nas figuras 14A e 14C resultou na marcação de duas bandas, corroborando resultados prévios de nosso grupo ⁵⁶. A identidade dessas duas bandas, a mais migratória delas com meia-vida aparentemente maior que a menos migratória, permanece obscura. Repetimos os Western-blots para confirmação do silenciamento da PDI utilizando outro anticorpo específico para a PDI (34/PDI/BD Transduction Laboratories), que confirmou o silenciamento da PDI, com marcação de uma banda única.

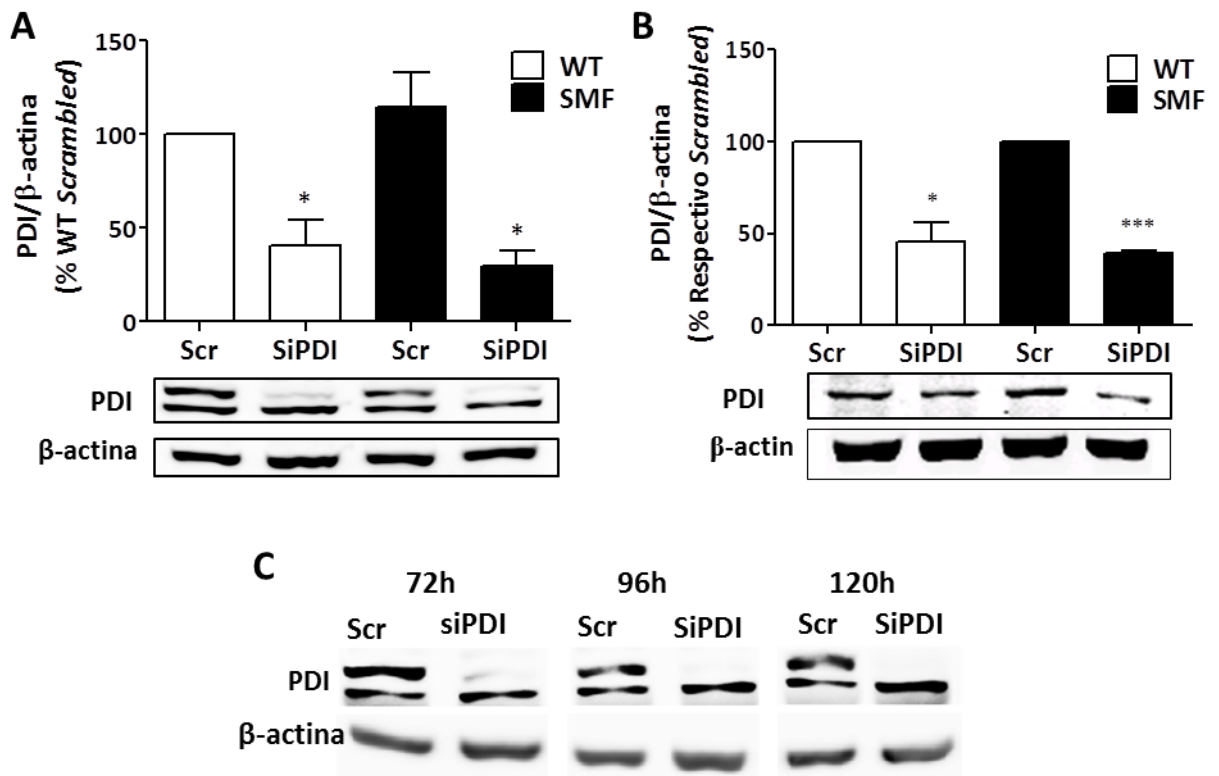


Figura 16. Efetividade e manutenção do silenciamento da PDI por RNA interferente nos MEFs WT e SMF. Os MEFs WT e SMF foram transfectados com RNA interferente específico para PDI (SiPDI) ou uma sequência controle inespecífica (Scr – Scrambled) e após 24h de transfecção, as células foram replaqueadas. Após 48h da transfecção, a efetividade do silenciamento da PDI foi avaliada por Western-blot utilizando diferentes anticorpos específicos para PDI (A) e (B). (C) A manutenção do silenciamento da PDI foi verificada em MEFs WT em até 120h pós transfecção. Os dados foram plotados como média + SEM de três experimentos independentes e analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey; * $P < 0,05$ v.s. Scr grupos (A) ou test T comparando cada grupo SiPDI ao seu respectivo Scr; * $P < 0,05$ (B).

A perda de função PDI promoveu um aumento inesperado da secreção da fibrilina-1 pelas células WT, o que não ocorreu com as células SMF (Fig. 17A). Esta alteração de secreção não foi acompanhada por nenhuma alteração aparente na localização intracelular da fibrilina-1 após silenciamento da PDI, tanto nas células WT quanto SMF (Figura 17B). Para um entendimento mais profundo do efeito da PDI na secreção e processamento da fibrilina-1, avaliamos a organização da fibrilina-1 depositada na matriz extracelular antes e

após o silenciamento da PDI. As células SMF apresentaram matriz extracelular de fibrilina-1 desorganizada em comparação às células WT, conforme esperado pela perda de função da proteína e já descrito na literatura ⁴⁶. Entretanto, o silenciamento da PDI promoveu desorganização da matriz de fibrilina-1 depositada pelas células WT, indicando a indução de um defeito na maturação da proteína. Em paralelo, silenciamento da PDI nas células SMF não foi acompanhado por alteração ou desorganização adicional aparente (Figura 17C).

Avaliamos também a possível perda de homeostase do RE após silenciamento da PDI por meio da avaliação da expressão de GRP78 como marcador de estresse do RE. De fato, um aumento na expressão de GRP78 foi induzido após o silenciamento da PDI, entretanto, de maneira similar nas células SMF comparadas com as células WT (Figura 18), indicando que a fibrilina-1 mutada não foi um obstáculo extra à maquinaria do RE na tentativa de adaptação à perda de função da PDI.

