



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Expressão heteróloga e atividade enzimática de QSOX
(Quiescina/ Sulfidril Oxidase) de camundongo, selvagem e
mutada

Nome: Chelin Auswaldt Steclan

Orientador: Prof. Dra. Lia Sumie Nakao

Co-orientadora: Márcia Helena Appel

CURITIBA

20015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Agradeço a minha família, que mesmo longe fez parte de todas as etapas de minha vida, apoiando minhas escolhas e decisões, e proporcionando momentos inesquecíveis que levarei comigo por toda a vida.

Agradeço aos meus orientadores e mestres, pela confiança a mim depositada, pela oportunidade de realização deste trabalho, e pelos preciosos ensinamentos científicos e pessoais a mim repassados.

Agradecimentos

A minha Orientadora Prof. Dra. Lia S. Nakao pela oportunidade da realização deste trabalho, por sua orientação segura, e além de tudo por sua amizade durante todo esse tempo.

A Prof. Dra. Marcia Helena Appel por além da sua co-orientação, mas também por sua companhia, amizade e compreensão.

Ao Prof. Dr. Silvio M. Zanata e a Prof. Dra. Adriana Mercadante pela orientação, ensinamentos, oportunidades e espaço cedido.

Ao Prof. Dr. Silvio S. Veiga por ceder espaço e equipamentos para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Netto da Universidade de São Paulo por seu apoio e incentivo ao projeto.

Ao pessoal do Laboratório de Neurobiologia e do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos pela companhia, pelo auxílio, e pelas construtivas discussões laboratoriais.

Aos meus não só colegas de trabalho, mas também minha segunda família: Alessandra, Axel, Bia, Beth, Luis, Dilza, Giuseppe, Helena, Katya, Marcia, Michele, Monica, Olga, Silvia, pelo carinho, compreensão, companhia e por me deixarem fazer parte de suas vidas!

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A minha família pela compreensão nas horas de ausência, pelo apoio nas horas de cansaço e pelos estímulos nos momentos de indecisão.

A Capes e ao Instituto do Milênio Redoxoma pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1.	LISTA DE ABREVIATURAS	8
2.	RESUMO	10
3.	ABSTRACT.....	11
4.	INTRODUÇÃO.....	12
5.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
6.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
7.	RESULTADOS	37
8.	DISCUSSÃO.....	64
9.	CONCLUSÃO	68
10.	REFERÊNCIAS	69

1. LISTA DE ABREVIATURAS

ALR, do inglês, *Augmenter Liver Regeneration*

bp, pares de base

C, aminoácido cisteína

Cys, do inglês, cisteína

DTNB, do inglês, ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

DTT, ditioneitol

EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK, quinases reguladas por sinais extracelulares

Ero, do inglês, *endoplasmic reticulum oxidoreductin*

Erv, do inglês, *Essencial for Respiration and Viability*

FAD, flavina-adenina dinucleotídeo

FN, fibronectina

GnHCl, hidrocloreto de guanidina

GSH, glutationa reduzida

GSSG, glutationa dissulfeto

HRP, peroxidase de raiz forte

HVA, do inglês, homovanilic acid

IPTG, Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa, Kilo Dalton

K_M , constante de Michaelis-Menten

LB, meio Luria-Bertani

MAP, do inglês, *Mitogen Activated Protein*

MEC, matriz extracelular

NO, óxido nítrico

P4H, prolil 4 hidroxilase

PCR, do inglês, polymerase chain reaction

PDI, proteína dissulfeto isomerase

PBS, salina tamponada com fosfato

QSOX, quiescina/ sulfidril oxidase

ROS, do inglês, reatives oxygen species

S, aminoácido serina

SDS-PAGE, do inglês, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TAE, tampão tris-acetato-EDTA

TBST, tampão salina tamponada com Tris contendo Tween-20

V_0 , velocidade inicial da reação, velocidade 0

BSA, do inglês, bovine serum albumin

2. RESUMO

Dissulfetos são importantes para a estrutura, estabilidade, e regulação de muitas proteínas, entre as quais incluem as proteínas da matriz extracelular (MEC). A flavoproteína quiescina sulfidril oxidase (QSOX) insere pontes dissulfetos em proteínas nascentes, e ditióis com a concomitante redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio. A presença dos três motivos CxxC na estrutura primária de QSOX1 humana é crucial para sua catálise. Este estudo reporta a expressão heteróloga e atividade enzimática de duas proteínas QSOX1 (isoforma curta) de murino, a recombinante selvagem (QSOXm selv) e a recombinante com mutação sítio-dirigida (QSOXm mut. C452S). Através da técnica do MegaPrimer, o mutante C452S, no motivo CxxC proximal – FAD, foi construído a partir da sequência recombinante selvagem. As duas construções foram clonadas no vetor pET32a+ e expressadas em *E. coli* AD494. Após cromatografia de afinidade a metal, as duas proteínas recombinantes foram obtidas. O espectro UV-visível da QSOXm selv e QSOXm mut C452S foram idênticos. A atividade sulfidril (DTT) oxidase da QSOXm selv. foi determinada pelo método HRP/ácido homovanílico, usando 12, 24, 36, 48, 60 e 72 nM da enzima. Os resultados mostraram que, enquanto QSOXm selv. apresentou atividade de $26 \pm 1,2 \text{ nmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, a QSOXm mut. C452S não foi capaz de produzir peróxido de hidrogênio em uma velocidade detectável. Estes dados confirmam que o motivo CxxC proximal - FAD é essencial para a atividade sulfidril oxidase. Utilizando este mesmo método, fibronectina reduzida foi analisada como substrato para QSOXm selv e os resultados obtidos indicam que esta proteína de MEC pode ser oxidada pela QSOX. Em conjunto, estes dados abrem novas perspectivas quanto a possível função da QSOX na montagem final de proteínas extracelulares.

Palavras chave: Quiescina sulfidril oxidase; isoforma curta; tiol proteínas; expressão heteróloga; atividade enzimática; fibronectina.

3. ABSTRACT

Disulfides are important for structure, stability and regulation of several protein, including extracellular matrix (ECM) proteins. The flavoprotein quiescin/sulfhydryl oxidase (QSOX) inserts disulfide bridges into nascent protein and dithiols with reduction of molecular oxygen to hydrogen peroxide. The presence of three CxxC motifs in the primary structure of human QSOX 1 is essential for its catalysis. This study reports the heterologous expression and enzymatic activity of two recombinant murine QSOX1 (short isoform), the wild type (QSOXm selv) and the site-directed mutated (QSOXm mut. C452S) recombinant proteins. Using the megaprimer technique, the C452S mutant, in the FAD-proximal CxxC motif, was constructed from the wild-type recombinant sequence. The two constructs were cloned into pET32a+ vector and expressed in *E. coli* AD494 strain. After metal affinity chromatography, the two recombinant proteins were obtained. The UV-vis spectra of both proteins were identical. The sulfhydryl (DTT) oxidase activity of QSOXm selv was determined by the HRP/homovanillic acid, using 12, 24, 36, 48 60 and 72 nM QSOXm selv. Results showed that while QSOXm selv presented an activity of $26 \pm 1,2$ nmol H₂O₂.min⁻¹.mg⁻¹, QSOXmut C452S was not able to produce hydrogen peroxide at a detectable rate. These data confirm the relevance of the proximal CxxC motif for the sulfhydryl oxidase activity. Using the same method, reduced fibronectin was analyzed as a QSOXm selv substrate and the results obtained indicate that this ECM protein can be oxidized by QSOX. Altogether, these findings open novel perspectives regarding QSOX functions in the final assembly of extracellular proteins.

Keywords: Quiescin/sulfhydryl oxidase; short isoform; thiol proteins; heterologous expression; enzymatic activity; fibronectin.

4. INTRODUÇÃO

Proteínas redox

Entre os diversos mecanismos pelos quais as proteínas podem ter suas funções reguladas, os mecanismos redox são exclusivos de proteínas que possuem resíduos de aminoácidos ou cofatores susceptíveis a oxidação e/ou redução. Entre os aminoácidos mais facilmente oxidáveis, destacam-se a metionina, triptofano, fenilalanina, tirosina e cisteína (CHIARUGI & FIASCHI, 2007; LAHAV et al., 2002). A presença de resíduos de cisteínas em particular, tem especial importância, uma vez que tiol proteínas tem sido cada vez mais consideradas proteínas chaves na sinalização redox (GHEZZI, 2005; CLAVREUL et al., 2006).

A versatilidade das reações redox sobre resíduos de cisteína permitem que tiol proteínas possam ser reguladas de diversas formas. Por exemplo, a S-nitrosação, ou ligação de um grupo NO ao tiolato de resíduos de cisteína já foi considerada um mecanismo de controle de regulação da função protéica, semelhante ao mecanismo de fosforilação/desfosforilação, uma vez que ambas as modificações são reversíveis e as reações nos dois sentidos podem ser catalisadas enzimaticamente (MANNICK & SCHONHOFF, 2004; BENHAR et al., 2008).

De fato, várias tiol proteínas já foram descritas por estarem com função alterada por S-nitrosação. Por exemplo, a S-nitrosação da proteína dissulfeto isomerase (PDI) é um evento que anula a capacidade protetora da PDI em condições neurotóxicas, visto que PDI está envolvida na maturação e transporte de proteínas desdobradas (UEHARA et al., 2006). Muitas outras proteínas sofrem S-nitrosação como processo fisiológico normal da célula, participando de processos chaves como transdução de sinal, reparo do DNA,

controle da pressão sanguínea e neurotransmissão (BROILLET, 1999). Adicionalmente, cisteínas podem ser também oxidadas a ácido sulfênico e outras formas mais oxidadas, estes sulfênicos podem ser reversivelmente reduzidos, propiciando um mecanismo interessante para regulação redox, do tipo “switch on/off”, assim como a S-nitrosação (MANNICK & SCHONHOFF, 2004). Contudo, resíduos de cisteínas podem ser oxidados a dissulfeto por ligações intra-moleculares ou inter-molecular, ou ainda a dissulfetos mistos, no qual o outro componente geralmente é o tripeptídeo glutationa (GSH) (SEVIER & KAISER, 2006).

A glutationilação de proteínas também tem sido considerada um possível mecanismo de controle redox de algumas proteínas, como a subunidade 20S do proteossomo (SILVA et al., 2008). Quanto à formação de dissulfetos, a literatura tem relatado um papel crucial destas pontes na estrutura tridimensional das proteínas. De fato, a exata função de uma proteína é consequência de seu arranjo estrutural, o qual depende, além da estrutura primária e secundária da cadeia polipeptídica, de modificações pós-traducionais, entre os quais estaria à formação de pontes dissulfeto (WEDEMEIER et al., 2000). Apesar disso, os mecanismos de formação de pontes dissulfetos em proteínas nascentes é uma área recém-inaugurada na literatura.

Atualmente, conhecem-se algumas tiol oxidases que participam do dobramento oxidativo no retículo endoplasmático, como *endoplasmic reticulum oxidoreductin 1* (Ero1), *essencial for respiration and viability 2* (Erv2), e *protein disulfide isomerase* (PDI) (JESSO et al., 2004; SEVIER et al., 2006, 2007). Estas proteínas oxidam tiois protéicos a dissulfetos à custa da redução do oxigênio molecular. Além destas, na década de 90, uma nova proteína foi revisitada e pareceu muito importante no processo de dobramento oxidativo, e foi denominada quiescina sulfidril oxidase (QSOX) (HOOBER et al., 1998, 1999).

Sulfidril Oxidases: Quiescina Sulfidril Oxidase (QSOX)

Numerosas proteínas contêm grupos sulfidrilas (SH) devido à presença de um ou mais resíduos de cisteína. Estes grupos podem estar presentes como tióis (-SH), dissulfeto (S-S) ou como uma mistura de dissulfetos ou dissulfeto misto (S-GH) (WEDEMEYER et al., 2000). As sulfidril oxidases são enzimas que participam possivelmente da formação de pontes dissulfetos e dobramento oxidativo de várias proteínas, através da oxidação de grupos sulfidrilas a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (Figura 1) (HECKLER et al., 2008b).



Figura 1: Oxidação de grupos sulfidrilas a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Sulfidril oxidases podem ser classificadas em duas classes, dependente do co-fator utilizado: a) Sulfidril oxidases metalo-dependentes (contêm cobre ou ferro); e b) Sulfidril oxidases dependentes de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (THORPE et al., 2002). Sulfidril oxidases dependentes de FAD utilizam um anel de flavina (adenina dinucleotídeo) como co-fator redox para sua atividade catalítica, porque este pode ser facilmente reduzido por ditióis e oxidado pelo oxigênio molecular.

Um membro da família de proteínas sulfidril oxidases é a quiescina/ sulfidril oxidase (QSOX), a qual utiliza um domínio tiorredoxina e um pequeno domínio ligado à

FAD para oxidar grupos sulfidríla a dissulfeto. Esta proteína possui um domínio N-terminal tiorredoxina (Trx1 e Trx2) e um domínio próximo à região C-terminal Erv/ALR homóloga à Erv1p de leveduras. A proteína de mamíferos possui três motivos CxxC envolvidos nos processos catalíticos: motivo CxxC_{Trx}: aminoácidos 70xx73; motivo CxxC_{Prox}: aminoácidos 449xx452; e motivo CxxC_{Distal}: aminoácidos 509xx512, os quais são típicos das proteínas pertencentes à superfamília das tiorredoxinas e participam de reações redox tiol-dissulfeto (COPPOCK et al., 1998). O domínio Trx2 não possui motivo CxxC, e está localizado antes do terceiro domínio “espaçador” (Figura 2) (HECKLER et al., 2008b; RAJE & THORPE, 2003; THORPE et al., 2002).

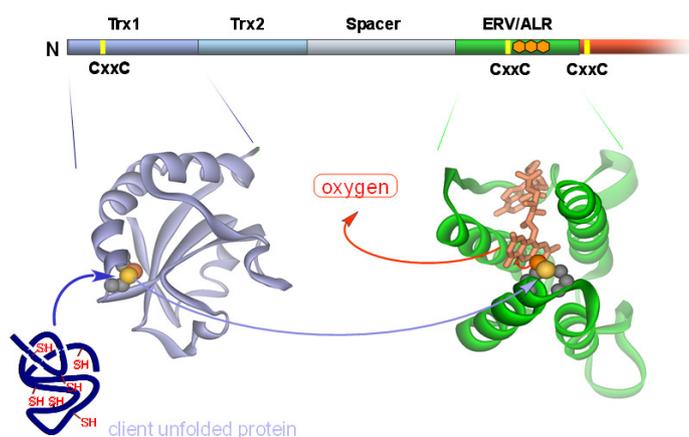


Figura 2: Esquema ilustrativo da catálise pela QSOX, com seus domínios N-terminal e C-terminal, e seus três domínios CxxC. No esquema a proteína cliente reduzida é oxidada pelo domínio Trx1 da QSOX, seguido pela transferência de elétrons para o domínio Erv/ALR com a redução concomitante do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio.

No modelo atualmente aceito para catálise a reação de oxidação pela QSOX ocorre primeiramente com redução do domínio CxxC_{Trx} pela proteína cliente, passando-a

na sequência ao domínio Erv/ALR, no qual a molécula de FAD participa na transferência de elétrons para substratos receptores de elétrons, como o oxigênio molecular e citocromo-c (HECKLER et al., 2008b). O co-fator FAD fica localizado dentro do cone formado pelas α -hélices 1, 2, e 4 no domínio ALR (WU et al., 2003).

