

ANTONIO MARCUS DE ANDRADE PAES

**Mecanismo da interação entre a
proteína dissulfeto isomerase e a NADPH oxidase :
papel regulatório sobre a produção de espécies reativas
de oxigênio em fagócitos profissionais**

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

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2009

ANTONIO MARCUS DE ANDRADE PAES

Mecanismo da interação entre a proteína dissulfeto isomerase e a NADPH oxidase : papel regulatório sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em fagócitos profissionais

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

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Paes, Antonio Marcus de Andrade

Mecanismo da interação entre a proteína dissulfeto isomerase e a NADPH oxidase : papel regulatório sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em fagócitos profissionais / Antonio Marcus de Andrade Paes. -- São Paulo, 2009.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.Isomerase de dissulfeto da proteína 2.NADPH oxidase
3.Espécies de oxigênio reativas 4.Explosão respiratória 5.Fagócitos

USP/FM/SBD-102/09

Para Maria Clara,

*“Menininha do meu coração
Eu só quero você
A três palmos do chão
Menininha, não cresça mais não
Fique pequenininha na minha canção”*

Vinicius de Moraes

À Mainha, Aninha e Lila,
por serem sempre o meu porto seguro

À Mira e Paty,
por me ensinarem o que não sei

Às três Graças,
por serem “tudo o que uma pessoa,
grande ou pequena, pode ter
a ousadia de querer”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco Laurindo, por ter me ouvido por cinco minutos naquela tarde de agosto, para depois me dar, ao longo dos últimos três anos, exemplos diários de seriedade e dedicação ao ofício de “ser cientista”.

À Profa. Lúcia Lopes, pela confiança, pela paciência em me apresentar um mundo neutrofílico que eu desconhecia, pelas horas de acaloradas discussões mecanísticas.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Maranhão, por me apoiar nesta busca, especialmente ao professores e alunos do Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia (LPPF) e do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Fisiologia (LEFISIO).

Aos amigos Leonardo, Victor, Cristina, Cláudia, Marina e Leonora, por tudo o que nos ensinamos, nos aprendemos, nos superamos.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia da Sinalização Redox. Ao Sidney, por tudo que me ensinou, por toda a ajuda técnica, por ser um exemplo de profissionalismo. Ao Gabriel, por ter me ensinado do be-a-bá do *cell-free*. Às meninas *redox* Ana Alice, Livia e Aline pelo dia-a-dia com ou sem café.

Aos colegas de laboratório Célio, Denise, João, Angélica, Luciana, Maria, Ana, Elídia, Marcel, Estevão, Márcia, Rita, Vítor, Heloísa, Hélen, Liliete, Viviane, Camila, Thalita e Júlia, pela troca diária de experiências e gargalhadas.

À Vanda, Laura e Diana, por compartilharem o fundo e fazerem dele a melhor parte do todo.

Ao Criador, sem o qual tudo é nada!

Este trabalho foi desenvolvido com recursos públicos provenientes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O autor recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica (PICDT) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 LEUCÓCITO E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA	14
1.2 COMPOSIÇÃO MOLECULAR E REGULAÇÃO DA NADPH OXIDASE	16
1.3 REGULAÇÃO REDOX DA NADPH OXIDASE	24
1.4 INTERAÇÃO ENTRE NADPH OXIDASE E PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE.	26
1.5 É POSSÍVEL REGULAR A ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE DURANTE O BURST RESPIRATÓRIO EM NEUTRÓFILOS?	32
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 REAGENTES QUÍMICOS	38
3.2 ESTIMULAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS E FRACIONAMENTO SUBCELULAR	39
3.3 MICROSCOPIA CONFOCAL DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	41
3.4 IMUNOPRECIPITAÇÃO, ELETROFORESE DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOTTING	42
3.5 FRACIONAMENTO CELULAR EM TRITON X-100 (ASSOCIAÇÃO AO CITOESQUELETO)	43
3.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	44
3.7 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS	45
3.8 ENSAIO DA GERAÇÃO DE O₂^{•-} EM SISTEMA CELL-FREE SEMI-RECOMBINANTE	47
3.9 ENSAIO DE PRECIPITAÇÃO POR AFINIDADE (GST PULL-DOWN ASSAY)	48
3.10 ENSAIO DA INCORPORAÇÃO DE DERIVADO MALEIMÍDICO EM CISTEÍNAS OXIDADAS (DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX PROTÉICO IN VIVO)	49
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	50

4. RESULTADOS.....	51
4.1 GERAÇÃO DE SUPERÓXIDO É REDUZIDA POR INIBIDORES DA PDI	52
4.2 O EFEITO INIBITÓRIO DA PDI SOBRE A ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE DO NEUTRÓFILO É DEPENDENTE DO SEU ESTADO REDOX.....	54
4.3 PDI CO-LOCALIZA COM AS SUBUNIDADES DA NADPH OXIDASE.....	58
4.4 A ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS COM PMA INDUZ A MOBILIZAÇÃO DA PDI PARA A MEMBRANA PLASMÁTICA	60
4.5 O ESTÍMULO COM PMA AUMENTA A ASSOCIAÇÃO DA PDI AO CITOESQUELETO ..	63
4.6 PDI ASSOCIA-SE ÀS SUBUNIDADES DA NADPH OXIDASE	65
4.7 p47^{PHOX} ASSOCIA-SE PREFERENCIALMENTE À FORMA REDUZIDA DA PDI EM NEUTRÓFILOS ATIVADOS	66
4.8 PDI E p47^{PHOX} ESTÃO ENVOLVIDAS EM TROCAS TIOL/DISSULFETO IN VIVO	69
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 <i>ESTRUTURA E ATIVAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO NADPH OXIDASE NO FAGÓCITO.</i>	19
FIGURA 2 <i>REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS SUBUNIDADES CITOSÓLICAS DO COMPLEXO NADPH OXIDASE.</i>	21
FIGURA 3 <i>REAÇÕES REALIZADAS PELAS PDI EM SUBSTRATOS PROTÉICOS PORTADORES DE DISSULFETOS OU DITIÓIS</i>	27
FIGURA 4 <i>REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PDI.</i>	29
FIGURA 5 <i>FRACIONAMENTO SUBCELULAR DE NEUTRÓFILOS EM GRADIENTE DE PERCOLL-HYPAQUE®.</i>	41
FIGURA 6 <i>PEPTÍDEOS BASEADOS NO MOTIVO REDOX DA PDI</i>	46
FIGURA 7 <i>ATIVIDADE NADPH OXIDASE É REDUZIDA POR INIBIDORES DA PDI EM UM SISTEMA CELL-FREE SEMI-RECOMBINANTE.</i>	53
FIGURA 8 <i>O ESTADO REDOX DA PDI MODULA A GERAÇÃO DE SUPERÓXIDO PELA NADPH OXIDASE EM UM SISTEMA CELL-FREE SEMI-RECOMBINANTE</i>	56
FIGURA 9 <i>O EFEITO DA PDI SOBRE A ATIVIDADE NADPH OXIDASE É DEPENDENTE DO ESTADO REDOX DAS CISTEÍNAS DO MOTIVO WCGHC.</i>	57
FIGURA 10 <i>CO-LOCALIZAÇÃO DA PDI COM AS SUBUNIDADES DA NADPH OXIDASE EM NEUTRÓFILOS</i>	59
FIGURA 11 <i>ATIVAÇÃO DA NADPH OXIDASE INDUZ A MOBILIZAÇÃO DA PDI ENTRE COMPARTIMENTOS SUBCELULARES.</i>	62
FIGURA 12 <i>ATIVAÇÃO DA NADPH OXIDASE AUMENTA A ASSOCIAÇÃO DA PDI AO CITOESQUELETO</i>	64
FIGURA 13 <i>CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO ENTRE A PDI E AS SUBUNIDADES DA NADPH OXIDASE</i>	66
FIGURA 14 <i>EFEITO DO ESTADO REDOX DA PDI SOBRE A AFINIDADE DE LIGAÇÃO À P47^{PHOX} EM FRAÇÕES CELULARES DE NEUTRÓFILOS.</i>	68
FIGURA 15 <i>EFEITO DA ESTIMULAÇÃO COM PMA SOBRE O ESTADO REDOX DA PDI E P47^{PHOX} DE NEUTRÓFILOS.</i>	69
FIGURA 16 <i>MECANISMO DA INTERAÇÃO DA PDI COM A SUBUNIDADE P47^{PHOX} DA NADPH OXIDASE DO FAGÓCITO.</i>	78

RESUMO

Paes, AMA. Mecanismo da interação entre a proteína dissulfeto isomerase e a NADPH oxidase : papel regulatório sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em fagócitos profissionais [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 110p.

INTRODUÇÃO: A ativação da NADPH oxidase de neutrófilos requer o acoplamento das subunidades citosólicas p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e Rac2 ao componente de membrana citocromo *b*₅₅₈. Em trabalhos anteriores, nós mostramos que as isoformas vasculares da oxidase são reguladas pela proteína dissulfeto isomerase (PDI), uma chaperona redox. Neste trabalho, nós utilizamos um sistema cell-free semi-recombinante como ferramenta para investigar o papel da PDI na ativação da NADPH oxidase do neutrófilo. **RESULTADOS:** Inibidores da PDI, scrambled RNase (100µg/mL) ou bacitracina (1mM), praticamente suprimiram a geração de superóxido. Para avaliação dos efeitos do estado redox da PDI sobre a atividade da oxidase, amostras de PDI foram previamente oxidadas (H₂O₂; 0,5 mM) ou reduzidas (DTT; 0,5 mM). A PDI oxidada (100 nM) aumentou a produção de superóxido em aproximadamente 30%, enquanto a mesma concentração de PDI reduzida promoveu efeito inverso, inibindo a atividade do complexo. A adição de um peptídeo contendo a seqüência peptídica do sítio ativo da PDI inibiu a produção de superóxido em 70%. Dados de imunolocalização e co-localização demonstraram que a interação da PDI com a subunidade p47^{phox} parece ser intensificada pelo estímulo com PMA e envolvem modificações do estado redox de ambas as proteínas. **CONCLUSÕES:** Nossos dados confirmam a associação física e funcional entre a PDI e o complexo NADPH oxidase. Além disso, sugerem que a PDI exerça um importante papel como fator de regulação redox da ativação da oxidase.

Descritores: 1.Isomerase de dissulfeto da proteína 2.NADPH oxidase 3.Espécies de oxigênio reativas 4.Explosão respiratória 5.Fagócitos

SUMMARY

Paes, A.M.A. Mechanisms involved in the interaction of protein disulfide isomerase with NADPH oxidase: Regulatory role on the reactive oxygen species generation by professional phagocytes [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil), 2009. 110p.

Activation of the leukocyte NADPH oxidase requires the assembly of the cytosolic subunits p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox} and Rac2 with the membrane-bound cytochrome b₅₅₈. We have previously shown that the vascular oxidase is regulated by the redox chaperone protein disulfide isomerase (PDI). Taking advantage of the semi-recombinant cell-free system, we sought to investigate the role of PDI in the activation of neutrophil NADPH oxidase. The PDI thiol inhibitors scrambled RNase (100µg/mL) or bacitracin (1mM), almost suppressed superoxide generation. In order to investigate if the redox status of PDI thiols could modulate superoxide generation, PDI was oxidized or reduced by treatment with H₂O₂ (0.5mM) or DTT (1mM), respectively. Oxidized PDI increased by 30% superoxide production, while reduced PDI diminished superoxide generation also in 30%. The addition of a peptide (1µM) containing PDI's exact active site sequence inhibited superoxide production by 70 %. Immuno- and co-localization data demonstrated the interaction of PDI with the subunit p47^{phox} to be intensified by PMA stimulation and to involve redox status exchange of both proteins. Our data confirm the physical and functional association between PDI and the oxidase complex. Moreover, we show a relevant role for PDI as a redox-dependent supportive factor for NADPH oxidase activation.

Descriptors: 1. protein disulfide isomerase 2. NADPH oxidase 3. reactive oxygen species 4. Respiratory burst 5. phagocytes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucócito e a resposta imunológica inata

O sistema inato de resposta imunológica representa uma estratégia altamente conservada, através da qual, efetores celulares e elementos solúveis são arregimentados de modo a compor uma potente defesa contra a ampla variedade de patógenos que continuamente colocam em risco a integridade dos sistemas hospedeiros [1, 2]. Nas últimas décadas, muitos estudos têm examinado em detalhes as ações específicas dos elementos do sistema imune. Em especial, a resposta hospedeira aguda é vista como uma coalizão de elementos antimicrobianos, alguns transitórios e outros duradouros, que colaboram entre si para a criação de um ambiente fagocítico que promova a destruição da maioria dos patógenos invasores [1]. Neste contexto, os leucócitos são especialmente importantes pela sua capacidade de eficientemente engolfar e destruir tais patógenos. Estas células são também conhecidas como fagócitos profissionais e compreendem neutrófilos polimorfonucleados, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Dentre todos, os neutrófilos são os mais abundantes e geralmente os primeiros a aportar aos sítios inflamatórios durante as infecções agudas [3].

Os neutrófilos sempre foram considerados importantes componentes da resposta inflamatória aguda. Muito antes dos estudos realizados por Elie Metchnikoff no final do século XIX, Galeno já havia descrito que o pus inflamatório continha elementos que ele classificou como *bonum et laudabile* (bons e louváveis) [4]. Entretanto, foi apenas com a descrição dos primeiros casos de doença

granulomatosa crônica (DGC), feita por Robert Good em 1959 [5], que maiores incursões na busca dos mecanismos da atividade antimicrobiana dos neutrófilos começaram a surgir [6]. Relatos iniciais deram conta de que neutrófilos oriundos de pacientes com DGC apresentavam fagocitose, quimiotaxia e degranulação semelhantes às observadas em células de pacientes normais [7-9]. Somente em 1967 as primeiras suspeitas da existência de um defeito imunológico foram feitas. Baehner e Nathan [10-12] observaram que estimulação de neutrófilos de pacientes com DGC não promovia os mesmos picos de consumo de oxigênio observados em fagócitos normais, tampouco gerava os produtos característicos do *burst* respiratório. Concomitantemente, Klebanoff [13] demonstrou que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) interagia com a mieloperoxidase (MPO) e halogenatos para gerar uma substância potencialmente bactericida, o ácido hipocloroso, dentro do fagossoma. Trabalhos subseqüentes definiram, então, a importância capital de outra oxidase, a NADPH oxidase, na geração de superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (ERO), na intermediação de uma eficiente atividade antimicrobiana e na promoção de outros eventos inflamatórios [14-16].

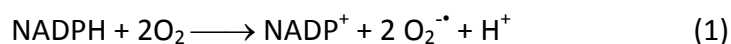
A importância da NADPH oxidase para a função leucocitária foi sobremaneira reforçada com a constatação de que a síndrome clínica observada em pacientes com DGC apresentava padrões de herança associada ao cromossomo X [17] e de que o produto do gene localizado na posição p2.1 era a cadeia pesada do citocromo b_{558} [18-20]. Anteriormente, Segal e Jones [20] haviam identificado esta proteína em vacúolos fagocíticos e observado que a mesma estava ausente ou funcionalmente alterada em pacientes com DGC. A documentação de outras

mutações responsáveis pela ocorrência da doença [21], associada ao desenvolvimento de sistemas livres de células (aqui denominados sistemas *cell-free*) nos quais a atividade da NADPH oxidase fora reconstituída a partir de frações subcelulares de neutrófilos normais ou não [22, 23], permitiram a dissecação dos componentes celulares e elementos reguladores da NADPH oxidase.

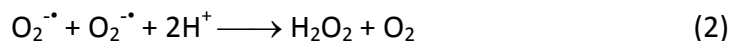
Atualmente, sabe-se que a DGC pode ser causada por alterações genéticas em quaisquer dos componentes da NADPH oxidase, incluindo gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} [24]. Defeitos genéticos nos componentes Rap 1a, Rac ou p40^{phox} não foram ainda descritos. Entretanto, uma mutação dominante negativa no gene da Rac2 foi identificada em uma criança com fenótipo clínico semelhante a uma deficiência de adesão leucocitária [25, 26]. De modo geral, a perda de função por quaisquer dos componentes descritos incapacita os leucócitos destes pacientes a gerar ERO em resposta a infecções virais ou bacterianas [27].

1.2 Composição molecular e regulação da NADPH oxidase

O complexo multimérico da NADPH oxidase gera quantidades relativamente elevadas do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), na ordem de 2 nmol/min para cada 10^6 leucócitos humanos [28, 29]. Segundo Robinson [30], a ativação da NADPH oxidase do fagócito catalisa a produção de $O_2^{\cdot-}$ a partir de oxigênio molecular e NADPH, de acordo com a seguinte reação:



Uma reação de dismutação ocorre com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2):



Os efeitos citotóxicos do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 estão relacionados à habilidade destes em reagir com produtos de outros sistemas microbicidas, nestas células, de modo a gerar outras ERO, tais como: radical hidroxila (OH^{\cdot}), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e ozônio (O_3). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode reagir tanto com ácido hipocloroso (HClO) quanto com óxido nítrico (NO^{\cdot}), neste caso produzindo ONOO^- cuja decomposição gera potentes oxidantes tais como $^{\cdot}\text{NO}_2$ e OH^{\cdot} [31, 32]. O HClO e o NO^{\cdot} são produzidos em fagócitos profissionais pela mieloperoxidase e pela óxido nítrico sintase, respectivamente [13, 33]. O oxigênio singlete, uma forma energeticamente mais excitada do oxigênio, reage com H_2O_2 para formar O_3 , que também reage com H_2O_2 para formar OH^{\cdot} e $\text{O}_2^{\cdot-}$ [34].

A estrutura do complexo NADPH oxidase é relativamente complexa. Ela é composta por seis subunidades multiméricas, as quais se associam mediante estímulo adequado para formar a complexo enzimático ativo e produzir $\text{O}_2^{\cdot-}$. Esta atividade está espacial e temporalmente restrita ao ambiente fagossômico como forma de prevenção da destruição do tecido hospedeiro pelas ERO geradas [28]. A rigorosa regulação da atividade enzimática é primariamente possibilitada por dois mecanismos distintos, quais sejam: (1) separação das subunidades da oxidase em compartimentos subcelulares distintos durante o estado de repouso e (2) modulação de interações protéicas reversíveis entre as mesmas [35].