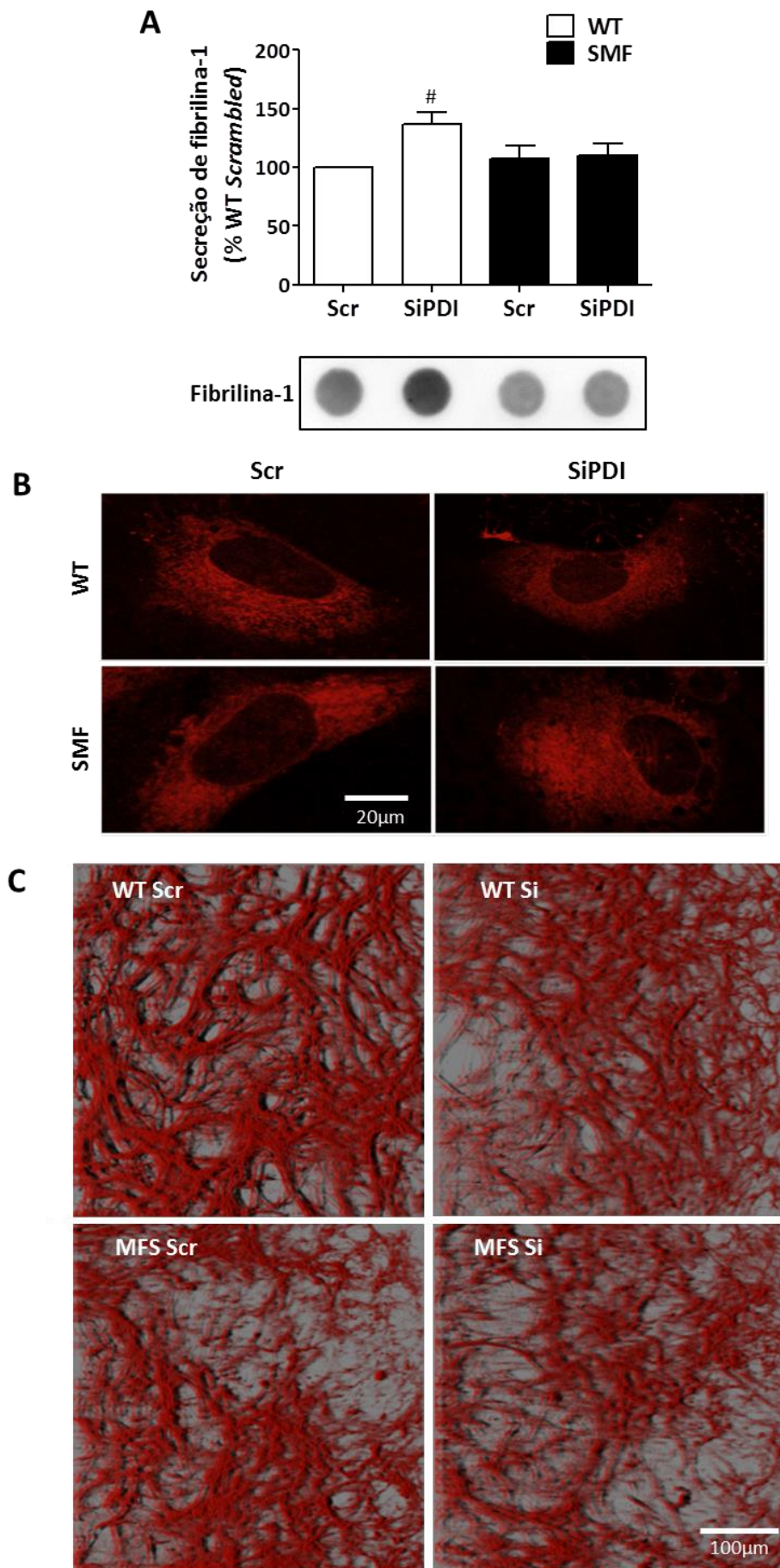


Figura 17. Secreção, localização intracelular celular e deposição extracelular da fibrilina-1 antes e após o silenciamento da PDI em células WT e SMF. Os MEFs foram transfectados com RNA interferente específico para PDI (SiPDI) ou uma sequência controle inespecífica (Scr – Scrambled) e após 24h de transfecção, as células foram replaqueadas para as avaliações demonstradas. (A) Após 48h do silenciamento da PDI, o meio de cultivo foi substituído por meio novo sem soro e coletado após 4h30min em contato com as células para mensuração da secreção de fibrilina-1 total para o meio extracelular durante este período, por Dot-blot. As barras representam média + SEM de 5 experimentos realizados independentemente e os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey; # P <0,05 v.s. Scr WT. (B) As células foram processadas 48h após o silenciamento da PDI e a localização intracelular da fibrilina-1 foi avaliada por microscopia confocal. A marcação em vermelho representa a fibrilina-1 detectada com anticorpo específico. (C) Os MEFs foram cultivados por 120h em alta confluência celular após silenciamento da PDI (total de 144h após transfecção) para favorecer a deposição de matriz extracelular e organização das fibras contendo fibrilina-1 em cultura. A marcação em vermelho representa a fibrilina-1 detectada com anticorpo específico por imunofluorescência em microscopia confocal. As imagens são representativas de ao menos três experimentos realizados independentemente.

