

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Vivian Cristine Calegari

**Dinâmica molecular de ativação da sinalização
celular da angiotensina II em coração de ratos –
participação das fosfatases SHP1 e SHP2 e da
proteína SOCS3**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Vivian Cristine Calegari
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto
de Biologia para a obtenção do Título de Mestre
em Biologia Funcional e Molecular na área de
Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	80
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	C128d
V	EX
TOMBO BC/	54496
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/06/03
Nº CPD	

CM00186759-6

BIB ID 295253

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C128d

Calegari, Vivian Cristine

Dinâmica molecular de ativação da sinalização celular da Angiotensina II em coração de ratos – participação das fosfatases SHP1 e SHP2 e da proteína SOCS3/Vivian Cristine Calegari. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Lício Augusto Velloso

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia

1. Angiotensina. I. Velloso, Lício Augusto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

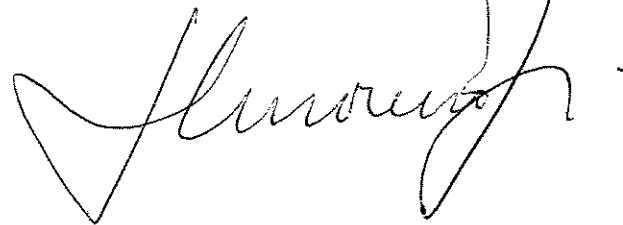
Data da Defesa: 07/03/2003

Banca Examinadora:

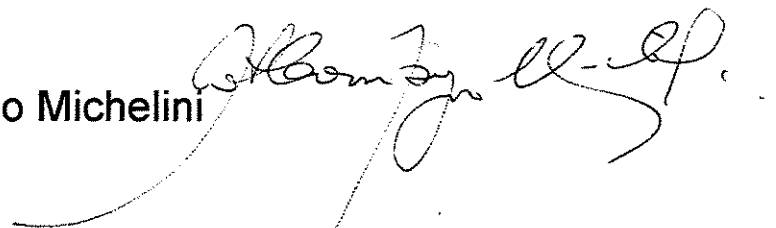
Prof. Dr. Lício Augusto Velloso (orientador)



Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior



Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini



Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

84972066078

***“Compartilhe o seu conhecimento.
Esta é uma maneira de alcançar
a imortalidade”.***

Agradecimentos

À Deus por ter me dado forças e por sempre ter iluminado meu caminho e minhas decisões.

Aos meus pais, Mauro e Silvana, pelo carinho, apoio, compreensão, amor e dedicação em todos os momentos.

Ao meu irmão, Willian (*in memorian*), que me ensinou a viver cada dia como se fosse meu último dia e a dar mais valor às pessoas e à vida.

Aos meus avós, que sempre me deram ânimo e esperança para continuar.

Às minhas amigas, Dani, Lu, Adriana, Valéria, Dri, Paty e Mônica, e aos meus amigos Flávio, Leonardo e Henrique, pela amizade, compreensão e apoio em todos os momentos difíceis.

Ao querido Fausto, pelo carinho, compreensão, incentivo, companheirismo e paciência.

Aos amigos e companheiros de trabalho de meu laboratório.

Ao Sr. Luis, pela ajuda em todos os momentos e extrema dedicação.

Ao amigo Jamilson, pela imensa ajuda e paciência a mim dispensadas.

Ao Prof. Mário, por me possibilitar o uso de seu laboratório e por seu extremo otimismo.

Ao Prof. Kleber, que me possibilitou o uso de materiais de seu laboratório nos momentos em que precisei.

Ao meu orientador, pelo apoio, compreensão, paciência, otimismo e pelas palavras de incentivo quando tudo parecia não ter mais jeito.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e ao meu
irmão (*in memoriam*), dedico este
trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Lista de anticorpos utilizados em experimentos de <i>Western blot</i>	xv
Lista de Quadros	xvi
Lista de Figuras	xvi
I – INTRODUÇÃO	01
Mecanismos moleculares de ação da AII	
Via de sinalização JAK/STAT	
Família Janus kinase (JAKs)	
Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição gênica (STATs)	
Proteínas supressoras da sinalização das citocinas (SOCSs)	
A via JAK/STAT no sistema cardiovascular	
II – OBJETIVOS	17
III – MATERIAL E MÉTODOS	21
a) Materiais	

- 1 – Anticorpos e Reagentes
- 2 – Animais
- 3 – Soluções utilizadas nos experimentos

b) Metodologia

- 1 – Procedimentos cirúrgicos
- 2 – Homogeneização e Determinação do conteúdo de proteínas totais
 - 2.1 – Imunoprecipitação
 - 2.2 – *Immunoblotting*
- 3 – Fracionamento subcelular
- 4 – *Stripping*
- 5 – PCR – semiquantitativo
 - 5.1 – Coleta das amostras
 - 5.2 – Extração de RNA total
 - 5.3 – Obtenção do cDNA e reação de amplificação
 - 5.4 – PCR semiquantitativo
- 6 – Imunohistoquímica
 - 6.1 – Fixação e processamento do material
 - 6.2 – Reação de Imunoperoxidase
 - 6.3 – Reação de Imunofluorescência
- 7 – *Time-Courses*
 - a) Imunoprecipitação e *Immunoblotting*
 - b) Fracionamento subcelular
 - c) RT-PCR e PCR
 - d) Imunohistoquímica
 - Imunoperoxidase
 - Imunofluorescência
- 8 – Análise estatística

IV – RESULTADOS	43
- Fosforilação em tirosina dos receptores AT1 e AT2 após estímulo com AII - Fosforilação em tirosina de JAK2 após estímulo com AII - Fosforilação em tirosina das fosfatases SHP1 e SHP2 após estímulo com AII - Avaliação da expressão proteica de AT1, AT2, JAK2, SHP1 e SHP2 após estímulo com AII - Associação entre os receptores AT1 ou AT2 e JAK2 após estímulo com AII - Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT1 após estímulo com AII - Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT2 após estímulo com AII - Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e JAK2 após estímulo com AII - Migração transcelular de JAK2 após estímulo com AII - Expressão e localização de SOCS3 em tecido cardíaco após estímulo com AII - Indução da expressão do RNAm da proteína SOCS3 após estímulo com AII - Indução da expressão da proteína SOCS3 após estímulo com AII - Associação entre SOCS3 e as fosfatases SHP1 e SHP2 após estímulo com AII - Associação entre SOCS3 e JAK2 após estímulo com AII - Migração transcelular de SOCS3 após estímulo com AII - Associação entre SOCS3 e JAK2 – estudo da migração transcelular de SOCS3 induzida por AII - Associação entre SOCS3 e JAK2 – co-localização através de microscopia de fluorescência	
V – DISCUSSÃO	73
VI – CONCLUSÃO	91
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
VIII – ANEXOS	121

RESUMO

O hormônio angiotensina II (AII) exerce efeitos hemodinâmicos, controladores da função renal e do equilíbrio hidroeletrolítico, e também efeitos remodeladores, mitogênicos e de crescimento no sistema cardiovascular. Suas ações são exercidas através de uma classe de receptores acoplados à proteína G heterotrimérica, designados AT1 e AT2, os quais apresentam sete segmentos transmembrana. A maioria dos efeitos conhecidos da AII são exercidos através do subtipo de receptor AT1. O receptor AT2 apresenta, em geral, efeitos antagônicos aos de AT1, promovendo inibição do crescimento celular, diferenciação e apoptose, através da ativação de proteínas tirosina fosfatases que inibem as vias de sinalização ativadas por AT1.

Além das clássicas vias ativadas por hormônios que sinalizam através de receptores acoplados à proteína G, a AII, através de AT1, é capaz de ativar a via de sinalização intracelular JAK/STAT, a qual é também ativada por hormônios que apresentam receptores com atividade tirosina quinase intrínseca. Esta via é responsável pela transmissão do sinal diretamente da superfície celular para o núcleo, promovendo assim o controle da transcrição gênica e o crescimento celular. Existem na literatura vários relatos a respeito da ativação da via JAK/STAT pela AII, mas pouco é conhecido sobre os mecanismos de controle da transmissão do sinal através desta via.

No presente estudo, examinamos o papel da AII sobre os mecanismos de ativação e regulação da via de sinalização intracelular JAK/STAT em coração de ratos adultos. Nossos resultados demonstraram que, após a ligação da AII ao receptor AT1, ocorre fosforilação da fosfatase SHP2, a qual se liga a JAK2, translocando-o do citosol em direção à mem-

brana a fim de formar o complexo AT1-SHP2-JAK2. JAK2 se autofosforila e promove a fosforilação em tirosina de AT1. AT2 também é ativado, promovendo a ativação da fosfatase SHP1. Após AT1 e JAK2 atingirem um pico de fosforilação, SHP1 liga-se a JAK2 e a AT1, desfosforilando-os e assim, inibindo a sinalização. Verifica-se que SHP2 é uma fosfatase importante para a ativação da via JAK/STAT, enquanto que SHP1 constitui-se num dos mecanismos de controle negativo desta via, ao lado da internalização do receptor AT1. Um outro mecanismo possivelmente envolvido na inibição da via JAK/STAT é exercido através da proteína inibitória da sinalização, conhecida por SOCS3, a qual, após estímulo com AII sofre aumento em seus níveis de expressão gênica e protéica. SOCS3 transloca-se do núcleo em direção ao citosol e à membrana e, num período mais tardio, encontra-se altamente expressa e associada a JAK2. Isto possivelmente faz com que JAK2 seja inibido e, transitoriamente, deixe de transduzir o sinal proveniente do receptor presente na superfície celular para o núcleo. Logo, verificamos que a proteína SOCS3 constitui-se num mecanismo mais tardio de controle negativo da via JAK/STAT ativada pela AII, enquanto que SHP1 constitui-se num mecanismo precoce.

ABSTRACT

A complex interplay of tyrosine phosphorylation/dephosphorylation events accompanied by protein-protein association/dissociation participates in the activation and deactivation of the angiotensin II signal. In the present series of experiments, a complete characterization of the molecular dynamics of the angiotensin II signal in cardiac tissue of living animals is reported. Evaluation of signaling events was performed by immunoprecipitation, immunoblotting, immunohistochemistry and subcellular fractionation. Most of JAK2 immunoreactivity is detected associated with SHP2 in a cytosolic compartment and presenting a low tyrosine phosphorylation status. AT1, mostly located in a membrane compartment, presents low tyrosine phosphorylation and is associated with SHP1 while AT2 is associated with a restricted pool of JAK2, SHP1 and SHP2. Following angiotensin II stimulus, SHP1 dissociates from AT1 and AT2, which is followed by a rapid tyrosine phosphorylation of SHP2 that migrates together with JAK2 from the cytosolic compartment to a membrane – AT1 associated fraction. After 15-30 min of the angiotensin II pulse SHP1 becomes tyrosine phosphorylated and binds to JAK2, participating on its tyrosine dephosphorylation inducing its dissociation from AT1 and return to the cytosolic and the AT2-bound fraction. In parallel, SOCS-3 is induced by angiotensin II and after 20 minutes a rise on its protein levels is detected in a membrane fraction in association with JAK2.

Key words. Angiotensin II / AT1 / AT2 / JAK2 / Signal transduction / SOCS3.

Lista de abreviaturas

AII – Angiotensina II

AT1, AT2 – Receptores da AII 1 e 2

BSA – Soro de albumina bovino

Ca²⁺ - Cálcio

CIS – proteínas SH2 induzidas pelas citocinas

DTT – Ditioneítreitol

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

ERK – Quinase regulada pelo sinal extracelular

FAK – Quinase de adesão focal

GH – Hormônio de crescimento

Gq – Proteína Gq

H₂O DEPC – Água desionizada previamente tratada com DEPC – dietilpirocarbonato

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

i.p. – Intraperitoneal

IGF – Fator de crescimento parecido com insulina

IL-3, IL-6 – Interleucina 3, -6

IP₃ – Inositol trifosfato

IRS-1, IRS-2 – Substratos 1 e 2 do receptor de insulina

JAK – Proteína Janus kinase

JH1 – 7 – Domínios de homologia JAK conservados 1 a 7

KDa – Quilo Dalton

LIF – Fator inibitório da leukemia

MAPK – Proteína quinase ativadora mitogênica

MKP-1 – Fosfatase da proteína MAPK

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

Na₃VO₄ - Ortovanadato de sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaF – Fluoreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NGF – Fator de crescimento do nervo

PBS – Tampão fosfato de sódio

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PI 3-K – Fosfatidil inositol 3 quinase

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PLC γ 1 – Fosfolipase C γ 1

PLA₂, PLC, PLD – Fosfolipases A₂, C e D

PMSF – Fenil metil sulfonyl fluoreto

PP2A – Fosfatase serina-treonina

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SEM – Erro padrão da média

.SH2 – *Src homology 2*

.SH2, SH3, PTB, PH – Domínios SH2, SH3, PTB, PH

.SHP1, SHP2 – Proteínas tirosina-fosfatases 1 e 2

SOCS – Proteína supressora da sinalização das citocinas

Src- Oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rorus

STAT – Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição gênica

TA – Temperatura ambiente

Trisma base – Hidroximetil amino metano

VSMC – Células musculares lisas vasculares

Lista de anticorpos utilizados em experimentos de *Immunoblot*

Anticorpo anti-AT1 – policlonal de coelho (sc 579)

Anticorpo anti-AT2 – policlonal de coelho (sc 9040)

Anticorpo anti-SHP1 – policlonal de coelho (sc 287)

Anticorpo anti-SHP2 – policlonal de coelho (sc 280)

Anticorpo anti-JAK2 – policlonal de coelho (sc 7729 para imunoprecipitação)

Anticorpo anti-JAK2 – policlonal de coelho (sc 278 para *immunoblotting*)

Anticorpo anti-SOCS3 – policlonal de coelho (sc 9023 para imunoprecipitação)

Anticorpo anti-SOCS3 – policlonal de cabra (sc 7009 para *immunoblotting*)

Anticorpo anti-*c-fos* – policlonal de coelho (sc 253)

Anticorpo anti-*c-jun* – policlonal de coelho (sc 1694)

Anticorpo anti-H1 – policolonal de cabra (sc 8616)

Anticorpo anti-pY pY 20– monoclonal de camundongo (sc 508)

Anticorpo anti-FITC – burro anti-cabra FITC (sc 2024)

Anticorpo anti-Rodamina – burro anti-coelho R (sc 2091)

sc- número de catálogo Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Lista de Quadros

Quadro 1 – Lista dos *primers* utilizados para a reação de PCR

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema das condições de amplificação para os genes da β -actina e SOCS3

Figuras 2 – Testes PCR

Figura 2a – Optimização de parâmetros para amplificação do *primer* para SOCS3

Figura 2b – Análise estatística

Figuras 3 – Fosforilação em tirosina dos receptores AT1 e AT2 após estímulo com AII

Figura 3 a – Fosforilação em tirosina de AT1 após estímulo com AII

Figura 3 b – Fosforilação em tirosina de AT2 após estímulo com AII

Figura 4 – Fosforilação em tirosina de JAK2 após estímulo com AII

Figuras 5 – Fosforilação em tirosina das fosfatases SHP1 e SHP2 após estímulo com AII

Figura 5 a – Fosforilação em tirosina de SHP1 após estímulo com AII

Figura 5 b – Fosforilação em tirosina de SHP2 após estímulo com AII

Figuras 6 – Avaliação da expressão protéica de AT1, AT2, JAK2, SHP1 e SHP2 após estímulo com AII

Figura 6 a - Expressão de AT1 após estímulo com AII

Figura 6 b – Expressão de AT2 após estímulo com AII

Figura 6 c – Expressão de JAK2 após estímulo com AII

Figura 6 d – Expressão de SHP1 após estímulo com AII

Figura 6 e – Expressão de SHP2 após estímulo com AII

Figuras 7 – Associação entre os receptores AT1 ou AT2 e JAK2 após estímulo com AII

Figura 7 a – Associação entre AT1 e a quinase JAK2 após estímulo com AII

Figura 7 b - Associação entre AT2 e a quinase JAK2 após estímulo com AII

Figuras 8 – Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT1 após estímulo com AII

Figura 8 a – Associação entre SHP1 e AT1 após estímulo com AII

Figura 8 b – Associação entre SHP2 e AT1 após estímulo com AII

Figuras 9 – Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT2 após estímulo com AII

Figura 9 a – Associação entre SHP1 e AT2 após estímulo com AII

Figura 9 b – Associação entre SHP2 e AT2 após estímulo com AII

Figuras 10 – Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e JAK2 após estímulo com AII

Figura 10 a – Associação entre SHP1 e JAK2 após estímulo com AII

Figura 10 b – Associação entre SHP2 e JAK2 após estímulo com AII

Figura 11 – Caracterização da dinâmica de translocação subcelular de JAK2 após estímulo com AII

Figuras 12 – Localização celular de SOCS3 em coração de ratos estimulados com AII

Figuras 12 a, b – Localização de SOCS3 em átrios de animais Controle

Figuras 12 c, d – Localização de SOCS3 em ventrículos de animais Controle

Figuras 12 e, f – Localização de SOCS3 em átrios de animais estimulados com AII

Figuras 12 g, h – Localização de SOCS3 em ventrículos de animais estimulados com AII

Figura 13 – Expressão gênica de SOCS3 induzida por AII

Figura 14 – Expressão protéica de SOCS3 induzida por AII

Figuras 15 – Associação entre SOCS3 e as fosfatases SHP1 ou SHP2 após estímulo com AII

Figura 15 a – Associação entre SOCS3 e SHP1 após estímulo com AII

Figura 15 b – Associação entre SOCS3 e SHP2 após estímulo com AII

Figura 16 - Associação entre SOCS3 e JAK2 após estímulo com AII

Figura 17 – Caracterização da dinâmica de translocação subcelular de SOCS3 após estímulo com AII

Figura 18 – Localização subcelular da associação entre JAK2 e SOCS3 após estímulo com AII

Figuras 19 – Imunofluorescência de dupla marcação de JAK2 e SOCS3 em coração de ratos estimulados com AII.

Figuras 19 a, b – Localização da associação entre SOCS3 e JAK2 em ventrículos de animais Controle

Figuras 19 c, d – Localização da associação entre SOCS3 e JAK2 em ventrículos de animais tratados com AII

I – INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

O hormônio angiotensina II (AII) é um peptídeo biologicamente ativo, que apresenta efeitos pleiotrópicos sobre os sistemas nervoso, cardiovascular e endócrino, os quais são iniciados pela ativação de receptores específicos ligados à proteína G, localizados na membrana plasmática (BAKER and ACETO, 1990; LINDPAINTNER and GANTEN, 1991; WEBER and BRILLA, 1991).

As propriedades de fator de crescimento da AII têm sido demonstradas em uma variedade de tipos celulares. Em cultura de células musculares lisas vasculares (VSMC), a AII induz hipertrofia, aumenta a formação de matriz extracelular e, sob certas condições, causa hiperplasia (GIBBONS et al., 1992). Tais efeitos mitogênicos podem participar da fisiopatologia de condições patológicas, como hipertensão e aterosclerose (DZAU, 1987).

❖ Mecanismos moleculares de ação da AII

A resposta celular à AII é direcionada por receptores acoplados à proteína G. Até o momento, quatro subtipos de receptores para AII são conhecidos mas, dois deles chamados AT1 e AT2 são os mais bem caracterizados (TIMMERMANS et al., 1991). Embora AT1 e AT2 sejam igualmente distribuídos em cardiomiócitos (MATSUBARA et al., 1994; REGITZ-ZAGROSEK et al., 1995a; SECHI et al., 1992), vários estudos têm revelado que a maior parte das respostas da AII é mediada pelo subtipo AT1 (DOSTAL and BAKER, 1992; HANATANI et al., 1995; ITO et al., 1995; REGITZ-ZAGROSEK et al., 1994; REGITZ-ZAGROSEK et al., 1995b; SADOSHIMA and IZUMO, 1996).

Duas isoformas de AT1 são descritas em roedores: AT1a e AT1b, os quais apresentam mais de 95% de identidade em sua sequência de aminoácidos (TIMMERMANS et al., 1991). AT1 é uma glicoproteína possuidora de sete segmentos transmembrana composta por 359 aminoácidos (TIMMERMANS et al., 1993). O domínio transmembrana na extensão amino-terminal e os segmentos no primeiro e terceiro *loops* extracelulares são responsáveis pelas interações do receptor com a proteína G (BHAT et al., 1994). A internalização deste receptor acoplado à proteína G envolve a fosforilação do receptor, a qual pode ser mediada, em parte, por elementos presentes nas cavéolas (IHLE et al., 1994; SCHINDLER and DARNELL, 1995). AT1 pode ser fosforilado em resíduos de serina e treonina em resposta a AII (KAI et al., 1994) e também em resíduos de tirosina através de tirosina quinases, incluindo a família *Janus kinase* (JAK e Tyk), família Src quinases e a quinase de adesão focal (FAK) (TOUYZ and SCHIFFRIN, 2000).

O receptor AT2 é normalmente expresso em altos níveis em tecidos fetais e diminui rapidamente após o nascimento (NOVAK et al., 1996b). Em adultos, a expressão de AT2 é detectável no pâncreas, coração, rim, adrenais, cérebro e vasculatura (GUPTA et al., 1996; OPPERMANN et al., 1996). Também é um receptor que atravessa a membrana plasmática 7 vezes, está acoplado à proteína G, apresenta 363 aminoácidos e possui baixa homologia com AT1 (aproximadamente 32%) (ZHUANG et al., 1994). Embora as vias de sinalização e os papéis funcionais de AT2 ainda não estejam muito claros, esses receptores parecem ser regulados por cátions intracelulares, particularmente o Na^+ (ALI et al., 1997a) e podem antagonizar, sob condições fisiológicas, os efeitos mediados por AT1 (BHAT et al., 1995; MURPHY et al., 1991) por inibirem o crescimento celular e por induzirem apoptose e vasodilatação (FENG et al., 1997; IHLE, 1996; SAYESKI et al., 1998).

Os efeitos inibitórios de crescimento de AT2 parecem estar associados com a ativação de uma série de fosfatases, incluindo a proteína tirosina fosfatase SHP1 (BEDECS et al., 1997; LEHTONEN et al., 1999), a fosfatase da proteína MAPK, MKP-1 (HORIUCHI et al., 1997; YAMADA et al., 1996), e a fosfatase serina-treonina 2A, PP2A (SHENOY et al., 1999), o que resulta na inativação do receptor AT1-, e /ou da quinase regulada pelo sinal extracelular ativada pelo fator de crescimento (ERK). SHP1 (anteriormente chamada PTP1C, SH-PTP1C, SHP ou HCP) (ADACHI et al., 1996), é uma tirosina fosfatase citosólica que contém dois domínios citoplasmáticos *Src homology 2* (SH2) e que está envolvida na regulação negativa de um amplo espectro de receptores tirosina quinases, assim como c-Kit (PAULSON et al., 1996; YI and IHLE, 1993), receptor de EGF (Tomic et al., 1995), receptores de citocinas, como interleucina-3 (IL-3) (YI and IHLE, 1993) e outros. Dado ao amplo espectro de sua interação com receptores de fatores de crescimento, acredita-se que a fosfatase SHP1 esteja envolvida na via de sinalização intracelular de AT2 que interage negativamente com a via de sinalização de AT1 (CUI et al., 2001).

A AII liga-se a ambos os receptores com similar afinidade. Logo, a resposta celular é dependente do nível de expressão e/ou responsividade de ambos os seus receptores independentemente. Sabe-se que a expressão de AT2 é potencializada sob condições de prolongada estimulação com AII, já que AT2 não sofre internalização após ligar-se à AII (HEIN et al., 1997) como acontece com AT1 (HUNYADY, 1999; ISHIZAKA et al., 1997; SMITH et al., 1998; THOMAS, 1999). Dados existentes na literatura demonstram que após a ligação da AII, o receptor AT1 sofre rápida taquifilaxia e dessensibilização, uma vez que a administração repetida de AII falha em promover uma resposta comparável à inicial (MOELLENHOFF et al., 2001).