O gene *QSOX* é encontrado em um grande número de organismos multicelulares como: organismos unicelulares de vida livre (ex: *Ostreococcus taurii*); protistas patogênicos (ex: *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* e *Cryptosporidium parvum*), mas estão ausentes em leveduras (HECKLER et al., 2008a; THORPE et al., 2002). Em mamíferos são descritas duas formas para enzimas QSOX, QSOX1 (gene *QSCN6*) e QSOX2 (gene *QSOXM*) e descreve-se que essas duas formas são encontradas em todos os vertebrados (COPPOCK & THORPE, 2006).

Recentemente foi descoberto que algumas sulfidril oxidases como as encontradas na clara do ovo de galinha (HOOBER et al., 1996, 1999), fibroblastos de pulmão humano (COPPOCK et al., 1993), trato reprodutivo masculino e fluido de vesículas seminais (OSTROWSKY & KESTLER, 1980; BENAYOUN et al., 2001), epiderme de camundongo (MATSUBA et al., 2002) e no leite de bovinos (JAJE et al., 2007) são todas membros da família de QSOX.

O gene *QSOX1* em humanos, está localizado no cromossomo 1q24, região que resulta da fusão de duas famílias de genes: *tioredoxina* e *Erv1*, durante a evolução dos metazoários (COPPOCK et al., 1998; THORPE et al., 2002). A expressão da QSOX1 em humanos tem sido descrita em: ilhotas de Langerhans; glândula parótida; glândulas apócrinas da pele; células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (COPPOCK & THORPE, 2006). Quando expressada em células de mamíferos em cultura, a versão longa da QSOX1 humana apresenta-se como uma proteína transmembrânica localizada

no aparato de Golgi (CHAKRAVARTHI et al., 2007). Níveis aumentados de *QSOX1* estão relacionados com o processo normal de quiescência celular reversível em cultivo de fibroblastos *in vitro*, sendo que quando estes estão em proliferação seus níveis de *QSOX1* são baixo, porém quando entram em quiescência reversível apresentam indução na expressão do gene *QSOX1* (COPPOCK et al., 1993).

Wittke e colaboradores (2003) descreveram a segunda forma do gene *QSOX* (*QSOXN* ou *QSOX2*). A *QSOX2* foi caracterizada em neuroblastoma humano compreende 12 éxons, está localizada no cromossomo 9q34.3 e é altamente homóloga aos membros da família *QSOX1*. *QSOX2* é predominantemente localizada nas membranas plasmática e nuclear. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou também que a inativação do gene *QSOX2*, confere resistência à apoptose induzida por IFN, e que a indução da expressão de *QSOX2* sensibiliza as células se á apoptose. A maior parte dos tecidos de mamíferos apresenta a proteína *QSOX1* consideravelmente mais abundante que a proteína *QSOX2*. Além disso, *QSOX1* pode sofrer processamento alternativo do RNA mensageiro (RNAm) levando a formação de duas isoformas (COPPOCK & THORPE, 2006) (Figura 3).

FIGURA 3:

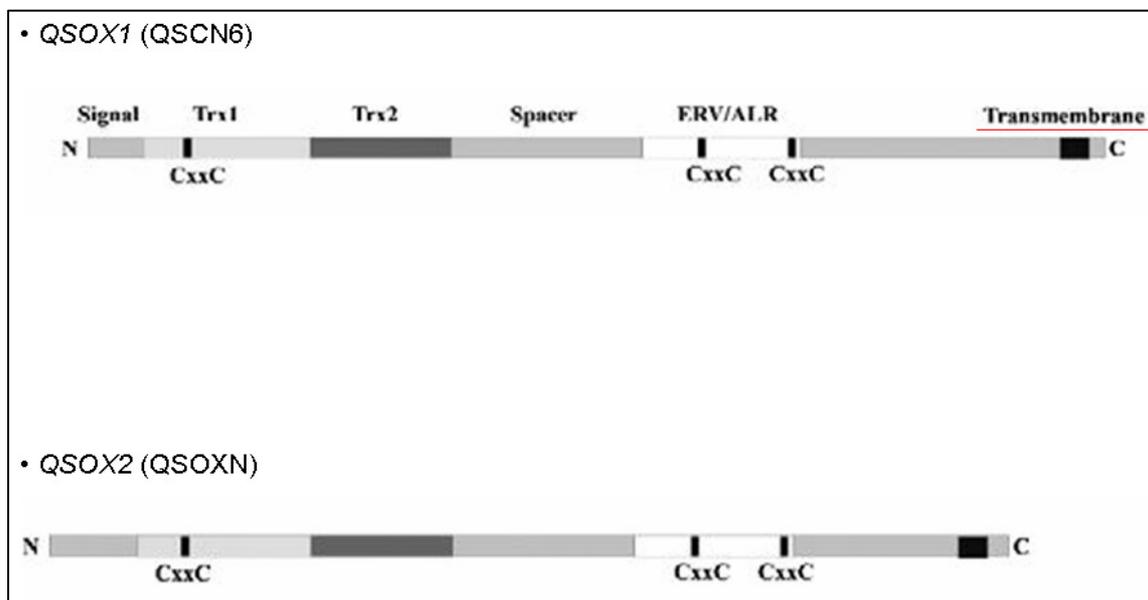


Figura 3: Esquema demonstrando as duas formas de QSOX descritas, QSOX1 e QSOX2. Lembrando a que a proteína QSOX1 sofre processamento alternativo do RNAm gerando duas isoformas da proteína, um transcrito longo e um transcrito curto (Figura adaptada de Coppock & Thorpe (2006)).

A presença de duas isoformas para *QSOX1* em ratos foi demonstrada por Radom e colaboradores (2006). Este grupo descreveu a existência de duas seqüências de cDNA para QSOX em córtex cerebral de rato, sendo um transcrito longo (rQSOX-L) e um transcrito curto (rQSOX-S) que diferem por 851 nucleotídeos devido ao processamento alternativo do RNAm. *A priori*, não há evidências de que os dois produtos da QSOX1 possuam diferença em sua especificidade catalítica intrínseca, pois ambas retêm o mesmo conjunto de domínios catalíticos (HECKLER et al., 2008a). Contudo, entre as duas isoformas da proteína QSOX1 a isoforma curta apresenta maior expressão (OSTROWSKI et al., 1980; COPPOCK et al., 1993; HOOBER et al., 1996).

A isoforma curta da proteína QSOX1 também já foi encontrada na clara do ovo de galinha (HOOBER et al., 1996, 1999) e de outras aves e répteis; em soro fetal bovino (ZANATA et al., 2005); em tecidos derivados da mesoderme e ectoderme de feto murino (PORTES et al., 2008); e no leite de bovinos (JAJE et al., 2007). A sulfidril oxidase de aves é um dímero formado por duas subunidades glicosiladas idênticas com massa molecular de 40 kDa cada, e também realiza seus processos de oxidação com a participação de FAD e uma ponte dissulfeto (HOOBER et al., 1999). A QSOX encontrada no leite de bovinos apresenta forma solúvel e mantém atividade na presença de EDTA, acredita-se que sua solubilidade é devida a ausência do domínio C-terminal transmembrânico (JAJE et al., 2007).

Funções fisiológicas das QSOX

Ainda não se conhecem as funções fisiológicas desta família de proteínas. Estudos recentes evidenciam e sugerem que QSOX participe: a) na elaboração de componentes da matriz extracelular (COPPOCK et al., 1993, 1998, 2000); b) na maturação de poxvírus como fatores de crescimento envolvidos na regeneração de tecidos (THORPE et al., 2002); c) na sensibilização de células de neuroblastoma a estímulos apoptóticos (WITTKKE et al., 2003); d) regulando positivamente e negativamente o processo da apoptose (MOREL et al., 2007); e) como fator de regulação do crescimento e adesão celulares, e no processo de angiogênese (HELLEBREKERS et al., 2007).

Recentemente Magalhães e colaboradores (2008) observaram que a sobrevivência de mosquitos *Anopheles gambiae* silenciados para o gene QSOX e

catalase foi reduzida se comparado ao grupo controle após a ingestão e digestão do sangue. Os autores sugerem que a mortalidade dos mosquitos silenciados seja devido ao comprometimento da habilidade de prevenção contra danos, como estresse oxidativo causado pelo metal derivado do sangue.

O produto secundário gerado pela reação de oxidação de tióis pela QSOX é H_2O_2 , o qual é uma espécie reativa de oxigênio (ROS), estando relacionado a importantes acontecimentos biológicos, participando de maneira benéfica e/ou nociva no contexto celular (VALKO et al., 2007). Atuando benéficamente, H_2O_2 está presente em concentrações de baixa a moderada, onde é capaz de ativar receptores tirosina quinases seguida pela estimulação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase) e fosfolipase C (PLC_γ) as quais ativam vários fatores de transcrição importantes e atuam como parte de um sistema antimicrobica (KAMATA & HIRATA, 1999).

Os substratos já conhecidos de QSOX são tióis com baixo peso molecular, tais como glutathione (GSH), cisteína (Cys) e ditioneitol (DTT) (RANCY & THORPE, 2008; HECKLER et al., 2008a; RAJE et al., 2002). A QSOX de ave catalisa a oxidação de substratos como: peptídeos e substratos protéicos reduzidos, incluindo insulina A e B, lisozima, ovalbumina e RNase (HOOBER et al., 1999). Proteínas secretadas e com massa molecular baixa parecem ser os melhores substratos para QSOX1, tendo valores de K_M típicos de 110 a 330 μM . Já a ovoalbumina, glutathione e β -mercaptoetanol apresentam K_M de 1,7 mM, 20 mM e 50 mM, respectivamente (THORPE et al., 2002). Hooper e colaboradores (1999) também demonstraram que a recuperação eficiente dos padrões dissulfetos nativos em RNase reduzida ocorre somente quando PDI está presente, sugerindo um efeito colaborativo entre estas duas proteínas. Contudo, dados do mesmo grupo recentemente demonstraram que PDI reduzida não é um bom substrato para QSOX recombinante humana (RANCY & THORPE, 2008).

Neste contexto, considerando sua reação catalítica e sua localização intracelular (retículo endoplasmático e aparato de Golgi) e extracelular, sugere-se que tanto QSOX, como o produto da reação de oxidação catalisada por ela, podem estar envolvidos na remodelação dos componentes da matriz extracelular e sinalização celular. Isto deve ocorrer provavelmente pelo favorecimento da formação de pontes dissulfeto em uma mesma proteína ou entre proteínas distintas, já que estas proteínas de matriz necessitam de ligações dissulfeto para o seu apropriado dobramento e estabelecimento de sua função e estrutura (COPPOCK & THORPE, 2006; THORPE et al., 2002). Paralelamente, a expressão de QSOX1 está relacionada a várias proteínas da matriz extracelular (MEC), incluindo subunidade de colágeno, decorina (COPPOCK et al.,1993) e lisil oxidase (HECKLER et al., 2008b).

Matriz Extracelular

A MEC é um conjunto de moléculas como glicoproteínas e proteoglicanos, entre outras, formando um elaborado complexo que fornece suporte mecânico, nutricional e comportamental às células. Este complexo regula eventos biológicos cruciais como a migração, proliferação e diferenciação celular (TANZER, 2006), atuando também na susceptibilidade dos tecidos ao estresse oxidativo durante o envelhecimento e doenças (MORIARTY-CRAIGE & JONES, 2004).

O remodelamento da MEC é realizado de forma contínua por várias enzimas que catalisam a degradação, o rearranjo e a concentração de diferentes moléculas, sendo estas responsáveis pela ampla diversidade de formas de MEC encontradas em diferentes tecidos (VAKONAKIS & CAMPBELL, 2007). A complexa trama de moléculas arranjadas na

MEC propicia a adesão celular e o desenvolvimento dos tecidos, os quais estão intimamente relacionados às vias de comunicação entre superfícies celulares e a MEC. Por exemplo, o reconhecimento de moléculas da MEC por integrinas, resultando numa interação específica e possibilitando a formação de interações distintas entre célula - MEC (TANZER, 2006).

No contexto redox, a maioria das proteínas da MEC ou extracelulares é altamente rica em pontes dissulfeto, tais como fibronectina, vitronectina, laminina, proteínas de fibras elásticas, fibrilina, e microfibrilas (TANZER, 2006). Além disso, várias proteínas de superfície celular são reguladas pelo equilíbrio tiol-dissulfeto e este estado parece ser controlado por proteínas do ambiente extracelular (SAHAF et al., 2005). Winter e colaboradores (2007) demonstraram que *Caenorhabditis elegans* mutantes para proteína PDI-2 são incapazes de regular com eficácia a biogênese de colágeno e realizar o correto arranjo da MEC. Isto de fato era esperado já que PDI-2 é requerida para o normal funcionamento da enzima prolil 4-hidroxilase (P4H).

Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína adesiva de alta massa molecular, heterodimérica e composta por três diferentes domínios (FNI, FNII, e FNIII). A FN pode reconhecer e interagir com outras moléculas de matriz como fibrina, heparina, colágeno, integrina e outras de superfície celular. FN é encontrada na matriz de tecidos conjuntivos e em forma solúvel no plasma e em outros fluidos corporais de vertebrados (VAKONAKIS & CAMPBELL, 2007).

A forma solúvel da FN, encontrada no plasma (pFN), é secretada por hepatócitos diretamente na circulação, apresenta estrutura de um dímero ligado por duas pontes dissulfeto inter-cadeias localizadas na região C-terminal da molécula. Cada subunidade da molécula possui massa molecular de aproximadamente 235-270 kDa, com 28 pontes dissulfeto intra-cadeia e dois grupos sulfidril livres. A FN celular (cFN) é encontrada na MEC de tecidos na forma multimérica, interagindo com moléculas como colágeno e proteoglicanos de heparan sulfato formando uma plataforma de MEC sobre a qual as células residem (TANZER, 2006; VARTIO & KUSSELA, 1991).

O gene da FN também sofre processamento alternativo do RNAm, o qual afeta alternativamente seus dois domínios extras, domínio extra A (DEA) e domínio extra B (DEB) levando a propriedades distintas e variação na função, o que explica a ocorrência de 20 isoformas diferentes de FN em humanos (WHITE et al., 2008). Langenbach & Sottiles (1998) descreveram que FN possui sua própria atividade dissulfeto isomerase catalisada por seus motivos domínios CxxC. Isto está parcialmente de acordo com os dados de Vartio & Kussela (1991), os quais relatam que a dimerização e formação de pontes dissulfetos intra-cadeia da FN podem ocorrer espontaneamente. Entretanto, a completa formação de pontes dissulfeto e uma exata conformação estrutural necessitam de outros fatores coadjuvantes encontrados apenas no meio extracelular.

Várias técnicas de biologia molecular têm proporcionado grandes avanços e descobertas envolvendo moléculas da MEC, revelando a extrema importância de uma matriz íntegra e funcional. O que é confirmado por Castelletti e colaboradores (2008), os quais demonstram que mutações no gene da FN resultam em alguns tipos de glomerulopatias.