Duas subunidades da NADPH oxidase, gp91^{phox} e p22^{phox}, são proteínas integrais de membrana. A subunidade gp91^{phox}, a qual também é conhecida como Nox2, contém os componentes responsáveis pela transferência de elétrons. A porção C-terminal da proteína está voltada ao lado citosólico da membrana e contém os sítios de ligação para FAD e NADPH. A porção N-terminal da proteína forma uma sequência de seis domínios em α - hélice aos quais está ancorado um par de grupos heme [36]. Os grupos heme estão orientados perpendicularmente a ambos os lados da membrana, formando um conduto à passagem dos elétrons oriundos do NADPH citosólico em direção ao O₂ extracelular ou intra-fagosômico [37]. A subunidade p22^{phox} apresenta na porção c-terminal uma região rica em prolina (RRP) que interage com o p47^{phox} fosforilado, evento indispensável à ativação do complexo enzimático. Juntas, gp91^{phox} e p22^{phox} formam o citocromo b₅₅₈, caracterizado como o núcleo catalítico do complexo enzimático, mas que permanece em estado latente na ausência das outras subunidades [36]. Estas, desempenham uma função primordialmente regulatória e estão localizadas no citosol durante o estado de repouso. Elas incluem as proteínas multi-domínio p67^{phox}, p47^{phox} e p40^{phox}, assim como Rac2, uma proteína da família Rho de GTPases monoméricas. Em resposta a estímulos apropriados, tais como partículas opsonizadas, lipídios bioativos, peptídeos quimiotáticos ou anticorpos, o complexo formado pelas subunidades citosólicas migra do citosol para a membrana plasmática e associa-se ao citocromo b₅₅₈ [28, 35, 38]. Uma vez montado o complexo, os dois grupos heme localizados na subunidade gp91^{phox} realizam a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, resultando na geração de O₂⁻ [39] (Figura 1).

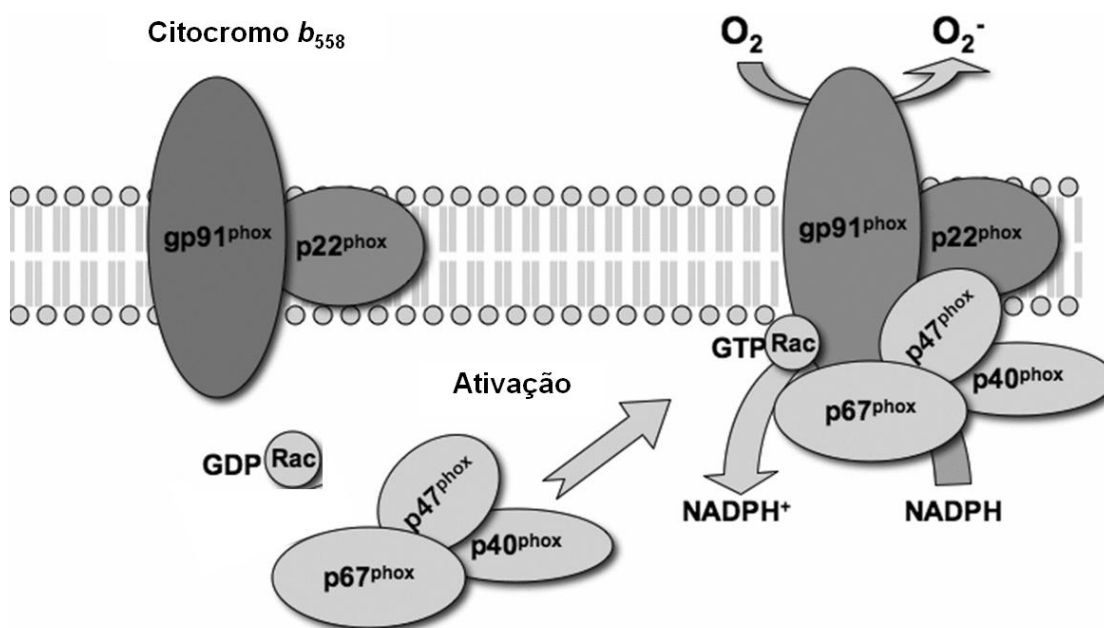


Figura 1 Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito. Em neutrófilos em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão espacialmente segregados entre citosol e membrana. Mediante estímulo, o complexo formado pelas unidades citosólicas p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} e Rac associa-se ao citocromo b_{558} , possibilitando a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, o que resulta na geração de $O_2^{\cdot-}$. Ilustração adaptada de: *Biochem. Soc. Trans.*: 34, 960-964, 2006.

A fosforilação da subunidade p47^{phox} está bem caracterizada como um evento indispensável à ativação do *burst* respiratório em leucócitos polimorfonucleados [40-44]. A subunidade p47^{phox} é constituída por um domínio PX N-terminal, seguido por dois domínios SH3 consecutivos, uma região polibásica auto-inibitória (RPB/AI) rica em resíduos de arginina e lisina, e uma região rica em prolina (RRP) na extremidade C-terminal (Figura 2) [45]. O complexo citosólico é formado pela associação das subunidades p67^{phox} e p40^{phox} à p47^{phox}. A p67^{phox} é constituída por um domínio N-terminal contendo quatro motivos TPR (tetratricopeptídeo) consecutivos, seguidos por uma RRP e dois domínios SH3 que são separados por uma região polibásica (PB1) [35]. A seqüência compreendida entre os resíduos 199 - 210 da p67^{phox} foi caracterizada com um domínio de ativação (DA) da gp91^{phox}, responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o FAD (Figura 2) [46, 47]. O domínio PB1 da p67^{phox} forma um heterodímero com o domínio PB1 da p40^{phox} [47]. O dímero p67/p40^{phox}, por sua vez, ancora-se à RRP da subunidade p47^{phox} através do domínio SH3 C-terminal da subunidade p67^{phox} [48]. A superfície de ligação de ambos os domínios SH3 da subunidade p47^{phox} apresenta resíduos hidrofóbicos que interagem entre si formando uma ranhura que é ocupada por uma alça formada pela seqüência Gly-Ala-Pro-Pro-Arg do domínio RPB/AI. Outras interações hidrofóbicas adicionais contribuem para a manutenção desta conformação que resulta na forma auto-inibida da proteína e retenção do complexo no citosol [45] (Figura 2).

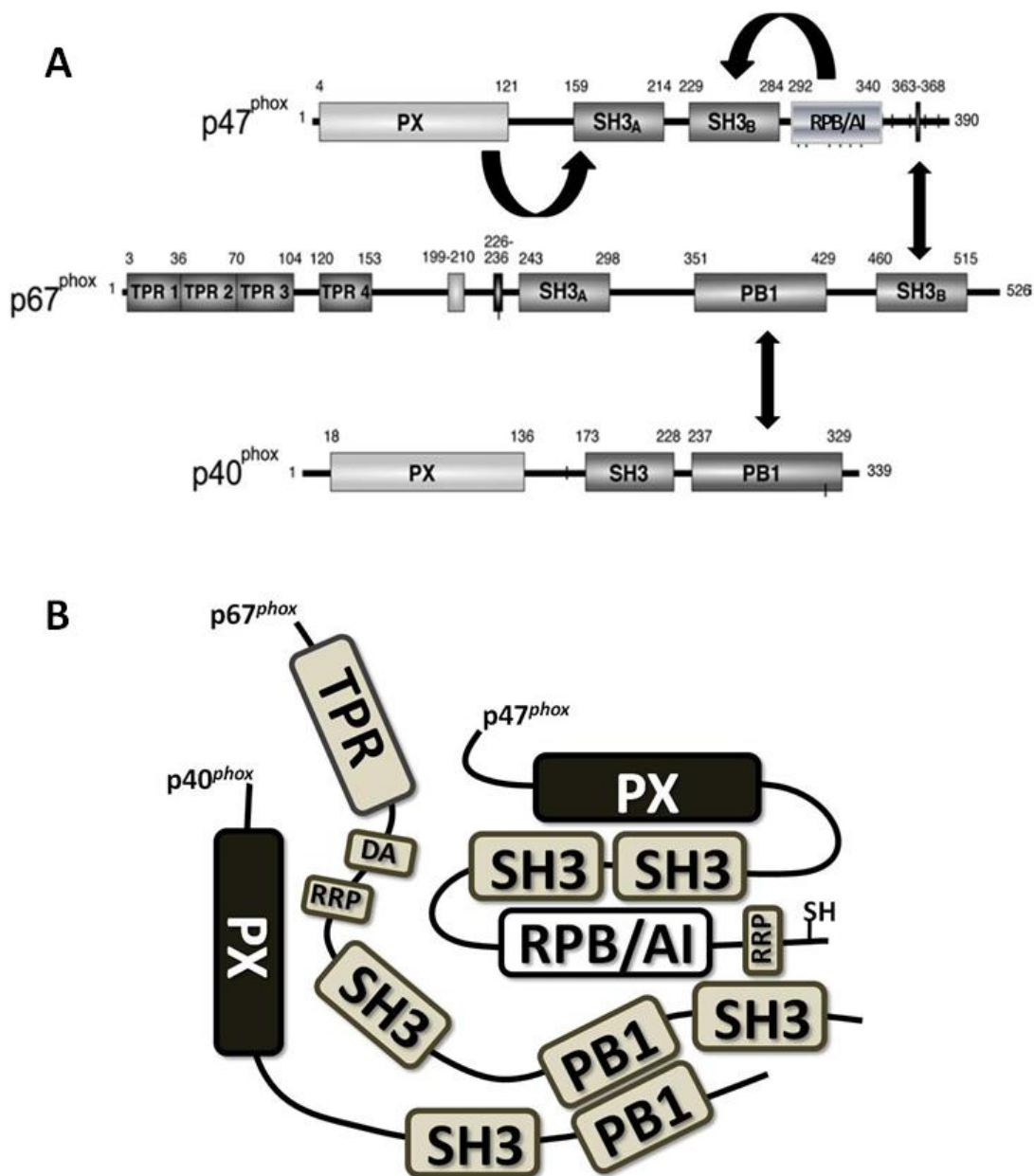


Figura 2 Representação esquemática das subunidades citosólicas do complexo NADPH oxidase. (A) Os domínios estruturais de cada subunidade são mostrados conforme citados no texto. As setas indicam as interações que caracterizam a formação do complexo citosólico em leucócitos em repouso. Ilustração adaptada de: *Biochem J* (2005), 401 - 416. (B) Representação da associação das subunidades citosólicas, de acordo com as descrições das prováveis interações entre mesmas, no citosol de leucócitos em repouso. Ilustração adaptada de: *J. Leukoc. Biol.* 76: 760–781, 2004.

Durante a fagocitose ou sob ação de ativadores, tais como os ésteres de forbol, a subunidade $p47^{phox}$ é fosforilada em múltiplos sítios compreendidos entre os resíduos de serina 303 e 379, a maior parte dos quais localizados no domínio RPB/AI [49]. Esta extensa fosforilação induz alterações conformacionais que resultam na exposição dos domínios SH3, tornando-os hábeis a interagir com a RRP localizada na porção C-terminal da subunidade $p22^{phox}$ [50, 51]. A fosforilação destes resíduos de serina contribui de maneira diferenciada para a ativação da proteína. Mutações individuais de cada serina mostraram que somente a Ser₃₇₉ é essencial para a ativação da oxidase [52], embora estudos com duplos mutantes tenham mostrado que a substituição dos pares de serinas 303/304 ou 359/370 por alaninas reduz drasticamente a ativação do complexo NADPH oxidase [53, 54]. Por sua vez, a substituição das serinas 303/304 por resíduos fosfomiméticos, tais como glutamato e aspartato, resultou em direta interação da $p47^{phox}$ com a $p22^{phox}$ e ativação da NADPH oxidase independentemente de estímulos fosforilantes. A extensa fosforilação das serinas localizadas no domínio RPB/AI resulta em alteração da polaridade desta região e conseqüente ruptura das interações hidrofóbicas que a mantinham na conformação auto-inibida [53, 55, 56]. Este efeito é semelhante ao promovido pelos ânions anfifílicos, conhecidos ativadores da oxidase [45, 57, 58].

A estabilidade do acoplamento do complexo citosólico ao citocromo b_{558} é de importância fundamental para a ativação da oxidase. O domínio PX localizado na porção N-terminal da subunidade $p47^{phox}$ reconhece fosfatidil-inositolis na membrana plasmática [59, 60]. A fosforilação da $p47^{phox}$ rompe a interação entre o domínio PX e o domínio SH3 e, conseqüentemente, contribui para a ancoragem da

subunidade à membrana [61]. Função semelhante é exercida pelo domínio PX da p40^{phox} [62]. A Rac apresenta isoprenilação C-terminal, que é essencial para a sua ancoragem à membrana plasmática. Sob estimulação do fagócito, a Rac é liberada do complexo com a proteína inibitória RhoGDI e associa-se à membrana de maneira independente tanto da p47^{phox} quanto da p67^{phox}. A Rac ativada interage com a p67^{phox} através dos domínios TPR desta, fornecendo uma plataforma estável adicional à associação entre p67^{phox} e gp91^{phox} [63, 64].

Dada a complexidade desta rede de interações, uma questão de relevante importância diz respeito a como a regulação da atividade do complexo é realizada. A regulação da atividade do complexo NADPH oxidase pode ser exercida em três estágios distintos: (a) iniciação, acoplamento e ativação do complexo enzimático; (b) manutenção da atividade e (c) término ou desativação do *burst* respiratório [65]. A disponibilidade do substrato NADPH é um dos principais limitantes da atividade do complexo [29]. Entretanto, a perda de atividade da NADPH oxidase ativada, como observada em sistemas *cell-free*, é insensível à adição do substrato [66, 67]. Nos mesmos sistemas *cell-free*, a desativação do *burst* ocorre em neutrófilos ativados com bactérias opsonizadas ou zimosan, mas não naqueles estimulados com PMA [67]. O acoplamento dos elementos do complexo NADPH oxidase é comumente assumido como um passo que resulta, inequivocamente, na ativação do sistema. Entretanto, Tamura e col. [68], demonstraram a ocorrência de ciclos contínuos de acoplamento/desacoplamento dos elementos dissociáveis, tais como o p47^{phox}, sem prejuízo à manutenção da atividade. Cross e Segal [29] propuseram a existência de um equilíbrio dinâmico entre três estados da oxidase: inativo, pré-

ativado e ativo. Segundo este modelo, a transferência de elétrons não acontece até que ocorra uma mudança conformacional na estrutura do citocromo b_{558} , a despeito do acoplamento das subunidades. O fato da atividade da NADPH oxidase poder ser mantida apesar da dissociação parcial de um ou outro elemento permite supor que outros elementos, que não os já conhecidos, possam interagir e co-regular o seu funcionamento.

A proteína S100A8/A9, uma proteína altamente expressa em leucócitos e que possui domínios de ligação ao cálcio e ao ácido araquidônico, tem sido caracterizada como facilitadora da ativação do complexo NADPH oxidase. Há evidências de que esta proteína associa-se seletivamente à subunidade $p67^{phox}$ e à Rac2, participando da montagem citosólica do complexo de iniciação da NADPH oxidase [69, 70]. Interessantemente, o óxido fenilarsênico (PAO), um oxidante de ditióis, potencializa os efeitos facilitadores da S100A8/A9 sobre a NADPH oxidase [71].

Em suma, fatores que afetem a montagem das subunidades, bem como mudanças conformacionais de suas estruturas, são determinantes primários da regulação da NADPH oxidase fagocítica.

1.3 Regulação redox da NADPH oxidase

As reações de oxidação e redução têm sido consideradas como um importante mecanismo de regulação celular. Neste contexto, as proteínas tiólicas, em especial os ditióis, têm se mostrado como importantes alvos do controle celular

oxidativo por submeterem-se com relativa facilidade a ciclos de oxidação e redução [72]. Está bem estabelecido que a atividade do complexo NADPH oxidase é inibida por reagentes oxidantes ou alquilantes de tióis [73]. Akard e col. [74] mostraram que o N-etil maleimida (NEM), um alquilante de tióis, impede o acoplamento ou a ativação da NADPH oxidase, mas não inibe a atividade de complexos já formados, em um sistema *cell - free*. Por outro lado, quando adicionado a neutrófilos íntegros pré-ativados, NEM induziu a desativação do *burst* desencadeado tanto por PMA [74] quanto por fMLP [75]. O PAO inibe a oxidase de neutrófilos em repouso, mas não daqueles previamente ativados [76, 77]. Mais recentemente, foi demonstrado que aminoácidos sulfúricos, tais como L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e L-cistationina, suprimem a geração de $O_2^{\bullet -}$ por inibirem a translocação das subunidades $p67^{phox}$ e $p47^{phox}$ para a membrana [77]. Após re-análise destes dados, DeCoursey e Ligeti [65] consideraram haver evidências consistentes com a existência de um componente citosólico, prontamente dissociável, que interage com o complexo NADPH oxidase de maneira similar ao NEM e outros alquilantes de tióis.

Em trabalhos recentes, nosso grupo tem estendido estas observações para as isoformas vasculares da NADPH oxidase. Diamida, um oxidante de tióis, o alquilante *p*-cloro mercúrio-fenil-sulfonato (*p*CMPS) e o oxidante 5,5 ditio-bis-nitrobenzoato (DTNB) antagonizaram a atividade da NADPH oxidase vascular. Vários outros compostos também foram utilizados, demonstrando que a presença ou o grau de efeito inibidor da oxidase não é proporcional à redução dos níveis intracelulares de glutatona total, reduzida ou oxidada [78]. Estes dados permitiram sugerir que a redução de tióis críticos no microambiente enzimático, e não apenas o

estado redox celular, poderia influenciar a atividade da NADPH oxidase de maneira semelhante à evidenciada para a tioredoxina, uma ditiol oxidoreductase [79].

1.4 Interação entre NADPH oxidase e Proteína Dissulfeto Isomerase.

As oxidoreductases ditiólicas, especialmente aquelas pertencentes à superfamília das tioredoxinas, são proteínas reconhecidamente importantes para os mecanismos de sinalização redox [80-82]. Os membros desta família têm como principal característica a presença de um motivo catalítico ditiólico CxxC, cuja natureza redox é a principal responsável pela grande variedade de funções encontrada entre seus membros. As cisteínas do sítio ativo atuam tanto como aceptores de elétrons, quando estão na forma dissulfeto (S-S, oxidada), quanto como doadores de elétrons, quando na forma ditiólica (-SH, reduzida). Assim, o sítio redox CxxC cicla reversivelmente entre um e outro estado redox durante reações ou interações que envolvam trocas tiol/dissulfeto [83]. Os resíduos “x” podem ser representados por distintos aminoácidos, embora a natureza química de suas cadeias laterais exerça importância capital à determinação do potencial redox das cisteínas do sítio ativo [84].

Entre os muitos membros da superfamília tioredoxina, a proteína dissulfeto isomerase (PDI) e suas análogas são as únicas que catalizam reações de isomerização, ou seja, reorganizam o posicionamento de pontes dissulfeto através de repetidos ciclos de oxidação e redução [82, 84-86] (Figura 3). A função clássica

da PDI é promover o enovelamento protéico no retículo endoplasmático (RE) [83]. Esta função é assegurada pelo contínuo fornecimento de equivalentes oxidantes realizado pela Ero1 (*Endoplasmic reticulum oxidase - 1*), uma oxidase residente do RE [87]. Esta, por sua vez, é mantida na forma oxidada pela ação da glutathiona oxidada (GSSG) oriunda do citosol [88]. De fato, a ação da PDI é consideravelmente influenciada pelo potencial redutor do meio, ou seja, pela razão entre as concentrações de GSH e GSSG. No RE, dadas as condições relativamente oxidantes, a PDI atua principalmente como uma oxidase, enquanto fora dele atua principalmente como uma redutase [82] (Figura 3). A PDI também possui atividade chaperona, auxiliando o enovelamento de proteínas destituídas de pontes dissulfeto [89, 90]. Esta atividade esta bem caracterizada como sendo independente dos tióis reativos da proteína [91].