O bloqueio de AT1 é acompanhado por um aumento nos níveis circulantes de AII e seus metabólitos, possivelmente resultando na estimulação de AT2, o qual contrabalança os efeitos proliferativos e de crescimento de AT1.

Enquanto a AII induz vasoconstrição, crescimento e migração celular, produção de componentes da matriz extracelular, e inflamação via receptores AT1, promove apoptose, e inibe a proliferação e hipertrofia celular via AT2 (ALLEN et al., 2000; SIRAGY, 2000). Portanto, as respostas vasculares integradas da AII são o resultado das ações combinadas mediadas por AT1 e AT2.

A AII diretamente estimula a frequência e a contratilidade cardíacas, e o crescimento de fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos (SADOSHIMA and IZUMO, 1993a; SCHUNKERT et al., 1995; WONG et al., 1993). Também ativa a transcrição de proto-oncogenes ou *early inducible genes*, como *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *jun B* e *Egr-1*, que codificam proteínas controladoras da expressão de elementos da matriz extracelular (como colágeno e fibronectina), e fatores de crescimento (como o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de transformação de crescimento- β) (KANG et al., 1996; KIM et al., 1995b; SADOSHIMA and IZUMO, 1993b). A ativação dos receptores de citocina e AT1 leva a um rápido aumento no RNAm de *c-fos*. O bloqueio de AT1 por meios farmacológicos inibe a expressão destes genes (KIM et al., 1995a). É por isso que o bloqueio deste receptor (Losartan) ou até mesmo de seu ligante (inibidor da enzima conversora de AII) têm tido grande utilidade clínica no controle da hipertensão arterial (MARRERO et al., 1997).

As vias de sinalização levando à produção de *c-fos* são muito bem definidas. Uma delas é usada por receptores que apresentam atividade tirosina quinase e que ativam uma cascata intracelular, a qual age ligando proteínas tirosina quinases à quinases serina/treonina (DUFF et

al., 1995). Uma outra, mas direta via de sinalização, é estimulada pelas citocinas, assim como os interferons (SCHINDLER and DARNELL, 1995), e ocorre após a ligação do ligante ao receptor, ativando a via JAK/STAT.

A ligação da AII a seu receptor AT1 inicia várias vias de transdução de sinal, as quais levam a efeitos vasculares de curto prazo, como contração, e de longo prazo, como crescimento e migração celular, deposição de matriz extracelular e inflamação. Os processos de sinalização são multifásicos com distintas características temporais. Eventos de sinalização imediatos, iniciais e tardios ocorrem dentro de segundos, minutos e horas, respectivamente. A fosforilação da fosfolipase C (PLC) e a ativação da Src induzida pela AII, ocorrem dentro de segundos e se constituem em eventos imediatos. A ativação da fosfolipase A2 (PLA₂), fosfolipase D (PLD), tirosinas quinases e MAPKs ocorrem dentro de minutos, sendo considerados processos iniciais, enquanto que a geração de stress-oxidativo, expressão de proto-oncogenes, e síntese protéica, ocorrem dentro de horas, constituindo-se nos eventos tardios da sinalização da AII (TOUYZ and SCHIFFRIN, 2000).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que, em adição às citocinas, hormônios de crescimento (GOUILLEUX et al., 1995; WOOD et al., 1995), fatores de crescimento PDGF (NOVAK et al., 1996a) e EGF (LEAMAN et al., 1996), prolactina (GOUILLEUX et al., 1994) e leptina (BAUMANN et al., 1996; GHILARDI et al., 1996), também o hormônio AII através de seu receptor AT1 é capaz de promover a ativação da via JAK/STAT (BHAT et al., 1994; MARRERO et al., 1995b; MASCARENO et al., 1998).

A via JAK/STAT ativa genes iniciais de resposta ao crescimento e pode se constituir em um dos mecanismos pelos quais a AII influencia o crescimento, o remodelamento e o reparo cardíaco e vascular (BERK and CORSON, 1997; HEFTI et al., 1997).

Ativação da via JAK/STAT

A ativação da via JAK/STAT pela AII foi observada em células musculares lisas vasculares (MARRERO et al., 1995b), fibroblastos cardíacos (BHAT et al., 1994), células musculares cardíacas (MASCARENO et al., 1998) e tecido cardíaco *in vivo* (VELLOSO et al., 1996). Os componentes da via JAK/STAT encontram-se em estado latente no citoplasma de células não estimuladas. Embora AT1 não apresente atividade tirosina quinase intrínseca, ele participa da indução da fosforilação em tirosina de outras proteínas e, através de tal mecanismo, estimula o crescimento celular (GEISTERFER et al., 1988; NAFTILAN et al., 1989; TAUBMAN et al., 1989). AT1 pode se associar com e participar da fosforilação e ativação da tirosina quinase intracelular JAK2 (ALI et al., 1997a; MARRERO et al., 1995b; MARRERO et al., 1998). JAK2 é um dos membros da família *Janus kinase* de proteínas tirosina quinases.

- Família *Janus kinase* (JAKs)

A família *Janus kinase* (JAK) é composta por 4 membros, até então conhecidos: JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2 (IHLE, 2001), com pesos moleculares que variam entre 120 a 130 KDa e, com exceção de JAK3, todas são ubiquamente expressas (LEONARD and O'SHEA, 1998). São proteínas que apresentam 7 domínios de homologia JAK conservados (JH1-7). A porção carboxi-terminal destas moléculas inclui um domínio catalítico funcional (JH1) imediatamente precedido por um domínio pseudoquinase (JH2). A função do domínio JH2 ainda é incerta. Enquanto alguns dados sugerem que este domínio iniba a atividade quinase da JAK (FRANK et al., 1994), outros sugerem que esta região possa funcionar como um sítio potencial para o recrutamento das STATs (FUJITANI et al., 1997). Os domínios JH amino-terminal

constituem o domínio FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) e medeiam a associação com os receptores (KISSELEVA et al., 2002). Não possuem domínios transmembrana nem domínios SH2, SH3, PTB ou PH. Por não possuírem o domínio SH2, estas proteínas não conseguem ligar-se diretamente ao receptor AT1 da AII. As proteínas JAK são mediadores chave da expressão do RNAm e são caracterizados como “genes iniciais de resposta ao crescimento”.

Subsequentemente à ativação das JAKs, ocorre a fosforilação de proteínas consideradas seus substratos, pertencentes à família das STATs (DARNELL et al., 1994).

- **Proteínas transdutoras do sinal e ativadoras da transcrição gênica – STATs**

As proteínas STAT são fatores de transcrição citoplasmáticos originalmente identificados como parte das vias de transdução de sinal das citocinas. Recentemente, verificou-se que uma grande variedade de ligantes pode também ativar membros da família STAT. As STATs encontram-se em estado latente no citoplasma de células não estimuladas (DARNELL, 1997). Estas proteínas estão envolvidas em várias funções biológicas de transformação celular, desenvolvimento, diferenciação, imunidade e apoptose (LEONARD and O'SHEA, 1998). Estruturalmente, possuem um sítio de fosforilação em tirosina altamente conservado, um domínio SH2, um domínio de ligação ao DNA (DNA-binding) e um domínio de transativação.

Através de seu domínio SH2, as proteínas STAT ligam-se às JAKs fosforiladas. Uma vez ligadas, as STATs são fosforiladas pelas JAKs, dissociam-se delas e formam homo ou heterodímeros. Os dímeros das STATs translocam-se para o núcleo onde interagem com elementos específicos do DNA nas regiões promotoras de genes alvos regulando portanto, a transcrição gênica (DARNELL, 1997). Portanto, a via de sinalização JAK/STAT constitui-se numa via de

ligação direta entre o receptor de membrana e o núcleo a fim de ativar a transcrição de genes alvos.

A família Src de tirosina quinases também está implicada na fosforilação e ativação das proteínas STAT (FENG et al., 1997; HARPUR et al., 1992; IHLE, 1996; PAXTON et al., 1994; SAYESKI et al., 1998). Smit e colaboradores (SMIT et al., 1996) demonstraram que, em contraste à fosforilação de STAT1 induzida pela AII (WONG et al., 1993), a fosforilação de STAT3 em VSMC não requer JAK2 nem a proteína p59 Lyn, mas sim a proteína p60 *c-Src*.

As JAKs, em adição à fosforilação das STATs, também podem interagir com várias outras proteínas. JAK1 e JAK2 podem associar-se e sinalizar através de IRS-1 e IRS-2, os quais promovem a ativação da PI 3-K (JOHNSTON et al., 1995; SAAD et al., 1996). JAK2 associa-se com Grb2, Sos (CHAUHAN et al., 1995) e Vav (MATSUGUCHI et al., 1995). JAK1 e JAK2 podem se associar com STAM e induzir sua fosforilação (TAKESHITA et al., 1997), o que leva à indução de *c-myc*, e também com SHP2, que pode então se associar com Grb2 (SENGUPTA et al., 1996; YIN et al., 1997).

Estudos em cultura de células cardiovasculares demonstraram que JAK2 e Tyk2 são fosforiladas após 5 minutos do estímulo com AII (DOSTAL et al., 1997; MARRERO et al., 1995a). A fosforilação de STAT1 e STAT2 em resposta à AII é máxima por aproximadamente 15 minutos, enquanto que STAT5b é ativada dentro de 30 a 60 minutos. Já STAT3 tem sua fosforilação detectada aproximadamente 60 minutos após estímulo com AII (KODAMA et al., 1998; MARRERO et al., 1995a; McWHINNEY et al., 1998).

Marrero e colaboradores (MARRERO et al., 1995b) e Ali e colaboradores (ALI et al., 1997a), demonstraram que, em contraste ao paradigma existente para os receptores de citocina (IHLE et al., 1994; LEONARD and O'SHEA, 1998), a associação entre JAK2 e AT1 é depen-

dente do ligante (MARRERO et al., 1995b; McWHINNEY et al., 1997). A quinase JAK2 precisa estar catalicamente ativa (fosforilada) para se associar a AT1, uma vez que a inibição de JAK2 por meios farmacológicos ou por uma proteína JAK2 dominante-negativa significativamente reduz esta associação (ALI et al., 1997a). Estudos de Sayeski e colaboradores (SAYESKI et al., 2001), demonstraram que para haver co-associação entre JAK2 e AT1 é necessário o domínio ²³¹*YRFRR* localizado na porção amino-terminal de JAK2.

A ligação de JAK2 ao receptor AT1 é necessária para a fosforilação de JAK2 (ALI et al., 1997a). A inibição da ligação de JAK2 ao receptor AT1 coincide com a inibição da fosforilação em tirosina de JAK2 (ALI et al., 1998). Recentemente, demonstrou-se que a associação entre JAK2 e AT1, induzida pela AII, é mediada pelo domínio *YIPP* encontrado dentro da porção carboxi-terminal de AT1 (aminoácidos 319-322). Receptores AT1 com deleções ou mutações na tirosina 319 presente neste domínio, são incapazes de mediar a fosforilação de JAK2 dependente do ligante (ALI et al., 1997a). O domínio *YIPP* foi originalmente identificado em receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) como um sítio de ligação fosforilado em tirosina para domínios SH2 da fosfolipase C γ 1 (PLC γ 1) (ERIKSSON et al., 1995; VALIUS et al., 1993). Este mesmo domínio é também ativado de maneira dependente da AII e fosforilado em tirosina. A ligação é mediada pelos dois domínios SH2 da carboxila-terminal de PLC γ 1 (VENEMA et al., 1998) ao domínio *YIPP*. Somente proteínas que apresentem domínios SH2 podem se ligar ao domínio *YIPP*.

Recentemente, duas proteínas tirosina-fosfatases (PTPases) contendo domínios citoplasmáticos *Src homology 2* (SH2), chamadas SHP1 e SHP2 (ou anteriormente chamada SH-PTP1D, SHPTP2, SHPTP3, Syp ou PTP2C) (ADACHI et al., 1996) foram identificadas por interagirem com e regularem a atividade da proteína JAK2 em resposta à ativação de recepto-

res de citocinas. SHP1 promove o término da sinalização proliferativa induzida por receptores de citocinas, como receptores de interleucina-3 (IL-3) e eritropoietina (KLINGMULLER et al., 1995; YI et al., 1993) em células hematopoiéticas. A regulação negativa da via JAK/STAT induzida pela eritropoietina ocorre através da desfosforilação direta da quinase JAK2 por SHP1 (JIAO et al., 1996). SHP2, em contraste a SHP1 que age como um efetor negativo da sinalização mitogênica, freqüentemente funciona como um efetor positivo nas vias de sinalização estimuladoras de crescimento.

A AII é capaz de estimular a fosforilação em tirosina e, conseqüentemente, a ativação das fosfatases SHP1 e SHP2 em VSMC (ALI et al., 1997b; MARRERO et al., 1998). Tem-se documentado o importante papel de SHP2 na ativação de receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina quinase, como os receptores de PDGF, EGF, IGF, insulina e NGF (HAUSDORFF et al., 1995; KAZLAUSKAS et al., 1993; RIVARD et al., 1995; WRIGHT et al., 1997; XIAO et al., 1994). Nestas vias, SHP2 parece interagir diretamente com os receptores mitogênicos via seus dois domínios SH2. Em células hematopoiéticas, SHP2 tem mostrado formar um complexo com JAK2 em resposta a interleucinas, eritropoietina e prolactina (ALI et al., 1996; FUHRER et al., 1995; TAUCHI et al., 1995). Além disso, SHP2, JAK2 e o receptor de prolactina formam um complexo trimérico, consistente com a possibilidade de que SHP2 possa agir como uma proteína adaptadora neste contexto.

Uma característica compartilhada por várias vias de transdução de sinal é o acoplamento da ativação do receptor à fosforilação em tirosina de intermediários da sinalização. A fosforilação em tirosina é um processo rápido e reversível e é, portanto, o alvo de moléculas regulatórias.

Dados na literatura sugerem vários mecanismos que podem atuar como reguladores negativos da via JAK/STAT, tais como: ativação de fosfatases, como a fosfatase SHP1 que age

desfosforilando a proteína JAK2; internalização do receptor (endocitose do receptor por degradação lisossomal); degradação pelo sistema ubiquitina /proteosoma; ativação das proteínas PIAS e STATs dominante-negativas, além das proteínas CIS/SOCS (YASUKAWA et al., 2000).

- **Proteínas supressoras da sinalização das citocinas (SOCSs)**

Recentemente, uma família de proteínas inibidoras da sinalização das citocinas induzida pelas citocinas foi descrita. Esta família é composta por 8 membros, chamados de proteínas SH2 induzidas pela citocina (CIS) e proteínas supressoras da sinalização das citocinas (SOCS) 1 a 7 (HILTON et al., 1998; MASUHARA et al., 1997; MINAMOTO et al., 1997; YASUKAWA et al., 2000). A expressão das proteínas SOCS é induzida por várias citocinas e, uma vez expressas, promovem a regulação negativa da via JAK/STAT induzida pelas citocinas, modulando as respostas biológicas (MADIEHE et al., 2001). As proteínas SOCS apresentam um papel central na determinação da intensidade e na duração das respostas celulares de muitas citocinas e outros hormônios, como a insulina (SADOWSKI et al., 2001), leptina (BJORBAK et al., 2000), entre outros.

Estas proteínas compartilham uma estrutura similar, com um domínio SH2 central, uma região amino-terminal que é variável tanto no comprimento como na sequência de aminoácidos, e uma região de homologia na porção carboxi-terminal, chamada de SOCS-*box* (ENDO et al., 1997; NAKA et al., 1997; STARR et al., 1997; YASUKAWA et al., 1999). Esta região compreende uma sequência de 40 aminoácidos que são preservados dentro da família. Sua função é ainda desconhecida.

Dados da literatura demonstram que as proteínas SOCS podem ser induzidas através da ativação da via JAK/STAT pela leptina (BJORBAEK et al., 1998; EMILSSON et al., 1999), insulina (SADOWSKI et al., 2001), hormônio de crescimento (FAVRE et al., 1999; TOLLET-EGNELL et al., 1999) e prolactina (HELMAN et al., 1998; PEZET et al., 1999) e, quando expressas, inibem a sinalização e a atividade biológica de seus indutores (BJORBAEK et al., 1998; EMILSSON et al., 1999; FAVRE et al., 1999; HELMAN et al., 1998; PEZET et al., 1999; SADOWSKI et al., 2001; TOLLET-EGNELL et al., 1999).

A transcrição dos genes *socs* parece ser mediada, no mínimo parcialmente, pelos fatores de transcrição STAT (STARR and HILTON, 1999). Esta hipótese é suportada por várias evidências. Camundongos deficientes em STAT3 têm bloqueada a transcrição de SOCS1 (AUERNHAMMER et al., 1999). A versão dominante-negativa de STAT3 inibe a indução do RNAm de SOCS1 em resposta a IL-6 ou LIF em células M1 (NAKA et al., 1997). Percebe-se então, que as STATs podem formar uma ligação direta entre os receptores de citocinas e a indução de genes *socs* no núcleo.

Os transcritos que codificam SOCS1, SOCS2, SOCS3 e CIS estão frequentemente presentes nas células em baixos níveis, mas podem ser induzidos dentro de 15 a 30 minutos por uma grande variedade de citocinas, hormônios ou fatores de crescimento.

As proteínas SOCS inibem a sinalização das citocinas por mecanismos que não são mutuamente exclusivos. As proteínas SOCS1 e SOCS3 são capazes de se ligar ao *loop* de ativação das proteínas JAK e inibir sua atividade catalítica (ENDO et al., 1997; MASUHARA et al., 1997; NAKA et al., 1997; PEZET et al., 1999; SUZUKI et al., 1998; YASUKAWA et al., 1999). Ligando-se a este *loop*, SOCS1 e SOCS3 agem como pseudo-substratos impedindo a ligação de substratos quinases legítimos às JAKs (YASUKAWA et al., 1999). SOCS3, na via de sinalização das citocinas, liga-se a JAK2 exatamente no mesmo local em que as proteínas

STATs, bloqueando a sinalização (YASUKAWA et al., 1999). Isto faz com que as STATs não fosforilem e, portanto, não se transloquem para o núcleo para promover a transcrição gênica. CIS e SOCS2 não inibem a atividade quinase de JAK2 (PEZET et al., 1999; YASUKAWA et al., 1999). Ao contrário das SOCSs, as proteínas PIAS ligam-se e inibem as STATs.

Uma outra maneira pela qual as SOCS podem inibir a sinalização das citocinas e outros hormônios e fatores de crescimento é interagindo diretamente com seus receptores ativados. SOCS3 associa-se com o receptor de GH (hormônio de crescimento) fosforilado em tirosina através de seu domínio amino-terminal, mas não impede a ligação de STAT5 ao receptor (HANSEN et al., 1999).

As SOCS podem inibir diretamente a atividade de JAK2 ou direcionar o complexo receptor/JAK2 para o proteossoma (STARR et al., 1997). A interação física entre SOCS e seus alvos, em adição à promoção da degradação, contribuem para a regulação da via de sinalização JAK/STAT.

A via JAK/STAT no sistema cardiovascular

A via JAK/STAT é encontrada ativa quando há sobrecarga aguda de pressão em ratos *Wistar*. Neste modelo, onde a sobrecarga de pressão é induzida por constrição aórtica, a AII é capaz de ativar JAK2 e Tyk2 (PAN et al., 1997).

A ativação da via JAK/STAT está associada ao remodelamento cardíaco e vascular induzido pela AII na hipertensão, tão bem como nos processos inflamatórios que antecedem a aterosclerose (DOSTAL et al., 1997).

Diversas alterações na transdução do sinal têm sido descritas em células cardiovasculares durante a hipertensão (TOUYZ and SCHIFFRIN, 1993; WITTE and LEMMER, 1996). Vários componentes da via JAK/STAT foram encontrados ativados durante a isquemia miocárdica (MASCARENO and SIDDIQUI, 2000).

O aumento na expressão e na ativação das proteínas STAT na neointima resulta em danos na artéria carótida, sugerindo que estes fatores de transcrição possam também contribuir para o desenvolvimento de danos vasculares (DOSTAL et al., 1997). A duração e o tempo de ativação das proteínas STAT promovido pelas quinases JAK, dependem do tempo em que estas quinases permanecerem ativas (fosforiladas).

A super-ativação das proteínas JAK e *c-Src* talvez seja o mecanismo mais comum para a fosforilação e ativação constitutiva das proteínas STAT. Supõe-se que a super-ativação destas proteínas ocorra por algum defeito no mecanismo de internalização do receptor após a ligação do ligante, como se observa em células neoplásicas (BROMBERG, 2002). Com isso, as proteínas JAK e *c-Src* passam a se acumular em níveis anormais no interior da célula promovendo a hiper-ativação das STATs.

Embora numerosos estudos tenham demonstrado o papel essencial das vias de sinalização intracelular na regulação da hipertrofia (CHIEN, 1999; McKINSEY and OLSON, 1999; SUGDEN, 1999), há poucos estudos sobre a ativação de um *feedback* negativo dessas vias. Desde que a ativação contínua das moléculas de sinalização possa ter efeitos deletérios sobre a função cardíaca, a atividade destas moléculas deve ser rigorosamente controlada.

Portanto, a caracterização dos eventos moleculares que levam ao término ou ao controle do sinal da AII no coração poderá fornecer novos alvos para medidas fármaco-terapêuticas em doença cardíaca isquêmica e hipertrófica.

II - OBJETIVOS

14

14

14

II - OBJETIVOS

Avaliar a dinâmica de associação e dissociação entre AT1 e AT2 e proteínas sinalizadoras citoplasmáticas como JAK2, SHP1, SHP2 e SOCS3 em coração de ratos tratados com AII.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

III - Materiais e Métodos

a) Materiais

1. Anticorpos e Reagentes

Utilizaram-se anticorpos policlonais contra os receptores AT1 e AT2 da AII, contra JAK2, SHP1, SHP2 e SOCS3, e anticorpos monoclonais contra fosfotirosina – pY (4G10) e contra histona H1. Além disso, utilizaram-se anticorpos biotinilados e conjugados com peroxidase para imunohistoquímica, e anticorpos conjugados com fluoresceína e rodamina, os quais foram utilizados para imunofluorescência. Uma lista com as características de todos estes anticorpos é apresentada na página XV. Todos os anticorpos foram obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e para *immunoblotting* foram obtidos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Proteína A-Sepharose 6MB foi obtida da Pharmacia (Uppsala, Sweden). ¹²⁵I-Protein A foi obtida da Amersham Corp. (Aylesbury, UK) e membranas de nitrocelulose (BA85; 0.2mm) foram obtidas da empresa Schleicher and Schuell. Anestésico tiopental sódico foi obtido da empresa Cristália (Itapira, SP, Brasil). Reagente Trizol e outros utilizados em RT-PCR e PCR e *primers* para SOCS3 e β -actina (quadro 1) foram obtidos da Life Technology (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). PMSF, aprotinina, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glicerol, angiotensina II, soro de albumina bovino (BSA-fraction V) e demais reagentes utilizados foram obtidos da empresa Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA).

Quadro 1 – Primers para SOCS3 utilizados em experimentos de PCR semiquantitativo.

Primers	Sequência	Produto (pb)
β -actina	s- 5' - TTT GGG AGG GTG AGG GAC TTC 3'	
	as- 5' - TGA GCG CAA GTA CTC TGT GTG G 3'	489
	(Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)	
SOCS3	s- 5'- ACC TCT CTC CTC CAA CG - 3'	
	as- 5'- TGC TGG GCT AAC TGG - 3'	251
	(Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)	

s – iniciador sense

as – iniciador antisense

2. Animais

Para o presente estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar-Hannover provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 150 e 200 gramas. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 6 animais por unidade, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclos de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos

artificialmente. Tiveram água e ração Purina (contendo 2,3 mg de sódio por grama de ração) “*ad libitum*”.

Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas antes dos experimentos recebendo água “*ad libitum*”. Foram realizados estudos de *time-course* a fim de se investigar a fosforilação, a associação e a expressão de proteínas alvo do estudo em experimentos de *Western blot*. A localização de algumas proteínas alvo foi observada através de experimentos de imunohistoquímica (imunoperoxidase e imunofluorescência) e fracionamento subcelular. Foi também realizada a técnica de RT-PCR a fim de se investigar a presença do RNAm de proteínas em estudo durante *time-course* de tratamento com AII.

3. Soluções utilizadas nos experimentos

→ Soluções empregadas em experimentos de *Western blot*:

- *Solução tampão de extração*: Utilizada para homogeneização do tecido cardíaco e extração de proteínas. Composta de: 100 mM Tris base, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na_3VO_4 , 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina. Esta solução foi preparada em gelo e nele mantida durante todo o experimento. Na_3VO_4 e PMSF foram acrescentados ao tampão somente no momento de uso.

- *Tampão de Laemmli (5x)*: Utilizada para armazenar, em freezer, as proteínas extraídas e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para eletroforese. Composta de: 0.1 % Azul de Bromofenol, 1 M fosfato de sódio, pH 7.0, 50% glicerol e 10% SDS.

- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: Utilizada para lavagem das amostras após incubação com proteína A-sepharose 6 MB. Composta de: 100 mM Trisma base, 10 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 e 0.5% Triton X-100. Esta solução foi preparada em gelo e nele mantida durante todo o processo de lavagem das amostras.

- Solução tampão para SDS-PAGE, gel da fase de resolução “Resolving”: Utilizada para confecção do gel de resolução. Composta de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 750 mM Trisma base, pH 8.9 (ajustado com HCl).

- Solução tampão para SDS-PAGE, gel da fase de empilhamento “Stacking”: Utilizada para confecção do gel onde ocorre o empilhamento das proteínas. Composta de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 50 mM Trisma base, pH 6.7 (ajustado com ácido fosfórico).

- Solução tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Composta de: 200 mM Trisma base, 1.52 M glicina, 7.18 M EDTA e 0.4% SDS. Para uso, a solução foi diluída 1:4.

- Solução tampão para transferência: Utilizada na transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Composta de: 25 mM Trisma base, 192 mM glicina, 20% Metanol e 0.02% SDS para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantido à 4°C.

- Solução basal: Solução utilizada no manuseio da membrana de nitrocelulose após a transferência. Composta de: 150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0.02% Tween 20.

- Solução bloqueadora: Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose após a transferência a fim de diminuir ligações inespecíficas. Composta de: 5% BSA dissolvido em solução basal.

- Solução de anticorpo: Solução contendo anticorpos específicos para marcação de proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Composta de: 3% BSA dissolvido em solução basal mais os anticorpos utilizados nos experimentos na diluição estabelecida.

- Solução de Iodo (^{125}I): Solução que permite a visualização das bandas em autoradiografia. Composta de: 1% BSA dissolvido em solução basal mais 2 μCi de proteína A marcada com ^{125}I .

- Solução Tampão de Stripping: Composta de: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M β -mercaptoetanol, uréia, 0.1 mg/ml BSA.

- Solução Tampão STE para fracionamento subcelular: Solução utilizada em fracionamento subcelular a fim de se obter a separação das frações nuclear, de membrana e citosol. Composta de: 0.32 M sacarose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaF, 100 mM Pirofosfato de sódio, 100 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF e 0,1 mg/ml aprotinina.

- Solução Tampão T para fracionamento subcelular: Solução utilizada em fraciona -

mento subcelular a fim de se purificar a fração nuclear. Composta de: 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM EDTA, 10 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM pirofosfato de sódio e 0,1 mg/ml aprotinina.

Soluções empregadas em experimentos de imunohistoquímica:

- Solução de paraformaldeído 4 %: Solução utilizada para a fixação de fragmentos cardíacos (átrios e ventrículos). Composta de: 4 % paraformaldeído, tampão fosfato 0,2 M, pH 7.4, água desionizada, pH 7.4 (ajustado com NaOH).
- Solução tampão fosfato salina (PBS) 0.1 M, pH 7.4: Solução utilizada em experimentos de imunohistoquímica (reação de imunoperoxidase e imunofluorescência). Composta de: 0,2 M fosfato de sódio dibásico acrescida de 0,2 M fosfato de sódio monobásico até atingir pH 7.4. Diluída em 0,3 M NaCl (V:V).
- Solução bloqueadora da atividade da peroxidase endógena: Solução composta de: 1% peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diluído em PBS 0,1M, pH 7.4. Preparada no momento do uso e mantida no escuro.
- Solução bloqueadora para imunoperoxidase: Solução composta de: 3% BSA diluído em PBS 0,1M, pH 7.4.
- Solução bloqueadora para imunofluorescência: Solução composta de: 8% glicina, 2,5 % BSA, 2 % leite em pó desnatado, 4 ml PBS 0,1 M, pH 7.4.

- Solução de anticorpo: Solução composta de: 1% BSA diluída em PBS 0,1M, pH 7.4, à qual se adiciona o anticorpo na diluição específica.

- Hematoxilina de Harris: Solução utilizada para corar cortes utilizados em imunoperoxidase. Composta de: 2,5 g óxido de mercúrio, 5 g hematoxilina, 100 g alumínio de potássio, 30 ml ácido acético glacial. Volume completado para 1000 ml água destilada e mantido em frasco âmbar, preferencialmente em ambiente escuro.

Soluções empregadas em experimentos de RT-PCR e PCR:

- Solução para Reação de transcrição reversa (RT-PCR): Solução utilizada para obtenção da fita simples do DNA (cDNA). Composta de: 5x tampão RT (transcriptase reversa), 10 mM dNTP, 50 mM oligo-dT, 40 U/ μ l inibidor RNase Out, 200 U/ μ l enzima SuperScript (transcriptase reversa), 7 μ g RNA total e água DEPC para um volume final de 30 μ l.

- Solução para Reação de amplificação: Solução utilizada em PCR. Composta de: tampão 10 x, 1 mM dNTP, 50 mM $MgCl_2$, iniciador (*primer*) sense e antisense para SOCS3, iniciador (*primer*) sense e anti-sense para β -actina (controle interno), *taq polimerase*, cDNA e água DEPC, para um volume final de 25 μ l.

b) Métodos

1. Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (5 mg/100 g de peso, i.p.) e usados após 10-15 minutos, assim que a anestesia foi confirmada pela perda de reflexos corneanos. Tiveram a cavidade abdominal e torácica limpas com etanol 70%. À seguir, a cavidade abdominal foi aberta para exposição da veia cava inferior, através da qual receberam 0,02 ml de salina 0,9% ou AII 10^{-6} M previamente diluída em salina. Após períodos de tempo pré-determinados (*time-course*), a cavidade torácica foi aberta para retirada dos ventrículos, o qual foi lavado em tampão de extração ou salina 0,9 % a fim de se remover todo o excesso de sangue.

2. Homogeneização e Determinação do conteúdo de proteínas totais

O material extraído conforme descrito no item 1 foi submetido a homogeneização em tampão de extração, à 4 °C, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos celulares foram então centrifugados ($15.500 \times g$, 20 minutos, 4 °C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida à imunoprecipitação e *immunoblotting* com anticorpos específicos.

2.1. *Imunoprecipitação*

Após determinação do conteúdo de proteínas totais, o sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação *overnight*, à 4 °C, com anticorpos específicos. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A sepharose 6 MB por 2 horas à 4 °C.

Após isso, as amostras foram centrifugadas (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) e submetidas à lavagem com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 minutos cada (15.500 x g, 4 °C). Em seguida, as proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mmol/l de DTT e aquecidas em água fervente por 5-10 minutos. À seguir, quantidades iguais de proteína (5 mg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos à 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, como descrito (TOWBIN et al., 1979). A ligação dos anticorpos à proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente (TA). A membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpo, e então, lavada por 15 minutos com solução basal. Após, a membrana foi incubada com 5 µCi de [¹²⁵I] Proteína A (30 µCi/µg) em solução de iodo por 120 minutos à TA e lavada novamente por 15 minutos, como descrito anteriormente. A proteína A [¹²⁵I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Para isso, o cassete contendo a membrana e o filme foram mantidos à temperatura de -80 °C e, após 12 - 120 horas, o filme foi revelado de maneira convencional. As bandas identi-

ficadas na autoradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um scanner de mesa ColorPage HR6X (Genius) e o programa Scion Image (Scioncorp).

2.2. Immunoblotting

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (200 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE conforme descrito anteriormente (item 2.1).

3. Fracionamento subcelular

O material extraído conforme descrito no item 1, foi submetido a homogeneização em tampão STE à 4 °C, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. À seguir, essas amostras foram submetidas à centrifugação (1.000 x g, 25 minutos, 4 °C) a fim de se obter a separação das frações.

O *pellet* resultante, correspondente à fração nuclear foi ressuspendido em tampão T, mantido em gelo por 30 minutos, centrifugado (15.000 x g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante retirado e mantido em gelo. Com isso, obteve-se a fração nuclear.

O sobrenadante resultante da primeira centrifugação foi retirado e ultracentrifugado (100.000 x g, 60 minutos, 4 °C) a fim de se obter a fração citosólica, a qual foi retirada e ar-

mazenada em gelo, enquanto que o *pellet*, foi ressuspensionado em tampão STE mais 1% de Nonidet P-40, mantido em gelo por 20 minutos e ultracentrifugado (100.000 x g, 10 minutos, 4 °C), obtendo-se assim, a fração de membrana. Parte do sobrenadante da fração nuclear, citosólica e de membrana foi submetido à determinação do conteúdo de proteínas totais pelo método fotolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida à imunoprecipitação e *immunoblotting* conforme descrito em 2.1 e 2.2, respectivamente.

4. *Stripping*

Membranas já utilizadas em experimentos anteriores foram incubadas com solução de *stripping* em recipiente plástico fechado, à 60 °C (banho-maria), por 60 minutos. Esta solução foi descartada e adicionou-se às membranas 1 M Tris-HCl, pH 7.5, durante 30 minutos, à TA, sob agitação contínua. As membranas foram então lavadas com solução basal e incubadas com solução bloqueadora, solução para anticorpo e para iodo conforme descrito anteriormente no item 2.1.

5. *PCR - semi quantitativo*

5.1. *Coleta de amostras*

Amostras de tecido cardíaco (ventrículos) foram coletadas após o *time-course* pré-estabelecido em condições livres de RNAses, onde todo o material cirúrgico e de armazenamento foi cuidadosamente lavado e esterilizado em estufa à 180 °C por 8 horas. Após a extração, as amostras foram lavadas em solução salina estéril para eliminar todo o excesso de san-

gue e então submersas em N₂ líquido para congelamento. Todo o material foi devidamente identificado e armazenado em freezer – 70 °C para posterior extração de RNA.

5.2. *Extração de RNA total*

Sob condições estéreis e livres de RNases, as amostras foram utilizadas para extração do RNA total com reagente Trizol (GIBCO BRL).

Os ventrículos foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados com Trizol (1 ml Trizol/50-100 mg de tecido). Após atingirem a temperatura ambiente, os homogeneizados foram transferidos para tubos estéreis onde permaneceram à TA por 5 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado (12.000 x g, 10 minutos, 4 °C) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionado 0,2 ml de clorofórmio/ml de Trizol, homogeneizado vigorosamente por 15 segundos e mantido por 3 minutos à TA, sendo à seguir centrifugado (12.000 x g, 15 minutos, 4 °C). O RNA encontrado na fase aquosa da solução contida no tubo foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 0,5 ml de álcool isopropil/ml de Trizol, homogeneizado e mantido à TA por 10 minutos para, em seguida, ser novamente centrifugado (12.000 x g, 10 minutos, 4 °C), a fim de que ocorresse a precipitação do RNA. O sobrenadante foi removido e, ao *pellet* contendo o RNA, foi adicionado 75 % etanol-DEPC (1 ml/ml de Trizol) e centrifugado (7.500 x g, 5 minutos, 4 °C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, após seco, foi ressuspenso em água estéril, livre de RNase (H₂O DEPC), e armazenado em freezer – 70 °C.

A quantidade de RNA das amostras foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (*A*₂₆₀) e a 280 nm (*A*₂₈₀) e a integridade do RNA isolado foi determinada pela razão *A*₂₆₀:*A*₂₈₀ e

por eletroforese em gel de agarose com visualização em luz ultra violeta, usando brometo de etídeo como corante.

5.3. Obtenção do cDNA e Reação de amplificação

Para sintetizar a fita simples do cDNA à partir do RNA total, realizou-se uma reação de transcrição reversa (RT-PCR). As condições para transcrição foram de 50 minutos à 42 °C e 15 minutos à 70 °C utilizando aparelho PTC –100 (MJ Research, Inc, Watertown, Mass). Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis e livres de RNAses.

Como controle negativo de contaminação com DNA genômico, uma reação de RT-PCR foi realizada à semelhança das condições descritas acima, com exceção da enzima SuperScript utilizada na solução da reação, que foi substituída por água DEPC.

5.4. PCR semiquantitativo

Para estabelecer o ponto ótimo de amplificação na fase exponencial da curva de amplificação, amostras de cDNA do mesmo animal foram utilizadas para uma reação de amplificação, sendo utilizado tubos em duplicata que foram retirados da reação de amplificação a cada um ou dois ciclos, iniciando no ciclo 20 e terminando no ciclo 38.

As condições de amplificação foram de 94 °C/5 minutos (denaturação inicial), 94 °C/1 minuto (denaturação), 52 °C/50 segundos (anelamento dos primers), 72 °C/1 minuto (extensão) e 72 °C/7 minutos (extensão final).

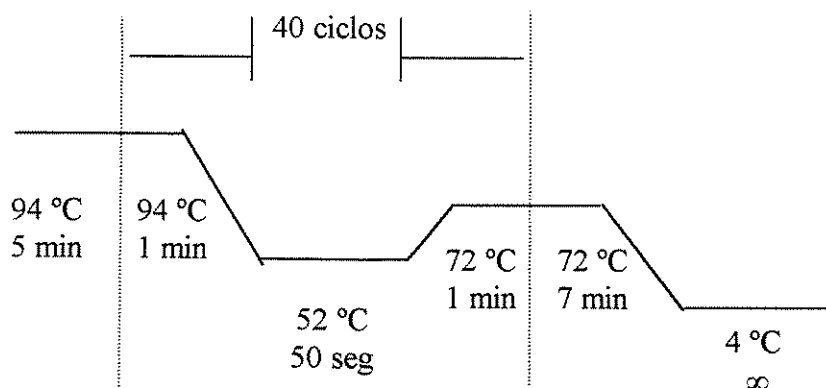
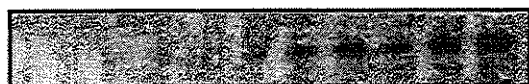


Figura 1 - Esquema das condições de amplificação para os genes da β -actina e SOCS3

O produto final da reação de amplificação foi submetido à eletroforese em gel 1,5 % de agarose, corado posteriormente com brometo de etídeo e visualizado em luz ultra-violeta através do aparelho TFX 35M UV Transluminator (Life Technologies, Inc, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD).

Foram também submetidas à estas condições de PCR, amostras controle negativo da reação, onde um volume de água foi adicionado em substituição ao volume de cDNA utilizado na reação de amplificação, para se investigar contaminação dos materiais usados no preparo da reação e amostras controle negativo do RT-PCR.

a)



22 24 26 27 28 29 30 32 34 36 38 ciclos

b)

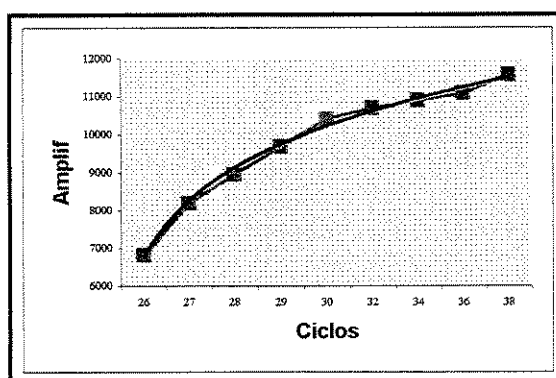


Figura 2 - a) Gel de agarose 1,5%. Teste com número crescente de ciclos a fim de se estabelecer o ponto inicial de exponenciação da curva de amplificação dos primers sense e antisense para SOCS3; b) Curva da regressão linear feita pelo programa INSTAT a fim de se verificar o ponto inicial de exponenciação de amplificação do primer para SOCS3, considerado como ótimo para a realização do experimento.

Após analisar-se o gráfico, estabeleceu-se o ciclo 30 como ótimo para a amplificação do primer para SOCS3. Para β -actina, o ciclo usado foi o 23.

6. Imunohistoquímica

6.1. Fixação e processamento do material

Após tratamento dos animais com 0,02 ml de salina 0,9% ou AII 10^{-6} M nos tempos pré-estabelecidos, átrios e ventrículos foram extraídos, lavados em salina 0,9 % estéril, a fim de se remover todo o excesso de sangue e mergulhados em solução de paraformaldeído 4 % por 12 horas, à TA.

O material foi então processado e incluído em parafina, conforme procedimento de rotina. As lâminas, previamente silanizadas, receberam cortes de 3 μm e foram armazenadas em estufa à 60 °C até o momento do uso. Estas lâminas foram utilizadas para reações de imunoperoxidase e imunofluorescência.

6.2. Reação de Imunoperoxidase

Cortes histológicos de átrios e ventrículos, obtidos conforme descrito no item 6.1, foram diafanizados e hidratados e então submetidos à imunoperoxidase, com a utilização de anticorpo específico, conforme descrito à seguir.

Inicialmente, foram lavados em tampão PBS por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e permeabilizados com 0,1 % de Triton X-100 diluído em PBS 0,1 M, pH 7.4, durante 10 minutos, à TA. Após lavagem em PBS, conforme descrito anteriormente, foram incubados com solução bloqueadora da atividade da peroxidase endógena, permanecendo no escuro por 30 minutos, à TA. Novamente foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada e submetidos à solução bloqueadora para imunoperoxidase por 1 hora, à TA, a fim de se evitar a ligação de proteínas não-específicas. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário (anti-*goat* SOCS3, diluição 1:20) em solução de anticorpo, em câmara umidecida e fechada, *overnight*, à 4 °C. Os cortes chamados de controle negativo receberam somente solução de anticorpo (sem adição de anticorpo). Após lavagem com PBS (3 vezes com intervalos de 5 minutos), os cortes foram incubados novamente com a solução de anticorpo contendo o anticorpo secundário específico biotilado (anti-*goat* biotilado, diluição 1:150), por 2 horas, à TA. Após lavagem com PBS, os cortes foram submetidas à incubação por 45 minutos com Estreptoavidina conjugada com

peroxidase (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA). Foram novamente lavados e submetidos à solução reveladora (kit Vectashield, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA) por 8 – 10 minutos, sendo à seguir, lavados com água destilada por 5 minutos. Realizou-se então, a contra-coloração com Hematoxilina de Harris por aproximadamente 30 segundos. Os cortes foram lavados com água destilada por 5 minutos e desidratados. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Entelan. A reação de peroxidase nas amostras foi detectada em microscópio óptico (Leica, Wetzlar, Alemanha) e as fotografias foram obtidas utilizando-se o sistema Focus Imagecorder Plus.

6.3. Reação de Imunofluorescência

Os cortes histológicos de átrios e ventrículos, obtidos conforme descrito no item 6.1, foram diafanizados e hidratados e então submetidos à imunofluorescência, com a utilização de anticorpo específico para SOCS3 e JAK2, conforme descrito à seguir.

Os cortes foram lavados em tampão PBS, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem), permeabilizados com 0,1 % de Triton X-100 diluído em PBS 0,1 M, pH 7.4, durante 10 minutos, à TA, e novamente lavados em PBS conforme descrito anteriormente para, em seguida, serem incubados com solução bloqueadora para imunofluorescência, por 60 minutos, à TA, a fim de se evitar ligações inespecíficas. Os cortes foram então incubados com o primeiro anticorpo primário (anti-*goat* SOCS3, diluição 1:20) em solução de anticorpo, em câmara úmida e fechada, *overnight*, à 4 °C. Os cortes chamados de controle negativo receberam somente solução de anticorpo (sem adição de anticorpo). Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados em solução de anticorpo contendo o segundo anticorpo primário (anti-*rabbit* JAK2, diluição 1:20) por 2 horas, à TA. À seguir, foram lavados e então, incubados com o primeiro anticorpo

secundário conjugado com isotiocianato fluoresceína (*donkey anti-goat* FITC, diluição 1:150) em solução de anticorpo, por 2 horas à TA. Os cortes foram bem lavados com PBS, a fim de se remover todo o excesso deste anticorpo. Em seguida, foram incubados com o segundo anticorpo secundário conjugado com rodamina (*donkey anti-rabbit* R, diluição 1:150) em solução de anticorpo, por 2 horas à TA e lavados. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield. A especificidade dos anticorpos secundários foi testada através de cortes controle positivo e negativo. Na ausência dos anticorpos primários, a aplicação dos anticorpos secundários (controle negativo) não produziu qualquer marcação significativa. As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Alemanha) e as fotos foram obtidas através do sistema Focus Imagecorder Plus.

7. Time-course

Os *time-courses* a que os animais foram submetidos para cada metodologia estão descritos à seguir.

a) Imunoprecipitação e Immunoblotting

- Animais Controle (0) → tiveram os ventrículos extraídos 1.5 minutos após estímulo com 0,02 ml de salina 0,9 % .
- Animais Tratados → tiveram os ventrículos extraídos 0.25, 1.5, 3, 6, 10, 15, 30, 120, 180 ou 360 minutos após estímulo com 0,02 ml de AII 10^{-6} M.

b) Fracionamento subcelular

- Animais Controle (0) → tiveram os ventrículos extraídos 6 minutos após estímulo com 0,02 ml de salina 0,9 % .

- Animais Tratados → tiveram os ventrículos extraídos 6, 12, 20, 30, 60 ou 120 minutos após estímulo com 0,02 ml de AII 10^{-6} M.

c) RT-PCR e PCR

- Animais Controle (0) → tiveram os ventrículos extraídos 1.5 minutos após estímulo com 0,02 ml de salina 0,9 % .

- Animais Tratados → tiveram os ventrículos extraídos 1.5, 60, 120, 180 ou 360 minutos após estímulo com 0,02 ml de AII 10^{-6} M.

d) Imunohistoquímica

- Imunoperoxidase

- Animais Controle (0) → tiveram os átrios e ventrículos extraídos 120 minutos após estímulo com 0,02 ml de salina 0,9 % .

- Animais Tratados → tiveram os átrios e ventrículos extraídos 120 minutos após estímulo com 0,02 ml de AII 10^{-6} M.

- Imunofluorescência

- Animais Controle (0) → tiveram os átrios e ventrículos extraídos 20 minutos após estímulo com 0,02 ml de salina 0,9 % .

- Animais Tratados → tiveram os átrios e ventrículos extraídos 20 minutos após estímulo com 0,02 ml de AII 10^{-6} M.

8. *Análise estatística*

Após quantificação das bandas obtidas nas autoradiografias, procedeu-se à análise dos dados, comparando-se o valor da densidade das bandas, nos diferentes tempos de estímulo com AII com aquele obtido no grupo Controle (0). Os resultados foram expressos em porcentagem, tendo recebido o grupo Controle o valor de 100% e os grupos restantes foram normalizados em relação a ele. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (média $\pm$ SEM) dos valores percentuais e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para isso, utilizamos o teste *t* de *Student's* não pareado. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Instat* (Instat GraphPad Software, Inc).

As imagens obtidas através de reação de imunoperoxidase e de imunofluorescência foram analisadas comparando-se o Grupo Controle (0) com o grupo estimulado com AII.

