

LUCIANA PESCATORE ALVES

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

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael
Martins Laurindo

São Paulo

2011

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus familiares pela intensa torcida, meu eterno carinho.

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

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

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

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

Apêndice

Curriculum Vitae

Lista de abreviaturas

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

Resumo

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

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

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

Summary

Pescatore LA, The role of protein disulfide isomerase (PDI) in vascular smooth muscle cell migration: possible interaction with Nox1 NADPH oxidase and RhoGTPases [Thesis]. São Paulo. School of Medicine, University of São Paulo, 2011. 89p.

Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC) migration into vessel neointima is a therapeutic target for atherosclerosis and post-injury restenosis. NADPH oxidase-derived oxidants synergize with growth factors to support VSMC migration. We described interaction between NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum redox chaperone Protein Disulfide Isomerase (PDI) in many cell types. However, physiological implications as well as mechanisms of such association are yet unclear. The aim of the present work was to investigate, through experiments of gain or loss of PDI function, the importance of PDI in VSMC migration associated to NADPH oxidase. The specific aims were: *i*) to evaluate effects of PDI silencing or PDI overexpression in VSMC migration *in vitro*; *ii*) to evaluate effects of PDI silencing on PDGF-induced NADPH oxidase isoform expression and ROS production; *iii*) to evaluate the involvement of RhoGTPases on NADPH oxidase regulation by PDI. We show here that PDGF promoted subcellular redistribution of PDI concomitant to ROS production and that siRNA-mediated PDI silencing inhibited such ROS production, while near-totally suppressing the increase in Nox1 expression, with no change in Nox4. Furthermore, PDI silencing inhibited PDGF-induced VSMC migration assessed by distinct methods, while PDI overexpression increased spontaneous basal VSMC migration. To address possible mechanisms of PDI effects, we searched for PDI interactome by PPI networks, which indicated convergence with small GTPases and their regulator RhoGDI. PDI silencing decreased PDGF-induced Rac1 and RhoA activities, without change in their expression. PDI displayed small detectable points of perinuclear co-localization with Rac1 and co-immunoprecipitated with Rac1 and RhoA in a PDGF-independent way. Moreover, there was PDI association with RhoGDI at baseline (confocal and co-immunoprecipitation), decreased after PDGF. Of note, PDI silencing promoted strong cytoskeletal changes: branched stress fiber disorganization, markedly decreased number of focal adhesions and reduced number of RhoGDI-containing vesicular recycling adhesion structures. Overall, these data suggest that PDI is required to support redox and GTPase-dependent VSMC migration. Moreover, RhoGTPases are a potential upstream target mediating the convergence between PDI and NADPH oxidase.

Descriptors: 1. Protein disulfide isomerase 2. NADPH oxidase 3. rho GTP-binding proteins 4. Cell movement 5. Platelet-derived growth factors 6. Endoplasmic reticulum 7. Reactive oxygen species 8. Superoxides 9. Hydrogen peroxide

1. Introdução

Processos de sinalização mediados por vias redox estão envolvidos na gênese de diversas doenças vasculares, incluindo aterosclerose, reestenose pós-angioplastia, hipertensão e diabetes. Esta influência decorre do papel de processos redox na regulação de eventos celulares relevantes à patogênese dessas doenças, incluindo proliferação, migração e diferenciação, além de apoptose e sobrevivência. Entretanto, os mecanismos celulares do equilíbrio redox são complexos e incompletamente conhecidos. Várias evidências obtidas ao longo da última década indicam que o estresse oxidativo é mais complexo do que um simples desbalanço entre oxidantes e antioxidantes (Jones, 2006). De fato, o estresse oxidativo modula a sinalização de diversas condições patológicas não somente causando danos diretos a biomoléculas por radicais livres, mas principalmente por induzir desequilíbrio da ativação e/ou expressão de proteínas-alvo como resultado de uma geração excessiva, descompensada ou descompartmentalizada de espécies reativas de oxigênio (ROS - Jones, 2006). Em células vasculares há numerosas fontes de ROS, incluindo NADPH oxidase, cadeia respiratória mitocondrial, xantina oxidase, lipoxigenase e óxido nítrico sintase (Clempus et al, 2006). Um requisito do conceito de sinalização redox é o fato de que a geração de ROS é um processo enzimático controlado.

Assim, para um entendimento adequado dos mecanismos de sinalização redox, é essencial compreender em detalhes os mecanismos bioquímicos e celulares que regulam a geração enzimática de ROS. Muitas enzimas geradoras de ROS estão envolvidas na sinalização redox. Dentre várias fontes potenciais de ROS, isoformas vasculares do complexo NADPH oxidase de fagócitos parecem ser uma das principais vias de geração dessas espécies com finalidade de sinalização (Brandes & Kreuzer, 2005; Griendling et al, 2000; Lassegue & Clempus, 2003).

NADPH oxidases: regulação funcional por aspectos estruturais

O complexo da NADPH oxidase vascular integra uma família de enzimas denominadas Nox (NADPH Oxidases), cuja função específica é a produção de ROS com finalidade de transdução de sinais, adaptação celular e defesa antimicrobiana, entre outras. A arquitetura geral de Nox(s) implica em um domínio trans-membrana obrigatório contendo, com a porção ligante de NADPH voltada para o citosol e um sítio adicional de ligação a FAD.

A transferência de elétrons ocorre no sentido $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{heme} \rightarrow \text{oxigênio molecular}$, gerando radical superóxido de acordo com a equação:



O membro fundador da família Nox é a NADPH oxidase de fagócitos (gp91phox, também denominada Nox2). A família compreende as isoformas Nox1-Nox5 e Duox 1-2. As subunidades catalíticas dessas isoformas têm graus variados de homologia com a Nox2, embora a arquitetura geral do domínio transmembrana com 6 domínios seja semelhante. Além dessas diferenças, as distintas isoformas têm sua regulação governada por um conjunto de subunidades regulatórias peculiares a cada tipo, que provêm regulação estrita da ativação. Na Nox2 fagocítica, a ativação envolve a montagem de outras subunidades citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e Rac) e não citosólicas (p22^{phox}). A subunidade gp91phox possui na região N-terminal seis α -hélices transmembranas e na região C-terminal possui os domínios de ligação a FAD e NADPH. Esta subunidade é ainda responsável por complexar dois grupos hemes. A subunidade p22^{phox} além de se heterodimerizar e estabilizar gp91^{phox}, se liga a p47^{phox}. Sob estímulo específico, p47^{phox} é fosforilada pela proteína quinase C (desativando domínio auto-inibitório da proteína) e migra para membrana com p67^{phox}. A subunidade Rac, se liga ao p67^{phox} e modula a atividade da enzima (Babior, 1999; Griendling, 2004). A composição e estrutura das subunidades reguladoras variam conforme o tipo de isoforma. Uma importante diferença entre o fagócito e outros tipos celulares é que nestes a ativação enzimática é regulada essencialmente pela montagem das subunidades pré-existentes, enquanto em outras células a ativação de Nox(s) geralmente envolve um aumento de expressão de mRNA e proteína das várias subunidades (Lassegue et al, 2003).

No caso específico do tecido vascular, estudos recentes mostraram que a composição estrutural da NADPH oxidase difere significativamente entre o endotélio, células musculares lisas e fibroblastos da camada adventícia (Griendling et al, 2000; Lassegue et al, 2003). Na célula muscular lisa vascular (VSMC), as duas isoformas principais são a Nox1 (que geralmente está envolvida em respostas de proliferação, crescimento, migração e sobrevivência) e a Nox4 (geralmente envolvida em respostas de diferenciação, estresse celular e apoptose – Tabela 1). As principais subunidades regulatórias da VSMC são: p22phox (que se associa com Nox1 ou Nox4) e NOXO1, NOXA1 e p47phox (que assistem a Nox1, porém não a Nox4 – Clempus et al, 2006; Ambasta et al, 2004). As duas subunidades catalíticas também diferem quanto à expressão e quanto a produção de ROS. A expressão constitutiva de

Nox1 é menor do que a de Nox 4 (Tabela 1). É geralmente aceito que o produto primário de Nox(s) é o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o produto secundário é peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , derivado da dismutação do superóxido pela enzima superóxido dismutase).

Tabela 1. NADPH oxidase Vascular

Subunidade Catalítica	Nox1	Nox2	Nox4	
Subunidade Reguladora	p22 ^{phox}	p22 ^{phox}	p22 ^{phox}	
	NOXO1	p47 ^{phox}	-	
	NOXA1	p67 ^{phox}	-	
	-	p40 ^{phox}	-	
Função	Proliferação, migração, sobrevivência	Proliferação, migração, inflamação	Diferenciação, apoptose, estresse celular	
Expressão X Tipo celular	Cél. Endotelial	+	++	+++
	VSMC	++	-	++
	Fibroblasto	-	+++	+
	Monócito	-	+++++	++

Obs.: os dados representam uma síntese de vários estudos (revisados por Lassègue et al, 2003), portanto são estimativas aproximadas. O sinal “+” equivale a semi-quantificações relativas da expressão de mRNA das diferentes isoformas de Nox(s) e o sinal “-” representa presença indetectável.

Entretanto, no caso da Nox4 (e naturalmente no caso das Duoxes, que não são aqui discutidas), particularmente com expressão induzida, o principal produto detectado é o peróxido de hidrogênio (Helmcke et al, 2009). Outra importante diferença entre as duas principais subunidades em VSMC é a localização subcelular, entretanto ainda controversa devido à baixa especificidade dos anticorpos disponíveis. Enquanto a Nox1 é detectada preferencialmente na membrana e em cavéolas e *lipid rafts*, a Nox4 pode ser detectada preferencialmente no retículo endoplasmático (RE), mas também no citoesqueleto e adesões focais, mitocôndrias (Block, Sadoshima) e núcleo. O tráfego subcelular de proteínas parece ser também importante para a ativação da oxidase. A ativação da oxidase no endotélio (Touyz et al, 2003), VSMC (Li & Shah, 2003) ou fagócito (Kobayashi et al, 1998), é simultânea ao deslocamento de subunidade(s) da região perinuclear para a membrana. Portanto, o nível básico de regulação do complexo NADPH oxidase é a constituição e expressão das

subunidades do complexo em si. Contudo, o alto grau de especificidade da sinalização da NADPH oxidase, não é suficientemente explicado apenas pela seleção de subunidades específicas (Brandes & Kreuzer, 2005).

NADPH oxidase: regulação funcional por proteínas associadas e papel da PDI

Os mecanismos coordenados a nível celular, que restringem a geração espacial e temporal de ROS para microambientes subcelulares específicos, ainda precisam ser melhor definidos. A especificidade da sinalização da NADPH oxidase pode ser promovida por diversos mediadores e proteínas associadas (Brandes & Kreuzer, 2005, Clempus & Griendling, 2006) que, embora não sendo membros canônicos do complexo NADPH oxidase, interagem com a ativação da oxidase ou por várias plataformas proteicas capazes de localizar a NADPH oxidase (Ushio-Fukai, 2006). Particularmente, existem evidências de que a NADPH oxidase é regulada por processos redox (Djordjevic et al, 2005, Seshiah et al, 2002).

Recentemente, investigações de nosso laboratório promoveram um avanço neste sentido, indicando que a NADPH oxidase sofre uma regulação funcional importante e se associa espacialmente à dissulfeto isomerase proteica (PDI), uma chaperona redox do retículo endoplasmático pertencente à superfamília da tiorredoxina (Janiszewski et al, 2005). Estes resultados mostraram que diversos antagonistas da PDI (bacitracina, “scrambled” RNase, anticorpo anti PDI, DTNB), induzem redução de ~40-80% na atividade da NADPH oxidase induzida por agonistas como angiotensina II (AngII; Janiszewski et al, 2005). Além disso, uma evidência mais específica foi obtida por meio de oligonucleotídeos antisense contra a PDI, que induziram redução (~70%) na atividade da NADPH oxidase e na produção de ROS. Um efeito inibitório semelhante e ainda mais intenso foi documentado por meio de um RNA de interferência (siRNA) contra a PDI (Fernandes et al, 2009). Estes experimentos mostraram ainda que o silenciamento da PDI levou à inibição significativa, na condição basal e após AngII, da expressão do mRNA da isoforma Nox1, sem alterações na expressão da Nox4 (Fernandes et al, 2009). Considerando que a inibição da atividade isomerase da PDI por bacitracina, anticorpo anti-PDI e DTNB envolvem tióis (Essex et al, 1995; Gallina et al, 2002; Mandel et al, 1993; Orlandi, 1997), estes resultados sugerem que a PDI contribui para atividade NADPH oxidase por um mecanismo dependente de tióis redox.

Apesar das conseqüências funcionais da interação entre PDI e NADPH oxidase não serem claras, o silenciamento da PDI com oligonucleotídeos antisense foi capaz de prevenir a fosforilação da Akt mediada pela AngII, um alvo fisiológico sabidamente mediado por ROS dependente da NADPH oxidase (Ushio-Fukai et al, 1999). Em homogenatos de fração de membrana, durante a ativação da oxidase por Angiotensina II, a atividade isomerase da PDI (pelo método da “scrambled” RNase - Wilkinson et al, 2004) aumentou 5 vezes. Estudos de co-imunolocalização e co-imunoprecipitação sugeriram interação espacial entre PDI e pelo menos as subunidades p22phox, Nox1 e Nox4 da oxidase (Janiszewski et al, 2005). A associação da PDI com diversas subunidades da oxidase pode ter diversos significados, indicando potencialmente uma associação direta com cada isoforma de Nox, com uma subunidade reguladora comum (como p22phox) ou com um domínio quinase/fosfatase, ou ainda uma co-migração para um microdomínio específico.

Em paralelo com os experimentos de perda de função da PDI descritos até o momento, estudos mais recentes em nosso laboratório examinaram os efeitos do ganho de função da PDI no complexo NADPH oxidase. A superexpressão da PDI (*ca.* 2,3 vezes) em VSMC levou a uma ativação basal espontânea, independente de estímulo farmacológico, da atividade do complexo NADPH oxidase, expressão da isoforma Nox1 e produção de ROS. No entanto, a superexpressão da PDI mutada em seus 4 resíduos de cisteínas redox teve um efeito semelhante. Este fato indica que a PDI coopera com a NADPH oxidase também por meio de efeito independente de tióis (possivelmente um efeito chaperona, conforme comentado nas sessões subseqüentes). É interessante que, após superexpressão de quaisquer desses tipos de PDI, o estímulo subseqüente com AngII foi ineficaz, i.e., não levou a aumento na produção de ROS, atividade NADPH oxidase e mRNA Nox1 (Fernandes, et al 2009). Estes dados são consistentes com a idéia que a superexpressão de PDI (tanto selvagem como mutada) é suficiente para aumentar a ativação de Nox1.

Considerando que o complexo mais bem estudado da NADPH oxidase é o fagocítico, outros experimentos de nosso grupo abordaram a convergência entre a PDI e este tipo de complexo. Em macrófagos, a transfecção com plasmídeo PDI-senso aumenta fagocitose de *Leishmania*, enquanto o plasmídeo PDI-antisense, siRNA contra PDI ou catalase reduzem a infecção (Santos, et al 2009). Em neutrófilos humanos, a PDI associa-se a várias subunidades do complexo NADPH oxidase, particularmente p47phox, e modula

funcionalmente a ativação (de A Paes et al, 2010). Em resumo, a interação e regulação da NADPH oxidase pela PDI não é um fenômeno específico de VSMC, mas ocorre em outros tipos celulares.

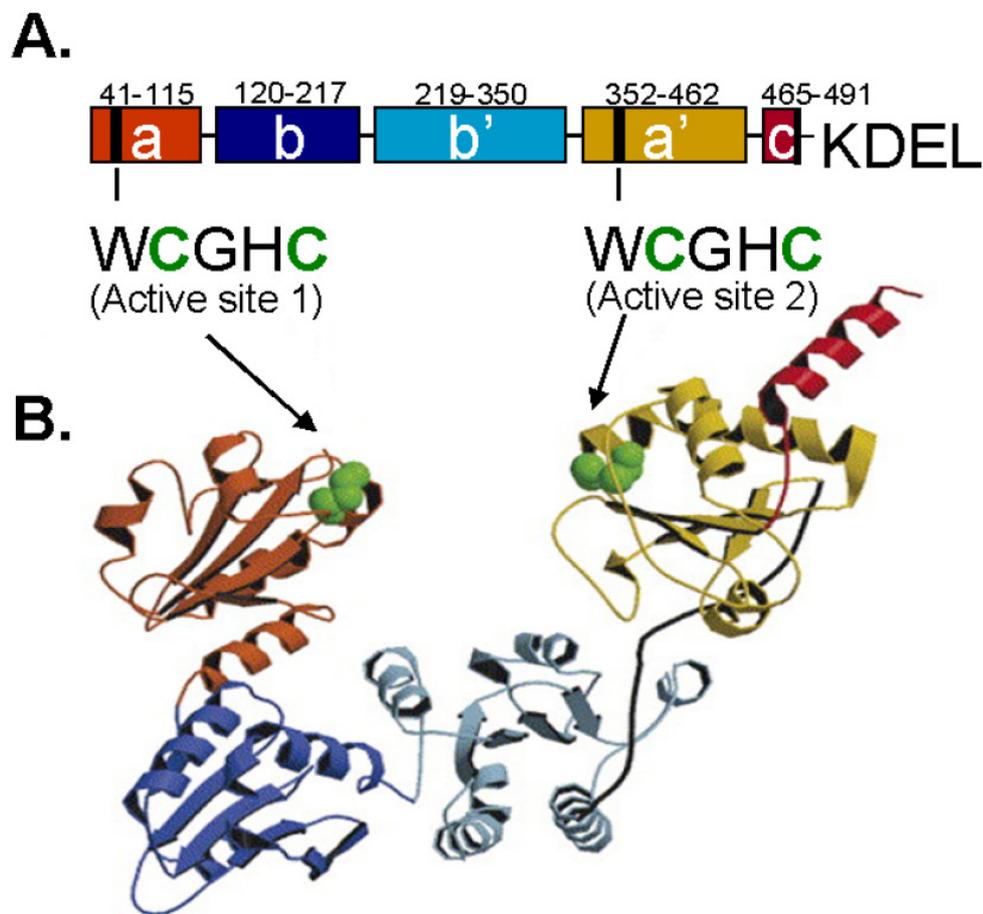
Características estruturais e funcionais da PDI

A superfamília da tiorredoxina é particularmente importante e reconhecidamente participa da sinalização celular (Arrigo, 1999; Clissold & Bicknell, 2003; Wilkinson et al, 2004, Yamawaki et al, 2003). A principal característica da família da tiorredoxina é o motivo ditiol catalítico CXXC, no qual X representa diferentes resíduos de aminoácidos (CGHC, no caso da PDI). Dentre os diversos membros da superfamília da tiorredoxina, a PDI (55Kda) e seus análogos são os únicos a catalisarem reações de isomerização (rearranjos de pontes dissulfeto por repetidos ciclos de redução e oxidação - Clissold et al, 2003; Ellgaard et al, 2005; Ferrari et al, 1999; Noiva, 1999, Wilkinson et al, 2004).

A função clássica da PDI é a de promover o enovelamento redox de proteínas no retículo endoplasmático (RE; Gruber et al, 2006), que é a principal localização subcelular da PDI. Equivalentes oxidantes necessários para esta função da PDI são providos por uma flavoproteína denominada Ero-1 (“Endoplasmic reticulum oxidase-1”), a qual por sua vez é reoxidada pela transferência, via FAD, de elétrons para o oxigênio molecular, gerando H₂O₂ (Gross et al, 2006; Tu et al, 2002; Wilkinson et al, 2004). No retículo, devido a condições relativamente oxidantes (GSH/GSSG ~2-3:1), a PDI exerce atividade isomerase/oxidase, enquanto fora do retículo (GSH/GSSG >30-100:1) a PDI atua principalmente como redutase (Noiva, 1999, Wilkinson et al, 2004). Esta versatilidade redox da PDI decorre de inúmeros fatores, incluindo baixo pKa (= 4,5) da cisteína próxima ao sítio ativo a N-terminal (Wilkinson et al, 2004) que torna esse tiol altamente reativo em pH fisiológico.

Estruturalmente, a PDI tem cinco domínios organizados na sequência: a-b-b'-a'-c (Fig.1). Os domínios a e a' da PDI são homólogos à tiorredoxina e apresentam sítios ativos independentes (WCGHC), enquanto os domínios b e b' não apresentam o motivo redox, mas têm enovelamento semelhante à tiorredoxina e estão possivelmente relacionados com o reconhecimento/interação da PDI com peptídeos (Ellgaard et al, 2005; Ferrari et al, 1999; Gruber et al, 2006; Noiva, 1999; Tian et al, 2006; Wilkinson et al, 2004). O domínio c é um

suposto sítio de ligação a Ca^{2+} , e parece ser menos crítico em mamíferos do que em leveduras (Tian et al, 2006). As cisteínas redox-ativas dos domínios *a* e *a'* podem estar na forma de ditióis reduzidos, intramoleculares ou dissulfetos mistos. Os domínios *a* e/ou *a'* são suficientes para a atividade oxidase da PDI, enquanto para isomerizações mais complexas é necessário o envolvimento dos 4 domínios tiorredoxina (Wilkinson et al, 2004).



(Laurindo et al, 2008)

Fig.1. Estrutura de múltiplos domínios da PDI. **A.** Estrutura modular da PDI, com destaque para cisteínas presentes no sítio tiorredoxina e seqüência C-terminal KDEL de retenção no RE; **B.** Estrutura cristalográfica da PDI de levedura.

Rescentes estudos estruturais avançaram no entendimento dos mecanismos catalíticos da PDI. Estudos com diferentes temperaturas de cristalização indicam que a PDI pode assumir duas diferentes estruturas. A primeira, uma estrutura flexível em forma de “U” (Fig.1) na qual os 2 motivos CGHC têm cooperação mútua, um em cada ponta deste “U”, e a parte interna do “U” (domínio \underline{b} e \underline{b}') é responsável pela ligação da proteína a peptídeos (Tian et al, 2006). O domínio \underline{b}' parece ser o principal sítio de ligação a substratos e assim como o domínio \underline{b} , é rico em resíduos hidrofóbicos. Em mamíferos um possível modelo é o de que após a oxidação das cisteínas do domínio \underline{a} (pela Ero1), há uma mobilidade região adjacente da molécula (*x-linker region*), deslocando os domínios \underline{a}' e \underline{b}' , possibilitando maior exposição da região hidrofóbica de ligação a proteínas mal enoveladas, aumentando assim a atividade chaperona da enzima (Wang et al, 2010; Serve et al, 2010). Por outro lado, a redução dessas cisteínas induz um fechamento na estrutura deste “U”, reduzindo a exposição da região hidrofóbica a peptídeos (Wang et al, 2010). A segunda estrutura é em forma de “barco”, bem mais linear do que a primeira, induzida por uma drástica rotação do domínio \underline{a} . A função desta última é ainda desconhecida, mas pode refletir uma forma inativa da proteína, ou ainda uma adaptação da desta a substratos ainda maiores (Tian et al, 2008).

A superfície hidrofóbica e a flexibilidade estrutural da PDI permitem a ligação desta proteína a substratos de diferentes tamanhos e com grupos dissulfeto em diferentes localizações (Gruber et al, 2006, Tian et al, 2006, Wilkinson et al, 2004). De fato, inúmeros estudos sugerem que o sítio de ligação da PDI a substratos é independente do sítio catalítico (tiol-redox ativo; Noiva et al, 1993), contudo, os motivos redox são necessários para a posterior estabilização desta ligação (Klappa et al, 1997; Noiva et al, 1993). Mais ainda, a fosforilação e ligação ao Ca^{2+} podem potencialmente modular a ligação da PDI a proteínas (Guthapfel et al, 1996; Rao et al, 1993; Wilkinson et al, 2004). Em sintonia com estes aspectos estruturais, a PDI possui ainda função chaperona, a qual parece ser independente dos domínios redox ativos (Tian et al, 2006).

Estas várias atividades compõem um modelo pelo qual a PDI liga-se a substratos primeiramente por uma atividade chaperona, independente de seus tióis e posteriormente exerce atividade tiol oxidoredutase/isomerase sinérgica e complementar à atividade chaperona (Hatahed & Ruddock, 2009). Inúmeros (>17) análogos da PDI foram descritos,

indicando que a PDI faz parte de uma grande família com propriedade tiol-oxidoredutase, chaperona e isomerase (Clissold & Bicknell, 2003; Ellgaard et al, 2005; Ferrari et al, 1999).

A PDI é uma proteína abundante, presente na ordem de mM no RE (Noiva R, 1999), importante ou mesmo essencial para sobrevivência celular, e a sua superexpressão forçada aumenta a resistência à apoptose após hipóxia em astrócitos ou células endoteliais (Graven et al, 2002; Sullivan et al, 2003; Tanaka et al, 2000). Tais efeitos fisiológicos são atribuídos ao importante papel da PDI no enovelamento de proteínas. A PDI é ainda capaz de formar agregados com outras proteínas, p.ex., com a oxidase Ero-1 (Otsu et al, 2006) ou com outras chaperonas no lúmen do RE (Meunier et al, 2002), ou ainda com várias oxi-redutases no lado citosólico do Sec61 (Stockton et al, 2003). Um interessante trabalho descreveu a PDI como mediadora, por mecanismos redox, da estabilização de sítios de ligação de peptídeos ao complexo MHC-1, permitindo a seleção do peptídeo ideal no contexto da apresentação de antígenos (Park et al, 2006). É interessante notar que a PDI, assim como outras chaperonas do RE, são importantes antígenos em processos auto-imunes como doença reumática cardíaca (Faé et al, 2008).

Apesar de a PDI conter a seqüência KDEL (lys-asp-glu-leu - Harter et al, 1996) de retenção no RE (presente na região C-terminal da proteína), evidências crescentes indicam possibilidade de localização fora do RE, podendo inclusive ser secretada. Neste contexto, a PDI pode se associar à membrana plasmática por interação eletrostática (Terada, 1995) e de fato tem sido detectada na superfície de uma variedade de células. Os mecanismos pelo qual a PDI sobre passa o receptor KDEL, apesar de manter esta seqüência de retenção, ainda não estão claros (Terada et al, 1995, Wilkinson et al, 2004). Na superfície celular, a PDI exerce predominantemente atividade redutase (Turano et al, 2002) e pode catalisar reações de trans-nitrosação responsáveis pela internalização de óxido nítrico a partir de S-nitrotióis extracelulares (Ramachandran et al, 2001). Nesse local, a PDI está ainda envolvida na modificação de cisteínas de proteínas de membrana, podendo modular fortemente a adesão celular mediada por receptores de integrinas. O modelo mais estudado neste sentido é a adesão/agregação plaquetária. A agregação plaquetária é inibida por antagonistas da PDI, incluindo o anticorpo monoclonal neutralizante RL90 (Essex et al, 1995; Essex et al, 2001; Lahav et al, 2000; Lahav et al, 2002). De fato, é conhecido que a troca tiol-dissulfeto enzimática estabiliza a agregação plaquetária mediada pela integrina $\alpha 2\beta 1$ (Lahav et al, 2003).

Além disso, foi demonstrado por FRET que subunidades beta de integrinas interagem fisicamente com a PDI (Burgess et al, 2000). Além disso, certas integrinas (p.ex., $\alpha 2\beta 3$) têm um motivo tiorredoxina CXXC (Walsh et al, 2004) e podem ter atividade tiol isomerase endógena, embora a função desta atividade esteja ainda incerta. Um efeito análogo da PDI no sistema de coagulação foi descrito recentemente. A PDI desabilita, de modo dependente de NO, a coagulação induzida pelo fator tecidual, desviando a sinalização para vias mediadas pelo fator VII (Ahamed et al, 2006), embora o mecanismo preciso deste efeito da PDI não esteja claro (Hatahet & Ruddock, 2009). A PDI de superfície tem ainda a propriedade de se ligar à galectina-9 na superfície de linfócitos T e, por mecanismos redox, dar suporte à migração celular e à infecção por HIV (Bi et al, 2011). Em células endoteliais, a função oxidoreductase da PDI de superfície celular contribui para manter a assimetria de fosfolípidos de membrana, prevenindo a exposição da fosfatidil-serina na face externa da membrana plasmática via inibição de translocases de aminofosfolípidos (responsáveis pela atividade flipase e/ou flopase trans-membrana) (Popescu et al, 2010). Mais ainda, além de seus efeitos na superfície celular, a PDI tem importantes funções no tráfego e secreção de proteínas, p.ex., na ligação e exportação da tireoglobulina (Delom et al, 2001).

Em conjunto, a combinação de diversas propriedades redox da PDI, seu papel no tráfego e secreção de proteínas e seu envolvimento em cascatas de sinalização abrem perspectivas novas e amplas para o esclarecimento de mecanismos de regulação funcional da NADPH oxidase, e consequentemente estresse oxidativo, na fisiologia do sistema vascular.

Modelos de interação entre PDI e o complexo NADPH oxidase

Os dados discutidos até o momento indicam de modo claro que a PDI se associa e regula funcionalmente o complexo NADPH oxidase. Os mecanismos pelos quais a PDI assiste o complexo NADPH oxidase não estão ainda elucidados. Possivelmente, múltiplas vias estejam envolvidas, refletindo as diversas atividades funcionais da PDI. Os resultados obtidos em homogenatos de membranas incubados com NADPH exógeno indicam ser pouco provável que mudanças no estado redox celular ou disponibilidade de NADPH sejam fatores primários explicando o efeito da PDI na oxidase. De fato, a PDI não tem características de um tampão redox, considerando suas propriedades redox peculiares e sua compartimentalização (Meusser et al, 2005 Tian et al, 2006). Outras hipóteses compreendem um efeito da PDI no tráfego ou na localização subcelular de subunidades específicas ou ainda um papel na

degradação proteolítica destas proteínas. Um efeito chaperona da PDI no complexo é sugerido pelos dados obtidos com a superexpressão da PDI, comentados anteriormente (Fernandes et al, 2009).

Pelo menos dois modelos conceituais básicos podem ser propostos para o entendimento de como a PDI interage com o complexo NADPH oxidase. O modelo mais intuitivo pressupõe uma possível interação direta entre o motivo tiorredoxina da PDI e um motivo complementar semelhante em alguma subunidade da Nox ou proteína reguladora da oxidase. Entretanto, argumentos dando suporte a este modelo são questionáveis ou conflitantes. Primeiro, motivos tiorredoxina típicos estão ausentes em todas as subunidades catalíticas ou reguladoras conhecidas da oxidase, conforme buscas em bases de dados pertinentes. Por outro lado, foi previamente proposta a existência de um possível ditiol regulador na Nox2 (Cross, 1990), além de 4 cisteínas na molécula de p47phox (Gruber et al, 2006). Particularmente, conforme discutido acima, a ligação da PDI a outros substratos proteicos, incluindo neste contexto possíveis subunidades da oxidase, usualmente não requer a ação de motivos tiorredoxina e ocorre principalmente por meio de interações hidrofóbicas no domínio *b'* ou em sua proximidade (Mezghrani et al, 2001; Kaufmann et al, 2007, Meunier et al, 2002, Sekaki et al, 1984, Tian et al, 2006). Mesmo com outras proteínas da família da PDI, como Erp57, a ligação com a PDI não envolve motivos tiorredoxina (Jones, 2006). Os motivos tiorredoxina, entretanto, são importantes para a estabilização subsequente da ligação à PDI.

Estas considerações sugerem um modelo alternativo para a interação PDI-oxidase. Neste modelo, a PDI se ligaria a subunidades relacionadas à oxidase via domínios hidrofóbicos e as vias redox-sensíveis do efeito da PDI na oxidase seriam dependentes de uma troca tiol-dissulfeto com outros ditióis ainda não esclarecidos, pertencentes a proteínas reguladoras, estruturais ou da família da tiorredoxina. Desta forma, o domínio tiorredoxina da PDI, essencial à sua função isomerase, sinergiza com domínios hidrofóbicos de reconhecimento e ligação de substratos e atividade chaperona.

Papel de processos redox em doenças vasculares

Durante o processo de angiogênese, aterosclerose ou restenose pós-angioplastia, a migração vascular é essencial à reparação vascular. Nestes processos, a secreção local de fatores de crescimento promove um potente estímulo à proliferação e migração de VSMC.

Tais fatores incluem fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- β e angiotensina II (AngII; Schwartz, 1997). Particularmente *in vivo*, entretanto, existem crescentes evidências indicando que proliferação e migração são processos distintos, controlados por mecanismos paralelos, porém independentes. *In vivo*, o PDGF é liberado no ambiente da lesão por plaquetas (fonte predominante nas primeiras 24-48 horas após uma lesão mecânica), monócitos e células musculares lisas, induzindo, de modo autócrino, migração de VSMC da camada média através da lâmina elástica interna, formando uma camada íntima espessada. Este processo é essencial na formação da neoíntima após lesão (Schwartz, 1997).

A geração de ROS durante aterosclerose e na reparação vascular após angioplastia é bem conhecida e foi claramente demonstrada, inclusive por trabalhos de nosso grupo (Sousa et al, 2000; Leite et al, 2003; Fernandes et al, 2007). A inibição da formação da neoíntima com a utilização de antioxidantes foi também extensamente investigada na literatura, com resultados ainda conflitantes, mas indicativos de um papel complexo de processos redox na formação da neoíntima (Azevedo et al, 2000). Especificamente, ocorre inibição da migração de VSMC induzida por PDGF na presença de inibidores de ROS intracelulares como catalase, NAC ou DPI (Sundaresan et al, 1995; Weber et al, 2004). Estes estudos sugerem assim que a migração de VSMC seja um processo pelo menos em parte dependente da geração de ROS (Weber et al, 2004). Estudos adicionais indicam que o mecanismo redox-sensível desta via é posterior à ligação do ligante ao receptor de PDGF (Weber et al, 2004).

Neste sentido, estudos recentes com siRNA contra Nox1, em células musculares lisas induzidas por FGF, mostraram uma inibição da produção de ROS, migração e atenuação da secreção de metaloproteinases (necessária para migração por digerir matriz celular), sem alteração nas células transfectadas com siRNA contra Nox4 (Schröder et al, 2007). Em particular, siRNA Nox1 não foi capaz de reduzir a geração basal de ROS, mas sim a induzida por FGF, ao contrário do evidenciado com siRNA Nox4. Além disso, ocorreu inibição da migração celular em aortas de camundongos Nox1 *y/-* cultivadas na presença do agonista FGF e posterior recuperação da migração após restituição da Nox1 por meio de vetor viral (Schröder et al, 2007). Tais observações indicam importante papel da migração celular por mecanismos redox-dependentes durante diferentes processos patogênicos.