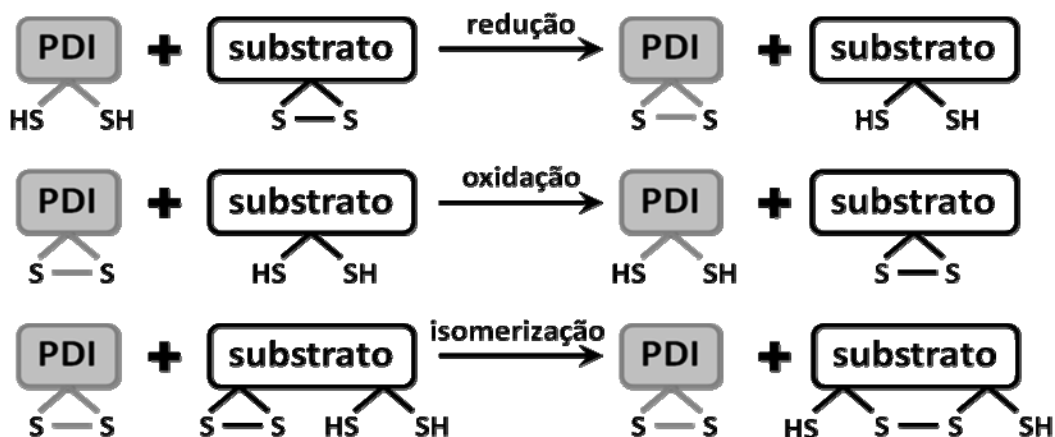


Figura 3 Reações realizadas pelas PDI em substratos protéicos portadores de dissulfetos ou ditióis. A PDI catalisa reações de redução de dissulfetos em ambientes onde o potencial redox local é mais redutor. Entretanto, naqueles menos redutores, como o RE, a PDI tende a intermediar reações de oxidação e/ou isomerização, reações essenciais ao correto enovelamento protéico. Ilustração adaptada de: *Antioxid Redox Signal* 10 (6), 1101 - 1113, 2008.

A PDI está organizada em 5 domínios (*a*, *b*, *a'*, *b'* e *c*), com peso molecular aproximado de 55 kDa [92]. Os domínios *a* e *a'* são homólogos à tioredoxina e apresentam dois sítios ativos independentes, cujas cisteínas reativas estão localizadas na seqüência Trp-Cys-Gly-His-Cys (WCGHC). Os domínios *b* e *b'* também apresentam enovelamento semelhante à tioredoxina, porém não possuem o motivo redox. Finalmente, o domínio carboxi-terminal *c* possui a seqüência KDEL de retenção no RE e tem sido considerado um sítio de ligação ao cálcio (Figura 4) [81, 82, 93, 94]. As cisteínas dos sítios redox existem como ditióis ou dissulfetos, quer sejam intramoleculares quanto mistos com outras proteínas [94]. A atividade oxidase é dependente apenas dos domínios *a* e *a'*, entretanto, todos os quatro domínios semelhantes à tioredoxina são necessários à execução de reações de isomerização mais complexas. Desta forma, percebe-se que a estrutura multidomínio da PDI é essencial à sua plena função e a habilita a interagir e estabilizar tanto proteínas nascentes, parcialmente dobradas, quanto outras mal enoveladas [82]. O domínio *b'* é considerado o sítio primário para a ligação de peptídeos e proteínas não - nativas, as quais interagem com um pequeno bolso hidrofóbico delimitado pelos resíduos Leu₂₄₂, Leu₂₄₄, Phe₂₅₈ e Ile₂₇₂ [95, 96]. Mutações em quaisquer destes resíduos influenciam significativamente a capacidade de reconhecimento e ligação da PDI aos seus substratos [96].

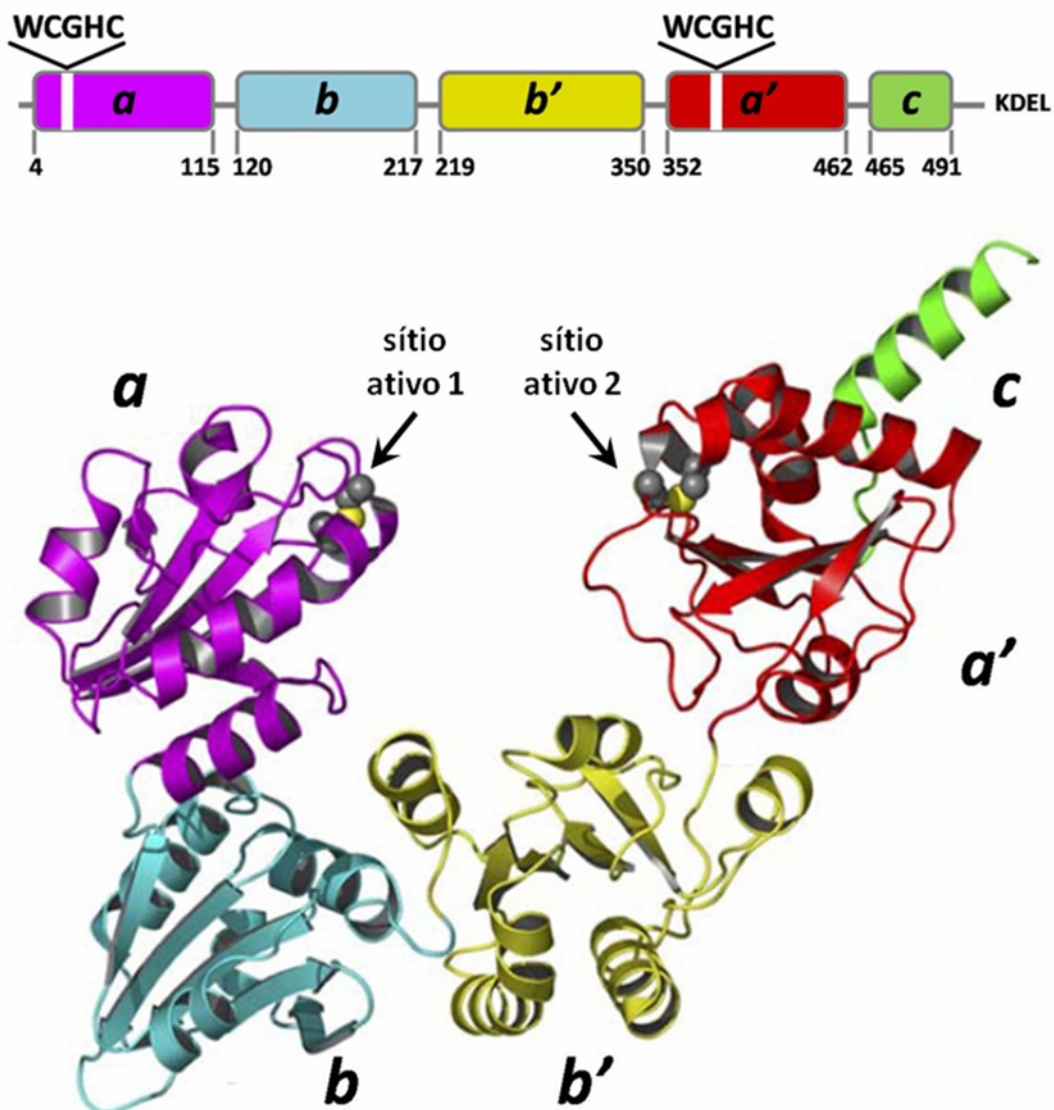


Figura 4 Representação esquemática da estrutura da PDI. A organização multidomínio da PDI é vista com uma sequência de 5 domínios: *a*, *b*, *b'*, *a'* e *c*. Os sítios ativos redox (WCGHC) estão localizados à entrada da estrutura em U, nos domínios *a* e *a'*. Os domínios *b* e *b'* constituem o principal sítio de ligação de substratos e o domínio *c* possui a sequência KDEL de retenção no RE. O diagrama localizado na parte inferior do painel representa a estrutura cristalizada da PDI de levedura segundo descrita por Tian e col. [90]. A representação em cores visa facilitar a identificação dos múltiplos domínios. Ilustração adaptada de: *Antioxid Redox Signal* 10 (6), 1101 - 1113, 2008.

A recente elucidação da estrutura cristalizada da PDI de levedura [90] tem guiado muitos estudos sobre as relações estrutura - atividade da enzima e permitido inferir que a PDI de mamíferos, cuja estrutura cristalizada é conhecida apenas para domínios isolados, deve manter muitas das características encontradas. A estrutura da enzima tem a forma de um U torcido, com os domínios α e α' apresentando-se como domínios flexíveis, nos quais os sítios catalíticos redox confrontam-se um ao outro na entrada da estrutura em U. O domínio b' encontra-se no fundo da estrutura, onde são abundantes os resíduos hidrofóbicos necessários à interação com os substratos (Figura 4). Esta estrutura confirma dados prévios, segundo os quais, os sítios redox da PDI não são essenciais à ligação dos substratos, mas são importantes para a estabilização da mesma [95, 97]. Dados mais recentes têm sugerido que a flexibilidade das regiões de conexão entre os domínios da proteína são essenciais à sua atividade catalítica, posto que permite adequada adaptação a substratos protéicos de variados tamanhos moleculares [98].

A PDI é uma proteína abundante e pode atingir níveis milimolares no RE de hepatócitos [85]. É uma proteína essencial à sobrevivência celular, mesmo em leveduras, de modo que qualquer diminuição na sua expressão pode comprometer a viabilidade celular [82]. Em células de mamíferos, a expressão da PDI mantém a sobrevivência celular e o aumento da sua expressão melhora a resistência celular à apoptose pós-hipóxia em astrócitos ou células endoteliais [99, 100]. A PDI realiza intenso tráfego intracelular e é encontrada na superfície de diversas células procarióticas e eucarióticas [101], de modo que ditióis constituem

aproximadamente 25% dos tióis encontrados nas superfícies celulares [102]. De fato, a PDI é um importante mediador da agregação e secreção plaquetárias, sendo que a adesão plaquetária é inibida por seus antagonistas [103, 104]. Mais recentemente, a PDI foi caracterizada como um estimulador da agregação plaquetária por promover o rompimento de uma ponte dissulfeto específica na molécula da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, importante mediador da agregação plaquetária induzida por agonistas como o colágeno e o ADP [105].

Dados publicados por nosso grupo [106] foram pioneiros ao mostrar que a PDI pode estar envolvida na regulação da atividade da NADPH oxidase em células musculares lisas vasculares (CMLV). A exposição de CMLV a agonistas da NADPH oxidase não alterou a expressão da PDI. Entretanto, aumentou significativamente o tráfego para a membrana plasmática. Em homogenatos de frações de membranas de CMLV expostos a diversos antagonistas da PDI, a atividade da NADPH oxidase foi consistentemente reduzida, a despeito do método utilizado para a mensuração da atividade da oxidase, os quais incluíram espectroscopia de ressonância eletrônica paramagnética (EPR) [106], quimiluminescência com lucigenina [107] ou análise em HPLC dos produtos de oxidação da diidroetidina [108]. Particularmente, um oligonucleotídeo antisense contra a PDI reduziu em 70% a atividade da NADPH oxidase tanto em condições basais quanto sob estímulo com angiotensina II [106].

A interação da PDI com a NADPH oxidase não parece ser apenas funcional. Resultados de co-imunolocalização por microscopia confocal forneceram evidências da interação espacial entre a PDI e a subunidade $\text{p}22^{\text{phox}}$ da NADPH da

oxidase. A transfecção de CMLV com o antisenso da PDI reduziu a intensidade do sinal fluorescente da PDI, bem como a sua co-localização com a subunidade p22^{phox}. Também foi observada co-localização da PDI com as isoformas Nox1 e Nox4 da oxidase [106]. Estes e outros dados recém publicados [107] (Fernandes *et al.*, 2009 *no prelo*) são consistentes com a hipótese de que a PDI está associada ao complexo NADPH oxidase em CMLV e exerce papel regulador sobre sua atividade.

1.5 É possível regular a atividade da NADPH oxidase durante o burst respiratório em neutrófilos?

Os estudos dos mecanismos de acoplamento e regulação da geração de ERO pelo complexo NADPH oxidase dos fagócitos têm sido extensivamente utilizados como modelo para estudos envolvendo as isoformas não-fagocíticas da NADPH oxidase [36, 109-112]. Em células não fagocíticas, a geração de ERO atende mais a uma função de sinalização e menos de defesa [109]. Nestas, as ERO contribuem decisivamente para a sustentação celular, afetando quase todos os aspectos da sinalização celular, desde a expressão gênica, proliferação, migração, até a morte celular e apoptose [110]. Deste modo, a caracterização e compreensão dos mecanismos de sinalização redox têm trazido uma nova dimensão às redes de sinalização, especialmente aquelas relacionadas à regulação do sistema cardiovascular [112, 113].

Vários relatos têm demonstrado que a elevada geração de $O_2^{\bullet-}$ por leucócitos fagocíticos é uma observação freqüente em condições patológicas como aterosclerose, hipertensão e lesão pós-isquêmica [114, 115]. Recentemente, Vendrov e col. [116] mostraram que a atividade NADPH oxidase de monócitos e macrófagos contribui para a formação da lesão aterosclerótica de forma proporcional à das oxidases presentes nas células da parede vascular. O nocaute combinado dos genes da apolipoproteína E ($apoE^{-/-}$) e $p47^{phox}$ em camundongos resultou em diminuição significativa da aterosclerose habitualmente observada neste modelo [117, 118]. Há evidências de que ERO oriundas de fagócitos possam exercer outras funções sinalizadoras, além da defesa antimicrobiana. ERO produzidas por macrófagos exercem um importante papel sinalizador na seleção, maturação e ativação de células T [119].

Os leucócitos, apesar de sua curta meia-vida e do fato de possuírem RE e ribossomos escassos, não só expressam abundantemente a PDI como a liberam em forma solúvel quando estimulados com ésteres de forbol [120]. Experimentos em andamento no nosso laboratório têm demonstrado que antagonistas da PDI reduzem a capacidade fagocítica de macrófagos (Santos, C.X., dados não publicados). Além disso, em publicação recente, nosso grupo demonstrou que a PDI co-imunoprecipita com as subunidades $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ de neutrófilos, estejam estes ativados ou não [107].

Dadas a relevância das ERO oriundas de leucócitos circulantes para mecanismos fisiopatológicos do sistema cardiovascular e as novas funções celulares que têm sido atribuídas às mesmas, nos propusemos a investigar se a proteína

dissulfeto isomerase é capaz de interagir e regular a atividade da NADPH oxidase do fagócito durante o *burst* respiratório. Para tanto, empregamos, entre outras técnicas, um sistema *cell-free* semi-recombinante da NADPH oxidase do neutrófilo. Os sistemas *cell-free* são considerados uma ferramenta valiosa no estudo dos mecanismos de regulação da geração de ERO, uma vez que, a atividade da isoforma fagocítica da oxidase é regulada essencialmente pela associação de seus componentes e não depende da expressão protéica, como nas isoformas vasculares [36]. Ademais, tratam-se de sistemas abertos, moduláveis e, principalmente, fidedignos ao que ocorre no neutrófilo *in vivo* [121]. Os dados aqui mostrados fornecem suporte experimental à hipótese da associação física da PDI ao complexo NADPH oxidase e propõem um mecanismo pelo qual a PDI regula a atividade da oxidase de forma dependente do seu estado redox.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o mecanismo da interação física e funcional da proteína dissulfeto isomerase com o complexo enzimático da NADPH oxidase em neutrófilos humanos em repouso e sob ativação do *burst* respiratório.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar a(s) subunidade(s) do complexo NADPH oxidase com a(s) qual(is) a proteína dissulfeto isomerase interage.

Determinar os efeitos da proteína dissulfeto isomerase sobre a geração de ERO em um sistema *cell-free* semi-recombinante.

Caracterizar os mecanismos redox envolvidos na interação entre a proteína dissulfeto isomerase e a NADPH oxidase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes químicos

Ácido araquidônico, bacitracina, diamida, peptídeo metil-leucil-prolil formilado (fMLP), scrambled RNase (scrRNase), β -fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (β NADPH), acetato de forbol miristato (PMA), isopropil β -D-tiogalacto-piranosídeo (IPTG), N-etilmaleimida (NEM), ditioneitol (DTT), guanosina 5'-O - [3-(tio) trifosfato] (GTP γ S), superóxido dismutase (SOD) e citocromo c foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. Ficoll-Hypaque™, Percoll-Hypaque™, proteínas A e G Sepharose™, glutationa Sepharose™ 4B foram adquiridos da GE Healthcare. Ácido imidilestilbeno 2,2-disulfônico(AMS) da Invitrogen Co. Glutationa reduzida (GSH) e tris 2-carboxietilfosfina (TCEP) da Calbiochem. Triton X-100 da Amresco. Complete™ Cocktail Tablets (inibidores de proteases) da Roche. Meio de montagem Vectashield® da Vector Laboratories. Anticorpos policlonais contra p47^{phox} e p67^{phox} foram uma generosa doação do Dr. Bernard M. Babior (The Scripps Research Institute, La Jolla EUA). O anticorpo anti-p22^{phox} foi doado pelo Dr. Mark T. Quinn (Montana State University, Mozeman, EUA). Os anticorpos primários utilizados nos experimentos de imuno-localização e imunoprecipitação foram anti-PDI (Affinity Bioreagents), anti-p22^{phox}, anti-p47^{phox}, anti-p67^{phox} e anti-gp91^{phox} (Upstate Biotechnology). Anticorpos secundários conjugados aos fluoróforos Alexa 488 (Molecular Probes) e Cy5 (Jackson Immuno Research). Reagente de Bradford para dosagem de proteínas (BioRad). Todos os demais sais e reagentes utilizados

apresentavam grau de pureza analítica (>95%) e foram obtidos de companhias de reconhecida qualidade.

3.2 Estimulação dos neutrófilos e fracionamento subcelular

A preparação das frações subcelulares de neutrófilos foi realizada segundo método descrito por Kjeldsen e col. [122], com algumas modificações. Amostras de sangue fresco (450 ml) foram colhidas em bolsas contendo citrato de sódio (25 mM), a partir de doadores saudáveis. As células mononucleadas foram separadas das células polimorfonucleadas (PMN) e eritrócitos por centrifugação (800 × g, 25°C, 30 min.) em mistura com Ficoll - Hypaque® (1:1). O *pellet* resultante da centrifugação anterior foi ressuscitado em tampão de hemólise (NH₄Cl 150mM; NaHCO₃ 10mM; EDTA 0,1 mM), mantido em banho de gelo por 10 minutos e centrifugado (800 × g, 4°C, 5 min.) para separação dos PMN livres de hemácias. Após ressuspensão em tampão fosfato (PBS, 50 mM, pH 7,4), as células foram contadas em câmara de Neubauer e separadas em alíquotas contendo 1 × 10⁸ células. Cada alíquota foi lavada em PBS gelado (800 × g, 4°C, 5 min.) e ressuscitada em 1 ml de tampão RB [*Relaxation buffer* (KCl 0,1M; NaCl 3mM; MgCl₂ 3,5mM; PIPES 10mM; pH 7,3) suplementado com glicose (5,5mM) e CaCl₂ (10mM)].