Com base no que foi exposto e no fato de que a isoforma curta da QSOX1 foi primeiramente identificada em cultivo de fibroblastos humanos em quiescência, propõe-se e se reforça a hipótese de que QSOX1 isoforma curta possa estar atuando como catalisadora oxidativa para a elaboração e arranjo das moléculas de MEC que não estejam apropriadamente estruturadas. Sabendo que a FN tem tido grande importância no meio científico por estar sendo alvo de intervenção em vários tipos de câncer (KASPAR et al., 2006), e que esta molécula necessita da presença de duas pontes dissulfeto unindo suas duas subunidades e que suas 28 pontes dissulfeto intrínsecas estejam oxidadas (VAKONAKIS & CAMPBELL, 2007), supõe-se então que a FN possa ser substrato para enzimas tio oxidases, mais especificamente a QSOX.

5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O processo pelo qual a proteína QSOX de humano e de aves realiza a oxidação de grupos tióis ainda não está completamente esclarecido, embora tenha sido amplamente explorado (HOOBER et al., 1996, 1999; THORPE et al., 2002; CHAKRAVARTHI et al., 2007; HECKLER et al., 2008a, e 2008b; RANCY & THORPE, 2008). Como já demonstrado por Heckler e colaboradores (2008a), através da expressão de QSOX recombinantes de humano mutante, um dos três motivos CxxC (C509-C512) é dispensável para a oxidação de substratos como RNase reduzida e ditiotreitol (DTT). Contudo, ainda não foram demonstrados dados sobre a presença de QSOX1 e sua caracterização enzimática em modelos animais.

Sabendo-se disso e que a isoforma curta de QSOX1 de mamífero é uma enzima que: (i) catalisa a formação de pontes dissulfeto (HECKLER et al., 2008), assim como a de aves (HOOBER et al., 1996); (ii) é secretada para o meio extracelular (THORPE & COPPOCK, 2006); (iii) cuja expressão está intimamente relacionada à expressão de várias proteínas da MEC, incluindo várias subunidade de colágeno, decorina (COPPOCK et al., 1993), e lisil oxidase (HECKLER et al., 2008b), propõe-se que QSOX seja um dos fatores que atuem possivelmente promovendo a formação/manutenção da matriz extracelular (COPPOCK et al., 2000, 2006). Nosso objetivo geral foi realizar a expressão heteróloga da proteína QSOX1 isoforma curta de murino (com e sem atividade sulfidril oxidase), a qual possibilita a utilização deste animal modelo como ferramenta de estudo. E através disso avaliar se FN, uma proteína da MEC, rica em pontes dissulfeto, seria substrato desta enzima quando suas pontes de dissulfeto estivessem reduzidas.

Objetivos específicos

- Expressão e purificação da proteína QSOX recombinante de murina (QSOXm) selvagem;
- Clonagem do gene de QSOX recombinante murina mutante C452S (QSOXm C452S);
- Expressão e purificação da QSOXm C452S;
- Caracterização da atividade enzimática das enzimas recombinantes selvagem e mutada;
- Avaliação da possibilidade da proteína de MEC fibronectina ser oxidada pela QSOXm recombinante;

6. MATERIAIS E MÉTODOS

As cepas bacterianas (BL21 (DE3) C41 e C43, AD494 e Origami) (*Novagen*) foram doadas pelo Prof. Dr. Luis Eduardo S. Netto (Instituto de Biologia, USP, São Paulo). O vetor pET32a+ (*Novagen*) cedido pela Dra. Anamaria Camargo (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo).

QSOX recombinante murina selvagem (QSOXm selv.)

1.1 - Construção e clonagem: A construção do plasmídeo recombinante para expressão da *QSOXm selv.* já havia sido realizada por nosso grupo de pesquisa (PORTES et al., 2008). Tal construção foi feita através da subclonagem de um fragmento de 1533 pares de bases (nt + 215 a + 1747, NM 023268) correspondente a maior parte da região codificadora da proteína. Este fragmento foi ligado ao vetor pET-32^a+ que possui o promotor do fago T7, repressão em *cis*, resistência ao antibiótico ampicilina e origina proteínas fusionadas a uma sequência de 6 histidinas na região C-terminal. Com a construção do plasmídeo *pET32a+/QSOXm selv* já concluída, os experimentos partiram da etapa de padronização da expressão e purificação da proteína recombinante ativa.

1.2 – Transformação das bactérias: Foram realizadas transformações de quatro cepas de bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes (BL21 (DE3) C41 e C43, AD494 e Origami) com o *pET32a+/QSOXm selv.*, seguindo o protocolo e recomendações do *pET System Manual – 11th Edition* (Novagen). Resumidamente, as bactérias foram

eletroporadas (2,5 kvolts) com 1 ng plasmídeo, em eletroporador Gene Pulser X-Cell (BioRad). Em seguida, foram incubadas a 37° C, em meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 0,2 M), a 100 rotações por minuto (rpm) por 1h (período de recuperação). Após este período os cultivos foram plaqueados em meio sólido LB Agar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, Agar-ágar 15 g/L) contendo os antibióticos pertinentes por 16 horas a 37° C. Após isto, 1 colônia de cada placa foi selecionada para o preparo do pré-inóculo. As características de cada cepa são: *cepa C41* possui um mecanismo de prevenção de morte celular associada com superexpressão de proteínas recombinantes tóxicas (não apresenta resistência a antibiótico); *cepa C43* possui efetiva expressão de proteínas de membrana além de proteínas tóxicas (não apresenta resistência a antibiótico); *cepa AD494* (proveniente de uma mutação da cepa K12) possui maior expressão de *tiorredoxina redutase* (TrxB), a qual favorece a formação de pontes dissulfeto no citoplasma, permitindo a produção de proteínas corretamente dobradas e ativas (apresenta resistência ao antibiótico canamicina [15 µg/ml]); *cepa Origami* (também derivada de mutações da cepa K12) possui mutações em ambos os genes para *tiorredoxina redutase* (TrxB) e *glutathione redutase*, os quais determinam um ambiente citoplasmático menos redutor (apresenta resistência ao antibiótico canamicina [15 µg/ml] e tetraciclina [12,5 µg/ml]).

1.3 - Expressão: Dentre as cepas de *E. coli* positivas para a transformação, as colônias isoladas foram pré-inoculadas em 10 ml de meio LB+antibióticos e incubadas por 16 horas (durante a noite) a 37°C e sob agitação de 200 rpm. Das culturas crescidas, 5 ml do meio saturado foram inoculados em 500ml de meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) +antibióticos e então foram novamente incubadas nas

mesmas condições anteriores, até atingirem densidade ótica (D.O.) de 0,4 – 0,6 em 550 nm. Atingida esta D.O., a expressão protéica foi induzida por 0,1 mM de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 16 horas a 20° C e sob agitação de 200 rpm.

1.4 - Obtenção do extrato bacteriano: Após a indução, cada cultura de bactérias foi sedimentada por centrifugação a 4.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com 40 ml de água deionizada gelada. O *pellet* obtido após lavagem foi ressuspensso em 40 ml de tampão de lise nativa (NaH₂PO₄ [50 mM], NaCl [500 mM], Imidazol [10 mM], pH 8,0) e armazenado por 16 horas a -80°C para facilitar a lise bacteriana. Após esta etapa, a suspensão bacteriana foi descongelada e as bactérias foram lisadas por aplicação de alta pressão mecânica fornecida pela prensa de French (French Press). O extrato bacteriano obtido foi submetido à centrifugação (9.000 x g por 30 minutos) e o sobrenadante foi coletado. Todo o procedimento foi realizado a 4° C.

1.5 - Purificação: Devido à presença da etiqueta de 6 histidinas nas proteínas recombinantes expressas, utilizou-se o método de purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado. Os sobrenadantes clarificados que foram recuperados dos extratos bacterianos (aproximadamente 30 ml) foram individualmente incubados sob agitação com 1 ml de resina de agarose Ni⁺²-NTA (Quiagen) pré-equilibrada com tampão de lise nativa por 1 hora a 4°C. Após este período de incubação, a mistura (extrato + resina) foi transferida para uma coluna (Bio-Rad) para subsequente empacotamento da resina. A resina empacotada foi então submetida à lavagem com 40 ml de tampão de

lavagem (NaH_2PO_4 [50 mM], NaCl [500 mM], imidazol [20 mM], pH 8,0) com a finalidade de diminuir a presença de contaminantes pelo aumento da competição do imidazol pela resina, permanecendo ligadas à coluna apenas proteínas que tenham alta afinidade pelo níquel. A proteína QSOX recombinante foi eluída com tampão de eluição (NaH_2PO_4 [50 mM], NaCl [500 mM], imidazol [250 mM], pH 8,0) por meio da coleta de alíquotas de 2 ml (aproximadamente 10 alíquotas). A presença de proteína foi observada pela coloração amarelada do eluato e determinada através de leitura em 280 nm. Alíquotas de 10 μl de cada fase da purificação (*pellet* do lisado; sobrenadante da ligação com a resina (Void); lavado; e eluato) foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE 10%) com corrente de 30 mA.

QSOX recombinante mouse mutada (QSOXm mut. C452S)

2.1 - Técnica do MegaPrimer. Esta técnica baseia-se na obtenção e clonagem de um fragmento de cDNA contendo uma mutação pontual, cuja tradução fornece a substituição de um aminoácido por outro (LING & ROBNSON, 1997). Para isso, foi realizado o desenho de um iniciador no motivo $\text{CxxC}_{\text{Prox}}$, contendo uma substituição (mutação) do nucleotídeo no códon correspondente ao aminoácido cisteína 452 (C452). A substituição permitiu a troca de uma timina (*t*) (códon UGU) por uma adenina (*A*) (códon AGU), fazendo assim a conversão de um aminoácido cisteína (C) para um aminoácido serina (S). Através da obtenção do seguinte iniciador: *Mut 452 forward*, 5'-CTTCTTTGGCAGTCGTGACTGTGC – 3'. Este iniciador foi utilizado juntamente com o iniciador reverso da clonagem 5' – CCCAAGCTTTC AAGAAGAGTCTATGACGAT – 3' (PORTES et al., 2008) em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a obtenção do fragmento chamado de megaprimer a partir do molde pET32a+/QSOXm selv. Nesta

reação de PCR foram usados 2 µg do pET32a+/QSOXm selv. como molde, nas mesmas condições descritas por Sambrook e Russel (2001). Os ciclos de temperatura utilizados foram: ciclo 1, 95° C por 2 min; ciclo 2 (35 vezes), 95° C por 30 seg, 62° C por 30 seg e 72° C por 2 min; ciclo 3, 72° C por 5 min. O produto obtido (com 304 pb) foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1%, por 50 minutos sob corrente constante de 70 volts (V), com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). O gel foi exposto à coloração em brometo de etídeo possibilitando a visualização das bandas para posterior extração. O produto contido na banda do gel correspondente ao megaprimer foi purificado com o Kit Perfect Prep Gel – CleanUp (Eppendorf), seguindo recomendações do fabricante, e a concentração determinada em NanoDrop ND-1000 para dupla fita de DNA (DNA-50). Esta sequência foi denominada MegaPrimer 452 reverso.

2.2 - Obtenção da sequência mutada: Para a obtenção da sequência de 1533 bp QSOXm mutada no motivo CxxC_{Prox} (C452S) foi realizada PCR com os iniciadores *MegaPrimer 452 reverso* e *QSOXm forward* nas mesmas condições anteriormente descritas (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), com os seguintes ciclos de temperatura: ciclo 1, 95° C por 2 min; ciclo 2 (35 vezes), 95° C por 30 seg, 62° C por 30 seg, e 72° C por 3 min; ciclo 3, 72° C por 5 min. O produto desta PCR também foi isolado, purificado e dosado como descrito anteriormente no item 2.1.

2.3 - Digestão do vetor e inserto: O vetor pET32a+ (Novagen) e o inserto mutado foram ambos submetidos à dupla digestão com as enzimas de restrição: *Kpn I* e *Hind III* seguindo recomendações para dupla digestão do *pET System Manual – 11th Edition*

(Novagen). Resumidamente, 1 µg do vetor e 1 µg do inserto foram incubados separadamente com 1 U de *Kpn I* e 3 U *HindIII* (Fermentas) em volume final de 30 µL. Os produtos de ambas as digestões foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1% por 50 minutos sob corrente constante de 70 V, com tampão TAE. Como controle positivo, o vetor pET32a+/QSOXm selv foi utilizado para confirmar a atividade das enzimas (dado não mostrado). As bandas correspondentes foram purificadas e a concentração dosada como descrito no item 2.1.

2.4 - Ligação: A reação de ligação do inserto *QSOXm C452S* no vetor *pET 32a+* foi realizada seguindo protocolo estabelecido no *pET System Manuall – 11th Edition* (Novagen). Para isso, 1 pmol do vetor e 10 pmol do inserto foram incubados a 16° C por 16 horas com 2,4 U T4 DNA ligase (New England Biolabs) num volume final de 10 µL, obtendo-se assim o seguinte vetor de expressão: *pET32a/mQSOX C452S*. O produto da ligação foi dialisado em membrana de nitrocelulose sobre água MilliQ por 1 h para remoção dos sais.

2.5 - Transformação e clonagem: Cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α (Novagen) eletrocompetentes foram transformadas pelo vetor *pET32a+/mQSOX C452S* (seguindo recomendações *pET System Manuall – 11th Edition*). Foram escolhidas 15 colônias para presença do vetor de interesse para realização de três PCR de colônia. As condições das PCR foram iguais às descritas no item 2.2, utilizando-se como molde as colônias transformadas. Na primeira PCR de colônia (para inicial rastreamento das colônias positivas) utilizou-se os iniciadores *QSOXm forward* e *QSOXm reverso*, nas

outras duas PCR foram utilizados os iniciadores *T7 Promoter* e *QSOXm reverso*, e os iniciadores *T7 Terminator* e *QSOXm forward*, buscando confirmar a presença e integridade do inserto ligado ao vetor. Dentre as 15 colônias positivas para a primeira PCR de colônia (rastreamento), apenas duas apresentaram resultados positivos para as outras duas reações de PCR. Em ambas as reações de PCR foi utilizado um controle positivo no qual o molde era pET32a+/QSOXm, e um controle negativo que resumia-se na ausência de molde. As colônias positivas para a transformação com pET32a+/QSOXm mut C452S foram então submetidas à técnica de minipreparação com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) para obtenção do plasmídeo purificado.

2.6 - Miniexpressão: Foi realizada mini-expressão para identificar as colônias com maior eficiência para expressão protéica. Os dois vetores correspondentes às colônias positivas para PCR de colônia (item 2.5) foram empregados para transformar cepas de *E. coli* AD494. Dentre as colônias provenientes da transformação, 4 colônias de cada clone foram separadamente pré-inoculadas em 2 ml de meio LB + antibióticos, crescidas por 16 horas a 20^o C sob agitação de 200 rpm. Um ml do meio saturado (de cada pré-inóculo) foi inoculado em 10 ml de meio LB + antibióticos e crescido nas mesmas condições anteriores até atingirem D.O. entre 0,4 – 0,6. A seguir, os meios foram induzidos com 0,1 mM de IPTG e incubados por 4 horas sob as mesmas condições. Alíquotas do meio não induzido (tempo = 0) e após 4 horas de indução (tempo = 4) foram coletadas para análise de expressão por corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE (30 mA).

2.7 - Expressão, obtenção do extrato bacteriano, e purificação: O clone com a maior taxa de expressão foi escolhido para expressão da proteína recombinante mutada. Os procedimentos de indução da expressão proteica, obtenção do extrato bacteriano e purificação da proteína seguiram de acordo com os itens 1.3, 1.4 e 1.5.