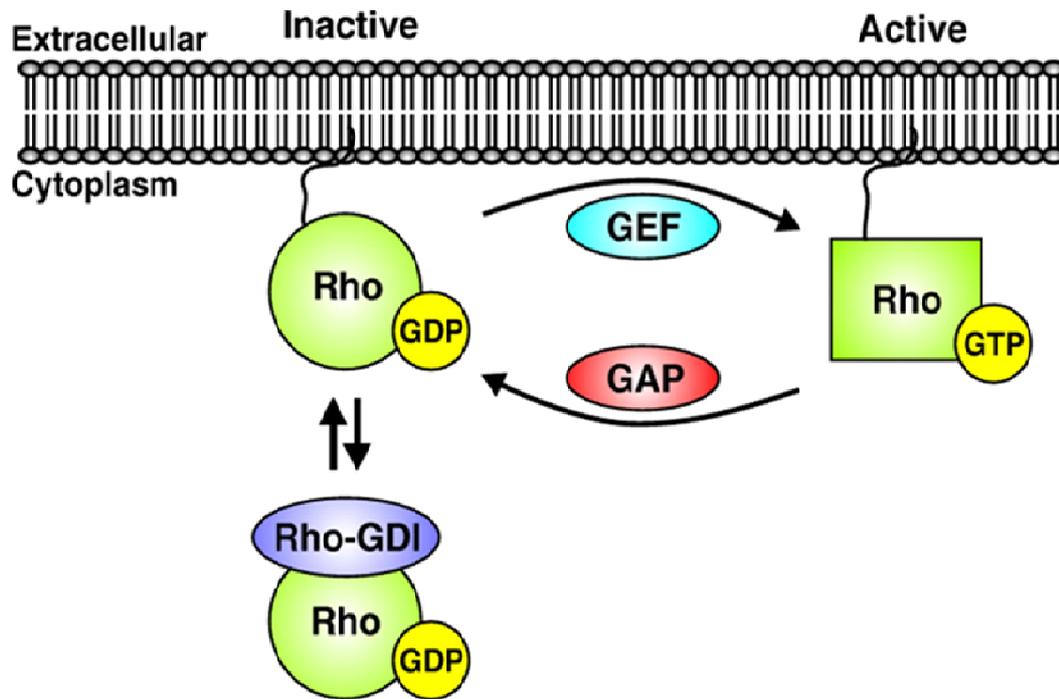
Migração celular e RhoGTPases

A migração celular é um mecanismo importante para a gênese de doenças vasculares. As GTPases da família Rho têm um papel central no controle da migração celular (van Nieuw Amerongen et al, 2001). RhoGTPases pertencem ao grupo de pequenas proteínas-G, que se constituem em interruptores de sinalização em praticamente todos os subcompartimentos celulares. RhoGTPases transitam entre o citoplasma e a membrana celular. São encontradas em plantas, leveduras, invertebrados e vertebrados. Em vertebrados, a família da Rho GTPases consiste em pelo menos 22 proteínas agrupadas nas principais subfamílias Rho, Rac e Cdc42. Essas proteínas são responsáveis pela regulação do formato, polaridade e mobilidade celular e ainda estão envolvidas na regulação de enzimas e no controle transcricional de inúmeros genes.

Como todas as pequenas proteínas G (*small G-proteins*), a transdução de sinal é estimulada por GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) que catalisam a troca do GDP por GTP; e inibida por GAPs (*GTPase-activating proteins* – Fig.2) que aumentam a hidrólise do GTP. Diferentes GEFs e GAPs podem atuar de modo específico para determinadas RhoGTPases, como por exemplo p190RhoGAP, geralmente associada a reduções na atividade de RhoA. Desta forma, GEFs e GAPs são essenciais à regulação da função de pequenas GTPases.

A RhoGDI é outra proteína também importante no papel da regulação de RhoGTPases. O resíduo lipídico da GTPase inativa (GDP) está escondido por um complexo com uma GDI (*GDP dissociation inhibitor*) específica, que confere uma solubilidade em água pela GTPase e ainda inibe a troca GDP-GTP (Fig.2). Sob este ângulo, RhoGDI pode ser considerada uma chaperona dedicada a RhoGTPases e responsável pelo tráfego destas para membranas (Boulter et al, 2010).

Inicialmente, a interação da RhoGDI com RhoGTPases foi descrita como limitante da de GTPases, ao estimular o efluxo dessas proteínas da membrana plasmática. Por outro lado, outros estudos têm demonstrado um papel importante da RhoGDI não como inibidor simples, mas como organizador da ativação localizada de GTPases para a correta polarização celular. A regulação de RhoGTPases em plantas evidencia um importante papel de RhoGDI na coordenação do crescimento de pêlos radiculares (tricoma de raízes, responsáveis pela aumento da superfície de absorção).



(Huveneers et al. *J Cell Sci.* 2009)

Fig.2. Ciclo de ativação e desativação de RhoGTPases. Papel de GEFs e GAPs na troca GTP/GDP e papel de RhoGDI em esconder o resíduo lipídico da GTPase inativa.

O silenciamento desta GDI de plantas gera um crescimento descoordenado do pelo em distintas direções, impossibilitando seu alongamento correto (Carol et al, 2005). A regulação de GTPases envolvendo ou não RhoGDI está fortemente associada à inserção de GTPases em membranas. Para ativação e seus efetores as RhoGTPases precisam se ligar à membrana plasmática. A ligação covalente de proteínas a resíduos lipídicos é necessária para sua ancoragem à membrana. No caso das RhoGTPases, após a síntese protéica no ribossomo, a proteína é reconhecida pelo motivo CAAX (região C-terminal- C=cys; A=resíduos alifáticos; X= ser, thr, met, leu, ala ou gln), por uma prenil-transferase (Pechlivanis et al, 2006). Prenil-transferases modificam a cisteína do motivo CAAX adicionando um tio-éster ligado a farnesil (C15) ou geranylgeranil (C20). O resíduo X, do motivo CAAX, determina se a proteína será alvo de uma farnesil-transferase ou geranylgeranil-transferase (Moore et al, 1991). A maioria das proteínas da família da Rho se liga a geranylgeranil-transferases. Enquanto a prenilação ocorre no citoplasma, os demais processos pós prenilação ocorrem na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático e no golgi (Wright & Philips, 2006). A prenilação

da sequência *CAAX* torna a proteína alvo de uma endoprotease específica (prenylil-*CAAX*-specific – Rce1), presente essencialmente na endomembrana do retículo endoplasmático que cliva os três últimos aminoácidos da região *CAAX* (Boyartchuk et al, 1997). Ainda na superfície citosólica do retículo, uma metiltransferase (Icmt) é responsável pela carboximetilação da cisteína prenilada (Clarke et al, 1992). No entanto, apesar dessas modificações pós-traducional tornarem a região C-terminal hidrofóbica, isso não é suficiente para o endereçamento da proteína à membrana plasmática. Assim, no Golgi, ocorre a adição de um “segundo sinal”, que é a adição de um ácido palmítico (palmitoilação) à região C-terminal da proteína. Algumas proteínas da família da Rho (como Rac2 e Cdc42) não possuem esse segundo sinal, responsável pelo endereçamento na membrana plasmática (Murphy et al, 2001). Assim, quando dissociadas de suas chaperonas citosólicas (RhoGDI), estas se localizam em endomembranas, dando suporte à idéia de que o processamento da sequência *CAAX* serve para o endereçamento de proteínas à superfície do retículo (Wright & Philips, 2006) e daí posteriormente, via RhoGDI, para a membrana plasmática, aonde são ativadas (Boulter et al, 2009).

Na membrana plasmática, Rho GTPases ativam cascatas de sinalização localizada, com funções específicas na reorganização do citoesqueleto celular durante o movimento. Na célula estática, a actina está polimerizada. Antes de iniciar o movimento, é necessária nova polimerização de actina na frente de migração para o desenvolvimento de filipódios (dependente de Cdc42) e lamelipódios (dependente de Rac1) na direção que a célula pretende seguir. A retração destas protrusões é prevenida por Rac, que inibe a fosforilação da MLC (*myosin light-chain* – que, quando não fosforilada, inibe interação actina/miosina). Após formação dessas extensões na frente de migração, é necessária a formação de novas adesões focais ao substrato e degradação de adesões antigas na parte de trás da célula, possibilitando a contração do corpo celular, o que resulta no impulso da célula para frente. Adesão e contração são dependentes de RhoA, responsável pela indução de fibras de estresse e aumento da fosforilação da MLC (Gerthoffer et al, 2007).

A sinalização de RhoA tem sido ainda descrita como via principal de regulação dinâmica de podosomos dependente de actomiosina. Podosomos são estruturas dinâmicas, de curta meia vida, que estabelecem contato entre célula e matriz extracelular e são capazes de degradar componentes de matriz extracelular. São essenciais tanto no processo fisiológico como patológico de invasão celular envolvendo diapedese transendotelial e inflamação em

situações como aterosclerose e metástase (Linder S et al, 2009). Estudos recentes mostraram que sob estímulo de Prostaglandina E2, há redução de podosomos e aumento de adesões focais em células dendríticas, de modo dependente de miosina II. Tais fenômenos são simultâneos ao aumento da atividade de RhoA e redução da atividade de Rac e Cdc42. É interessante que a inibição do efetor de RhoA (Rock) impede a desorganização do podosomo, sugerindo que a Prostaglandina E2 ativa a sinalização de RhoA-Rock, levando à contração via actomiosina, desorganização do podosomo e formação de adesão focal (Van Helden et al, 2008).

RhoGTPases são, desta forma, interruptores moleculares responsáveis por iniciar cascatas de sinalização celular. Assim, a regulação na localização subcelular e na ativação/desativação destas proteínas durante a migração celular é de extrema importância por possibilitar interações com outras proteínas efetoras, levando adiante e ramificando um sinal específico.

Migração celular, NADPH oxidase e processos redox

Conforme discutido acima, distintas GTPases têm papéis específicos no processo de migração celular. RhoA regula a ligação entre adesões focais e a formação das fibras de actina, enquanto Rac1 é necessária para o dobramento da membrana (Ridley et al, 1992). Desta forma, uma das principais moléculas sinalizadoras intracelulares da migração celular é a GTPase Rac, sendo que em VSMC a principal isoforma é a Rac1.

Apesar de a ativação de Rac não ser em si dependente de ROS, a incubação com dominante negativo de Rac, diminui significativamente a migração induzida por PDGF, sugerindo-o como um mediador proximal do complexo da oxidase (Weber et al, 2004). No contexto do seu papel na sinalização local do complexo de adesão focal, Rac1 está envolvido estreitamente com a produção de ROS via NADPH oxidase. Os mecanismos de interação entre Rac1 e NADPH oxidase são bastante discutidos e envolvem pelo menos 2 vias potenciais: 1) interação com p67phox (Ugolev et al, 2008), a qual, entretanto, é uma subunidade pouco expressa em VSMC (Lassegue & Clempus, 2003); 2) interação direta com subunidades catalíticas da Nox (Kao et al, 2008). Neste sentido, RhoGDI exerce papel fundamental no controle da associação da Rac ao complexo NADPH oxidase. No sistema livre de células em neutrófilos, o complexo entre RhoGDI e RacGDP (i.e., inativa) é praticamente tão eficiente quanto a RacGTP (i.e., ativa) em sustentar a ativação da NADPH

oxidase (Di-Poi et al, 2001). Em cardiomiócitos, há um requerimento essencial da RhoGDI para a produção de ROS dependente de Rac1 na hipertrofia cardíaca (Custodis et al, 2006). Este papel da RhoGDI está em sintonia com o efeito geral deste regulador de GTPases na polaridade celular, discutido acima para o caso de plantas (Carol et al, 2005), considerando que o silenciamento da RhoGDI induz neste modelo perda da produção localizada de ROS (Kost et al, 2005). De fato, a interação entre Rac e NADPH oxidase confere um caráter focal à produção de ROS na célula e é um importante mecanismo de compartimentalização da sinalização redox (Terada, 2006; Ushio-Fukai, 2006). De fato

Sumário e Hipótese

Em resumo, a PDI é uma proteína versátil com importante papel em processos que vão desde manutenção de funções fundamentais à homeostase celular à sinalização celular dependente de processos redox associados à NADPH oxidase. Contudo, apesar de inúmeros estudos demonstrando o efeito regulador da PDI no complexo NADPH oxidase, ainda não há evidência clara da relevância fisiológica desta interação. Mais ainda, os mecanismos específicos pelos quais a PDI converge com o complexo NADPH oxidase não são claros. Neste sentido, a hipótese geral de nosso estudo é que a PDI regula vias redox que governam a migração celular. Como ferramenta geradora de hipóteses para entender o mecanismo pelo qual a PDI regula a NADPH oxidase, foram analisadas redes de interação proteína-proteína, por métodos de Biologia de Sistemas, que identificaram possível convergência entre PDI e RhoGTPases e seu regulador RhoGDI. Desta forma, uma segunda hipótese de nosso estudo é que RhoGTPases são um possível mecanismo na regulação da NADPH oxidase e migração celular pela PDI.

2.Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar, por meio de experimentos de perda e ganho de função, a importância da PDI na migração celular associada à ativação do complexo NADPH oxidase, bem como possíveis mecanismos envolvidos na interação entre a PDI e esse complexo enzimático durante a migração celular.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar o efeito do silenciamento da PDI, bem como da expressão forçada de PDI “wild-type” na migração de VSMC *in vitro*.
- 2) Analisar o efeito da transfecção de siRNA da PDI atividade e expressão de distintas isoformas da NADPH oxidase vascular e produção de ROS induzida por PDGF.
- 3) Investigar o envolvimento de Rho GTPases na regulação do complexo NADPH oxidase pela PDI.

3. Métodos

3.1. Cultura de células

As células musculares lisas vasculares de coelhos (VSMC) pertencem a uma linhagem celular estabelecida e imortalizada por seleção pelo Prof. V. Buonassisi, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina e foram gentilmente disponibilizadas pela Profa. Helena B. Nader.

VSMC foram mantidas em frascos de cultura contendo meio completo F-12 Coon's com penicilina/estreptomicina, suplementado com 10% (v/v) de SFB (Gibco BRL-Life Technologies Grand Island, NY, USA) e mantidos em estufa de 5% CO₂. Para todos os experimentos as células foram carenciadas de 12-24h antes de adicionar o estímulo de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-BB (PDGF).

O homogenato total foi obtido após raspagem das células em tampão de lise (50mM Tris, pH 7,4 contendo 0,1mM EDTA e EGTA e inibidores de protease - 1mM PMSF, 10µg/ml leupeptina e aprotinina). Este homogenato foi sonificado (3x 10seg, 8W) e centrifugado a 12000 g, 4°C por 15 min, para a remoção de aglomerados celulares. Nos experimentos de imunoprecipitação, acrescentamos 1% Triton X-100 ao tampão de lise e as células foram deixadas por 30 min no gelo, seguida de centrifugação. Para os ensaios de *pull-down* com proteína de fusão, VSMC foram lisadas em tampão RIPA (50mM Tris pH 7,2, 500mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio contendo inibidores de protease - descritos acima - e inibidores de fosfatase: 1mM ortovanadato e fluoreto de sódio). Após 10 min neste tampão, as células foram raspadas da placa e submetidas à centrifugação (12000 rpm, 15min). A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (BioRad), utilizando-se uma curva de concentração com albumina bovina (BSA).

Em alguns casos, foi necessária a separação da fração de membrana. Resumidamente, para a obtenção da fração de membrana foram utilizados procedimentos já previamente validados, nos quais as células são raspadas em tampão de lise (descrito a cima), sonicadas (3x 10seg, 8W) e centrifugadas (18.000 g por 15 min, 4°C), para a retirada de debris e células inteiras e o sobrenadante centrifugado a 100.000 g por 1h (Laurindo et al, 2002). A fração de membrana foi ressuspensa no mesmo tampão de lise inicial.

3.2. Transformação de bactérias e purificação do DNA plasmideal

A transformação da *E. coli* (DH5 α) com o plasmídeo específico foi realizada por choque térmico, como descrito por Sambrook & Russell (2001). Resumidamente, a bactéria competente foi incubada com o plasmídeo por 30 min em gelo, seguido de uma incubação por 2 min 42°C e 1min no gelo. Após a adição de meio SOC as bactérias foram incubadas por 1h a 37°C para a posterior seleção das bactérias transformadas por plaqueamento em meio LB (Luria Bertani), Ágar (0,7%) e ampicilina (100 μ g/ml). Algumas colônias foram selecionadas ao acaso para clonagem, extração e purificação do DNA plasmideal (Plasmid Mini Kit; Qiagen).

3.3. Transfecção em VSMC

3.3.1. Lipofectamina®

DNA plasmidial

Para a transfecção de DNA plasmidial, $2 \cdot 10^5$ cel/poço foram adicionadas em uma placa de 6 poços e carenciadas por 12-16h. Após 24h do plaqueamento 5 μ g de DNA foram transfectadas, na presença de Lipofectamina® (5 μ g/ml) em meio F12 na ausência de soro e antibióticos, por 8h. Após 48h, algumas placas foram estimuladas com PDGF (100 ng/ml; indutor de migração celular). O vetor vazio (pcDNA3.1) foi utilizado como controle. A superexpressão da enzima foi confirmada por western blotting com anticorpo anti PDI.

siRNA em VSMC

Para a transfecção de siRNA, $1 \cdot 10^5$ células/poço foram adicionadas em uma placa de 6 poços (ou $0,8 \cdot 10^6$ em placa 100mm) e carenciadas por 12-16h. Após 24h do plaqueamento adicionamos 50 μ M de siRNA contra PDI (sequencias # 1, 2 ou 3), ou sequencias de siRNA controle negativo (scrambled ou Stealth RNAi™ siRNA Negative Controls), 3 μ l Lipofectamina® (ou 12,5 μ l em placa 100mm) em meio F12 na ausência de soro e antibióticos, por 6h. Somente após 72h (com carênciamento prévio de soro por 12-16h) as células foram ou não estimuladas com PDGF (100 ng/ml).

3.3.2. Kit Nucleofactor Amaxa®

Para a realização dos experimentos de *single cell migration* as células foram transfectadas utilizando-se aparelho e kit Amaxa®. Esses experimentos foram realizados na Université de la Méditerranée (Marseille).

As transfecções com o Amaxa foram realizadas após tripsinização e contagem das células ($4,8 \cdot 10^5$ células/tubo) foram centrifugadas e ressuspensas na solução do kit V (nucleofactor – Amaxa®) e eletroporadas pelo programa U-025. Após 48h (com carenciamento prévio de soro por 12-16h) as células foram incubadas ou com PDGF (100 ng/ml).

3.4. Atividade do complexo NADPH oxidase

Após a transfecção ou não de VSMC com siRNA PDI, a atividade do complexo NADPH oxidase foi avaliada como descrito por Fernandes et al (2007). Para a análise da ativação do complexo da NADPH oxidase a fração de membrana foi preparada conforme procedimento padronizado em nosso grupo, descrito no item 3.1(Laurindo et al, 2002). A atividade da NADPH oxidase foi medida em espectrofluorímetro conforme descrito por Fernandes et al (2007). A fração de membrana (15 µg) foi incubada com DHE (10 µM) em PBS (pH 7,4 contendo DTPA 100 µM) na presença de NADPH (50 µM); DNA (1,25 µg/mL) e DHE (10 µM) por 30 min a 37°C no escuro em placa de 96 poços (volume final de 120 µL). A fluorescência total foi medida usando-se filtro de rodamina (excitação 490 nm e emissão 590 nm) em espectrofluorímetro de placa.

3.5. Produção total de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A produção de radical superóxido e ativação do complexo NADPH oxidase foram realizadas por métodos descritos por Fernandes (2007). A utilização do método da DHE para a detecção de espécies reativas de oxigênio em sistemas vasculares e para a medida da atividade da NADPH oxidase (recentemente validada em nosso laboratório) tem se mostrado eficiente e mais específica do que apenas a análise da fluorescência total. A DHE é permeável a membranas e sofre oxidação intracelular por espécies reativas de oxigênio, gerando dois produtos: 2-hidroxi-etídio (EOH, mais específico para superóxido) e etídio (E, relacionado a

vários outros oxidantes, como H₂O₂/peroxidases e grupos heme) (Papapostolou et al, 2004; Patsoukis et al, 2005).

Para a análise da produção de radical superóxido, VSMC foram incubadas com DHE (50 µM) em PBS e DTPA 0,1mM por 30min e lisadas mecanicamente com acetonitrila (CH₃CN). As amostras foram centrifugadas (12000rpm por 5min) e os sobrenadantes secos sob vácuo e os resíduos ressuspensos em PBS e analisados por HPLC. A separação por HPLC foi realizada em coluna NovaPak C18, com gradiente linear de H₂O: CH₃CN (9:1v/v) + TFA 0,1% para CH₃CN (100%), com fluxo de 0,5 mL/min. DHE foi monitorada a 245 nm e EOH e E por detecção por fluorescência (excitação 510 nm e emissão 595 nm). A quantificação foi realizada pela integral das áreas dos picos correspondentes e comparação com as áreas obtidas de padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas. A concentração dos padrões foi avaliada pela absorvidade molar de cada composto e os picos foram separados com concentrações crescentes de CH₃CN. Os dados são expressos pela taxa de oxidação de DHE em EOH e E, obtidos na mesma corrida cromatográfica.

3.6. Migração Celular

3.6.1. Câmara de *Boyden*

Os estudos de migração celular foram realizados em uma câmara de Boyden manufaturada pela Université de la Méditerranée (Marseille), cedida por colaboração com o Prof. Hervé Kovacic. Os ensaios foram realizados por método adaptado de Weber (2004). O estímulo para migração adicionado à parte de baixo da câmara foi o PDGF. Resumidamente, VSMC em confluência de 85% foram carenciadas por 12-16h, para minimização da proliferação celular. Após tripsinização, VSMC (5.10⁴ cels./poço; transfectadas ou não) foram transferidas para a parte superior da câmara, sobre a membrana de policarbonato (Whatman; 8 µm). Em experimentos com utilização de inibidor da produção de ROS (DPI), a adição deste foi realizada ao meio contendo as células antes de colocá-las na parte superior da câmara. Após o fechamento da Câmara, esta foi incubada no interior de uma caixa úmida, em estufa a 37°C, por 4h. VSMC que não migraram foram removidas com cotonete e as demais, na parte inferior da membrana, foram fixadas com paraformaldeído (4%, por 30min). Após a fixação a membrana foi colocada sobre uma lâmina de vidro para microscopia em meio de montagem com glicerol (50%) e DAPI (1:100 – para coloração dos núcleos celulares), seguido da análise e quantificação em microscópio invertido (Axiovert 200, Zeiss).

3.6.2. Wound Healing

O ensaio de *Wound Healing* foi realizado conforme descrição por Taboubi et al (2007). Resumidamente, $2 \cdot 10^5$ células/poço foram passadas para placa de 12 poços (ou $7 \cdot 10^4$ para lamínulas de vidro no caso de ensaios para imunofluorescência) e após *ca.* 12h na placa, foram carenciadas por 24h, para minimização da proliferação celular. Foram realizadas duas escarificações lineares (em forma de risco) por poço com o auxílio de uma ponteira estéril. Após lavagem para retirada de células em suspensão, foram adicionadas 1 ml de meio sem soro na presença ou ausência de PDGF. Fotos de campos contendo as duas margens dos riscos foram tiradas no tempo 0 e 16h. A quantificação da migração foi realizada pela percentagem da área recoberta no tempo de 16h em relação ao tempo zero hora. Os dados foram expressos pela diferença entre a superfície recoberta em resposta ao PDGF e a condição basal (% superfície recoberta PDGF - superfície recoberta basal).

3.6.3. Single cell Migration

Todos os estudos de *Single cell Migration* foram padronizados e realizados na Université de la Méditerranée (Marseille – Fr), segundo método descrito por Sadok, et al (2008). A matriz extracelular de colágeno I ($10 \mu\text{g/ml}$) foi adicionada à placa de 24 poços por 1h, 37°C . Após esse período, a placa foi lavada 2 vezes com PBS para retirada do excesso de matriz. VSMC foram soltas com tripsina e plaqueadas em baixa confluência ($0,6 \cdot 10^4$ cels/poço) na placa contendo matriz. Após o período de adesão (2h), as células foram ou não estimuladas com PDGF.

A análise da migração foi realizada a 37°C em microscópio invertido (Leica DMIRB) em objetiva de x10. Com a uma vídeo câmera acoplada ao microscópio operada pelo Metamorph image analysis software (Princeton Instruments, Evry, France) foram fotografados 3 campos por poço, em um intervalo de 5min, por 16h. As imagens obtidas (em formato ND2) foram convertidas em AVI, utilizando o software ImageJ (time-lapse movies; manual tracking plugin). As coordenadas (X, Y) obtidas do rastreamento de cada célula foram utilizadas para ao cálculo da distância total percorrida, distância do ponto de origem e persistência direcional da migração. A distância total percorrida representa a soma de todos os deslocamentos de cada célula durante o período de 16h. A distância do ponto de origem representa o deslocamento entre o ponto inicial e final. A persistência direcional da migração foi calculada utilizando-se a distância do ponto de origem (durante o período de 16h) dividido

pela distância total percorrida durante este período. Os experimentos foram realizados em duplicata e a quantificação foi feita com no mínimo 30 células por monoplicata.

3.7. Atividade RhoA e Rac1

A análise da atividade de Rho e Rac foi realizada por ensaios de *pull-down* com proteína de fusão conforme descrito por Ren et al (1999). Os ensaios de *pull-down* com RBD-GST (Glutathione S-Transferase ligada a “Rhotekin Binding Domain”), para análise da atividade de Rho, foram realizados em colaboração com o Dr. Fábio Forti (Instituto de Química da Universidade de São Paulo). A proteína de fusão PBD-GST (Glutathione S-Transferase ligada a “Pak1 Binding Domain”), utilizada para análise da atividade de Rac, foi gentilmente cedida pela Dra. Ulla Knaus (The Scripps Research Institute – California/USA).

3.7.1. Preparação dos *beads* ligados à RBD-GST ou PBD-GST

Após termo-transformação de bactérias BL21 com o plasmídeo contendo a proteína de fusão (conforme descrito no item 4.2), algumas colônias foram selecionadas ao acaso para incubação da pré-cultura. A cultura foi realizada em 3L de meio 2YT contendo 100 µg/ml de ampicilina, a 37°C até alcançar a OD₆₀₀ = 0,6 (cerca de 2-3h) e adicionou-se 1 mM de IPTG incubando por mais 2h. A suspensão de bactérias foi centrifugada por 10 min a 8krpm a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 20 ml de tampão A (50mM Tris pH 7,5, 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂) contendo inibidores de protease e fosfatase (0,1µM aprotinina e leupeptina, 1mM PMSF, 1mM DTT, 1mM ortovanadato e fluoreto de sódio). As bactérias foram sonicadas em gelo por 10 ciclos de 1min (60W). A suspensão foi submetida a nova centrifugação (14000rpm, 30min, 4°C) e posteriormente ressuspenso em tampão A contendo 10% de glicerol. Metade do sobrenadante foi aliqotado em ependorf e armazenado à -80°C. Para ligar a proteína de fusão em beads, adicionamos 0,5ml de resina (Glutathione Sepharose 4B – Amersham Biosciences) à outra metade do sobrenadante e incubamos, sob agitação orbital, por 1h30min, 4°C. Após a incubação, os beads foram submetidas a novas centrifugações (3000rpm, 3min, 4°C) para as lavagens (6x) em tampão B (50mM Tris pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂) contendo inibidores de protease e fosfatase. Após a última centrifugação os beads, ligados à proteína de fusão, foram ressuspendidos em tampão B com 10% glicerol.

3.7.2. Pull-down com proteína de fusão

Para este ensaio, após a lise celular (descrita no item 4.1), 0,5 mg de homogenato de VSMC foram adicionados à 20 µg de proteína de fusão (RBD-GST ou PBD-GST) em um ependorf por 1h30min, 4°C, sob agitação. Após esse período os beads foram lavados (4x) em tampão B (acrescido de inibidores de protease e fosfatase) sempre com centrifugações alternadas de 3min cada a 3000 rpm e a 4°C. Após a última centrifugação, os beads foram ressuspendidos em 20 µl de tampão de amostra e submetidos à análise western.

3.8. Análise Western

Após os diferentes tratamentos, as células foram lisadas, a proteína dosada por método de Bradford (Bio Rad) e o extrato total (30µg proteína) submetido a SDS-Page em gel de poliacrilamida 12% ou 15% (no caso das RhoGTPases) e transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada por 1h em tampão de bloqueio contendo TBS (tween 0,05%), pH 7,4. As proteínas foram identificadas utilizando anticorpo primário (1:1000) anti PDI de camundongo (Stressgen), anti Rac1 de camundongo (Abcam), anti RhoA de camundongo (Santa Cruz), anti RhoGDI de coelho (Abcam) ou anti β-actina de camundongo (1:10000; Sigma) incubados por 12-16h. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP de camundongo ou coelho (Calbiochem), foi incubado por 1 hora e revelados por quimiluminescência (ECL; Amershan-Pharmacia), seguido por exposição a filmes radiográficos.

3.9. Prospecção de potenciais interações da PDI por métodos de Biologia de Sistemas

Todos os dados obtidos por métodos de Biologia de Sistemas foram realizados/analizados em colaboração com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo Prof. Dr. Diego Bonatto.

3.9.1 Desenho da rede de interação proteína-proteína (PPPI) e análise topológica global

Os dados de interatoma obtidos a partir da PDI humana foram utilizados para obtenção de informações sobre o potencial de interações com outras proteínas no contexto de interações físicas proteína-proteína (PPPI) em *Homo sapiens*. Neste sentido, o desenho da rede principal (Fig. 14) foi realizado utilizando-se o *software* Cytoscape, version 2.6.3 (Shannon et al,

2003). Com este propósito utilizamos dados de PPPI disponíveis no banco STRING 9 (<http://string.embl.de>), utilizando os seguintes parâmetros: número máximo de 50 interações; número de confiança médio ou padrão (0.700 ou 0.400, respectivamente); e profundidade da rede igual a 1 com adição de novos nós até a saturação da rede. As redes obtidas com esta primeira seleção foram combinadas em uma única rede maior utilizando-se um *plugin* do *software* Cytoscape (Fig. 14). Esta rede principal foi analisada com outro *plugin* do *software* Cytoscape, Molecular Complex Detection (MCODE; <http://www.cytoscape.org/plugins2.php>) (Bader & Hogue, 2003), para detectar sub-redes ou grupos de proteínas representando diferentes processos biológicos.

3.9.2. Centralidade das redes e análise topológica

A centralidade das redes foi avaliada utilizando-se o *plugin* Cyto-Hubba (do *software* Cytoscape; <http://hub.iis.sinica.edu.tw/cytoHubba>) (Lin et al, 2008). A análise de *clustering* de ontologia gênica (GO) foi realizada utilizando-se o *plugin* Biological Network Gene Ontology (BiNGO; do *software* Cytoscape; http://chianti.ucsd.edu/cyto_web/plugins/index.php) (Maere et al, 2005). O grau de enriquecimento funcional para cada *cluster* e categoria foi quantificado utilizando-se a ferramenta de distribuição hipergeométrica (Rivals et al, 2007) e múltiplos testes de correção foram aplicados utilizando o teste de taxa de falsos positivos (Benjamini & Hochberg, 1995). Os processos biológicos super-representados nas redes de interação foram obtidos após a aplicação do teste de taxa de falsos positivos, com valor de significância de 0,05.

3.10. Análise Confocal

A análise do padrão de F-actina foi realizada por experimentos com microscopia confocal a laser (Microscópio Zeiss LSM510-Meta). Após estímulo com PDGF, VSMC foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 1h, 4°C e permeabilizadas em PBS contendo Nonidet p40 (0,1%) por 30min, 37°C; seguido por bloqueio em PBS/BSA (2%) por 30min, 37°C. Os anticorpos primários foram incubados por 12-16h na presença de faloidina/Alexa 633 (1:200). Os anticorpos primários foram: PDI de camundongo (Enzo Life Science) ou coelho (Enzo Life Science), anti paxilina de coelho (Abcam), anti Rac1 de camundongo (Abcam), anti RhoGDI de coelho (Abcam). O DAPI (1:100) foi incubado simultaneamente aos anticorpos secundários conjugados a Alexa (A488 coelho ou A546 camundongo) por

1h,30min, 25°C no escuro. Após essas incubações, aplicou-se meio de montagem (50% glicerol em PBS) e fechou-se a lamínula com esmalte para posterior análise.

3.11. Imunoprecipitação

Para este ensaio, após a lise celular (descrita no item 4.1). O Homogenato total (1 mg) foi adicionado ao anticorpo de interesse (mouse anti-PDI 10µg, Enzo Life Science; ou anti-Rac1, 5 ug, Abcam), por 12-16h, sob agitação, 4°C (em eppendorf previamente bloqueado com 0,5% de albumina bovina por 20min, 25°C). Posteriormente, foram adicionados 100µl de bead ligada à proteína G Sepharose, por 2h, sob agitação, 4°C. A lavagem das beads foi realizada 5 vezes com centrifugações a 12000g, 4°C, em tampão Ripa (50mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂). Após a última lavagem, foi adicionado *Laemmli buffer* e as amostras foram incubadas a 100°C por 10min. O sobrenadante foi submetido à análise western.

3.12. Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizados através de teste *t* de Student para os valores não pareados ou análises de variancias (ANOVA), seguido por *Newman-Keuls*, ou *Dunnnett* (conforme descrito em cada gráfico), com grau de significância de 0.05. O *software* utilizado foi GraphPad Prism v.5 *software*.

4. Resultados

4.1. Efeito de curva dose-resposta de PDGF na migração de VSMC.

Inicialmente foram realizados estudos para estabelecer as condições ideais nos ensaios de migração celular em Câmara de *Boyden* (Fig.3.A) e *Wound Healing* (Fig.3.B). Nesses ensaios, foram usados crescentes concentrações do indutor de migração celular PDGF (conhecido ativador de ROS) (Sundaresan et al, 1995; Weber et al, 2004). Após a realização desses ensaios e a análise da literatura, padronizamos a concentração ideal de PDGF para nossos ensaios: 100 ng/ml.

4.2. Produção de ROS e atividade NADPH oxidase em VSMC após curva tempo-resposta de PDGF

As curvas tempo-resposta para PDGF (100 ng/ml) na produção total de ROS e atividade NADPH oxidase foram avaliadas pela análise dos produtos da oxidação de DHE por HPLC e por DHE na microplaca, respectivamente. Na análise da produção total de ROS, PDGF aumentou o sinal de hidroxietídio (EOH) após 1, 2 e 3h e o de etídio (E) após 2 e 4h (Fig.4.A e B.), indicando respectivamente a produção de superóxido e de outros produtos oxidantes, conforme resultados de nosso laboratório (Fernandes et al, 2007) e da literatura (Fink et al, 2004; Papapostolou et al, 2004; Patsoukis et al, 2005). A ativação do complexo NADPH oxidase iniciou-se em tempos menores, de 30min e 2h (Fig.5), sugerindo, de acordo com a literatura, que Nox(s) estejam envolvidas na sinalização da migração celular (Schröder et al, 2007; Weber et al, 2004).