Os neutrófilos contidos nestas alíquotas foram estimulados com PMA (100 ng/ml, 37°C, 12 min.), fMLP (1μM, 37°C, 2 min.) ou ácido araquidônico (100μM,

37°C, 5 min.). Amostras controle foram mantidas à mesma temperatura, pelos mesmos intervalos de tempo, porém sem adição de quaisquer dos ativadores. Estas alíquotas de neutrófilos, estimulados ou não, foram utilizadas para experimentos com células íntegras (imunofluorescência) ou submetidas a fracionamento subcelular segundo protocolo descrito a seguir.

Neutrófilos obtidos segundo a descrição acima foram ressuspensos em tampão de cavitação (KCl 100mM; NaCl 3mM; MgCl₂ 3,5mM; PIPES 10mM; ATP 1mM) suplementado com inibidores de protease. Os neutrófilos presentes nas alíquotas foram rompidos por cavitação em bomba de nitrogênio (N₂, 450 *psi*, 20 min.), sob agitação contínua. Ao final da cavitação, as amostras foram tratadas com EGTA (125μM) e aplicadas cuidadosamente sobre gradiente de Percoll-Hypaque® de dupla densidade, cuja tonicidade havia sido ajustada em mistura de água destilada e tampão RB 10x (KCl 1M; NaCl 30mM; MgCl₂ 35mM; ATP 10mM; EGTA 1,25mM; PIPES 100mM; pH 6,8), de modo a render soluções com densidades de 1,05 e 1,12 g/ml. A mistura foi centrifugada (18.000 × g, 4°C, 30 min.) para a obtenção de quatro bandas visíveis e distintas, as quais foram identificadas como sendo as frações de citosol, de membranas (γ), de grânulos específicos (β) e de grânulos azurofílicos (α) (Figura 5). Para uso em sistemas *cell-free* semi-recombinantes, a fração de membranas foi submetida a uma centrifugação adicional (35.000 × g, 2 h; 4°C) e o pellet resultante foi ressuspensionado em tampão RB contendo sacarose 80%. Todas as frações foram mantidas sob temperatura de -70°C até que fossem utilizadas.

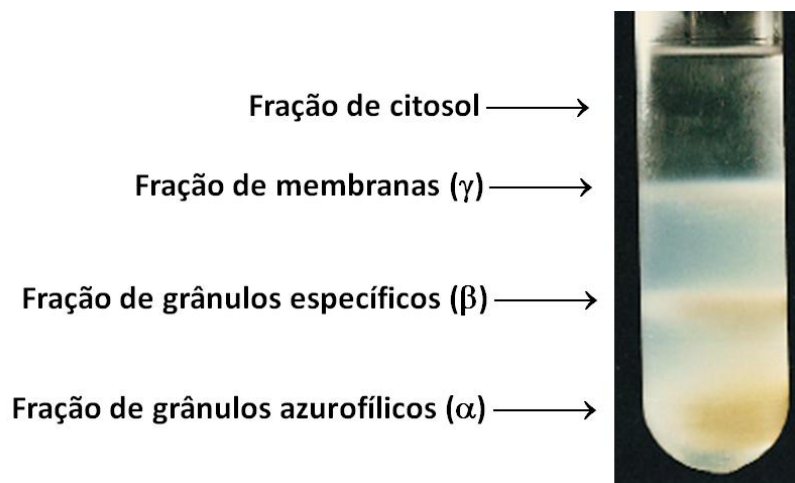


Figura 5 *Fracionamento subcelular de neutrófilos em gradiente de Percoll-Hypaque®*. Foto representativa das frações obtidas após centrifugação de neutrófilos cavitados em gradiente de Percoll-Hypaque® de dupla densidade. Adaptado de: *J Immunol Met* (232): 131–143, 1999.

3.3 *Microscopia confocal de imunofluorescência*

A preparação de neutrófilos para microscopia de imunofluorescência foi feita segundo o método descrito por Bingham e col. [123], com algumas modificações. Neutrófilos isolados, estimulados ou não com PMA, foram obtidos segundo método descrito no item 3.2. As células foram lavadas em PBS (800 × g, 4°C, 5 min.) e fixadas em solução de paraformaldeído 4%. As células foram lavadas em PBS (50 mM) e incubadas por 12 horas, a 4°C, em solução PBS/Triton X-100

(0,3%) contendo os anticorpos primários contra PDI, gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} ou p67^{phox} na proporção volumétrica de 1:100. Após lavagem com PBS (x2), as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados aos fluoróforos Cy5 (1:100, PDI) ou Alexa 488 (1:100, proteínas *phoxes*), durante uma hora, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após três lavagens adicionais, as células foram ressuspensas em meio de montagem Vectashield™ e montadas em lâminas de microscopia. Os estudos de co-localização foram realizados com o auxílio de um microscópio confocal de escaneamento à *laser* (Modelo LSM 510 META, Carl Zeiss) em modo *multitracking*.

3.4 Imunoprecipitação, eletroforese de proteínas e western blotting

Alíquotas de frações de citosol ou membranas de neutrófilos contendo 1×10^8 células foram obtidas como descrito no item 3.2 e submetidas a imunoprecipitação. Para tanto, foram incubadas com anticorpos primários contra p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, ou PDI (1:100 v/v) diluídos em 400 µL de tampão de solubilização (NaCl 150mM, EDTA 5mM, Tris 10mM, NP-40 1%, SDS 1%, deoxicolato de sódio 1%, pH 7,5) e incubados a 4°C, por 12 horas, sob agitação contínua por inversão. Os meios de incubação foram carregados com 100 µl de proteína A Sepharose™ previamente lavadas e postas em agitação contínua por inversão (2 h, 4°C). As amostras foram lavadas três vezes em tampão de solubilização (800 × g, 4°C, 5 min.) e fervidas em *Laemmli buffer* (tampão de amostra) a 100°C por 5 minutos. As proteínas presentes nas amostras foram separadas por eletroforese em

gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), cuja densidade variou de acordo com o peso molecular da proteína se que buscava detectar. A detecção das proteínas imunoprecipitadas foi realizada mediante transferência para membranas de nitrocelulose, bloqueio em leite desnatado 5% e posterior incubação com os anticorpos primários contra PDI (1:1.000), p22^{phox} (1:1.000), p47^{phox} (1:5.000) ou p67^{phox} (1:5000), por 12 horas a 4°C. Após incubação primária, as membranas foram incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários e as proteínas interativas reveladas por quimiluminescência.

3.5 Fracionamento celular em Triton X-100 (associação ao citoesqueleto)

Frações solúveis ou insolúveis em Triton X-100 foram obtidas a partir de neutrófilos estimulados ou não, conforme descrito no item 3.2, seguindo a técnica descrita por Curnutte e col. [124]. As células foram lisadas após incubação em tampão de citoesqueleto (Tris HCl 20mM, MgCl₂ 3mM, Triton X-100 0,5%, PMSF 2mM, leupeptina 10µg/ml e sacarose 8%) por 15 minutos em banho de gelo. As frações solúveis e insolúveis foram obtidas por centrifugação a 100.000 × g (60 min., 4°C). As proteínas presentes na fração solúvel foram precipitadas com mistura de metanol/clorofórmio, mediante vigorosa agitação seguida de centrifugação (12.000 × g, 10 min., 4°C) e resuspensão em tampão de amostra. A fração insolúvel, a qual foi denominada fração de citoesqueleto, foi também ressuspensa em tampão de amostra. As proteínas contidas em ambas as frações foram separadas por

eletroforese em SDS-PAGE 10% e analisadas por *western blotting*, conforme descrito no item 3.4, para detecção das proteínas PDI, p47^{phox} e p67^{phox}.

3.6 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes resultantes da fusão da glutathione S - transferase (GST) com as proteínas PDI, p47^{phox}, p67^{phox} e Rac2 foram individualmente expressas em culturas de *Escherichia coli* transformadas com plasmídeos pGEX-1λT contendo os insertos de cDNA codificadores das mesmas, segundo técnica descrita por Park e col. [125]. Inicialmente as culturas foram crescidas em 100 ml de meio TB (*Terrific Broth*) contendo ampicilina 0,1% (12 - 16 h, 250 rpm, 37°C). As culturas foram então diluídas em meio TB (1L) e mantidas sob agitação (250 rpm, 37°C) até que fosse atingida uma $DO_{600nm} = 0,6 - 0,8$. A síntese protéica foi induzida com a adição de IPTG (0,1 mM) e a cultura crescida por 3 horas adicionais sob a mesma agitação a 30°C (para expressão da GST-Rac2) ou a 37°C (para expressão da GST-PDI, GST-p47^{phox} e GST-p67^{phox}). Ao final das incubações, as bactérias foram recuperadas por centrifugação (5.000 × g, 4°C, 20 min.), ressuspendidas em PBS suplementado com inibidores de proteases (para GST-p47^{phox}) ou em tampão de lise (Tris-HCl 50mM; NaCl 50mM, MgCl₂ 50mM; DTT 1mM; PMSF 1mM; pH 7,6; para GST-PDI, GST-p67^{phox} e GST-Rac2) e rompidas por sonicação. Após centrifugação (18.000 × g, 4°C, 15 min.), o sobrenadante contendo as proteínas recombinantes foi mantido sob agitação orbital (1h, 4°C) em presença

da resina Sepharose 4B para purificação das proteínas. As proteínas de fusão associadas à resina foram recuperadas através da eluição desta em solução de GSH 5mM em Tris-HCl 50mM, por 30 minutos. O excesso de GSH das soluções foi removido por diálise contra tampão RB (*overnight*). Amostras de cada proteína recombinante foram ensaiadas por SDS-PAGE e *western blotting* para avaliação da pureza das mesmas. Alíquotas de concentração conhecida foram armazenadas à -70°C até o momento do uso.

Para os ensaios nos quais o estado redox da PDI constituía questão relevante, amostras de GST-PDI foram previamente reduzidas [PDI-(SH)₂, DTT 1 mM, 30 min] ou oxidadas [PDI-S₂, H₂O₂ 0,5 mM ou diamida 0,5 mM, 30 min]. O excesso dos agentes oxidantes ou redutores foi eliminado por diálise das amostras contra PBS (50mM, pH 7,4). A efetiva redução ou oxidação das amostras foi verificada pela determinação quantitativa de grupos sulfidríla (-SH), segundo método descrito por Ellman [126].

3.7 Síntese de peptídeos

Peptídeos curtos, contendo 12 resíduos de aminoácidos em extensão, foram obtidos por síntese em fase sólida utilizando um sintetizador múltiplo de oito canais, modelo PSSM-8 (Shimadzu Inc., Japão). A purificação dos mesmos foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em um sistema HPLC-Waters e caracterizados por espectrometria de massa, com o equipamento Triplo

Quadrupolo (Quattro) e MALDITOF T (E Micromass). Todos os procedimentos de síntese e purificação foram realizados pelo Setor de Síntese de Peptídeos do Laboratório de Imunologia do InCor/FMUSP e constituíram uma generosa doação do Prof. Dr. Edécio Cunha Neto. Em caráter mais específico, os peptídeos continham o motivo redox da PDI na sua sequência original WCGHG (CxxC) ou em uma conformação ditiólica alternativa (CxC). Um peptídeo controle *scrambled* [102], cujas cisteínas não mais compunham um ditiol, e outro com substituição das cisteínas por alaninas (AxxA) também foram sintetizados, conforme pode ser observado na Figura 6. A sequência peptídica foi extraída daquela descrita para a PDI de *Oryctolagus cuniculus* (coelho, nº de acesso P21195), cuja homologia à PDI humana é superior a 95%.

Seqüência	Abrev.	Descrição
VEFYAPWCGHCK	CxxC	Seqüência idêntica à original, representa o motivo redox da PDI.
VGCPCKWAYHEF	CxC	Mesmos resíduos da seqüência original, porém compondo um ditiol alternativo.
FCYPKACEWGHV	SCR	Mesmos resíduos da seqüência original, porém sem compor um ditiol clássico.
VEFYAPWAGHAK	AxxA	Seqüência idêntica à original, porém com as Cys substituídas por Ala.

Figura 6 Peptídeos baseados no motivo redox da PDI. São apresentadas a composição e seqüência de aminoácidos dos peptídeos similares à PDI, bem como descrição dos mesmos.

3.8 Ensaio da geração de $O_2^{\cdot-}$ em sistema cell-free semi-recombinante

A transferência de um elétron do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para o citocromo *c*, promovendo sua redução, foi utilizada como fundamento para a medição da atividade NADPH oxidase, seguindo técnica utilizada por Lopes e col. [41], dentre outros. A mistura de reação contendo GST-Rac2 (105 pmol) previamente ativada com $GTP\gamma S$ (160 μM), 5×10^6 equivalentes celulares de membranas de neutrófilos, ATP (1mM), GST-p47^{phox} (70 pmol) e GST-p67^{phox} (70 pmol) diluídos em tampão RB, foi incubada a 30°C por 10 minutos. Após a incubação, a mistura de detecção composta por citocromo *c* (140 nM) e ácido araquidônico (0,2 mM) foi adicionada à reação e a geração de $O_2^{\cdot-}$ desencadeada pela adição de NADPH (160 μM). A redução do citocromo *c* foi seguida em 550 nm em um espectrofotômetro de duplo feixe (Modelo DU 640, Beckman Coulter, EUA) lida contra uma referência contendo os mesmos componentes, porém acrescida de 150 unidades de SOD. Os valores de referência foram posteriormente subtraídos dos valores experimentais para cada leitura tomada em intervalos de 10 segundos durante 10 minutos. A atividade do complexo enzimático foi derivada a partir do coeficiente de extinção molar do citocromo *c* ($\Delta E_{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e expressa como nmoles $O_2^{\cdot-}/\text{min}/10^7 \text{ eq.cel.}$, ou seja, como o número de nanomoles de $O_2^{\cdot-}$ gerados por minuto por amostra contendo o equivalente à membrana de 10^7 neutrófilos.

Nos ensaios contendo Bacitracina (1 mM) ou scrambled RNase (100 µg/ml), inibidores farmacológicos da PDI, estes agentes foram incubados previamente à adição da mistura de detecção e a atividade medida como descrito acima. Procedimento idêntico foi realizado quando da incubação de PDI (50-200 nM) previamente reduzida [PDI-(SH)₂] ou oxidada [PDI-S₂], conforme descrito no item 3.6. Incubações adicionais foram feitas com os peptídeos sintéticos descritos no item 3.7. Nestes experimentos, os peptídeos foram individualmente incubados na concentração final de 1 µM.

3.9 Ensaio de precipitação por afinidade (GST pull-down assay)

Amostras de GST-PDI (5µg) foram previamente tratadas, conforme descrito no item 3.6, para obtenção das mesmas em diferentes estados redox, a saber: nativa (não tratada), reduzida ou oxidada. A seguir, foram incubadas com alíquotas contendo 1×10^8 equivalentes celulares de fração de citosol ou de membranas oriundas de neutrófilos estimulados ou não com PMA. Após 12 horas de incubação sob agitação por inversão, 40 µl de glutathione Sepharose 4B™ foram adicionados a cada alíquota e mantidos em incubação adicional por 2 horas, nas mesmas condições anteriores. A adição desta resina teve a finalidade de extrair a proteína de fusão GST-PDI, bem como proteínas a ela associadas, do meio de incubação. A resina presente em cada alíquota foi recuperada por centrifugação (800 × g, 4°C, 5 min.) e submetida a três lavagens consecutivas em tampão RB (800 × g, 4°C, 5 min.),

seguidas por ressuspensão em tampão de amostra e fervura a 100°C. Alíquotas contendo apenas a proteína GST foram submetidas ao mesmo tratamento para controle do método. Para imunodeteção das subunidades p47^{phox} e p67^{phox}, todas as alíquotas foram submetidas a SDS-PAGE e *western blotting*, conforme descrito no item 3.4.

3.10 Ensaio da incorporação de derivado maleimídico em cisteínas oxidadas (Determinação do estado redox protéico *in vivo*)

A determinação do estado redox da PDI e p47^{phox} *in vivo* foi realizada segundo o método descrito por Jessop e col. [127], com modificações. Frações de citosol e de membranas de neutrófilos estimulados ou não com PMA foram obtidos conforme descrito no item 3.2. Imediatamente após o fracionamento celular, as amostras foram submetidas a bloqueio das cisteínas reduzidas (tiólicas) por alquilação com NEM (20 mM, 4°C, 20 min.). Após ajuste do conteúdo protéico de cada amostra para 50 µg, as cisteínas oxidadas na forma de dissulfetos foram reduzidas pela adição de TCEP (10 mM, 25°C, 15 min.). A seguir, os tióis presentes nestas cisteínas recém reduzidas foram alquilados com AMS (15 mM, 25°C, 1h). Cada molécula de AMS possui peso molecular aproximado de 0,5 kDa. A forma oxidada da proteína foi, assim, detectada pela maior incorporação do derivado maleimídico, o qual confere à proteína maior peso molecular e menor mobilidade eletroforética. As amostras foram fervidas em tampão de amostra não redutor e

analisadas por SDS-PAGE e *western blotting*, como descrito previamente, para imunodeteção das formas oxidadas e/ou reduzidas de PDI e p47^{phox}. Amostras de PDI recombinante, previamente oxidadas ou reduzidas, foram submetidas ao mesmo protocolo para caracterização da variação de peso molecular causada pela incorporação da probe.

3.11 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As comparações entre grupos foram realizadas por análise de variância [128], seguida pela aplicação de teste confirmatório de Newman-Keuls, quando necessário, utilizando o programa GraphPad Prism Versão 5.0 (GraphPad, San Diego, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando obtidos valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Geração de superóxido é reduzida por inibidores da PDI

Em estudos anteriores, nosso grupo mostra consistentemente que inibidores da PDI reduzem a geração de ERO, em especial de $O_2^{\bullet-}$, pelas isoformas não-fagocíticas da NADPH oxidase, independentemente do método de mensuração utilizado [106-108]. Assim, buscamos inicialmente caracterizar os efeitos de inibidores farmacológicos da PDI sobre a atividade da NADPH oxidase fagocítica. Para tanto, a geração de $O_2^{\bullet-}$ foi avaliada em um sistema *cell-free* semi-recombinante, onde proteínas recombinantes das subunidades citosólicas da oxidase (*GST-p67^{phox}*, *GST-p47^{phox}* e *GST-Rac2*) foram adicionadas a homogenatos de membranas de neutrófilos em repouso e pré-incubadas com inibidores farmacológicos da PDI, bacitracina (1mM) e *scrambled* RNase (100 μ g/ml). A geração de $O_2^{\bullet-}$ em presença de NADPH foi ativada com ácido araquidônico (200 μ M) e derivada a partir da determinação espectrofotométrica da redução do citocromo *c* em 550nm, lida contra um controle contendo SOD (150 UI).