2.8 - Caracterização espectrofotométrica: para a realização do espectro UV visível das proteínas purificadas, estas foram dialisadas e diluídas em PBS na concentração de 48 nM. A varredura de espectro foi realizada no espectrofluorímetro Tecan i-control (Infinite M-200) na faixa de 280-600 nm.

2.9 – Sequenciamento: reações de seqüenciamento automático foram realizada para ambos os vetores pET32a+/QSOXm selv. e mut C452S. Foi utilizado o Kit ABL Prism™ Big Dye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction (PerkinElmer) conforme instruções do fabricante, e o processamento das mesmas foi realizado no seqüenciador automático ABL Prism 377 DNA Sequencer (PerkinElmer).

Caracterização das enzimas recombinantes

3.1 – Determinação da concentração proteica: A concentração das proteínas recombinantes QSOXm selv. e QSOXm mut. C452S foi determinada fotometricamente em 456 nm, utilizando-se do coeficiente de extinção ($\epsilon_{456} = 12,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (HECKLER et al., 2008). A fibronectina, purificada de plasma humano, foi dosada de acordo com Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.2 – *Western Blot*: dez microgramas de cada proteína recombinante (selvagem e mutada) foram separados por corrida eletroforética SDS-PAGE (10%), transferidas e imobilizadas sobre membrana de nitrocelulose (0,45 µm – Amersham Biosciences, USA) durante 16 horas sob voltagem constante de 25 V, A membrana foi bloqueada com TBST (129 mM NaCl, 20 mM Tris e 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) por duas horas. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo comercial produzido em cabra, anti-peptídeo 14 (Bethyl) (HOOBER et al., 1999), em tampão de bloqueio (1:1000), durante a noite, a 4º C. Após este tempo, a membrana foi lavada cinco vezes por 5 min com TBST e em seguida, foi adicionado anticorpo secundário anti-Ig cabra HRP (conjugado a peroxidase) em tampão de bloqueio (1:200) durante uma hora à temperatura ambiente. A membrana foi submetida a um novo ciclo de lavagem apenas com TBST, e então foi incubada com substrato para a reação quimioluminescente (Amersham Pharmacia) por 5 min. A membrana foi exposta a um filme de auto-radiograma (Kodak) para a visualização adequada do antígeno.

3.3 - *Ensaio de redução da FN*: Em 2 ml de reação, 100 µg de FN foi reduzida na presença de: DTT [1 mM] (30x excesso sobre tióis da FN) em tampão Tris-HCl [100 mM] pH 8,0; contendo EDTA [0,3 mM]; e GnHCl [6M]. Após 5 horas de incubação a 37º C no escuro, a proteína foi gel-filtrada em uma coluna PD-10 pré-equilibrada com solução de ácido acético (0,1%) sob baixa tensão de oxigênio. Onze frações (500 µl cada) foram coletadas e a concentração protéica determinada em 280 nm. A concentração de tióis livres foi determinada pela reação de Ellman (BENAYOUN et al., 2001), usando DTNB [5 mM].

3.4 – Atividade enzimática das proteínas recombinantes: A atividade sulfidril oxidase da QSOXm selv. e QSOXm mut. C452S foi determinada pelo método do ácido homovanílico/peroxidase de raiz forte (HVA/HRP) (RAJE, 2002), usando DTT [25 μ M a 250 μ M] e GSH [50 mM a 500 mM] como substratos já conhecidos, e fibronectina reduzida como substrato hipotético. Uma curva padrão com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 μ M) foi feita a cada ensaio. A fluorescência da reação foi monitorada pelo fluorímetro Tecan i-control M-200, utilizando os seguintes parâmetros: λ emissão = 420 nm, λ excitação = 320 nm.

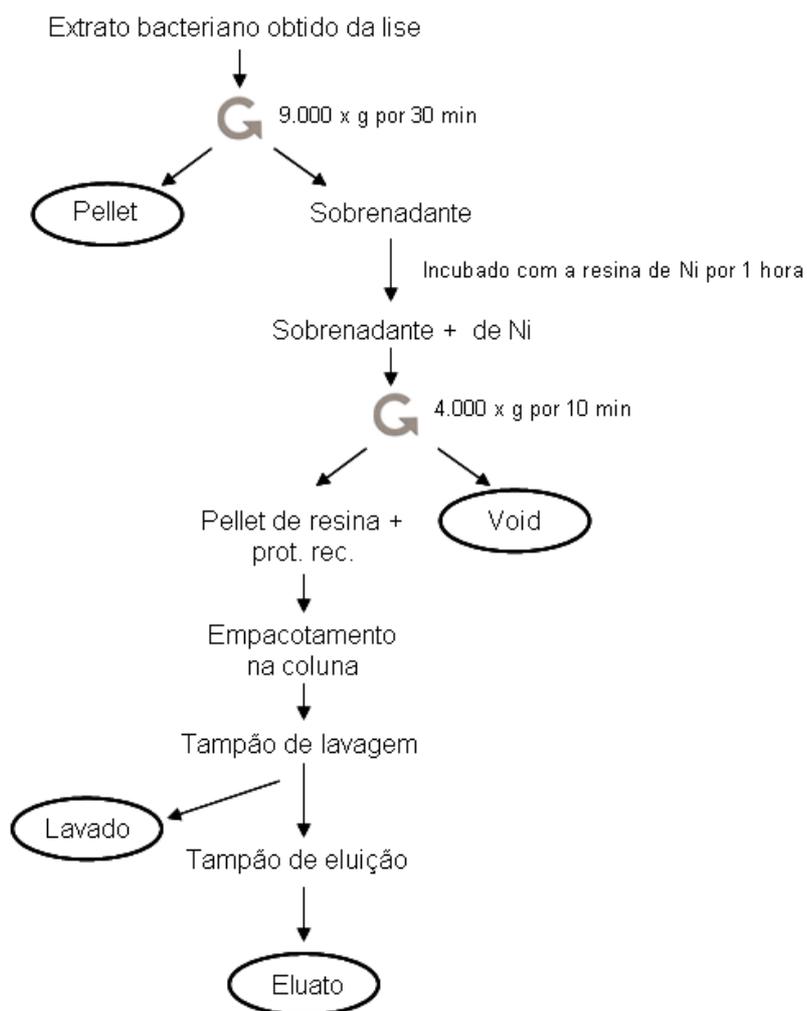
3.5 - Tratamento matemático dos dados cinéticos: Os valores de velocidade inicial (V_0) foram obtidos dos gráficos de fluorescência do produto x tempo na sua porção linear, para cada condição experimental. Os valores de fluorescências foram convertidos em valores de concentração de peróxido de hidrogênio através da curva de calibração com peróxido de hidrogênio autêntico.

7. RESULTADOS

Expressão e purificação da proteína QSOXm selvagem

Após ser realizada mini-expressão da proteína *QSOXm selvagem* nas quatro cepas bacterianas diferentes (BL21 C41 e C43, AD494, e Origami) alíquotas das etapas da purificação foram coletadas para análise do perfil de expressão de cada cepa (Fluxograma), através da qual pode ser constatada divergência entre os resultados obtidos para cada uma delas. As cepas C43, Origami e AD494 foram positivas para expressão da proteína solúvel. Dentre estas, a cepa C43 apresentou menor rendimento (Figura 5) e ausência da proteína na sua forma insolúvel (Figura 4C). Já a cepa C41 demonstrou completa ausência de expressão da proteína na forma solúvel (Figura 5), podendo ser observada apenas a forma insolúvel no *pellet*, possivelmente em corpos de inclusão (Figura 4A).

Fluxograma:



Fluxograma: Etapas do procedimento de purificação das proteínas recombinantes, onde os círculos indicam as fases coletadas que foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE (10%).

FIGURA 4

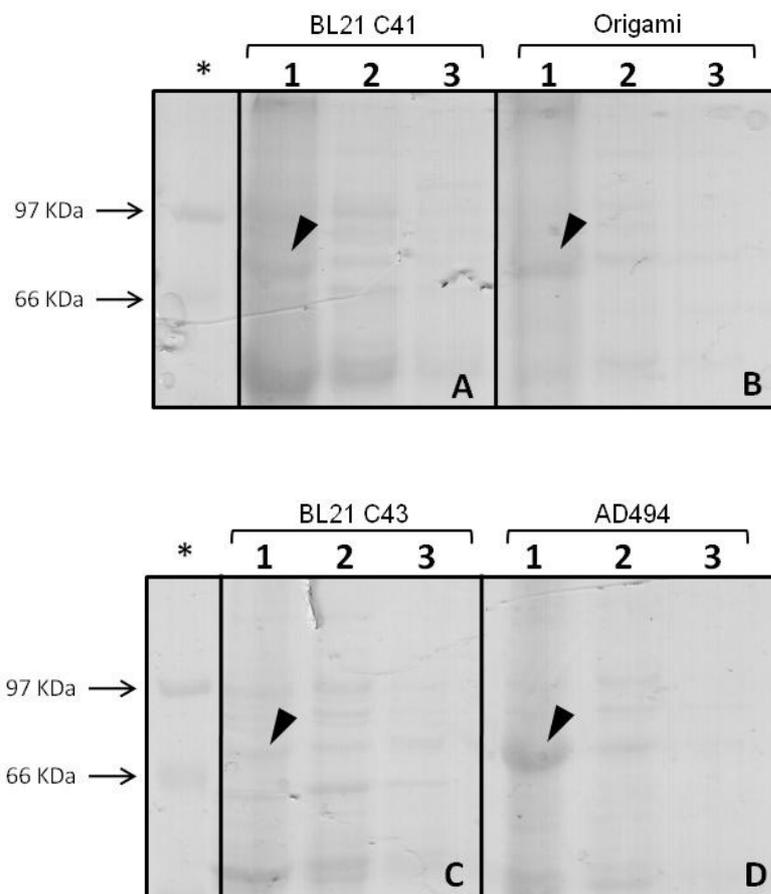


Figura 4: Perfil das etapas de purificação das mini-expressões da QSOXm selvagem, quando submetidas a corrida eletroforética em gel de acrilamida SDS-PAGE. Asterisco (*), marcador de massa. Quadro A, BL 21 C41; Quadro B, Origami; Quadro C, BL 21 C43; Quadro D, AD494. Canaletas: 1, pellet; 2, void; e 3, lavado. Cabeças de seta indicando a presença (quadros A, B e D) ou ausência (quadro C) da proteína em corpos de inclusão.

O perfil do *void* e lavado (produto coletado da lavagem) derivados da expressão com as cepas C41 e C43 foram equivalentemente semelhantes, onde foi possível observar a ocorrência de indução de outras proteínas além da proteína de interesse (Figura 4A e 4B). Já quando analisado o perfil do *void* e lavado das cepas Origami e

AD494, notou-se menor contaminação e praticamente somente a indução da proteína de interesse (Figura 4B e 4D).

FIGURA 5

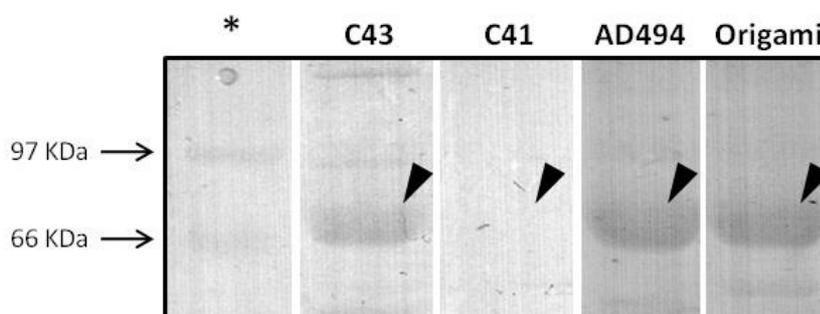


Figura 5: Perfil dos eluatos da mini-expressão da proteína QSOXm selv. pelas cepas C41, C43, Origami e AD494. Volume de 20µl dos eluatos da coluna de Ni-agarose foram submetidos à separação eletroforética por SDS-PAGE 10% de acrilamida. Asterisco (*), marcador de massa. Cabeças de seta indicando a presença da proteína recombinante (aproximadamente 69 KDa).

Através dos resultados obtidos, constatamos que o sistema de expressão heteróloga na cepa bacteriana *E. coli* AD494 e Origami detinham a melhor capacidade de expressar nossa proteína recombinante. Estes sistemas viabilizariam a obtenção da proteína solúvel, com menor número de contaminantes. Contudo, optamos pela cepa AD494 como melhor sistema heterólogo para o prosseguimento do nosso trabalho devido ao fato desta cepa possuir alta capacidade de expressão protéica na forma solúvel, que está relacionada à sua deficiência na expressão da enzima *Tiorredoxina redutase*,

favorecendo ao rearranjo protéico por um ambiente celular menos redutor (DERMAN et al., 1993), e também devido esta apresentar taxa de crescimento mais rápido se comparada a cepa Origami, diminuindo assim o tempo para obtenção da QSOXm selvagem e mutada.

Clonagem do gene de QSOX recombinante mouse mutante para o motivo CxxC_{prox} (QSOXm mut. C452S).

Para realização da mutação sítio dirigida foi escolhida a técnica do MegaPrimer (LING & ROBNSON, 1997). Como demonstrado na figura 6, a mutação foi obtida através de uma reação de PCR com os iniciadores *QSOXm reverso* (para a região terminal da sequência) e *Mut 452 forward*, sendo que este último possuía a substituição da base timina pela base adenina correspondente ao aminoácido 452, fazendo com isso a conversão do aminoácido de cisteína para serina. O produto desta reação de PCR foi purificado e denominado *MegaPrimer 452 reverso*.

Figura 6

```

QSOXm_murino      TACTCGTCCTCTGACCCGCTGACGCTGCTGGATGCTGATTTCGGTGCCTCC  50
Inic_Mut_452_Foward -----
Inic_QSOXm_Reverso -----

QSOXm_murino      CACTGTGCTCGGCTCCAGCAGCGCCTGGGCGGTGGAGTTCCTTCGCCTCCT  100
Inic_Mut_452_Foward -----
Inic_QSOXm_Reverso -----

.....

QSOXm_murino      CTCCAAGCCATGAGGAGCTAIGTTCAGTTCCTTCCTTTGGCTGTCGTGACTG  1250
Inic_Mut_452_Foward -----CTTCCTTTGGCAGTCGTGACTG  21
Inic_QSOXm_Reverso -----
                        *****

QSOXm_murino      TCGGACCATTITGAGCAGATGGCTGCAGCGTCCATGCACCAAGTGAGAA  1300
Inic_Mut_452_Foward TGC-----  24
Inic_QSOXm_Reverso -----
                        ***

.....

QSOXm_murino      AGGTGCCTTTGTGGACCTTGGTGCCACCCTCAACTTCTCAAGGCTCAC  1500
Inic_Mut_452_Foward -----
Inic_QSOXm_Reverso -----

QSOXm_murino      TTCTCCCAGCAAACATCGTCATAGACTCTTCT  1533
Inic_Mut_452_Foward -----
Inic_QSOXm_Reverso -----ATCGTCATAGACTCTTCT  18
                        *****

```

Figura 6: Alinhamento dos iniciadores Mut 452 Forward e QSOXm Reverso sobre a sequência correspondente a região codificadora da QSOX de murino através do programa *Clustal 2.0.10*. A seta indica a localização da mutação sítio-dirigida inserida no primeiro nucleotídeo do códon através da técnica do MegaPrimer. O esquema apresenta apenas o início da sequência, e as regiões de alinhamento entre a sequência e os dois iniciadores.