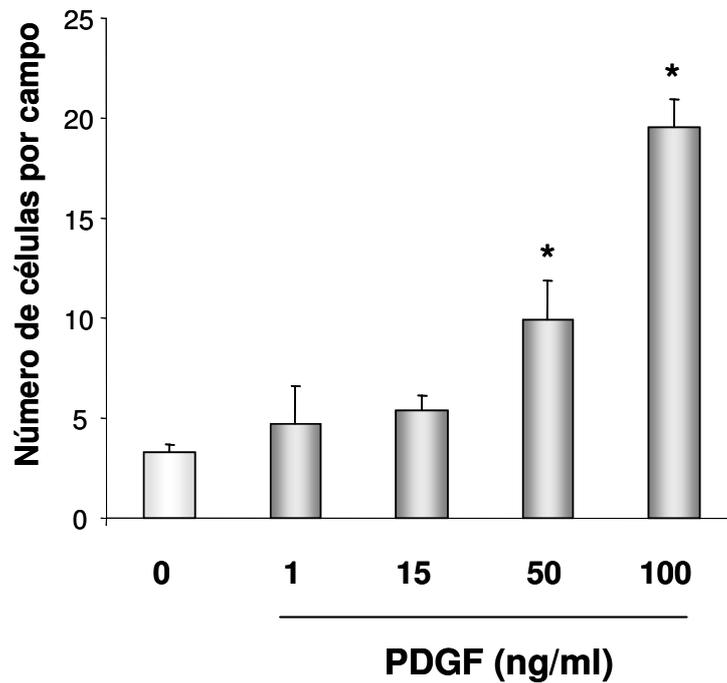
4.3. Efeito do difenileno-iodônio na migração celular de VSMC.

Para entender o possível papel do complexo NADPH oxidase na migração celular induzida por PDGF em VSMC, ensaios de migração celular por câmara de *Boyden* foram realizados na presença e ausência do inibidor de flavoenzimas Difenileno-iodônio (DPI; inibidor inespecífico da produção de ROS por NADPH oxidases). Nesse ensaio, DPI promoveu inibição praticamente total da migração celular induzida por PDGF (Fig.6).

4.4. Expressão/localização de PDI após estímulo com PDGF

Para avaliar os efeitos do estímulo pró-migratório (PDGF) na PDI analisamos possíveis alterações na expressão e localização de PDI. Estudos de microscopia confocal mostraram mudanças significativas no padrão de expressão/localização da PDI após estímulo com PDGF (Fig.7.A). Na condição basal, a expressão da PDI é bastante intensa na região perinuclear, conforme evidenciado por gráfico de intensidade celular (gerado pelo *software* do

A)



B)

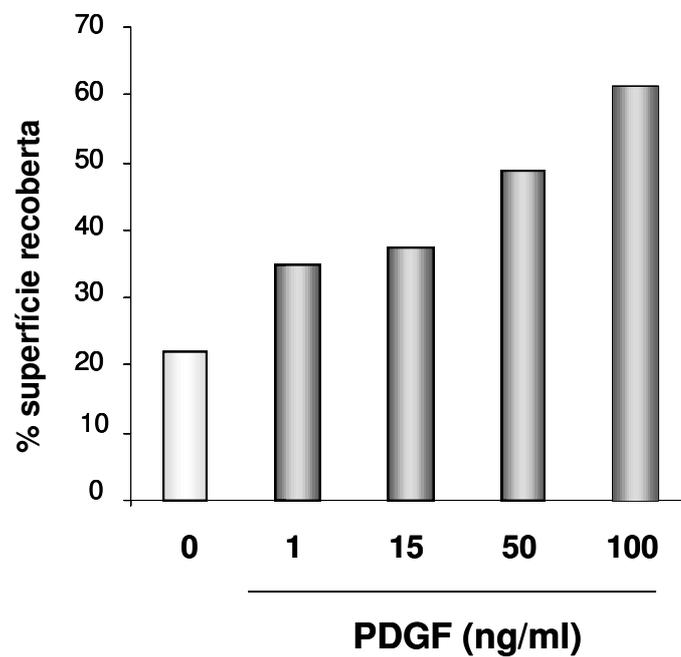
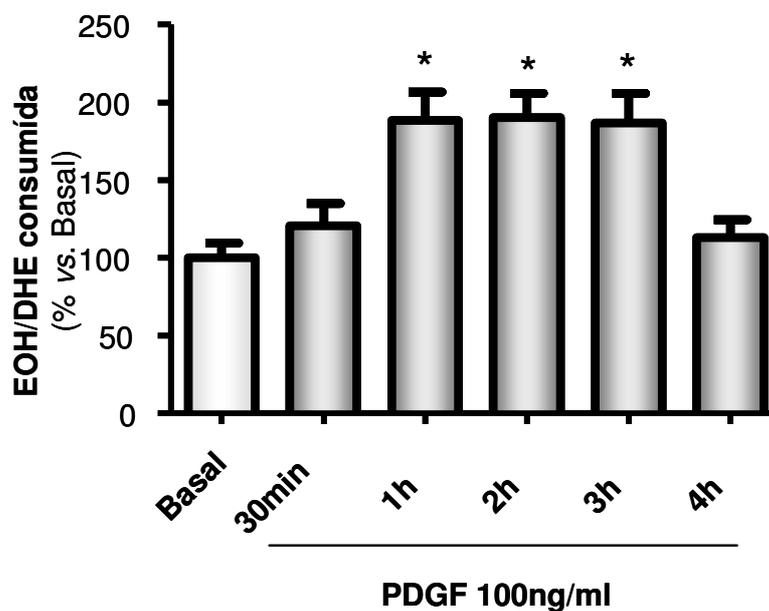


Fig.3. Curva dose-resposta do efeito de PDGF na migração celular de VSMC, avaliada por dois distintos modelos. A) Câmara de *Boyden* (N=4). B) *Wound Healing* (N=2; duplicata). *P<0,005 vs basal sem PDGF. Anova - "Dunnett's Multiple Comparison Test".

A)



B)

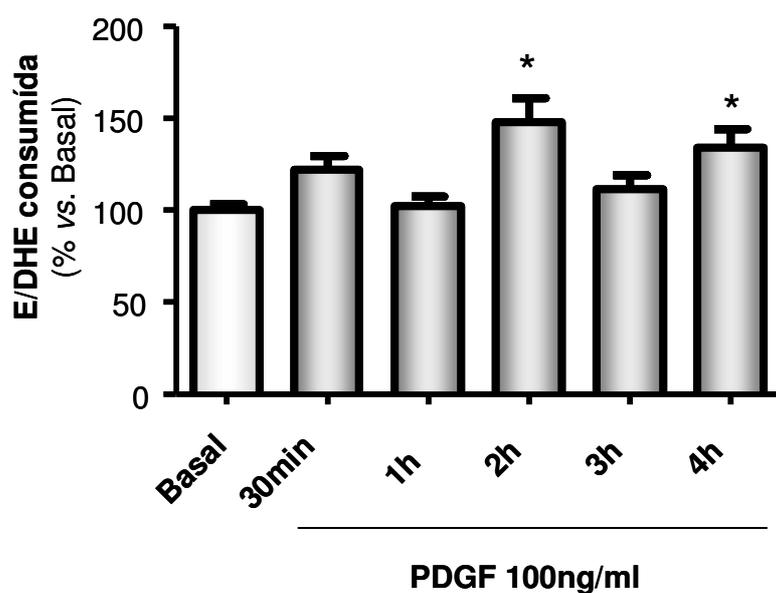


Fig.4. Curva tempo-resposta do efeito de PDGF no aumento da produção de ROS em VSMC. A produção de ROS foi medida pela análise dos produtos de oxidação de DHE por HPLC, medidos por fluorescência (excitação 510 nm e emissão 595 nm). A quantificação foi feita pela integral das áreas dos picos de **A)** 2-hidroxi-etídio (EOH) e **B)** etídio (E), normalizada por DHE consumida (245 nm). **Basal**, VSMC sem estímulo.. * $P < 0,05$ vs basal. Anova - "Dunnett's Multiple Comparison Test". N=4.

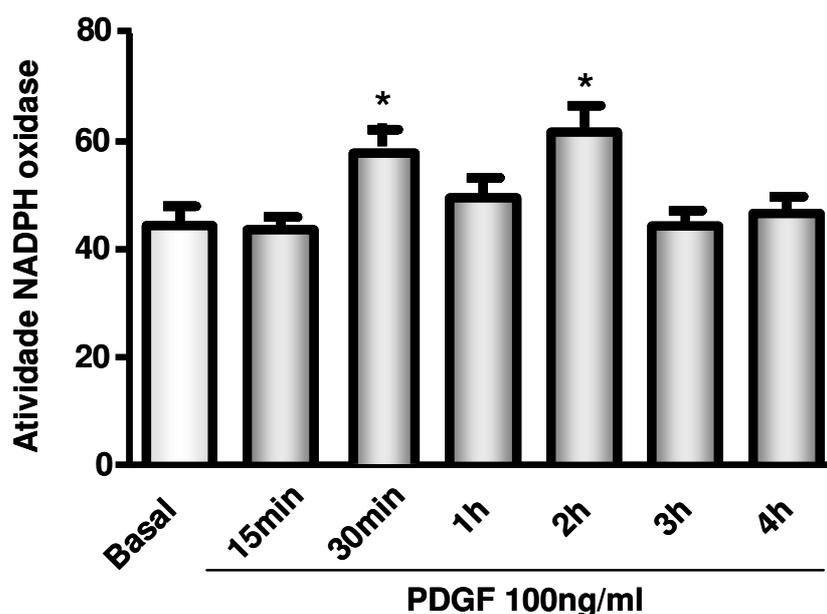


Fig.5. Curva tempo-resposta do efeito de PDGF no aumento da atividade NADPH oxidase em VSMC. A atividade enzimática foi avaliada em fração de membrana (15 μ g proteína) de VSMC pela fluorescência total medida em espectrofluorímetro de placa. (excitação 490nm e emissão 590nm). *P<0,05 vs basal sem estímulo. Anova - "Dunnett's Multiple Comparison Test". N=4

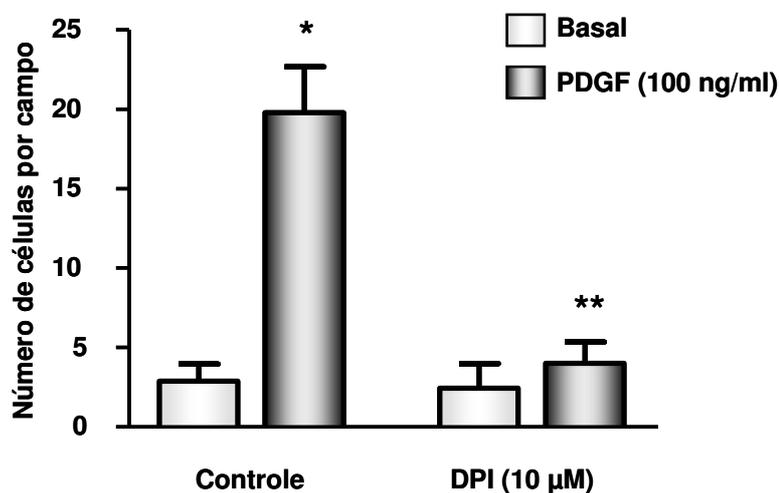


Fig.6. Efeito inibitório de DPI na migração celular de VSMC induzida por PDGF. A migração celular foi quantificada no modelo de quimiotaxia em Câmara de *Boyden* na presença do inibidor de flavoenzimas e da produção de ROS por NADPH oxidases. *P<0,005 vs controle sem PDGF; ** vs controle com PDGF. Anova - "Newman-Keuls Multiple Comparison Test". N=4

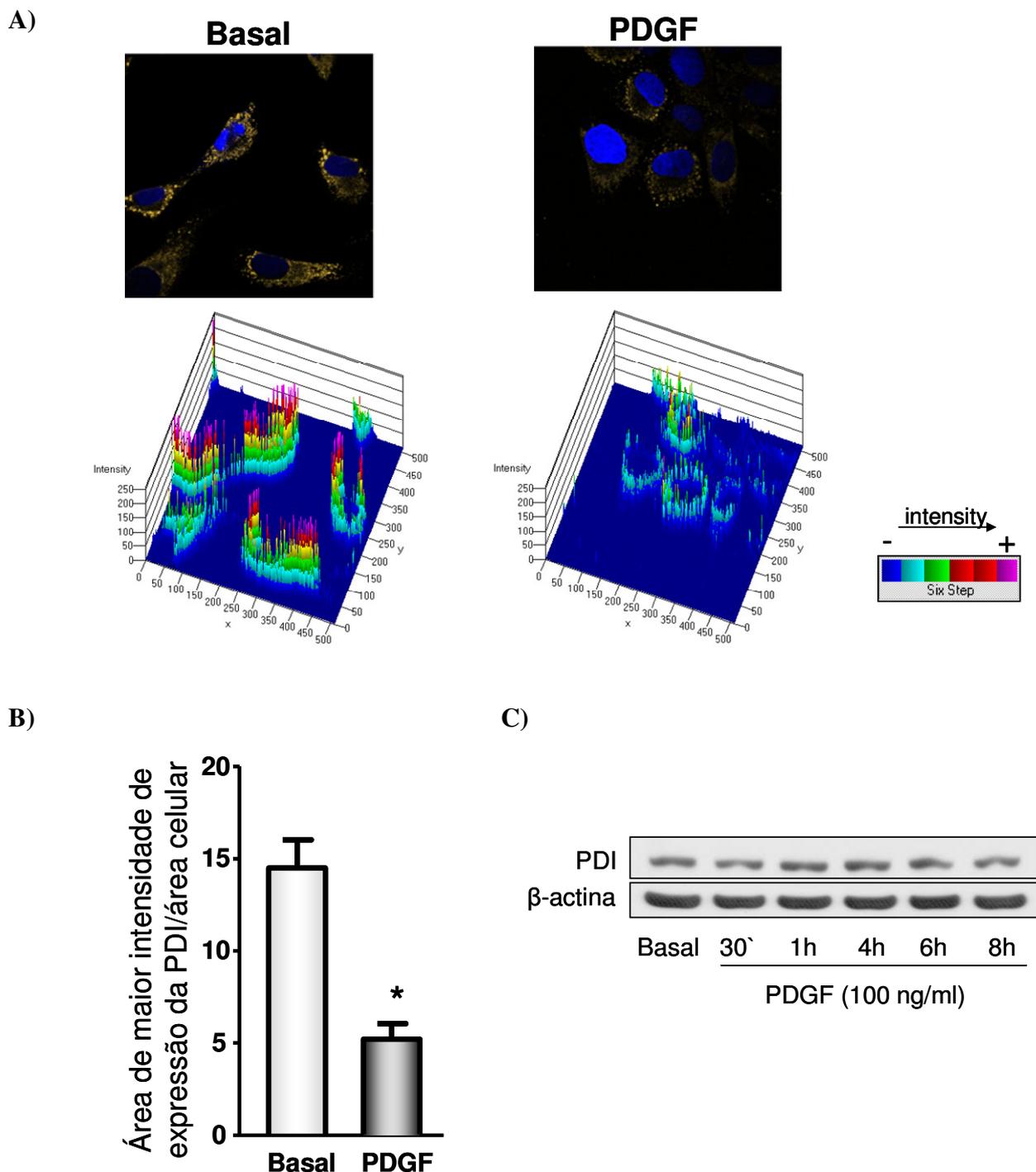


Fig.7. PDGF induz redistribuição subcelular da PDI, sem alterar a expressão total da proteína. **A)** Figura representativa da localização da PDI por microscopia confocal e gráfico representativo desta expressão (gerado pelo *software* do *Laser Scanning microscopy*, Zeiss) na presença ou ausência de PDGF 100 ng/ml, por 7h. **B)** Gráfico representativo da análise (por *software* de morfometria *QWin*) dos pontos de maior intensidade na fluorescência da PDI na presença ou ausência de PDGF 100 ng/ml, por 7h. **C)** Western blot da expressão de PDI em homogenato total de VSMC na presença de PDGF nos tempos indicados. * $P < 0,0001$ vs controle sem superexpressão de PDI. Teste t não pareado. $N=3$.

Laser Scanning microscopy, Zeiss - Fig.7.A) ou por quantificação das áreas de maior intensidade de fluorescência (por software QWin - Fig.7.B). Após estímulo com PDGF, essa expressão tornou-se menos intensa na região perinuclear e passou a ser mais difusa, abrangendo uma área maior do citoplasma (Fig.7.A). Tal expressão mais difusa da PDI à microscopia confocal gerou uma imagem que poderia à primeira vista sugerir redução aparente na expressão da proteína. Entretanto, esta impressão parece ser apenas consequência do método de detecção, pois a análise western homogenato total de VSMC não mostrou alteração na expressão de PDI após estímulo com PDGF (30min, 1h, 4h, 6h e 8h - Fig.7 C).

4.6. Produção total de ROS em VSMC após silenciamento da PDI

A produção total de ROS, em VSMC deficientes em PDI, foi investigada pela análise dos produtos da oxidação de DHE por HPLC. O silenciamento da PDI nessas células impediu o aumento da produção total de ROS induzida por PDGF, comparada às células controle (Fig.8.A e B). Estes resultados confirmam e ampliam observações prévias de nosso grupo mostrando que PDI é essencial à produção de ROS estimulada por outro fator de crescimento, a angiotensina II (Fernandes et al, 2009).

4.7. Expressão de mRNA Nox1 e Nox4 em VSMC com silenciamento da PDI

A análise de possíveis alterações na expressão de mRNA da Nox1 e Nox4 foi investigada por PCR em tempo real. Em VSMCs controle observamos um aumento significativo na expressão do mRNA da Nox1. O silenciamento da PDI, na presença de PDGF (100 ng/ml), reduziu significativamente a expressão do mRNA da Nox1 quando comparada ao controle sem transfecção ou ao controle com Lipofectamina® (Fig.9.A). Nas mesmas condições, não existem mudanças significativas na expressão do mRNA da Nox 4 (Fig.9.B).

4.8. Efeito do silenciamento da PDI na migração celular em *Câmara de Boyden e Wound Healing*.

A Câmara de *Boyden* é um modelo de migração por quimiotaxia que mede a resposta de uma população de células a um determinado tratamento. Apesar de não ser um método eficiente para investigação de formato e posição celular (necessários para aprofundar o entendimento de certos mecanismos), é um método sensível e eficiente para testar intervenções que possam alterar migração celular (Gerthoffer et al, 2007). Desta forma, estudos adicionais foram realizados com outros modelos de migração celular. O *wound*

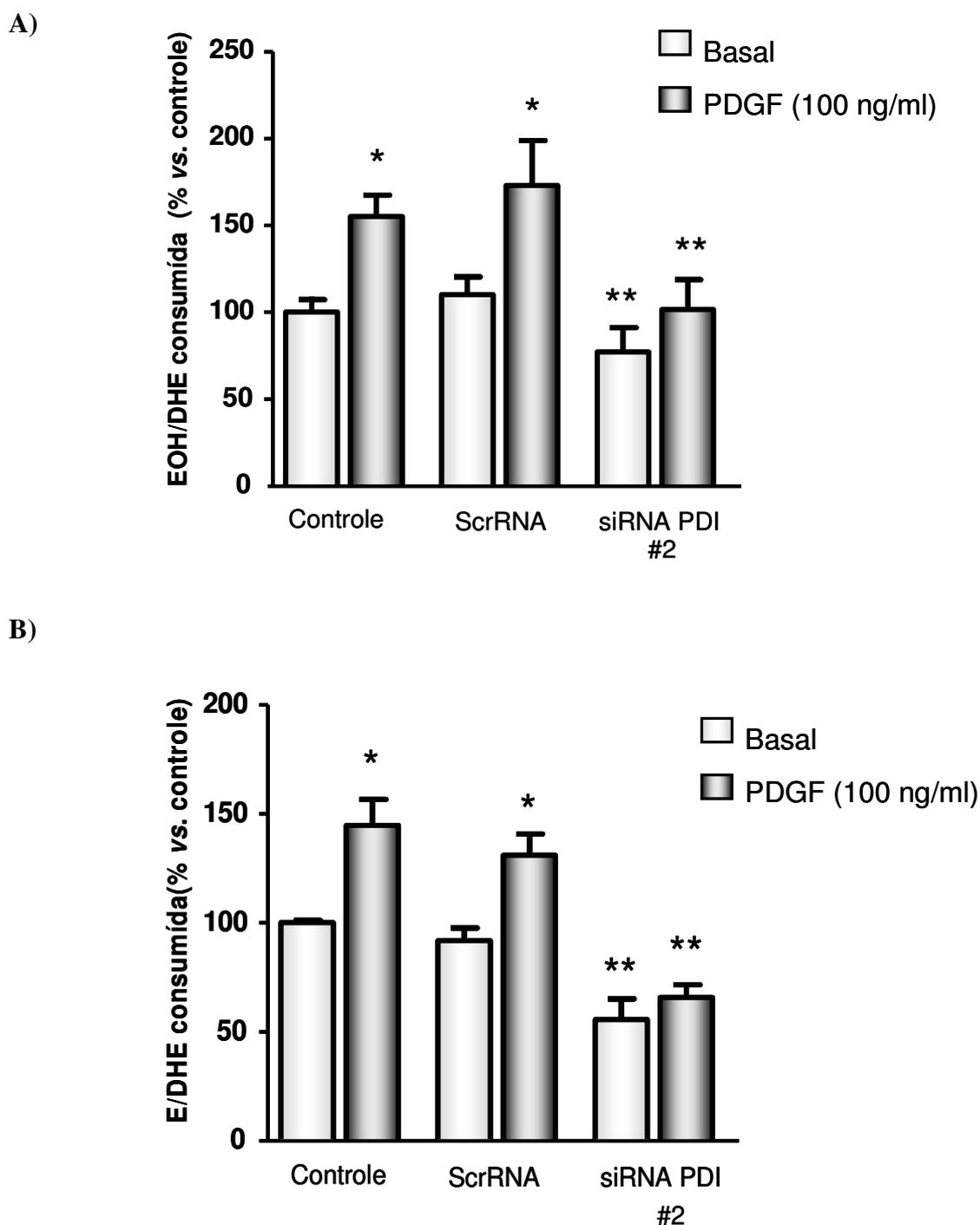
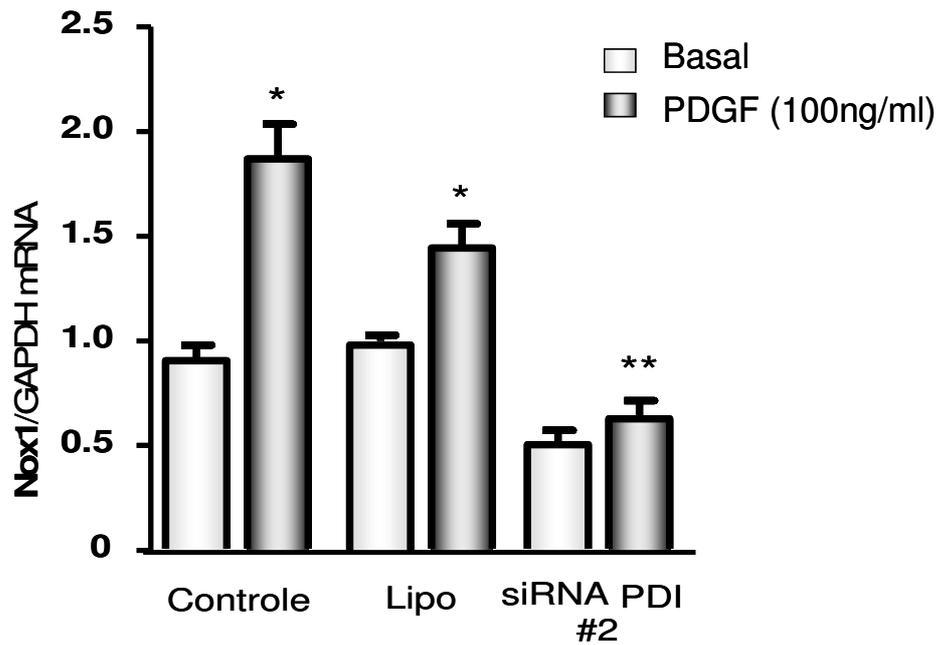


Fig.8. O silenciamento da PDI reduz a produção de ROS induzido por PDGF. A produção de ROS foi medida pela análise dos produtos de oxidação de DHE, por HPLC, medidos por fluorescência (excitação 510 nm e emissão 595 nm). A quantificação foi feita pela integral das áreas dos picos de **A)** 2-hidroxi-etídio (EOH) e **B)** etídio (E), normalizada por DHE consumida (245 nm). **Controle**, VSMC sem transfecção; **ScrRNA**, controle negativo de transfecção (sequência de siRNA *scrambled*); **siRNA PDI**, siRNA contra a sequência da PDI. *P<0,05 vs controle sem PDGF. Anova - "Dunnett's Multiple Comparison Test". N=4.

A)



B)

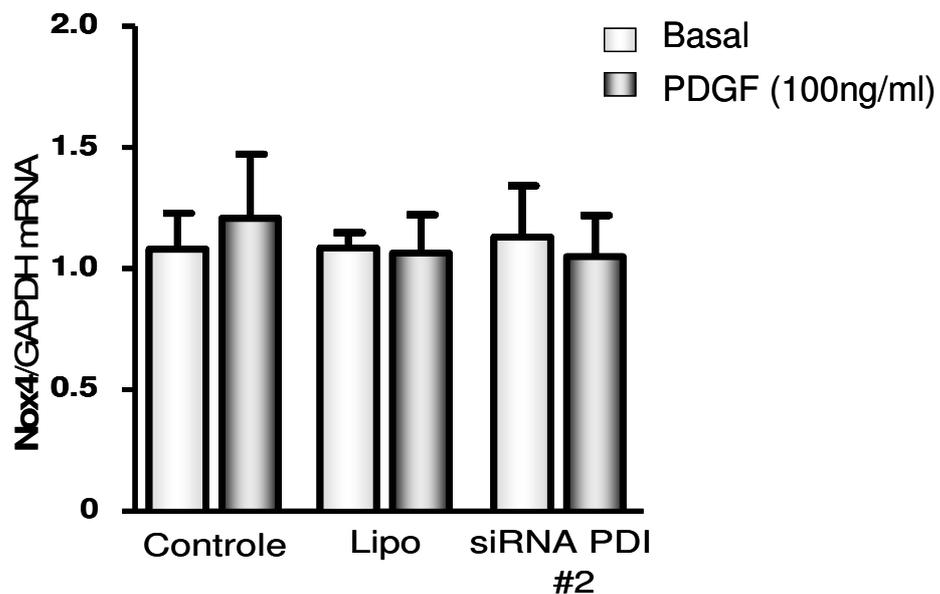


Fig.9. O silenciamento da PDI bloqueia a expressão do mRNA da Nox1 induzido por PDGF, sem alterar significativamente a expressão do mRNA da Nox4. Expressão do mRNA de Nox(es) por PCR em tempo real na ausência e presença de PDGF por 4h. **A)** mRNA Nox1, **B)** mRNA Nox4. **Controle**, VSMC sem transfecção; **Lipo**, controle negativo de transfecção (Lipofectamina®); **siRNA PDI**, siRNA contra a sequência da PDI. * $P < 0,005$ vs controle sem PDGF; ** vs. controle com PDGF. Anova - "Dunnett's Multiple Comparison Test". N=4

healing permite análise global de aspectos morfológicos e o *single cell analysis* permite o estudo de outros aspectos como a persistência direcional na migração celular.

Os ensaios de Câmara de *Boyden* em VSMC sugerem que o silenciamento da PDI (com duas diferentes sequências de siRNA) reduz a migração celular, em comparação às células controle (Fig.10.A e B).

Para confirmação adicional do efeito do silenciamento da PDI na migração celular realizamos experimentos de migração celular pelo modelo de *wound healing*. Neste ensaio, foi possível evidenciar uma redução bastante significativa na migração dependente de PDGF (representado pela diferença entre a superfície recoberta em VSMC sob estímulo com PDGF e VSMC na condição basal; Fig.11). Os resultados obtidos por este modelo corroboram as observações obtidas pelo modelo de migração em Câmara de *Boyden*, indicando que a PDI é capaz de sustentar a migração celular induzida por PDGF em VSMC.

4.9. Efeito do silenciamento da PDI na persistência direcional da migração de VSMC pelo modelo de *Single cell Migration*.

Os experimentos de *Single cell Migration* foram realizados na U. de la Méditerranée, Marseille, em colaboração com o Prof. Hervé Kovacic. Para a padronização inicial deste modelo, a migração celular foi observada na presença e ausência de duas diferentes matrizes extracelulares: Colágeno I (10 µg/ml); Fibronectina (5 µg/ml). Na ausência de matriz ou na presença da matriz de fibronectina, as células demoraram muito para aderir e começaram a migrar, na presença de PDGF, somente após 8h de ensaio (dados não mostrados). Desta forma, os experimentos foram realizados somente na presença de matriz de colágeno I.

A análise da persistência na direção da migração de VSMC em colágeno I, sugere que o silenciamento da PDI promove significativa redução na persistência da migração induzida por PDGF em relação às células transfectadas com controle negativo (Stealth RNAi™ siRNA Negative Controls - Fig.12.A). Estes resultados reforçam a idéia de que a PDI é necessária para sustentar a migração induzida por PDGF.

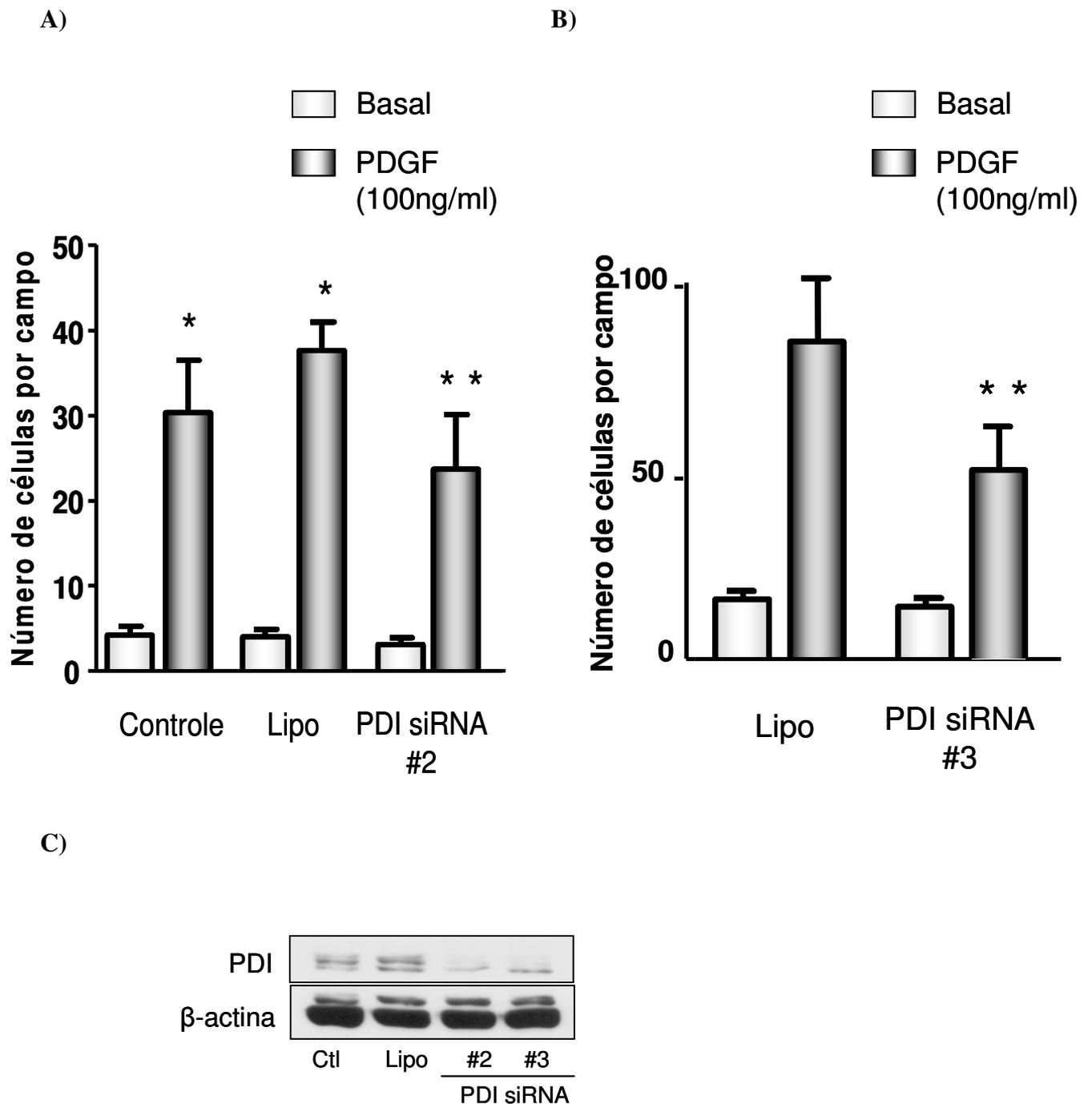


Fig.10. O silenciamento da PDI inibe a migração celular de VSMC induzida por PDGF, pelo modelo de câmara de Boyden. A-B) Migração celular pelo modelo de quimiotaxia em câmara de Boyden com duas diferentes seqüências de siRNA contra PDI (PDI siRNA #2 e #3, respectivamente). C) Análise western do silenciamento da PDI após transfecção com siRNA contra PDI. Ctl, VSMC sem transfecção; Lipo, controle negativo de transfecção (Lipofectamina®); ScrRNA, controle negativo de transfecção (seqüência de siRNA scrambled); siRNA PDI, siRNA contra a seqüência da PDI. * $P < 0,005$ vs controle sem PDGF; ** vs controle com PDGF. Anova - "Newman-Keuls Multiple Comparison Test". N=4.