Como visto na Figura 7, a atividade da NADPH oxidase foi reduzida em aproximadamente 75% após a incubação com *scrambled* RNase (de $6,40 \pm 0,55$ para $1,65 \pm 0,29$ nmols $O_2^{\bullet-}$ /min/ 10^7 eq. cel.), $p < 0,001$. A adição de bacitracina, um conhecido inibidor da atividade isomerase da PDI [129], aboliu completamente a geração de $O_2^{\bullet-}$ pelo sistema (Figura 7). A PDI é amplamente expressa em neutrófilos e pode ser encontrada associada à membrana dos mesmos, tanto em condição de repouso, quanto após estímulo com PMA (100 ng/ml) (Figura 7,

inserto). Deste modo, os efeitos descritos acima devem ser decorrentes da ação destes inibidores sobre a PDI presente no homogenato de membranas.

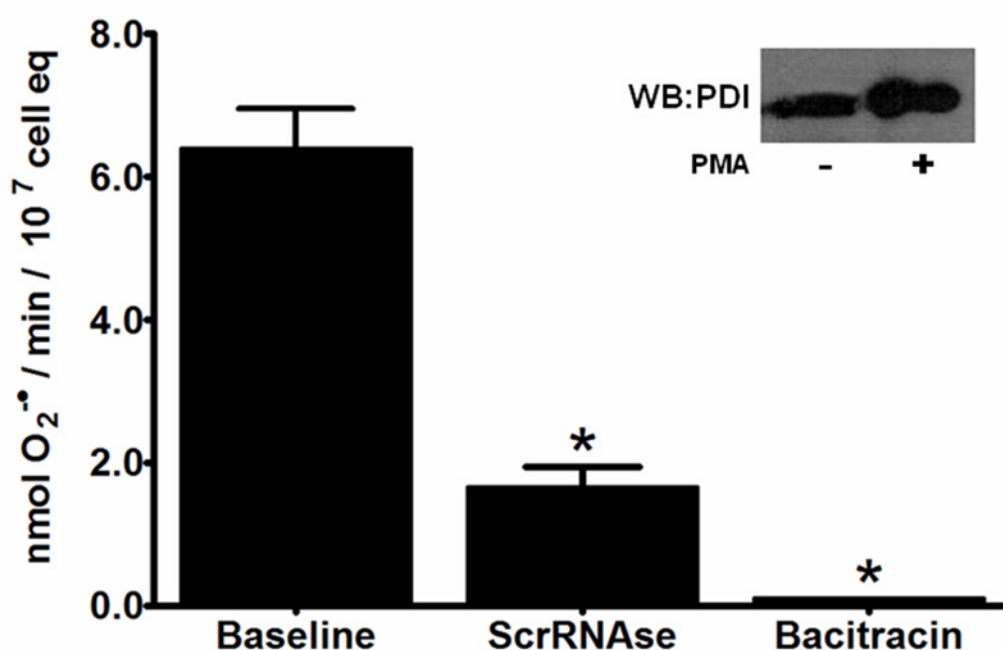


Figura 7 Atividade NADPH oxidase é reduzida por inibidores da PDI em um sistema *cell-free* semi-recombinante. Um sistema *cell-free* contendo 5×10^6 eq. cel. de membrana, 70 pmol de GST-p47phox, 105 pmol de GST-Rac2 e 75pmol de GST-p67phox foi utilizado para avaliar a geração de $O_2^{\bullet-}$. Os experimentos foram realizados na ausência (basal) ou presença de antagonistas da PDI, scrambled RNAse (100 μ g/ml) ou bacitracina (1 mM), adicionados ao sistema antes da ativação da oxidase. As colunas e barras verticais representam média \pm e.p.m. de três experimentos individuais (* $p < 0,001$ vs. basal). Inseto: *Western blot* ilustrativo da presença da PDI na membrana de neutrófilos ativados ou não com PMA (100 ng/ml), conforme descrito em Material e Métodos.

4.2 O efeito inibitório da PDI sobre a atividade da NADPH oxidase do neutrófilo é dependente do seu estado redox

Considerando que a atividade isomerase da PDI é dependente do estado redox dos seus tióis, os resultados acima foram sugestivos de que os efeitos da PDI sobre a atividade da NADPH oxidase pudessem envolver mecanismos redox. Para investigar esta hipótese, amostras de PDI recombinante foram previamente reduzidas [DTT 1 mM, PDI-(SH)₂] ou oxidadas [H₂O₂ 0,5 mM, PDI-S₂] e então adicionadas à mistura de reação de um sistema *cell-free* semi-recombinante, como descrito acima. A adição de PDI-(SH)₂ nas concentrações finais de 50 e 100 nM reduziram as taxas de geração de O₂^{-•} de 6,03 ± 0,27 para 4,03 ± 0,47 e 4,37 ± 0,57 nmol O₂^{-•} /min/10⁷ eq. cel., respectivamente, p < 0,01 (Figura 8A). Por outro lado, a incubação de PDI-S₂ (100 nM) estimulou a atividade da NADPH oxidase, aumentando a geração de O₂^{-•} para 7,97 ± 0,28 nmol O₂^{-•} /min/10⁷ eq. cel., p < 0,05 (Figura 8B). É importante notar que a adição de maiores concentrações de PDI, seja reduzida ou oxidada, não alterou a atividade do complexo quando comparada a ativação em ausência da proteína. Embora este dado pareça controverso, sabe-se que a adição de um dos componentes do sistema *cell-free* em quantidades excessiva em relação aos demais pode resultar em ausência de efeitos adicionais [130].

A observação de efeitos opostos entre a PDI-(SH)₂ e a PDI-S₂ alertaram para o fato de que a ação da PDI sobre a atividade do complexo NADPH oxidase poderia

ser dependente do estado redox de seus sítios ativos. Para responder a esta questão, a geração de $O_2^{\bullet-}$ foi ensaiada no mesmo sistema *cell-free* já descrito, entretanto em presença de peptídeos competitivos. Tais peptídeos continham ditióis idênticos ao encontrado na sequência WCGHC do sítio ativo da PDI (CxxC, 1mM) ou uma forma alternativa do mesmo (CxC, 1 mM). Como controles foram utilizados peptídeos nos quais as cisteínas foram substituídas por alaninas (AxxA, 1 mM) ou estavam presentes em uma sequência aleatória (SCR, 1 mM). Ambos os peptídeos que continham cisteínas adjacentes na forma de ditióis reduziram a atividade NADPH oxidase em mais de 70% [de $5,98 \pm 0,24$ para $1,65 \pm 1,0$ (CxxC) ou para $2,32 \pm 0,62$ nmol $O_2^{\bullet-}$ /min/ 10^7 eq. cel. (CxC)], $p < 0,01$ vs. basal (Figura 9). Este mesmo efeito inibitório não foi observado quando as cisteínas foram substituídas por alaninas (AxxA) ou embaralhadas de modo a não formarem um ditiol clássico. O estado redox das cisteínas presentes nos peptídeos CxxC e CxC foi determinado através da quantificação do número de tióis livres com DTNB, segundo método descrito por Ellman [126]. O resultado mostrou que aproximadamente 80% das cisteínas estavam em estado reduzido. Para descartar a possibilidade de que a inibição da oxidase tenha decorrido de um efeito redutor inespecífico, o mesmo experimento foi realizado em presença de quantidade equimolar de DDT, um conhecido redutor de dissulfetos. Como visto na Figura 9, o DTT não produziu qualquer alteração na geração de $O_2^{\bullet-}$. Sendo assim, constatamos que o efeito inibitório da PDI sobre a geração de $O_2^{\bullet-}$ pela NADPH oxidase fagocítica é dependente da forma ditiólica (reduzida) das cisteínas de seus sítios ativos.

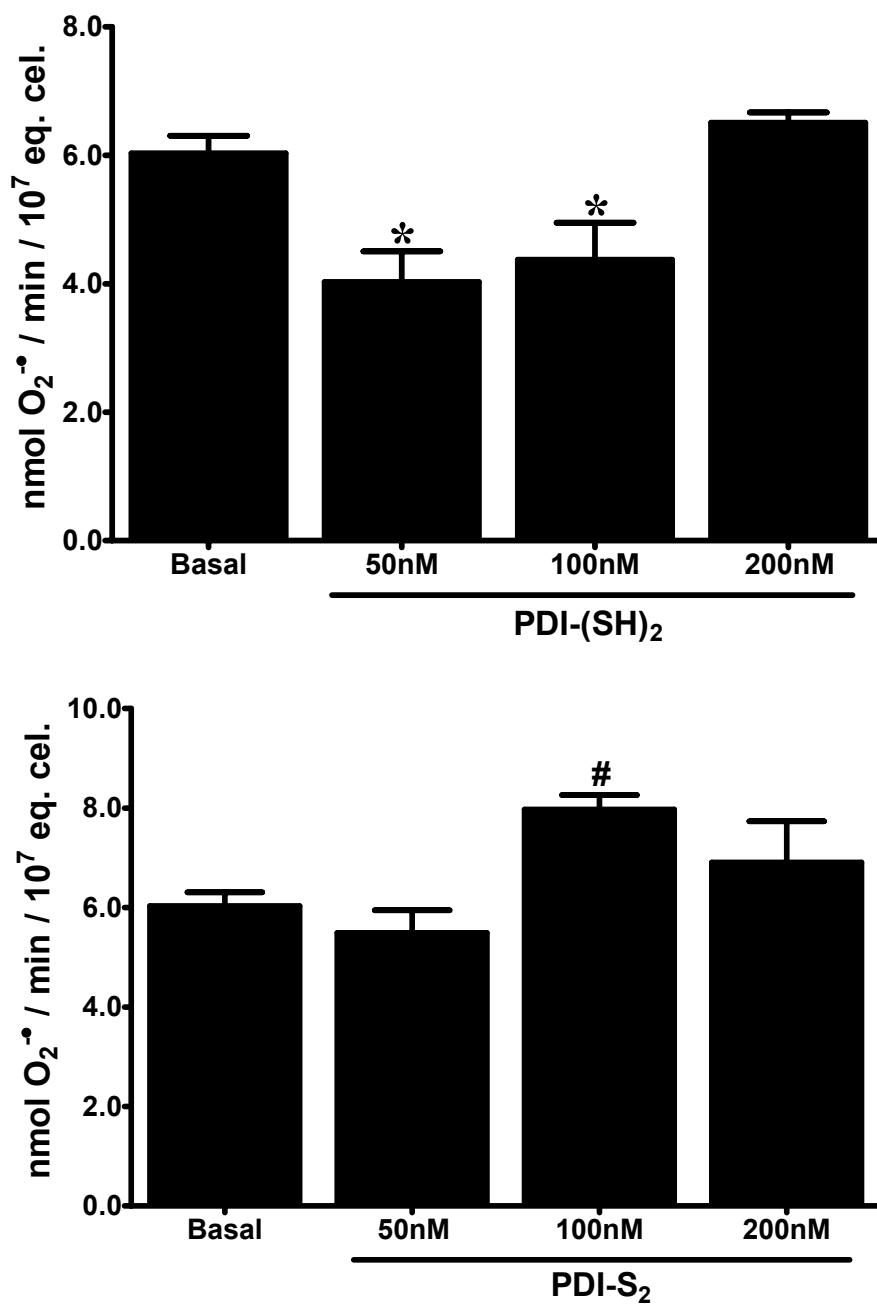


Figura 8 O estado redox da PDI modula a geração de superóxido pela NADPH oxidase em um sistema cell-free semi-recombinante. Um sistema cell-free contendo 5×10^6 eq. cel. de membrana, 70 pmol de GST-p47phox, 105 pmol de GST-Rac2 e 75pmol de GST-p67phox foi utilizado para avaliar a geração de $O_2^{\bullet-}$ em presença ou não de concentrações crescentes de PDI previamente reduzida [DTT 1 mM, PDI-(SH)₂, painel A] ou oxidada [H₂O₂ 0,5 mM, PDI-S₂, painel B] adicionada ao sistema antes da ativação da oxidase. As colunas e barras verticais representam média \pm e.p.m. de pelo menos três experimentos individuais (*p < 0,01 vs. basal e PDI-(SH)₂ 200 nM, # p < 0,05 vs. basal e PDI-S₂ 50 nM).

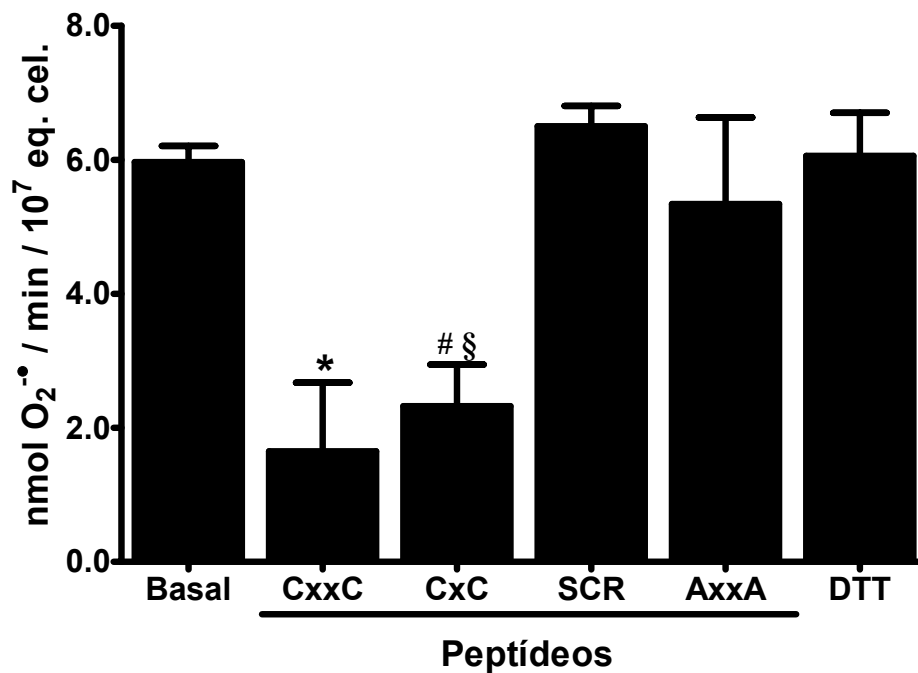


Figura 9 O efeito da PDI sobre a atividade NADPH oxidase é dependente do estado redox das cisteínas do motivo WCGHC. Um sistema *cell-free* semi-recombinante foi montado como previamente descrito e utilizado para avaliar a geração de O₂^{•-} em presença ou não (basal) de peptídeos competitivos contendo a motivo redox WCGHC da PDI (CxxC 1μM) ou um ditiol similar (CxC 1μM). Um peptídeo com a sequência embaralhada [102], um com as cisteínas substituídas por alaninas (AxxA), ou um agente redutor (DTT), nas mesmas concentrações molares, forma usado como controles. As colunas e barras verticais representam média ± e.p.m. de pelo menos três experimentos individuais (*p < 0,01 vs. basal, SCR, AxxA e DTT, # p < 0,01 vs. basal, § p < 0,05 vs. SCR, AxxA e DTT).

4.3 PDI co-localiza com as subunidades da NADPH oxidase

Para melhor entender os mecanismos envolvidos na interação funcional da PDI com a NADPH oxidase, procuramos observar se a PDI associava-se às subunidades da oxidase. Para tanto, neutrófilos humanos, estimulados ou não com PMA, foram incubados com anticorpos contra PDI, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} ou gp91^{phox} e detectados com anticorpos secundários associados a fluoróforos. A ocorrência de co-localização entre a PDI e as subunidades da NADPH oxidase foi verificada mediante análise de fluorescência por microscopia confocal. As imagens exibidas na Figura 10 mostram que a PDI essencialmente co-localiza com todas as subunidades da oxidase, em ambos os estados de atividade. Em neutrófilos em repouso, foi visto que a co-localização é mais evidente com as subunidades p67^{phox} e gp91^{phox} (Figura 10A). Sob estímulo com PMA, a marcação da subunidade p67^{phox} tornou-se mais puntiforme, menos dispersa. Ao mesmo tempo, observou-se um aumento expressivo da co-localização entre a PDI e as subunidades p47^{phox} e gp91^{phox} (Figura 10B). Um dado relevante é o fato do estímulo com PMA haver aumentado a intensidade do sinal fluorescente para a PDI em todas as lâminas analisadas. É provável que isto decorra da maior translocação da proteína em direção à membrana plasmática, como anteriormente mostrado no inserto da Figura 7. Estes dados permitiram supor que a PDI compartilha ambientes celulares com as subunidades da oxidase, sendo que a ativação do *burst* respiratório parece induzir associações mais específicas.

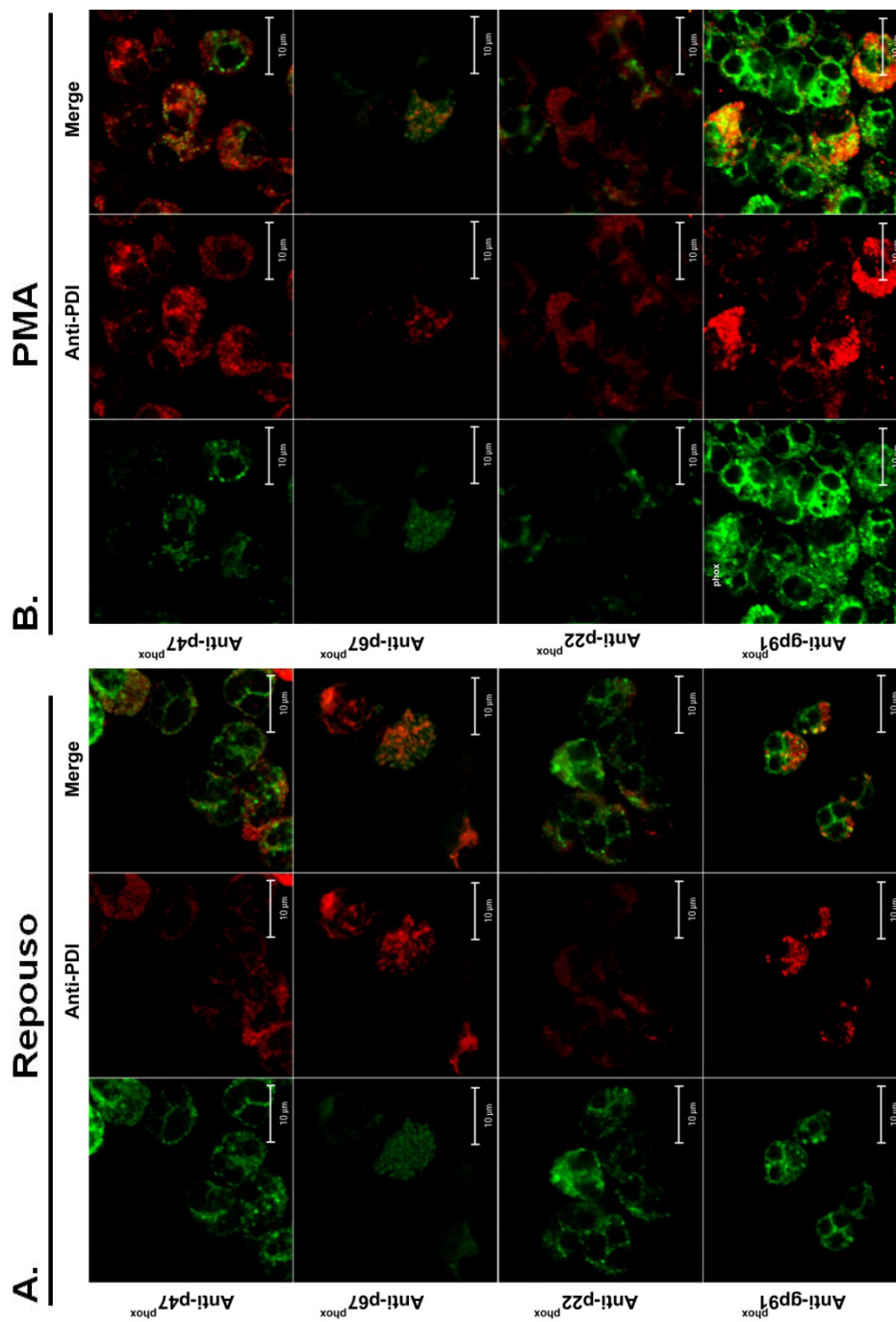


Figura 10 Co-localização da PDI com as subunidades da NADPH oxidase em neutrófilos. Neutrófilos em repouso ou estimulados com PMA (100 ng/ml, 12 min, 37°C), foram fixados com paraformaldeído 4% e tratados conforme descrito em Material e Métodos. A análise de imunolocalização por fluorescência, sob microscopia confocal, foi realizada para PDI (coloração vermelha, Cy5) e para as subunidades p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e gp91^{phox} da NADPH oxidase. A co-localização entre as proteínas é mostrada em amarelo / laranja (merge). A barra de magnitude equivale a 10 μm. As imagens são representativas de três experimentos individuais.