Subsequentemente, uma reação de PCR foi realizada para a obtenção da sequência mutada utilizando os iniciadores *MegaPrimer 452 reverso* e *QSOXm forward*, na presença de 2 µg do vetor pET32a+/*QSOXm selv* como molde. Após corrida eletroforética do produto desta PCR, pode-se verificar e confirmar a presença de um único fragmento na altura aproximada de 1500 pb (Figura 7).

Figura 7

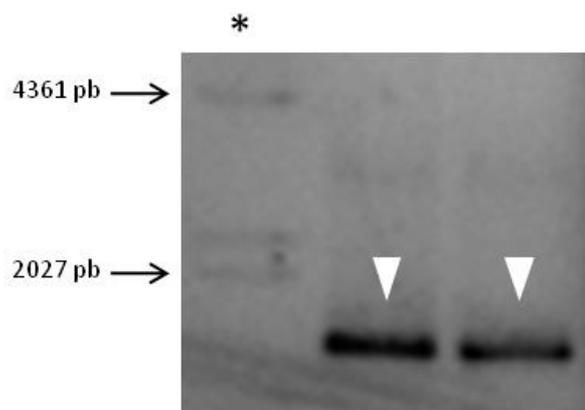


Figura 7: Produto da PCR para obtenção da sequência mutada submetido à corrida eletroforética em gel de agarose (1%) sob corrente constante de 70 V, com tampão TAE. Asterisco (*) indica o marcador de peso molecular *Lambda Hind*. As cabeças de seta apontam para o fragmento correspondente a sequência mutada, com aproximadamente 1500 pb, obtidos em 2 reações.

Com a sequência mutada obtida, foram iniciados os processos de digestão, tanto para sequência quanto para o vetor pET32a+ (Novagen). Optou-se por escolher o protocolo de dupla digestão indicada pelo *pET System Manual – 11th Edition*, o qual relata a possibilidade do uso conjunto das duas enzimas de restrição *Kpn I* e *Hind III* na mesma reação de digestão. Através da análise do perfil eletroforético dos produtos das duas digestões, sequência e vetor, foi constatada a real possibilidade da utilização da dupla digestão sem ocasionar degradação de nossas amostras (Figura 8).

Figura 8

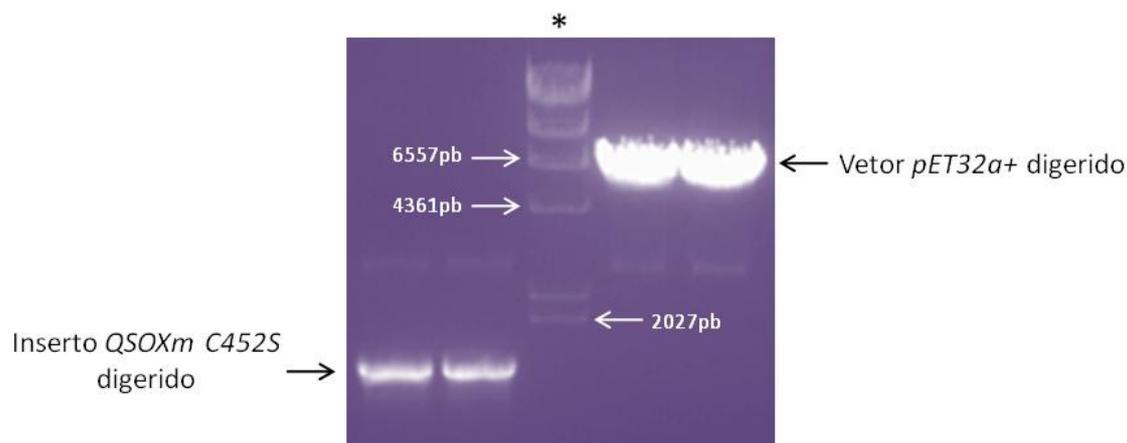


Figura 8: Produto da reação de digestão (dupla digestão) da sequência mutada e do vetor pET32a+ quando submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (1%) sob corrente constante de 70 V, com tampão TAE. Asterisco (*) indicando marcador de massa molecular *Lambda Hind* (Fermentas). Setas brancas indicam a massa molecular correspondente. A seta preta à esquerda do asterisco indica a presença de dois fragmentos correspondentes ao inserto digerido (aproximadamente 1533 pb), enquanto à direita do asterisco está indicando dois fragmentos correspondentes ao vetor digerido (aproximadamente 5.900 pb).

Com a sequência mutada e o vetor ambos digeridos e purificados foi iniciada a padronização da reação de ligação, utilizando diferentes concentrações da sequência mutada. A razão com melhor rendimento foi de 1 pmol de vetor para 10 pmol de sequência mutada. Quando aplicada essa razão (1:10), foram necessários o rastreamento por PCR de colônia de apenas 15 colônias positivas para a transformação, para que se obtivessem dois clones positivos para inserção da sequência mutada (Figura 9). Os clones positivos para PCR de colônia de rastreamento (usando apenas os iniciadores da sequência mutada) foram submetidos a duas outras reações de PCR utilizando-se os iniciadores do vetor (T7 *forward* ou *reverso*) e do inserto (QSOX *reverso* ou *forward*),

gerando fragmentos de 2.080 pb e 1.701 bp, respectivamente. Assim, foi confirmada a presença da sequência mutada inserida integralmente no vetor de expressão (Figura 10).

Figura 9

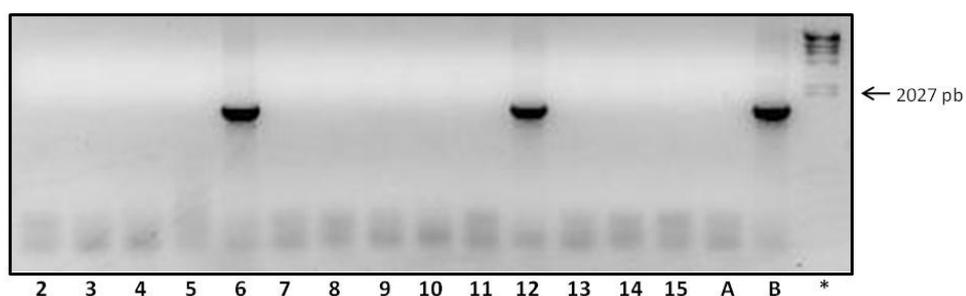


Figura 9: Produtos da PCR de rastreamento com as colônias positivas para transformação, submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (1%) por 50 min sob corrente constante de 70 V, com tampão TAE. Os números indicam as colônias (2 – 15), sendo que a colônia de número 1 não está presente devido a problemas de espaço, contudo esta foi negativa para reação. A, controle negativo (ausência de molde). B, controle positivo (utilizando-se do molde pET32a+/QSOXm selv.). Asterisco (*), indica marcador de massa molecular *Lambda Hind* (Fermentas).

Figura 10

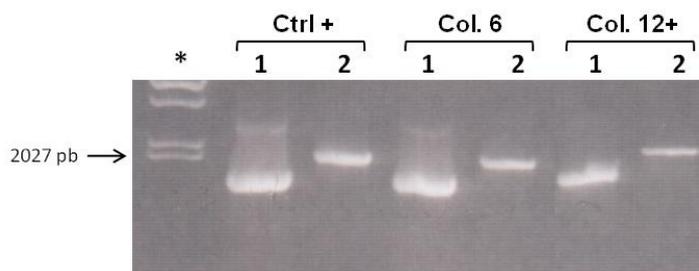


Figura 10: Produtos da PCR com iniciadores do vetor e do inserto das colônias positivas (Col. 6 e 12, e controle positivo) para o rastreamento, submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (1%) por 50 min sob corrente constante de 70 V, com tampão TAE. Asterisco (*), indica marcador de massa molecular *Lambda Hind* (Fermentas). Canaletas 1, indica reação de PCR com os iniciadores *T7 reverso* e *QSOXm forward*, com fragmento gerado de 1.701 pb. Canaletas 2, indicam reação de PCR com os iniciadores *T7 forward* e *QSOXm reverso*, com fragmento gerado de 2.080 pb.

As duas colônias positivas para ambas as reações de PCR foram sequenciadas e, então, confirmadas por sequenciamento direto como descrito no item 2.9 para presença da mutação sítio dirigida no resíduo de aminoácido 452. Onde houve a substituição de timina por adenina na primeira base do códon cisteína, proporcionando com isso a mutação aminoácida de cisteína para serina (Anexo 1).

Expressão e purificação da QSOXm mut. C452S.

Os protocolos e procedimentos utilizados na expressão e purificação da proteína recombinante mutante foram os mesmos empregados na obtenção da proteína selvagem,

onde o vetor transformado na cepa bacteriana AD494 foi proveniente da mini-preparação da colônia 12.

Semelhantemente aos resultados obtidos com a expressão da proteína recombinante selvagem, a proteína mutada mostrou-se presente na forma solúvel e insolúvel, sendo a primeira em maior concentração (Figura 11).

Figura 11:

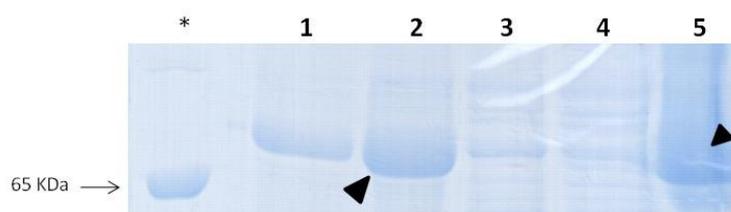


Figura 11: Etapas de purificação da proteína recombinante mutada (*QSOXm mut.C452S*) quando submetidos a corrida eletroforética em gel de acrilamida (10%) SDS-PAGE, sob corrente constante de 30 mA. Asterisco (*) indica o padrão eletroforético de BSA (66 KDa). Canaletas: 1, segunda fração de 5 ml do eluato; 2, primeira fração de 5 ml do eluato; 3, lavado; 4, void; e 5, pellet. As cabeças de seta indicam a presença da proteína tanto de forma solúvel no eluato, quanto de forma insolúvel no pellet.

Para comprovar que ambas as proteínas (selvagem e mutada) obtidas eram de fato QSOX1, foi realizada a imunomarcação com o anticorpo comercial anti-peptídeo 14 (α -pep. 14) o qual reconhece especificamente a sequência de aminoácidos EDPQFPKVQWPPR, que está presente tanto na proteína QSOX humana (resíduos 494-507) na quanto QSOX *mouse* (resíduos 497-510), sendo que na proteína de camundongo ocorre uma substituição no 4º quarto resíduo de aminoácido glutamina (Q) para histidina

(H) (THORPE et al., 2002). Contudo, esta alteração não comprometeu o reconhecimento da proteína (selvagem e mutada) pelo anticorpo, confirmando assim a identidade ambas (Figura 12).

Figura 12

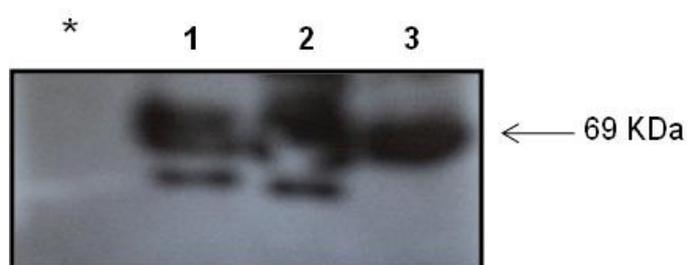


Figura 12: Reação de *Western Blot* demonstrando o reconhecimento do anticorpo α -pep. 14 pelas proteínas *QSOXm sel.* e *QSOXm mut. C452S* por imunomarcção realizada como descrito no item 3.2. Um asterisco (*) indica o controle negativo BSA [4 μ g]. Canaleta 1, controle positivo *QSOXm selvagem* [10 μ g], anteriormente purificada por nosso grupo de pesquisa. E as proteínas *QSOXm sel.* e *QSOXm mut. C452S* nas canaletas 2 e 3, respectivamente.

O espectro na região UV-visível das proteínas recombinantes foi realizado para avaliar a presença de FAD. Os resultados demonstraram que a mutação C452S não impediu a ligação de FAD. Entretanto, parece ter afetado a afinidade, uma vez que os valores de absorbância em 456 nm foram de 0,208 e 0,393 para as proteínas mutada e selvagem, respectivamente (Figura 13).

Figura 13

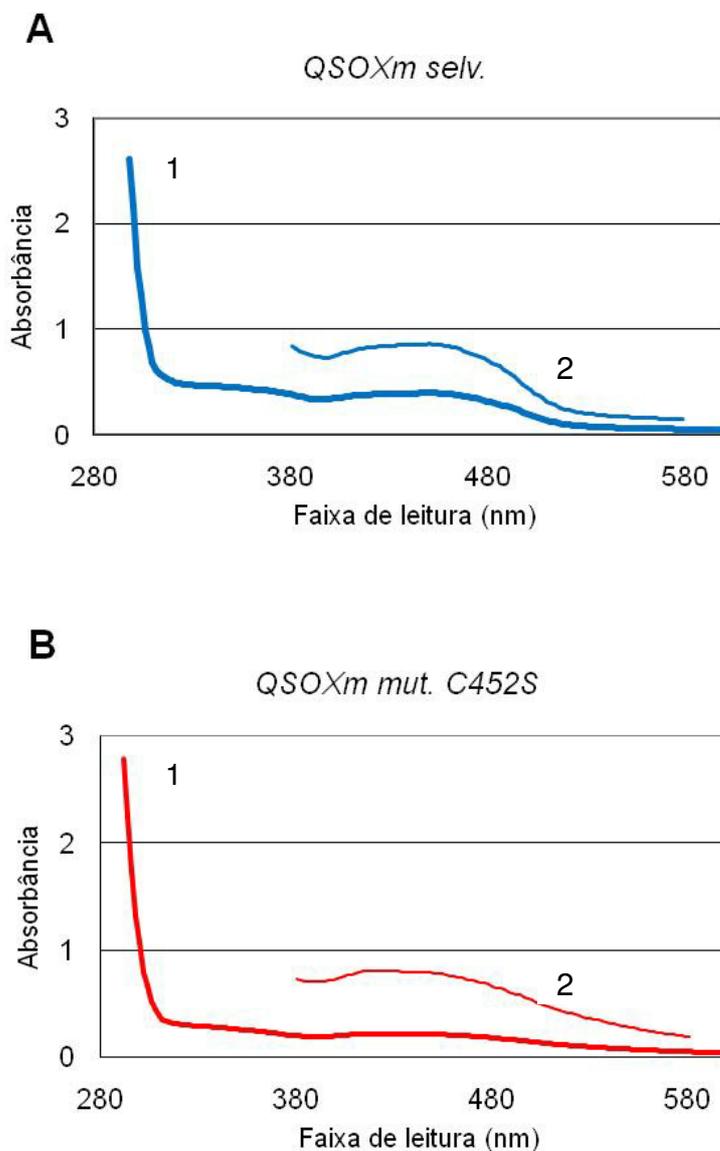


Figura 13: As linhas de número 1 correspondem a varredura do espectro UV-visível da proteína *QSOXm selv* (**A**) e *QSOXm mut C452S* (**B**) na faixa de leitura de 280-600 nm. A linha de número 2 representa um *inset* da região correspondente ao espectro de 380-580 nm de cada gráfico, possibilitando melhor visualização do perfil espectrofotométrico em 456 nm. Os perfis espectrofotométricos foram obtidos a partir de 48 nM de cada enzima, em PBS [1x] num volume final de 500 μ l.