IV – RESULTADOS

IV - RESULTADOS

Visando estudar a sequência de eventos moleculares decorrentes da ativação da via de sinalização da AII em coração de ratos adultos, mais especificamente com relação à participação da via JAK/STAT, avaliou-se inicialmente o tempo de fosforilação de cada proteína envolvida nesta via, a saber: AT1, AT2, JAK2, SHP1 e SHP2.

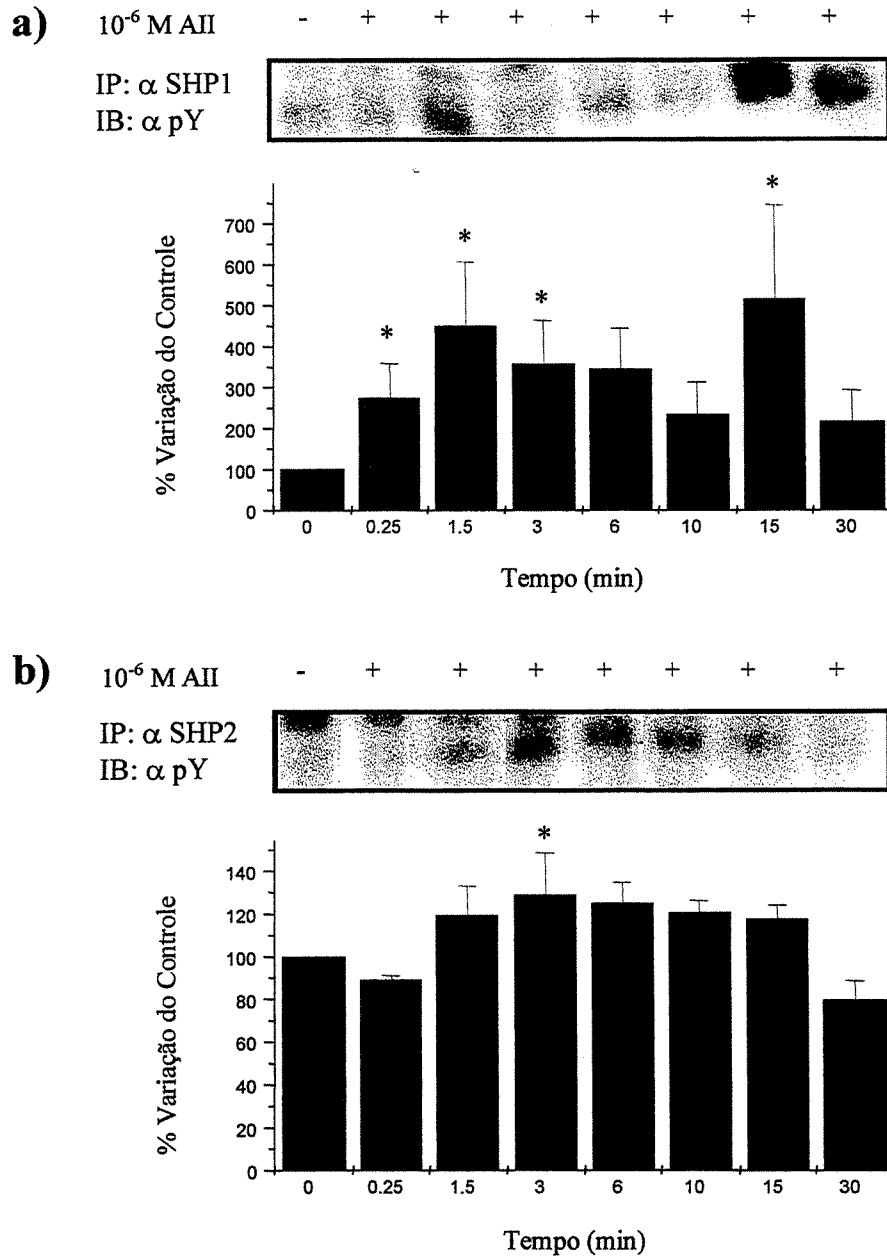
O material, proveniente de animais submetidos a diferentes períodos de estímulo com AII, conforme descrito em Métodos, foi imunoprecipitado com anticorpos anti-AT1, ou -AT2, ou -JAK2, ou -SHP1, ou -SHP2 e submetido à *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina (pY).

- Fosforilação dos receptores AT1 e AT2 após estímulo com AII

A Figura 3 a, demonstra que AT1 (51 KDa), em tecido cardíaco, encontra-se levemente fosforilado em condições basais. Após estímulo com AII, seus níveis de fosforilação aumentam gradativamente, iniciando-se por volta de 1,5 minutos até atingirem o pico de fosforilação por volta de 10 minutos. Após 30 minutos do estímulo com AII, seus níveis de fosforilação aproximam-se dos basais.

Quanto à fosforilação de AT2 (51 KDa), a Figura 3 b demonstra que este também apresenta-se levemente fosforilado no estado basal e que, em 6 minutos após o estímulo com AII, atinge um pico de fosforilação, o qual decai logo em seguida.

- Fosforilação das fosfatases SHP1 e SHP2 após estímulo com AII



Figuras 5 a e 5 b – Fosforilação em tirosina das fosfatases SHP1 e SHP2 após estímulo com AII. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10^{-6} M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-SHP1 (a) ou –SHP2 (b), e à *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina (anti-pY). O gráfico de barras demonstra a fosforilação relativa de SHP1 e SHP2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média $\pm$ SEM, * $p<0.05$ quando comparado com controle).

- Fosforilação da quinase intracelular JAK2 após estímulo com AII

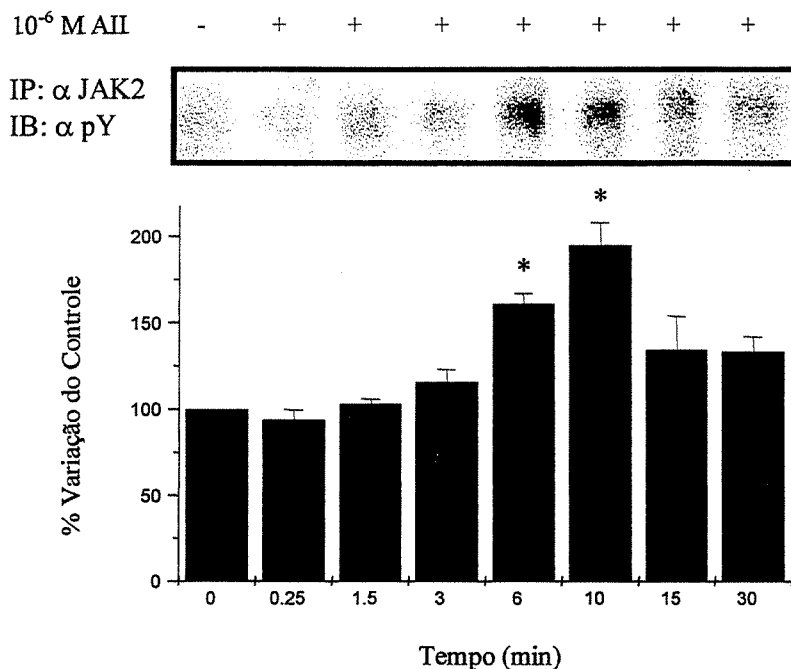
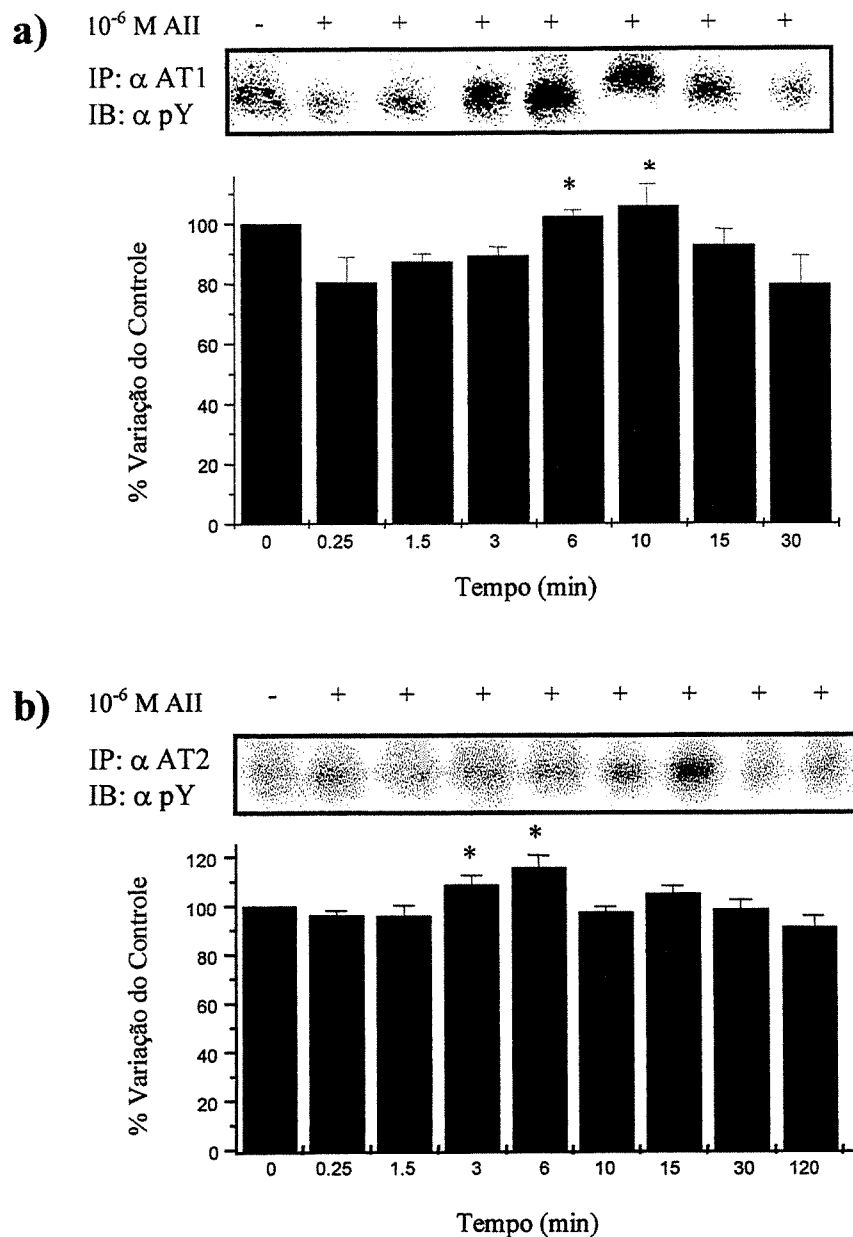


Figura 4 – Fosforilação em tirosina de JAK2 após estímulo com AII. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10⁻⁶ M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-JAK2, e à *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina (anti-pY). O gráfico de barras demonstra a fosforilação relativa de JAK2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média ± SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média ± SEM, * $p<0.05$ quando comparado com controle).

Ao analisarmos a Figura 4, notamos que a proteína JAK2 (130 KDa) encontra-se fracamente fosforilada no estado basal. Após estímulo com AII, ocorre rápido e progressivo aumento em sua fosforilação, iniciando-se precocemente por volta de 3 minutos e prolongando-se até cerca de 30 minutos, atingindo neste intervalo de tempo, um pico máximo de fosforilação em 10 minutos após estímulo com AII.



Figuras 3 a e 3 b – Fosforilação em tirosina dos receptores AT1 e AT2 após estímulo com AII. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10^{-6} M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-AT1 (a) ou –AT2 (b), e à *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina (anti-pY). O gráfico de barras demonstra a fosforilação relativa de AT1 e AT2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa Scion-Corp. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média $\pm$ SEM, $*p<0.05$ quando comparado com controle).

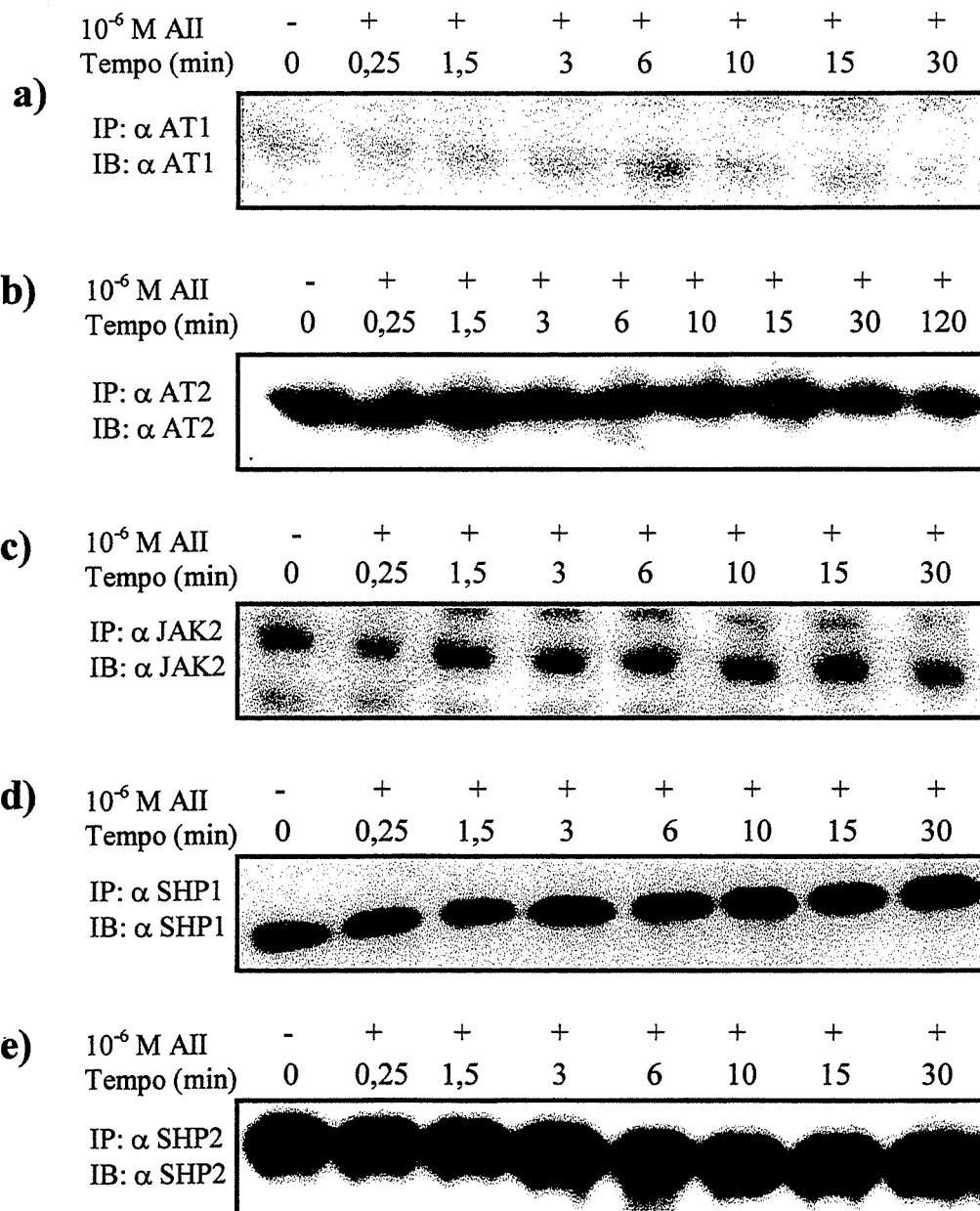
O *immunoblotting* de proteínas precipitadas com anticorpo anti-SHP1 (75 KDa) nos revelou que, em condições basais, SHP1 encontra-se levemente fosforilado. Após estímulo com AII, ocorre um aumento rápido e transitório em sua fosforilação, seguido por uma redução significativa entre 3 e 10 minutos. Aos 15 minutos, atinge um pico de fosforilação, o qual é rápido e transitório, e retorna aos níveis basais em 30 minutos após estímulo com AII (Figura 5 a).

Quanto à fosfatase SHP2 (75 KDa), observamos que esta também se encontra levemente fosforilada em condições basais, mas que, após estímulo com AII, seus níveis de fosforilação são aumentados de forma progressiva, começando por volta de 1,5 minutos e atingindo um pico em 3 minutos. Aos 30 minutos, retorna a valores próximos aos basais (Figura 5 b).

A fim de verificarmos se os diferentes níveis de fosforilação encontrados para todas as proteínas até o momento investigadas foram devidos a um aumento em sua expressão protéica após estímulo com AII, as membranas de nitrocelulose utilizadas neste estudo foram submetidas à *stripping* e *immunoblotting* com o mesmo anticorpo com que foram imunoprecipitadas.

- Expressão de AT1, AT2, JAK2, SHP1 e SHP2 após estímulo com AII

Conforme demonstrado nas Figuras 6 a a 6 e, o aumento na fosforilação das proteínas envolvidas na via JAK/STAT estimulada pela AII, não foi devido a aumento em sua expressão.



Figuras 6 a, b, c, d, e – Avaliação da expressão protéica de AT1, AT2, JAK2, SHP1 e SHP2 após estímulo com AII. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10⁻⁶ M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação e *immunoblotting* com anticorpos anti-AT1 (a) ou –AT2 (b) ou –JAK2 (c), ou –SHP1 (d) ou –SHP2 (e). O gráfico de barras demonstra a expressão relativa de AT1, AT2, JAK2, SHP1 e SHP2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média ± SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média ± SEM, $*p<0.05$ quando comparado com controle).

Investigamos à seguir, as possíveis associações existentes entre as diferentes proteínas envolvidas na via de sinalização JAK/STAT induzida pela AII.

- Associação entre os receptores AT1 ou AT2 e a quinase JAK2 após estímulo com AII

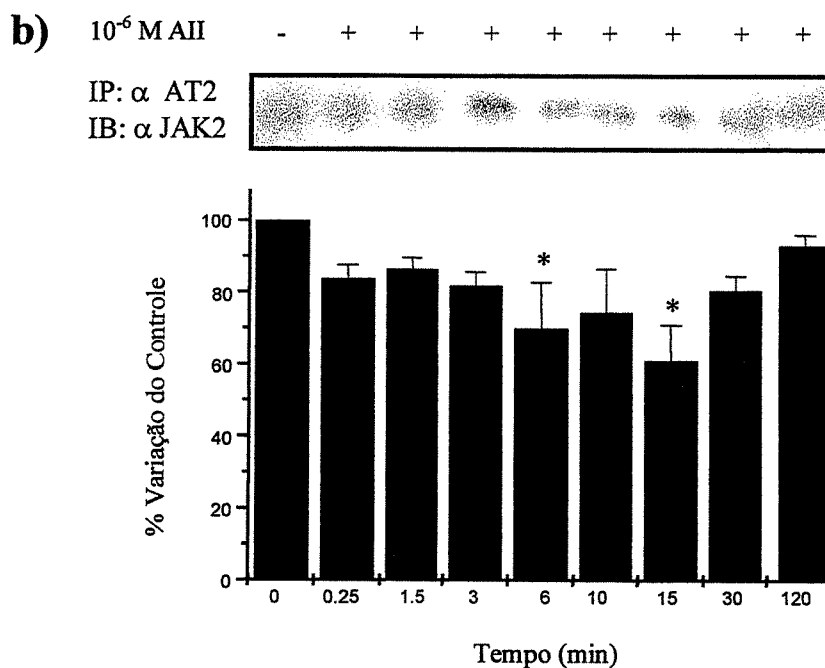
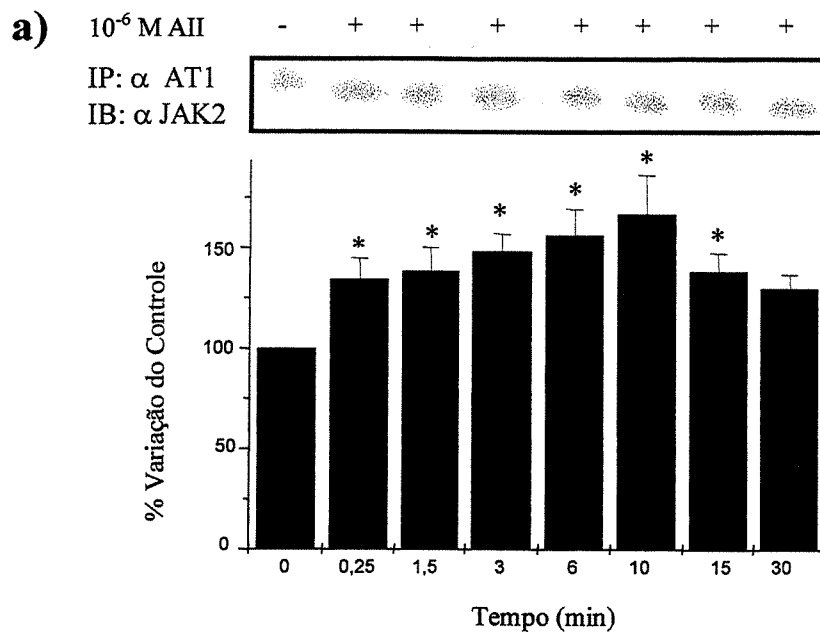
Ventrículos cardíacos de animais expostos ou não à AII foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-AT1 ou –AT2 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-JAK2.

Conforme demonstrado na Figura 7 a, AT1 e JAK2 apresentam baixo nível de associação no estado basal. Após estímulo com AII, esta associação sofre incremento progressivo, iniciando-se em 6 minutos e prolongando-se até cerca de 10 minutos. Aos 30 minutos, retorna aos níveis basais.

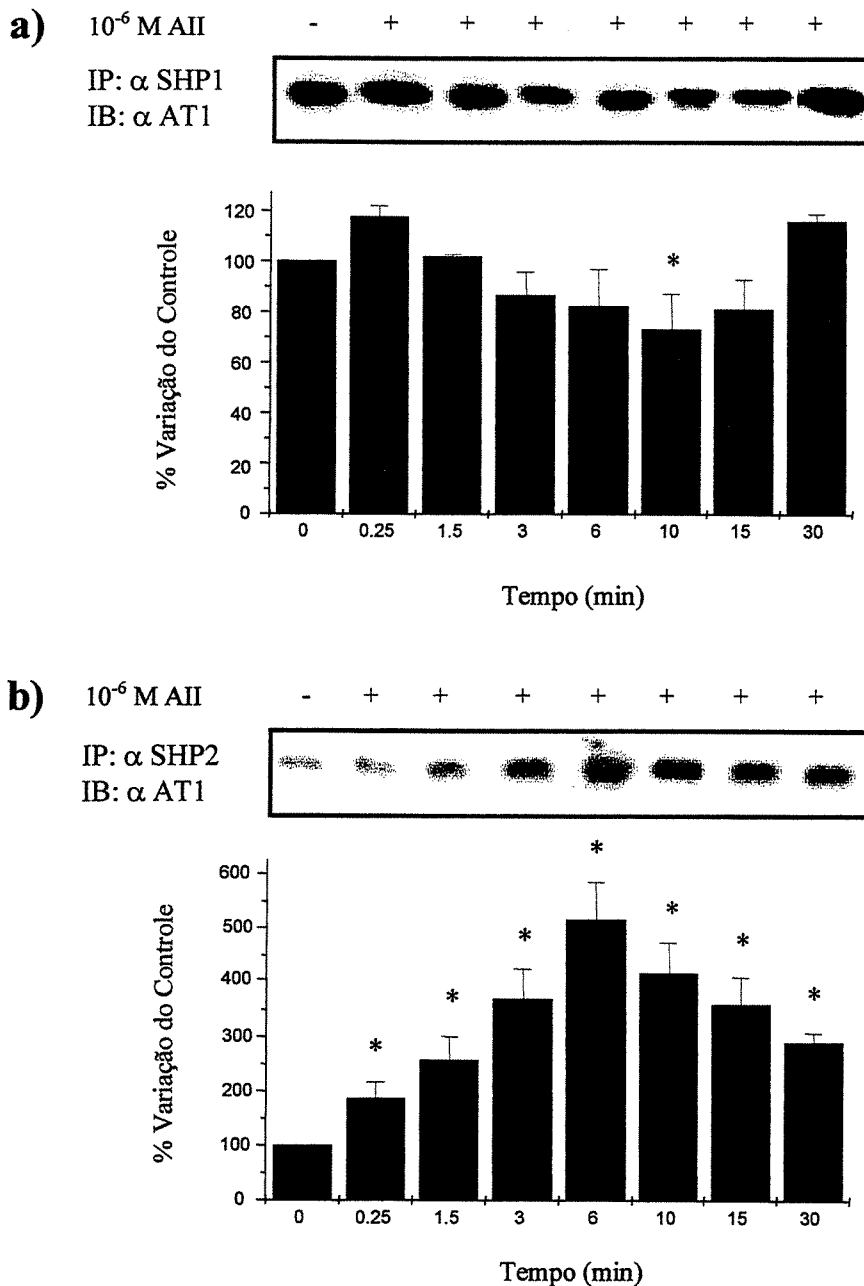
Diferentemente da associação entre AT1 e JAK2, AT2 e JAK2 encontram-se associados em moderada quantidade no estado basal. Após o estímulo com AII, sofrem rápida e progressiva dissociação (cerca de 20%), atingindo aos 15 minutos o menor nível de associação observado. Aos 120 minutos encontram-se associados em níveis próximos aos basais (Figura 7 b).

- Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT1 após estímulo com AII

Extratos proteicos de ventrículos cardíacos provenientes de animais tratados ou não com AII foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-SHP1 ou –SHP2 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-AT1.



Figuras 7 a e 7 b – Associação entre os receptores AT1 ou AT2 e JAK2 após estímulo com AII. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10^{-6} M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-AT1 (a) ou –AT2 (b), e à *immunoblotting* com anticorpo anti-JAK2. O gráfico de barras demonstra a associação relativa entre AT1 ou AT2 e JAK2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média $\pm$ SEM, $*p<0.05$ quando comparado com controle).



Figuras 8 a e 8 b – Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT1 após estímulo com AII Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10^{-6} M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHP1 (a) ou –SHP2 (b), e à *immunoblotting* com anticorpo anti-AT1. O gráfico de barras demonstra a associação relativa entre SHP1 ou SHP2 e AT1 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa Scion-Corp. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média $\pm$ SEM, * $p<0.05$ quando comparado com controle).

Como demonstrado na Figura 8 a, SHP1 e AT1 encontram-se fortemente associados em condições basais. Contudo, após 3 minutos do estímulo com AII, SHP1 e AT1 dissociam-se e assim permanecem até cerca de 15 minutos. Aos 30 minutos, voltam a se associar.

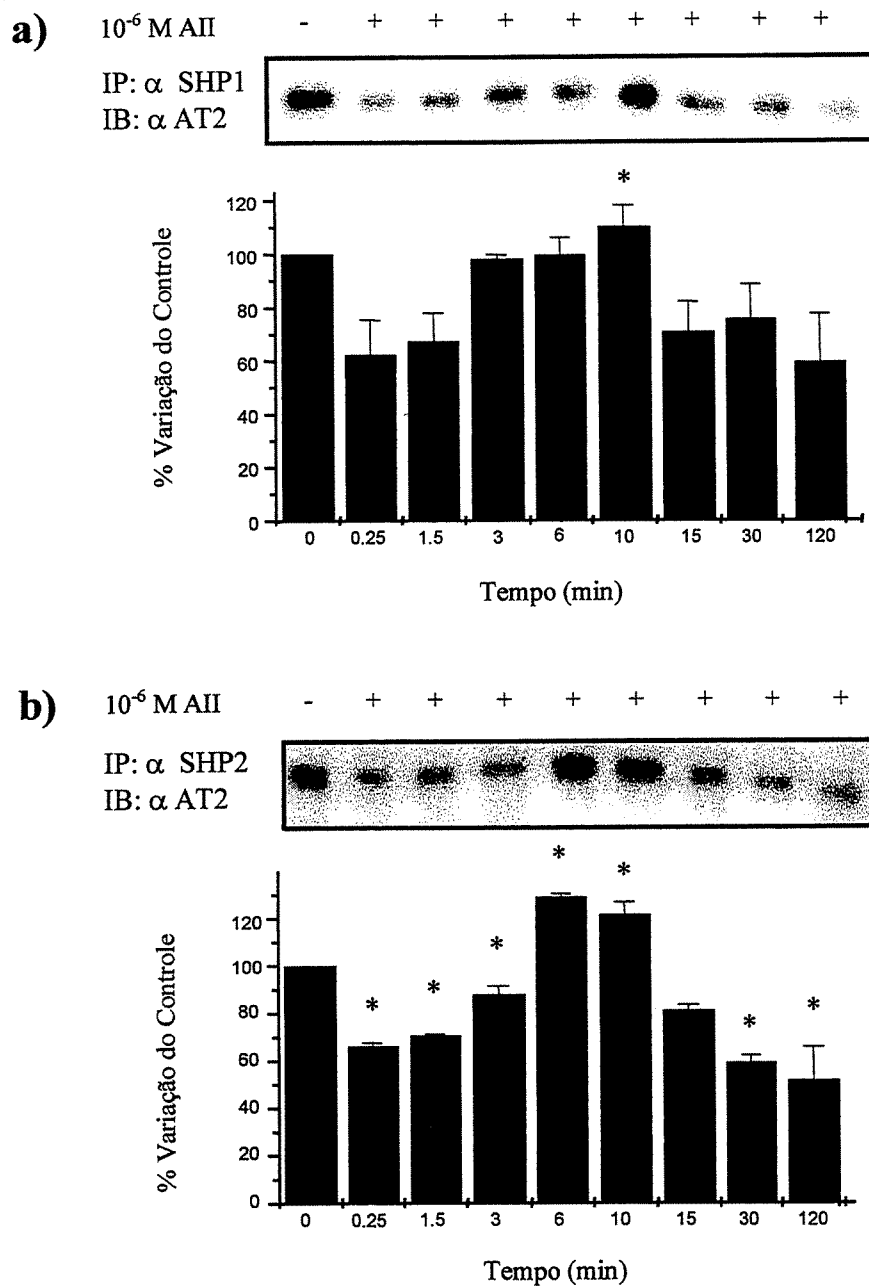
SHP2 e AT1 encontram-se levemente associados no período basal. Após o estímulo com AII, ocorre um aumento gradativo nesta associação, iniciando-se por volta de 0,25 minutos. Aos 6 minutos esta associação atinge um pico, o qual decai em seguida. Aos 30 minutos, ainda há associação entre AT1 e SHP2 (Figura 8 b).

- Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT2 após estímulo com AII

Para esta série de experimentos, extratos protéicos de ventrículos provenientes de animais tratados ou não com AII foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-SHP1 ou -SHP2 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-AT2.

Ao analisarmos a Figura 9 a, verificamos que SHP1 e AT2 encontram-se fortemente associados em condições basais. Logo após o estímulo com AII, dissociam-se de forma rápida e, aos 3 minutos associam-se novamente, atingindo aos 10 minutos um pico de associação. Logo depois, voltam a se dissociar, assim permanecendo, em níveis bem inferiores aos basais até cerca de 120 minutos após estímulo com AII.

SHP2 e AT2 também estão associados no período basal e se dissociam após estímulo com AII de maneira semelhante ao que acontece entre SHP1 e AT1. Aos 3 minutos voltam a se associar, atingindo um pico de associação entre 6 e 10 minutos para, em seguida, se dissociarem (Figura 9 b).



Figuras 9 a e 9 b – Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e AT2 após estímulo com AII. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10^{-6} M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHP1 (a) ou –SHP2 (b), e à *immunoblotting* com anticorpo anti-AT2. O gráfico de barras demonstra a associação relativa entre SHP1 e SHP2 com AT2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa Sci-onCorp. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média $\pm$ SEM, $*p<0.05$ quando comparado com controle).

- Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e JAK2 após estímulo com AII

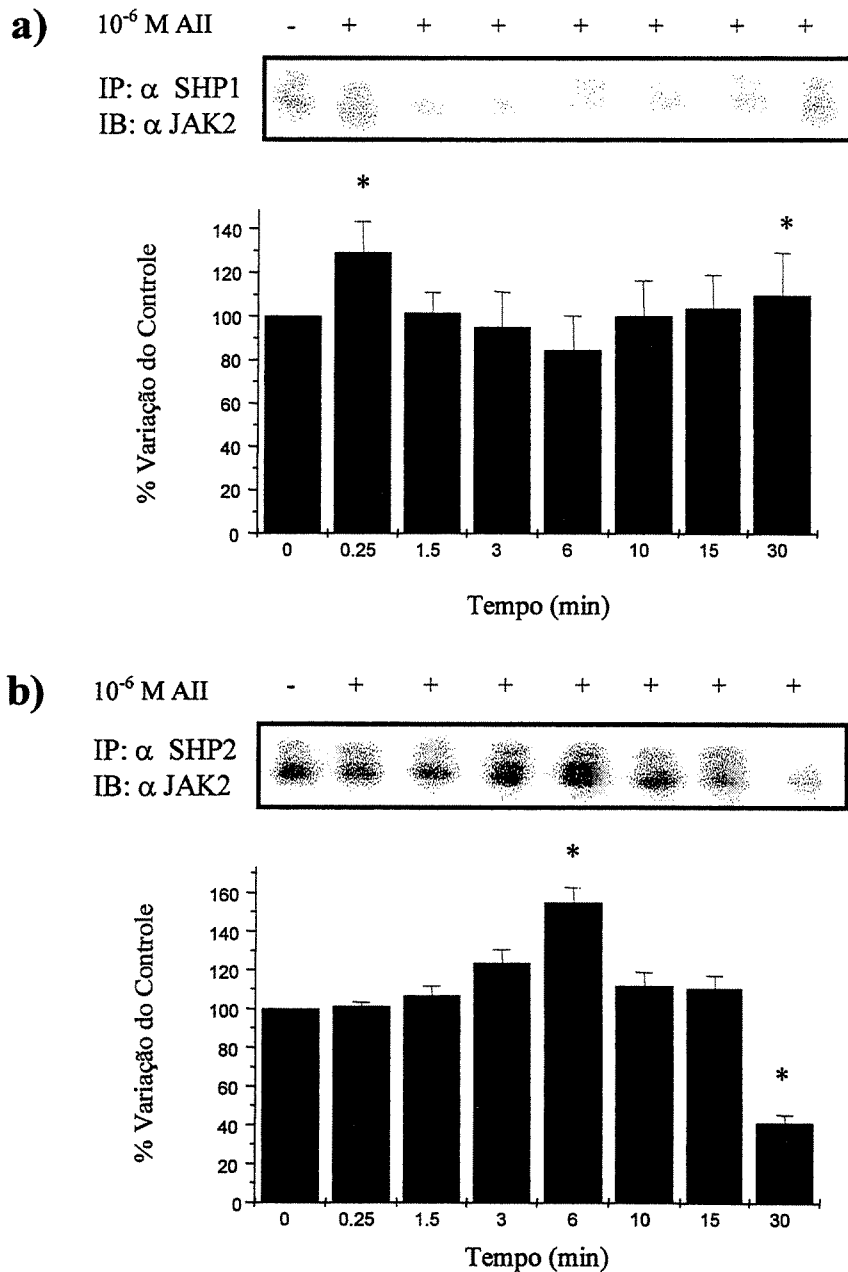
Ventrículos cardíacos de animais expostos ou não à AII foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-SHP1 ou -SHP2 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-JAK2.

Na Figura 10 a, SHP1 e JAK2 encontram-se pouco associados no estado basal. Após 0,25 minutos do estímulo com AII, ocorre um rápido e transitório aumento nesta associação. Em seguida, estas duas proteínas dissociam-se, atingindo aos 6 minutos o menor nível de associação observado. Aos 10 minutos, retornam a níveis de associação semelhantes aos basais.

Como demonstrado na Figura 10 b, o anticorpo anti-SHP2 foi capaz de co-precipitar uma pequena quantidade de JAK2 no estado basal até cerca de 1,5 minutos após estímulo com AII. Em seguida, esta associação sofreu um aumento progressivo, iniciando-se por volta de 3 minutos e atingindo um pico aos 6 minutos. Logo após, dissociam-se e atingem valores semelhantes aos basais. Aos 30 minutos, ocorre grande dissociação entre estas proteínas.

Em todos os casos em que verificamos a dinâmica de associação/dissociação entre as proteínas, os mesmos resultados foram encontrados quando invertemos a ordem dos anticorpos no procedimento de imunoprecipitação e *immunoblotting*.

A fim de confirmarmos os resultados obtidos sobre a associação das proteínas, procedemos ao fracionamento subcelular das amostras. Para isso, somente alguns dos períodos de tempo, os quais mostraram mudanças mais significativas, foram testados.



Figuras 10 a e 10 b – Associação entre as fosfatases SHP1 ou SHP2 e JAK2 após estímulo com AII. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10^{-6} M pelos períodos de tempo indicados e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHP1 ou -SHP2 (b), e à *immunoblotting* com anticorpo anti-JAK2. O gráfico de barras demonstra a associação relativa entre SHP1 ou SHP2 com JAK2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média $\pm$ SEM, * $p<0.05$ quando comparado com controle).

- Migração transcelular de JAK2 induzida por AII

Ventrículos cardíacos de animais expostos ou não à AII foram submetidos à técnica de fracionamento subcelular conforme descrito em Métodos e à *immunoblotting* com anticorpo anti-JAK2.

Como controle de contaminação das frações, em paralelo aos experimentos, o material foi submetido à *immunoblotting* com anticorpo anti-histona H1. Devido ao fato de ser esta uma proteína nuclear, sua localização se restringiu a este local em todas as amostras.

IB: α JAK2

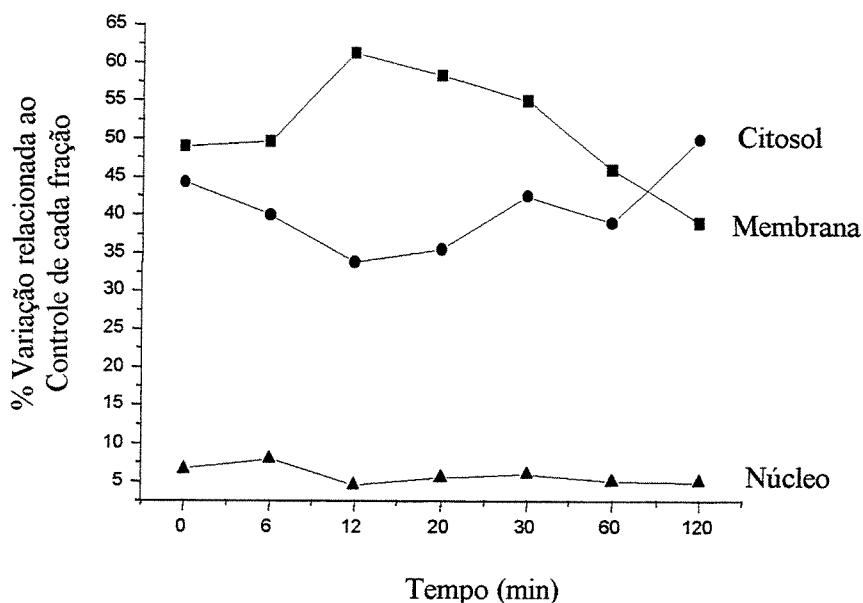


Figura 11 – Caracterização da dinâmica de translocação subcelular de JAK2 após estímulo com AII. Frações subcelulares foram preparadas de ventrículos após estímulo com 0,02 ml de AII 10^{-6} M nos tempos indicados e submetidas à SDS-PAGE. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo anti-JAK2. Frações de Membrana (■); Citosólica (●); e Nuclear (▲). Cada ponto representa a média de triplicatas. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes (n=3).

Analisando-se a Figura 11, verificamos que, no período basal, JAK2 é encontrado em concentrações semelhantes tanto no compartimento citosólico (44%) quanto no de membrana (49%). Após 6 minutos do estímulo com AII, ocorre uma grande migração de JAK2 do citosol (cerca de 40%) para a membrana. Aos 12 minutos, JAK2 atinge seu pico na fração de membrana (61%), permanecendo assim até aproximadamente 30 minutos. Após este tempo, verifica-se que JAK2 migra novamente para a fração citosólica.

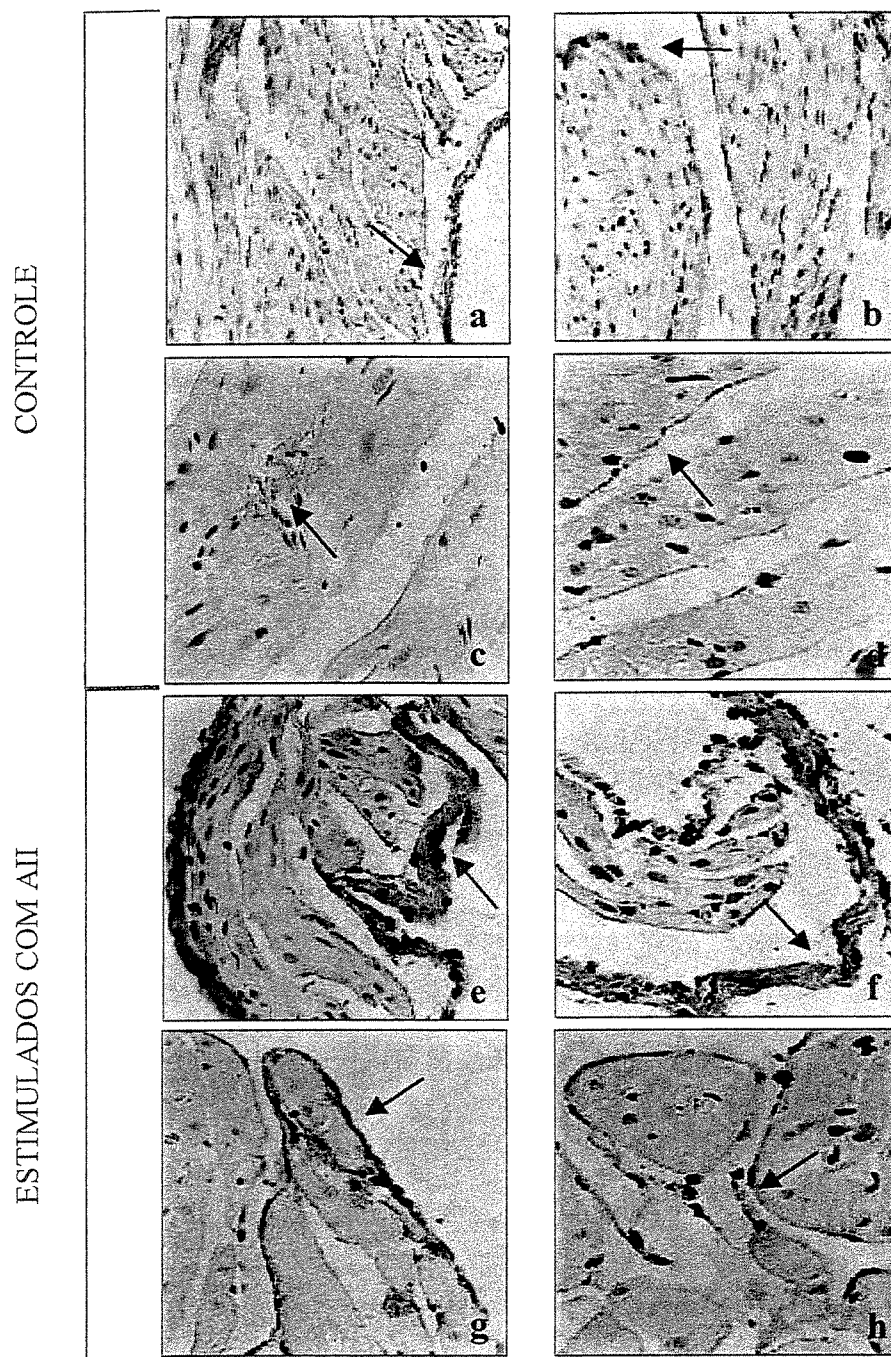
A etapa seguinte de nosso estudo foi investigar se a AII é capaz de induzir a ativação da proteína SOCS3 em coração de ratos Wistar adultos.

Inicialmente, estudamos a distribuição celular de SOCS3 em átrios e ventrículos de animais estimulados ou não com AII.

- Expressão e localização de SOCS3 em tecido cardíaco após estímulo com AII

Cortes histológicos (átrios e ventrículos) provenientes de animais tratados por 2 horas ou não com 0,02 ml de AII 10^{-6} M, foram submetidos à técnica de imunoperoxidase, conforme descrito em Métodos.

Conforme podemos observar nas Figuras 12 a a 12 d, embora a proteína SOCS3 seja encontrada em átrios e ventrículos de animais não tratados (Controle), sua expressão sofre evidente incremento após 120 minutos do estímulo com AII, como demonstrado nas Figuras 12 e a 12 h. Verifica-se ainda que esta proteína distribui-se preferencialmente em endocárdio e células endoteliais de vasos sanguíneos nos ventrículos e endocárdio e tecido muscular de átrios.



Figuras 12 a a 12 h – Localização celular de SOCS3 em coração de ratos estimulados com AII. Ratos foram estimulados ou não com AII 10^{-6} M por 120 minutos. Após, o coração foi extraído, fixado em solução de para-formaldeído 4% e submetido à caracterização histológica de distribuição de proteína pelo método tradicional de imunoperoxidase utilizando-se anticorpo específico para SOCS3. a, b) Átrios Animais Controle; e, f) Átrios Animais estimulados com AII; c, d) Ventrículos Animais Controle; g, h) Ventrículos Animais estimulados com AII. As imagens são representativas de 3 experimentos diferentes ($n=3$).

Investigamos então, a expressão gênica e protéica de SOCS3 e também sua possível associação aos elementos participantes da via de sinalização JAK/STAT.

- Indução da expressão do RNAm de SOCS3 após estímulo com AII

Para este estudo, ventrículos de animais tratados ou não com 0,02 ml de AII 10^{-6} M por períodos de tempo pré-estabelecidos, foram submetidos à técnica de RT-PCR, conforme descrito em Métodos.

A análise da banda correspondente à SOCS3 (251 bp) em diferentes tempos após estímulo com AII demonstrou que, em condições basais, níveis discretos de RNAm de SOCS3 são encontrados. Entretanto, verificou-se que ocorre um aumento de 1,5 vezes na expressão deste RNAm 60 minutos após estímulo com AII, o qual decai para níveis indetectáveis em 360 minutos (Figura 13).

- Indução da expressão da proteína SOCS3 após estímulo com AII

Ventrículos cardíacos provenientes de animais expostos ou não à AII foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-rabbit SOCS3 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-goat SOCS3 para uma melhor visualização do sinal desta proteína. Quando o material foi submetido somente à *immunoblotting* com anticorpo anti-SOCS3, o sinal desta tornou-se pouco visível, atestando a baixa sensibilidade do método para esta análise. Acredita-se que a porção de SOCS3 existente no tecido cardíaco, mesmo após estímulo com AII, encontra-se pró-

xima ao limite de detecção do método (*Western blot*) e que, somente após uma purificação parcial da proteína por imunoprecipitação, sua identificação e medida possam ser obtidas.