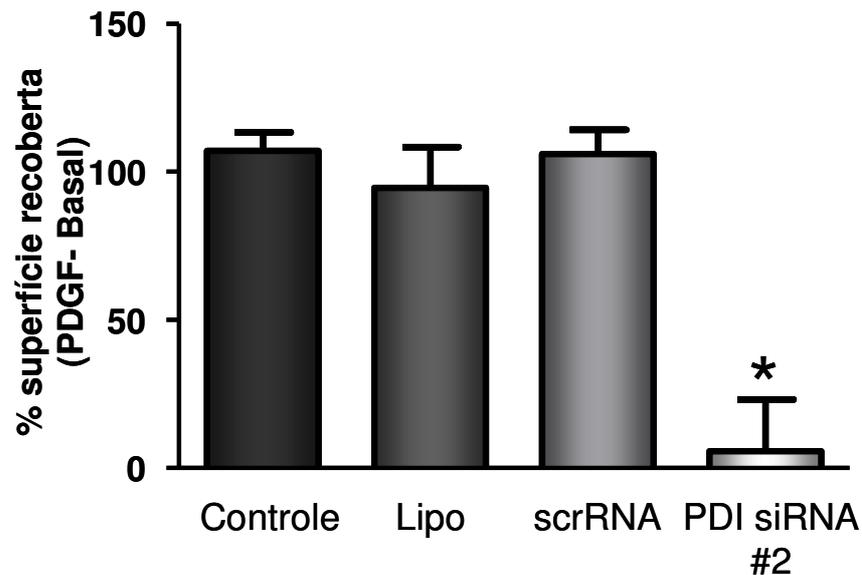
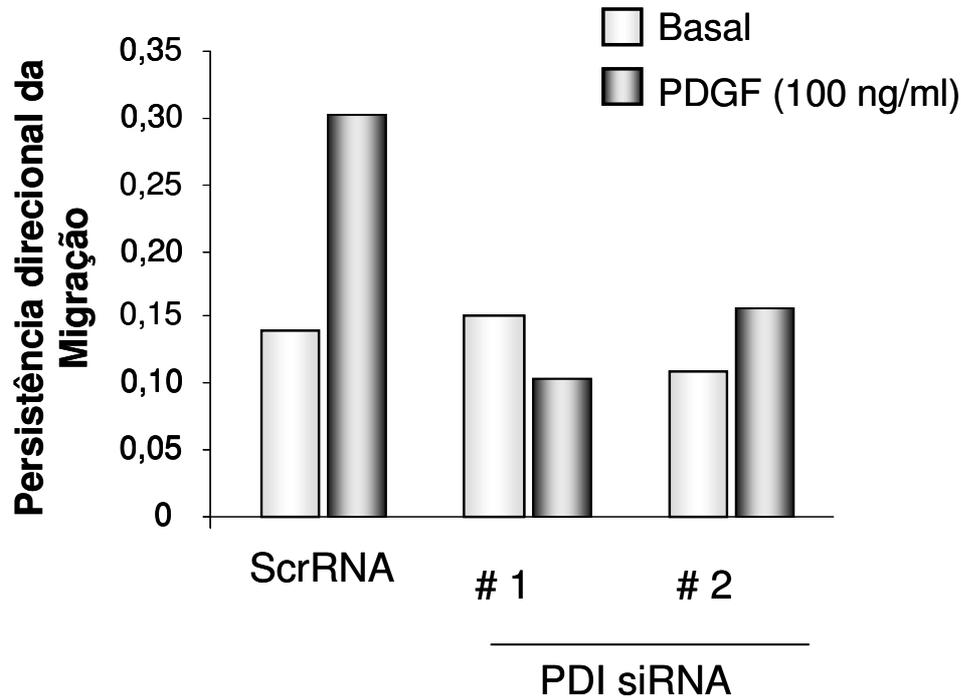


Fig.11. O silenciamento da PDI inibe a migração celular de VSMC induzida por PDGF, no modelo de *Wound Healing*. Figura representativa da diferença entre a % superfície recoberta em VSMC sob estímulo com PDGF e condição basal, após 16h de ensaio. **Controle**, VSMC sem transfecção; **Lipo**, controle negativo de transfecção (Lipofectamina®); **ScrRNA**, controle negativo de transfecção (sequência de siRNA *scrambled*); **siRNA PDI**, siRNA contra a sequência da PDI. * $P < 0,005$ vs controle sem PDGF; ** vs controle com PDGF. Anova - "Newman-Keuls Multiple Comparison Test". N=3.

4.10. Efeito da superexpressão de PDI na migração celular de VSMC.

Estudos com ganho de função da PDI (por superexpressão de PDI selvagem) também foram avaliados pelo modelo de Câmara de *Boyden*. Transfecção com plasmídeo da PDI induziu um aumento de *ca.* 2 vezes na expressão da proteína (Fig.13.C). Na condição basal (sem estímulo migratório), observamos um aumento espontâneo (35%) na migração das células com overexpressão de PDI, em relação ao controle transfectado com vetor vazio (Fig.13.A), reforçando a idéia de um envolvimento da PDI na migração celular. Por outro lado, sob estímulo com PDGF, a migração por quimiotaxia não se alterou em VSMC após superexpressão de PDI (Fig.13.B).

A)



B)

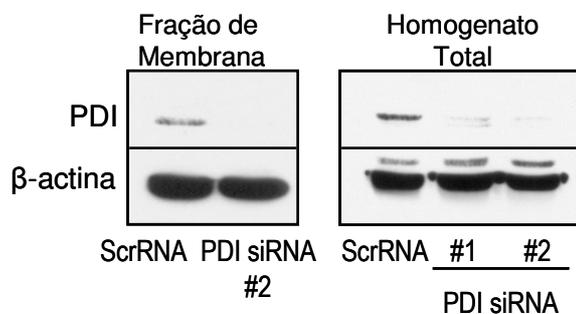


Fig.12. O silenciamento da PDI reduz a migração celular de VSMC induzida por PDGF, pelo modelo de *single cell migration*. A) Persistência direcional da migração celular (distância do ponto de origem/distância total percorrida) no modelo de *single cell migration* acompanhado por 16h B) Análise western da expressão da PDI após transfecção com siRNA contra PDI. **ScrRNA**, controle negativo de transfecção (Stealth RNAi™); **siRNA PDI**, siRNA contra a sequência da PDI. A quantificação foi feita no mínimo com 30 células por monocultiva, em experimentos realizados em duplicata. N=2.

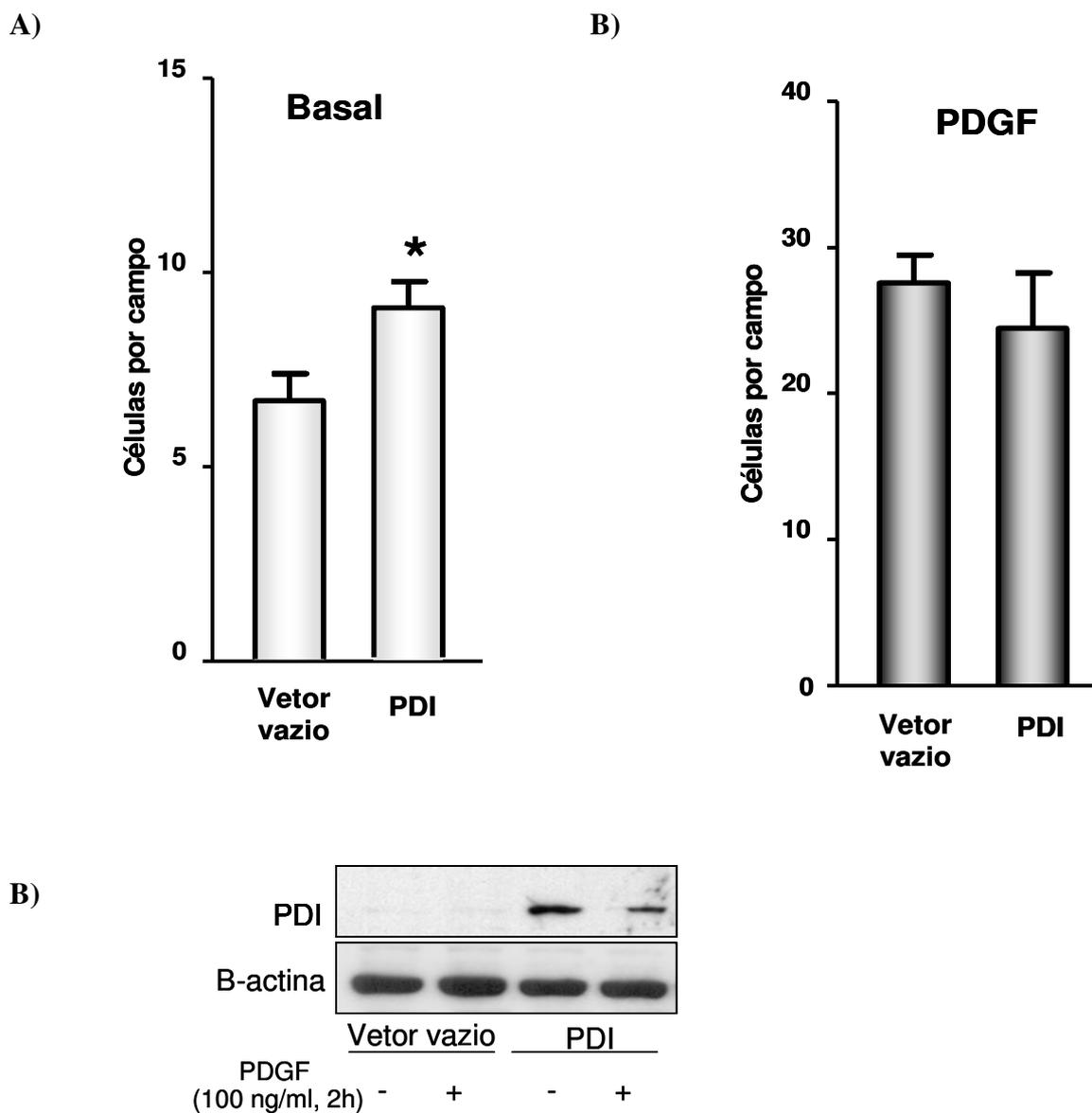


Fig.13. A superexpressão da PDI induz aumento espontâneo na migração de VSMC, na condição basal, no modelo de Câmara de *Boyden*. A) Migração espontânea de VSMC com superexpressão da PDI. B) Migração induzida por PDGF de VSMC com superexpressão de PDI. C) Análise western da expressão de PDI após a superexpressão de PDI. **Vetor vazio, controle negativo de transfecção; **PDI**, VSMC transfectada com sequência da PDI selvagem. * $P < 0,04$ vs controle sem superexpressão de PDI. Test t não pareado. N=5**

4.11. Estudos do interatoma da PDI por meio de mapas de interação proteína-proteína por métodos de Biologia de Sistemas

As evidências de modulação da produção de ROS (proveniente da NADPH oxidase) e migração celular pela PDI instigaram a busca de um mecanismo pelo qual a PDI está envolvida na migração e ativação da NADPH oxidase. Desta forma, possíveis proteínas e/ou mecanismos e processos biológicos associados ligados à PDI foram investigados pela análise

de mapas de interação física proteína-proteína (PPPI) no banco de dado STRING. Proteínas compartilhadas e sub-redes presentes na rede principal (Fig.14) foram identificadas e recuperadas (utilizando-se o *CytoscapeMCODE*) e submetidas à análise de ontologia gênica (GO) para a obtenção de informações sobre a natureza e número de sub-gráficos pertencentes à rede e seus processos biológicos associados.

Os resultados obtidos (MCODE e análise GO) mostraram que a rede de interações proteína-proteína contém 159 nós e 565 conectores compostos por dois *clusters* interconectados, cada um contendo diferentes processos biológicos (*cluster 1* e 2). Pela análise GO do *cluster 1*, (Fig. 15) foram identificados os seguintes processos biológicos, classificados em: (i) transdução de sinal intracelular, (ii) metabolismo de espécies reativas de oxigênio, (iii) Transdução de sinal mediada por pequenas GTPases, (iv) processos regulatórios no sistema circulatório e (v) estresse do retículo endoplasmático. No *cluster 2*, os

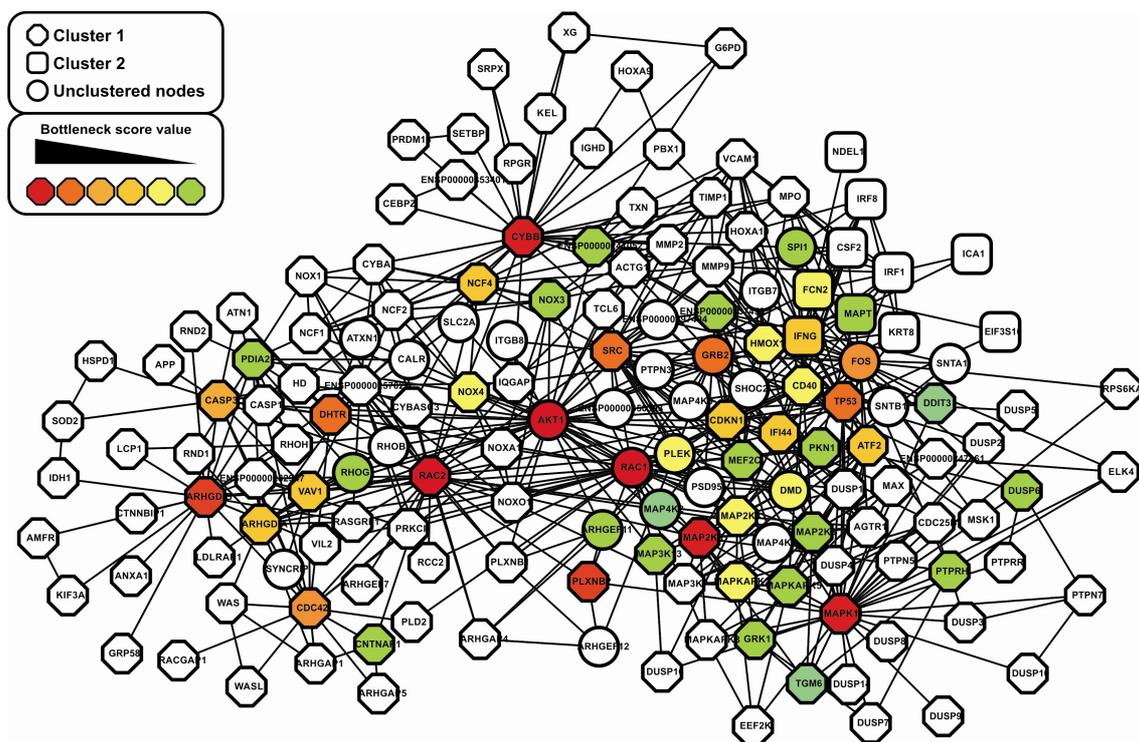


Fig.14. Rede de interações proteína-proteína (PPPI) obtida a partir de dados de interatoma da PDIA2 de humano. As sub-redes e nós não agrupados que compõem a rede PPPI estão indicadas pelos diferentes formatos de nós (inset). Os nós são representados na PPPI por uma escala de cores que indica o valor do escore (do maior para o menor valor, conforme o inserto da figura).

processos biológicos foram classificados em: (i) hematopoiese e diferenciação de leucócitos, (ii) regulação positiva da cascata de JAK-STAT, e (iii) sinalização de vias ER-núcleo (dados não mostrados).

Os dados gerados nesta análise inicial de biologia de sistemas nos incentivaram a buscar mais informações sobre os nós envolvidos na interação com PDI, utilizando redes de centralidade. As redes de centralidade identificam os nós (e seus consequentes processos biológicos) que possuem posição relevante na arquitetura geral da rede (Borgatti, 2005). Muitos dos nós de uma rede que mostram valores elevados de centralidade são importantes pontos de vulnerabilidade, indicando que um ataque a esses nós pode gerar grandes perturbações na rede

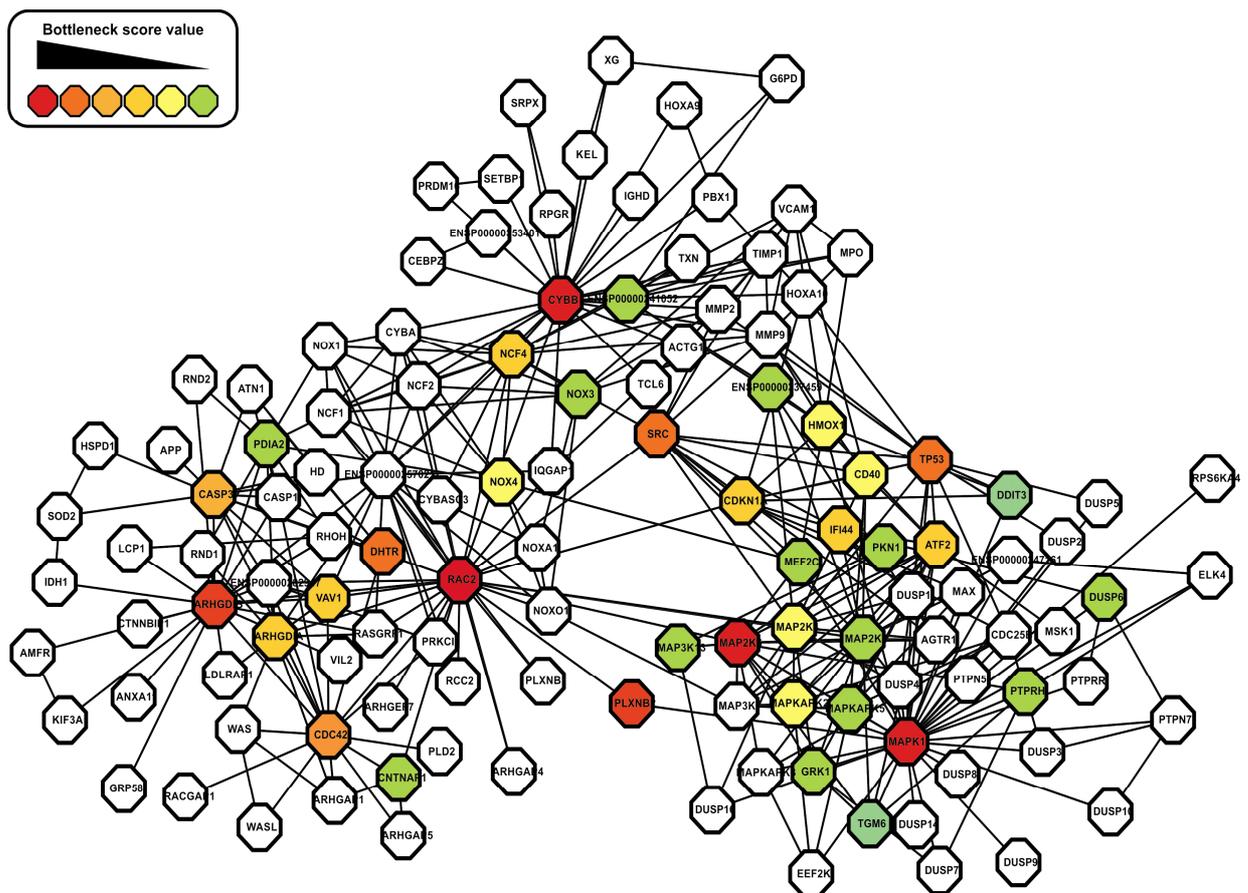


Fig.15. Sub-rede de proteínas (*cluster 1*) associada à transdução de sinal intracelular, metabolismo de espécies reativas de oxigênio, transdução de sinal mediada por pequenas RhoGTPases, processos do sistema sanguíneo e circulatório e estresse do retículo endoplasmático. Os nós são representados no *cluster 1* por escala de cores que indicam o valor do escore de cada nó (do maior para o menor valor, conforme o inseto da figura).

4.12. Efeito do silenciamento da PDI na atividade de RhoA e Rac1

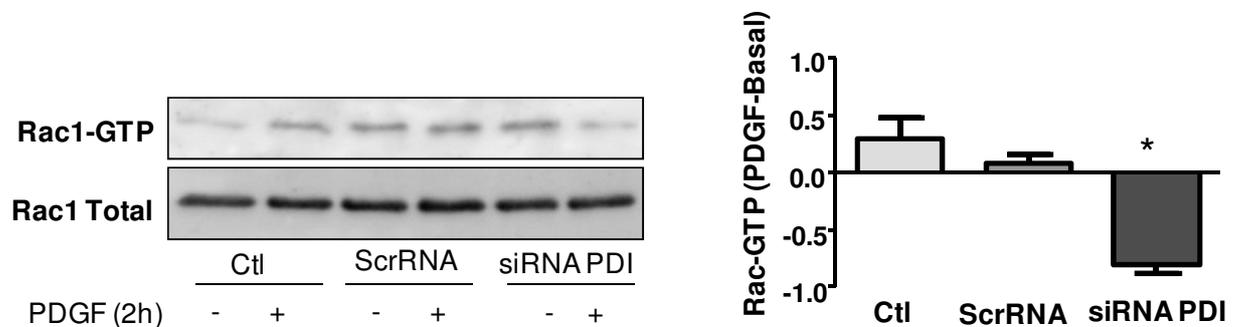
Para investigar se a PDI é necessária para sustentar a atividade de RhoGTPases, avaliamos o efeito do silenciamento da PDI na atividade Rac1 e RhoA pelo ensaio de *pull-down* com proteína de fusão (RBD-GST e PBD-GST, respectivamente), seguido por eletroforese em SDS-PAGE.

Em VSMC controle, a indução da migração celular por PDGF promoveu discreto aumento na atividade de Rac1 e RhoA quando comparado à condição basal. Em VSMC com silenciamento da PDI, a presença do PDGF reduziu a ativação tanto da Rac1 (Fig.17.A) como da RhoA (Fig.17.B). A análise da diferença de ativação de GTPase entre as células com PDGF e basal, mostrou redução significativa da atividade de Rac1 e RhoA em VSMC com silenciamento da PDI em comparação às células controle (Fig.17.A e B). É importante ressaltar que apesar das alterações na atividade de RhoGTPases, a expressão total Rac1, RhoA ou RhoGDI não se alterou após diferentes tempos de estímulo com PDGF (30min, 1h, 4h, 6h e 8h) ou nas células com silenciamento da PDI (Fig. 18.A e B).

4.13. Análise da co-localização entre PDI e RhoGTPases por microscopia confocal.

Estudos de microscopia confocal mostraram uma co-localização entre PDI e Rac1 tanto na condição basal ou sob estímulo de PDGF (Fig.19). Esta co-localização ocorre em pontos focais, de modo predominante na região peri-nuclear, um pouco menos evidente em locais mais distantes e praticamente ausente na membrana plasmática, aonde a Rac1 aparece isoladamente principalmente após incubação com PDGF. A análise confocal entre PDI e RhoGDI mostrou na condição basal uma discreta co-localização entre as duas proteínas em pontos específicos peri-nucleares, que foi diminuída após estímulo com PDGF (Fig.20). Nas condições testadas, o anticorpo contra RhoA mostrou-se ineficiente para experimentos de imunofluorescência. Esse tipo de ensaio possui limitações técnicas, mas os resultados sugerem que apenas uma fração de Rac ou RhoGDI interage com PDI ou ainda que essa interação é transitória.

A)



B)

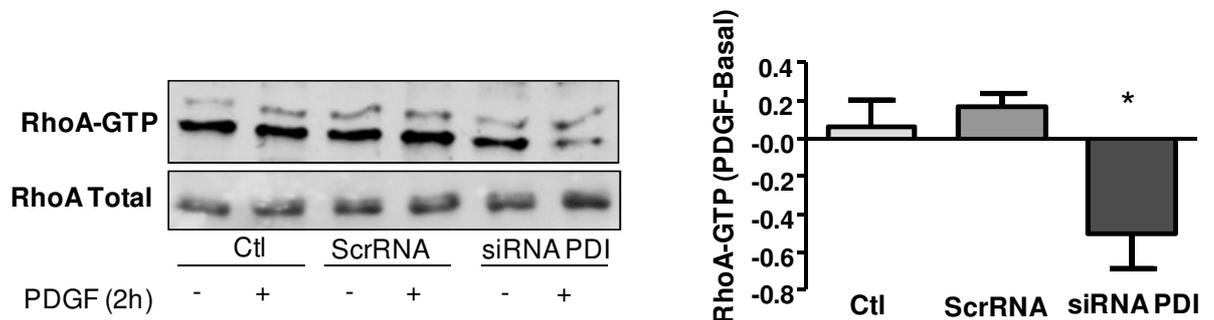


Fig.17. O silenciamento da PDI, sob estímulo com PDGF (2h) diminui a atividade de Rac1 e RhoA, detectadas pelo ensaio de *pull-down*. A) Ensaio de *pull-down* com PBD-GST para análise de Rac1 ativa. B) Ensaio de *pull-down* com RBD-GST para análise de RhoA ativa. Ctl, VSMC sem transfecção; ScrRNA, controle negativo de transfecção (sequência de siRNA *scrambled*); siRNA PDI, siRNA contra a sequência da PDI. *P<0,05 vs controle. Anova - "Dunnnett's Multiple Comparison Test". N=3

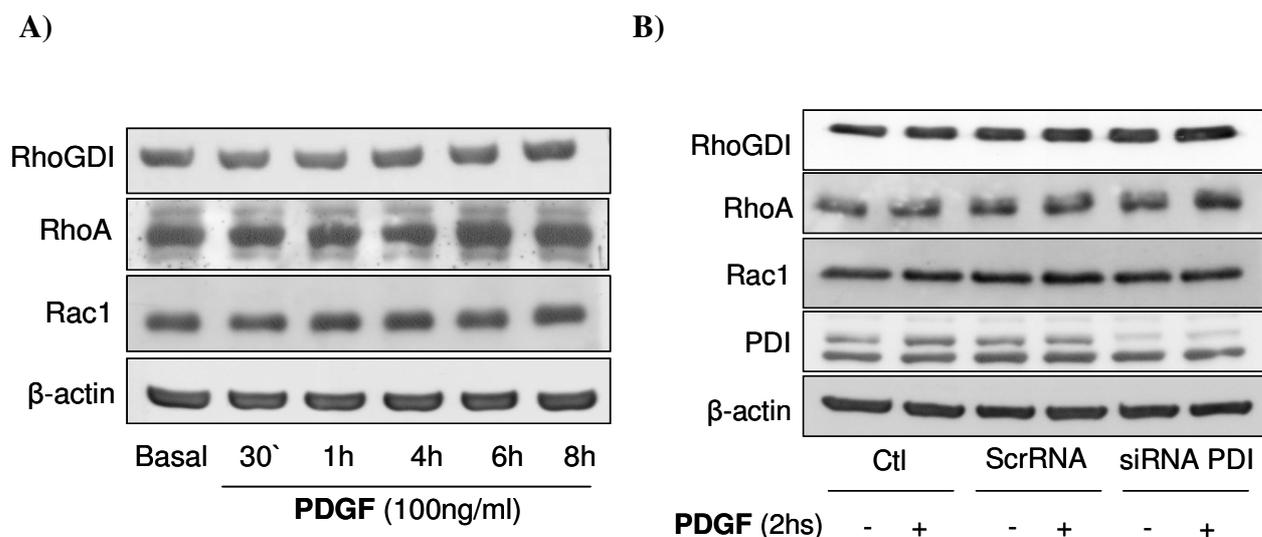


Fig.18. A expressão total de Rac1, RhoA e RhoGDI se mantém inalterada após estímulo com PDGF ou silenciamento da PDI, em VSMC. Western blot representativo da expressão de proteínas após **A)** diferentes tempos de exposição ao PDGF ou **B)** após o silenciamento da PDI. **Basal**, VSMC sem estímulo; **Controle**, VSMC sem transfecção; **ScrRNA**, controle negativo de transfecção (sequência de siRNA *scrambled*); **siRNA PDI**, siRNA contra a sequência da PDI. N=3

4.14. Análise da interação física entre PDI e Rac1, RhoA ou RhoGDI por ensaios de co-precipitação (co-IP).

A imunoprecipitação da PDI por anticorpo específico, seguida por análise western para GTPases, mostrou interação física da PDI com Rac1 ou RhoA. A fração que co-precipitou foi inalterada após estímulo com PDGF (10min e 2h, Fig.21). A imunoprecipitação da Rac1, seguida de análise western da PDI, confirmou os resultados anteriores (Fig.21).

Experimentos com co-precipitação da RhoGDI mostraram uma clara interação física com a PDI na condição basal. Após o estímulo com PDGF (10min e 2h), essa interação física foi reduzida (Fig.22.A).

É importante ressaltar que os experimentos de análise western não mostraram diferença significativa na expressão total de Rac1, RhoA, RhoGDI ou PDI nos diferentes tempos de estímulo (Fig. 22.B).

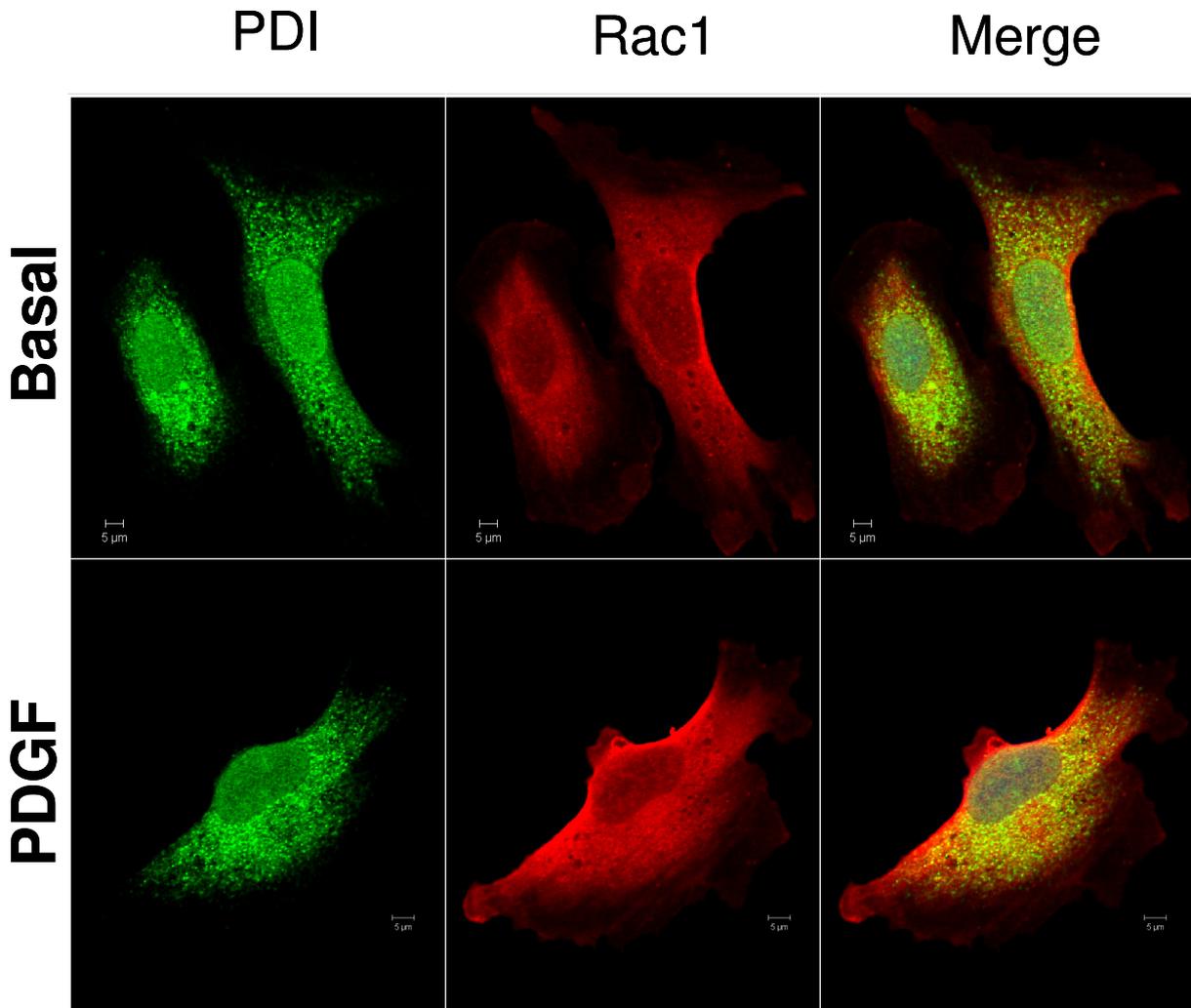


Fig.19. Experimentos de co-localização entre PDI e Rac1 em VSMC, por microscopia confocal. Figura representativa da imunodeteção da PDI (verde), Rac (vermelho), pontos de co-localização (amarelo) e núcleo (corado por DAPI – Azul) em VSMC submetida a *wound healing*, sob estímulo de PDGF (7h). Figura representativa de fatiamento 0,5μm, por microscopia confocal. No mínimo 20 células foram observadas por condição. N=3.

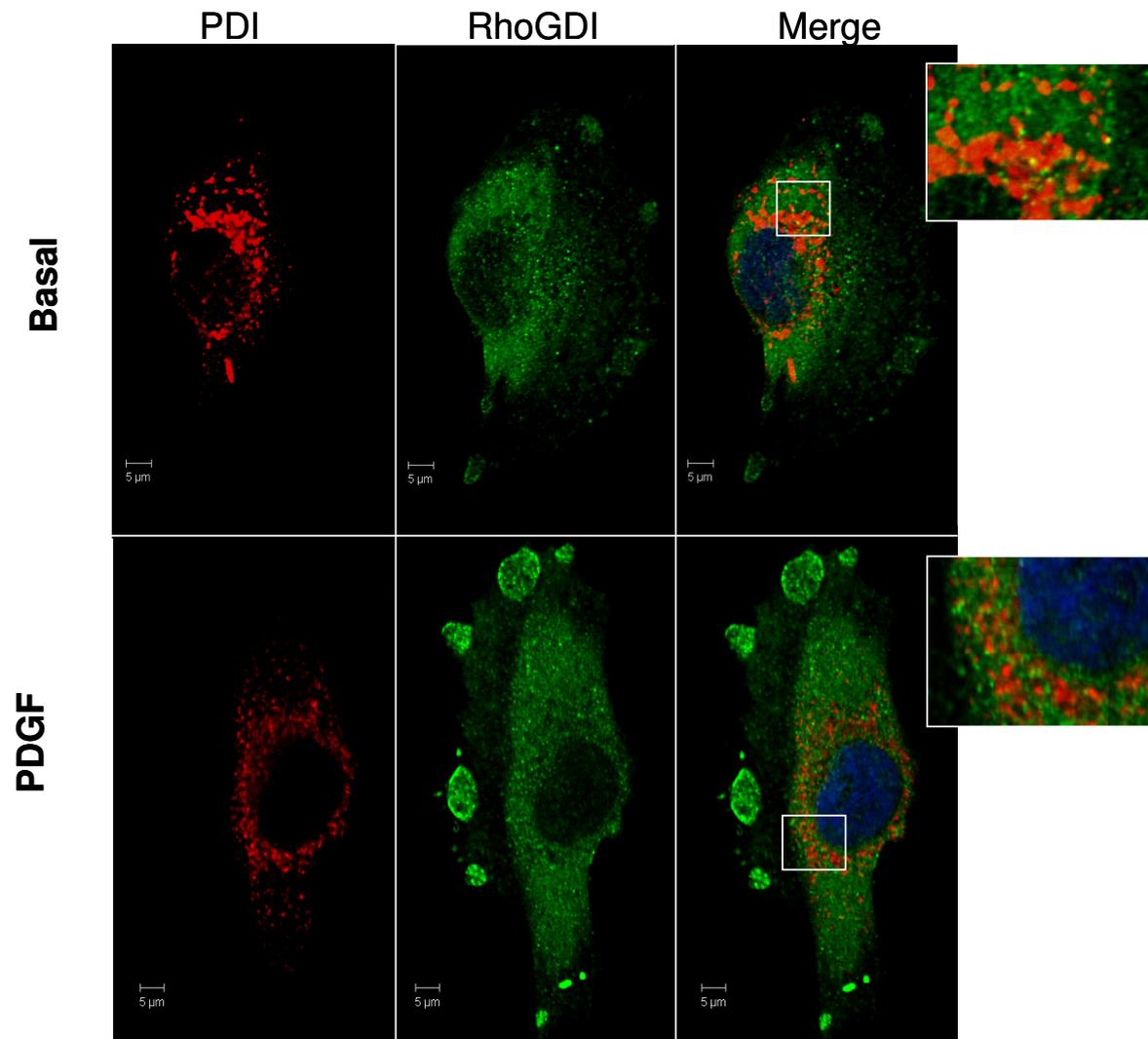


Fig.20. Experimentos de co-localização entre PDI e RhoGDI por microscopia confocal. Figura representativa da imunodeteção de PDI (vermelho), RhoGDI (verde), pontos de co-localização (amarelo) e núcleo (corado por DAPI – Azul) em VSMC submetida a *wound healing* sob estímulo de PDGF (7h). Figura representativa de fatiamento 0,5µm, por microscopia confocal. No mínimo 20 células foram observadas por condição. N=3.