Caracterização da atividade enzimática das enzimas QSOXm selv. e QSOXm mut. C452S.

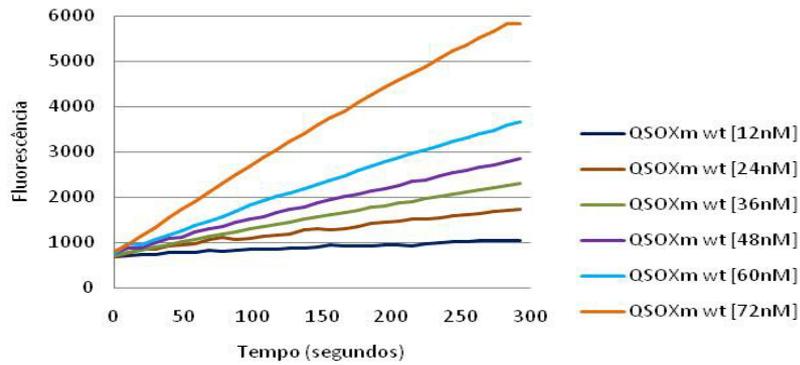
Para verificar a presença de atividade enzimática nas proteínas *QSOXm selv.* e *QSOXm mut. C452S* foi realizado ensaio de cinética enzimática, no qual se monitorou continuamente a fluorescência emitida do dímero de HVA formado pela oxidação via HRP- H₂O₂ (produto da oxidação do substrato pela QSOX) (RAJE et al, 2002). O perfil enzimático de cada proteína *QSOXm* recombinante foi gerado através da exposição de uma única concentração do substrato DTT [150 µM] a concentrações crescentes da enzima [12; 24; 36; 48; 60 e 72 nM].

A análise desses resultados evidenciaram que a proteína *QSOXm selv.* possui atividade DTT oxidase, proporcional a concentração enzimática, observada pelo aumento da velocidade inicial da reação proporcional à concentração da enzima (na presença de substrato suficiente) (Figura 14 A e B). No entanto, a proteína *QSOXm mut. C452S* apresentou completa ausência de atividade enzimática sobre o substrato testado (Figura 15A e B).

Figura 14

A

Atividade enzimática da *QSOXm selv.* sobre DTT [150 μ M]



Concentração da enzima vs Velocidade da reação

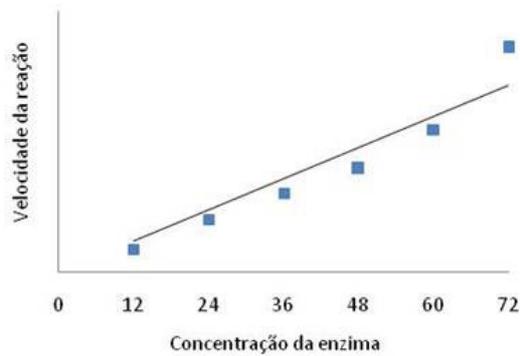


Figura 14: A, Atividade enzimática gerada por diferentes concentrações da proteína *QSOXm selv.* Ensaio realizado com tampão fosfato de potássio [50 mM], pH 8,00 contendo EDTA [0,3 mM], HVA [1 mM], HRP [0,037 μ M], e DTT [150 μ M] como substrato. Onde a fluorescência da reação foi iniciada pela adição da QSOX. **B**, Variação da velocidade inicial (V_0) da reação com a concentração de QSOX, conforme demonstrado em A. Eixo Y expressa quantidade de H₂O₂ μ mol gerado por minuto. Eixo X expressa a concentração da enzima em nM. Os valores utilizados nos gráficos correspondem a média obtida de seis repetições para cada experimento.

Figura 15

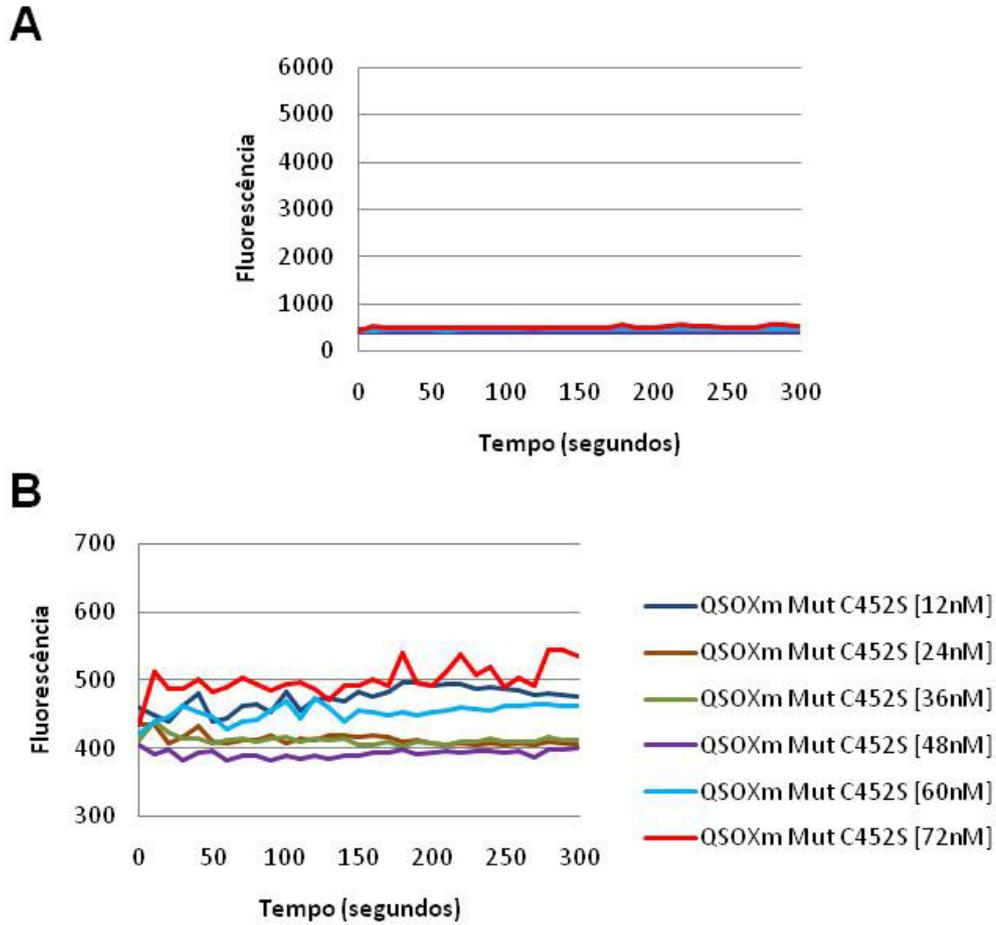


Figura 15: A, Atividade enzimática gerada por diferentes concentrações da proteína *QSOXm mut. C452S*, em ensaio realizado com tampão fosfato de potássio [50 mM], pH 8,00 contendo EDTA [0,3 mM], HVA [1 mM], HRP [0,037 μ M], e DTT [150 μ M] como substrato. **B**, figura A com o eixo da fluorescência em menor escala, possibilitando a visualização do perfil enzimático descontínuo da proteína. As concentrações utilizadas da *QSOXm mut. C452S* estão indicadas na legenda ao lado da figura **B**, com a cor da linha correspondente.

Para calcular a atividade enzimática foi realizada uma curva de calibração (curva padrão) com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio [0; 0,2; 0,4; 0,8; e 1,6 μM] na presença de HVA e HRP, com a finalidade de estabelecer a padronização dos valores de fluorescência capturados pelo fluorímetro. Através da equação da reta gerada pela curva padrão a atividade enzimática da proteína *QSOXm selv.* sobre DTT foi de 26 nmol de H_2O_2 produzidos por minuto de reação e miligrama de proteína ($26 \pm 1,2$ nmol $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Entretanto, não foi possível realizar a mesma mensuração com a proteína *QSOXm mut.452* decorrente da sua ausência de atividade enzimática detectável.

Visto que a proteína selvagem apresentou DTT oxidase, outro substrato foi testado. Para isso o monotiol GSH foi usado. Nestes ensaios as concentrações de substrato e enzima na reação foram diferentes das anteriormente citadas, sendo uma única concentração de enzima empregada com diferentes concentrações do substrato. Este ensaio teve como finalidade a mensuração da concentração de substrato necessária para se atingir a metade da velocidade máxima da reação, que foi expressa como constante de Michaelis-Menten (K_M). Os valores de K_M aproximados para os substratos foram de 60 $\mu\text{mol/L}$ para DTT, e 10 mmol/L para GSH. Os resultados obtidos na oxidação dos substratos DTT e GSH pela enzima *QSOXm selv.* estão de acordo com os valores descritos para QSOX humana, de ave, e a encontrada no leite de bovinos (Tabela 1). Tendo a molécula ditiol DTT apresentado baixo K_M , diferentemente do monotiol GSH, o qual demonstrou reter alto K_M . Contudo, os valores de K_M do DTT e GSH para QSOX murina e humana foram relativamente mais próximas (HECKLER et al., 2008b).

Tabela 1: ¹ Valores da K_M encontrados para os substratos DTT e GSH na presença da proteína QSOXm recombinante: ¹ murina selvagem e mutada; ² humana selvagem (HECKLER et al., 2008a); ³ da clara do ovo e bovina (HOOBER et al., 1996, 1999).

Constante de Michaelis-Menten					
Substrato	QSOXm selv. ¹	QSOXm mut C452S ¹	QSOX humana ²	QSOX aves ³	QSOX bovina ³
DTT	60µmol/L	ausente	100µmol/L	150µmol/L	86µmol/L
GSH	10mmol/L	ausente	12,4mmol/L	20mmol/L	4,9mmol/L

Redução das pontes dissulfeto da fibronectina

O fato de muitos trabalhos ressaltarem o possível papel de QSOX na manutenção da MEC (COOPOCK et al., 2006; THORPE et al., 2002; HECKLER et al., 2008b; HOOBER et al., 1999a, 1999b), sugeria a molécula FN como hipotético substrato para QSOX. A escolha desta proteína FN foi devida sua importância no contexto científico, onde é amplamente explorada como alvo de intervenção em doenças como o câncer (TANZER, 2006; VARTIO, 1991; KASPAR et al., 2006) e também por apresentar 28 pontes dissulfeto e duas sulfidrilas livres por subunidade, o que resultaria em 116 sulfidrilas livres quando submetida a ensaios redução.

Para realizar a redução da FN foi escolhido o agente redutor DTT, por este ser detentor de duas sulfidrilas livres. Entretanto, devido ao fato do DTT ter demonstrado baixo K_M para nossa enzima QSOXm selv., foi primeiramente necessário a realização de um protocolo eficaz para separação da FN reduzida do DTT residual presente na reação. Para isso foi utilizado o método de separação cromatográfica por gel-filtração em coluna PD-10.

Antes do ensaio de redução da FN foram realizados testes de gel-filtração para DTT [1 mM] e FN [100 µg] separadamente para análise do perfil de eluição individual destas duas moléculas. Para cada molécula foram mantidas as mesmas condições encontradas na reação de redução, deixando apenas ausente DTT no ensaio da FN, e FN no ensaio do DTT. As condições na preparação da coluna e o método de eluição também foram os mesmos. O perfil das frações coletadas foi acompanhado por absorvância em 280 nm, revelando a necessidade da coleta de 15 frações (1 ml cada) para total eluição residual da coluna. O dado fotométrico comprovou a divergência entre os perfis de separação cromatográfica das duas moléculas, sendo a FN eluída nas primeiras frações (1-5), e o DTT nas frações seguintes (5-15), validando assim a utilização desta técnica como eficaz para separação da FN do DTT (Figura 16).

Figura 16

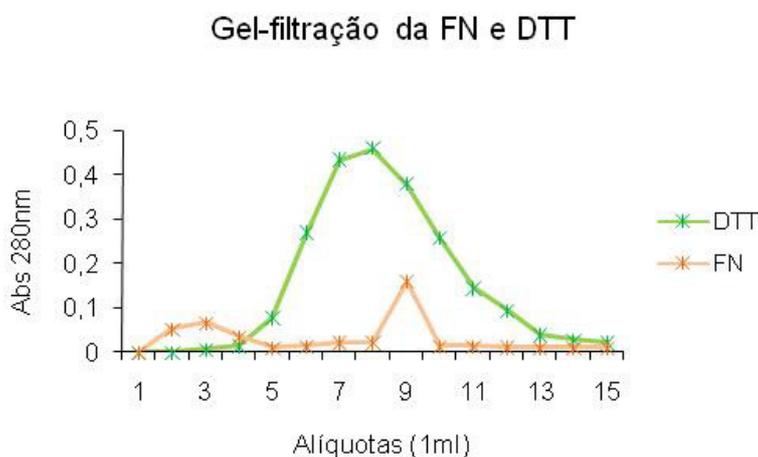


Figura 16: Perfil cromatográfico das frações coletadas da gel-filtração individual de FN e DTT em coluna PD-10. A linha de cor laranja representa as frações de FN, sendo o primeiro pico (entre 1 – 5 ml) moléculas de FN integras (com aproximadamente 440 KDa), e o segundo pico (entre 8 – 10 ml) produtos de degradação e contaminantes. A linha de cor verde representa as frações do DTT com único pico (entre 4 – 12 ml).

Ao analisar os resultados obtidos pelas gel-filtrações individuais da FN e DTT foi constatado que a separação cromatográfica realmente difere entre as duas moléculas. No entanto, na figura 16 pode-se também observar que entre o terceiro e quinto ml ocorreu sobreposição das linhas correspondentes a FN e DTT, o que seria potencialmente problemático na obtenção de FN reduzida sem DTT residual. Mesmo sabendo que em 280 nm só há absorbância de DTT oxidado, foi realizada uma nova gel-filtração somente de DTT [1 mM] onde o volume das frações coletadas foi 500 µl, buscando com isso aumentar a sensibilidade na visualização da eluição do DTT. Um volume de 20 µl de cada fração coletada desta gel-filtração foi submetida a ensaio de atividade enzimática na

presença de 195nM da *QSOXm selv.* (igual concentração utilizada nos ensaios de cinética para as frações correspondentes a FN reduzida). O resultado obtido mostra que as quantidades de DTT residuais presentes apenas após a fração 9 interfeririam nos ensaios com FN reduzida (Figura 17).