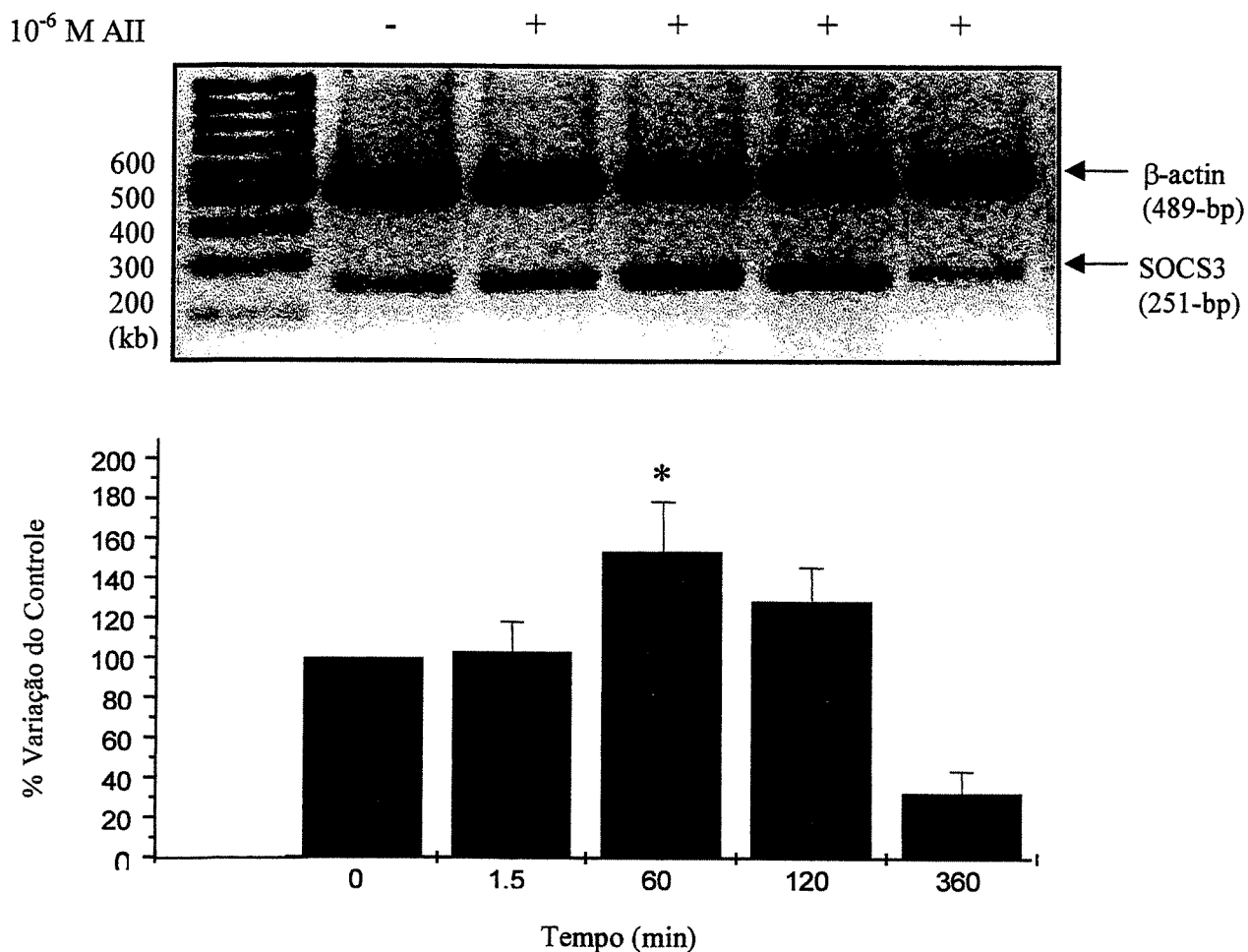


Figura 13 – Expressão gênica de SOCS3 induzida por AII. O RNAm de SOCS3 foi extraído e amplificado usando-se *primers* específicos para SOCS3. O produto foi fracionado em gel de agarose a 1,5% por 60 minutos. a) gel de agarose demonstrando a banda de β-actina (489 bp) como controle interno e a banda de SOCS3 (251 bp); b) histograma demonstrando a quantificação do RNAm de SOCS3. A mesma concentração de RNAm foi utilizada em todos os grupos. Os dados são representativos de 3 experimentos diferentes ($n=3$).

Como demonstrado na Figura 14, antes do estímulo com AII, há discreta expressão da proteína SOCS3 (30 KDa). Após 10 minutos do estímulo com AII, ocorre um aumento gradativo nos níveis de expressão protéica de SOCS3, o qual atinge um pico máximo em 120 minutos. Após 360 minutos do estímulo com AII, a expressão de SOCS3 retorna a níveis basais.

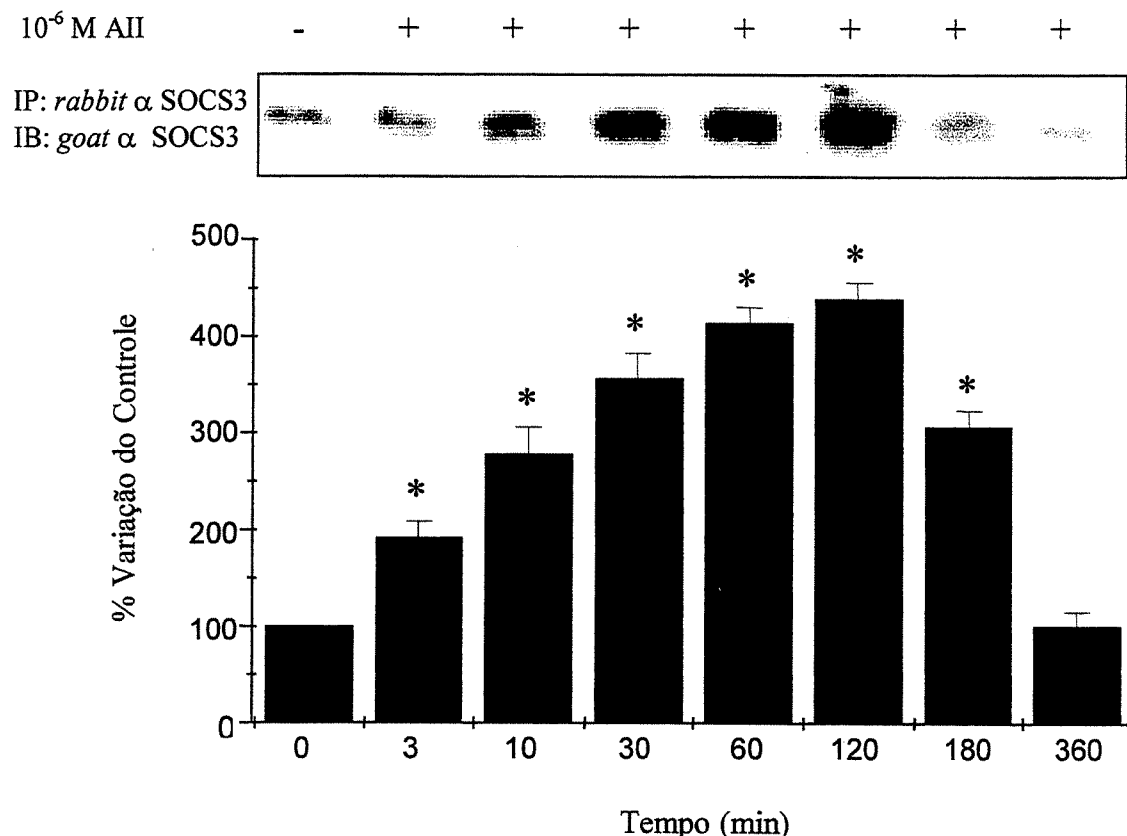


Figura 14 – Expressão protéica de SOCS3 induzida por AII. Ratos foram estimulados com 0,02 ml de AII 10⁻⁶ M pelos tempos indicados. Os ventrículos foram extraídos e homogenizados. Os extratos protéicos foram imunoprecipitados com anticorpo anti-rabbit SOCS3 e analisados por *Western blot* utilizando-se anticorpo anti-goat SOCS3. O gráfico de barras demonstra a expressão relativa da proteína SOCS3 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média ± SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média ± SEM, * $p<0.05$ quando comparado com controle).

Uma vez demonstrada a indução de SOCS3 por AII, investigamos a dinâmica de associação de SOCS3 com proteínas da via de sinalização da AII.

- Associação entre SOCS3 e os receptores AT1 ou AT2, após estímulo com AII

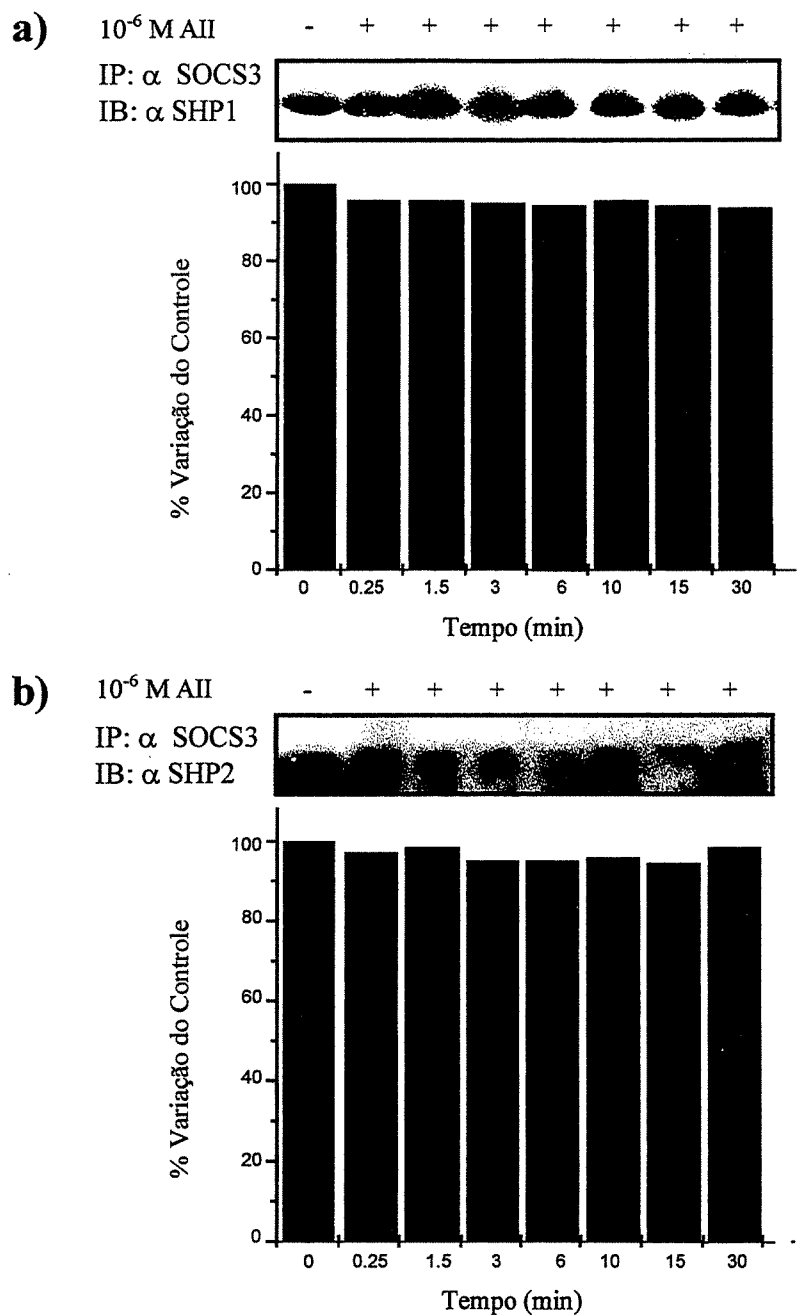
Ventrículos cardíacos de animais expostos ou não à AII por períodos de tempo pré-estabelecidos, foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-AT1 ou –AT2 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-SOCS3.

Após 4 experimentos, verificamos que SOCS3 não se associa aos receptores AT1 e AT2 no estado basal nem após estímulo com AII. Tal resultado foi obtido realizando-se imunoprecipitação com anticorpo anti-AT1 ou –AT2 e *immunoblotting* com anticorpo anti-SOCS3, ou realizando-se o inverso, imunoprecipitação com anticorpo anti-SOCS3 e *immunoblotting* com anticorpo anti-AT1 ou –AT2.

- Associação entre SOCS3 e as fosfatases SHP1 ou SHP2 após estímulo com AII

Ventrículos cardíacos provenientes de animais estimulados ou não com AII, foram homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-SHP1 ou -SHP2 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-SOCS3.

Após 3 experimentos, verificamos que o padrão de associação entre SOCS3 e SHP1 ou SHP2 parece não sofrer variações após estímulo com AII. Parece haver discreta associação antes do estímulo, o qual se mantém constante. O mesmo foi encontrado quando se inverteu a ordem de adição dos anticorpos (Figuras 15 a e 15 b).



Figuras 15 a e 15 b – Associação entre SOCS3 e as fosfatases SHP1 ou SHP2 após estímulo com AII em corações de ratos. Ratos foram tratados com 0,02 ml de AII 10^{-6} M pelo período de tempo indicado e, em seguida, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-SOCS3, e à *immunoblotting* com anticorpos anti-SHP1 (a) ou –SHP2 (b). O gráfico de barras demonstra a associação relativa entre SOCS3 e JAK2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média $\pm$ SEM, $*p<0.05$ quando comparado com controle).

- Associação entre SOCS3 e JAK2 após estímulo com AII

Homogeneizados de ventrículos cardíacos provenientes de animais estimulados ou não com AII, foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-SOCS3 e à *immunoblotting* com anticorpo anti-JAK2.

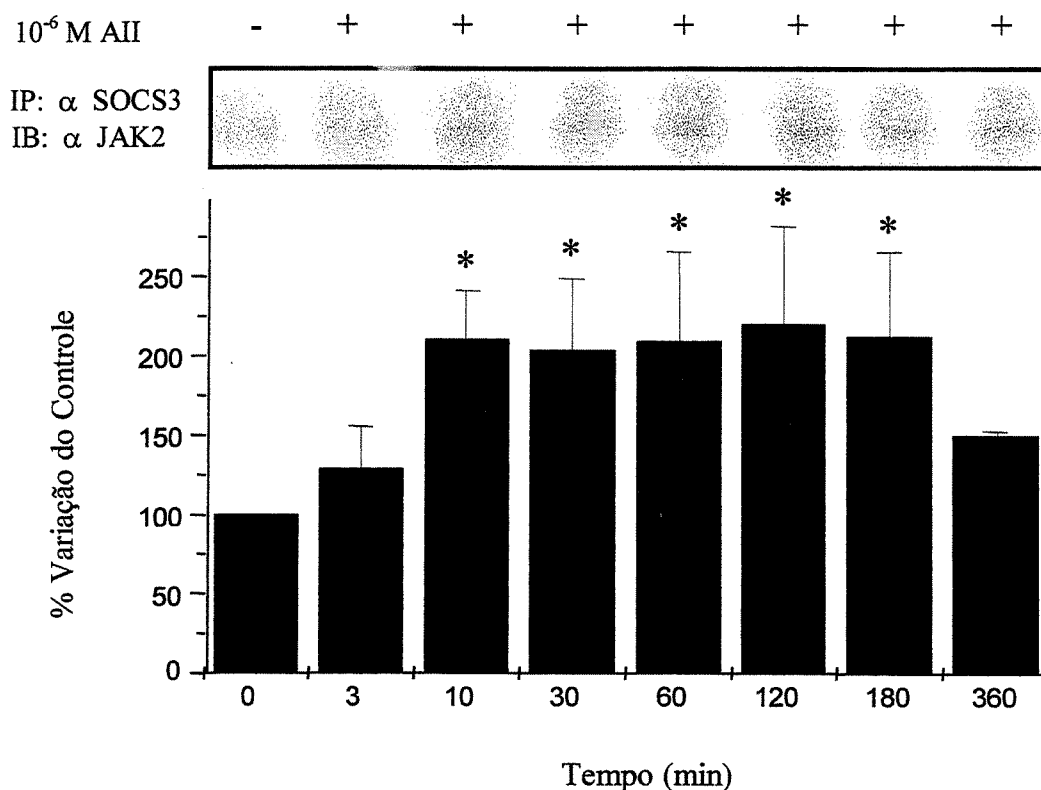


Figura 16 – Associação entre SOCS3 e JAK2 após estímulo com AII. Os animais foram anestesiados, e a cavidade abdominal foi aberta. 0,02 ml de AII 10⁻⁶ M foi injetada através da veia cava e, após os tempos indicados, os ventrículos foram extraídos e homogeneizados. Os extratos protéicos foram imunoprecipitados com anticorpo anti-SOCS3 e submetidos à *immunoblotting* com anticorpo anti-JAK2. O gráfico de barras demonstra a associação relativa entre SOCS3 e JAK2 como determinado pela quantificação das bandas feita no programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média ± SEM de 3 experimentos separados ($n=3$, média ± SEM, $*p<0.05$ quando comparado com controle).

Como demonstrado na Figura 16, SOCS3 foi capaz de co-precipitar uma pequena porção de JAK2 no tempo zero. Contudo, 10 minutos após o estímulo com AII, a porção de JAK2 co-precipitada foi significativamente aumentada, assim permanecendo até cerca de 180 minutos e diminuindo aos 360 minutos para valores próximos aos basais.

Quando a ordem de adição do anticorpo foi invertida, o mesmo resultado foi encontrado. Entretanto, a análise densitométrica foi comprometida devido à baixa intensidade do sinal obtido, sugerindo-se que talvez o anticorpo utilizado para a precipitação de JAK2 interfira com a formação do complexo SOCS3/JAK2.

Frente aos resultados obtidos, avaliamos o padrão de migração transcelular de SOCS3 quando induzido por AII.

- Migração transcelular de SOCS3 induzida por AII

Na presente série de experimentos, os ventrículos, após terem sido submetidos à técnica de fracionamento subcelular, foram submetidos à *immunoblotting* com anticorpo anti-SOCS3.

No estado basal, 43% de SOCS3 encontra-se na fração nuclear sendo o restante igualmente distribuído entre as frações de membrana e de citosol. Após 6 minutos do estímulo, ocorre um significativo incremento da proteína SOCS3 na fração de membrana (45%) a qual diminui lentamente a seguir, até atingir, aos 20 minutos os valores mais baixos (22%). Na fração nuclear, onde se observam os mais altos níveis de SOCS3, ocorre uma progressiva redução da mesma com nadir aos 20 minutos após estímulo com AII. Durante o mesmo intervalo, o conteúdo de SOCS3 na fração citosólica sofre aumento gradativo até atingir, aos 20 minutos, um

pico (62%) e uma subsequente diminuição aos 30 minutos (29%), para finalmente atingir, aos 120 minutos, valores próximos aos obtidos em 20 minutos (56%) (Figura 17).

IB: α SOCS3

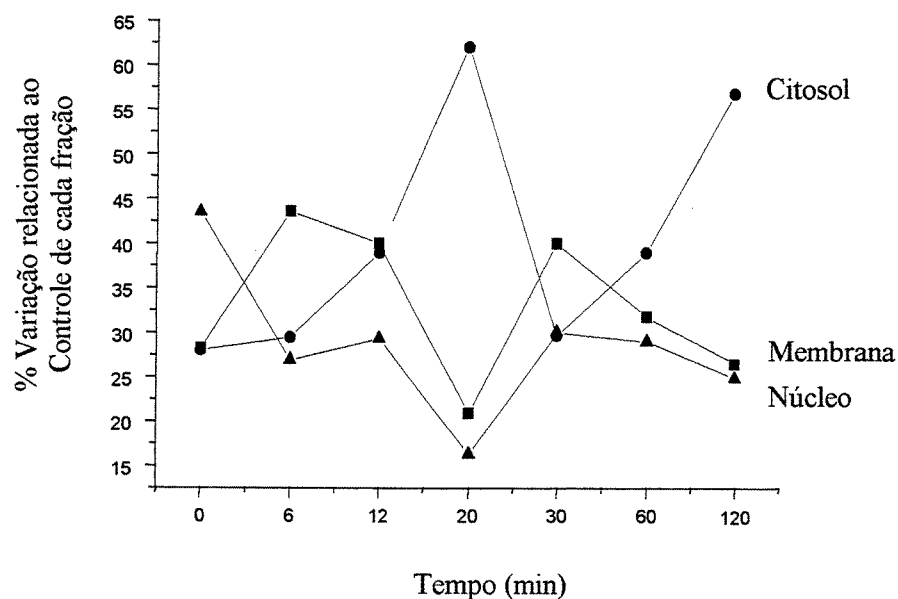


Figura 17 – Caracterização da dinâmica de translocação subcelular de SOCS3 após estímulo com AII. Frações subcelulares foram preparadas de ventrículos após estímulo com 0,02 ml de AII 10^{-6} M nos tempos indicados e submetidas à SDS-PAGE. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo anti-SOCS3. Frações de Membrana (■); Citosólica (●); and Nuclear (▲). Cada ponto representa a média de triplicatas. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes ($n=3$).

- Associação entre SOCS3 e JAK2 – estudo da migração transcelular de SOCS3 induzida por AII

Ventrículos cardíacos, após terem sido submetidos à técnica de fracionamento subcelular, foram imunoprecipitados com anticorpo anti-JAK2 e submetidos à *immunoblotting* com anticorpo anti-SOCS3.

IP: α JAK2
IB: α SOCS3

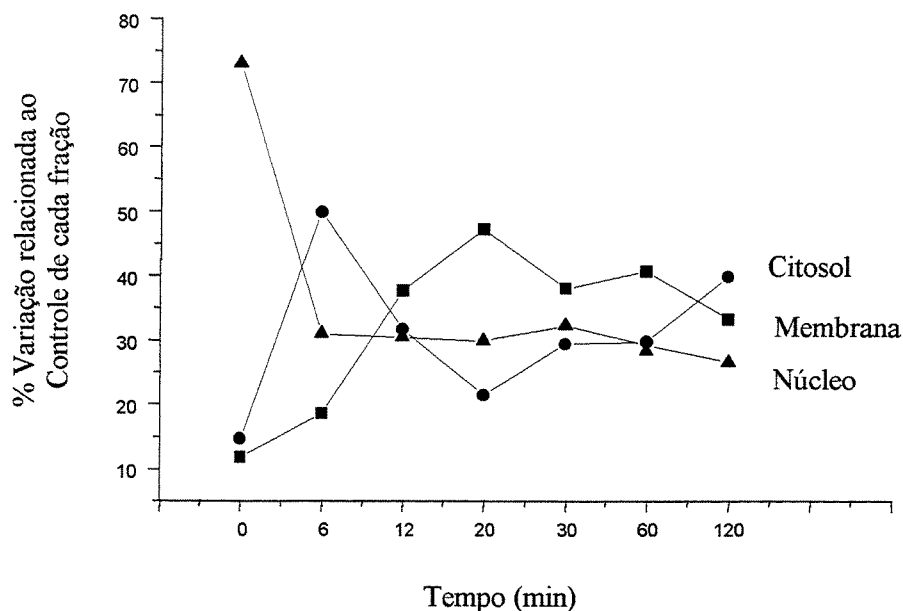


Figura 18 – Localização subcelular da associação entre JAK2 e SOCS3 após estímulo com AII. Frações subcelulares foram preparadas e submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-JAK2 e *immunoblotting* com anticorpo anti-SOCS3. Frações de Membrana (■); Citosólica (●); e Nuclear (▲). Cada ponto representa a média de triplicatas. Os dados são representativos de três experimentos independentes ($n=3$).

Ao analisarmos este resultado (Figura 18), verificamos que SOCS3 encontra-se levemente associada a JAK2 no período basal tanto no compartimento de membrana como no compartimento citosólico (13%). Após 6 minutos do estímulo com AII, há um súbito aumento nesta associação na fração citosólica (50%). Na membrana, esta associação começa a se elevar gradativamente, iniciando-se por volta de 6 minutos (18%), até 60 minutos após o estímulo (33%), atingindo aos 20 minutos um pico (48%). Após a elevação aos 6 minutos, a associação na fração citosólica diminui e, aos 20 minutos atinge valores mais baixos (21%). Em seguida, sofre elevações progressivas até atingir, aos 120 minutos valores semelhantes aos da fração de membrana (41%).