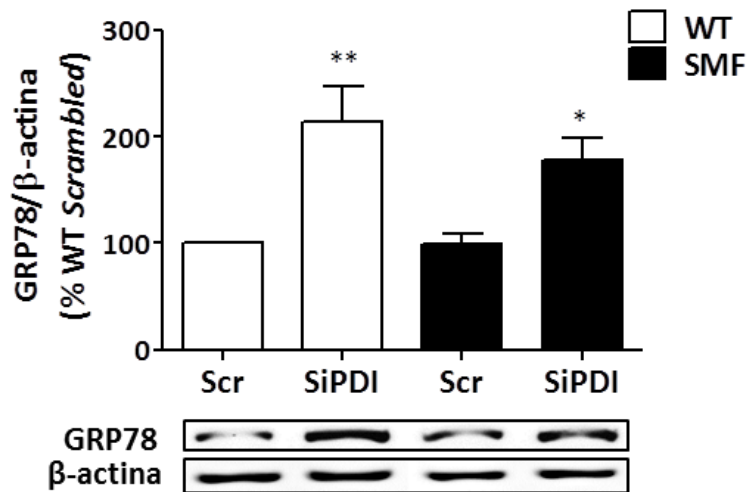


Figura 18. Expressão da chaperona GRP78 nos MEFs WT e SMF após silenciamento da PDI. MEFs foram transfectados com uma sequência controle inespecífica (Scr = Scrambled) ou siRNA específico para PDI (SiPDI). A expressão de GRP78 foi mensurada 48h após o silenciamento da PDI por Western-blot. As barras representam as médias + SEM (n=3 em cada grupo). Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey; * P <0,05 vs. grupos Scr; ** P <0,01 vs. grupos Scr.

4.4. Investigação da ocorrência de estresse do RE na SMF *in vivo*

Paralelo ao estudo com as células, avaliamos a indução de estresse do RE durante a progressão da SMF *in vivo*. Para tanto, avaliamos a expressão de GRP78 em órgãos coletados dos camundongos $Mg\Delta^{loxPneo}$ e WT com 1, 3 e 6 meses de idade, e os resultados são mostrados na figura 19. De acordo com os resultados encontrados para os MEFs em cultivo, com 1 e 3 meses, a expressão de GRP78 não foi alterada em nenhum dos órgãos avaliados comparando os camundongos WT e SMF, embora fenótipos cardiovasculares, como dilatação da aorta ascendente e disfunção diastólica já sejam claramente detectáveis já com um mês de idade (dados não publicados do nosso laboratório).

No entanto, a expressão de GRP78 aumentou significativamente na aorta ascendente dos animais SMF aos 6 meses de idade, coincidentemente com a progressão do aneurisma aórtico típico da SMF com detecção de um aumento significativo da espessura e fração total do volume de colágeno da aorta (dados não publicados do nosso laboratório). A expressão de GRP78 não foi modificada nos outros órgãos avaliados. Em conjunto, estes dados corroboram dados *in vitro* indicando que manifestações fenotípicas da SMF não requerem a ocorrência de estresse do RE e claramente precedem o desenvolvimento desse estresse na evolução temporal da doença *in vivo*.