4.4 A ativação de neutrófilos com PMA induz a mobilização da PDI para a membrana plasmática

Um evento essencial à ativação da NADPH oxidase é a transferência das subunidades citosólicas para a membrana plasmática e sua interação com o citocromo b_{558} . Para determinar se a PDI é mobilizada juntamente com grânulos ou vesículas secretórias durante a ativação leucocitária, neutrófilos humanos foram estimulados com diferentes ativadores da NADPH oxidase; nominalmente, PMA (100 ng/ml), fMLP (1 μ M) e ácido araquidônico (100 μ M). Após o estímulo, as células foram lisadas e realizada imunoprecipitação da PDI a partir dos sobrenadantes resultantes. Todos os três ativadores da oxidase promoveram a mobilização da PDI quando comparados a neutrófilos em repouso. Entretanto, um maior efeito foi observado quando o PMA foi utilizado como agente indutor da degranulação (Figura 11A).

É sabido que estes agonistas induzem a mobilização de grânulos exocitóticos provenientes de diferentes compartimentos subcelulares, tais como: vesículas secretórias, grânulos específicos e grânulos azurofílicos [131-134]. Foi mostrado também que o PMA induz maior degranulação que o fMLP, especialmente dos grânulos específicos [122]. Portanto, para melhor caracterizar o tráfego realizado pela PDI durante a ativação celular, neutrófilos estimulados ou não com PMA foram submetidos a um gradiente de Percoll de dupla densidade. As

frações obtidas, grânulos azurofílicos (α), grânulos específicos (β) e uma mistura de membrana plasmática e vesículas secretórias (γ), além do citosol, foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE, seguida pela detecção da PDI e das subunidades citosólicas p47^{phox} e p67^{phox} por *western blotting*. Como mostrado na figura 11B, as subunidades da oxidase foram encontradas tanto na fração citosólica quanto na fração de membranas. Além destas, a PDI foi encontrada também na fração de grânulos específicos. É importante notar que os grânulos específicos contêm aproximadamente 85% de todo o citocromo *b*₅₅₈ presente no neutrófilo [134]. A presença da PDI nesta fração corrobora relatos anteriores nos quais foi mostrado que a mesma associa-se à subunidade p22^{phox} tanto em neutrófilos [107] quanto em células musculares lisas vasculares [106]. O estímulo com PMA aumentou a associação da PDI, p47^{phox} e p67^{phox} à fração de membranas, embora tenha diminuído a associação à fração de grânulos específicos (Figura 11B). Este dado foi sugestivo de que a ativação celular possa induzir a mobilização de PDI a partir dos grânulos para o citosol e membrana celular, estando submetida a um tráfego subcelular similar ao observado para as subunidades citosólicas p47^{phox} e p67^{phox}, durante a ativação do *burst* respiratório.

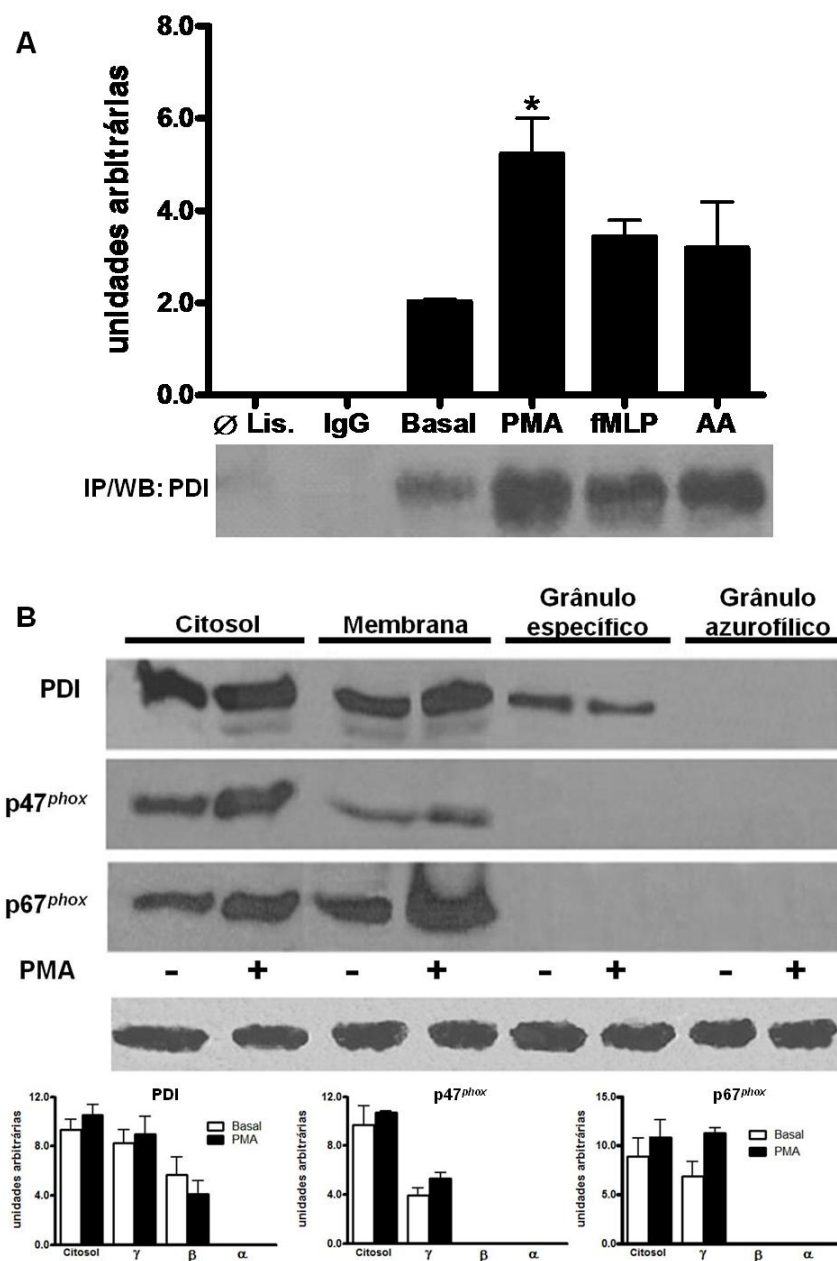


Figura 11 Ativação da NADPH oxidase induz a mobilização da PDI entre compartimentos subcelulares. (A) A PDI foi imunoprecipitada a partir de homogenatos celulares obtidos de neutrófilos estimulados ou não com PMA (100 ng/ml), fMLP (1 μ M) ou ácido araquidônico (100 μ M, AA). O mesmo protocolo foi realizado na ausência de qualquer homogenato (\emptyset lisado) ou na presença de uma imunoglobulina não específica (IgG) para controle do experimento. As amostras resultantes foram submetidas a *western blotting* e reveladas com anticorpo anti-PDI. (B) Neutrófilos estimulados ou não com PMA (100 ng/ml) foram submetidos a cavitação e fracionamento subcelular através de um gradiente descontínuo em Percoll. As frações de citosol, membranas (γ), grânulos específicos (β) e grânulos azurofílicos (α) foram submetidas a *western blotting* usando anticorpos contra as proteínas especificadas. A quantificação densitométrica das bandas é expressa em unidade arbitrária e expressa como média \pm e.p.m. de pelo menos três experimentos.

4.5 O estímulo com PMA aumenta a associação da PDI ao citoesqueleto

Na busca por abordagens que permitissem uma melhor compreensão da natureza e dos mecanismos da interação da PDI com a NADPH oxidase, nossas atenções foram voltadas para o citoesqueleto. Sabe-se que a ativação leucocitária induz a associação das subunidades citosólicas da oxidase às proteínas do citoesqueleto, em especial à actina [133, 135, 136]. Além disso, o uso de inibidores da polimerização da actina promove a desativação da NADPH oxidase tanto em células íntegras quanto em sistemas cell-free [137, 138]. Em vista disto, tem-se atribuído à actina um importante papel na organização e redistribuição do complexo citosólico da NADPH oxidase fagocítica.

Como próximo passo, buscamos examinar se a PDI, a exemplo da $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$, também se associa ao citoesqueleto. A fração celular insolúvel obtida quando neutrófilos, estimulados (PMA ou fMLP) ou não, foram lisados em tampão contendo Triton X-100 (0,5%) foi definida como sendo a fração de citoesqueleto. Como mostrado na Figura 12, a PDI associa-se à fração insolúvel de neutrófilos, embora seja mais abundante na fração solúvel. É importante notar que a ativação da NADPH oxidase, em especial pelo PMA, aumentou a associação da PDI ao citoesqueleto. O mesmo aumento foi observado para a associação da $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$, embora as mesmas já estivessem associadas em neutrófilos em repouso (Figura 12). É sabido que os componentes citosólicos da oxidase associam-se à

actina mesmo em neutrófilos em repouso, estado no qual a actina já encontra-se parcialmente polimerizada [139, 140].

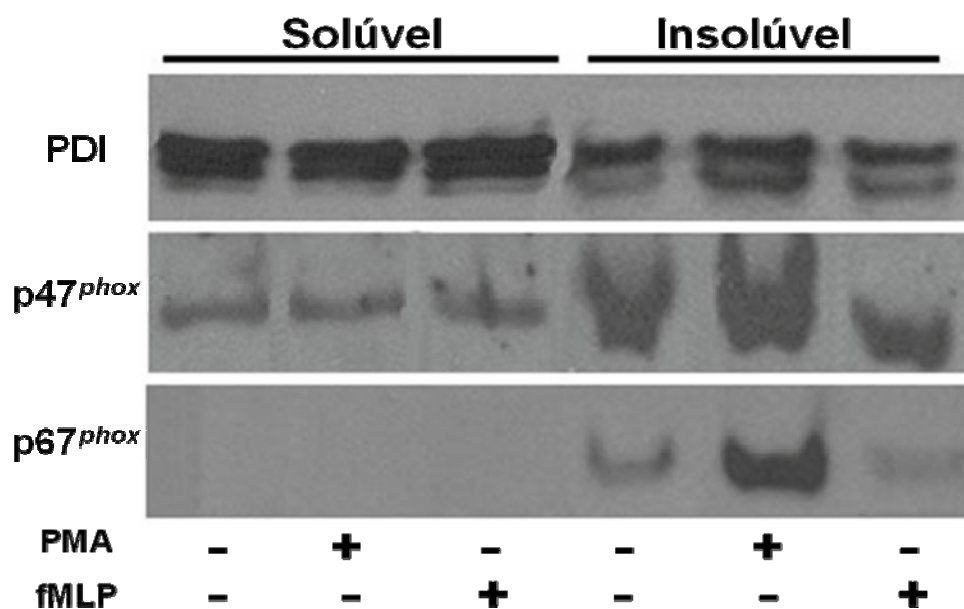


Figura 12 Ativação da NADPH oxidase aumenta a associação da PDI ao citoesqueleto: Neutrófilos foram estimulados ou não com PMA (100 ng/ml) ou fMLP (1 μ M) e lisados em tampão contendo Triton X-100 (0,5 %). As frações solúveis e insolúveis em detergente foram coletadas e analisadas por western blot. Cada *lane* corresponde a 2×10^7 equivalentes celulares. Os resultados são representativos de três experimentos individuais.

4.6 PDI associa-se às subunidades da NADPH oxidase

Considerando que a PDI compartilha mecanismos de mobilização e translocação celular com as subunidades citosólicas da NADPH oxidase, procuramos observar se as mesmas interagem entre si e qual o efeito da ativação celular sobre esta interação. Para tanto, frações de citosol e de membranas obtidas de neutrófilos em repouso ou estimulados com PMA foram submetidas à imunoprecipitação utilizando-se anticorpos contra PDI, p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} e analisadas por *western blot* com o emprego de anticorpo anti-PDI. Como mostrado na Figura 13A, a PDI co-precipitou com a p22^{phox} presente na fração de membrana de neutrófilos em repouso. O estímulo com PMA não foi capaz de intensificar esta interação, embora tenha havido maior associação de PDI à membrana (Figura 13A, painel superior). De fato, já havíamos mostrado que o estímulo com PMA não aumenta a interação da PDI com as subunidades p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} presentes na membrana de neutrófilos [107]. Efeito oposto foi observado na fração citosólica, onde a interação da PDI com as subunidades p47^{phox} e p67^{phox} foi totalmente dependente da ativação celular com PMA (Figura 13B). Este dado contrasta com os dados anteriores [107], nos quais a imunoprecipitação da PDI resultou em co-precipitação das subunidades citosólicas da oxidase a despeito do estado de atividade celular. Considerando que a concentração de PDI presente na fração citosólica (solúvel) de neutrófilos é flagrantemente maior que aquelas de p47^{phox} e p67^{phox} (ver Figura 12), a interação anteriormente observada pode ser decorrente

de uma ligação inespecífica causada pelo excesso da proteína imunoprecipitada. Desta forma, a imunoprecipitação “reversa” ora mostrada parece ser uma abordagem mais adequada à investigação da interação das subunidades citosólicas da NADPH oxidase com a PDI.

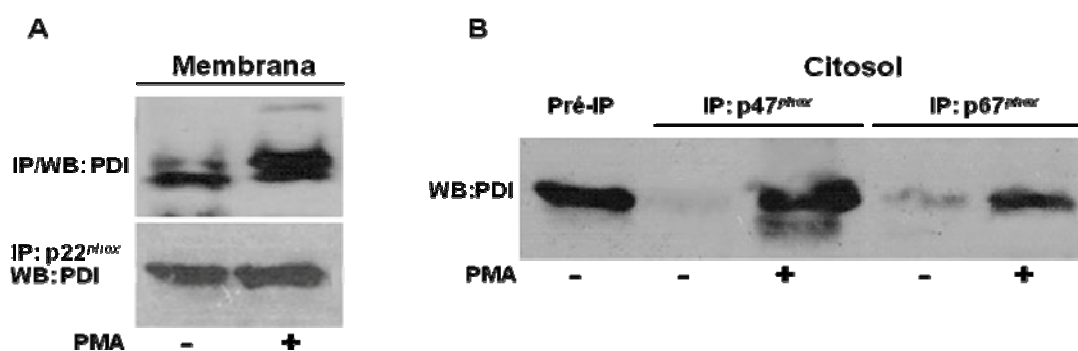


Figura 13 Co-imunoprecipitação entre a PDI e as subunidades da NADPH oxidase. Frações de membrana (A) ou de citosol (B) de neutrófilos em repouso ou estimulados com PMA (100 ng/ml) foram submetidas à imunoprecipitação e *western blot* utilizando-se os anticorpos indicados. Pré-IP indica amostra de fração citosólica não submetida à IP e utilizada como controle. Os resultados são representativos de dois ou mais experimentos.

4.7 p47^{phox} associa-se preferencialmente à forma reduzida da PDI em neutrófilos ativadas

Com o objetivo de confirmar se a interação da PDI com as subunidades citosólicas da NADPH oxidase, observada em neutrófilos ativados, era dependente de mecanismos redox, foram realizados experimentos de precipitação por

afinidade. Frações de membrana e de citosol de neutrófilos em repouso ou estimulados foram incubadas em presença de GST-PDI ou GST apenas. Os resultados mostram que a GST-PDI interage diretamente com a p47^{phox} citosólica de neutrófilos em repouso, sendo que esta interação é aumentada sob ativação com PMA (Figura 14A, *lanes* 2 e 6). De forma contrária, a interação da GST-PDI com a p47^{phox} presente na membrana foi dependente de estimulação com PMA (Figura 14B, *lanes* 2 e 6), embora se faça necessário considerar a baixa concentração na qual a p47^{phox} é encontrada na membrana de neutrófilos em repouso (Figura 11B).

Uma vez que o estado redox da PDI pode modular a atividade da NADPH oxidase (Figura 8), decidimos avaliar se a interação com a p47^{phox} é, também, sensível a variações do estado redox da PDI. Portanto, amostras de GST-PDI foram previamente reduzidas ou oxidadas para, então, serem submetidas ao mesmo experimento de precipitação por afinidade. Como visto na Figura 14A (*lanes* 2 - 4), a variação do estado redox da GST-PDI não afetou a afinidade de ligação à p47^{phox} presente no citosol de neutrófilos em repouso. Entretanto, naqueles estimulados com PMA, a p47^{phox} associou-se com mais eficiência às formas nativa e reduzida da GST-PDI (Figura 14A, *lanes* 5 e 7). É relevante informar que a quantificação de tióis livres realizada em amostras de GST-PDI nativa resultou em caracterização da mesma como majoritariamente reduzida (dados não mostrados). Por outro lado, em membranas de neutrófilos estimulados com PMA, a GST-PDI associou-se a um aglomerado protéico com peso molecular aproximado de 150 kDa, a despeito de qual fosse seu estado redox (Figura 14B, *lanes* 5-7). É notável que o anticorpo anti-p47^{phox} tenha reconhecido o mesmo complexo protéico em uma

amostra de membrana de neutrófilo ativo que não fora submetida ao mesmo ensaio (Figura 14B, *lane* 1). Em face ao fato de que a GST-PDI, em quaisquer dos estados redox testados, não foi capaz de ligar-se à p67^{phox} (dados não mostrados), consideramos que estes resultados são sugestivos de que a ativação celular com PMA modifica o estado redox da p47^{phox}, facilitando a interação com a PDI e a associação a complexos protéicos na membrana plasmática e/ou vesículas secretórias.