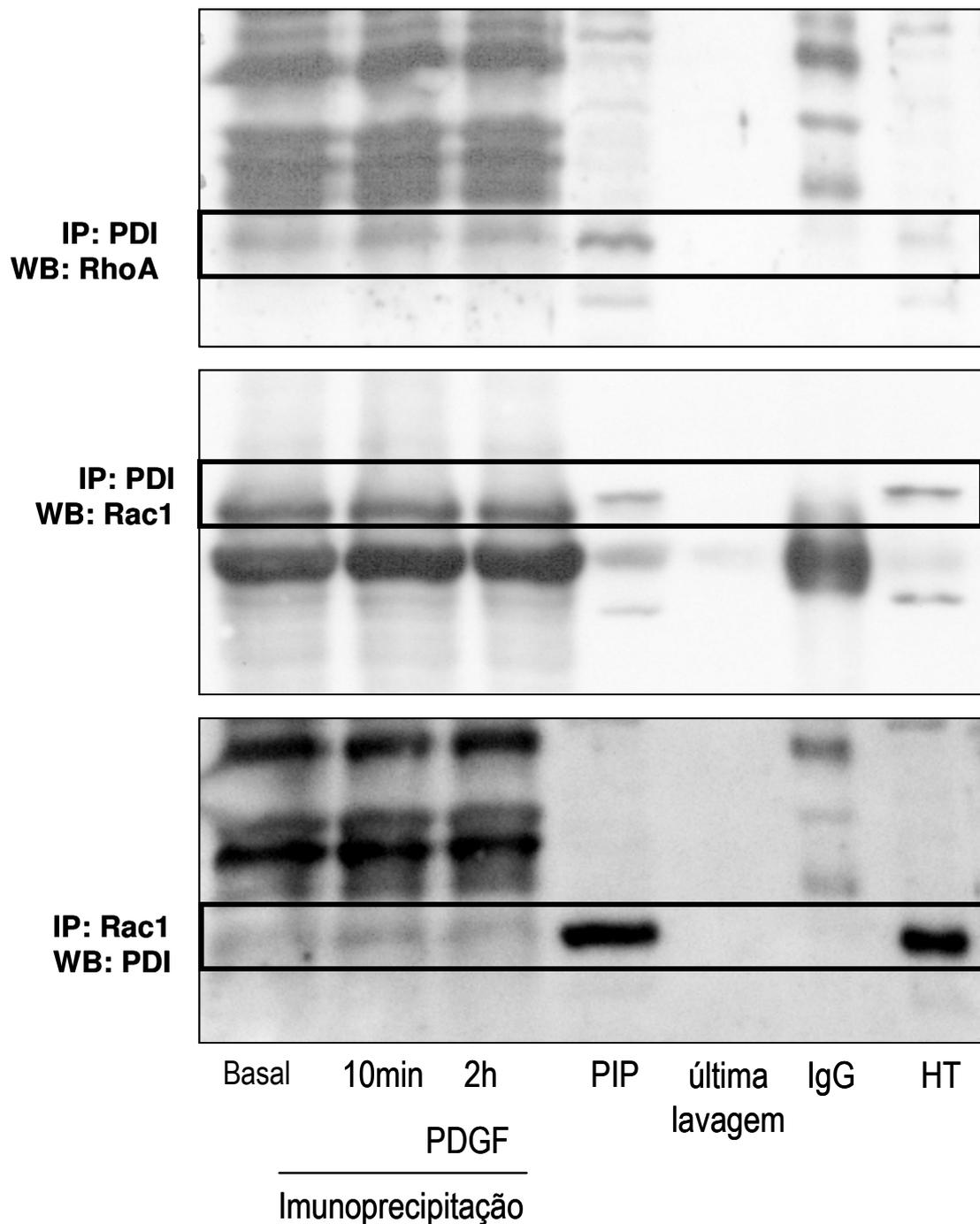


Fig.21. Interação entre PDI e RhoA ou Rac1, inalterada após estímulo com PDGF. Imunoprecipitação de PDI, seguida por análise western da RhoA (painel superior) ou Rac1 (painel central) ou Imunoprecipitação de Rac1 seguido da análise western de PDI (painel inferior). **Basal**, VSMC sem estímulo; **PIP**, sobrenadante pós-imunoprecipitação (contendo excesso de proteínas não-aderidas aos beads); **última lavagem**, última lavagem dos beads antes de eluição das proteínas para análise western; **IgG**, 1 μ l de anticorpo utilizado para imunoprecipitação; **HT**, controle com homogenato total de VSMC.

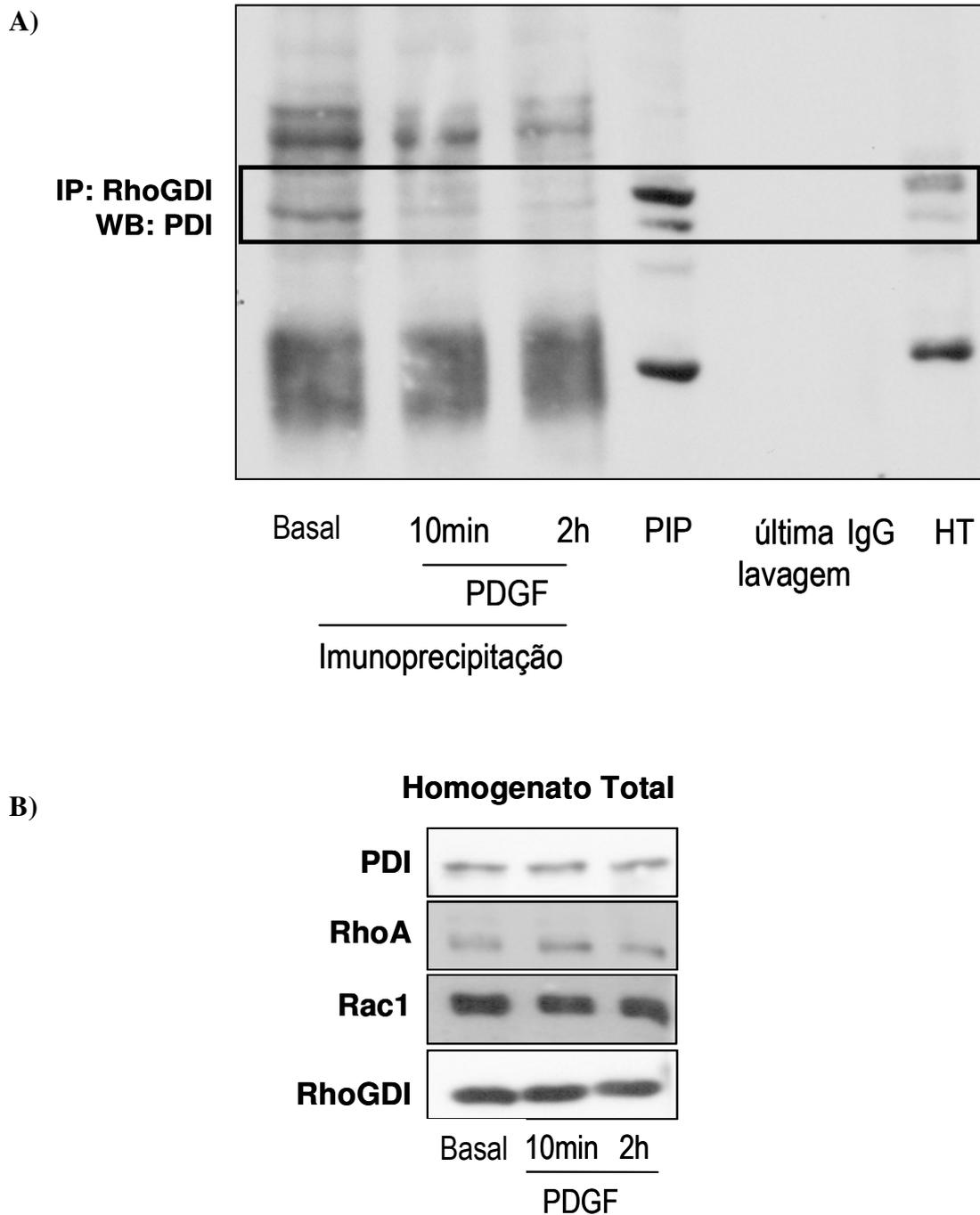


Fig. 22. Interação entre PDI e RhoGDI na condição basal, reduzida após estímulo com PDGF. **A)** Imunoprecipitação da RhoGDI, seguida por análise western da PDI. **B)** Análise western da expressão total inalterada de PDI, RhoA, Rac1 e RhoGDI. **Basal**, VSMC sem estímulo; **PIP**, sobrenadante pós-imunoprecipitação (contendo excesso de proteínas que não grudaram na bead); **última lavagem**, última lavagem dos beads antes de eluição das proteínas para análise western; **IgG**, 1 μ l de anticorpo utilizado para imunoprecipitação; **HT**, controle com homogenato total de VSMC.

4.15. Efeito do silenciamento da PDI na formação de estruturas de adesão em VSMC

Complexos de adesão focal são estruturas importantes de fixação de célula a substratos em repouso e durante migração celular. Para avaliar se a redução da migração e da atividade de RhoGTPases estavam associadas à perda de estruturas de adesão celular, investigamos o efeito do silenciamento da PDI na formação de adesões focais e fibras de estresse. Os experimentos por microscopia confocal em VSMC submetidas a ensaios de *Wound Healing* mostraram, em células não estimuladas, um grande número de adesões focais (marcadas pela colocalização entre paxilina e F-actina), enquanto a F-actina apresentou-se predominantemente na forma de fibras longas e paralelas (Fig.23). Sob estímulo com PDGF, ocorreu redução no número e tamanho de adesões focais, associado a um padrão de fibras de F-actina mais curtas e desorganizadas. Em VSMC com silenciamento da PDI, tanto na condição basal como na presença de PDGF, observou-se um número reduzido de adesões focais e a presença de fibras de F-actina mais curtas e desorganizadas em relação às células controle (Fig.23). Em conjunto, estes dados evidenciam, nas células nas quais a PDI foi silenciada, uma desorganização geral do citoesqueleto e de estruturas associadas, em concordância com os dados indicando perda da capacidade migratória sob estímulo com PDGF.

Em uma série de experimentos de microscopia confocal em que examinamos a imunolocalização de RhoGDI e Rac1, verificamos consistentemente a presença de ambas proteínas em estruturas circulares distribuídas circularmente na periferia células. Tais estruturas aumentaram significativamente em número e tamanho na presença de PDGF (7h; Fig.24). A marcação de F-actina evidenciou que estas estruturas eram intracelulares e, principalmente, evidenciou a ausência de um anel de actina circundando a plataforma de adesão (Fig. 24), anel este característico de podossomos (Linder S, *TRENDS in Cell Biology*, 2003). Desta forma, interpretamos estas estruturas como vesículas de reciclagem de maquinaria de adesão celular. Para avaliar o efeito da PDI no número dessas vesículas, experimentos com silenciamento da PDI foram realizados, evidenciando significativa redução do número e tamanho dessas estruturas comparado às células controle (Fig.25).

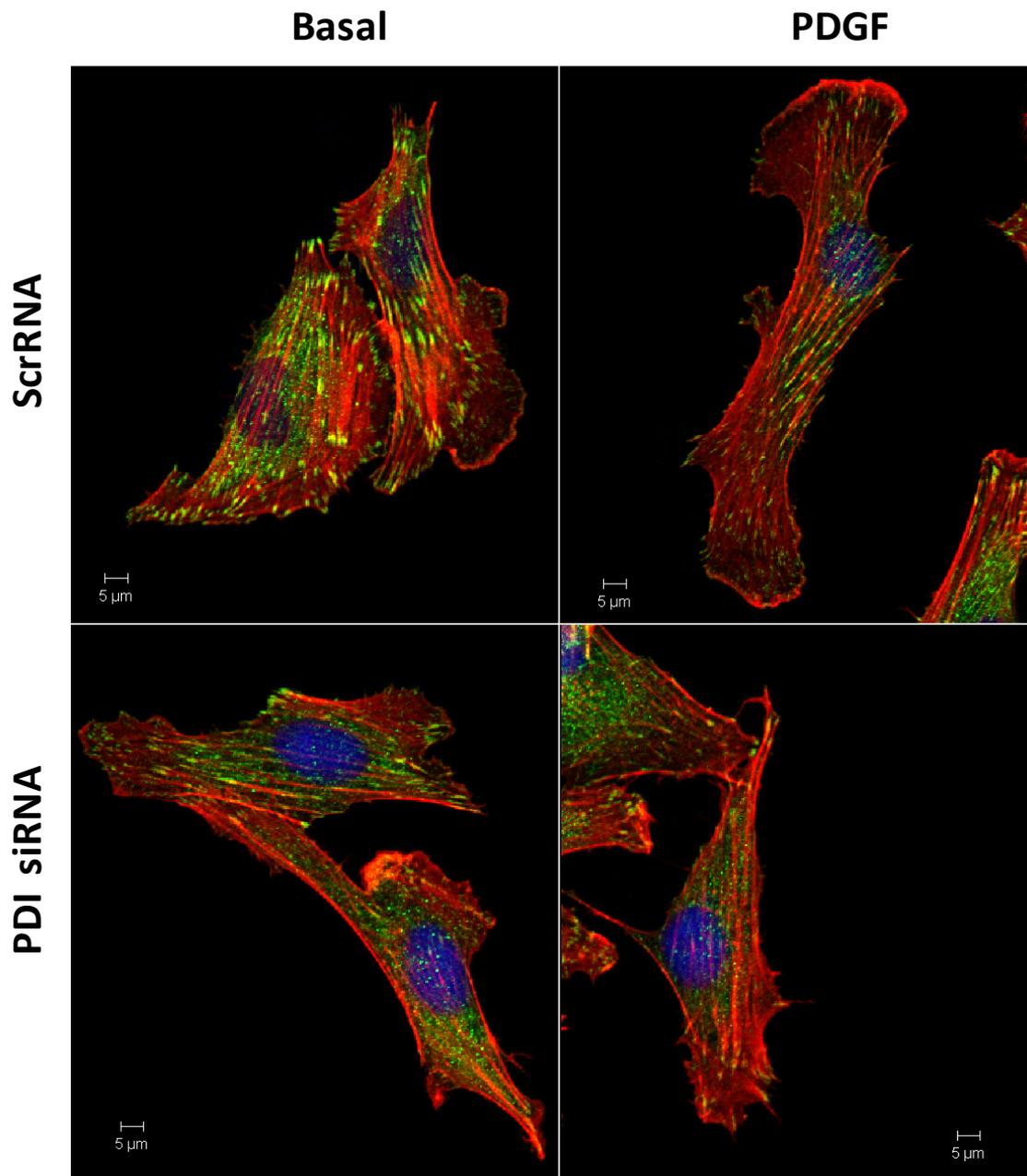


Fig.23. O silenciamento da PDI diminui o número de adesões focais. Figura representativa da expressão de Paxilina (marcando pontos de adesão focal nas extremidades celulares - verde), F-actina (marcada por faloidina/A633 - vermelho) em VSMC submetida a *wound healing*, na presença ou ausência de PDGF (100ng/ml - 7hs). Núcleo (corado por DAPI - Azul). **ScrRNA**, controle negativo de transfecção (sequência de siRNA *scrambled*); **siRNA PDI**, VSMC transfectada com siRNA contra PDI. Figura representativa da somatória das fatias obtidas por microscopia confocal. No mínimo 20 células foram observadas por condição. N=3.

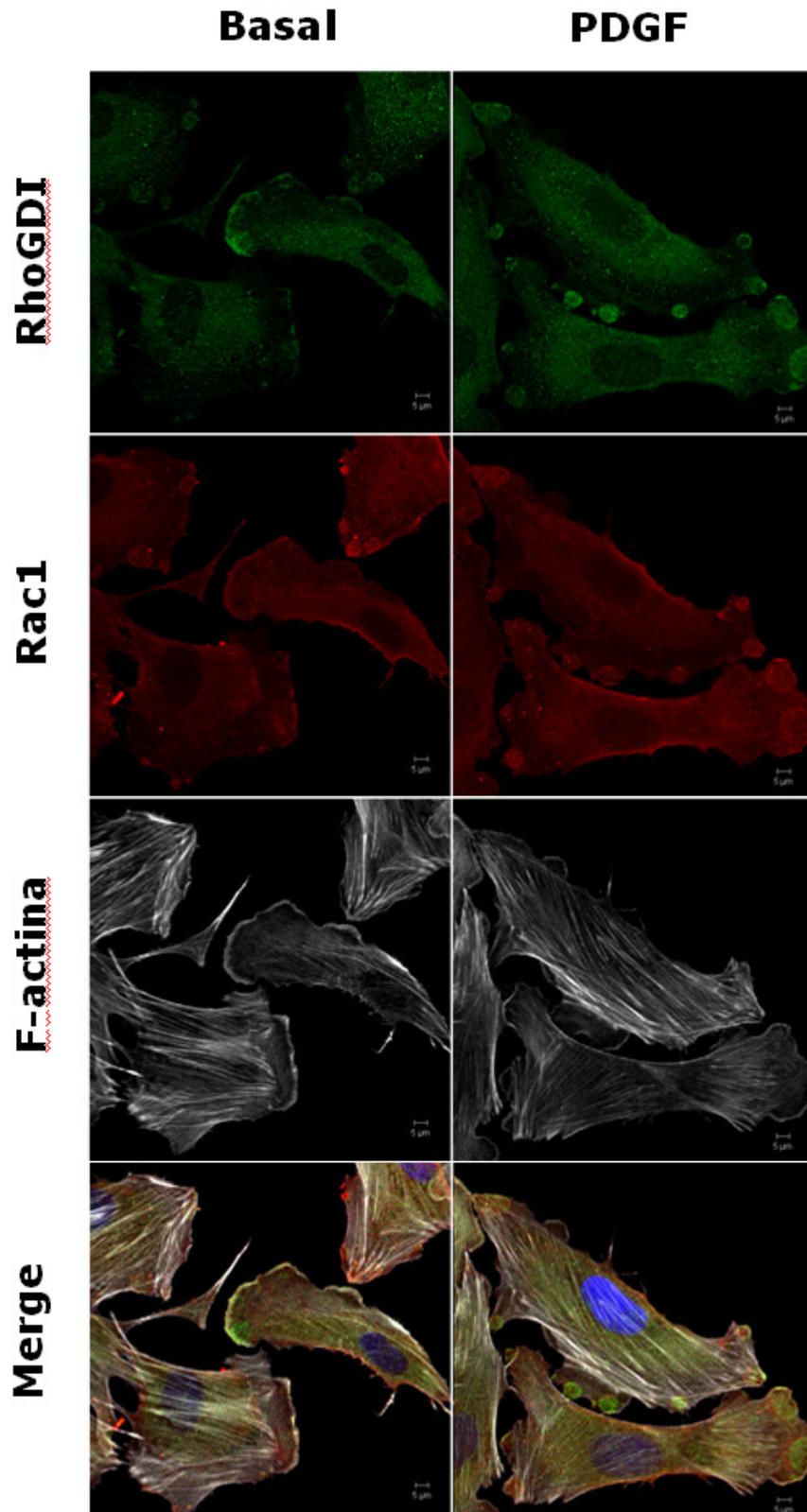


Fig.24. Expressão de Rac1 e RhoGDI em estruturas vesiculares de adesão. Figura representativa da expressão de Rac (vermelho), RhoGDI (verde), F-actina (corada por faloidina/A633 – branco) e núcleo (corado por DAPI - Azul), de VSMC submetida a *wound healing* e analisada por microscopia confocal na **A**) presença e **B**) ausência de PDGF (100ng/ml -7hs). Figura representativa da somatória das fatias obtidas por microscopia confocal. No mínimo 20 células foram observadas por condição. N=3.

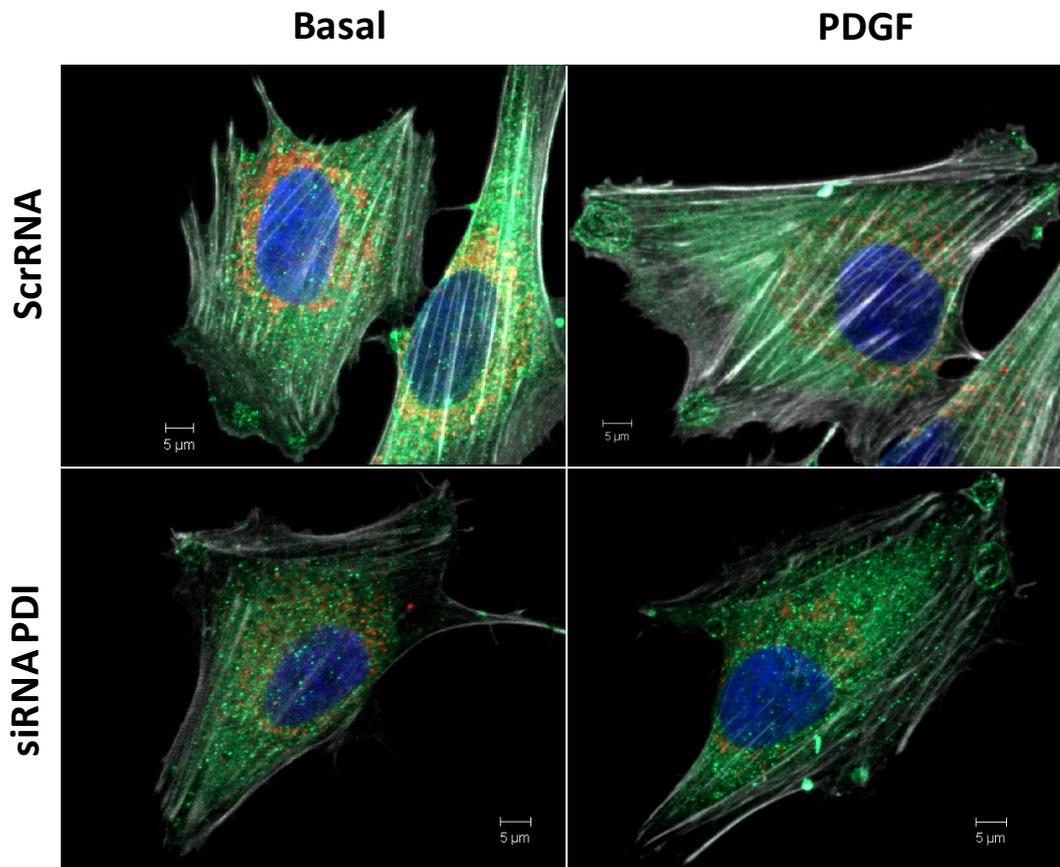


Fig.25. O silenciamento da PDI diminui o tamanho e número de estruturas vesiculares de adesão celular. Figura representativa da expressão de PDI (vermelho), RhoGDI (verde) em VSMC submetidas a *wound healing*, na presença ou ausência de PDGF (100ng/ml – 7hs). F-actina (corada por faloidina/A633 – branco) e núcleo (corado por DAPI - Azul). **ScrRNA**, controle negativo de transfecção (sequência de siRNA *scrambled*); **siPDI**, VSMC transfectada com siRNA contra PDI. Foto representativa da somatória das fatias obtidas por microscopia confocal. No mínimo 20 células foram observadas por condição. N=3.

5. Discussão

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem um efeito modulador da PDI na migração de VSMC. O silenciamento da PDI reduz tanto a migração celular como a persistência direcional induzidas por PDGF. PDGF não alterou a expressão global de PDI, porém mudou sua localização subcelular de um padrão predominantemente perinuclear para um padrão difuso. A superexpressão da PDI induziu aumento espontâneo na migração celular na condição basal. A inibição do aumento induzido por PDGF na produção total de ROS e especificamente na expressão do mRNA da Nox1 pelo silenciamento da PDI sugerem modulação da migração por via dependente da isoforma Nox1. Estudos adicionais de biologia de sistemas para detecção de interação proteína-proteína indicaram forte convergência entre PDI e proteínas da família das RhoGTPases, particularmente Rac1 e RhoGDI. Desta forma, realizamos estudos para investigar a possibilidade de que o mecanismo do efeito da PDI na migração envolva diretamente modulação da atividade de GTPases da família Rho. Ensaios de atividade de GTPases mostraram uma redução significativa na atividade de Rac1 ou RhoA em células com o silenciamento da PDI na presença de PDGF. Por microscopia confocal, evidenciou-se a colocalização entre PDI e Rac1 na região perinuclear, inalterada após estímulo com PDGF. A interação física entre PDI e Rac1 ou RhoA por imunoprecipitação também corroboram com esses achados. A clara interação física entre PDI e RhoGDI observada na condição basal é diminuída após estímulo com PDGF. A identificação de estruturas de adesão celular, e a posterior observação de que o silenciamento da PDI impede o aumento do número e tamanho destas estruturas, acrescentam importante evidência de que PDI contribua para vias necessárias a rearranjos no citoesqueleto celular. Desta forma, a PDI parece sustentar a migração celular por mecanismos que envolvem processos redox, expressão de Nox1 e possivelmente ativação de pequenas GTPases da família Rho.

Os mecanismos envolvidos no efeito da PDI durante a migração celular podem ser múltiplos e dependentes de vias que envolvem ou não processos redox. A inibição da migração celular após inibição da produção de ROS e a modulação pela PDI do mRNA da Nox1 são consistentes com um papel de vias redox nos efeitos da PDI. Trabalhos anteriores mostraram que indutores da migração celular (*p. ex.* PDGF, FGF) induzem aumento na produção de ROS e migração celular, ambos dependentes de Nox1 (Weber et al, 2004; Schröder et al, 2007). Adicionalmente, nosso grupo mostrou que o siRNA da PDI, além de reduzir a ativação da NADPH oxidase, reduz a expressão do mRNA da Nox1 induzida por AngII (Fernandes et al, 2009). A redução do mRNA da Nox1 após ativação com PDGF observada no presente estudo após silenciamento da PDI amplia as implicações destes dados

e está de acordo com o fato de que alterações da atividade da NADPH oxidase vascular são uniformemente acompanhadas de mudanças na expressão gênica e proteica, ao contrário da NADPH oxidase fagocítica, em que aumentos de atividade refletem essencialmente o grau e velocidade de montagem do complexo da oxidase (Lassègue et al, 2003). Dados prévios de nosso grupo mostraram que super-expressão da PDI em VSMC induz aumento precoce da produção de ROS e do mRNA da Nox1 a valores semelhantes aos observados após incubação com AngII (Fernandes et al, 2009). No presente trabalho, o aumento na migração celular basal após super-expressão da PDI é importante e coerente com os outros resultados, porém é pequeno quando comparado à maior migração induzida por PDGF. Assim, não se pode descartar que fatores adicionais à produção de ROS estejam envolvidos na modulação da migração pela PDI.

Nas mesmas condições de inibição da Nox1, nossos dados não mostram efeito da PDI na expressão do mRNA de Nox4. Contudo, não se pode descartar que em tempos mais tardios de observação, ou em modelos distintos de migração celular, a PDI possa modular a função da Nox4, uma vez que dados prévios do grupo indicam co-localização e co-imunoprecipitação entre PDI e Nox4 (Janiszewski et al, 2005). Mais ainda, estudos mostraram que o silenciamento da Nox4 (Santos et al, 2009.) ou PDI (dados não publicados) reduzem a geração de ROS induzida por indutores do estresse do retículo. Além disso, Nox4 pode ter papel importante na migração celular, possivelmente por vias associadas à formação de adesões focais essenciais à migração celular, de modo que tanto a super-expressão como o silenciamento da Nox4 inibem a migração induzida por PDGF (Lyle et al, 2009). Particularmente, Nox4 foi recentemente identificada como um importante indutor de migração de células endoteliais e angiogênese (Zhang et al, 2010). É importante lembrar que a análise da expressão do mRNA não exclui a necessidade de avaliar a expressão protéica de Nox(s). Recentes estudos em células endoteliais mostraram discordância entre expressão de mRNA e expressão protéica de Nox4. Após 16h de privação de soro, o mRNA da Nox4 aumentou ~3 vezes, comparado a células com soro restituído, enquanto a expressão da proteína foi reduzida (Peshavariya et al, 2009). Estas discrepâncias não são necessariamente inesperadas, considerando a crescente identificação de vários mecanismos pelos quais a expressão protéica é regulada no âmbito da tradução, p.ex. via degradação de mRNA, microRNAs, fatores de inibição da tradução, etc (Shenouda et al, 2009). Limitações adicionais neste sentido decorrem da baixa sensibilidade e especificidade dos anticorpos disponíveis contra subunidades catalíticas de Nox(s).

O envolvimento da PDI em eventos funcionais relacionados à geração de ROS pela NADPH oxidase adiciona informações relevantes para o entendimento do controle redox na migração celular. Nossa análise da rede de interação proteína-proteína por métodos de Biologia de Sistemas, mostrou forte interação e conectividade entre PDI e GTPases, bem como do regulador de GTPases RhoGDI. A utilização de redes de Biologia de Sistemas para análise de interações físicas entre proteínas é uma estratégia que simplifica sistemas complexos. Nestas redes, as interações apresentadas podem ser físicas, bioquímicas ou funcionais (Vidal et al, 2011). É importante ressaltar que ao analisar uma rede de interação entre proteínas não se pode dizer qual molécula influencia ou é influenciada por outra. Contudo, este tipo de análise é capaz de avaliar um grande número de interações em bancos de dados pré-existentes e gerar hipóteses de forma bastante eficiente (Vidal et al, 2011). Neste sentido, a observação de redução da atividade de Rac1 e RhoA após o silenciamento da PDI sob estímulo com PDGF adiciona uma nova via para o entendimento dos efeitos da PDI na ativação de Nox e migração celular.

O papel de Rho GTPases na ativação de isoformas da NADPH oxidase é bem estudado. Rac1 é essencial para sustentar a atividade de Nox1, Nox2 e Nox3 em células não-fagocíticas, enquanto Rac2 sustenta a atividade de Nox2 em fagócitos (Hordijk, 2008). Nox4 e Nox5 não parecem requerer a presença de Rac1 ou Rac2 (Hordijk, 2008). Nox4, por sua vez, tem como um de seus principais alvos a ativação de RhoA, por um mecanismo envolvendo o co-fator Poldip2 da Nox4 (Lyle et al, 2009). Além de vias redox, RhoGTPases e, por conseguinte a própria PDI podem afetar potencialmente vias não-redox de sinalização. A ativação da Pak1 é regulada pela sua ligação com GTPases e posterior auto-fosforilação de vários sítios. Estudos recentes mostram que PDGF induz migração celular via fosforilação em dois diferentes sítios da Pak1. Esses sítios têm diferentes papéis na ativação da proteína, sendo um deles (Thr423) fosforilado por PDK1 é dependente de ROS, enquanto o outro (Ser199/204) corresponde à auto-fosforilação da proteína, possivelmente via Rac1 e independente de ROS (Weber et al, 2004). Assim, a convergência entre PDI e RhoGTPases implica em efeitos que vão além da regulação da NADPH oxidase e produção de ROS.

No presente trabalho, estudos de co-localização e co-imunoprecipitação entre PDI e Rac1 ou RhoA, corroboram a idéia de interação entre PDI e GTPases. Inclusive, não é espantoso que haja interação somente em uma pequena fração das proteínas, já que estas proteínas são originalmente de compartimentos diferentes: PDI, residente do retículo

endoplasmático e GTPases, prioritariamente no citosol. Além disso, o grau de associação relativamente baixo pode significar uma interação transitória. De fato, a ativação de apenas uma pequena fração de RhoGTPases é responsável por todo o efeito destas proteínas na sinalização celular. Reduções nas atividades de GTPases promovidas pelo siRNA da PDI estão de acordo com alterações observadas em estruturas de adesão celular. VSMC participam no desenvolvimento de lesões vasculares tanto por sua habilidade em proliferar como migrar (Doran et al, 2008). Mais especificamente, a migração celular é dependente da dinâmica de reciclagem de adesões focais e reorganização do citoesqueleto (Lyle et al, 2009). Assim, o fato do silenciamento da PDI, mesmo na condição basal ou sob estímulo de PDGF, reduzir o número de adesões focais pode induzir a redução da migração celular por não possibilitar a formação de novas adesões na frente de migração da célula. Em estudo com inibição da Nox4, foi demonstrada a perda de adesões focais e fibras de estresse, as quais foram recuperadas após transfecção com Rho ativa (Lyle et al, 2009).

A rápida e contínua reorganização do citoesqueleto acontece por um mecanismo dinâmico e localizado de ativação das RhoGTPases, que agem geralmente de modo antagônico (Vincente-Manzanares et al, 2005). A super-expressão de Rac constitutivamente ativa, mas não a Rac mutada (na região responsável pela ativação do complexo NADPH oxidase) leva à inibição de RhoA por via dependente da produção de ROS e conseqüente fosforilação de p190RhoGAP (Nimmuel et al, 2003). Por outro lado, regulações da atividade de Rac por efetores da Rho também foram descritas. Foi demonstrado que a super-expressão de ROCK (Rho quinase - efetor direto da Rho) aumenta fosforilação de FilGAP, resultando na inativação de Rac e conseqüente redução da formação do lamelipódio (Ohta et al, 2006). Ao contrário da regulação antagônica entre Rac1 e RhoA, em certos casos pode ocorrer uma regulação coincidente, semelhante à observada em nosso estudo. A fosforilação da RhoGDI na Tyr156 ou Tyr27 pela quinase Src ou ainda a fosforilação na Thr pela PKC ζ reduz a afinidade desta GDI não só por RhoA, mas também por Rac e Cdc42 (DerMardirossian et al, 2006; Wu Y. et al, 2009; Kuribayashi et al, 2007).

As considerações acima indicam que a PDI tem efeito funcional significativo em GTPases, porém a evidência de interação direta entre elas não parece ser suficiente para explicar tal efeito. Neste contexto, a análise da rede de Biologia de sistemas demonstrando interação entre PDI e RhoGDI, bem como a observação de interação física entre PDI e RhoGDI e sua modulação negativa por estímulo com PDGF fortalecem a hipótese de um

mecanismo indireto envolvendo PDI e RhoGDI na inibição da atividade de RhoA e Rac1. De fato, mutações na RhoGDI que impedem sua ligação com Rac1 impedem também a ativação de NADPH oxidase (Di-Poi et al, 2001). A necessidade da RhoGDI para o efeito da Rac1 na ativação da NADPH oxidase foi também observado em cardiomiócitos (Custodis et al, 2006). Os complexos mecanismos da regulação de proteínas da família da Rho pela RhoGDI já foram demonstradas em diferentes trabalhos. Um recente estudo demonstrou que o silenciamento de RhoGDI reduz a expressão protéica de Rac1, Cdc42 e RhoA, possivelmente por mecanismo dependente de degradação pelo proteasoma, uma vez que estas proteínas, quando preniladas, tornam-se instáveis e possivelmente são parcialmente desnoveladas (Boulter et al, 2010). Contudo, mesmo com expressão protéica reduzida, a ativação destas GTPases permanece aumentada (Rac1, Cdc42) ou inalterada (RhoA - Boulter et al, 2010). Tais observações sugerem que a RhoGDI, além do seu papel regulador, tem um importante papel na estabilidade de GTPases, semelhante ao de uma chaperona. Por outro lado, outro estudo aponta evidências de um transporte alternativo de RhoGTPases para membrana, independente de RhoGDI (Slaughter et al, 2009). Indicações adicionais da grande complexidade da regulação de RhoGTPases foi também mostrada pelo inesperado aumento da atividade de Rac1 na membrana celular de leucócitos de camundongo *knockout* para geranylgeranyl-transferase I, levando a artrite erosiva com formação de autoanticorpos (Khan et al, 2011). Assim, é provável que os efeitos da RhoGDI em GTPases dependam do balanço de vários fatores, variando conforme o tipo celular. Enquanto em células com alto potencial migratório, como melanoma, o silenciamento da RhoGDI reduz a migração e a persistência direcional da migração (Boulter et al, 2010), em células com baixo potencial migratório, como células de câncer de bexiga, o silenciamento da RhoGDI induz aumento da migração (Moissoglu et al, 2009). Esses resultados conflitantes são potencialmente explicáveis pela existência de um tráfego alternativo vesicular de RhoGTPases para membrana. Em células com baixo grau migratório, o lento tráfego vesicular é suficiente para o transporte de GTPases para membrana. Já em células altamente migratórias, esse tipo de transporte não é suficiente para levar as GTPases para novos lamelipódios (Garcia-Mata R et al, 2011), gerando possível acúmulo destas GTPases na superfície do retículo endoplasmático (Boulter et al, 2010). Neste sentido, postulamos que em VSMC com silenciamento da PDI o estímulo de PDGF induz uma situação análoga à das células com alto potencial migratório, no qual a translocação de GTPases para membrana por vias dependente de RhoGDI é predominante em relação a outras vias. Neste contexto, a interação da PDI pode ajudar na assistência da formação ou mesmo de algum tipo de *priming* do complexo RhoGDI/GTPases após ativação por fatores de

crescimento. Em plantas a RhoGDI auxilia a polarização, organização espacial da ativação de GTPases, geração de ROS e crescimento de tricomas de raiz (Carol et al, 2005; Kost, 2008). Nossos dados mostraram que a perda da migração pelo silenciamento da PDI e a simultânea perda da atividade de Rac1 e RhoA são consistentes com um possível defeito no transporte de Rac/RhoA pela RhoGDI. Tais efeitos reforçam um possível papel da PDI na organização da NADPH oxidase, como já sugerido em neutrófilos com respeito à interação entre PDI e a subunidade p47phox (de A Paes et al, 2011).