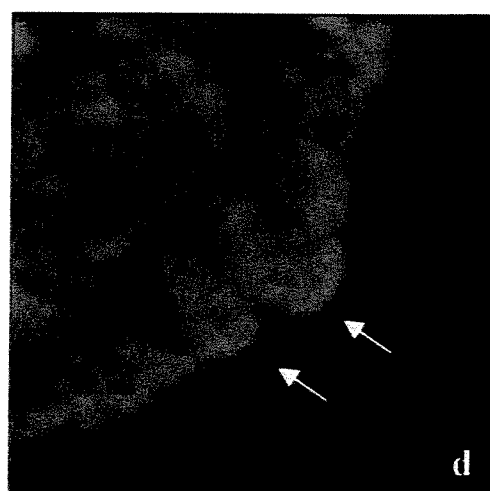
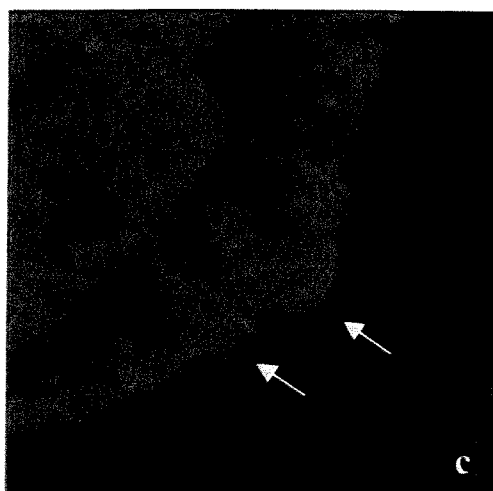
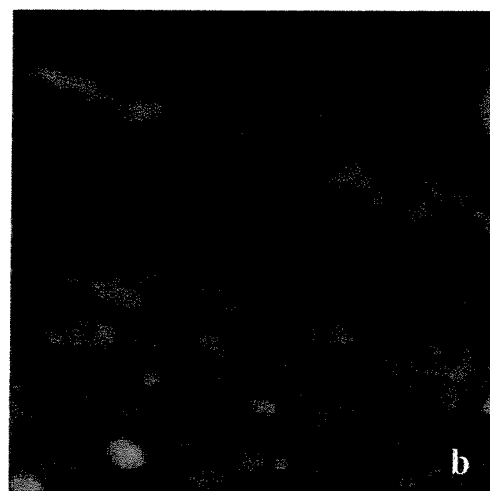
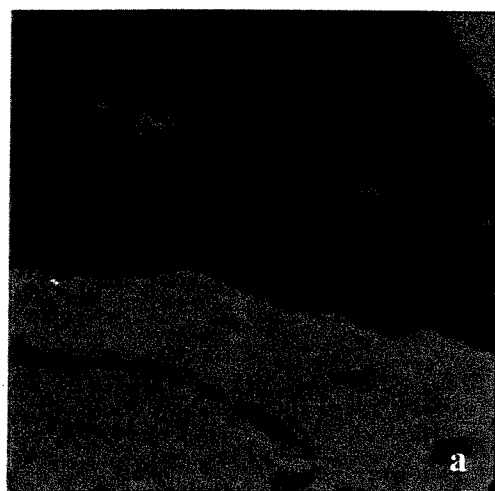
Frente aos resultados acima, empreendemos à avaliação da localização histológica de JAK2 e SOCS3 através de microscopia de fluorescência de dupla marcação.

- Associação entre SOCS3 e JAK2 induzida por AII – co-localização através de microscopia de fluorescência

Para este estudo, cortes histológicos de átrios e ventrículos provenientes de animais tratados por 20 minutos ou não com AII, foram submetidos à técnica de imunofluorescência, conforme descrito em Métodos.

A microscopia de fluorescência revelou que, antes do estímulo com AII, JAK2 pode ser visualizado no citoplasma de cardiomiócitos ventriculares, enquanto que, somente uma baixa expressão pode ser detectada em endocárdio ventricular (Figuras 19 a e 19 b). O tratamento com AII causou tanto um aumento na marcação da proteína SOCS3, principalmente no endocárdio, como também da co-localização entre SOCS3 e JAK2 em várias áreas do endocárdio ventricular (Figuras 19 c e 19 d).

CONTROLE



ESTIMULADOS COM AII

V – DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

Ao lado da sinalização intracelular tradicional que ocorre através da ativação da proteína Gq levando a um aumento na geração de IP_3 e de Ca^{2+} citosólico, a AII pode também ativar várias das vias tirosina quinases que, em geral, são ativadas por receptores com atividade tirosina quinase intrínseca. A via JAK/STAT, que se constituiu no objeto de nosso estudo, é um exemplo deste tipo de via. Nesta, os sinais extracelulares são transmitidos da superfície celular para o núcleo promovendo a ativação ou o controle da expressão de vários genes alvos (HORVATH and DARNELL, 1997).

Muitos dos estudos sobre a caracterização da via de sinalização JAK/STAT induzida pela AII foram realizados em cultura de células isoladas. Poucos são os dados encontrados em animais adultos.

A AII ativa múltiplas vias tirosina quinases em VSMC que, por analogia, também são ativadas por fatores de crescimento. Isto demonstra que estas vias são importantes na mediação dos efeitos de crescimento promovidos pela AII. A resposta final promovida pela AII, como contração, crescimento ou proliferação, além de ser dependente do fenótipo celular, é também dependente da ativação seletiva de múltiplas vias.

Assim como os fatores de crescimento, a AII é capaz de estimular a fosforilação de numerosas proteínas em resíduos de tirosina. Tsuda e colaboradores (TSUDA et al., 1991) demonstraram que, em VSMC, a AII induz a fosforilação de, no mínimo, nove proteínas, entre as quais pode-se citar o seu receptor AT1 (KAI et al., 1996; TSAI et al., 1996), JAK2, STAT1 e STAT2 (MARRERO et al., 1995b) e IRS-1 (DU et al., 1996).

Dados na literatura demonstram que, embora muito se conheça sobre os eventos moleculares envolvidos na ativação da via JAK/STAT, os eventos moleculares que participam de sua regulação negativa ainda não são totalmente entendidos. Há vários estudos indicando que a via de sinalização JAK/STAT pode ser controlada negativamente em múltiplos níveis por um grande número de moléculas e através de diferentes meios. Desta forma, no presente trabalho, enfatizou-se a avaliação da dinâmica de associação e dissociação das proteínas participantes da sinalização da AII, particularmente através da via JAK/STAT, com ênfase para o estudo das proteínas envolvidas no controle da resposta à AII.

Iniciamos nosso estudo investigando o *time-course* de fosforilação dos receptores da AII. Pudemos observar que o receptor AT1 encontra-se pouco fosforilado em tirosina no estado basal e, após estímulo com AII, seu estado de fosforilação sofre aumento gradativo, atingindo entre 6 e 10 minutos, um pico de fosforilação (FIGURA 3 a). O receptor AT2 também se encontra pouco fosforilado em tirosina no estado basal. Após estímulo com AII, atinge rapidamente seu pico de fosforilação, o que ocorre momentos antes de AT1 ser fosforilado (FIGURA 3 b). Supomos que a fosforilação basal destes receptores seja devido à AII endógena circulante. Nossos resultados sobre a fosforilação de AT1 no estado basal e em resposta a AII corroboram com os encontrados na literatura (KAI et al., 1994; VELLOSO et al., 1996).

O receptor AT1 é também fosforilado em resíduos de serina e treonina em resposta a AII, atingindo um pico de fosforilação 20 minutos após estímulo com o agonista (KAI et al., 1994).

Sabe-se que AT1 sofre internalização, mas há dúvidas quanto ao momento em que isso ocorre. Alguns autores demonstram que AT1 internaliza rapidamente após a ligação do hormônio (GRIENDLING et al., 1987; PEACH, 1981). Outros acreditam que AT1 só é internalizado, juntamente com o ligante, após ter sido fosforilado (HUNYADY, 1999; ISHIZAKA et

al., 1997; SMITH et al., 1998; THOMAS, 1999). O processo de internalização de AT1 é proposto como um mecanismo de desensibilização.

Em VSMC, o processo de internalização de AT1 inicia-se por volta de 1,5 minutos (GRIENDLING et al., 1987) após a adição do ligante. Dados da literatura demonstram que a sinalização da PLD mediada por AT1 nestas células é ativada 1,5 minutos após a adição de AII e continua por mais uma hora (LASSEGUE et al., 1993). Observa-se assim que, mesmo que AT1 tenha sido internalizado, as vias de sinalização intracelulares promovidas pela AII ainda continuam ativas. Alguns autores sugerem que a AII promova a translocação de AT1 para dentro de um domínio especializado na membrana de onde sinais prolongados são gerados (ANDERSON et al., 1993; ZHANG et al., 1996).

Muitos investigadores têm observado uma diminuição na responsividade do sinal da AII (também chamado taquifilaxia, desensibilização ou *downregulation*) após repetidas aplicações deste hormônio (MOELLENHOFF et al., 2001; PEACH, 1977). Não há dúvidas de que a exposição prolongada à AII altere as vias de sinalização envolvidas na geração do sinal subsequente. Em VSMC, a AII além de promover *downregulation* (desensibilização) de seu próprio receptor AT1 (LASSEGUE et al., 1995), diminui a quantidade destes receptores na superfície celular, diminui o seu acoplamento à proteína G (KAI et al., 1996) e aumenta os níveis de expressão de proteínas fosfatases. O efeito final é uma atenuação da responsividade à AII. Logo, há poucos receptores AT1 na superfície celular para serem estimulados e aqueles que estão presentes são incapazes de se acoplar à proteína G e de promover a ativação da PLC ou de tirosinas quinases citosólicas, como JAK2. Por isso não fosforilam e tornam-se inativados pelo aumento da expressão de fosfatases e proteínas inibitórias. Percebe-se portanto, que a AII além de afetar agudamente a geração de sinais intracelulares, também regula a expressão e a

atividade de componentes chaves das vias de sinalização que modulam a responsividade à longo prazo.

AT2 não sofre internalização após a ligação do ligante. Também não se sabe se sua resposta pode ser atenuada pela dessensibilização.

Após a ligação da AII a seus receptores, várias proteínas tirosina quinases intracelulares são ativadas. Embora AT1 não possua atividade tirosina quinase intrínseca, é capaz de induzir a fosforilação em tirosina de outras proteínas e de estimular o crescimento celular (GEISTERFER et al., 1988; NAFTILAN et al., 1989; TAUBMAN et al., 1989). Não existem dados na literatura a respeito da atividade quinase de AT2.

Dados existentes na literatura demonstram que a AII induz a fosforilação e a ativação de JAK2 e Tyk2, proteínas tirosina quinases usualmente associadas aos receptores de citocinas (MARRERO et al., 1995b). O presente trabalho visou estudar a ativação da tirosina quinase citosólica JAK2. Como demonstramos (FIGURA 4), antes do estímulo com AII, JAK2 está fracamente fosforilado em tirosina (assim como AT1), mas logo após o estímulo, JAK2 tem seus níveis de fosforilação aumentados gradativamente, alcançando entre 6 e 10 minutos um pico máximo. Também em cultura de células COS-7 transfectadas, JAK2 é fosforilada após a ligação da AII ao receptor AT1 (ALI et al., 1998).

Curiosamente, o mesmo tempo encontrado para a fosforilação de AT1 foi também encontrado para JAK2. Isso nos leva a supor então, que JAK2 pode ser a proteína tirosina quinase citosólica responsável pela fosforilação de AT1 após estímulo com AII, uma vez que AT1 só é fosforilado por intermédio de proteínas tirosina quinases intracelulares (TOUYZ and SCHIFFRIN, 2000).

A fim de confirmarmos este resultado, investigamos a associação entre AT1 e JAK2. Resultados recentes da literatura demonstram que, em VSMC, a AII ligando-se a AT1, induz a

ativação de JAK2 e sua associação com AT1 (ALI et al., 1998). Ainda neste contexto, JAK2 precisa estar cataliticamente ativa para formar um complexo com AT1 e este processo parece ser regulado por um evento de autofosforilação mediado pela AII (ALI et al., 1998).

Em células COS-7 transfectadas (WEBER and BRILLA, 1991) e em cultura de células musculares lisas da aorta de ratos (MARRERO et al., 1995b), verifica-se um baixo nível de associação entre JAK2 e AT1 em condições basais. Após a adição de AII ao meio de cultura, esta associação sofre um aumento, demonstrando que receptores acoplados à proteína G são também capazes de sinalizar através de vias de fosforilação intracelulares utilizadas por receptores de citocinas (SILVENNOINEN et al., 1993; WATLING et al., 1993). Em coração de ratos adultos observamos que, embora em condições basais, AT1 e JAK2 encontrem-se levemente associados, após estímulo com AII, esta associação aumenta até atingir um pico máximo (FIGURA 7 a), o qual corresponde exatamente ao período de tempo em que as proteínas AT1 e JAK2 sofrem fosforilação (FIGURAS 3 a e 4).

A fim de confirmarmos nossos dados sobre a associação entre JAK2 e o receptor AT1, investigamos a migração transcelular de JAK2 após estímulo com AII. Verificamos que JAK2, após estímulo com AII, migra do citosol em direção à membrana (FIGURA 11). Observa-se que a sua localização na membrana coincide com o tempo em que se encontra associada a AT1 (FIGURA 7 a).

A associação entre JAK2 e AT1 ocorre através de seus domínios ²³¹YRFRR e YIPP, respectivamente. Recentemente demonstrou-se que a associação entre JAK2 e AT1, induzida pela AII, é dependente do domínio YIPP presente na região carboxi-terminal do receptor AT1, pois receptores AT1 com deleções ou mutações na tirosina 319 presente neste domínio, foram incapazes de induzir a fosforilação de JAK2 (ALI et al., 1997b).

Como JAK2 não apresenta domínios SH2, sugere-se que a fosfatase SHP2, a qual possui 2 domínios SH2, funcione como uma molécula adaptadora, ou seja, como uma molécula capaz de mediar a ligação de JAK2 a AT1. Dados encontrados na literatura demonstram que quando SHP2 é depletado em VSMC, JAK2 não se associa a AT1 (MARRERO et al., 1998). Devido a isso, JAK2 não se autofosforila nem fosforila AT1. Logo, o sinal não é transmitido de AT1 para JAK2 e não há ativação da via JAK/STAT. Também deleções na tirosina 319 do domínio *YIPP* de AT1, impedem a ligação tanto de JAK2 (ALI et al., 1997b) como de SHP2 (ALI et al., 1998) a AT1, demonstrando que a ligação de SHP2 a AT1 é dependente do mesmo domínio que medeia a ligação de JAK2.

Além de estimular a atividade de tirosina quinases, a AII também estimula a atividade de proteínas tirosina fosfatases (PTPases) (MARRERO et al., 1998). Os estados de fosforilação e de atividade de proteínas que são reguladas por fosforilação em tirosina são controladas por ações combinadas de proteínas tirosina quinases e tirosina fosfatases (SUN and TONKS, 1994).

Ao investigarmos a fosforilação em tirosina de SHP1 e SHP2 em coração de ratos adultos, encontramos que a AII é capaz de induzir a fosforilação de ambas as fosfatases, mas em períodos de tempo diferentes (FIGURAS 5 a e 5 b). O mesmo foi encontrado por Marrero e colaboradores (MARRERO et al., 1998) em cultura de VSMC.

Observamos que a fosforilação de SHP2 (FIGURA 5 b) inicia-se anteriormente e estende-se por todo o período de tempo em que ocorre a fosforilação de JAK2 (FIGURA 4) e AT1 (FIGURA 3 a), ao passo que, durante este mesmo período, SHP1 sofre desfosforilação (FIGURA 5 a). Quando SHP1 começa a ser fosforilada, SHP2 desfosforila simultaneamente a JAK2 e AT1. Com estes resultados, podemos supor que a fosfatase SHP1 é a responsável pela desfosforilação de JAK2 e, conseqüentemente, de AT1 em coração de ratos adultos. Estes

resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para cultura de VSMC (MARRERO et al., 1998).

Marrero e colaboradores (MARRERO et al., 1998), ao estudarem a atividade catalítica de SHP1 e SHP2 em VSMC, observaram que a atividade catalítica de SHP1 diminui durante os primeiros cinco minutos de exposição à AII, mas é seguido por um aumento que, após 30 minutos é significativamente maior que o tempo zero (controle). Já a atividade de SHP2 sofre um aumento inicial durante os primeiros 10 minutos, seguido por uma diminuição próxima aos níveis basais após 30 minutos. Os resultados deste grupo de pesquisadores demonstram que SHP1 é desativada durante a fosforilação de JAK2 (0 – 5 minutos) e é subseqüentemente ativada durante a desfosforilação desta proteína (10 – 30 minutos), enquanto que SHP2 tem atividade máxima ao mesmo tempo em que a fosforilação de JAK2 é também máxima (5 – 10 minutos). Supomos que isso também aconteça em coração de ratos adultos, embora não tenhamos estudado a atividade catalítica destas fosfatases.

Examinamos à seguir a associação entre a fosfatase SHP2 e o receptor AT1 ou JAK2 induzida pela AII. Verificamos que SHP2 é capaz de se associar a AT1 (FIGURA 8 b) e também a JAK2 (FIGURA 10 b) em tecido cardíaco de ratos adultos, corroborando com os dados obtidos em cultura de VSMC (MARRERO et al., 1998). Também observamos que as associações entre SHP2 e AT1 e entre SHP2 e JAK2 ocorrem ao mesmo tempo em que estas proteínas encontram-se fosforiladas em tirosina (FIGURAS 3 a, 4 e 5 b). Sugere-se que SHP2 tenha papel fundamental na fosforilação de AT1 e JAK2, contribuindo para a ativação da via de sinalização JAK/STAT induzida pela AII.

SHP2, em coração de ratos adultos e em cultura de VSMC (MARRERO et al., 1998), forma muito rapidamente um complexo com JAK2, e também se associa a AT1 de maneira muito rápida em resposta a AII, o qual perdura por todo o tempo em que JAK2 e AT1 estão sendo

fosforilados. Isto é consistente com a possibilidade de que a associação entre JAK2 e AT1 ocorra de forma indireta, sendo mediada por SHP2. Acredita-se que, assim como acontece em células hematopoiéticas em resposta à interleucinas, eritropoietina e prolactina (ALI et al., 1996; WELHAM et al., 1994), em coração de ratos adultos, a AII é capaz de induzir a formação de um complexo trimérico entre o receptor AT1, JAK2 e a fosfatase mediadora da associação entre eles, SHP2.

Ao contrário de SHP2, SHP1 parece estar associada a AT1 no momento em que esta proteína está sofrendo desfosforilação. Após SHP2 dissociar-se de AT1, SHP1 associa-se a este receptor promovendo sua desfosforilação (FIGURA 8 a). O mesmo foi encontrado para JAK2 (FIGURA 10 a). Portanto, a formação do complexo JAK2/SHP1 está temporariamente relacionada com a desfosforilação de JAK2, consistente com a possibilidade de que SHP1 seja a fosfatase que o desfosforila. Nossos resultados sobre o papel das fosfatases na fosforilação e regulação da atividade da proteína JAK2 estão consistentes com os encontrados na literatura para VSMC estimuladas com AII (MARRERO et al., 1998).

Ao analisarmos o gráfico correspondente a associação entre AT2 e JAK2, notamos que estas proteínas, embora associados em condições basais, dissociam-se após estímulo com AII (FIGURA 7 b). SHP1 e AT2, encontram-se associados antes do estímulo e assim permanecem até cerca de 10 minutos após o estímulo com AII, dissociando-se em seguida (FIGURA 9 a). Observa-se então, um aumento na associação entre SHP1 e AT1 (FIGURA 8 a) e entre SHP1 e JAK2 (FIGURA 10 a). SHP2 e AT2 associam-se durante o período em que AT2 é fosforilado (FIGURA 9 b). Durante o período restante, AT2 permanece associado a SHP1 (FIGURA 9 a). A análise dos dados relativos às associações AT2/SHP1 e AT2/JAK2 sugerem que AT2 funcione como uma proteína ancoradoura para a fosfatase SHP1 que, ao ser liberada, desempenha importante papel na interrupção do sinal ativador gerado por AII e dependente de AT1.

A AII estimula a atividade de proteínas tirosina fosfatases através de receptores AT2 via mecanismos independentes da proteína G (BRECHLER et al., 1994). AT2 promove a ativação da fosfatase SHP1, a qual interage negativamente com a via de sinalização de AT1, inibindo-a (CUI et al., 2001). Acredita-se que a maioria das ações de AT2 sejam exercidas através de SHP1 já que esta é sua molécula efetora mais próxima, e é através dela que AT2 é capaz de exercer amplos efeitos inibitórios sobre a ativação das proteínas STAT induzidas por múltiplas famílias de receptores (fatores de crescimento, citocinas e receptores de 7 segmentos transmembrana) (HORIUCHI et al., 1999). Embora AT2 promova a desfosforilação das STATs não permitindo que elas se transloquem para o núcleo, este receptor não interfere com a atividade e com a fosforilação de JAK2 (HORIUCHI et al., 1999). SHP1 também promove regulação negativa nos sinais de proliferação induzidos pela eritropoietina ligando-se à tirosina fosforilada do receptor e desfosforilando JAK2 (TSUI et al., 1993).

Com base em nossos achados, verificamos que, após estímulo com AII, SHP2 se liga a JAK2, sendo à seguir, fosforilado em tirosina. Então, o complexo SHP2/JAK2 transloca-se em direção à membrana, onde se localiza AT1. Ao ligar-se a AT1 por intermédio de SHP2, JAK2 se autofosforila e fosforila AT1. Desse modo, o sinal da AII é passado de AT1 para JAK2 havendo a ativação da via JAK/STAT. Seguinte a isso, a fosfatase SHP1 associa-se a JAK2. Ocorre então sua ativação e, conseqüentemente, a desfosforilação de JAK2 e AT1. Verificamos então, que SHP1 e SHP2 apresentam papéis essenciais, mas opostos na regulação da fosforilação de JAK2 e AT1 e, desse modo, na ativação ou desativação da via JAK/STAT. Podemos então observar, através dos resultados obtidos até o momento, que a AII é capaz de induzir rapidamente a ativação (através de SHP2) e a desativação (através de SHP1) da via JAK/STAT.

Como em vários sistemas de sinalização mediados por fatores de crescimento, hormônios e citocinas, a regulação negativa ou desensibilização das vias de sinalização pode servir como um mecanismo de proteção contra possíveis efeitos deletérios impostos pela super estimulação. Assim como é observado em células neoplásicas (BROMBERG, 2002), também em células cardiovasculares durante o desenvolvimento de hipertensão, ocorre uma superativação da via JAK/STAT (DOSTAL et al., 1997). Portanto, a ativação da via JAK/STAT pela AII é tão importante quanto sua regulação por mecanismos de *feedback* negativo.

Por ser a ativação da via JAK/STAT pela AII um processo rápido e transitório, com moléculas sendo ativadas dentro de minutos após estímulo e que desaparecem dentro de horas, vários eventos diferentes desta via podem ser o alvo de proteínas inibitórias. A quinase JAK2 constitui-se num dos alvos destas proteínas. Estas, ao agirem sobre JAK2, impedem a transdução do sinal proveniente da superfície celular para o núcleo, impedindo a transcrição de genes e a proliferação celular.

Além das fosfatases, o controle negativo da sinalização da AII pode ocorrer através de mecanismos de internalização/desensibilização do receptor AT1 (CONCHON et al., 1998), ativação da PKC (IGLESIAS et al., 2001), fosforilação em serina/treonina de AT1 (BALMFORTH et al., 1997), degradação do receptor AT1 e proteínas ativadas, como JAK2, pelo sistema ubiquitina/proteosoma, ativação das proteínas PIAS, STATs dominantes negativas, e proteínas da família CIS/SOCS (YASUKAWA et al., 2000).