Figura 17

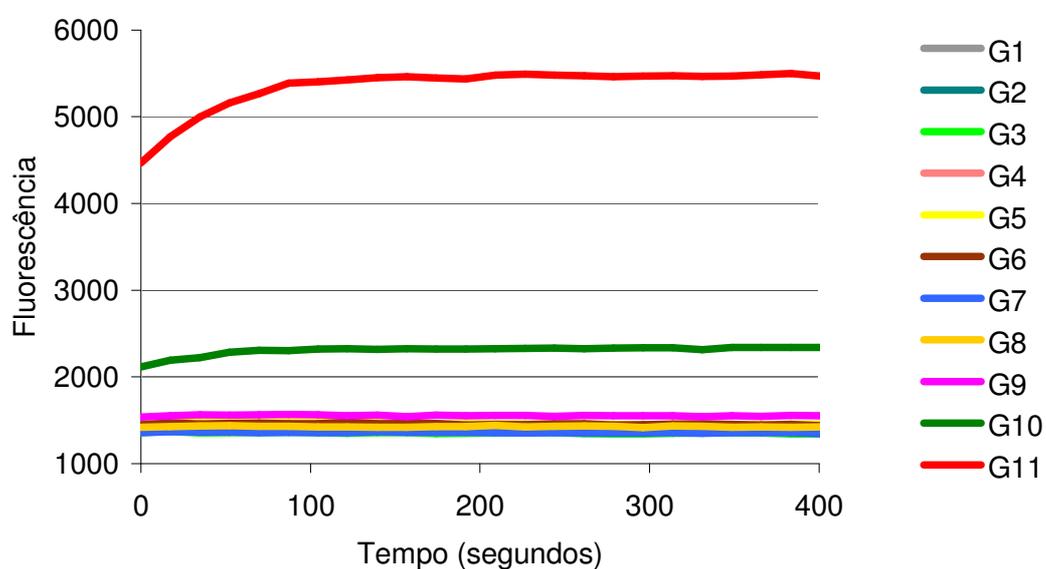


Figura 17: Ensaio de cinética enzimática com as 10 primeiras frações coletas da gel-filtração de DTT [1 mM] na presença de 195 nM da proteína *QSOXm selv.* Nesta gel-filtração foram coletadas 10 frações de 500 μ l visando aumentar a sensibilidade do ensaio, correspondendo em igual proporção as 5 primeiras frações ilustradas na gel-filtração do DTT na figura 16.

Depois de descartada a hipótese de possível contaminação das frações correspondentes a FN reduzida por DTT, foi realizada a redução (condições descritas no item 3.3) de 100 µg de FN plasmática por 1 mM de DTT, sendo que nestas condições havia a presença de 30x mais tióis de DTT para cada tiol de FN. O volume de cada fração coletada para o ensaio de redução foi 500 µl, como mostrado na figura 17. A confirmação de redução da FN foi realizada pelo método de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) segundo Heckler e colaboradores (2008a), onde para cada fração coletada da gel-filtração da reação de redução, 20 µl foram reagidos com 200 µl de DTNB [5 mM], e a absorbância do produto foi determinado a 412 nm.

Através dos dados obtidos pela leitura em 412 nm foi notado que a eluição da FN reduzida ficou concentrada entre as frações 4 e 6, dado esse que foi também confirmado quando as frações coletadas foram monitoradas em 280 nm (Figura 18 A e B). Na figura 19, o perfil eletroforético da FN reduzida (220 KDa) contida nas frações coletadas pode ser comparado ao perfil de FN não reduzida (440 KDa).

Figura 18

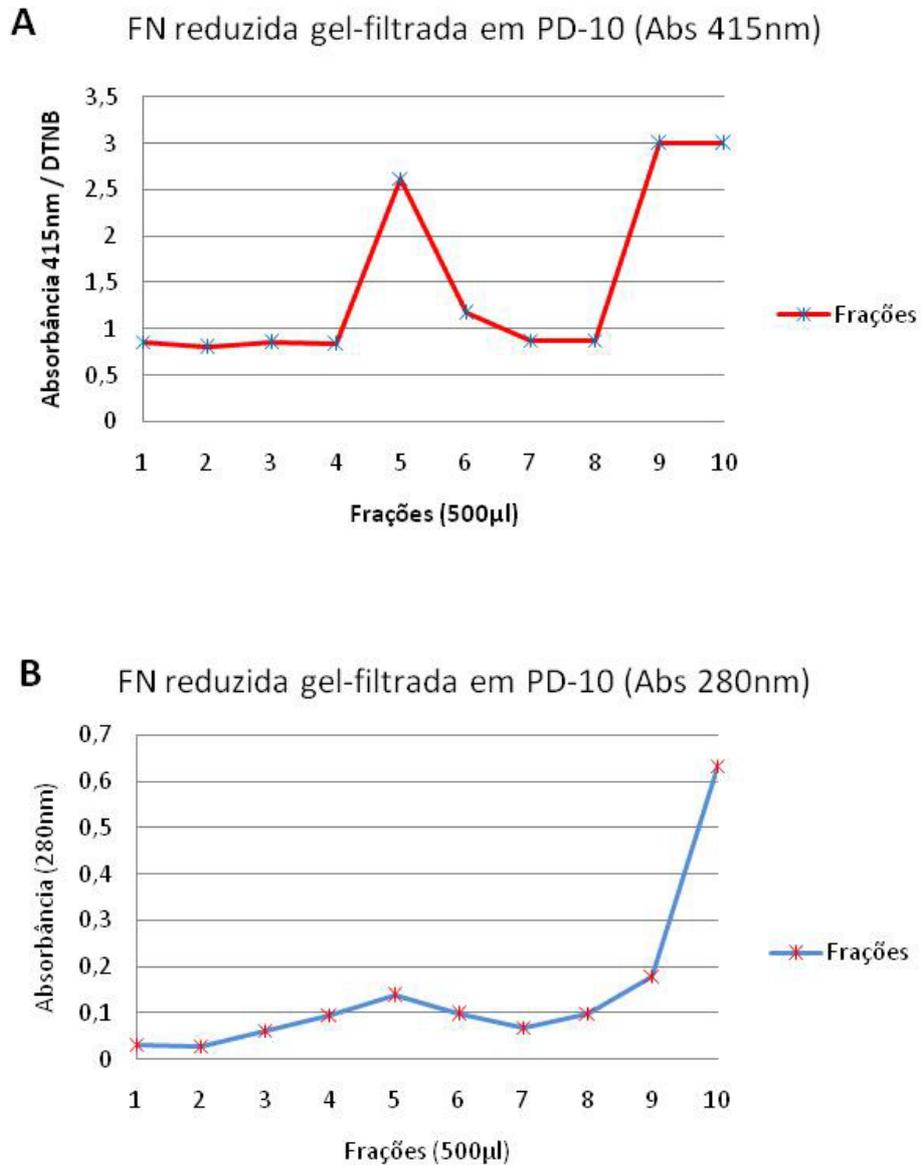


Figura 18: Frações coletadas da gel-filtração em PD-10 da reação de redução da FN. A, perfil da absorbância medida em 412 nm das frações reagidas com DTNB [5 mM]; B, perfil da absorbância em 280 nm.

Figura 19



Figura 19: Separação eletroforética por SDS-PAGE das frações de número ímpar coletadas da gel-filtração da reação de redução da FN. Os números correspondem às frações, onde a seta indica na fração 5 a presença de FN reduzida (aproximadamente 220 KDa). Asterisco (*), 1 µg de FN não reduzida utilizada como controle negativo (aproximadamente 440 KDa).

A determinação de tióis livres presentes em cada fração coletada foi realizada através da utilização de uma curva de calibração com diferentes concentrações de DTT reagidos também com DTNB [5 mM]. Entretanto, não foi possível mensurar a concentração exata de FN reduzida utilizada para os ensaios de cinética, pois a diluição da proteína pela eluição na coluna impossibilitou a dosagem, tanto pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e também pela leitura do espectro em 280 nm devida interferência na absorvância pelo maior número de tióis livres (LYER & KLEE, 1973).

Para que houvesse um ensaio cinético preliminar da FN reduzida frente às proteínas *QSOXm selv.* e *QSOXm. mut. C452S* foi estabelecida à concentração fixa de 3 µg de cada fração utilizada para o ensaio, onde a concentração aproximada foi determinada com base na leitura em 280 nm. Através do volume usado para o ensaio cinético e o volume usado para determinação de tióis livres, pode ser calculado em valores estimados a concentração de tióis livres presentes em cada reação (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de tióis livres por fração, quando em 20 μ l e em 3 μ g, valores expressos em μ M,.

Fração	Tióis livres [μ M]	
	20 μ l	3 μ g
1	9,44	44,36
2	3,33	18,31
3	8,66	20,59
4	7,22	11,19
5	205,44	220,84
6	44,33	67,6
7	12,22	26,27

Oxidação da fibronectina pelas QSOXm recombinantes

Através dos ensaios de cinética enzimática realizados com a concentração estimada de 3 μ g de cada fração correspondente a FN reduzida foi constatada a presença de atividade enzimática pela *QSOXm selv.* e ausência pela *QSOXm mut. C452S* (Figuras 20 A e B).

Conforme esperado, na figura 20A as frações iniciais (1 – 4) não provocaram qualquer indício de emissão de fluorescência, onde apenas na fração de número 1 houve uma pequena emissão, provavelmente ocasionada por contaminantes, já que também foi observada a mesma taxa para *QSOXm mut. C452S*. Contudo, foi constatada emissão de fluorescência significativa nas frações de número 5, 6 e pouco menos na fração de número 7, Denotou-se também que os resultados obtidos com essa cinética estão de acordo com o perfil das frações de FN reduzida observado nas figuras 18A e 18B. Já na figura 20B não foi observado qualquer emissão de fluorescência pelas frações.

Figura 20

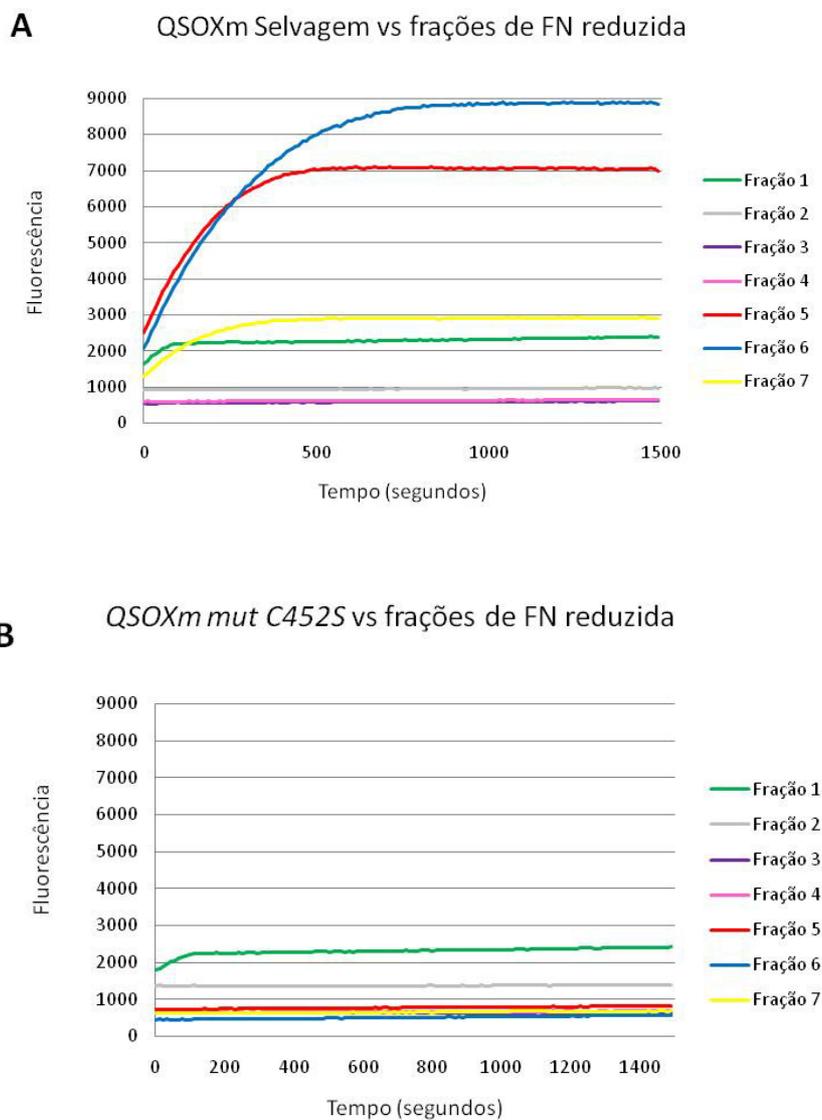


Figura 20: Ensaio de cinética enzimática sobre 3 μg de cada fração correspondente a FN reduzida (1 – 7) na presença de *QSOXm selv.* [195 nM] (A), e *QSOXm mut. C452S* [195 nM] (B). Em ensaio realizado na presença de tampão fosfato de potássio [50 mM], pH 8,00 contendo EDTA [0,3 mM], HVA [1 mM], HRP [0,037 μM]. **A**, Notar: a ausência de fluorescência emitida pelas frações 1, 2, 3 e 4; presença de fluorescência emitida pelas frações 5 e 6; e diminuição da fluorescência emitida pela fração 7. **B**, notar a completa ausência de fluorescência emitida por todas as frações.

Com base no princípio de que a emissão de fluorescência pelo método de cinética enzimática com HVA/HRP na presença de QSOX reflete a presença de atividade sulfidril oxidase da enzima sobre o substrato presente (RAJE & THORPE, 2002), pode-se propor que QSOX oxida frente a proteína de matriz extracelular fibronectina reduzida foi confirmada. Sendo assim, fica clara a possibilidade de moléculas de MEC, assim como fibronectina, serem substratos para *QSOXm selv.*

8. DISCUSSÃO

A expressão de proteínas recombinantes em sistemas de expressão heterólogo tem tido grande utilidade e relevância no meio científico, sendo, por exemplo, amplamente utilizada em pesquisas que envolvem a caracterização enzimática de proteínas com função ainda desconhecida. Através desta abordagem, foram recentemente propostos modelos para a catálise oxidativa realizada para proteína QSOX humana e de aves (HECKLER et al., 2008b; HOOBER et al., 1998, 1999; RAJE & THORPE, 2003) e agora com nosso trabalho para proteína QSOX de camundongo.

A atividade sulfidril oxidase da proteína QSOX de humano, de rato, na proteína encontrada no leite de bovinos, e na proteína encontrada na clara do ovo de galinha já foram bem caracterizadas sobre substratos pequenos como DTT (154 MW), GSH (307 MW), RNase (13,7 kDa) e lisozima (14 kDa), sendo todos substratos pequenos e de baixo peso molecular (BENAYOUN et al., 2002; CHAKRAVARTHI et al., 2007; COPPOCK et al., 1998; COPPOCK et al., 2000; HECKLER et al., 2008b; HOOBER et al., 1996; OSTROWSKI et al., 1980; RAJE & THORPE, 2002). O maior substrato já descrito para a QSOX de aves foi a ovalbumina (43 kDa) (RANCY & THORPE, 2008). Em nosso trabalho confirmamos que a isoforma curta da QSOX1 *mouse* também oxida DTT e GSH, com valores de K_M muito próximos aos obtidos com proteína recombinante QSOX humana (HECKLER et al., 2008a)

Com base na atividade apresentada pela proteína QSOX de ave e humano, dois modelos foram propostos para o processo de oxidação sobre proteínas clientes pela proteína QSOX. Na proteína QSOX de ave, descreve-se que a enzima utiliza primeiramente os motivos $CxxC_{\text{trx}}$ e $CxxC_{\text{distal}}$ de uma subunidade e posteriormente o motivo $CxxC_{\text{prox}}$ da outra subunidade, já que esta proteína apresenta forma dimérica

(HOOBER et al., 1998, 1999; RAJE & THORPE, 2003). Entretanto, este modelo difere do proposto para a proteína QSOX humana, o qual utiliza apenas os motivos CxxC_{Trx} e CxxC_{prox} para o processo catalítico, sem a participação do motivo CxxC_{distal} (HECKLER et al., 2008b).

Com base na divergência entre os modelos de catálise propostos para a QSOX de aves e de humanos (isoforma curta da QSOX1), nós realizamos uma mutação sítio dirigida inserida no resíduo do aminoácido 452 (C452S), localizado no motivo CxxC_{prox} dentro do domínio Erv/ALR, na sequência da proteína QSOXm (*QSOXm mut. C452S*). Ao serem realizados ensaios de cinética constatou-se que esta mutação sítio dirigida aboliu a atividade enzimática da enzima sobre o substrato já conhecido DTT, de acordo com os dados para a proteína recombinante QSOX humana (HECKLER et al., 2008a).