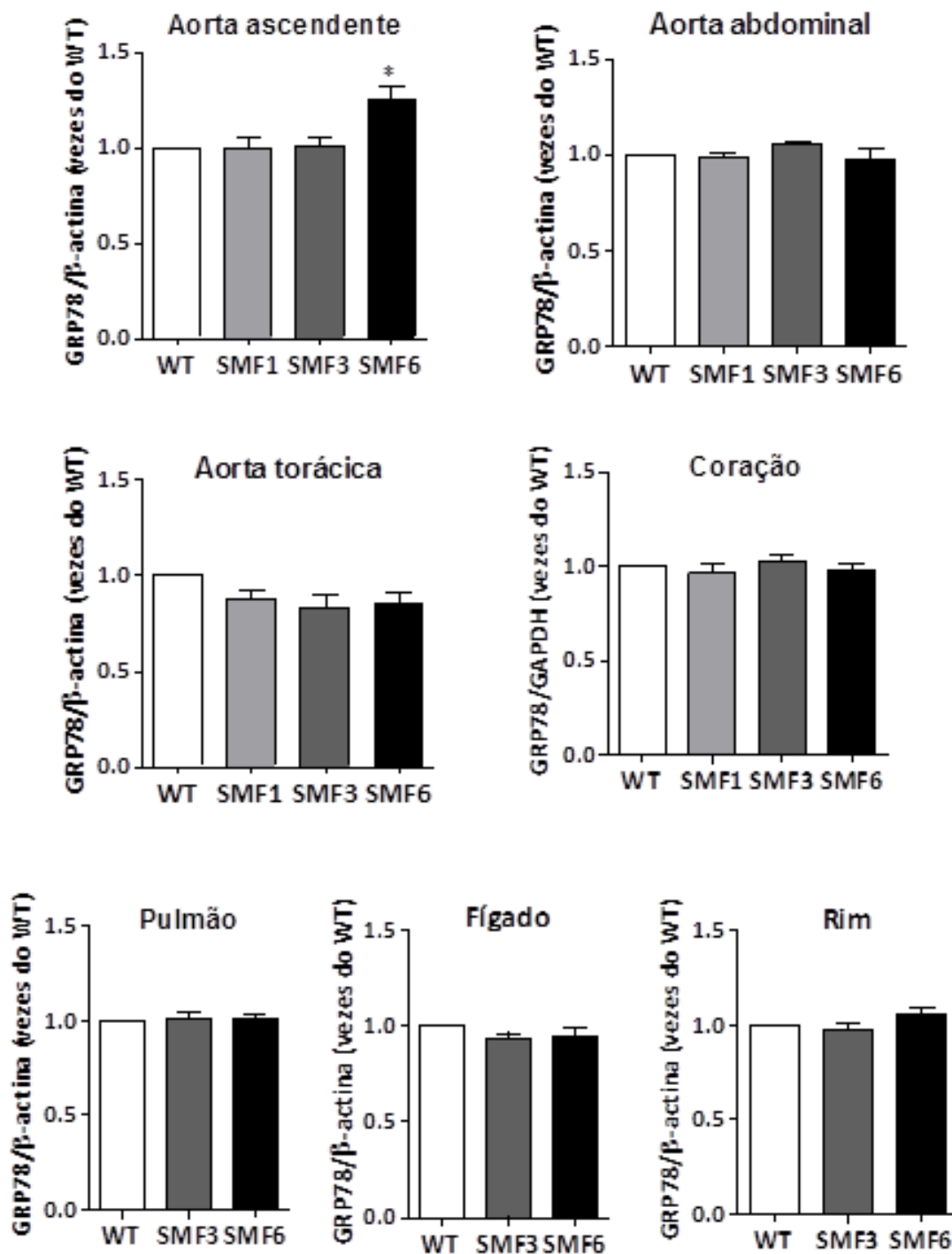


Figura 19. Expressão de GRP78 em órgãos coletados de camundongos WT e SMF. A expressão da chaperona marcadora de estresse do retículo endoplasmático GRP78 foi avaliada por Western-blot em lisados dos órgãos indicados. Os órgãos foram coletados de animais WT e SMF, modelo $MG\Delta^{lox/pneo}$ com 1, 3 e 6 meses de idade. As barras representam as médias + SEM (n=3 - 9 em cada grupo). WT = *wild-type*, SMF1=SMF com 1 mês de idade, SMF3 = SMF com 3 meses de idade, SMF6 = SMF com 6 meses de idade. Os dados dos grupos SMF foram normalizados v.s. seus respectivos WT (mesma idade), seguido por transformação logarítmica e representados como média + SEM. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey; * P < 0,05 vs. todos os grupos.

5. Discussão

A manutenção da homeostase do RE (Figuras 7-10) e secreção extracelular normal da fibrilina-1 mutada (Figuras 11 e 12) indicam que as mutações estudadas, embora capazes de desencadear o fenótipo da doença, não afetam a estrutura global da proteína de maneira suficiente para ser reconhecida pelo controle de qualidade do RE como proteínas mal-enoveladas capazes de desencadear estresse do RE. Mesmo diante da indução na quebra da homeostase do RE, a saber, inibição do proteassoma, inibição da via secretória e silenciamento da PDI, a presença da fibrilina-1 mutante não configurou um obstáculo detectável ao enovelamento proteico no RE quando comparado às células WT.

Os sinais responsáveis pelo reconhecimento de uma proteína como mal enovelada são pouco conhecidos^{24; 29}, e embora pequenas alterações estruturais possam ser suficientes para reter uma proteína no RE⁵⁷, algumas mutações de fato não levam a esta retenção. Portanto, o controle de qualidade do RE parece ser baseado em mudanças estruturais da proteína e não na sua funcionalidade²⁰. Dentre tais sinais, a exposição de resíduos hidrofóbicos na superfície proteica é bem reconhecido como dos mais importantes^{23; 29} e assim o escape do controle de qualidade pela fibrilina-1 mutada pode envolver a não-exposição destes resíduos.

Além disso, pode envolver a *N*-glicosilação correta da fibrilina-1 mutada, uma vez que esta modificação pós-traducional é essencial tanto para prevenir a agregação e a exportação prematura de glicoproteínas para fora do RE como a degradação pela via ERAD²⁵. De fato, as mutações estudadas não afetam potenciais sítios de glicosilação na fibrilina-1^{46; 47}. Neste contexto, é importante notar que a fibrilina-1 mutada não sofre nenhuma redistribuição

intracelular preferencial aparente em comparação às células WT (Figura 13 A), e que as células SMF realizam o transporte normal da fibrilina-1 entre o RE e o complexo de Golgi, evidenciado pelo enriquecimento semelhante da proteína mutada e *wild-type* no Golgi após o tratamento com monensina (Figura 13B). Este dado também sugere que a proteína mutada deve ser corretamente *N*-glicosilada. Em comparação, por exemplo, uma mutação *missense* foi responsável por causar a retenção de IgG3 no RE por induzir falha na glicosilação da cadeia pesada da proteína⁵⁷.

Nossos resultados são consistentes com uma robustez estrutural da fibrilina-1. No contexto evolutivo, o enovelamento de uma determinada proteína teria maior tolerância a erros de síntese quanto maior a sua necessidade pelas células⁵⁸, como tentativa de reduzir os custos de reparo e degradação de proteínas mal-enoveladas pelo controle de qualidade do processamento proteico⁵⁹. Este poderia ser o caso de fibrilina-1, por uma função essencial no tecido conjuntivo. Outras proteínas apresentam menos tolerância a mutações, provavelmente pela menor pressão evolutiva discutida acima, como, por exemplo, a tiroglobulina, cuja função é totalmente exercida na glândula tireoide e as mutações que resultam em bócio e hipotireoidismo congênito levam à retenção da proteína e estresse do RE^{60; 61}.

Em sintonia com a função da PDI no enovelamento proteico e sua importância no processamento de proteínas ricas em pontes dissulfeto, identificamos que a PDI exerce um papel essencial no enovelamento da fibrilina-1. A função direta da PDI no processamento da fibrilina-1 é sugerida pela demonstração da fibrilina-1 como substrato da PDI (Figuras 14 e 15 e ensaio de duplo híbrido), estendendo observações prévias de experimentos de

tradução *in vitro* da fibrilina-1⁶². A ausência da identificação da PDI em estudos prévios pela busca por proteínas associadas à fibrilina-1 na via secretória²² pode se dever a limitações metodológicas. Os intermediários formados entre a PDI e alguns de seus substratos são reconhecidamente transitórios e difíceis de detectar sem abordagens específicas como mutações “substrate-trapping” da PDI⁶³.

A função exercida pela PDI sobre o processamento da fibrilina-1 inclui um retardo na secreção da fibrilina-1, demonstrado pelo aumento da secreção da proteína *wild-type* após perda de função da PDI (Figura 17A), condizente com a PDI exercendo um controle de qualidade do enovelamento para secreção da proteína. Além disso, envolve a participação da PDI no estabelecimento da conformação final funcional da fibrilina-1 madura, conforme demonstrado pelo aumento na desorganização da matriz extracelular de fibrilina-1 não-mutada depositada após o silenciamento da PDI (Figuras 17C).