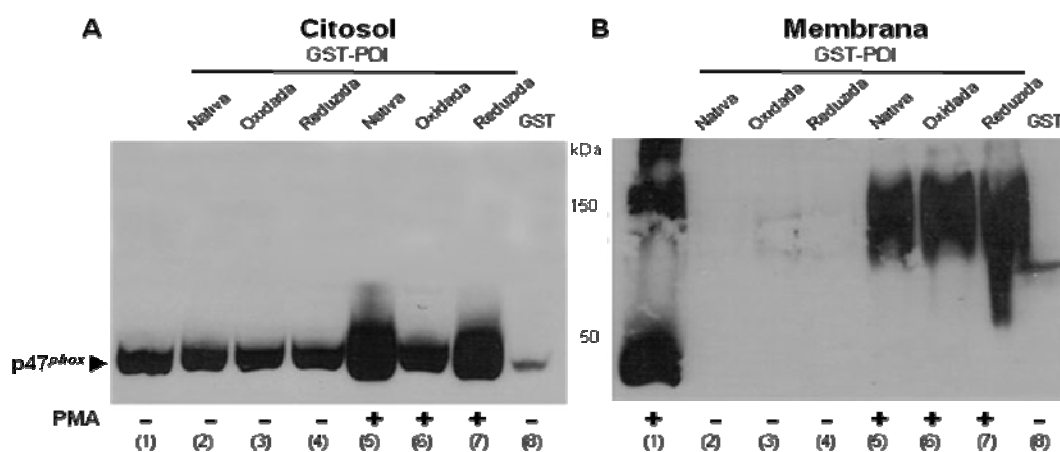


Figura 14 Efeito do estado redox da PDI sobre a afinidade de ligação à p47^{phox} em frações celulares de neutrófilos. Frações de membrana ou de citosol de neutrófilos em repouso ou tratados com PMA (100 ng/ml) foram submetidos a ensaio de precipitação por afinidade (GST-pulldown). Para os ensaios, a proteína de fusão GST-PDI foi empregada tanto na sua forma nativa, quanto nas formas reduzida (DTT 1 mM) ou oxidada (H₂O₂ 0,5 mM). As proteínas associadas à GST-PDI foram analisadas por *western blot* com o uso de um anticorpo anti-p47^{phox}. Cada *lane* corresponde a 1 x 10⁸ equivalentes celulares. Os resultados são representativos de dois experimentos individuais.

4.8 PDI e p47^{phox} estão envolvidas em trocas tiol/dissulfeto in vivo

Para verificar se a ativação do *burst* oxidativo modifica o estado redox da PDI e da p47^{phox}, frações de membrana e de citosol de neutrófilos em repouso ou estimulados com PMA foram utilizadas em um ensaio de incorporação de um derivado maleimídico, o AMS. Neste ensaio, o AMS é incorporado a cisteínas tiólicas originadas a partir da redução de pontes dissulfeto nativas, o que eleva o peso molecular da proteína em 0,5 kDa por tiol alquilado. Sendo assim, a forma oxidada da proteína é caracterizada pela maior incorporação do *probe* e diminuição da mobilidade eletroforética em gel SDS-PAGE não redutor.

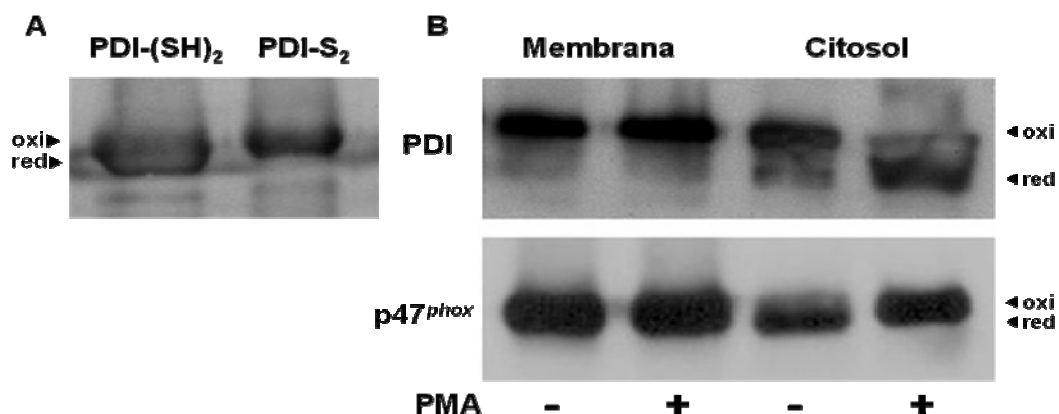


Figura 15 Efeito da estimulação com PMA sobre o estado redox da PDI e p47^{phox} de neutrófilos. Frações de membrana ou de citosol de neutrófilos em repouso ou tratados com PMA (100 ng/ml) foram submetidos a um protocolo de alquilação de tióis com AMS, conforme descrito em Material e Métodos, para caracterização do estado redox in vivo da PDI e p47^{phox}. (A) Amostras de PDI previamente reduzidas (DTT 1 mM) ou oxidadas (Diamida 0,5 mM) foram ensaiadas como controle da incorporação da *probe* pelas cisteína da proteína. (B) As amostras foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE não redutor e *western blot* contra PDI (painel superior) e p47^{phox} (painel inferior). A forma oxidada (oxi) e reduzida (red) de cada proteína está indicada pelas setas laterais. Resultados são representativos de três experimentos individuais.

Como visto na Figura 15A, a incorporação de moléculas de AMS pela PDI previamente oxidada (diamida 0,5 mM) caracterizou o padrão de variação do peso molecular da proteína quando comparada a que fora reduzida (DTT 1 mM). Os resultados deixam claro que a ativação celular com PMA não modifica o estado redox da PDI ou da $p47^{phox}$ presentes na fração de membrana (Figura 15B, esquerda). Entretanto, no citosol, a ativação celular induziu a modificação do estado redox da PDI, tornando-a claramente mais reduzida. Ao mesmo tempo, a estimulação com PMA resultou em oxidação da $p47^{phox}$, vista como uma discreta elevação do peso molecular da proteína (Figura 15B, direita). A pequena magnitude deste deslocamento é sugestiva de que a $p47^{phox}$ esteja envolvida na formação de uma ponte dissulfeto mista com outra proteína citosólica, possivelmente a PDI. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a PDI e a $p47^{phox}$ realizam troca tiol/dissulfeto no citosol de neutrófilos durante a ativação do *burst* respiratório.

5. **DISCUSSÃO**

Neste trabalho, fornecemos evidências de que a PDI, uma chaperona oxidoreductase do retículo endoplasmático, associa-se às subunidades da NADPH oxidase fagocíticas e atua como regulador da geração de ERO. Esta conclusão está amparada por consistentes evidências experimentais. (1) Antagonistas farmacológicos da PDI reduzem drasticamente a atividade da oxidase em um sistema *cell-free* semi-recombinante. (2) Os efeitos da PDI sobre a geração de ERO variam de acordo com o estado redox das cisteínas presentes nos sítios ativos da enzima. (3) A PDI compartilha rotas de migração subcelular e associa-se às subunidades da oxidase tanto na membrana plasmática quanto no citosol (4) A ativação do *burst* respiratório promove a associação dessas proteínas, aparentemente por facilitar a ocorrência de trocas tiol/dissulfeto entre as mesmas. Estes e outros dados permitem a proposta de um mecanismo de ação segundo o qual a interação da PDI com a subunidade p47^{phox}, durante o *burst* oxidativo, regula a geração de ERO via processos redox.

Fagócitos, quando apropriadamente estimulados, consomem oxigênio e produzem quantidades importantes de O₂^{•-} e outras ERO em um processo definido como *burst* oxidativo, evento considerado essencial aos mecanismos de defesa hospedeira [141]. Estudos recentes, ainda controversos, sugeriram um mecanismo alternativo pelo qual as proteases, e não ERO, sejam os reais agentes antimicrobianos, cabendo às ERO um papel estimulador da liberação de proteases [142]. ERO poderiam ainda regular eventos como a maturação e ativação de células T [119]. De fato, em células não-fagocíticas, várias funções sinalizadoras são atribuídas a certas espécies reativas, em processos como crescimento, migração,

proliferação e ativação de células não hematopoiéticas [112]. A especificidade e compartimentalização necessárias a esta função sinalizadora requerem que isoformas não-fagocíticas da NADPH oxidase sejam rigorosamente controladas. Usualmente, este controle envolve mecanismos de regulação da transcrição gênica e da expressão protéica [36], de tal forma que a ativação da oxidase é acompanhada por maior expressão de suas subunidades. Por outro lado, a atividade da NADPH oxidase do fagócito é primordialmente regulada pelo acoplamento de suas subunidades e encontra-se inativa na célula em repouso [6, 109]

Está bem estabelecido que agentes oxidantes ou alquilantes de tióis inibem a atividade do sistema NADPH oxidase tanto em neutrófilos [73, 76] quanto em células musculares lisas vasculares [78]. Em trabalhos recentes, nosso grupo tem sido pioneiro ao mostrar, tanto em modelos de perda como de ganho de função, que a atividade das isoformas vasculares da oxidase é regulada pela PDI [106, 107] (Fernandes *et al.*, 2009 *in prelo*). Neste contexto, nossos dados claramente mostram que a inibição farmacológica da PDI presente na membrana de neutrófilos reduz drasticamente a geração de $O_2^{\cdot-}$ em um sistema *cell-free* semi-recombinante. Ademais, os efeitos da PDI sobre a atividade da NADPH oxidase fagocítica parecem envolver trocas tiol/dissulfeto, uma vez que, a adição de PDI oxidada ou reduzida produziu efeitos diametralmente opostos sobre a atividade do sistema. Akard e col. [74] já haviam observado que o tratamento de amostras de citosol com NEM, um alquilante de tióis, inibe completamente a geração de $O_2^{\cdot-}$ quando as mesmas são adicionadas a um sistema *cell-free* contendo membranas não tratadas. O mesmo não ocorreu quando membranas pré-tratadas foram misturadas a citosol controle.

Efeito semelhante foi observado após adição de óxido fenilarsênico (PAO), um oxidante de ditióis [76]. Entretanto, a constatação de que a adição de NEM a um sistema *cell-free* parcialmente recombinante não promove o mesmo efeito sobre a geração de $O_2^{\cdot -}$ [143] levou DeCoursey e Ligeti [65] a proporem a existência de um elemento citosólico, prontamente dissociável e responsivo a tióis, capaz de interagir e regular a atividade do complexo NADPH oxidase.

Dados anteriormente publicados por nosso grupo demonstraram que a PDI está intimamente associada às subunidades da NADPH oxidase, tanto da isoforma fagocítica [107], quanto das isoformas vasculares [106-108]. Os resultados obtidos neste trabalho, tanto em neutrófilos em repouso quanto naqueles em estado ativado, reforçam tais dados. Observamos que a ativação celular com PMA promove aumento da migração da PDI para a membrana do neutrófilo, embora não resulte em maior associação às subunidades p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} da oxidase. Por outro lado, a associação da PDI às subunidades p47^{phox} e p67^{phox} presentes no citosol é dependente do estímulo com PMA. A ativação celular não apenas induz a interação da PDI com as *phoxes* citosólicas, mas também estimula a co-migração das mesmas. A exemplo do que ocorre com as subunidades citosólicas [136, 137], o estímulo com PMA aumenta a associação da PDI ao citoesqueleto e promove sua mobilização a partir dos grânulos específicos para o citosol e a membrana. Entretanto, é interessante notar que apesar da PDI, p47^{phox} e p67^{phox} responderem aos mesmos estímulos indutores da degranulação e utilizarem rotas de translocação celular em comum, esta co-migração não aumenta a interação das mesmas na membrana. Vale lembrar que o estímulo com PMA não aumentou a co-immunoprecipitação da

PDI com as subunidades da oxidase presentes na membrana de neutrófilos [107]. Desta forma, nossos dados sugerem que a PDI possa estar atuando como uma chaperona, promovendo a estabilização do complexo citosólico formado pelas subunidades p67^{phox}, p47^{phox} e p40^{phox} no curso da migração para a membrana. Em trabalho recém-publicado, nosso grupo mostrou que a super-expressão da PDI estimula a geração de ERO em células musculares lisas vasculares mesmo após mutação das cisteínas do sítio ativo, um dado consistente com a função chaperona da PDI, uma vez que atuaria estabilizando a montagem do complexo protéico da oxidase e aumentando a eficiência da geração de ERO (Fernandes *et al.*, 2009 *in prelo*). De fato, é sabido que a atividade chaperona da PDI independe dos seus tióis reativos [91].

Possíveis mecanismos redox envolvidos na associação entre PDI e NADPH oxidase merecem considerações mais aprofundadas. Está muito bem estabelecido que a fosforilação da subunidade p47^{phox} é um passo essencial à ativação da oxidase tanto em sistemas *cell-free* [41] quanto em células intactas [52]. Sob ativação, a p47^{phox} é fosforilada em uma série de resíduos de serina localizados no terço C-terminal da proteína [49]. A maioria destas serinas está na região polibásica auto-inibitória e a fosforilação das mesmas resulta em modificações na conformação da proteína com subsequente exposição dos domínios SH3 à ligação com a região rica em prolinas da subunidade p22^{phox} [50, 51]. A mesma modificação conformacional pode ser induzida por ânions anfífilicos tais como o ácido araquidônico e o SDS [57, 58]. Park e Babior [40] mostraram que a ativação da p47^{phox}, seja com proteína quinase C ou com ácido araquidônico, resulta em redução da alquilação da proteína

pelo [^3H]-NEM. A p47^{phox} tem quatro resíduos de cisteína localizados nas posições 98, 111, 196 e 378. Estudos de mutagênese mostraram que três destas quatro cisteínas estão envolvidas na regulação redox da p47^{phox} [144]. A expressão dos mutantes C111A e C378A em linfócitos B deficientes de p47^{phox} reduziu a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$, resultado semelhante ao obtido quando os mesmos mutantes foram utilizados em um sistema *cell-free* [144, 145]. Os autores sugeriram que os grupos tiol destas duas cisteínas poderiam estar envolvidos em algum mecanismo redox, possivelmente a formação de uma ponte dissulfeto, que resultaria na modulação da atividade da NADPH oxidase.

A sugestão acima é corroborada por nossos dados. Vimos que a PDI apresenta-se na membrana de neutrófilos em uma forma mais oxidada, enquanto a p47^{phox} está mais reduzida. Estas parecem ser as formas redox nas quais elas se acoplam ao complexo NADPH oxidase, principalmente considerando que a adição de PDI oxidada aumenta a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ no sistema *cell-free* semi-recombinante. Por outro lado, a ativação de neutrófilos com PMA promove a redução da PDI presente no citosol ao mesmo tempo em que ocorre a oxidação da p47^{phox} citosólica, fazendo com que esta se associe com mais afinidade à forma reduzida da GST-PDI. Estes dados nos permitem propor que a menor alquilação da Cys₃₇₈ pelo [^3H]-NEM, descrita por Park e Babior [40], possa ser conseqüência da oxidação da mesma pela PDI citosólica e não da sua ocultação em decorrência da alteração conformacional da proteína, conforme fora proposto.

Nosso argumento é fortalecido pela observação de que a incubação tanto da PDI reduzida quanto de peptídeos contendo a seqüência WCGHC do sítio ativo da PDI inibe a geração de $O_2^{\cdot -}$ pelo complexo NADPH oxidase semi-recombinante. Sabe-se que quando a oxidase é ativada, as subunidades $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e Rac2 associam-se ao citocromo b_{558} em proporção equimolar [146] semelhante à utilizada no sistema *cell-free* semi-recombinante aqui adotado. Portanto, propomos que a ligação da PDI reduzida à $p47^{phox}$ ativa possa resultar da retenção do complexo citosólico e regulação do número total de complexos NADPH oxidase ativos. De fato, vários autores têm observado que apenas uma pequena fração da $p47^{phox}$ presente no citosol migra para a membrana mediante ativação [146, 147], embora a maior parte esteja efetivamente fosforilada [135]. A manutenção de uma reserva prontamente acessível da $p47^{phox}$ ativa no citosol, decorrente da associação à PDI, satisfaria a hipótese defendida por outros autores [29, 65, 68, 74, 75, 148] de que a atividade da oxidase é mantida pela contínua associação dos componentes citosólicos ao citocromo b_{558} durante o *burst* respiratório.

Portanto, o conjunto dos dados aqui apresentados nos permite propor o seguinte desenho hipotético para o mecanismo da interação física e funcional da PDI com o complexo NADPH oxidase de fagócitos (Figura 16).

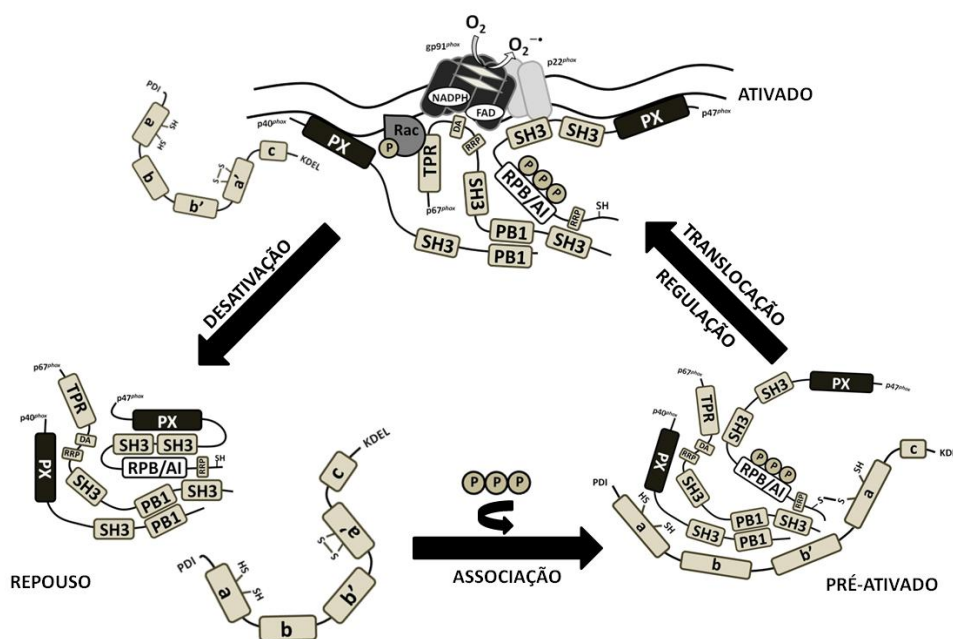


Figura 16 Mecanismo da interação da PDI com a subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase do fagócito. Representação esquemática do mecanismo hipotético da interação da PDI com o complexo citosólica da NADPH oxidase. A ativação celular com PMA induz fosforilação da p47^{phox} e associação com a PDI. No estado de pré - ativação, a PDI assiste a translocação do complexo citosólico para a membrana, ao mesmo tempo em que mantém uma reserva de complexo ativos no citosol de modo a regular a intensidade de ativação e duração do burst oxidativo. Após translocação para a membrana, a ligação entre a PDI e a p47^{phox} é perdida e esta se associa à p22^{phox} ativando a geração ERO. Ilustração adaptada de: *J. Leukoc. Biol.* 76: 760–781, 2004.