6. Conclusão

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que o silenciamento da PDI diminui a produção de ROS, a expressão do mRNA da Nox1 e a migração celular induzidas por PDGF. Este fator de crescimento também induziu redistribuição subcelular da PDI sem alterar a expressão total da proteína. Mais ainda, a superexpressão da PDI induziu um aumento espontâneo na migração celular. A análise por métodos de biologia de sistemas indicou convergência entre PDI e RhoGTPases e seu regulador RhoGDI. A redução, pelo silenciamento da PDI, da atividade de Rac1 e RhoA na presença de PDGF, reforçou a provável interação entre essas proteínas. Além da interação funcional, estudos de co-localização e imunoprecipitação com Rac1 e RhoA dão suporte a algum grau de interação física entre GTPases e PDI. Mais ainda, a diminuição da interação entre PDI e RhoGDI após PDGF sugere que a interação entre essas duas proteínas possa ter relevância no entendimento de como a PDI modula a atividade de GTPases, embora o modelo desta interação necessite de estudos adicionais. O silenciamento da PDI e a menor ativação de GTPases foram acompanhados da desorganização do citoesqueleto e de estruturas de adesão celular, em sintonia com a reduzida capacidade migratória.

Em conjunto, estes resultados evidenciam um papel novo e potencialmente importante da PDI no controle da migração celular por mecanismos que envolvem regulação da ativação e expressão da Nox1 NADPH oxidase, em particular mediados por uma interferência possivelmente direta na ativação de RhoGTPases. Nossos resultados conferem uma dimensão fisiológica a observações prévias de que a PDI se associa e regula a atividade do complexo NADPH oxidase em diferentes tipos celulares. É interessante neste sentido que uma proteína cuja função é complexa e descrita primariamente em compartimentos e eventos subcelulares específicos (ex: enovelamento protéico no retículo endoplasmático) possa ter um efeito identificável e relativamente focado em um fenômeno celular como migração, regulado em um estrato hierárquico claramente superior.

7.Referências

-
- Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W (2006) Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**:14259-14260.
- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem*. **279**:45935-45941.
- Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, de Souza HP, Janiszewski M, da Luz PL, Laurindo FR. (2000) Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res*. **47**:436-445.
- Babior BM. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood*. **93**:1464-1476.
- Bader GD, Hogue CW. (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* **4**:2.
- Benjamini Y, Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol*. **57**:289-300.
- Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG (2007) Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**:10650-5.
- Borgatti, S. P. (2005) Centrality and network flow. *Soc. Networks* **27**:55-71.
- Boulbés DR, Shaiken T, Sarbassov dos D. (2011) Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2. *Biochem Biophys Res Commun*. **413**:46-52.
- Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brennwald PJ, Burridge K. (2010) Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol*. **12**:477-83.
- Boyartchuk VL, Ashby MN, Rine J. (1997) Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science*. **275**:1796-1800.
- Brandes RP, Kreuzer J. (2005) Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* **65**: 16-27.
- Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. (2009) *Free Radic Biol Med*. **47**:1239-1253.
- Burgess JK, Hotchkiss KA, Suter C, Dudman NP, Szollosi J, Chesterman CN, Chong BH, Hogg PJ (2000) Physical proximity and functional association of glycoprotein 1balpha and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem*. **275**:9758-9766

- Carol RJ, Takeda S, Linstead P, Durrant MC, Kakesova H, Derbyshire P, Drea S, Zarsky V, Dolan L. (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature*. **438**:1013-1016.
- Clarke S. (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem.*; **61**:355-86.
- Clempus RE, Griendling KK. (2006) Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* **71**:216-25.
- Clissold PM, Bicknell R. (2003) The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. *Bioessays*. **25**:603-611
- Custodis F, Eberl M, Kilter H, Böhm M, Laufs U. (2006) Association of RhoGDI α with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res.* **71**:342-351.
- de A Paes AM, Veríssimo-Filho S, Guimarães LL, Silva AC, Takiuti JT, Santos CX, Janiszewski M, Laurindo FR, Lopes LR. (2011) Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47phox: evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol.* **90**:799-810.
- Delom F, Mallet B, Carayon P, Lejeune PJ. (2001) Role of extracellular molecular chaperones in the folding of oxidized proteins. Refolding of colloidal thyroglobulin by protein disulfide isomerase and immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Biol Chem.* **276**:21337-21342.
- DerMardirossian C, Rocklin G, Seo JY, Bokoch GM. (2006) Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. *Mol Biol Cell.* **17**:4760-4768.
- Di-Poi N, Fauré J, Grizot S, Molnár G, Pick E, Dagher MC. (2001) Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex. *Biochemistry.* **40**:10014-1022.
- Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Görlach A. (2005) The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* **38**:616-630.
- Doran AC, Meller N, McNamara CA. (2008) Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **28**:812-819.
- Ellgaard L, Ruddock LW (2005) The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* **6**: 28-32.
- Essex DW, Chen K, Swiatkowska M. (1995) Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood.* **86**:2168-2173.
- Essex DW, Li M, Miller A, Feinman RD. (2001) Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation. *Biochemistry.* **40**:6070-6075.

- Faé KC, Diefenbach da Silva D, Bilate AM, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kiss MH, Silva CA, Cunha-Neto E, Kalil J, Guilherme L. (2008) PDIA3, HSPA5 and vimentin, proteins identified by 2-DE in the valvular tissue, are the target antigens of peripheral and heart infiltrating T cells from chronic rheumatic heart disease patients. *J. Autoimmun.* **31**:136-141.
- Fernandes DC, Manoel AH, Wosniak J Jr, Laurindo FR. (2009) Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. *Arch Biochem Biophys.* **484**:197-204.
- Fernandes DC, Wosniak J Jr, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, Santos CX (2007) 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.* **292**:C413-422.
- Ferrari DM, Soling HD (1999) The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J.* **339**; 1-10.
- Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. (2004) Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol.* **287**:C895-902.
- Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, Ryser HJ. (2002) Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem.* **277**:50579-50588.
- Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. (2011) The 'invisible hand': regulation of RHO_GTPases_by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**:493-504.
- Gerthoffer WT. (2007) Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res.* **100**:607-21
- Gorovoy M, Neamu R, Niu J, Vogel S, Predescu D, Miyoshi J, Takai Y, Kini V, Mehta D, Malik AB, Voyno-Yasenetskaya T. (2007) RhoGDI-1 modulation of the activity of monomeric RhoGTPase RhoA regulates endothelial barrier function in mouse lungs. *Circ Res.* **101**:50-58.
- Graven KK, Molvar C, Roncarati JS, Klahn BD, Lowrey S, Farber HW. (2002) Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **282**; L996-L1003.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000) NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* **86**:494-501.
- Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, Thorpe C, Fass D. (2006) Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:299-304.

-
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci.* **31**:455-464.
- Guthapfel R, Gueguen P, Quemeneur E. (1996) ATP binding and hydrolysis by the multifunctional protein disulfide isomerase. *J Biol Chem.* **271**:2663-6.
- Hall A (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* **33**:891-895
- Harter C, Wieland F (1996) The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochim Biophys Acta.* **1286**:75-93.
- Hatahet F, Ruddock LW. (2009) Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal.* **11**:2807-2850.
- Hordijk PL. (2006) Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res.* **98**:453-462.
- Hordijk PL. (2006) Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res.* **98**:453-462.
- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, Laurindo FR. (2005) Regulation of NADPH oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **280**:40813-40819
- Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* **8**:1865-1879.
- Kao YY, Gianni D, Bohl B, Taylor RM, Bokoch GM. (2008) Identification of a conserved Rac-binding site on NADPH oxidases supports a direct GTPase regulatory mechanism. *J Biol Chem.* **283**:12736-12746.
- Kaufmann BB, van Ourdenaarden A (2007) Stochastic gene expression: from single molecules to the proteome. *Curr Opin Genet Dev* **17**:107-112
- Khan OM, Ibrahim MX, Jonsson IM, Karlsson C, Liu M, Sjogren AK, Olofsson FJ, Brisslert M, Andersson S, Ohlsson C, Hultén LM, Bokarewa M, Bergo MO (2011) Geranylgeranyltransferase type I (GGTase-I) deficiency hyperactivates macrophages and induces erosive arthritis in mice. *J Clin Invest.* **121**:628-639.
- Klappa P, Hawkins HC, Freedman RB (1997) Interactions between protein disulphide isomerase and peptides. *Eur J Biochem.* **248**:37-42.
- Knezevic N, Roy A, Timblin B, Konstantoulaki M, Sharma T, Malik AB, Mehta D. (2007) GDI-1 phosphorylation switch at serine 96 induces RhoA activation and increased endothelial permeability. *Mol Cell Biol.* **27**:6323-63
- Kobayashi T, Robinson JM, Seguchi H (1998) Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J Cell Sci* **111**:81-91.

- Kost B. (2008) Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends Cell Biol.* **18**:119-127.
- Kuribayashi K, Nakamura K, Tanaka M, Sato T, Kato J, Sasaki K, Takimoto R, Kogawa K, Terui T, Takayama T, Onuma T, Matsunaga T, Niitsu Y. (2007) Essential role of protein kinase C zeta in transducing a motility signal induced by superoxide and a chemotactic peptide, fMLP. *J Cell Biol.* **176**:1049-1060.
- Lahav J, Gofer-Dadosh N, Luboshitz J, Hess O, Shaklai M (2000) Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Lett.* **475**:89-92
- Lahav J, Jurk K, Hess O, Barnes MJ, Farndale RW, Luboshitz J, Kehrel BE.(2002) Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood.* **100**:2472-2478.
- Lahav J, Wijnen EM, Hess O, Hamaia SW, Griffiths D, Makris M, Knight CG, Essex DW, Farndale RW (2003) Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin alpha2beta1. *Blood.* **102**:2085-2092.
- Lassègue B, Clempus RE. (2003) Vascular NADPH oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **285**:R277-297.
- Laurindo FR, de Souza HP, Pedro Mde A and Janiszewski M. (2002) Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol.* **352**: 432-454.
- Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Santo CX. (2008) Novel role of protein disulfide isomerase in the implication of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases *Antioxid Redox Signal.* **10**:1101-1113.
- Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP, Laurindo FR. (2003) Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**:2197-2202.
- Lévay M, Settleman J, Ligeti E. (2009) Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site. *Biochemistry.* **48**:8615-8623
- Li JM, Shah AM. (2003) ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* **14**:S221-226.
- Lin CY, Chin C H, Wu H H, Chen SH, Ho CW, Ko MT. (2008) Hubba: hub objects analyzer—a framework of interactome hubs identification for network biology. *Nucleic Acids Res.* **36**:W438-443.
- Linder S, Aepfelbacher M. (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* **13**:376-385.
- Linder S. (2009) Invadosomes at a glance. *J Cell Sci.* **122**:3009-3013.

- Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, Papaharalambus C, Lassègue B, Griendling KK. (2009) Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **105**:249-259
- Maere S, Heymans K, Kuiper M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**:3448-3449.
- Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, Peak D (1993) Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**:4112-4116.
- Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell.* **13**:4456-4469.
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol.* **7**:766-772.
- Mezghrani A, Fassio A, Benham A, Simmen T, Braakman I, Sitia R (2001) Manipulation of oxidative protein folding and PDI redox state in mammalian cells. *EMBO J.* **20**:6288-6296.
- Moissoglu K, McRoberts KS, Meier JA, Theodorescu D, Schwartz MA. (2009) Rho GDP dissociation inhibitor 2 suppresses metastasis via unconventional regulation of RhoGTPases. *Cancer Res.* **69**:2838-2844.
- Moores SL, Schaber MD, Mosser SD, Rands E, O'Hara MB, Garsky VM, Marshall MS, Pompliano DL, Gibbs JB. (1991) Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem.* **266**:14603-10.
- Murphy GA, Jillian SA, Michaelson D, Philips MR, D'Eustachio P, Rush MG. (2001) Signaling mediated by the closely related mammalian Rho family GTPases TC10 and Cdc42 suggests distinct functional pathways. *Cell Growth Differ.* **12**:157-167.
- Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D. (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol.* **5**:236-241.
- Noiva R (1999) Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* **10**: 481-493.
- Noiva R, Freedman RB, Lennarz WJ (1993) Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites. *J Biol Chem.* **268**: 19210-19217.
- Ohta Y, Hartwig JH, Stossel TP. (2006) FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol.* **8**:803-814.
- Orlandi PA. (1997) Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of the A subunit of cholera toxin in a human intestinal cell line. *Biol Chem.* **272**:4591-4599.

-
- Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A. (2008) Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol.* **87**:469-477
- Otsu M, Bertoli G, Fagioli C, Guerini-Rocco E, Nerini-Molteni S, Ruffato E, Sitia R (2006) Dynamic retention of Ero1alpha and Ero1beta in the endoplasmic reticulum by interactions with PDI and ERp44. *Antioxid Redox Signal.***8**:274-282.
- Papapostolou I, Patsoukis N, Georgiou CD (2004) The fluorescence detection of superoxide radical using hydroethidine could be complicated by the presence of heme proteins. *Anal Biochem* **332**: 290-298.
- Papapostolou I, Patsoukis N, Georgiou CD. (2004) The fluorescence detection of superoxide radical using hydroethidine could be complicated by the presence of heme proteins. *Anal Biochem.* **332**:290-298.
- Park B, Lee S, Kim E, Cho K, Riddell SR, Cho S, Ahn K (2006) Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* **127**:249-251
- Patsoukis N, Papapostolou I and Georgiou CD (2005) Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H₂O₂. *Anal Bioanal Chem* **381**:1065-1072.
- Patsoukis N, Papapostolou I, Georgiou CD. (2005) Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H₂O₂. *Anal Bioanal Chem.* **381**:1065-1072.
- Pechlivanis M, Kuhlmann J. (2006) Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring. *Biochim Biophys Acta.* **764**:1914-1931.
- Peshavariya H, Jiang F, Taylor CJ, Selemidis S, Chang CW, Dusting GJ. (2009) Translation-linked mRNA destabilization accompanying serum-induced Nox4 expression in human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* **11**:2399-2408.
- Plasticity of human protein disulfide isomerase: evidence for mobility around the X-linker region and its functional significance. *J. Biol. Chem.* **285**:26788-26797.
- Popescu NI, Lupu C, Lupu F. (2010) Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood* **116**:993-1001.
- Qiao J, Holian O, Lee BS, Huang F, Zhang J, Lum H. (2008) Phosphorylation of GTP dissociation inhibitor by PKA negatively regulates RhoA. *Am J Physiol Cell Physiol.* **295**:C1161-1168.
- Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B (2001) Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.***98**:9539-9544.

-
- Rao ASK, Hausman RE (1993) cDNA for R-cognin: homology with a multifunctional protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 2950-2954.
- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J*. **18**:578-585.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. **302**:1704-179.
- Rivals I, Personnaz L, Taing L, Potier M. (2007) Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics*. **23**:401-407.
- Robinson JM. (2008) Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol*. **130**:281-297.
- Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H. (2008) Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration *Biochim Biophys Acta*. **1783**:23-33.
- Sadok A, Pierres A, Dahan L, Prévôt C, Lehmann M, Kovacic H. (2009) NADPH oxidase 1 controls the persistence of directed cell migration by a Rho-dependent switch of alpha2/alpha3 integrins. *Mol Cell Biol*. **29**:3915-3928.
- Sambrook J, Russell II DW (2001). *In: Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. CSHL PRESS. Vol.1
- Sambrook J, Russell II DW (2001). *In: Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. CSHL PRESS. Vol.3
- Santos CX, Stolf BS, Takemoto PV, Amanso AM, Lopes LR, Souza EB, Goto H, Laurindo FR. (2009) Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J Leukoc Biol*. **86**:989-998.
- Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. (2009) Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. **11**:2409-2427.
- Schröder K, Helmcke I, Palfi K, Krause KH, Busse R, Brandes RP. (2007) Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **27**:1736-1743.
- Sekaki A, Gardes-Albert M, Ferradini C (1984) Aspects Physico-chimiques des Espèces Réactives de L'Oxigene. *Journées d'Etude sula Chimie des Raditions*. Societe Francaise de Chimie, Mont Sainte-Odile, France.
- Serve O, Kamiya Y, Maeno A, Nakano M, Murakami C, Sasakawa H, Yamaguchi Y, Harada T, Kurimoto E, Yagi-Utsumi M, Iguchi T, Inaba K, Kikuchi J, Asami O, Kajino T,

- Oka T, Nakasako M, Kato K. (2010) Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface. *J. Mol. Biol.* **396**:361-374.
- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* **91**:406-413.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang J T, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**:2498-2504.
- Shenouda SK, Alahari SK (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* **28**:369-378
- Slaughter BD, Das A, Schwartz JW, Rubinstein B, Li R. (2009) Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis. *Dev Cell.* **17**:823-835
- Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, Pereira AC, Junqueira ML, Krieger JE, da Luz PL, Augusto O, Laurindo FR. (2000) Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic Biol Med.* **28**:1232-1242
- Stockton JD, Merkert MC, Kellaris KV (2003). A complex of chaperones and disulfide isomerases occludes the cytosolic face of the translocation protein Sec61p and affects translocation of the prion protein. *Biochemistry* **42**:12821-12834.
- Sullivan DC, Huminiecki L, Moore JW, Boyle JJ, Poulsom R, Creamer D, Barker J, Bicknell R (2003) EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. *J Biol Chem* **278**:47079-47088.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T.(1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.***270**:296-299.
- Taboubi S, Milanini J, Delamarre E, Parat F, Garrouste F, Pommier G, Takasaki J, Hubaud JC, Kovacic H, Lehmann M.(2007) G alpha(q/11)-coupled P2Y₂ nucleotide receptor inhibits human keratinocyte spreading and migration.*FASEB J.* **21**:4047-58.
- Tanaka S, Uehara T, Nomura Y (2000) Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem.* **275**:10388-10393.
- Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML. (1995) Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**:20410–20416.
- Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML (1995) Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **270**:20410-2046

- Tian G, Kober F-X, Lewandrowski U, Sickmann A, Lennarz WJ, Schindelin H. (2008) The catalytic activity of protein disulfide isomerase requires a conformationally flexible molecule. *J. Biol. Chem.* **283**:33630–33640.
- Tian G, Xiang S, Noiva R, Lennarz WJ, Schindelin H (2006) The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell.* **124**:61-73.
- Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL.(2003) Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **30**:860-866.
- Tu BP, Weissman JS (2002) The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* **10**:983-994
- Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol.* **193**:154-163
- Ugolev Y, Berdichevsky Y, Weinbaum C, Pick E. (2008) Dissociation of Rac1(GDP)-RhoGDI complexes by the cooperative action of anionic liposomes containing PtdIns(3,4,5)P₃, Rac guanine nucleotide exchange factor, and GTP. *J Biol Chem.* **283**:22257-22271
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griending KK. (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **274**:22699-22704.
- Ushio-Fukai M. (2006) Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE.*
- van Helden SF, Oud MM, Joosten B, Peterse N, Figdor CG, van Leeuwen FN (2008) PGE₂-mediated podosome loss in dendritic cells is dependent on actomyosin contraction downstream of the RhoA-Rho-kinase axis. *J Cell Sci.* **121**:1096-1106.
- van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW.(2001) Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; **21**:300-311.
- Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. (2005) Cell migration at a glance. *J Cell Sci.* **118**:4917-4919. Review.
- Vidal M, Cusick ME, Barabási AL. (2011) Interactome_networks_and_human_disease. *Cell.* **144**:986-998.
- Walsh GM, Sheehan D, Kinsella A, Moran N, O'Neill S (2004) Redox modulation of integrin [correction of integin] alpha IIb beta 3 involves a novel allosteric regulation of its thiol isomerase activity. *Biochemistry* **43**:473-480.
- Wang C, Chen S, Wang X, Wang L, Wallis AK, Freedman RB, Wang CC. (2010)

- Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, Seshiah PN, Dechert MA, Gerthoffer WT, Griendling KK(2004) Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circ Res.***94**:1219-1226.
- Wilkinson B, Gilbert HF (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.***1699**:35-44.
- Wilkinson B, Gilbert HF. (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **1699**:35–44.
- Wright LP, Philips MR. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res.* **47**:883-891
- Wu Y, Moissoglu K, Wang H, Wang X, Frierson HF, Schwartz MA, Theodorescu D. (2009) Src phosphorylation of RhoGDI2 regulates its metastasis suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**:5807-5812.
- Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC. (2003) Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res.* **93**:1029-1033.
- Yang B, Radcliff C, Hughes D, Kelemen S, Rizzo V.(2010) p190Rho GTPase-Activating Protein Links the β 1 Integrin/Caveolin-1 Mechanosignaling Complex to RhoA and Actin Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Nov 4. [Epub ahead of print]
- Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM.(2010) NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **107**:18121-1826.

APÊNDICE

Tabela 2. Proteínas encontradas no cluaster 1.

GO number	p value	Corrected p value ^a	k ^b	f ^c	GO biological process category	Protein names
23034	1.4703E-18	2.5334E-15	43	1159	intracellular signaling pathway	_DHTRI MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IMAP3K7 ARHGAP4 AGT R1 CDC42 ARHGAP5 IRAC2 HMOX1 ARHGAP1 DUSP16 CEBPZ MSK1 MAP2K6 ARHGDI ARHGI ARHGD IB PLD2 ARHGEF7 PLXNB1 MAP2K 4 TP53 PRKCI IPK1 IMAPK11 IRACGAP1 VAV1 DDIT3 RND2 DUSP4 D USP3 CDKN1A DUSP2 RPS6K4 RND1 AMFR DUSP9 DUSP8 MAP3K1 3 DUSP6
35556	1.3838E-16	9.3546E-14	35	833	intracellular signal transduction	_MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IMAP3K7 ARHGAP4 AGT TR1 CD C42 ARHGAP5 IRAC2 HMOX1 DUSP16 ARHGAP1 ARHGDI MAP2K6 MSK1 ARHGDI IRHDI PLD2 ARHGEF7 MAP2K4 TP53 IPK1 IMAPK11 RND2 DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6K4 RND1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP6
7165	1.6288E-16	9.3546E-14	51	1878	signal transduction	_DHTRI IQGAP1 MAP3K7 ARHGAP4 AGT TR1 CDC42 GRP58 ARHGAP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 CASP1 MAP2K6 MSK1 IRHOH PLD2 PLX NB1 ARHGEF7 PLXNB2 TP53 IPK1 RND2 RND1 RASGRF1 TXN1AMF R MAP3K13 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IATF2 IR AC2 DUSP16 ARHGDI ARHGD IB MAP2K3 MAP2K4 NOX1 IMAPK11 IR ACGAP1 DUSP4 CDKN1A DUSP3 RPS6K4 DUSP2 DUSP9 DUSP8 D USP6 GRK1
6470	3.1875E-16	1.3730E-13	17	131	protein amino acid dephosphorylation	_PTPN7 PTPRH IP TPN5 PTPRR DUSP10 CDC25B DUSP5 DUSP4 DUS P3 DUSP2 DUSP1 DUSP14 DUSP16 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6
16311	1.6195E-15	5.4193E-13	17	144	dephosphorylation	_DHTRI IQGAP1 MAP3K7 ARHGAP4 AGT TR1 CDC42 GRP58 APPI ARHG AP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 CASP1 MAP2K6 MSK1 IRHOH PLD2 PLXNB1 ARHGEF7 PLXNB2 TP53 IPK1 RND2 RND1 RASGRF1 TXN1A MFR MAP3K13 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IATF 2 IRAC2 DUSP16 ARHGDI ARHGD IB MAP2K3 MAP2K4 NOX1 IMA PK1 IRACGAP1 DUSP4 CDKN1A DUSP3 DUSP2 RPS6K4 DUSP9 DU SP8 DUSP6 GRK1
23060	2.2017E-15	5.4193E-13	53	2157	signal transduction	_DHTRI IQGAP1 MAP3K7 ARHGAP4 AGT TR1 CDC42 GRP58 APPI ARHG AP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 CASP1 MAP2K6 MSK1 IRHOH PLD2 PLXNB1 ARHGEF7 PLXNB2 TP53 IPK1 RND2 RND1 RASGRF1 TXN1A MFR MAP3K13 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IATF 2 IRAC2 DUSP16 ARHGDI ARHGD IB MAP2K3 MAP2K4 NOX1 IMA PK1 IRACGAP1 DUSP4 CDKN1A DUSP3 DUSP2 RPS6K4 DUSP9 DU SP8 DUSP6 GRK1
23046	2.2017E-15	5.4193E-13	53	2157	signaling process	_DHTRI IQGAP1 MAP3K7 ARHGAP4 AGT TR1 CDC42 GRP58 APPI ARHG AP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 CASP1 MAP2K6 MSK1 IRHOH PLD2 PLXNB1 ARHGEF7 PLXNB2 TP53 IPK1 RND2 RND1 RASGRF1 TXN1A MFR MAP3K13 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IATF 2 IRAC2 DUSP16 ARHGDI ARHGD IB MAP2K3 MAP2K4 NOX1 IMA PK1 IRACGAP1 DUSP4 CDKN1A DUSP3 DUSP2 RPS6K4 DUSP9 DU SP8 DUSP6 GRK1
6801	3.6185E-15	7.7932E-13	10	26	superoxide metabolic process	_NOX4 CYBA NOX3 CYBB NOXO1 NCF2 NCF1 NOXA1 NOX1 ISOD2 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IMAP3K7 IAPP DUS P14 DUSP16 IEEF2K MAP2K6 MSK1 PTPN7 PTPRH IMAP2K3 PTPN5 IM AP2K4 PTPRR IPK1 IPK1 IMAPK11 CDK25B DUSP5 DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6K4 DUSP1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 D USP6 GRK1
6796	7.1911E-15	1.2390E-12	35	948	phosphate metabolic process	MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IMAP3K7 IAPP DUSP 14 DUSP16 IEEF2K MAP2K6 MSK1 PTPN7 PTPRH IMAP2K3 PTPN5 IMA P2K4 PTPRR IPK1 IPK1 IMAPK11 CDK25B DUSP5 DUSP4 DUSP3 C DKN1A DUSP2 RPS6K4 DUSP1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 DU SP6 GRK1
6793	7.1911E-15	1.2390E-12	35	948	phosphorus metabolic process	MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC IMAP3K7 IAPP DUSP 14 DUSP16 IEEF2K MAP2K6 MSK1 PTPN7 PTPRH IMAP2K3 PTPN5 IMA P2K4 PTPRR IPK1 IPK1 IMAPK11 CDK25B DUSP5 DUSP4 DUSP3 C DKN1A DUSP2 RPS6K4 DUSP1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 DU SP6 GRK1

42554	3.9404E-14	6.1721E-12	8	14	superoxide anion generation oxygen and reactive oxygen species metabolic process	NOX4 CYBA NOX3 CYBB NCF2 NCF1 NOX1 ISOD2 NOX4 CYBA NOX3 AGTR1 CYBB NOX0 NCF2 NCF1 NOX1 INOX1 IM POISD2
6800	1.1463E-13	1.6459E-11	12	65		PLD2 ARHGEF7 TP53 MAPKAPK3 MAPK11 MAPKAPK2 SRCR IND2 AR HGAP4 AGTR1 CDC42 CDKN1A ARHGAP5 RND1 RAR2 HMOX1 ARH GAP1 ARHGDIA RHODI ARHGDIB
7264	1.6860E-13	2.2346E-11	20	292	small GTPase mediated signal transduction	MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC MAP3K7 APP DUSP 14 DUSP16 EEF2K TGM6 MAP2K6 MSK1 PTPN7 PTPRH MAP2K3 PTP N5 MAP2K4 PTPRR PRKCI PKN1 MAPK11 CDC25B DUSP5 DUSP4 DU SP3 CDKN1A DUSP2 RPS6KA4 DUSP1 AMFR DUSP9 DUSP8 MAP3K1 3 DUSP7 DUSP6 GRK1
43687	1.3060E-12	1.6073E-10	37	1264	post-translational protein modification	DHTR DUSP10 MAPKAPK3 MAPKAPK2 SRC ARHGAP4 MAP3K7 CDC 42 AGTR1 APP ARHGAP5 RAR2 HMOX1 ARHGAP1 DUSP16 CEBPZ IM SK1 MAP2K6 ARHGDIA RHODI ARHGDIB PLD2 HD ARHGEF7 PLXNB1 MAP2K4 TP53 PRKCI PKN1 MAPK11 CD40 FRACGAP1 VAV1 DDIT3 RN D2 DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6KA4 RND1 AMFR HSPD1 DU SP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP6 GRK1
23033	1.6012E-12	1.8392E-10	48	2101	signaling pathway	DHTR IQGAP1 MAP3K7 ARHGAP4 AGTR1 CDC42 GRP58 APP ARHG AP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 CASP1 MAP2K6 MSK1 RHODI PLD2 PLXNB1 ARHGEF7 PLXNB2 PRKCI TP53 PKN1 CD40 DDIT3 RND2 RN D1 RASGRF1 TXN AMFR MAP3K13 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC ATF2 RAC2 DUSP16 CEBPZ ARHGDIA ARHGDIB HD MAP2K3 INOX1 MAP2K4 MAPK11 FRACGAP1 VAV1 DUSP4 DUSP3 CDK N1A DUSP2 RPS6KA4 HSPD1 DUSP9 DUSP8 DUSP6 GRK1
23052	3.7685E-12	4.0582E-10	59	3132	signaling	MEF2C DHTR PDI2 MMF9 IQGAP1 MAP3K7 ARHGAP4 AGTR1 CDC4 2 MAX GRP58 APP CASP3 ARHGAP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 C ASP1 MSK1 MAP2K6 RHODI PLD2 INOX01 ARHGEF7 PLXNB1 VL2 PL XNB2 INOX1 TP53 PRKCI PKN1 CD40 LDLRAP1 DDIT3 CTNNB1 RN D2 G6P D RND1 RASGRF1 TXN WASL AMFR MAP3K13 LCP1 MAPKAP K5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 PRDM16 SRC ATF2 TTP1 VCAM 1 ATN1 RAR2 ELK4 DUSP16 CEBPZ HOXA10 HOXA9 ARHGDIA ARHG DIB INOX4 HD MAP2K3 INOX1 MAP2K4 MAPK11 FRACGAP1 VAV1 ISOD 2 CDC25B DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6KA4 DUSP1 MP PB X1 HSPD1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 GRK1
50794	8.0549E-12	8.1639E-10	86	6222	regulation of cellular process	DHTR MEF2C MMF9 PRDM16 ATF2 TTP1 VCAM1 MAP3K7 ARHGAP 4 CDC42 AGTR1 CASP3 APP GRP58 ARHGAP5 RAR2 HMOX1 CEBPZ CASP1 MAP2K6 ARHGDIA PLD2 HD ARHGEF7 PLXNB1 PLXNB2 MAP 2K3 INOX1 TP53 PRKCI CD40 LDLRAP1 VAV1 DDIT3 ISOD2 CDC25B C TNNB1 DUSP3 CDKN1A DUSP1 RASGRF1 PBX1 HSPD1 DUSP6 GR K1
48522	2.1847E-11	2.0912E-9	45	2005	positive regulation of cellular process	MEF2C DHTR PDI2 MMF9 IQGAP1 MAP3K7 ARHGAP4 AGTR1 CDC4 2 MAX GRP58 APP CASP3 ARHGAP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 C ASP1 MSK1 MAP2K6 RHODI PLD2 INOX01 ARHGEF7 PLXNB1 VL2 PL XNB2 INOX1 TP53 PRKCI PKN1 CD40 WASL DLRAP1 DDIT3 CTNNB1 P1 RND2 G6P D RND1 RASGRF1 TXN WASL AMFR MAP3K13 LCP1 IM PKAPK5 KEL1 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 PRDM16 SRC ATF2 T TP1 VCAM1 ATN1 RAR2 ELK4 DUSP16 CEBPZ HOXA10 HOXA9 ARH GDIA ARHGDIB INOX4 INOX3 HD MAP2K3 INOX1 MAP2K4 MAPK11 RA CGAP1 VAV1 ISOD2 CDC25B CYBA DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 IR PS6KA4 DUSP1 MP PBX1 HSPD1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 GR K1
65007	4.9297E-11	4.4705E-9	90	6941	biological regulation	