A partir dos nossos dados, não é possível concluir se o controle exercido pela PDI sobre o processamento da fibrilina-1 *wild-type* inclui um papel direto na formação/isomerização das pontes dissulfeto ou envolve outro mecanismo. De fato, uma multiplicidade de funções da PDI tem sendo descritas na assistência ao enovelamento de proteínas⁶⁴. No processamento da pró-insulina, por exemplo, foi mostrado que a perda de função da PDI resultou em um aumento da secreção da proteína, entretanto sem nenhum prejuízo para a formação das pontes dissulfeto. Estes resultados sugeriram que a PDI poderia exercer um papel na retenção da proteína no RE, enquanto outras óxido-redutases seriam responsáveis pelo enovelamento oxidativo da pró-insulina⁶⁵. Nosso resultado similar no incremento da secreção da fibrilina-1

após silenciamento da PDI (Figura 17A) sugere que a PDI poderia exercer papel equivalente no processamento da fibrilina-1. De fato, a família das óxido-redutases do RE apresenta aproximadamente 20 membros já identificados ²⁶, cuja redundância funcional indica que diferentes membros possuem distinta especificidade por um substrato ou uma classe de substratos ⁶³ e que estas proteínas podem atuar cooperativamente no enovelamento proteico ⁶⁶, ou ainda exercendo papéis opostos no controle de qualidade do RE ⁶⁷.

O papel da PDI na retenção proteica no RE é ainda pouco explorado e no caso da pró-insulina foi sugerido como um efeito “anti-chaperona” ou “unfoldase” da proteína ⁶⁵, análogo, mas claramente distinto da participação da PDI na retro-translocação de proteínas para a degradação pela via ERAD ⁶⁷. Um exemplo deste último ocorre durante o processamento do pró-colágeno-1 no endotélio da córnea, cuja associação e retenção pela PDI no RE são etapas fundamentais para sua posterior degradação ⁶⁸.

Por outro lado, propomos que este efeito pode também se traduzir em uma nova função da PDI equivalente à descrita para *holdases*, que são chaperonas citosólicas que se mantêm unidas às proteínas mantendo-as em um estado competente para o enovelamento quando as condições não são favoráveis. Estas associações evitam assim que interações intra ou intermoleculares improdutivas se estabeleçam e perturbem o correto enovelamento da proteína ⁶⁹. De fato, foi demonstrado que a PDI exerce um efeito de “segurar o lugar” nas cisteínas para a formação de dissulfetos, que é por sua vez precedida e ao mesmo tempo forçada pelo enovelamento da proteína ⁷⁰. Tal efeito poderia ser definido como *holdase de cisteínas*, que

envolveriam a manutenção de cisteínas redox em estado competente para a formação de dissulfetos.

A perda de função da PDI não afetou a secreção da fibrilina-1 mutada (Figura 17A), sugerindo que nas condições normais em que a PDI exerce o controle de qualidade sobre o processamento e secreção da fibrilina-1, a proteína mutada escapa deste controle para ser normalmente secretada. O escape da fibrilina-1 mutada do controle da PDI pode envolver um dos seguintes mecanismos: 1) A estrutura terciária da fibrilina-1 mutada prejudica a interação normal com PDI; 2) Os cinco domínios proteicos perdidos pela mutação da fibrilina-1 configuram um sítio fundamental para a interação com a PDI ou afetam a estrutura de outro sítio de ligação preferencial da PDI; 3) O tamanho reduzido da proteína mutada poderia resultar em um menor tempo de interação com a PDI. Em qualquer caso, nossos resultados sugerem que o escape do controle de qualidade mediado pela PDI contribui para a secreção normal da fibrilina-1 mutada apesar de ser uma proteína mal-enovelada.

Em que medida a manutenção da homeostase do RE e o escape do processamento mediado pela PDI ocorre com outras mutações na SMF é difícil de determinar, tendo em conta o grande número de mutações descritas associadas à doença ¹⁶. Enquanto nossos resultados demonstraram que o estresse do RE não é um requisito para o fenótipo na SMF, não podemos excluir que outras formas mutantes da fibrilina-1 possam induzir perda de homeostase do RE.

De fato, um estudo anterior que avaliou o processamento e secreção de fragmentos recombinantes transfectados da fibrilina-1, indicou que mutações específicas associadas à insuficiência na *N*-glicosilação podem

resultar na retenção da fibrilina-1 no RE ⁷¹. Este achado sugere que a fibrilina-1 mutada poderia ser reconhecida pelo controle de qualidade do RE dependendo de mudanças estruturais específicas. Por outro lado, é importante ressaltar que ambos os fragmentos avaliados neste estudo careciam do pro-peptídeo C-terminal e dos domínios cbEGF41-43, demonstrados recentemente como necessários para a correta secreção da fibrilina-1 ⁷². Assim, o processamento e consequente secreção de fragmentos recombinantes podem ser diferentes da proteína completa.

Embora seja intuitivo assumir que em geral mutações causando a retenção da proteína no RE estariam associadas a uma piora do fenótipo de qualquer doença, isto não é evidente, e em vários casos o fenótipo é dominado apenas pela perda da proteína funcional. Na hipercolesterolemia familiar, por exemplo, o fenótipo é desencadeado pela ausência de receptores de LDL funcionais na superfície celular. Esta por sua vez, pode ser consequência tanto da retenção do receptor mutado no RE quanto da exposição de um receptor incapaz de ligar normalmente ao LDL, o que depende diretamente do tipo específico de mutação ⁷³.