Sabe-se que este motivo está diretamente envolvido no processo catalítico realizado pela enzima por meio do recebimento dos elétrons provenientes do motivo CxxC_{Trx} no domínio Trx1, e posterior transferência para o cofator FAD, o qual realiza a etapa final do processo que é a transferência dos equivalentes redutores para o oxigênio molecular, gerando peróxido de hidrogênio como produto da reação (THORPE et al., 2002). Para que o motivo CxxC_{prox} receba os equivalentes redutores do motivo CxxC_{Trx} e realize a posterior transferência destes a FAD, ele necessita estar oxidada. Esta conformação favorece a interação e proximidade do cofator FAD com resíduos de aminoácidos conservados no domínio Erv/ALR. Esta proximidade possibilita a transferência dos equivalentes redutores do motivo para FAD (WU et al., 2003). Isso confirma os dados da literatura (HECKLER et al., 2008a) e ressalta a importância do motivo CxxC_{prox} estar na forma dissulfeto para receber os equivalentes redutores do motivo CxxC_{Trx}.

Através da construção das bioferramentas *QSOXm selv.* e *QSOXm mut. C452S* nosso trabalho teve como objetivo analisar hipóteses que vinham sendo há tempos levantadas, como a possível função da QSOX1 isoforma curta no dobramento protéico em ambientes tanto intra- e como extracelular (COPPOCK et al., 2000; COPPOCK & THORPE, 2006; THORPE et al., 2002; THORPE & COPPOCK, 2007; HECKLER et al., 2008a).

Foi através dessas hipóteses que decidimos avaliar o possível papel da QSOX no contexto extracelular, especificamente sobre a glicoproteína fibronectina. Com base nos resultados pudemos demonstrar *in vitro* que esta molécula é um substrato putativo para QSOX recombinante. Relevantemente, este substrato é muito maior do que os até então descritos para a QSOX, indicando que proteínas grandes podem ser oxidadas por esta enzima. Neste contexto, é interessante sugerir que outras proteínas da MEC ou extracelulares possam também ser montadas ou ter o “*assembly*” final assistido pela QSOX.

De fato, parece existir um mecanismo enzimático bem regulado para a formação de pontes dissulfeto em algumas moléculas (SEVIER & KAISER, 2006). Além disso, o conceito de dissulfetos alostéricos (ZHANG & HOGG, 2005) presentes em várias classes de proteínas de superfície celular e extracelular indicam a existência de uma proteína reguladora desses dissulfetos alostéricos, e nesse aspecto, a proteína mais aceita para esta função tem sido a PDI (HECKLER et al., 2008a; RANCY & THORPE, 2008). Por exemplo, a regulação da integrina de plaquetas depende de isomerização/redução de pontes dissulfeto na porção extracelular deste receptor, mecanismo possivelmente regulado pela PDI (LAHAV et al., 2000). Enquanto a PDI é capaz de reduzir, oxidar e isomerizar (NOIVA, 1999), a QSOX é uma oxidase sendo habilitada somente a oxidar tióis. Assim, no caso da QSOX estar atuando na regulação do tipo “switch on/off”

(liga/desliga), uma proteína com atividade dissulfeto redutase deveria atuar conjuntamente.

Em nosso trabalho, a molécula de FN foi utilizada em uma forma possivelmente não encontrada no ambiente extracelular, ou seja, bastante reduzida, tanto em termos inter-cadeia como intra-cadeia. Esta condição não fisiológica poderia levantar questionamentos sobre a possibilidade desta reação enzimática ocorrer *in vivo*. De fato, com os dados obtidos até o momento, podemos afirmar apenas que a QSOX é capaz de introduzir pontes dissulfeto nos monômeros da fibronectina reduzida, embora não possamos avaliar a localização intramolecular destas pontes e nem mesmo se intercadeia. Para isso, ensaios com cultura de células poderiam fornecer mais informações sobre o papel das QSOX recombinantes sobre o remodelamento da MEC e mais especificamente sobre a FN secretada pelas células. O fato de que FN só consegue obter sua conformação estrutural exata com o auxílio de fatores coadjuvantes contidos no meio celular (VARTIO & KUSSELA, 1991), e que QSOX é uma proteína secretada, fornecem subsídios aos nossos dados de que a QSOX possa ser uma proteína de montagem final das grandes proteínas e estruturas extracelulares.

9. CONCLUSÃO

- A proteína recombinante *QSOXm selvagem* expressa apresentou atividade sulfidril oxidase;
- A construção da bioferramenta *pET32a+/QSOXm mut C452S* e a obtenção da proteína *QSOXm mut. C452S* foi realizada;
- A enzima *QSOXm selvagem* apresentou atividade enzimática sobre os substratos já conhecidos DTT e GSH, diferentemente da enzima *QSOXm mut. C452S* que não apresentou atividade enzimática sobre os mesmos substratos;
- A proteína *QSOXm selvagem* é capaz de introduzir pontes dissulfeto nos monômeros na fibronectina reduzida.

10. REFERÊNCIAS

BENAYOUN, B., ESNARD-FÉVE, A., CASTELLA, S. COURTY, Y., ESNARD, F. J. Rat Seminal Vesicle FAD-dependent Sulfhydryl Oxidase. *Biol. Chem.*, v. 276, p. 13830-37, 2001.

BENHAR, M.; FORRESTER, M.T.; HESS, D.T.; STAMLER, J.S. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science*, v. 320 (5879), p. 1050-1054, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROILLET, M.C. S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci.*, v. 55 (8-9), p. 1036-1042, 1999.

CASTELLETTI, F.; DONADELLI, R.; BANTERLA, F.; HILDEBRANDT, F.; ZIPFEL, P.F.; BRESIN E.; *et al.* Mutations in *FN1* cause glomerulopathy with fibronectin deposits. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 105, p. 2538–2543, 2008.

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C.E.; WILLER, M.; STIRLING, C.J.; BULLEID, N.J. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. *Biochemical Journal*, v. 404, p. 403-411, 2007.

CHIARUGI, P.; FIASCHI, T. Redox signaling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, v. 19 (4), p. 672-682, 2006

CHIARUGI, P.; FIASCHI, T. Redox signaling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, v. 19, p. 672-682, 2007.

CLAVREUL, N.; ADACHI, T.; PIMENTAL, D.R.; IDO, Y.; SCHONEICH, C.; COHEN, R.A. S-glutathiolation by peroxynitrite of p21ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells. *FASEB J.*, v. 20 (3), p. 518-520, 2006

COPPOCK, D.; KOPMAN, C.; GUDAS, J.; CINA-POPPE, D.A. Regulation of the Quiescence-induced genes: Quiescin Q6, Decorin, and Ribosomal protein S29. *Biochem and Biophysical Res.*, v. 269, p. 604-610, 2000.

COPPOCK, D.L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics*, v, 54, p. 460-468, 1998.

COPPOCK, D.L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERMAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ*, v. 4, p. 483-493, 1993.

COPPOCK, D.L.; THORPE, C. Multidomain flavina-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 8, p. 300-311, 2006.

DERMAN, A.I.; PRINZ, W.A.; BELIN, D.; BECKWITH, J. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, v. 262 (5140), p. 1744-1747, 1993.

GHEZZI, P. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 33, p. 1378-1381, 2005.

HECKLER, E.J.; ALON, A.; FASS, D.; THORPE, C. Human Quiescin-Sulfhydryl Oxidase: Probing internal redox steps by mutagenesis. *Biochemistry*, v. 47, p. 4955-4963, 2008a.

HECKLER, E.J.; RANCY, P.C.; KODALI, V.K.; THORPE, C. Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v. 1783, p. 567-577, 2008b.

HELLEBREKERS, D.M.; MELOTTE, V.; VIRÉ, E.; LANGENKAMP, E.; MOLEMA, G.; FUKS, F.; HERMAN, J.G.; VAN CRIEKINGE, W.; GRIFFIOEN, A.W.; VAN ENGELAND, M. Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. *Cancer Research*, v. 67 (9), p. 4138-4148, 2007.

HOOBER, K.L., GLYNN, N.M., BURNSIDE, J., COPPOCK, D.L., THORPE, C. J. Homology between Egg White Sulfhydryl Oxidase and Quiescin Q6 Defines a New Class of Flavin-linked Sulfhydryl Oxidases. *Biol. Chem.* v. 274, p. 31759-62, 1999.

HOOBER, K.L., JONEJA, B., WHITE, H.B., THORPE, C. J. A Sulfhydryl Oxidase from Chichen Egg White. *Biol. Chem*, v. 271, p. 30510-16, 1996.

JAJE, L., WOLCOTT, H. N., FADUGBA, O., CRIPPS, D., YANG, A.J., MATHER, I.H., and THORPE, C. A Flavin-Dependent Sulfhydryl Oxidase in Bovine Milk. *Biochemistry.*, v. 46, p. 13031-13040, 2007.

JESSOP, C.E.; CHAKRAVARTHI, S.; WATKINS, R.H.; BULLEID, N.J. Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 32, p. 655-658, 2004.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signaling. *Cell. Signal*, v. 11(1), p. 1-14, 1999.

KASPAR, M.; ZARDI, L.; NERI, D. Fibronectin as target for tumor therapy. *Int. J. Cancer*, v. 118 (6), p. 1331-1339, 2006.

LAHAV, J.; GOFER-DADOSH, N.; LUBOSHITZ, J.; HESS, O.; SHAKLAI, M. Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Lett*, v. 475 (2), p. 89-92, 2000.

LAHAV, L.; JURK, K.; HESS, O.; BARNES, M.J.; FARNDAL, R.W.; LUBOSHITZ, J.; KEHREL, B.E. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood*, v. 100 (7), p. 2472-2478, 2002.

LANGENBACH, K.; SOTTILES, J. Identification of protein-disulfide isomerase activity in Fibronectin. *The J. Biol. Chemistry*, v. 274, n. 11, p. 7032-7038, 1998.

LING, M.M.; ROBINSON, B.H. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem.*, v. 254 (2), p. 157-178, 1997.

LYER, , K., S.; KLEE, W. A. Direct spectrophotometric measurement of the rate of reduction disulfide bonds. *The journal of biological chemistry*, v. 248, n. 2, p. 707-710, 1973.

MAGALHÃES, T.; BRACKNEY, D.E.; BEIER, J.C.; FOY, B.D. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito mortality a blood meal. *Arch Biochem. Physiol.*, v. 68 (3), p. 134-143, 2008.

MANNICK, J.B.; SCHONHOFF, C.M. NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation. *Free Radic. Res.*, v. 38 (1), p. 1-7, 2004.

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

MOREL, C.; ADAMI, P.; MUSARD, J-F.; DUVAL, D.; RADOM, J.; JOUVENOT, M. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Research*, v. 313, p. 3971-3982, 2007.

MORIARTY-CRAIGE, S.; JONES, D.P. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 24, p. 481-509, 2004.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.*, v. 10 (5), p. 481-493, 1999.

OSTROWSKI, W.S., KISTLER, W.S. Properties of a Flavoprotein Sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry*, v. 19, p. 2639-45, 1980.

PORTES, K.F.; IKEGAMI, C.M.; GETZ, J.; MARTINS, A.P.; NORONHA, L.; ZISCHLER, L.F.; KLASSEN, G.; CAMARGO, A.A.; ZANATA, S.M.; BEVILACQUA, E.; NAKAO, L.S. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in development mouse. *J Mol Hist.*, v. 39 (2), p. 217-225, 2008.

RADOM, J.; COLIN, D.; THIEBAULT, F.; DOGNIN-BERGERET, M.; MAIRET-COELLO, G.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; JOUVENOT, M. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. *Biochem. & Biophysica.*, v. 1759, p. 225-233, 2006.

RAJE, S.; and THORPE, C. Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. *Biochemistry*. V. 42, p. 4560-4568, 2003.

RAJE, S.; GLYNN, N.M.; THORPE, C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. *Anal Biochem.*, v. 307 (2), p. 266-72, 2002.

RANCY, P.C.; THORPE, C. Oxidative protein folding in vitro: A study of the cooperation between Quiescin-sulfhydryl Oxidase and protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, v. 47, p. 12047-12056, 2008.

SAHAF, B.; HEYDARI, K.; HERZENBERG, L.A. The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface protein in HIV-infected subjects. *Arch Biochem. Biophys.*, v. 434 (1), p. 26-32, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, 2001

SEVIER, C.S.; KAISER, C.A. Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxid Redox Signal*, v. 8 (5-6), p. 797-811, 2006.

SEVIER, C.S.; QU, H.; HELDMAN, N.; GROSS, E.; FASS, D.; KAISER, C.A. Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell*, v. 129 (2), p. 333-344, 2007.

SILVA, G.M.; NETTO, L.E.; DISCOLA, K.F.; PIASSA-FILHO, G.M.; PIMENTA, D.C.; BÁRCENA, J.A.; DEMASI, M. Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. *FEBS J.*, v. 275 (11), p. 2942-2955, 2008.

TANZER, M.L. Current concepts of extracellular matrix. *J. Orthop Sci.*, v. 11, p. 326-331, 2006.

THORPE, C.; COPPOCK, D.L. Generating disulfides in multiple organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J. Biol. Chem.*, p. 1-29, 2006.

THORPE, C.; HOOBER, K.L.; RAJE, S.; GLYNN, N.M.; BURNSIDE, J.; TURI, G.K.; COPPOCK, D.L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys*, v. 405, p. 1-12, 2002.

UEHARA, T.; NAKAMURA, T.; YAO, D.; SHI, Z.Q.; GU, Z.; MA, Y.; MASLIAH, E.; NOMURA, Y.; LIPTON, S.A. S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, v. 441, p. 513-517, 2006.

VAKONAKIS, L.; CAMPBELL, L.D. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr. Opin in Cell Biology*, v. 19, p.578-583, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.*, v. 39, p. 44-84, 2007.

VARTIO, T.; KUUSELA, P. Disulfide-bonded dimerization of fibronectin *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, v. 202, p. 597-604, 1991.

WEDEMEYER, W.J.; WELKER, E.; NARAYAN, M.; SCHERAGA, H.A. Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, v. 39 (15), p. 4207-4215, 2000.

WHITE, E.S.; BARALLE, F.E.; MURO, A.F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *Journal of Pathology*, v. 216, p. 1-14, 2008.

WINTER, A.D.; MCCORMACK, G.; PAGE, A.P. Protein disulfide isomerase activity is essential for viability and extracellular matrix formation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, v. 308, p. 449-461, 2007.

WITTKE, I.; WIEDEMEYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, v. 15, p.7742-7752, 2003.

WU, C-K.; DAILEY, T.A.; DAILEY, H.A.; WANG, B-C.; ROSE, J.P. The crystal structure of augments liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase. *Protein Science*, v. 12, p. 1109-1118, 2003.

ZANATA, S.M.; LUVIZON, A.C.; BATISTA, D.F.; IKEGAMI, C.M.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; CHAVES, D.F.; CARON, L.F.; PELIZZARI, J.V.; LAURINDO, F.R.; NAKAO, L.S. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. *Redox Rep.*, v. 10 (6), p. 319-323, 2005.

ZHANG, Y.; HOGG, N. S-nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 38 (7), p. 831-838, 2005.