6464	7.5439E-11	6.4991E-9	38	1524	protein modification process	MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC MAP3K7 APP DUSP14 DUSP16 EEF2K TG MAP2K6 MSK1 PTPN7 PTPRH MAP2K3 PTP N5 MAP2K4 PTPRR PRKC IPKN1 MAPK11 CDC25B DUSP5 DUSP4 DU SP3 CDKN1A DUSP2 RPS6KA4 G6PD DUSP1 AMFR DUSP9 DUSP8 M AP3K13 DUSP7 DUSP6 GRK1
23014	8.3790E-11	6.5623E-9	19	364	signal transmission via phosphorylation event	MAP2K4 DUSP10 IPKN1 MAPK11 MAPKAPK2 SRC MAP3K7 DUSP4 DU SP3 DUSP2 RPS6KA4 HMOX1 DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 MAP 2K6 MSK1 DUSP6
7243	8.3790E-11	6.5623E-9	19	364	intracellular protein kinase cascade	MAP2K4 DUSP10 IPKN1 MAPK11 MAPKAPK2 SRC MAP3K7 DUSP4 DU SP3 DUSP2 RPS6KA4 HMOX1 DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 MAP 2K6 MSK1 DUSP6
7265	9.1796E-11	6.8767E-9	12	112	Ras protein signal transduction	ARHGAP4 JAGTR1 CDKN1A ARHGAP5 ARHGAP1 TP53 MAPKAPK3 M APK11 MAPKAPK2 ARHGDI SRC ARHGDI B
48518	1.5562E-10	1.1172E-8	46	2209	positive regulation of biological process	DHTR MEF2C IMMP9 PRDM16 SRC ATF2 TMP1 VCAM1 ARHGAP4 MA P3K7 CDC42 AGTR1 CASP3 APP GRP58 ARHGAP5 IRAC2 HMOX1 CE BPZ CASP1 MAP2K6 ARHGDI PLD2 HD ARHGFE7 PLXNB1 PLXNB2 MAP2K3 NOX1 TP53 PRKC CD40 DLRAP1 VAV1 DDIT3 SOD2 CDC2 5B CTNBP1 DUSP3 CDKN1A DUSP1 RASGRF1 PBX1 HSPD1 DUSP 6 GRK1
50789	2.1740E-10	1.4984E-8	86	6552	regulation of biological process	MEF2C DHTR DIA2 IMMP9 JQGA P1 MAP3K7 ARHGAP4 JAGTR1 CDC4 2 MAX GRP58 APP CASP3 ARHGAP5 HMOX1 ARHGAP1 CNTNAP1 C ASP1 MSK1 MAP2K6 RHOG PLD2 NOX1 ARHGFE7 PLXNB1 VIL2 PL XNB2 NOXA1 TP53 PRKC IPKN1 CD40 DLRAP1 DDIT3 CTNBP1 RN D2 G6PD IRND1 RASGRF1 TXN1WASL AMFR MAP3K13 LCP1 MAPKAP K5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 PRDM16 SRC ATF2 TMP1 VCAM 1 ATN1 IRAC2 ELK4 DUSP16 CEBPZ HOXA10 HOXA9 ARHGDI ARHG D IB NOX4 HD MAP2K3 NOX1 MAP2K4 MAPK11 IRACGAP1 VAV1 SOD 2 CDC25B DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6KA4 DUSP1 MP PB X1 HSPD1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 GRK1
165	2.7444E-10	1.8187E-8	14	186	MAPKKK cascade	MAP2K4 DUSP10 IPKN1 MAPKAPK2 MAP3K7 DUSP4 DUSP3 DUSP2 D USP16 DUSP9 MAP3K13 DUSP8 MAP2K6 DUSP6
43412	3.4436E-10	2.1975E-8	38	1605	macromolecule modification	MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC MAP3K7 APP DUSP 14 DUSP16 EEF2K TG MAP2K6 MSK1 PTPN7 PTPRH MAP2K3 PTP N5 MAP2K4 PTPRR PRKC IPKN1 MAPK11 CDC25B DUSP5 DUSP4 DU SP3 CDKN1A DUSP2 RPS6KA4 G6PD DUSP1 AMFR DUSP9 DUSP8 M AP3K13 DUSP7 DUSP6 GRK1
65009	7.6423E-10	4.7028E-8	30	1063	regulation of molecular function	DHTR ATF2 MAP3K7 AGTR1 APP CASP3 HMOX1 DUSP16 CEBPZ MA P2K6 MAP2K3 TP53 IPKN1 VAV1 DLRAP1 DDIT3 SOD2 CTNBP1 CD KN1A DUSP3 DUSP2 DUSP1 RASGRF1 PBX1 HSPD1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 DUSP6
43065	2.2779E-9	1.3534E-7	19	443	positive regulation of apoptosis	HD ARHGFE7 IMMP9 TP53 VAV1 DDIT3 ARHGAP4 GRP58 APP CDKN1 A CASP3 DUSP1 RASGRF1 HMOX1 CEBPZ HSPD1 CASP1 MAP2K6 D USP6
43068	2.5461E-9	1.4623E-7	19	446	positive regulation of programmed cell death	HD ARHGFE7 IMMP9 TP53 VAV1 DDIT3 ARHGAP4 GRP58 APP CDKN1 A CASP3 DUSP1 RASGRF1 HMOX1 CEBPZ HSPD1 CASP1 MAP2K6 D USP6
42981	2.7191E-9	1.5113E-7	26	853	regulation of apoptosis	MEF2C IMMP9 ATF2 MAP3K7 ARHGAP4 APP GRP58 CASP3 HMOX1 C EBPZ CASP1 ARHGDI MAP2K6 HD ARHGFE7 PRKC ITP53 VAV1 DDI T3 SOD2 CDKN1A DUSP1 RASGRF1 PBX1 HSPD1 DUSP6

10942	2.9492E-9	1.5880E-7	19	450	positive regulation of cell death	HDIARHGFE7 IMMP9 TP53 VAV1 DDIT3 ARHGAP4 GRP58 ARPP CDKN1A CASP3 DUSP1 IRASGRF1 HMOX1 CEBPZ HSPD1 CASP1 MAP2K6 DUSP6
43067	3.3070E-9	1.7267E-7	26	861	regulation of programmed cell death	MEF2C IMMP9 ATF2 MAP3K7 ARHGAP4 APPI GRP58 CASP3 HMOX1 CEBPZ CASP1 ARHGDI MAP2K6 HDIARHGFE7 PRKCJ TP53 VAV1 DDIT3 SOD2 CDKN1A DUSP1 IRASGRF1 IMPOI HSPD1 DUSP6
10941	3.9173E-9	1.9851E-7	26	868	regulation of cell death	MEF2C IMMP9 ATF2 MAP3K7 ARHGAP4 APPI GRP58 CASP3 HMOX1 CEBPZ CASP1 ARHGDI MAP2K6 HDIARHGFE7 PRKCJ TP53 VAV1 DDIT3 SOD2 CDKN1A DUSP1 IRASGRF1 IMPOI HSPD1 DUSP6
50896	6.6764E-9	3.2867E-7	58	3634	response to stimulus	DHTR PDI A2 IMMP2 AGTR1 IMAX APPI CASP3 HMOX1 CASP1 MAP2K6 MSK1 PLD2 RRGR NCF2 NCF1 NCF4 PRKCJ TP53 PKN1 IF144 CD40 WAS DDIT3 CTN NBP1 G6PD IRASGRF1 IGHD AMFR WASL MAP3K13 LCP1 MAPKAP3 DUSP10 SRRC ATF2 VCAM1 IRAC2 CEBPZ ARHGDI B NOX4 INOX3 HDI MAP2K4 INOX1 MAPK11 VAV1 SOD2 CYBA DUSP4 CYBB CDKN1A DUSP1 ANXA11 IMPOI HSPD1 DUSP9 DUSP6 GRK1
9987	1.0011E-8	4.7912E-7	102	9366	cellular process	DHTR MEF2C IMMP9 MAP3K7 ACTG1 AGTR1 APPI GRP58 MAP2K6 PLD2 NCF2 PLXNB1 NCF1 NCF4 PTPRH PLXNB2 INOX1 PTPRR CD40 DDIT3 RND1 FCC2 IRASGRF1 AMFR MAPKAP3 IMAPKAP3 DUSP10 MAPKAP2 SRC TIMP1 ATF2 IRAC2 ATN1 DUSP14 DUSP16 IDH1 ARHGDI ARHGDI B PTN7 HDIKIF3A PTPN5 MAP2K3 MAP2K4 VAV1 CDKN1A HSPD1 GRK1 PDI A2 ARHGAP4 CDC42 MAX CASP3 SRP ARHGAP5 HMOX1 EEF2 K CNTNAP1 CASP1 MSK1 IRHO HRGR INOX1 ARHGFE7 VIL2 PRKCJ TP53 PKN1 LDLRAP1 WAS G6PD TXN1 WASL MAP3K13 LCP1 PRDM16 VCAM1 CEBPZ CYBASC3 TGM6 INOX4 INOX3 INOX1 MAPK11 IRACGAP1 CDC25B SOD2 DUSP5 DUSP4 CYBA CYBB DUSP3 RPS6K4 DUSP2 DUSP1 ANXA11 IMPOI PBX1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6
188	1.1660E-8	5.4297E-7	6	21	inactivation of MAPK activity	DUSP3 DUSP2 DUSP16 DUSP9 DUSP8 DUSP6
6950	2.1120E-8	9.5762E-7	37	1774	response to stress	PDI A2 IMAPKAP3 DUSP10 IMMP2 VCAM1 IMAX CASP3 HMOX1 CEBPZ CASP1 MAP2K6 MSK1 INOX4 PLD2 NCF2 NCF1 INOX1 MAP2K4 TP53 PKN1 MAPK11 CD40 WAS DDIT3 SOD2 CTN NBP1 CYBA CYBB CDKN1A G6PD DUSP1 IMPOI HSPD1 AMFR DUSP9 MAP3K13 DUSP6
48731	3.6644E-8	1.6189E-6	44	2423	system development	DHTR MEF2C IMMP9 PRDM16 IMMP2 ATF2 TIMP1 VCAM1 MAP3K7 AGTR1 CDC42 MAX CASP3 APPI ATN1 HMOX1 CEBPZ HOXA10 TGM6 ARHGDI ARHO INOX4 INOX3 PLD2 HDIARHGFE7 PLXNB1 VIL2 PLXNB2 INOX1 TP53 PRKCJ PTPRR IRACGAP1 WAS DDIT3 SOD2 CDKN1A G6PD RND1 IRASGRF1 PBX1 HSPD1 GRK1
45730	3.7665E-8	1.6224E-6	5	13	respiratory burst	CYBA CYBB NCF2 NCF1 INOX1
43407	3.8671E-8	1.6251E-6	7	42	negative regulation of MAP kinase activity	DUSP3 DUSP2 DUSP16 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6
48856	6.6237E-8	2.7173E-6	46	2657	anatomical structure development	DHTR MEF2C IMMP9 KEL PRDM16 IMMP2 ATF2 TIMP1 VCAM1 MAP3K7 IMAX AGTR1 CDC42 CASP3 APPI ATN1 HMOX1 CEBPZ HOXA10 TGM6 CASP1 ARHGDI ARHO INOX4 INOX3 PLD2 HDIARHGFE7 PLXNB1 VIL2 PLXNB2 INOX1 TP53 PRKCJ PTPRR IRACGAP1 WAS DDIT3 SOD2 CDKN1A G6PD RND1 IRASGRF1 PBX1 HSPD1 GRK1
43549	6.8488E-8	2.7443E-6	16	383	regulation of kinase activity	MAP2K3 PKN1 MAP3K7 APPI CDKN1A CASP3 DUSP3 DUSP2 DUSP1 DUSP16 DUSP9 IMAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6
6469	1.0576E-7	4.1413E-6	9	100	negative regulation of protein kinase activity	DUSP3 CASP3 CDKN1A DUSP2 DUSP16 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6

44267	1.1151E-7	4.2441E-6	40	2151	cellular protein metabolic process	PDIA2 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC MAP3K7 APP DUSP14 DUSP16 EEF2K TGM6 MAP2K6 MSK1 PTPN7 PTPRH MAP2K3 PTPN5 MAP2K4 PTPRR PRKC IPKN1 MAPK11 CDC25B DUSP5 DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6K4 G6PD DUSP1 AMFR HSPD1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 DUSP6 GRK1
19538	1.1331E-7	4.2441E-6	45	2609	protein metabolic process	PDIA2 MAPKAPK5 KEL1 MMFP9 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 IMMP2 SFC MAP3K7 APPI CAS3 DUSP14 DUSP16 EEF2K TGM6 CAS3 IMS K1 MAP2K6 PTPN7 PTPRH MAP2K3 PTPN5 MAP2K4 PRKC PTPRR IPKN1 MAPK11 CDC25B DUSP5 DUSP4 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6K4 G6PD DUSP1 AMFR HSPD1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 DUSP6 GRK1
51338	1.1603E-7	4.2535E-6	16	398	regulation of transferase activity	MAP2K3 PKN1 MAP3K7 APP CDKN1A CAS3 DUSP9 DUSP3 DUSP2 DUSP1 DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6
33673	1.6157E-7	5.7997E-6	9	105	negative regulation of kinase activity	DUSP3 CAS3 CDKN1A DUSP2 DUSP16 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP
50790	1.8112E-7	6.3686E-6	24	907	regulation of catalytic activity	DHTR MAP2K3 TP53 IPKN1 VAV1 SOD2 ATF2 MAP3K7 AGTR1 DUSP3 APP CDKN1A CAS3 DUSP2 DUSP1 DUSP16 HSPD1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6
45859	2.5916E-7	8.6478E-6	15	369	regulation of protein kinase activity	MAP2K3 PKN1 MAP3K7 APP CDKN1A CAS3 DUSP9 DUSP3 DUSP2 DUSP16 DUSP9 MAP3K13 DUSP8 DUSP7 MAP2K6 DUSP6
7275	2.6028E-7	8.6478E-6	48	2972	multicellular organismal development	DHTR IMEF2C MMFP9 KEL1 PRDM16 MMFP2 ATF2 TIMP1 VCAM1 MAP3K7 MAX CDC42 AGTR1 CAS3 APPI ATN1 HMOX1 CEBPZ HOXA10 HOXA9 ITGM6 ARHGDIAR HOH ARHGDIAR INOX3 PLD2 HD ARHGFEF7 PLXNB1 VIL2 PLXNB2 NOX1 TP53 PRKC PTPRR IRACGAP1 WAS DIT3 SOD2 CTN NBP1 CDKN1A G6PD RNND1 IRASGRF1 PBX1 HSPD1 GRK1
51348	2.6099E-7	8.6478E-6	9	111	negative regulation of transferase activity	6
35466	2.9750E-7	9.6717E-6	25	1003	regulation of signaling pathway	DHTR PRDM16 IQGAP1 MAP3K7 APP HMOX1 DUSP16 CAS3 MAP2K6 6 RHQ H PLD2 ARHGFEF7 TP53 IPKN1 CD40 VAV1 CTN NBP1 DUSP3 DUSP2 IRASGRF1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 GRK1 DUSP6
44092	3.1863E-7	1.0167E-5	15	375	negative regulation of molecular function	TP53 DIT3 CTN NBP1 CDKN1A CAS3 DUSP3 DUSP2 HMOX1 DUSP16 CEBPZ PBX1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6
43405	3.9242E-7	1.2293E-5	10	152	regulation of MAP kinase activity	MAP3K7 DUSP3 DUSP2 DUSP16 PKN1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 MAP2K6 6 DUSP6
2376	4.0708E-7	1.2525E-5	24	948	immune system process	NCF2 NCF1 MMFP9 NCF4 TP53 CD40 WAS VAV1 SOD2 TIMP1 VCAM1 MAP3K7 CYBA CDC42 CYBB CAS3 G6PD IGHD PBX1 HSPD1 CAS3 ILCP1 RHQ ARHGDIAR
32502	5.0166E-7	1.5164E-5	50	3235	developmental process	MEF2C DHTR MMFP9 MMFP2 MAP3K7 AGTR1 CDC42 MAX APPI CAS3 HMOX1 CAS3 IRHO H PLD2 PLXNB1 ARHGFEF7 PLXNB2 VIL2 PTPRR PRKC ITP53 WAS DIT3 CTN NBP1 RNND1 G6PD IRASGRF1 KEL1 PRD M16 TIMP1 ATF2 VCAM1 ATN1 HOXA10 CEBPZ HOXA9 ITGM6 ARHGDIAR ARHGDIAR INOX3 HD INOX1 IRACGAP1 SOD2 CDKN1A PBX1 HSPD1 DUSP6 GRK1
44237	6.1524E-7	1.8277E-5	66	4987	cellular metabolic process	DHTR PDIA2 MAP3K7 AGTR1 MAX APPI CAS3 HMOX1 EEF2K IMAP2 K6 MSK1 PLD2 NCF2 NOX1 NCF1 PTPRH INOXA1 PTPRR PRKC ITP53 IPKN1 DIT3 G6PD TXN1 AMFR MAP3K13 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC ATF2 ATN1 DUSP14 DUSP16 CEBPZ DIT3 CYBASC3 ITGM6 PTPN7 INOX4 INOX3 HD IMAP2K3 PTPN5 NOX1 MAP2K4 MAPK11 SOD2 CDC25B DUSP5 CYBA DUSP4 DUSP3 CYBB CDKN1A DUSP2 RPS6K4 DUSP1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 GRK1
22008	7.1368E-7	2.0842E-5	19	637	neurogenesis	PRDM16 SOD2 ATF2 AP PRND1 ATN1 IRASGRF1 PBX1 ARHGDIAR GRK1

9966	7.9144E-7	2.2540E-5	21	773	regulation of signal transduction	DHTR PLD2 ARHGFE7 PKN1 CD40 VAV1 IQGAP1 MAP3K7 DUSP9 AP PIDUS2 IRASGRF1 HMOX1 DUSP16 DUSP9 CASP1 DUSP8 DUSP7 MAP AP2K6 DUSP6 RH0H
42325	7.9797E-7	2.2540E-5	17	518	regulation of phosphorylation	DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6 GRK1
7266	8.4761E-7	2.3555E-5	6	41	Rho protein signal transduction	ARHGAP4 JAGTR1 ARHGAP5 ARHGAP1 ARHGDI ARHGDI B DHTR PLD2 ARHGFE7 PKN1 CD40 VAV1 IQGAP1 MAP3K7 DUSP9 AP PIDUS2 IRASGRF1 HMOX1 DUSP16 DUSP9 CASP1 DUSP8 DUSP7 MAP AP2K6 DUSP6 RH0H
23051	8.7855E-7	2.4028E-5	21	778	regulation of signaling process	PLD2 DUSP1 HMOX1 CEBPZ IMPO DDIT3 SOD2
42542	9.5236E-7	2.5639E-5	7	66	response to hydrogen peroxide	DHTR PDI2 KEL SRCT TMP1 JAGTR1 APPI GRP58 CASP3 ARHGAP6 R AC2 HMOX1 CEBPZ INOX4 INOX3 HD VIL2 INOX1 TP53 CD40 DLR AP1 WAS DDIT3 SOD2 CTN NBP1 CYBA CDKN1A G6PD IRASGRF1 TXNH SPD1
65008	9.9352E-7	2.6336E-5	31	1543	regulation of biological quality	DHTR PDI2 JMP2 SRC VCAM1 JAGTR1 MAX CASP3 IRAC2 HMOX1 C EBPZ CASP1 MAP2K6 MSK1 PLD2 HD PRKC ITP53 DDIT3 SOD2 DUS P4 CDKN1A G6PD DUSP1 ANXA1 IMPO HSPD1 AMFR DUSP6 GRK1
42221	1.0688E-6	2.7903E-5	30	1466	response to chemical stimulus	DHTR PRDM16 IQGAP1 ATF2 MAP3K7 APP HMOX1 DUSP16 CASP1 MAP2K6 RH0H PLD2 HD ARHGFE7 TP53 PKN1 CD40 VAV1 CTN NBP 1 DUSP3 DUSP2 IRASGRF1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 MAP2K3 PKN1 MAP3K7 APPI CDKN1A CASP3 DUSP3 DUSP2 DUSP1 DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6 GRK1
10646	1.1424E-6	2.9380E-5	26	1154	regulation of cell communication	DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6 GRK1
51174	1.4870E-6	3.7131E-5	17	542	regulation of phosphorus metabolic process	DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6 GRK1
19220	1.4870E-6	3.7131E-5	17	542	regulation of phosphate metabolic process	DUSP16 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 MAP2K6 DUSP6 GRK1
30154	1.7338E-6	4.2675E-5	32	1668	cell differentiation	DHTR MEF2C IMMP9 PRDM16 TMP1 ATF2 VCAM1 CDCC42 APPC ASP 3 ATN1 CASP1 ARHGDI ARHO INOX4 PLD2 HD PLXNB1 ARHGFE7 P LXNB2 VIL2 PTPRR1 PRKC ITP53 IRACGAP1 SOD2 RND1 G6PD IRASG R IPBX1 DUSP6 GRK1
42743	1.7709E-6	4.2718E-5	5	26	hydrogen peroxide metabolic process	CYBA CYBB INOX1 IMPO SOD2
8152	1.7851E-6	4.2718E-5	73	5956	metabolic process	DHTR PDI2 JMP9 IMMP2 MAP3K7 JAGTR1 MAX APP CASP3 HMOX1 EEF2K CASP1 MAP2K6 MSK1 PLD2 NCF2 INOX1 NCF1 NCF4 TPRH INOX1 PTPRR1 PRKC ITP53 PKN1 DLR AP1 DDIT3 G6PD TXN1 AMFR1 MAP3K13 MAPKAPK5 KEL MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRCT ATF 2 ATN1 DUSP14 DUSP16 CEBPZ IDH1 CYBASC3 TGM6 INOX4 PTPN7 NOX3 HD MAP2K3 PTPN5 INOX1 MAP2K4 MAPK11 SOD2 CDC28B DU SP5 CYBA DUSP4 DUSP3 CYBB CDKN1A DUSP2 IRPS6KA4 DUSP1 IM PO PBX1 HSPD1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 GRK1
8219	2.7768E-6	6.5541E-5	19	698	cell death	P4 MAX CASP3 APP ATN1 IRASGRF1 HMOX1 HSPD1 CASP1 GRK1
16265	3.0822E-6	7.1765E-5	19	703	death	P4 MAX CASP3 APP ATN1 IRASGRF1 HMOX1 HSPD1 CASP1 GRK1
48869	3.1267E-6	7.1831E-5	32	1714	cellular developmental process	DHTR MEF2C IMMP9 PRDM16 TMP1 ATF2 VCAM1 CDCC42 APPC ASP 3 ATN1 CASP1 ARHGDI ARHO INOX4 PLD2 HD PLXNB1 ARHGFE7 P LXNB2 VIL2 PTPRR1 PRKC ITP53 IRACGAP1 SOD2 RND1 G6PD IRASG R IPBX1 DUSP6 GRK1
6468	4.7995E-6	1.0881E-4	18	657	protein amino acid phosphorylation	MAPKAPK5 MAP2K3 MAP2K4 PRKGI MAPKAPK3 PKN1 MAPK11 MAP KAP2 SRC MAP3K7 APP CDKN1A IRPS6KA4 EEF2K MAP3K13 MAP2 K6 MSK1 GRK1
35335	5.0068E-6	1.1203E-4	3	5	peptidyl-lysine dephosphorylation	DUSP3 DUSP7 DUSP6
48699	5.1076E-6	1.1282E-4	17	594	generation of neurons	PLD2 HD PLXNB1 PLXNB2 TP53 PTPRR1 PRKC IRACGAP1 SOD2 ATF 2 APP RND1 ATN1 IRASGRF1 IPBX1 ARHGDI GRK1
302	6.2195E-6	1.3565E-4	7	87	response to reactive oxygen species	PLD2 DUSP1 HMOX1 CEBPZ IMPO DDIT3 SOD2

33554	8.9857E-6	1.9353E-4	17	620	cellular response to stress	MAP2K4 DUSP10 TP53 PKN1 DDIT3 SOD2 MAX CDKN1A ICASP3 G6P DHMOX1 CEBPZ IMPO AMFR DUSP9 MAP3K13 MAP2K6
43066	1.0098E-5	2.1480E-4	13	376	negative regulation of apoptosis	MEF2C HD PRKCI TP53 ATF2 SOD2 MAP3K7 CDKN1A ICASP3 HMOX1 IMPO HSPD1 ARHGDI
16043	1.0929E-5	2.2964E-4	40	2563	cellular component organization	MMP9 SRC ATF2 ARHGAP4 AGTR1 CDC42 MAX APP ICASP3 RAC2 HMOX1 MSK1 ARHGDI INOX4 PLD2 HDJ KIF3A VIL2 INOX1 TP53 PRKCI PKN1 CD40 RACGAP1 WAS LDLRAP1 VAV1 SOD2 CDC25B CYBA RN D1 RCC2 RASGRF1 ANXA1 IMPO WASL AMFR HSPD1 LCP1 GRK1
43069	1.1627E-5	2.4136E-4	13	381	negative regulation of programmed cell death	MEF2C HD PRKCI TP53 ATF2 SOD2 MAP3K7 CDKN1A ICASP3 HMOX1 IMPO HSPD1 ARHGDI
6915	1.1876E-5	2.4206E-4	16	567	apoptosis	MEF2C HD ARHGFEF PDIA2 PTPRH TP53 VAV1 SOD2 ARHGAP4 MAX APP ICASP3 RASGRF1 HSPD1 ICASP1 GRK1
51130	1.1942E-5	2.4206E-4	10	222	positive regulation of cellular component organization	CDC42 PLD2 PLXNB1 PLXNB2 NOX1 TP53 PRKCI LDLRAP1 ARHGDI SR
2694	1.3890E-5	2.7829E-4	9	179	regulation of leukocyte activation	VCAM1 MAP3K7 PLD2 DUSP3 ICASP3 CDKN1A HMOX1 HSPD1 CD40 MEF2C HD PRKCI TP53 ATF2 SOD2 MAP3K7 CDKN1A ICASP3 HMOX1 IMPO HSPD1 ARHGDI
60548	1.4499E-5	2.8714E-4	13	389	negative regulation of cell death	MEF2C HD ARHGFEF PDIA2 PTPRH TP53 VAV1 SOD2 ARHGAP4 MAX APP ICASP3 RASGRF1 HSPD1 ICASP1 GRK1
12501	1.4749E-5	2.8877E-4	16	577	programmed cell death	XIAPP ICASP3 RASGRF1 HSPD1 ICASP1 GRK1
3013	1.5182E-5	2.9066E-4	9	181	circulatory system process	CTNBP1 CYBA AGTR1 HMOX1 KEL INOX1 SRC MAP2K6 SOD2
8015	1.5182E-5	2.9066E-4	9	181	blood circulation	CTNBP1 CYBA AGTR1 HMOX1 KEL INOX1 SRC MAP2K6 SOD2
43620	1.7319E-5	3.2086E-4	3	7	regulation of transcription in response to stress	HMOX1 CEBPZ DDIT3
60263	1.7319E-5	3.2086E-4	3	7	regulation of respiratory burst	NOXO1 IRAC2 INOXA1
10310	1.7319E-5	3.2086E-4	3	7	regulation of hydrogen peroxide metabolic process	NOXO1 IRAC2 INOXA1
30036	1.9561E-5	3.5854E-4	10	235	actin cytoskeleton organization	CDC42 RND1 IRAC2 VIL2 PRKCI WAS IRACGAP1 WAS LCP1 ARHGDI DHT MEF2C IMMP9 IMMP2 TIMP1 ATF2 MAP3K7 VCAW1 AGTR1 CDC42 MAX APP ICASP3 HMOX1 CEBPZ TG6 FHO INOX4 INOX3 HD VIL2 INOX1 PRKCI TP53 WAS DDIT3 SOD2 CDKN1A G6PD PBX1 GRK1 PLD2 CDKN1A HD DUSP1 HMOX1 ANXA1 CEBPZ IMPO DDIT3 SOD2 NOX4 VCAM1 CDKN1A HD CEBPZ TP53 DDIT3 SOD2
48513	2.2375E-5	4.0581E-4	31	1793	organ development	VCAM1 MAP3K7 PLD2 DUSP3 ICASP3 CDKN1A HMOX1 HSPD1 CD40 CYBA CYBB SOD2
10035	2.2619E-5	4.0596E-4	10	239	response to inorganic substance	B
7568	2.2935E-5	4.0740E-4	8	146	aging	DHT PDIA2 MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRC ATF2 MAP3K7 MAX ICASP3 APP DUSP14 DUSP16 CEBPZ EEF2K TG6 IMS K1 MAP2K6 PTPN7 PLD2 PTPRH MAP2K3 PTPN5 MAP2K4 TP53 PRKCI PTPRR PKN1 MAPK1 DDIT3 CDC25B DUSP5 DUSP4 DUSP3 CDK N1A DUSP2 RRS6K4A G6PD DUSP1 AMFR HSPD1 DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 DUSP6 GRK1
50865	2.3290E-5	4.0948E-4	9	191	regulation of cell activation	MEF2C DHT IMMP9 IMMP2 MAP3K7 AGTR1 CDC42 MAX APP ICASP3 HMOX1 ICASP1 MAP2K6 FHO H PLD2 RPGR PLXNB1 ARHGFEF PLXNB2 VIL2 PTPRR PRKCI TP53 CD40 LDLRAP1 WAS DDIT3 CTNBP1 RN D1 G6PD RASGRF1 KEL PRDM16 SRC TIMP1 ATF2 VCAW1 IRAC2 ATN1 HOXA10 CEBPZ HOXA9 TG6 ARHGDI ARHGDI INOX4 INOX3 HD INOX1 IRACGAP1 SOD2 CYBA CDKN1A PBX1 HSPD1 GRK1
50665	2.7547E-5	4.7943E-4	3	8	hydrogen peroxide biosynthetic process	MAP2K4 DUSP10 PRKCI TP53 PKN1 DDIT3 SOD2 AGTR1 MAX CDKN1A ICASP3 G6PD DUSP1 HMOX1 CEBPZ IMPO AMFR DUSP9 MAP3K13 MAP2K6 GRK1
30029	3.3233E-5	5.7261E-4	10	250	actin filament-based process	
44260	3.4207E-5	5.8136E-4	48	3506	cellular macromolecule metabolic process	
32501	3.4416E-5	5.8136E-4	56	4376	multicellular organismal process	
51716	3.5330E-5	5.8536E-4	21	988	cellular response to stimulus	

7015	3.5333E-5	5.8536E-4	6	77	actin filament organization	RND1 VIL2 PRKC1 WASL WASL LCP1
48523	3.9226E-5	6.4368E-4	31	1845	negative regulation of cellular process	DHTR MEF2C PRDM16 TIMP1 ATF2 MAP3K7 CASP3 ATN1 HMOX1 CEBZ ARHGDI MAP2K6 ARHGDI BIRHO INOX4 PLD2 HD PRKC ITP53 SOD2 CTN NBP1 DUSP3 CDKN1A RND1 G6PD TXN IMPO PBX1 HSPD1 DUSP6
70482	4.0442E-5	6.5737E-4	8	158	response to oxygen levels	VCAM1 PLD2 CDKN1A PDIA2 HMOX1 CASP1 MMMP2 SOD2
42592	4.4379E-5	7.1463E-4	18	775	homeostatic process	NOX4 INOX3 HD PDIA2 NOX1 DLRAP1 DDIT3 SOD2 TIMP1 JAGTR1 G
6917	4.6154E-5	7.3633E-4	11	315	induction of apoptosis	RP58 AP1 CASP3 G6PD JAC2 HMOX1 TXN CEBPZ
12502	4.7499E-5	7.5083E-4	11	316	induction of programmed cell death	ARHGAP4 CASP3 CDKN1A HD AP1 ARHGEF7 RASGRF1 HMOX1 ITP5
16310	5.3299E-5	8.3486E-4	18	786	phosphorylation	3 CASP1 VAV1
3018	5.3883E-5	8.3640E-4	5	51	vascular process in circulatory system	MAPKAPK5 MAP2K3 MAP2K4 PRKCJ MAPKAPK3 PKN1 MAPK11 MAP
9314	6.0978E-5	9.3308E-4	9	216	response to radiation	KAPK2 SRIC MAP3K7 APP CDKN1A IRPS6 KA4 EEF2K MAP3K13 MAP2
43170	6.1636E-5	9.3981E-4	52	4015	macromolecule metabolic process	K6 MSK1 GRK1
19222	6.7291E-5	1.0170E-3	51	3918	regulation of metabolic process	CTN NBP1 JAGTR1 KEL SRIC SOD2
2520	7.4138E-5	1.1108E-3	10	275	regulation of metabolic process	VCAM1 CASP3 CDKN1A HD AP1 DUSP1 TP53 SOD2 GRK1
6983	7.9746E-5	1.1845E-3	3	11	immune system development	DHTR PDIA2 MMMP9 MMMP2 MAP3K7 MAX AP1 CASP3 EEF2K CASP1 M
48519	9.0711E-5	1.3359E-3	32	2021	ER overload response	AP2K6 MSK1 PLD2 PTPR HIP PRR PRKCJ TP53 PKN1 DDIT3 G6PD A
9628	9.8118E-5	1.4327E-3	12	404	response to abiotic stimulus	MFR MAP3K13 KEL MAPKAPK5 MAPKAPK3 DUSP10 MAPKAPK2 SRCJ
43433	1.0051E-4	1.4431E-3	5	58	negative regulation of transcription factor	ATF2 DUSP14 DUSP16 CEBPZ TG6 PTPN1 PTPN5 MAP2K3 MAP2K
90048	1.0051E-4	1.4431E-3	5	58	negative regulation of transcription regulator	4 MAPK11 CDC25B DUSP5 DUSP4 CDKN1A DUSP3 IRPS6 KA4 DUSP2
51239	1.0700E-4	1.5040E-3	21	1067	regulation of multicellular organismal process	DUSP1 HSPD1 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 GRK1
30097	1.0900E-4	1.5040E-3	9	233	hemopoiesis	MEF2C DHT TR MAP3K7 MAX JAGTR1 AP1 CASP3 HMOX1 MAP2K6 MS
45321	1.0900E-4	1.5040E-3	9	233	leukocyte activation	K1 IRHO INOX01 INOX1 TP53 PKN1 CD40 DLRAP1 DDIT3 CTN NBP
2703	1.0911E-4	1.5040E-3	5	59	regulation of leukocyte mediated immunity	1 G6PD IRASGRF1 TXN WASL MAP3K13 MAPKAPK2 PRDM16 ATF2 T
7254	1.0911E-4	1.5040E-3	5	59	JNK cascade	MP1 IRAC2 ATN1 ELK4 DUSP16 HOXA10 CEBPZ HOXA9 MAP2K3 NOX
6928	1.1095E-4	1.5172E-3	13	474	cellular component movement	1 VAV1 SOD2 CDKN1A DUSP3 IRPS6 KA4 DUSP2 DUSP1 PBX1 HSPD1
6979	1.2264E-4	1.6638E-3	8	185	response to oxidative stress	DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6 GRK1
46649	1.2730E-4	1.7136E-3	8	186	lymphocyte activation	VCAM1 CDC42 G6PD MMMP9 TP53 PBX1 HSPD1 SOD2 RHO H T IMP1
						CEBPZ TP53 DDIT3
						DHTR MEF2C PRDM16 TIMP1 ATF2 MAP3K7 CDC42 CASP3 ATN1 HM
						OX1 CEBPZ ARHGDI MAP2K6 ARHGDI BIRHO INOX4 PLD2 HD PRK
						C ITP53 DDIT3 SOD2 CTN NBP1 DUSP3 CDKN1A RND1 G6PD TXN IM
						PO PBX1 HSPD1 DUSP6
						VCAM1 INOX3 CASP3 CDKN1A HD AP1 DUSP1 NOX1 TP53 PKN1 SOD
						2 GRK1
						CTN NBP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 DDIT3
						CTN NBP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 DDIT3
						DHTR HD PLXNB1 PLXNB2 INOX1 TP53 CD40 PRDM16 SRCJ ATF2 CT
						NBP1 MAP3K7 AGTR1 AP1 ATN1 IRASGRF1 HMOX1 PBX1 HSPD1 C
						ASPI ARHGDI A
						VCAM1 CDC42 G6PD MMMP9 TP53 PBX1 SOD2 RHO H T IMP1
						VCAM1 TP53 HSPD1 CD40 CASP1 WASVAV1 LCP1 RHOH
						MAP3K7 PLD2 HMOX1 HSPD1 CD40
						MAP2K4 DUSP10 PKN1 DUSP9 MAP3K13
						PLXNB1 ARHGEF7 INOX1 ATF2 ACTG1 VCAM1 JAGTR1 AP1 TXN AMF
						R WASL ARHGDI ARHGDI B
						PLD2 G6PD DUSP1 HMOX1 CEBPZ MPD DDIT3 SOD2
						VCAM1 TP53 HSPD1 CD40 WASVAV1 LCP1 RHOH