Em outros exemplos, como na fibrose cística ⁷⁴ ou na osteogênese imperfeita ⁷⁵, embora o fenótipo também dependa essencialmente da ausência da proteína funcional, a retenção da proteína mutada no RE promove um ganho de função tóxica, levando a um agravamento do fenótipo da doença. Por outro lado, como no hipotireoidismo congênito, a retenção da proteína mutada no RE e consequente estresse do RE ocorre uniformemente, mas não há nenhuma evidência de que o seu grau determine a gravidade da doença ^{60; 61}.

Assim, não é possível estabelecer uma correlação linear entre mutação proteica, proteínas mal-enoveladas e toxicidade celular.

Em todo caso, nossos dados indicam que a haploinsuficiência ou efeito dominante negativo da fibrilina-1 induzidos por mutação, considerados atualmente como os principais mecanismos fisiopatológicos na SMF ⁶, promovem fenótipo independente de uma toxicidade celular induzida pela proteína mal-enovelada. Por extensão, convergem para o conceito de que a falta de estruturação adequada em quantidade ou qualidade das microfibrilas da matriz extracelular é o defeito mais importante e suficiente para desencadear a doença. Este conceito é ainda mais reforçado pelo desenvolvimento de um fenótipo SMF-*like* em camundongos que apresentam redução na expressão da fibrilina-1 normal ⁷⁶ e também pela correlação inversa demonstrada entre gravidade do fenótipo na SMF e os níveis de expressão da fibrilina-1 ⁴⁶.

In vivo, estresse do RE não é detectado em órgãos de camundongos SMF com 1 ou 3 meses de idade (Figura 19) apesar do estabelecimento de fenótipos definidos (dados não publicados do nosso laboratório). Por outro lado, mostramos que o estresse do RE é detectável na aorta ascendente (Figura 19) concomitante ao agravamento do fenótipo na SMF. Este achado está de acordo com o incremento do volume do RE anteriormente mostrado em VSMCs isoladas da mesma região do modelo animal para SMF, C1039G ⁴³, cuja mutação também mostramos não levar diretamente à indução de estresse do RE (Figura 7B). Em conjunto, estes achados sugerem que há uma perda da homeostase do RE associada à progressão do aneurisma na SMF, de modo

não correlacionado ao esperado de um efeito direto da mutação específica na fibrilina-1.

Várias vias de sinalização intracelular, e não apenas defeitos primários de conformação de proteínas, podem levar a perturbação da homeostase no processamento proteico e UPR ⁴¹. Portanto, o estresse do RE detectado tardiamente associado ao agravamento do aneurisma de aorta em nosso modelo SMF, é provavelmente consequência de outros eventos associados com a progressão do fenótipo nesta região, incluindo inflamação ^{77; 78}, estresse mecânico ^{4; 79} ou mesmo o sugerido aumento da síntese proteica total induzida pela ativação crônica de TGF- β ⁴³.

Em conclusão, nossos resultados indicam que o estresse do RE não está envolvido no desencadeamento da SMF, mas é uma característica da progressão do aneurisma de aorta, principal causa de morbi-mortalidade na doença^{5; 6}. Mais estudos são necessários para entender se o estresse do RE exerce alguma contribuição para a fisiopatologia tardia da doença aórtica na SMF ou é apenas consequência de outros eventos associados a este fenótipo.

6. Conclusões

- As mutações estudadas na fibrilina-1, associadas à SMF, não resultam em alterações estruturais suficientes para o seu reconhecimento pelo controle de qualidade do RE.
- A promoção do fenótipo na SMF não requer toxicidade celular induzida por mal-enovelamento proteico da fibrilina-1 mutada per se.
- A fibrilina-1 selvagem se torna mal enovelada na ausência de PDI levando a um comprometimento na formação das microfibrilas da ECM, não distinguível da fibrilina-1 mutada.
- A fibrilina-1 mutada evade mecanismos de controle de qualidade do enovelamento mediados pela PDI, sendo secretada e capacitando o fenótipo da doença.
- O estresse do RE é uma característica associada ao agravamento do aneurisma aórtico na SMF.

7. Referências

- 1 DIETZ, H. C. et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. **Nature**, v. 352, n. 6333, p. 337-9, Jul 25 1991.
- 2 AMMASH, N. M.; SUNDT, T. M.; CONNOLLY, H. M. Marfan syndrome-diagnosis and management. **Curr Probl Cardiol**, v. 33, n. 1, p. 7-39, Jan 2008.
- 3 JUDGE, D. P.; DIETZ, H. C. Marfan's syndrome. **Lancet**, v. 366, n. 9501, p. 1965-76, Dec 3 2005.
- 4 COOK, J. R. et al. Abnormal muscle mechanosignaling triggers cardiomyopathy in mice with Marfan syndrome. **J Clin Invest**, v. 124, n. 3, p. 1329-39, Mar 3 2014.
- 5 COOK, J. R. et al. Cardiovascular manifestations in Marfan syndrome and related diseases; multiple genes causing similar phenotypes. **Clin Genet**, May 27 2014.
- 6 JUDGE, D. P.; DIETZ, H. C. Therapy of Marfan syndrome. **Annu Rev Med**, v. 59, p. 43-59, 2008.
- 7 ISOGAI, Z. et al. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. **J Biol Chem**, v. 278, n. 4, p. 2750-7, Jan 24 2003.
- 8 CHAUDHRY, S. S. et al. Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. **J Cell Biol**, v. 176, n. 3, p. 355-67, Jan 29 2007.
- 9 NEPTUNE, E. R. et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. **Nat Genet**, v. 33, n. 3, p. 407-11, Mar 2003.
- 10 COLLINS, M. J. et al. Variation in the histopathological features of patients with ascending aortic aneurysms: a study of 111 surgically excised cases. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 4, p. 519-23, Apr 2008.
- 11 MILEWICZ, D. M. et al. Marfan syndrome: defective synthesis, secretion, and extracellular matrix formation of fibrillin by cultured dermal fibroblasts. **J Clin Invest**, v. 89, n. 1, p. 79-86, Jan 1992.
- 12 AOYAMA, T. et al. Missense mutations impair intracellular processing of fibrillin and microfibril assembly in Marfan syndrome. **Hum Mol Genet**, v. 2, n. 12, p. 2135-40, Dec 1993.