No citosol de neutrófilos em repouso, a PDI encontra-se parcialmente oxidada e desassociada da p47^{phox}, a qual se encontra na conformação auto-inibida e associada às subunidades p67^{phox} e p40^{phox}. A ativação com PMA ou outro agente degranulante induz fosforilação da p47^{phox}, alteração da conformação tridimensional da proteína e exposição da Cys₃₇₈. Dada a abundância citosólica da PDI, ocorre a formação de uma ponte dissulfeto mista entre a Cys₃₇₈ da p47^{phox} e uma das cisteínas dos sítios ativos da PDI. Esta interação redox facilita a associação

da PDI ao complexo citosólico como um todo, permitindo a mesma exerça sua função chaperona auxiliando na estabilização e manutenção do complexo ativo. O oposto também é plausível, que primeiro ocorra a associação via função chaperona, para então haver interação redox entre PDI e p47^{phox}. A formação deste complexo entre a PDI e as subunidades citosólicas teria, então, duas funções básicas: (1) conduzir o complexo citosólico ativo até a membrana, dissociando-se do mesmo após sua transferência ao citocromo *b*₅₅₈, e (2) sustentação e regulação da atividade da oxidase através do suprimento contínuo de complexos ativos durante a ativação leucocitária. A redução da ponte dissulfeto entre PDI e p47^{phox} poderia ser realizada pelo sítio redox de uma molécula de PDI presente na membrana ou pela ação de algum agente redutor citosólico, como a glutathiona reduzida (GSH). A desativação do sistema decorreria da cessação do estímulo fosforilador, da ação de fosfatases citosólicas ou da redução do número de complexo ativos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o presente trabalho permitiram concluir que:

1. A PDI regula a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase de neutrófilos, através de um mecanismo dependente do estado redox da mesma.
2. A PDI co-localiza com as subunidades da NADPH oxidase de neutrófilos tanto em estado de repouso quanto sob ativação, embora a interação física das mesmas seja dependente da ativação do *burst* respiratório.
3. A ativação de neutrófilos induz a mobilização da PDI em direção à membrana plasmática e parece facilitar sua atuação como chaperona, estabilizando o complexo formado pelas subunidades citosólicas durante a migração para a membrana.
4. A ativação de neutrófilos facilita a interação da PDI com a subunidade p47^{phox} citosólica através de um mecanismo que, aparentemente, envolve trocas tiol/dissulfeto.

7. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. Nauseef, W.M., *How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 88-102.
2. Sansonetti, P.J., *The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1237-42.
3. Dale, D.C., L. Boxer, and W.C. Liles, *The phagocytes: neutrophils and monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 935-45.
4. Gordon, S., *Elie Metchnikoff: father of natural immunity*. Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3257-64.
5. Bridges, R.A., H. Berendes, and R.A. Good, *A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome*. AMA J Dis Child, 1959. **97**(4): p. 387-408.
6. Nauseef, W.M., *Assembly of the phagocyte NADPH oxidase*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(4): p. 277-91.
7. Holmes, B., et al., *Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function*. Lancet, 1966. **1**(7449): p. 1225-8.
8. Johnston, R.B., Jr. and J.S. McMurry, *Chronic familial granulomatosis. Report of five cases and review of the literature*. Am J Dis Child, 1967. **114**(4): p. 370-8.
9. Quie, P.G., et al., *In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood*. J Clin Invest, 1967. **46**(4): p. 668-79.

10. Baehner, R.L. and D.G. Nathan, *Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease*. Science, 1967. **155**(764): p. 835-6.
11. Baehner, R.L. and M.L. Karnovsky, *Deficiency of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidase in chronic granulomatous disease*. Science, 1968. **162**(859): p. 1277-9.
12. Baehner, R.L. and D.G. Nathan, *Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease*. N Engl J Med, 1968. **278**(18): p. 971-6.
13. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system*. J Bacteriol, 1968. **95**(6): p. 2131-8.
14. Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte, *Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent*. J Clin Invest, 1973. **52**(3): p. 741-4.
15. Curnutte, J.T., R.S. Kipnes, and B.M. Babior, *Defect in pyridine nucleotide dependent superoxide production by a particulate fraction from the granulocytes of patients with chronic granulomatous disease*. N Engl J Med, 1975. **293**(13): p. 628-32.
16. Babior, B.M., J.T. Curnutte, and B.J. McMurrich, *The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst*. J Clin Invest, 1976. **58**(4): p. 989-96.
17. Payne, N.R., et al., *Growth in patients with chronic granulomatous disease*. J Pediatr, 1983. **102**(3): p. 397-9.

18. Royer-Pokora, B., et al., *Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location*. Nature, 1986. **322**(6074): p. 32-8.
19. Segal, A.W., *Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease*. Nature, 1987. **326**(6108): p. 88-91.
20. Segal, A.W., et al., *Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease*. Lancet, 1978. **2**(8087): p. 446-9.
21. Roos, D., *X-CGDbase: a database of X-CGD-causing mutations*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 517-21.
22. Heyneman, R.A. and R.E. Vercauteren, *Activation of a NADPH oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell-free system*. J Leukoc Biol, 1984. **36**(6): p. 751-9.
23. Bromberg, Y. and E. Pick, *Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate*. J Biol Chem, 1985. **260**(25): p. 13539-45.
24. Stasia, M.J. and X.J. Li, *Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(3): p. 209-35.
25. Ambruso, D.R., et al., *Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4654-9.

26. Williams, D.A., et al., *Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1646-54.
27. Dinayer, M.C., *Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 89-95.
28. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
29. Cross, A.R. and A.W. Segal, *The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1657**(1): p. 1-22.
30. Robinson, J.M., *Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(2): p. 281-97.
31. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
32. Ramos, C.L., et al., *Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(12): p. 8307-12.
33. Xie, Q.W., et al., *Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 225-8.
34. Wentworth, P., Jr., et al., *Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation*. *Science*, 2002. **298**(5601): p. 2195-9.

35. Groemping, Y. and K. Rittinger, *Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 3): p. 401-16.
36. Lambeth, J.D., T. Kawahara, and B. Diebold, *Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(3): p. 319-31.
37. Isogai, Y., T. Iizuka, and Y. Shiro, *The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(14): p. 7853-7.
38. Sumimoto, H., K. Miyano, and R. Takeya, *Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(1): p. 677-86.
39. Cross, A., *The participation of the hemes of flavocytochrome b245 in the electron transfer process in NADPH oxidase*. *Blood*, 1999. **93**(12): p. 4449.
40. Park, J.W. and B.M. Babior, *Activation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47phox by protein kinase C. A phosphorylation-dependent change in the conformation of the C-terminal end of p47phox*. *Biochemistry*, 1997. **36**(24): p. 7474-80.
41. Lopes, L.R., et al., *Activation of the leukocyte NADPH oxidase by protein kinase C in a partially recombinant cell-free system*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(22): p. 15533-7.
42. Hoyal, C.R., et al., *Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5130-5.

43. Massenet, C., et al., *Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains.* J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13752-61.
44. El-Benna, J., P.M. Dang, and M.A. Gougerot-Pocidalò, *Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane.* Semin Immunopathol, 2008. **30**(3): p. 279-89.
45. Yuzawa, S., et al., *A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase.* Genes Cells, 2004. **9**(5): p. 443-56.
46. Nisimoto, Y., et al., *The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558).* J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22999-3005.
47. Wilson, M.I., et al., *PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62.* Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 39-50.
48. Kami, K., et al., *Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p.* EMBO J, 2002. **21**(16): p. 4268-76.
49. el Benna, J., L.P. Faust, and B.M. Babior, *The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation.*

- Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases.* J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23431-6.
50. Sumimoto, H., et al., *Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5345-9.
51. Leto, T.L., A.G. Adams, and I. de Mendez, *Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10650-4.
52. Faust, L.R., et al., *The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis.* J Clin Invest, 1995. **96**(3): p. 1499-505.
53. Inanami, O., et al., *Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304.* J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9539-43.
54. Johnson, J.L., et al., *Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity.* J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35147-52.
55. Ago, T., et al., *Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated*

- intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase.* J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33644-53.
56. Groemping, Y., et al., *Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase.* Cell, 2003. **113**(3): p. 343-55.
57. Swain, S.D., et al., *Analysis of activation-induced conformational changes in p47phox using tryptophan fluorescence spectroscopy.* J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29502-10.
58. Shiose, A. and H. Sumimoto, *Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase.* J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13793-801.
59. Hiroaki, H., et al., *Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain.* Nat Struct Biol, 2001. **8**(6): p. 526-30.
60. Kanai, F., et al., *The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(7): p. 675-8.
61. Ago, T., et al., *Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4474-9.
62. Bissonnette, S.A., et al., *Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase.* J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2108-19.
63. Koga, H., et al., *Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase.* J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25051-60.

64. Lapouge, K., et al., *Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 899-907.
65. Decoursey, T.E. and E. Ligeti, *Regulation and termination of NADPH oxidase activity*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(19-20): p. 2173-93.
66. Light, D.R., et al., *Characteristics of the cofactor requirements for the superoxide-generating NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes*. Biochemistry, 1981. **20**(6): p. 1468-76.
67. DeLeo, F.R., et al., *NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6732-40.
68. Tamura, M., et al., *Stabilization of human neutrophil NADPH oxidase activated in a cell-free system by cytosolic proteins and by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7529-38.
69. Doussiere, J., F. Bouzidi, and P.V. Vignais, *The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils*. Eur J Biochem, 2002. **269**(13): p. 3246-55.
70. Kerkhoff, C., et al., *The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2*. FASEB J, 2005. **19**(3): p. 467-9.
71. Doussiere, J., F. Bouzidi, and P.V. Vignais, *A phenylarsine oxide-binding protein of neutrophil cytosol, which belongs to the S100 family, potentiates NADPH oxidase activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **285**(5): p. 1317-20.

72. Winterbourn, C.C. and M.B. Hampton, *Thiol chemistry and specificity in redox signaling*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 549-61.
73. Cross, A.R., *Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase: mechanisms of action and methods for their elucidation*. Free Radic Biol Med, 1990. **8**(1): p. 71-93.
74. Akard, L.P., D. English, and T.G. Gabig, *Rapid deactivation of NADPH oxidase in neutrophils: continuous replacement by newly activated enzyme sustains the respiratory burst*. Blood, 1988. **72**(1): p. 322-7.
75. Dahlgren, C. and T. Sundqvist, *The effects of N-ethylmaleimide on extracellularly and intracellularly generated chemiluminescence in neutrophils indicate that the rate of deactivation of NADPH-oxidase is higher when the oxidase system is localized on the plasma membrane than when it is localized on the phagosomal membrane*. J Biolumin Chemilumin, 1991. **6**(2): p. 81-6.
76. Doussiere, J., et al., *Phenylarsine oxide as an inhibitor of the activation of the neutrophil NADPH oxidase--identification of the beta subunit of the flavocytochrome b component of the NADPH oxidase as a target site for phenylarsine oxide by photoaffinity labeling and photoinactivation*. Eur J Biochem, 1998. **251**(3): p. 649-58.
77. Kitaoka, N., et al., *Effect of sulfur amino acids on stimulus-induced superoxide generation and translocation of p47phox and p67phox to cell membrane in human neutrophils and the scavenging of free radical*. Clin Chim Acta, 2005. **353**(1-2): p. 109-16.

78. Janiszewski, M., et al., *Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status.* Free Radic Biol Med, 2000. **29**(9): p. 889-99.
79. Yamawaki, H., J. Haendeler, and B.C. Berk, *Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis.* Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1029-33.
80. Arrigo, A.P., *Gene expression and the thiol redox state.* Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 936-44.
81. Clissold, P.M. and R. Bicknell, *The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins.* Bioessays, 2003. **25**(6): p. 603-11.
82. Wilkinson, B. and H.F. Gilbert, *Protein disulfide isomerase.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1699**(1-2): p. 35-44.
83. Gruber, C.W., et al., *Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding.* Trends Biochem Sci, 2006. **31**(8): p. 455-64.
84. Ellgaard, L. and L.W. Ruddock, *The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties.* EMBO Rep, 2005. **6**(1): p. 28-32.
85. Noiva, R., *Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum.* Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(5): p. 481-93.
86. Ferrari, D.M. and H.D. Soling, *The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds.* Biochem J, 1999. **339** (Pt 1): p. 1-10.

87. Appenzeller-Herzog, C., et al., *A novel disulphide switch mechanism in Ero1alpha balances ER oxidation in human cells*. EMBO J, 2008. **27**(22): p. 2977-87.
88. Molteni, S.N., et al., *Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32667-73.
89. Cai, H., C.C. Wang, and C.L. Tsou, *Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24550-2.
90. Tian, G., et al., *The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites*. Cell, 2006. **124**(1): p. 61-73.
91. Quan, H., G. Fan, and C.C. Wang, *Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17078-80.
92. Darby, N.J., J. Kemmink, and T.E. Creighton, *Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase*. Biochemistry, 1996. **35**(32): p. 10517-28.
93. Freedman, R.B., T.R. Hirst, and M.F. Tuite, *Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(8): p. 331-6.
94. Fu, X. and B.T. Zhu, *Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is redox-regulated through formation of an inter-subunit disulfide bond*. Arch Biochem Biophys, 2009.
95. Klappa, P., H.C. Hawkins, and R.B. Freedman, *Interactions between protein disulphide isomerase and peptides*. Eur J Biochem, 1997. **248**(1): p. 37-42.

96. Pirneskoski, A., et al., *Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10374-81.
97. Noiva, R., R.B. Freedman, and W.J. Lennarz, *Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19210-7.
98. Tian, G., et al., *The catalytic activity of protein-disulfide isomerase requires a conformationally flexible molecule*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33630-40.
99. Tanaka, S., T. Uehara, and Y. Nomura, *Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10388-93.
100. Graven, K.K., et al., *Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(5): p. L996-1003.
101. Terada, K., et al., *Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20410-6.
102. Zai, A., et al., *Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide*. J Clin Invest, 1999. **103**(3): p. 393-9.
103. Essex, D.W. and M. Li, *Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion*. Br J Haematol, 1999. **104**(3): p. 448-54.

104. Essex, D.W., et al., *Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation*. *Biochemistry*, 2001. **40**(20): p. 6070-5.
105. Essex, D.W. and M. Li, *Redox modification of platelet glycoproteins*. *Curr Drug Targets*, 2006. **7**(10): p. 1233-41.
106. Janiszewski, M., et al., *Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(49): p. 40813-9.
107. Laurindo, F.R., et al., *Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(6): p. 1101-13.
108. Fernandes, D.C., et al., *Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(1): p. C413-22.
109. Quinn, M.T. and K.A. Gauss, *Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(4): p. 760-81.
110. Brandes, R.P. and J. Kreuzer, *Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation*. *Cardiovasc Res*, 2005. **65**(1): p. 16-27.
111. Clempus, R.E. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(2): p. 216-25.
112. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities*. *Diabetes Care*, 2008. **31 Suppl 2**: p. S170-80.

113. Lee, M.Y. and K.K. Griendling, *Redox signaling, vascular function, and hypertension*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(6): p. 1045-59.
114. Kristal, B., et al., *Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension*. *Am J Hypertens*, 1998. **11**(8 Pt 1): p. 921-8.
115. Duilio, C., et al., *Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(6): p. H2649-57.
116. Vendrov, A.E., et al., *Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(12): p. 2714-21.
117. Barry-Lane, P.A., et al., *p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(10): p. 1513-22.
118. Vendrov, A.E., et al., *Thrombin and NAD(P)H oxidase-mediated regulation of CD44 and BMP4-Id pathway in VSMC, restenosis, and atherosclerosis*. *Circ Res*, 2006. **98**(10): p. 1254-63.
119. Gelderman, K.A., et al., *Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(10): p. 3020-8.
120. Bassuk, J.A., C. Capodici, and R.A. Berg, *Protein disulphide isomerase from human peripheral blood neutrophils*. *J Cell Physiol*, 1990. **144**(2): p. 280-6.

121. Dagher, M.C. and E. Pick, *Opening the black box: lessons from cell-free systems on the phagocyte NADPH-oxidase*. *Biochimie*, 2007. **89**(9): p. 1123-32.
122. Kjeldsen, L., H. Sengelov, and N. Borregaard, *Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients*. *J Immunol Methods*, 1999. **232**(1-2): p. 131-43.
123. Bingham, C.O., 3rd, et al., *Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(44): p. 31476-84.
124. Curnutte, J.T., et al., *Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(14): p. 10813-9.
125. Park, J.W., et al., *Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol*. *Biochemistry*, 1994. **33**(10): p. 2907-11.
126. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. *Arch Biochem Biophys*, 1959. **82**(1): p. 70-7.
127. Jessop, C.E. and N.J. Bulleid, *Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(53): p. 55341-7.

128. Kagan, V.E., et al., *Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(2): p. 117-26.
129. Mandel, R., et al., *Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4112-6.
130. Morimatsu, T., et al., *Actin enhances the activation of human neutrophil NADPH oxidase in a cell-free system*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(1): p. 206-10.
131. Borregaard, N., et al., *Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 86-96.
132. Vaissiere, C., V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini, *NADPH oxidase is functionally assembled in specific granules during activation of human neutrophils*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(5): p. 629-34.
133. Jog, N.R., et al., *The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1690-700.
134. Karlsson, A. and C. Dahlgren, *Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(1): p. 49-60.
135. el Benna, J., J.M. Ruedi, and B.M. Babior, *Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin*

- cytoskeleton during oxidase activation.* J Biol Chem, 1994. **269**(9): p. 6729-34.
136. El Benna, J., et al., *P40phox associates with the neutrophil Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and PMA-activated membrane skeleton: a comparative study with P67phox and P47phox.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 1014-20.
137. Tamura, M., et al., *Identification of an actin-binding site in p47phox an organizer protein of NADPH oxidase.* FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 261-7.
138. Chen, J., et al., *Characterization of a mutation in the Phox homology domain of the NADPH oxidase component p40phox identifies a mechanism for negative regulation of superoxide production.* J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30273-84.
139. Nauseef, W.M., et al., *Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components.* J Biol Chem, 1991. **266**(9): p. 5911-7.
140. Yassin, R., et al., *Effects of chemotactic factors and other agents on the amounts of actin and a 65,000-mol-wt protein associated with the cytoskeleton of rabbit and human neutrophils.* J Cell Biol, 1985. **101**(1): p. 182-8.
141. Babior, B.M., *The leukocyte NADPH oxidase.* Isr Med Assoc J, 2002. **4**(11): p. 1023-4.
142. Reeves, E.P., et al., *Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux.* Nature, 2002. **416**(6878): p. 291-7.

143. Eklund, E.A. and T.G. Gabig, *Deactivation of the subcellular NADPH oxidase and its relationship to termination of the respiratory burst*. *Biochem Soc Trans*, 1991. **19**(1): p. 51-4.
144. Inanami, O., J.L. Johnson, and B.M. Babior, *The leukocyte NADPH oxidase subunit p47PHOX: the role of the cysteine residues*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **350**(1): p. 36-40.
145. Babior, B.M., *The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues*. *Antioxid Redox Signal*, 2002. **4**(1): p. 35-8.
146. Quinn, M.T., et al., *Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(28): p. 20983-7.
147. Ambruso, D.R., et al., *Assembly and activation of the NADPH:O₂ oxidoreductase in human neutrophils after stimulation with phorbol myristate acetate*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(2): p. 924-30.
148. Dusi, S., et al., *Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils*. *Biochem J*, 1993. **290 (Pt 1)**: p. 173-8.