9605	1.3630E-4	1.8205E-3	14	552	response to external stimulus	NOX3 TP53 DDIT3 SOD2 VCAM1 AGTR1 MAX CDKN1A DUSP1 IRAC2 HMOX1 CEBPZ MSK1 GRK1
31098	1.4933E-4	1.9792E-3	5	63	cascade	MAP2K4 DUSP10 PKN1 DUSP9 MAP3K13
43086	1.5180E-4	1.9865E-3	10	300	negative regulation of catalytic activity	DUSP3 CASP3 CDKN1A DUSP2 DUSP16 TP53 DUSP9 DUSP8 DUSP7 DUSP6
9416	1.6055E-4	2.0957E-3	7	144	response to light stimulus	CASP3 CDKN1A HDIAP1 DUSP1 TP53 GRK1
34976	1.7139E-4	2.2204E-3	4	35	response to endoplasmic reticulum stress	CEBPZ TP53 AMFR DDIT3
31323	1.8400E-4	2.3659E-3	48	3735	regulation of cellular metabolic process	DHTR MEF2C MAPKAP2 PRDM16 TIMP1 ATF2 MAP3K7 AGTR1 MAX JAP1 CASP3 ATN1 IRAC2 ELK4 HMOX1 DUSP16 CEBPZ HOXA10 HOXA9 MSK1 MAP2K6 RHO INOXO1 INOXA1 MAP2K3 TP53 PKN1 CD40 AV1 DDIT3 SOD2 CTNNBIP1 DUSP3 CDKN1A DUSP2 RPS6KA4 G6PD DUSP1 RASGRF1 TXNIP PBX1 WASL DUSP9 DUSP8 MAP3K13 DUSP7 DUSP6 GRK1
43392	1.8627E-4	2.3773E-3	5	66	negative regulation of DNA binding	CTNNBIP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 DDIT3
32792	1.9131E-4	2.4237E-3	2	3	negative regulation of CREB transcription factor activity	CEBPZ DDIT3
1666	1.9828E-4	2.4937E-3	7	149	response to hypoxia	VCAM1 PLD2 PDIA2 HMOX1 CASP1 MMMP2 SOD2
45454	2.0001E-4	2.4972E-3	5	67	cell redox homeostasis	GRP58 PDIA2 TXN CEBPZ DDIT3
6916	2.0252E-4	2.5104E-3	8	199	anti-apoptosis	MEF2C HD HMOX1 PRKQ MPO ARHGDI SOD2 ATF2
6984	2.1353E-4	2.6279E-3	4	37	ER-nucleus signaling pathway	CEBPZ TP53 AMFR DDIT3
42493	2.2776E-4	2.7832E-3	9	257	response to drug	CDKN1A CEBPZ TP53 CASP1 DDIT3 MAP2K6 DUSP6 SOD2 GRK1
48534	2.4124E-4	2.9272E-3	9	259	hemopoietic or lymphoid organ development	ARHGAP4 CDC42 G6PD MM91 P53 PBX1 SOD2 RHO TIMP1
7010	2.5659E-4	3.0916E-3	12	448	cytoskeleton organization	ARHGAP4 CDC42 G6PD MM91 P53 PBX1 SOD2 RHO TIMP1
51402	2.6282E-4	3.1231E-3	3	16	neuron apoptosis	SILCP1 ARHGDI B
80010	2.6282E-4	3.1231E-3	3	16	regulation of oxygen and reactive oxygen species metabolic process	MAX CASP3 APP
51249	2.7329E-4	3.2252E-3	7	157	regulation of lymphocyte activation	NOXO1 IRAC2 INOXA1
9991	2.8575E-4	3.3493E-3	9	265	response to extracellular stimulus	VCAM1 MAP3K7 DUSP9 CASP3 CDKN1A HSPD1 CD40
6739	3.1272E-4	3.6937E-3	3	17	NADP metabolic process	VCAM1 MAX CDKN1A DUSP1 HMOX1 CEBPZ TP53 DDIT3 SOD2
7399	3.1973E-4	3.6973E-3	21	1155	nervous system development	G6PD INOX1 IDH1
22900	3.2746E-4	3.7614E-3	6	115	electron transport chain	MEF2C PLD2 HD ARHGEF7 PLXNB1 PLXNB2 TP53 PRKC PTPRR IRACGAP1 PRDM16 SOD2 ATF2 MAP3K7 APP RND1 ATN1 RASGRF1 PBX1 ARHGDI GRK1
2696	3.4308E-4	3.9148E-3	6	116	positive regulation of leukocyte activation	CYBA CYBB INOX1 TXN CYBASC3 SOD2
1775	3.7498E-4	4.1769E-3	9	275	cell activation	VCAM1 MAP3K7 PLD2 CDKN1A HSPD1 CD40
70887	3.7512E-4	4.1769E-3	11	400	cellular response to chemical stimulus	VCAM1 TP53 HSPD1 CD40 CASP1 WAS VAV1 LCP1 RHOH
70997	3.7850E-4	4.1769E-3	3	18	neuron death	MAX JAGTR1 G6PD DUSP1 HMOX1 CEBPZ PRKC MPO AMFR DDIT3 SOD2
920	3.8060E-4	4.1769E-3	2	4	cytokinetic cell separation	MAX CASP3 APP
14805	3.8060E-4	4.1769E-3	2	4	smooth muscle adaptation	ANXA1 IRACGAP1
42789	3.8060E-4	4.1769E-3	2	4	mRNA transcription from RNA polymerase II promoter	CYBA HMOX1
42110	3.9349E-4	4.2910E-3	6	119	T cell activation	CEBPZ DDIT3
42127	4.2613E-4	4.6177E-3	17	848	regulation of cell proliferation	TP53 HSPD1 WAS VAV1 LCP1 RHOH
50867	4.3019E-4	4.6272E-3	6	121	positive regulation of cell activation	DHTR INOX4 INOX1 TP53 CD40 SOD2 CDC25B TIMP1 CTNNBIP1 VCA
51100	4.3238E-4	4.6272E-3	5	79	negative regulation of binding	M1 JAGTR1 CDKN1A CASP3 ARHGAP5 IRAC2 HMOX1 PBX1
1836	6.0617E-4	6.4471E-3	3	21	release of cytochrome c from mitochondria	VCAM1 MAP3K7 PLD2 CDKN1A HSPD1 CD40
						CTNNBIP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 DDIT3
						CASP3 TP53 SOD2

2682	6.1103E-4	6.4589E-3	11	424	regulation of immune system process	VCAM1 CTNBP1 MAP3K7 PLD2 DUSP3 CASP3 CDKN1A HMOX1 HSD17B4 PDM16
3206	6.3099E-4	6.5494E-3	2	5	cytokinetic process	ANXA1 TRACGAP1
16322	6.3099E-4	6.5494E-3	2	5	neuron remodeling	APPRND1
22614	6.3099E-4	6.5494E-3	2	5	membrane to membrane docking	VCAM1 VIL2
71216	6.8711E-4	7.0892E-3	4	50	cellular response to biotic stimulus	CEBPZ TP53 AMFR DDIT3
34620	6.9779E-4	7.1141E-3	3	22	cellular response to unfolded protein	CEBPZ AMFR DDIT3
30968	6.9779E-4	7.1141E-3	3	22	endoplasmic reticulum unfolded protein response	CEBPZ AMFR DDIT3
31667	7.8841E-4	7.9908E-3	8	244	response to nutrient levels	VCAM1 MAX DUSP1 HMOX1 CEBPZ TP53 DDIT3 SOD2
8629	7.9781E-4	8.0388E-3	4	52	induction of apoptosis by intracellular signals	CASP3 CDKN1A HMOX1 TP53
90046	8.2923E-4	8.2588E-3	6	137	regulation of transcription regulator activity	CTNBP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 MAP3K13 DDIT3
51090	8.2923E-4	8.2588E-3	6	137	regulation of transcription factor activity	CTNBP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 MAP3K13 DDIT3
34599	9.2056E-4	9.1156E-3	4	54	cellular response to oxidative stress	G6PD HMOX1 IMPO SOD2
16044	1.0154E-3	9.9972E-3	10	382	cellular membrane organization	PLD2 CASP3 HDJ APP ANXA1 TP53 PRKC DLRAP1 VAV1 ATF2
61024	1.0357E-3	1.0139E-2	10	383	membrane organization	PLD2 CASP3 HDJ APP ANXA1 TP53 PRKC DLRAP1 VAV1 ATF2
8217	1.1026E-3	1.0734E-2	5	97	regulation of blood pressure	CYBA AGTR1 HMOX1 NOX1 SOD2
21700	1.1546E-3	1.1176E-2	5	98	developmental maturation	APPI G6PD IRND1 MMMP2 TIMP1
10627	1.1819E-3	1.1320E-2	9	323	regulation of intracellular protein kinase cascade	MAP3K7 DHTRI DUSP3 HMOX1 IPK1 CD40 CASP1 DUSP6 RHOG
35239	1.1891E-3	1.1320E-2	7	201	tube morphogenesis	MAP3K7 DHTRI AGTR1 KEL PBX1 SOD2 ATF2
51098	1.1891E-3	1.1320E-2	7	201	regulation of binding	CTNBP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 MAP3K13 DLRAP1 DDIT3
48666	1.2603E-3	1.1932E-2	9	326	neuron development	PLD2 HDJ APPRND1 IRASGRF1 PRKC SOD2 GRK1 ATF2
3044	1.2871E-3	1.1953E-2	3	27	regulation of systemic arterial blood pressure mediated by a chemical signal	AGTR1 NOX1 SOD2
43249	1.3112E-3	1.1953E-2	2	7	erythrocyte maturation	G6PD TIMP1
35437	1.3112E-3	1.1953E-2	2	7	maintenance of protein localization in endoplasmic reticulum	GRP58 PDIA2
16572	1.3112E-3	1.1953E-2	2	7	histone phosphorylation	PKN1 IMSK1
9299	1.3112E-3	1.1953E-2	2	7	mRNA transcription	CEBPZ DDIT3
6621	1.3112E-3	1.1953E-2	2	7	protein retention in ER lumen	GRP58 PDIA2
34383	1.3112E-3	1.1953E-2	2	7	low-density lipoprotein particle clearance	HMOX1 DLRAP1
9611	1.3555E-3	1.2292E-2	12	541	response to wounding	NOX4 VCAM1 CTNBP1 CYBA MAX CYBB CASP3 HMOX1 NOX1 CD40 WAS SOD2
71445	1.4332E-3	1.2929E-2	3	28	cellular response to protein stimulus	CEBPZ AMFR DDIT3
1819	1.4418E-3	1.2939E-2	5	103	positive regulation of cytokine production	MAP3K7 NOX1 HSPD1 CD40 CASP1
51251	1.5703E-3	1.3947E-2	5	105	positive regulation of lymphocyte activation	VCAM1 MAP3K7 CDKN1A HSPD1 CD40
2697	1.5703E-3	1.3947E-2	5	105	regulation of immune effector process	MAP3K7 PLD2 HMOX1 HSPD1 CD40
10033	1.5833E-3	1.3971E-2	16	870	response to organic substance	DHTRI PLD2 PRKC DDIT3 SRCDUSP4 MAX CDKN1A CASP3 DUSP1 HMOX1 CEBPZ AMFR HSPD1 CASP1 DUSP6
8637	1.5893E-3	1.3971E-2	3	29	apoptotic mitochondrial changes	CASP3 TP53 SOD2
9653	1.6061E-3	1.4047E-2	20	1218	anatomical structure morphogenesis	NOX4 DHTRI HDJ KEL NOX1 TP53 PRKC MMMP2 SOD2 ATF2 VCAM1 MAP3K7 AGTR1 APPI CDKN1A HMOX1 HOXA10 PBX1 CASP1 GRK1
50793	1.6574E-3	1.4423E-2	15	791	regulation of developmental process	DHTRI PLXNB1 PLXNB2 VIL2 TP53 CD40 PDM16 SOD2 ATF2 CTNBP1 JAGTR1 ATN1 HMOX1 PBX1 ARHGDI1A
51101	1.7288E-3	1.4969E-2	6	158	regulation of DNA binding	CTNBP1 HMOX1 CEBPZ PBX1 MAP3K13 DDIT3
8624	1.7786E-3	1.5323E-2	5	108	induction of apoptosis by extracellular signals	ARHGAP4 CASP3 ARHGGEF1 RASGRF1 VAV1

7050	1.8523E-3	1.5878E-2	5	109	cell cycle arrest	CDKN1A CEBPZ TP53 DDIT3 MAP2K6
50772	1.9323E-3	1.6482E-2	3	31	positive regulation of axonogenesis	PLXNB1 PLXNB2 ARHGDI2
6986	2.0595E-3	1.7395E-2	4	67	response to unfolded protein	CEBPZ HSPD1 AMFR DDIT3
31346	2.0595E-3	1.7395E-2	4	67	positive regulation of cell projection organization	CDC42 PLXNB1 PLXNB2 ARHGDI2
55114	2.0703E-3	1.7401E-2	13	647	oxidation reduction	NOX4 NOX3 NCF4 NOX1 SOD2 CYBA CYBB G6PD HMOX1 TXN1 DH1 MPO CYBASC3
44238	2.0832E-3	1.7424E-2	58	5285	primary metabolic process	DHTR1P IA2 MMP9 MMP2 MAP3K7 IMAX APPCASP3 IEEF2K CASP1 M
30888	2.1198E-3	1.7645E-2	3	32	regulation of B cell proliferation	AP2K6 MSK1 PLD2 PTPRH1 TPRR1 PRKCI TP53 PKN1 LDLRAP1 DDIT
30225	2.2242E-3	1.7908E-2	2	9	macrophage differentiation	3 G6PD AMFR MAP3K13 KEL1 MAPKAP5 MAPKAP3 DUSP10 MAPKA
70373	2.2242E-3	1.7908E-2	2	9	cascade	PK2 SRC1 ATF2 DUSP14 DUSP16 CEBPZ IDH1 TGM6 PTPN7 HD PTPN
43304	2.2242E-3	1.7908E-2	2	9	regulation of mast cell degranulation	5 MAP2K3 MAP2K4 NOX1 MAPK11 CDC25B SOD2 DUSP5 DUSP4 DU
48147	2.2242E-3	1.7908E-2	2	9	negative regulation of fibroblast proliferation	SP3 CDKN1A DUSP2 RPS6K4 DUSP1 PBX1 HSPD1 DUSP9 DUSP8 D
33006	2.2242E-3	1.7908E-2	2	9	immune response	USP7 DUSP6 GRK1
46902	2.2242E-3	1.7908E-2	2	9	regulation of mitochondrial membrane permeability	CASP3 CDKN1A CD40
34374	2.2242E-3	1.7908E-2	2	9	low-density lipoprotein particle remodeling	CDC42 MMP9
45768	2.3183E-3	1.8578E-2	3	33	positive regulation of anti-apoptosis	CDKN1A DUSP1 HMOX1
70271	2.5577E-3	2.0308E-2	11	507	protein complex biogenesis	CYBA IMAX HMOX1 TP53 WASL HSPD1 AMFR CD40 WAS SRC SOD2
6461	2.5577E-3	2.0308E-2	11	507	protein complex assembly	CYBA IMAX HMOX1 TP53 WASL HSPD1 AMFR CD40 WAS SRC SOD2
22607	2.5819E-3	2.0407E-2	16	913	cellular component assembly	VIL2 TP53 CD40 RACGAP1 WAS SRC SOD2 CYBA IMAX APP IRAC2 H
32880	2.6493E-3	2.0844E-2	6	172	regulation of protein localization	MOX1 AMFR HSPD1 WASL LCP1
7569	2.7487E-3	2.1273E-2	3	35	cell aging	TXN1 PRKCI CD40 CASP1 LCP1 ARHGDI2
43300	2.7657E-3	2.1273E-2	2	10	regulation of leukocyte degranulation	NOX4 HD TP53
32735	2.7657E-3	2.1273E-2	2	10	positive regulation of interleukin-12 production	PLD2 HMOX1
6740	2.7657E-3	2.1273E-2	2	10	NADPH regeneration	HSPD1 CD40
55093	2.7657E-3	2.1273E-2	2	10	response to hyperoxia	G6PD IDH1
50863	2.9212E-3	2.2370E-2	5	121	regulation of T cell activation	CDKN1A SOD2
42113	2.9616E-3	2.2529E-2	4	74	B cell activation	VCAM1 MAP3K7 DUSP3 CASP3 HSPD1
30182	2.9730E-3	2.2529E-2	10	442	neuron differentiation	VCAM1 TP53 HSPD1 CD40
55072	2.9812E-3	2.2529E-2	3	36	iron ion homeostasis	PLD2 HD IAP1 RND1 RASGRF1 PRKCI PTPRR SOD2 GRK1 ATF2
45786	3.0541E-3	2.2979E-2	6	177	negative regulation of cell cycle	HD HMOX1 SOD2
6996	3.1290E-3	2.3440E-2	21	1382	organelle organization	CASP3 CDKN1A CEBPZ TP53 DDIT3 MAP2K6
9893	3.1508E-3	2.3502E-2	17	1019	positive regulation of metabolic process	PLD2 HD IKIF3A VIL2 TP53 PRKCI PKN1 RACGAP1 WAS SOD2 CDC25
46651	3.2254E-3	2.3954E-2	3	37	lymphocyte proliferation	BIARHGAP4 CDC42 CASP3 RND1 RCC2 RAC2 WASL LCP1 MSK1 AR
48646	3.2561E-3	2.4019E-2	9	375	anatomical structure formation involved in morphogenesis	HGDI2
48469	3.2620E-3	2.4019E-2	4	76	cell maturation	MEF2C IDHTRIMAP2K3 INOX1 TP53 CD40 PRDM16 LDLRAP1 DDIT3 S

9790	3.2842E-3	2.4080E-2	12	602	embryonic development	VCAM1 MAP3K7 IDHTR HDICEBPZ TP53 HOXA10 PTPRR PBX1 RACGAP1 DDIT3 ATF2
43500	3.3625E-3	2.4241E-2	2	11	muscle adaptation	CYBA HMOX1
51881	3.3625E-3	2.4241E-2	2	11	potential	HD SOD2
2711	3.3625E-3	2.4241E-2	2	11	positive regulation of T cell mediated immunity	MAP3K7 HSPD1
2886	3.3625E-3	2.4241E-2	2	11	regulation of myeloid leukocyte mediated immunity	PLD2 HMOX1
3073	3.4815E-3	2.4891E-2	3	38	regulation of systemic arterial blood pressure	AGTR1 INOX1 SOD2
46496	3.4815E-3	2.4891E-2	3	38	nicotinamide nucleotide metabolic process	G6PD INOX1 IDH1
10243	3.5825E-3	2.5399E-2	4	78	response to organic nitrogen	MAX CDKN1A ICEBPZ DDIT3
43122	3.5968E-3	2.5399E-2	5	127	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	MAP3K7 HMOX1 CD40 CASP1 RHOH
2521	3.5968E-3	2.5399E-2	5	127	leukocyte differentiation	VCAM1 CD42 MMMP9 TP53 RHOH
32943	3.7498E-3	2.6371E-2	3	39	mononuclear cell proliferation	TP53 HSPD1 CD40
8284	3.8859E-3	2.7217E-2	10	459	positive regulation of cell proliferation	VCAM1 CDKN1A ARHGAP5 RAC2 HMOX1 INOX1 PBX1 CD40 CDC25B TIMP1
6954	3.9068E-3	2.7253E-2	8	315	inflammatory response	NOX4 VCAM1 CTNBP1 CYBA CYBB HMOX1 INOX1 CD40
45736	4.0139E-3	2.7339E-2	2	12	negative regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	CASP3 CDKN1A
3081	4.0139E-3	2.7339E-2	2	12	regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin	AGTR1 INOX1
42100	4.0139E-3	2.7339E-2	2	12	B cell proliferation	HSPD1 CD40
51128	4.0175E-3	2.7339E-2	11	538	regulation of cellular component organization	CDC42 PLD2 PLXNB1 VIL2 PLXNB2 INOX1 TP53 PRKC LDLRAP1 ARHGAP5 SRC
70661	4.0303E-3	2.7339E-2	3	40	leukocyte proliferation	TP53 HSPD1 CD40
45767	4.0303E-3	2.7339E-2	3	40	regulation of anti-apoptosis	CDKN1A DUSP1 HMOX1
2700	4.0303E-3	2.7339E-2	3	40	regulation of production of molecular mediator of immune response	MAP3K7 HMOX1 CD40
90066	4.0582E-3	2.7420E-2	8	317	regulation of anatomical structure size	DHTR AGTR1 CDKN1A APP ARHGAP5 KEL TP53 SOD2
6955	4.1051E-3	2.7630E-2	12	619	immune response	CYBA CYBB NCF2 NCF1 HMOX1 INOX1 IMPO
6952	4.1582E-3	2.7877E-2	12	620	defense response	RHGDI B
35150	4.3233E-3	2.8650E-2	3	41	regulation of tube size	NOX4 VCAM1 CTNBP1 CYBA CYBB NCF2 NCF1 HMOX1 INOX1 IMPO CD40 WAS
50880	4.3233E-3	2.8650E-2	3	41	regulation of blood vessel size	AGTR1 KEL SOD2
19362	4.3233E-3	2.8650E-2	3	41	pyridine nucleotide metabolic process	AGTR1 KEL SOD2
19725	4.3862E-3	2.8956E-2	10	467	cellular homeostasis	G6PD INOX1 IDH1
43114	4.7189E-3	3.0566E-2	2	13	regulation of vascular permeability	AGTR1 HD APP GRP58 PDIA2 INOX1 TXN ICEBPZ DDIT3 SOD2
48821	4.7189E-3	3.0566E-2	2	13	erythrocyte development	CTNBP1 SRC
48260	4.7189E-3	3.0566E-2	2	13	positive regulation of receptor-mediated endocytosis	G6PD TIMP1
31571	4.7189E-3	3.0566E-2	2	13	G1/S DNA damage checkpoint	PLD2 LDLRAP1
8088	4.7189E-3	3.0566E-2	2	13	axon cargo transport	CDKN1A TP53
43085	4.9310E-3	3.1570E-2	11	553	positive regulation of catalytic activity	HD APP
45595	4.9310E-3	3.1570E-2	11	553	regulation of cell differentiation	MAP3K7 AGTR1 DUSP1 RASGRF1 MAP2K3 TP53 PKN1 HSPD1 MAP3K13 MAP2K6 ATF2
48145	4.9472E-3	3.1570E-2	3	43	regulation of fibroblast proliferation	CTNBP1 IDHTR AGTR1 ATN1 PLXNB1 PLXNB2 TP53 PBX1 PRDM16 ARHGAP5 SOD2

2699	4.9472E-3	3.1570E-2	3	43	positive regulation of immune effector process	MAP3K7 PLD2 HSPD1
35467	5.2296E-3	3.3249E-2	7	262	negative regulation of signaling pathway	CTNBP1 PLD2 DUSP3 TP53 PRDM16 DUSP6 RHOG
43933	5.3909E-3	3.4149E-2	13	724	macromolecular complex subunit organization	SPD1 WASL
2286	5.4765E-3	3.4313E-2	2	14	T cell activation involved in immune response	TP53 LCP1
33003	5.4765E-3	3.4313E-2	2	14	regulation of mast cell activation	PLD2 HMOX1
45453	5.4765E-3	3.4313E-2	2	14	bone resorption	NOX4 IRAC2
32879	5.5776E-3	3.4820E-2	13	727	regulation of localization	PLD2 MMP9 PRKCI CD40 DLR1 ATF2 JAGTR1 ARHGAP5 HMOX1 TXNIP ARHGDI LCP1
6605	5.6697E-3	3.5267E-2	6	201	protein targeting	HDIGRP58 NCF1 DUSP16 TP53 PRKCI
1817	5.8058E-3	3.5983E-2	6	202	regulation of cytokine production	MAP3K7 HMOX1 NOX1 HSPD1 CD40 CASP1
9891	5.9002E-3	3.6438E-2	13	732	positive regulation of biosynthetic process	MEF2C DHTTR MAP2K3 NOX1 TP53 PRDM16 DDIT3 ATF2 SOD2 APP H
30705	5.9801E-3	3.6799E-2	3	46	cytoskeleton-dependent intracellular transport	MOX1 CEBPZ PBX1
43523	6.1991E-3	3.8011E-2	4	91	regulation of neuron apoptosis	HD APPI WAS
35088	6.2860E-3	3.8407E-2	2	15	establishment or maintenance of apical/basal cell polarity	HD TP53 SOD2 ATF2
9952	6.6594E-3	4.0521E-2	5	147	anterior/posterior pattern formation	VIL2 PRKCI
50670	6.6899E-3	4.0521E-2	4	93	regulation of lymphocyte proliferation	CTNBP1 HD TP53 HOXA10 PBX1
7162	6.7351E-3	4.0521E-2	3	48	negative regulation of cell adhesion	VCAM1 CASP3 CDKN1A CD40
50767	6.8263E-3	4.0521E-2	6	209	regulation of neurogenesis	RND1 ARHGDI ARHGDI B
30155	6.8490E-3	4.0521E-2	5	148	regulation of cell adhesion	ATN1 PLXNB1 PLXNB2 TP53 PBX1 ARHGDI
32944	6.9447E-3	4.0521E-2	4	94	regulation of mononuclear cell proliferation	PLD2 FRN1 VAV1 ARHGDI ARHGDI B
6357	6.9589E-3	4.0521E-2	13	747	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	VCAM1 CASP3 CDKN1A CD40
14070	7.0423E-3	4.0521E-2	5	149	response to organic cyclic substance	MEF2C DHTTR TP53 PKN1 PRDM16 ATF2 SOD2 CTNBP1 APP ATN1 HMOX1 TXNIP PBX1
34101	7.1329E-3	4.0521E-2	3	49	erythrocyte homeostasis	PLD2 CDKN1A HMOX1 CASP1 DUSP6
70972	7.1465E-3	4.0521E-2	2	16	protein localization in endoplasmic reticulum	G6PD HMOX1 TIMP1
45940	7.1465E-3	4.0521E-2	2	16	positive regulation of steroid metabolic process	GRP58 PDI A2
51240	7.1683E-3	4.0521E-2	7	278	positive regulation of multicellular organismal process	AGTR1 DLR1
30099	7.2058E-3	4.0521E-2	4	95	myeloid cell differentiation	MAP3K7 HMOX1 NOX1 HSPD1 CD40 CASP1 ATF2
48872	7.2058E-3	4.0521E-2	4	95	homeostasis of number of cells	CDC42 G6PD MMP9 TIMP1
70663	7.2058E-3	4.0521E-2	4	95	regulation of leukocyte proliferation	CASP3 G6PD HMOX1 TIMP1
31668	7.4734E-3	4.0521E-2	4	96	cellular response to extracellular stimulus	VCAM1 CASP3 CDKN1A CD40
2706	7.5443E-3	4.0521E-2	3	50	regulation of lymphocyte mediated immunity	MAX CDKN1A HMOX1 TP53
2822	7.5443E-3	4.0521E-2	3	50	regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	MAP3K7 HSPD1 CD40
71496	7.7474E-3	4.0521E-2	4	97	cellular response to external stimulus	MAP3K7 HSPD1 CD40
70201	7.8538E-3	4.0521E-2	5	153	regulation of establishment of protein localization	TXNIP PRKCI CD40 CASP1 LCP1
50864	7.9695E-3	4.0521E-2	3	51	regulation of B cell activation	CASP3 CDKN1A CD40
2819	7.9695E-3	4.0521E-2	3	51	regulation of adaptive immune response	MAP3K7 HSPD1 CD40
6733	7.9695E-3	4.0521E-2	3	51	oxidoreduction coenzyme metabolic process	G6PD NOX1 IDH1
21784	8.0414E-3	4.0521E-2	1	1	postganglionic parasympathetic nervous system development	ATF2

10149	8.0570E-3	4.0521E-2	2	17	senescence	CDKN1A TP53
2709	8.0570E-3	4.0521E-2	2	17	regulation of T cell mediated immunity	MAP3K7 HSPD1
10551	8.0665E-3	4.0521E-2	5	154	regulation of gene-specific transcription from RNA polymerase II promoter	DHTR MEF2C TP53 PKN1 ATF2
10557	8.1334E-3	4.0738E-2	12	676	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	DHTR MEF2C JAPP HMOX1 MAP2K3 NOX1 CEBPZ TP53 PBX1 PRDM16 DDIT3 ATF2
51173	8.3170E-3	4.1493E-2	12	678	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	DHTR MEF2C JAPP MAP2K3 CEBPZ TP53 PBX1 CD40 PRDM16 DDIT3 SOD2 ATF2
51049	8.3323E-3	4.1493E-2	10	513	regulation of transport	PLD2 AGTR1 HMOX1 ITXN1 PRKCJ CD40 CASP1 LDLRAP1 LCP1 ATF2
7163	8.4086E-3	4.1752E-2	3	52	establishment or maintenance of cell polarity	CDC42 VIL2 PRKCI
44085	8.5751E-3	4.2457E-2	16	1035	cellular component biogenesis	VIL2 TP53 CD40 RACGAP1 WAS SRC SOD2 CYBA MAX JAPP RAC2 H
43524	8.8617E-3	4.3625E-2	3	53	negative regulation of neuron apoptosis	MOX1 AMFR HSPD1 WASL LCP1
10741	8.8617E-3	4.3625E-2	3	53	negative regulation of intracellular protein kinase cascade	HD SOD2 ATF2
10552	8.9094E-3	4.3735E-2	4	101	positive regulation of gene-specific transcription from RNA polymerase II promoter	DUSP3 DUSP6 RHOH
43489	9.0169E-3	4.3764E-2	2	18	RNA stabilization	DHTR MEF2C TP53 ATF2
48255	9.0169E-3	4.3764E-2	2	18	mRNA stabilization	MAPKAPK2 ATF2
2718	9.0169E-3	4.3764E-2	2	18	regulation of cytokine production involved in immune response	MAP3K7 HMOX1
34381	9.0169E-3	4.3764E-2	2	18	lipoprotein particle clearance	HMOX1 LDLRAP1
43408	9.6682E-3	4.6793E-2	5	161	regulation of MAPKKK cascade	MAP3K7 DHTR DUSP3 PKN1 DUSP6
2285	1.0025E-2	4.8329E-2	2	19	lymphocyte activation involved in immune response	TP53 LCP1
51960	1.0042E-2	4.8329E-2	6	227	regulation of nervous system development	ATN1 PLXNB1 PLXNB2 TP53 PBX1 ARHGDI
35295	1.0112E-2	4.8531E-2	7	297	tube development	MAP3K7 DHTR AGTR1 KEL PBX1 SOD2 ATF2
2695	1.0306E-2	4.9324E-2	3	56	negative regulation of leukocyte activation	DUSP3 CASP3 HMOX1

a) Values calculated from p-value after FDR application; b) Total number of proteins found in the network that belong to a specific G; c) Total number of proteins belonging to a specific GO.

-CURRICULUM VITAE-

Luciana Pescatore Alves (Pescatore LA)

Nascimento: 30 de Setembro de 1982, São Paulo

Formação

Pós-Graduação - Doutorado (2007- 2011)

Área: Ciências Biológicas – Cardiologia

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração - USP

Graduação (2002-2006)

Curso: Ciências Biológicas (Licenciatura/Bacharelado)

Universidade: Universidade Presbiteriana Mackenzie

Ocupação

Bolsista – Doutorado (início: 2007)

Agência financiadora: Fapesp

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

Programa: Cardiologia

Colaboração presencial : *ARCUS/MAEE* (Ago/2008-Jan/2009)

Supervisão : Hervé Kovacic

Instituição : INSERM UMR911, Université de la Méditerranée, Marseille, France

Bolsista – Treinamento Técnico III (2006-2007)

Agência financiadora: Fapesp

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração - USP

Bolsista – Iniciação Científica (2003-2006)

Agência financiadora: Fapesp

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração - USP

Publicações

Fernandes DC, Wosniak J Jr, **Pescatore LA**, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, Santos CX. (2007) Analysis of dihydroethidium-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol- Cell Physiology*. **292**:C413-C422.

Laurindo FR, **Pescatore LA**, Santos CX, Fernandes DC. Protein disulfide isomerase as a novel type of integrative adaptor for redox cell signaling and homeostasis (submitted)

Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Kovacic K, Laurindo FRM. Protein Disulfide Isomerase is Required for Platelet-Derived Growth Factor-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration, Nox1 Expression and Rho-GTPase Activation. (submitted)

Resumos publicados em anais de congressos

Alves LP, Santos CX, Laurindo FRM. *Decreased superoxide dismutase activity in association with endoplasmic reticulum stress in rabbit aortic smooth muscle cells*. XXXIII Annual Meeting of Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBQ), 2004, Caxambu, Brazil.

Alves LP, Santos CX, Cabrera JC, Laurindo FRM. *Decreased superoxide dismutase activity in association with endoplasmic reticulum stress in rabbit aortic smooth muscle cells*. IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2005, Águas de Lindóia, Brazil.

Alves LP, Santos CX, Amanso AM, Cabrera JC, Azevedo IJ, Laurindo FR. *Early decrease in superoxide dismutase activity in vascular smooth muscle cells during endoplasmic reticulum stress*. XXXV Annual Meeting of Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBQ), 2006, Águas de Lindóia, Brazil.

Santos CX, Murata V, **Pescatore LA**, Thiesen K, Laurindo FRM. *Protein disulfide isomerase (PDI)/NAD(P)H oxidase interaction is a pathway bridging the unfolded protein reaction (UPR) to oxidative stress in vascular smooth muscle cells (VSMC)*. Molecular

Chaperones & The Heat Shock Response-Cold Spring Harbor Laboratory, 2006, New York/USA.

Pescatore LA, Santos CX, Laurindo FR *Endoplasmic reticulum stress induces early and sustained decrease in superoxide dismutase activity in vascular smooth muscle cells*. Free Radicals in Montevideo 2007, V Meeting of SFRBM - South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo/Uruguay.

Fernandes DC, Manoel AHO, **Pescatore LA**, Wosniak Jr J, Laurindo FR. *Protein Disulfide Isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure*. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009, VI Meeting of SFRMB South American Group, 2009, Chile.

Pescatore LA, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. *The Role of Protein Disulfide Isomerase (PDI) in Redox-Dependent VSMC Migration*. XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq). 2010. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

Pescatore LA, Forti FL, Kovacic H, Laurindo FR. *Protein disulfide isomerase contributes to redox-dependent vascular smooth muscle cell migration: possible convergence with RhoGTPases*. XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq). 2011. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

Pescatore LA, Forti FL, Kovacic H, Laurindo FR. *Protein disulfide isomerase contributes to redox-dependent vascular smooth muscle cell migration: possible convergence with RhoGTPases*. Free Radicals and Antioxidants in Brazil 2011, VII Meeting of SFRMB South American Group. 2011. São Pedro, Brazil.

Distinções

SBBq Award - XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq). 2011. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil

Young Investigator Award - Free Radicals and Antioxidants in Brazil 2011, VII Meeting of SFRMB South American Group. 2011. Brazil.