- ¹³ SCHRIJVER, I. et al. Cysteine substitutions in epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1: distinct effects on biochemical and clinical phenotypes. **Am J Hum Genet**, v. 65, n. 4, p. 1007-20, Oct 1999.
- ¹⁴ JENSEN, S. A.; ROBERTSON, I. B.; HANDFORD, P. A. Dissecting the fibrillin microfibril: structural insights into organization and function. **Structure**, v. 20, n. 2, p. 215-25, Feb 8 2012.
- ¹⁵ STRYDOM, H. et al. The oxytalan fibre network in the periodontium and its possible mechanical function. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 8, p. 1003-11, Aug 2012.
- ¹⁶ COLLOD-BEROUD, G. et al. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. **Hum Mutat**, v. 22, n. 3, p. 199-208, Sep 2003.
- ¹⁷ LIU, W. et al. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe marfan syndrome. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 10, p. 1581-7, Oct 1996.
- ¹⁸ LONNQVIST, L. et al. A point mutation creating an extra N-glycosylation site in fibrillin-1 results in neonatal Marfan syndrome. **Genomics**, v. 36, n. 3, p. 468-75, Sep 15 1996.
- ¹⁹ RAGHUNATH, M. et al. Carboxy-terminal conversion of profibrillin to fibrillin at a basic site by PACE/furin-like activity required for incorporation in the matrix. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 7), p. 1093-100, Apr 1999.
- ²⁰ CHRISTIS, C.; LUBSEN, N. H.; BRAAKMAN, I. Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. **FEBS J**, v. 275, n. 19, p. 4700-27, Oct 2008.
- ²¹ GLANVILLE, R. W. et al. Calcium binding, hydroxylation, and glycosylation of the precursor epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1, the Marfan gene protein. **J Biol Chem**, v. 269, n. 43, p. 26630-4, Oct 28 1994.
- ²² WALLIS, D. D. et al. Profibrillin-1 maturation by human dermal fibroblasts: proteolytic processing and molecular chaperones. **J Cell Biochem**, v. 90, n. 3, p. 641-52, Oct 15 2003.
- ²³ BRAAKMAN, I.; BULLEID, N. J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. **Annu Rev Biochem**, v. 80, p. 71-99, 2011.
- ²⁴ ARAKI, K.; NAGATA, K. Protein folding and quality control in the ER. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 11, p. a007526, Nov 2011.

- 25 RUTKEVICH, L. A.; WILLIAMS, D. B. Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 2, p. 157-66, Apr 2011.
- 26 LAURINDO, F. R.; PESCATORE, L. A.; FERNANDES DDE, C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 9, p. 1954-69, May 1 2012.
- 27 OKA, O. B.; BULLEID, N. J. Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 11, p. 2425-9, Nov 2013.
- 28 KAUFMAN, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **J Clin Invest**, v. 110, n. 10, p. 1389-98, Nov 2002.
- 29 MAATTANEN, P. et al. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. **Semin Cell Dev Biol**, v. 21, n. 5, p. 500-11, Jul 2010.
- 30 SCHRODER, M.; KAUFMAN, R. J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutat Res**, v. 569, n. 1-2, p. 29-63, Jan 6 2005.
- 31 RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 519-29, Jul 2007.
- 32 SANTOS, C. X. et al. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 10, p. 2409-27, Oct 2009.
- 33 HOSEKI, J.; USHIODA, R.; NAGATA, K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. **J Biochem**, v. 147, n. 1, p. 19-25, Jan 2010.
- 34 TOMKO, R. J., JR.; HOCHSTRASSER, M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. **Annu Rev Biochem**, v. 82, p. 415-45, 2013.
- 35 TRAVERS, K. J. et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. **Cell**, v. 101, n. 3, p. 249-58, Apr 28 2000.
- 36 PEDRUZZI, E. et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 24, p. 10703-17, Dec 2004.

- ³⁷ WU, R. F. et al. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 14, p. 3553-68, Jul 2010.
- ³⁸ AZFER, A. et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 3, p. H1411-20, Sep 2006.
- ³⁹ TABAS, I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. **Circ Res**, v. 107, n. 7, p. 839-50, Oct 1 2010.
- ⁴⁰ HETZ, C. The biological meaning of the UPR. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 7, p. 404, Jul 2013.
- ⁴¹ WANG, S.; KAUFMAN, R. J. The impact of the unfolded protein response on human disease. **J Cell Biol**, v. 197, n. 7, p. 857-67, Jun 25 2012.
- ⁴² NATAATMADJA, M. et al. Angiotensin II Receptor Antagonism Reduces Transforming Growth Factor Beta and Smad Signaling in Thoracic Aortic Aneurysm. **Ochsner J**, v. 13, n. 1, p. 42-8, Spring 2013.
- ⁴³ MCLOUGHLIN, D. et al. Pravastatin reduces Marfan aortic dilation. **Circulation**, v. 124, n. 11 Suppl, p. S168-73, Sep 13 2011.
- ⁴⁴ MASUD, A. et al. Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis. **J Biol Chem**, v. 282, n. 19, p. 14132-9, May 11 2007.
- ⁴⁵ GARFIELD, A. S. Derivation of primary mouse embryonic fibroblast (PMEF) cultures. **Methods Mol Biol**, v. 633, p. 19-27, 2010.
- ⁴⁶ LIMA, B. L. et al. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e14136, 2010.
- ⁴⁷ JUDGE, D. P. et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 172-81, Jul 2004.
- ⁴⁸ ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of

- phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Anal Biochem**, v. 253, n. 2, p. 162-8, Nov 15 1997.
- ⁴⁹ CHEN, F. et al. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. **Front Physiol**, v. 3, p. 412, 2012.
- ⁵⁰ PELLOM, S. T., JR.; SHANKER, A. Development of Proteasome Inhibitors as Therapeutic Drugs. **J Clin Cell Immunol**, v. S5, p. 5, Mar 15 2012.
- ⁵¹ MORAVEC, R. A. et al. Cell-based bioluminescent assays for all three proteasome activities in a homogeneous format. **Anal Biochem**, v. 387, n. 2, p. 294-302, Apr 15 2009.
- ⁵² CRAWFORD, L. J. et al. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132. **Cancer Res**, v. 66, n. 12, p. 6379-86, Jun 15 2006.
- ⁵³ KLAUSNER, R. D.; DONALDSON, J. G.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. **J Cell Biol**, v. 116, n. 5, p. 1071-80, Mar 1992.
- ⁵⁴ TARTAKOFF, A. M. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. **Cell**, v. 32, n. 4, p. 1026-8, Apr 1983.
- ⁵⁵ GIETZ, R. D. et al. Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. **Mol Cell Biochem**, v. 172, n. 1-2, p. 67-79, Jul 1997.
- ⁵⁶ PESCATORE, L. A. et al. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. **J Biol Chem**, v. 287, n. 35, p. 29290-300, Aug 24 2012.
- ⁵⁷ MCLEAN, G. R. et al. A point mutation in the Ch3 domain of human IgG3 inhibits antibody secretion without affecting antigen specificity. **Mol Immunol**, v. 42, n. 9, p. 1111-9, May 2005.
- ⁵⁸ TARTAGLIA, G. G. et al. Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 5, p. 204-6, May 2007.

- 59 DRUMMOND, D. A.; WILKE, C. O. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 10, p. 715-24, Oct 2009.
- 60 KIM, P. S.; KWON, O. Y.; ARVAN, P. An endoplasmic reticulum storage disease causing congenital goiter with hypothyroidism. **J Cell Biol**, v. 133, n. 3, p. 517-27, May 1996.
- 61 MEDEIROS-NETO, G. et al. Congenital hypothyroid goiter with deficient thyroglobulin. Identification of an endoplasmic reticulum storage disease with induction of molecular chaperones. **J Clin Invest**, v. 98, n. 12, p. 2838-44, Dec 15 1996.
- 62 ASHWORTH, J. L. et al. Fibrillin assembly: dimer formation mediated by amino-terminal sequences. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 20), p. 3549-58, Oct 1999.
- 63 HATAHET, F.; RUDDOCK, L. W. Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. **FEBS J**, v. 274, n. 20, p. 5223-34, Oct 2007.
- 64 NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Semin Cell Dev Biol**, v. 10, n. 5, p. 481-93, Oct 1999.
- 65 RAJPAL, G. et al. Action of protein disulfide isomerase on proinsulin exit from endoplasmic reticulum of pancreatic beta-cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 1, p. 43-7, Jan 2 2012.
- 66 SATOH, M. et al. Differential cooperative enzymatic activities of protein disulfide isomerase family in protein folding. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, n. 3, p. 211-20, Autumn 2005.
- 67 FORSTER, M. L. et al. Protein disulfide isomerase-like proteins play opposing roles during retrotranslocation. **J Cell Biol**, v. 173, n. 6, p. 853-9, Jun 19 2006.
- 68 KO, M. K.; KAY, E. P. PDI-mediated ER retention and proteasomal degradation of procollagen I in corneal endothelial cells. **Exp Cell Res**, v. 295, n. 1, p. 25-35, Apr 15 2004.
- 69 WINTER, J.; JAKOB, U. Beyond transcription--new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 39, n. 5-6, p. 297-317, Sep-Dec 2004.
- 70 KOSURI, P. et al. Protein folding drives disulfide formation. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 794-806, Nov 9 2012.

- ⁷¹ WHITEMAN, P.; HANDFORD, P. A. Defective secretion of recombinant fragments of fibrillin-1: implications of protein misfolding for the pathogenesis of Marfan syndrome and related disorders. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 7, p. 727-37, Apr 1 2003.
- ⁷² JENSEN, S. A.; ASPINALL, G.; HANDFORD, P. A. C-terminal propeptide is required for fibrillin-1 secretion and blocks premature assembly through linkage to domains cbEGF41-43. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 28, p. 10155-60, Jul 15 2014.
- ⁷³ HOBBS, H. H. et al. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. **Annu Rev Genet**, v. 24, p. 133-70, 1990.
- ⁷⁴ RUTISHAUSER, J.; SPIESS, M. Endoplasmic reticulum storage diseases. **Swiss Med Wkly**, v. 132, n. 17-18, p. 211-22, May 4 2002.
- ⁷⁵ LAMANDE, S. R. et al. Endoplasmic reticulum-mediated quality control of type I collagen production by cells from osteogenesis imperfecta patients with mutations in the pro alpha 1 (I) chain carboxyl-terminal propeptide which impair subunit assembly. **J Biol Chem**, v. 270, n. 15, p. 8642-9, Apr 14 1995.
- ⁷⁶ PEREIRA, L. et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. **Nat Genet**, v. 17, n. 2, p. 218-22, Oct 1997.
- ⁷⁷ HASNAIN, S. Z. et al. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. **Immunol Cell Biol**, v. 90, n. 3, p. 260-70, Mar 2012.
- ⁷⁸ RADONIC, T. et al. Inflammation aggravates disease severity in Marfan syndrome patients. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32963, 2012.
- ⁷⁹ TOISCHER, K. et al. Mechanical load-dependent cardiac ER stress in vitro and in vivo: effects of preload and afterload. **FEBS Lett**, v. 586, n. 9, p. 1363-9, May 7 2012.