Vários sistemas de sinalização que utilizam a via JAK/STAT para transduzir seu sinal, têm sua atividade controlada por membros da família de proteínas inibitórias SOCS (HILTON et al., 1998; YASUKAWA et al., 2000). Desde que JAK2 e várias proteínas STAT são ativadas e participam da transdução do sinal da AII, decidiu-se investigar a hipótese de que as proteínas SOCS possam ser induzidas pela AII em músculo cardíaco e possam participar do contro-

le da transdução do sinal da AII. A escolha de SOCS3 foi baseada no fato de que outros hormônios, assim como leptina (BJORBAEK et al., 1998), insulina (SADOWSKI et al., 2001) e hormônio de crescimento (TOLLET-EGNELL et al., 1999) induzem sua expressão. Não existem dados na literatura sobre uma possível relação entre AII e SOCS3.

A função fisiológica de SOCS3 foi recentemente investigada. Marine e colaboradores (MARINE et al., 1999), ao examinarem o modelo de expressão do gene *socs3 in vivo*, encontraram que, embora este gene seja expresso em baixos níveis em tecidos adultos, ele é altamente expresso em fígados fetais, tendo um importante papel na eritropoiese. SOCS3 regula a eritropoiese por modular a atividade de JAK2 (NEUBAUER et al., 1998; PARGANAS et al., 1998).

As proteínas SOCS estão sob o controle transcripcional das STATs (AUERNHAMMER et al., 1999; KREBS and HILTON, 2001). Recentes estudos têm revelado que o promotor de SOCS3 contém um elemento de ligação para as STATs funcionalmente ativas (AUERNHAMMER et al., 1999).

A expressão de cada um dos genes *socs* é induzida *in vivo* e *in vitro* em resposta às citocinas. Em fígado de roedores, a transcrição dos genes *socs1* e *socs3* é rápida e transitória em resposta à IL-6, iniciando-se dentro de 20 minutos de exposição à IL-6 e declinando dentro de 2 a 4 horas (NAKA et al., 1997).

Através das diversas técnicas utilizadas para o estudo da proteína SOCS3, observamos que SOCS3 está presente em baixíssimos níveis no coração antes do tratamento com AII. Após a injeção *in vivo* de AII, ocorre um rápido aumento no nível protéico de SOCS3, iniciando-se por volta de 10 minutos e atingindo um aumento significativo aos 120 minutos (FIGURA 14). Ao estudarmos a expressão de SOCS3 dentro dos três compartimentos intracelulares, verificamos que SOCS3 localiza-se inicialmente no núcleo. Após 20 minutos do estímulo com AII,

sua expressão no citosol é significativamente aumentada, indicando então, que esta proteína está migrando do núcleo em direção ao citosol. Em seguida, verificamos a migração de SOCS3 em direção à membrana, conforme observado pelo aumento de sua expressão neste compartimento (FIGURA 17). Também os níveis de RNAm de SOCS3 são elevados após estímulo com AII, apresentando um aumento significativo aos 60 minutos após o estímulo com AII (FIGURA 13), ao contrário do encontrado por Yasukawa e colaboradores (YASUKAWA et al., 2001) em cultura de cardiomiócitos, onde a AII não foi capaz de induzir aumento na expressão do RNAm de SOCS3 após 60 minutos de estímulo.

Pouco é conhecido sobre a meia-vida das proteínas SOCS. Na via de sinalização da IL-6 verifica-se que SOCS3 apresenta uma meia-vida curta, sugerindo que sua atividade seja regulada a nível transcripcional e que estas proteínas interrompam o sinal transduzido por JAK2 apenas transitoriamente. Com o tempo, a expressão dos genes *socs* pode, através de mecanismos intrínsecos, regular negativamente sua expressão, permitindo às células responderem a uma futura estimulação pela citocina (SIEWERT et al., 1999).

Na sinalização da IL-6, os transcritos de SOCS3 são detectados aproximadamente 30 minutos após o tratamento das células em cultura com IL-6 (SCHMITZ et al., 2000). Então, SOCS3 migra e interage com a *Tyr 759* localizada na subunidade gp130 do receptor de IL-6 inibindo, portanto, uma nova ativação da via de sinalização IL-6/JAK2/STAT (SCHMITZ et al., 2000).

A avaliação histológica de átrios e ventrículos estimulados com AII demonstrou que a maior parte de SOCS3 está presente no endocárdio e em células endoteliais de artérias coronárias, enquanto que uma pequena quantidade é encontrada em músculo cardíaco (FIGURAS 12 a a 12 h). O tratamento com AII leva a um aumento na expressão da proteína SOCS3, o qual é evidenciado pela marcação mais intensa desta proteína em átrios e ventrículos estimulados

com AII. É importante ressaltar que todas as imagens demonstradas na FIGURA 12 foram obtidas usando-se o mesmo protocolo e que os experimentos foram feitos em paralelo. É interessante notar que a localização do receptor AT1 no coração, conforme encontrado na literatura (TAMBASCIA et al., 2001), coincide com a localização de SOCS3.

As proteínas SOCS são capazes de se ligar a membros da família *Janus kinase* e/ou receptores e bloquear a sinalização intracelular (YASUKAWA et al., 1999). Estas proteínas ligam-se através de seu domínio catalítico SH2 e parte de sua região amino-terminal ao domínio catalítico de JAK2. Embora a região *SOCS-box* não seja necessária para a interação entre SOCS3 e JAK2, ela parece modular a estabilidade da proteína SOCS3 (NICHOLSON et al., 1999; SUZUKI et al., 1998). As proteínas SOCS1 e SOCS3 possuem dentro de sua região amino-terminal uma sequência de 12 resíduos de aminoácidos que se assemelham ao *loop* de ativação de JAK. Achados na literatura supõem que esta região iniba a atividade de JAK por agir como um pseudo-substrato que evita o acesso de substratos quinases legítimos à JAK (STARR and HILTON, 1999; YASUKAWA et al., 1999). A interação entre as SOCSs e os resíduos fosforilados em tirosina das JAKs parece ser suficiente para interferir com a função do domínio catalítico de JAK2. Uma vez associadas às proteínas fosforiladas em tirosina, as SOCS provavelmente recrutem ubiquitinas ligases, causando a ubiquitinação destas proteínas fosforiladas e sua destruição pelo proteossoma (ZHANG et al., 1999).

Uma vez induzida pela AII, SOCS3 associa-se a JAK2 de maneira muito lenta. Esta associação inicia-se aproximadamente 10 minutos após o estímulo com AII e estende-se até 180 minutos (FIGURA 16). Esta associação ocorre ao mesmo tempo em que há aumento na expressão de SOCS3. Ao estudarmos a associação entre SOCS3 e JAK2 pelo método de fracionamento subcelular, pudemos observar que SOCS3 liga-se a JAK2 inicialmente em um compartimento de membrana. Em períodos mais tardios do estímulo com AII, SOCS3 encontra-

se ligada a JAK2 em um compartimento citosólico (FIGURA 18). A fim de confirmarmos nossos resultados quanto à associação entre SOCS3 e JAK2, procedemos à avaliação histológica dos corações de animais estimulados ou não com AII. Pudemos então observar que SOCS3 e JAK2 co-localizam-se em várias áreas dos ventrículos, demonstrando que a AII é capaz de induzir a associação entre estas proteínas (FIGURAS 19 a a 19 d). Acredita-se que a interação física entre a proteína SOCS3 e a quinase JAK2 contribua para a regulação negativa da sinalização da AII.

Embora SOCS3 tenha a mesma distribuição em tecido cardíaco que o receptor AT1, não se observou qualquer associação entre SOCS3 e AT1 ou AT2, o que demonstra que, diferentemente das citocinas (NICHOLSON et al., 2000; SASAKI et al., 2000), SOCS3 liga-se somente a JAK2 após estímulo com AII em músculo cardíaco de ratos adultos.

Na sinalização da leptina, a associação entre SOCS3 e JAK2 só pode ser observada quando a expressão de SOCS3 encontra-se em altos níveis. Além disso, a super-expressão de SOCS3 pode induzir resistência à leptina (BJORBAEK et al., 1999), já que promove a desfosforilação de JAK2 e do receptor de leptina. No hipotálamo de camundongos Agouti, os quais exibem resistência à leptina e obesidade, o RNAm de SOCS3 é encontrado em altos níveis (BJORBAEK et al., 1998).

Schmitz e colaboradores (SCHMITZ et al., 2000) demonstraram que a fosfatase SHP2 pode recrutar SOCS3 ao complexo ativado do receptor, passando a exercer uma função regulatória negativa sobre a via JAK/STAT. Durante a transdução do sinal da IL-6, SHP2 e SOCS3 não agem independentemente, mas estão funcionalmente acopladas. A redução na ativação de SHP2 pode ser compensada por um aumento na expressão do RNAm de SOCS3. Quando ocorre aumento na expressão de SOCS3 há uma redução nos níveis de fosforilação de SHP2. Isto ocorre em virtude da inibição das JAKs pela SOCS3. Em tecido cardíaco de ratos adultos,

o padrão de associação entre SOCS3 e as fosfatases SHP1 e SHP2 permanece inalterado após o estímulo com AII (FIGURAS 15 a e 15 b).

Com base nos resultados do presente estudo, podemos supor que a expressão de SOCS3 induzida pela AII seja um fenômeno fisiológico e que SOCS3 possa participar no controle da função da AII, promovendo a regulação negativa da via JAK/STAT através de sua ligação à JAK2. Possivelmente, tal mecanismo exerce importante controle na via de sinalização da AII e pode participar de ajustes fisiológicos que promovem controle da pressão arterial e crescimento cardíaco e vascular (DOSTAL et al., 1997).

Em vista dos presentes resultados, verificamos que a sinalização da AII pode ser limitada quanto ao tempo de ativação das proteínas participantes da via JAK/STAT. Verificamos que enquanto a fosfatase SHP2 permanecer ativa, JAK2 continuará transduzindo o sinal da AII através do receptor AT1. Entretanto, quando houver a ativação de SHP1, o sinal será inibido, uma vez que SHP1 desfosforila JAK2. Podemos afirmar que a fosfatase SHP1 é a proteína responsável pela desfosforilação de JAK2 subsequentemente à sua fosforilação induzida por AII. Logo, esta fosfatase constitui-se numa das proteínas responsáveis por inibir a via de sinalização JAK/STAT induzida pela AII, atuando como um regulador negativo. Por outro lado, SHP2 tem papel fundamental na transmissão do sinal induzido por AII.

Uma vez que a proteína SHP1 encontra-se constitutivamente presente nas células e é rapidamente ativada após estímulo com AII, em contraste às proteínas SOCS, sugerimos que a proteína SHP1 possa funcionar como um regulador negativo da sinalização da AII de uma maneira mais aguda, e que a proteína SOCS3 funcione como um regulador negativo a médio e longo prazo da sinalização da AII.

Através deste estudo, pudemos apresentar uma completa caracterização dos eventos moleculares induzidos pela AII que levam à ativação e desativação da via JAK/STAT em coração

de ratos adultos. Além da inibição do sinal da AII pela fosfatase SHP1, uma proteína controladora da sinalização celular, tradicionalmente envolvida na inibição do sinal das citocinas, chamada SOCS3, também foi encontrada formando um complexo com JAK2, o que nos faz sugerir que ela possa ter um papel importante na regulação negativa do sinal da AII através da via JAK/STAT em coração de ratos Wistar adultos.

VI – CONCLUSÃO

VI -CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, toda a sequência de eventos de associação e dissociação de proteínas sinalizadoras participantes da via JAK/STAT após tratamento agudo de ratos com AII. Através deste estudo, identificamos um novo participante da via JAK/STAT, a proteína SOCS3, a qual deve colaborar no processo de desligamento do sinal gerado por AII. Esta é a primeira evidência da participação de um membro da família de proteínas SOCS nos eventos de sinalização celular que ocorrem através de um receptor pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi, M., Fischer, E. H., Ihle, J., Imai, K., Jirik, F., Neel, B., Pawson, T., Shen, S., Thomas, M., Ullrich, A. et al. (1996). Mammalian SH2-containing protein tyrosine phosphatases. *Cell* **85**, 15.

Ali, M. S., Sayeski, P. P., Dirksen, L. B., Hayzer, D. J., Marrero, M. B. and Bernstein, K. E. (1997a). Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* **272**, 23382-8.

Ali, M. S., Sayeski, P. P., Safavi, A., Lyles, M. and Bernstein, K. E. (1998). Janus kinase 2 (Jak2) must be catalytically active to associate with the AT1 receptor in response to angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 672-7.

Ali, M. S., Schieffer, B., Delafontaine, P., Bernstein, K. E., Ling, B. N. and Marrero, M. B. (1997b). Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation and activation of insulin receptor substrate 1 and protein-tyrosine phosphatase 1D in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **272**, 12373-9.

Ali, S., Chen, Z., Lebrun, J. J., Vogel, W., Kharitononkov, A., Kelly, P. A. and Ullrich, A. (1996). PTP1D is a positive regulator of the prolactin signal leading to beta-casein promoter activation. *Embo J* **15**, 135-42.

Allen, A. M., Zhuo, J. and Mendelsohn, F. A. (2000). Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* **13**, 31S-38S.

Anderson, K. M., Murahashi, T., Dostal, D. E. and Peach, M. J. (1993). Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* **264**, C179-88.

Auernhammer, C. J., Bousquet, C. and Melmed, S. (1999). Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6964-9.

Baker, K. M. and Aceto, J. F. (1990). Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* **259**, H610-8.

Balmforth, A. J., Shepherd, F. H., Warburton, P. and Ball, S. G. (1997). Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor. *Br J Pharmacol* **122**, 1469-77.

Baumann, H., Morella, K. K., White, D. W., Dembski, M., Bailon, P. S., Kim, H., Lai, C. F. and Tartaglia, L. A. (1996). The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8374-8.

Bedecs, K., Elbaz, N., Sutren, M., Masson, M., Susini, C., Strosberg, A. D. and Nahmias, C. (1997). Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J* **325**, 449-54.

Berk, B. C. and Corson, M. A. (1997). Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* **80**, 607-16.

Bhat, G. J., Thekkumkara, T. J., Thomas, W. G., Conrad, K. M. and Baker, K. M. (1994). Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J Biol Chem* **269**, 31443-9.

Bhat, G. J., Thekkumkara, T. J., Thomas, W. G., Conrad, K. M. and Baker, K. M. (1995). Activation of the STAT pathway by angiotensin II in T3CHO/AT1A cells. Cross-talk between angiotensin II and interleukin-6 nuclear signaling. *J Biol Chem* **270**, 19059-65.

Bjorbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J. D. and Flier, J. S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* **274**, 30059-65.

Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E. and Flier, J. S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* **1**, 619-25.

Bjorbak, C., Lavery, H. J., Bates, S. H., Olson, R. K., Davis, S. M., Flier, J. S. and Myers, M. G., Jr. (2000). SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* **275**, 40649-57.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

Brechler, V., Reichlin, S., De Gasparo, M. and Bottari, S. P. (1994). Angiotensin II stimulates protein tyrosine phosphatase activity through a G-protein independent mechanism. *Receptors Channels* **2**, 89-98.

Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* **109**, 1139-42.

Chauhan, D., Kharbanda, S. M., Ogata, A., Urashima, M., Frank, D., Malik, N., Kufe, D. W. and Anderson, K. C. (1995). Oncostatin M induces association of Grb2 with Janus kinase JAK2 in multiple myeloma cells. *J Exp Med* **182**, 1801-6.

Chien, K. R. (1999). Stress pathways and heart failure. *Cell* **98**, 555-8.

Conchon, S., Peltier, N., Corvol, P. and Clauser, E. (1998). A noninternalized non-desensitized truncated AT1A receptor transduces an amplified ANG II signal. *Am J Physiol* **274**, E336-45.

Cui, T., Nakagami, H., Iwai, M., Takeda, Y., Shiuchi, T., Daviet, L., Nahmias, C. and Horiuchi, M. (2001). Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT2 receptor-mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res* **49**, 863-71.

Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-5.

Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-21.

Dostal, D. E. and Baker, K. M. (1992). Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens* **5**, 276-80.

Dostal, D. E., Hunt, R. A., Kule, C. E., Bhat, G. J., Karoor, V., McWhinney, C. D. and Baker, K. M. (1997). Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 2893-902.

Du, J., Sperling, L. S., Marrero, M. B., Phillips, L. and Delafontaine, P. (1996). G-protein and tyrosine kinase receptor cross-talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin- and angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 934-9.

Duff, J. L., Marrero, M. B., Paxton, W. G., Schieffer, B., Bernstein, K. E. and Berk, B. C. (1995). Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovasc Res* **30**, 511-7.

Dzau, V. J. (1987). Vascular angiotensin pathways: a new therapeutic target. *J Cardiovasc Pharmacol* **10**, S9-16.

Emilsson, V., Arch, J. R., de Groot, R. P., Lister, C. A. and Cawthorne, M. A. (1999). Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett* **455**, 170-4.

Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H. et al. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921-4.

Eriksson, A., Nanberg, E., Ronnstrand, L., Engstrom, U., Hellman, U., Rupp, E., Carpenter, G., Heldin, C. H. and Claesson-Welsh, L. (1995). Demonstration of functionally different interactions between phospholipase C-gamma and the two types of platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* **270**, 7773-81.

Favre, H., Benhamou, A., Finidori, J., Kelly, P. A. and Edery, M. (1999). Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett* **453**, 63-6.

Feng, J., Witthuhn, B. A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I. M. and Ihle, J. N. (1997). Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol* **17**, 2497-501.

Frank, S. J., Gilliland, G., Kraft, A. S. and Arnold, C. S. (1994). Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endocrinology* **135**, 2228-39.

Fuhrer, D. K., Feng, G. S. and Yang, Y. C. (1995). Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin- 11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes. *J Biol Chem* **270**, 24826-30.

Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K. and Hirano, T. (1997). An alternative

pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* **14**, 751-61.

Geisterfer, A. A., Peach, M. J. and Owens, G. K. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* **62**, 749-56.

Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H. and Skoda, R. C. (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6231-5.

Gibbons, G. H., Pratt, R. E. and Dzau, V. J. (1992). Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* **90**, 456-61.

Gouilleux, F., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Wakao, H., Haldosen, L. A., Norstedt, G., Levy, D. and Groner, B. (1995). Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *Embo J* **14**, 2005-13.

Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M. and Groner, B. (1994). Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J* **13**, 4361-9.

Griendling, K. K., Delafontaine, P., Rittenhouse, S. E., Gimbrone, M. A., Jr. and Alexander, R. W. (1987). Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **262**, 14555-62.

Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J. and Schindler, C. (1996). The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. *Embo J* **15**, 1075-84.

Hanatani, A., Yoshiyama, M., Kim, S., Omura, T., Toda, I., Akioka, K., Teragaki, M., Takeuchi, K., Iwao, H. and Takeda, T. (1995). Inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist of cardiac phenotypic modulation after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 1905-14.

Hansen, J. A., Lindberg, K., Hilton, D. J., Nielsen, J. H. and Billestrup, N. (1999). Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* **13**, 1832-43.

Harpur, A. G., Andres, A. C., Ziemiecki, A., Aston, R. R. and Wilks, A. F. (1992). JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**, 1347-53.

Hausdorff, S. F., Bennett, A. M., Neel, B. G. and Birnbaum, M. J. (1995). Different signaling roles of SHPTP2 in insulin-induced GLUT1 expression and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **270**, 12965-8.

Hefti, M. A., Harder, B. A., Eppenberger, H. M. and Schaub, M. C. (1997). Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 2873-92.

Hein, L., Meinel, L., Pratt, R. E., Dzau, V. J. and Kobilka, B. K. (1997). Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol* **11**, 1266-77.

Helman, D., Sandowski, Y., Cohen, Y., Matsumoto, A., Yoshimura, A., Merchav, S. and Gertler, A. (1998). Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT5 signaling. *FEBS Lett* **441**, 287-91.

Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D. and Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 114-9.

Horiuchi, M., Hayashida, W., Akishita, M., Tamura, K., Daviet, L., Lehtonen, J. Y. and Dzau, V. J. (1999). Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res* **84**, 876-82.

Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T. and Dzau, V. J. (1997). Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 19022-6.

Horvath, C. M. and Darnell, J. E. (1997). The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 233-9.

Hunyady, L. (1999). Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization. *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**, S47-56.

Iglesias, A. G., Suarez, C., Feierstein, C., Diaz-Torga, G. and Becu-Villalobos, D. (2001). Desensitization of angiotensin II: effect on. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E462-70.

Ihle, J. N. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* **84**, 331-4.

Ihle, J. N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 211-7.

Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B. and Silvennoinen, O. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* **19**, 222-7.

Ishizaka, N., Alexander, R. W., Laursen, J. B., Kai, H., Fukui, T., Oppermann, M., Lefkowitz, R. J., Lyons, P. R. and Griendling, K. K. (1997). G protein-coupled receptor kinase 5 in cultured vascular smooth muscle cells and rat aorta. Regulation by angiotensin II and hypertension. *J Biol Chem* **272**, 32482-8.

Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O. and Coffman, T. M. (1995). Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3521-5.

Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Platanias, L. C. and Yi, T. (1996). Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2- domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* **16**, 6985-92.

Johnston, J. A., Wang, L. M., Hanson, E. P., Sun, X. J., White, M. F., Oakes, S. A., Pierce, J. H. and O'Shea, J. J. (1995). Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *J Biol Chem* **270**, 28527-30.

Kai, H., Fukui, T., Lassegue, B., Shah, A., Minieri, C. A. and Griendling, K. K. (1996). Prolonged exposure to agonist results in a reduction in the levels of the Gq/G11 alpha subunits in cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **49**, 96-104.

Kai, H., Griendling, K. K., Lassegue, B., Ollerenshaw, J. D., Runge, M. S. and Alexander, R. W. (1994). Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Hypertension* **24**, 523-7.

Kang, P. M., Nakouzi, A., Simpson, T., Scheuer, J. and Buttrick, P. M. (1996). Role of endogenous renin-angiotensin system in c-fos activation and PKC- epsilon translocation in adult rat hearts. *Am J Physiol* **270**, H2177-83.

Kazlauskas, A., Feng, G. S., Pawson, T. and Valius, M. (1993). The 64-kDa protein that associates with the platelet-derived growth factor receptor beta subunit via Tyr-1009 is the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6939-43.

Kim, S., Kawamura, M., Wanibuchi, H., Ohta, K., Hamaguchi, A., Omura, T., Yukimura, T., Miura, K. and Iwao, H. (1995a). Angiotensin II type 1 receptor blockade

inhibits the expression of immediate-early genes and fibronectin in rat injured artery. *Circulation* **92**, 88-95.

Kim, S., Ohta, K., Hamaguchi, A., Omura, T., Yukimura, T., Miura, K., Inada, Y., Ishimura, Y., Chatani, F. and Iwao, H. (1995b). Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **273**, 509-15.

Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. and Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24.

Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G. and Lodish, H. F. (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729-38.

Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Makino, S., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S. and Ogawa, S. (1998). Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ Res* **82**, 244-50.

Krebs, D. L. and Hilton, D. J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**, 378-87.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

Lassegue, B., Alexander, R. W., Clark, M., Akers, M. and Griendling, K. K. (1993). Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* **292**, 509-17.

Lassegue, B., Alexander, R. W., Nickenig, G., Clark, M., Murphy, T. J. and Griendling, K. K. (1995). Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1

receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* **48**, 601-9.

Leaman, D. W., Pisharody, S., Flickinger, T. W., Commane, M. A., Schlessinger, J., Kerr, I. M., Levy, D. E. and Stark, G. R. (1996). Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **16**, 369-75.

Lehtonen, J. Y., Daviet, L., Nahmias, C., Horiuchi, M. and Dzau, V. J. (1999). Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis. *Mol Endocrinol* **13**, 1051-60.

Leonard, W. J. and O'Shea, J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* **16**, 293-322.

Lindpaintner, K. and Ganten, D. (1991). The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res* **68**, 905-21.

Madiehe, A. M., Lin, L., White, C., Braymer, H. D., Bray, G. A. and York, D. A. (2001). Constitutive activation of STAT-3 and downregulation of SOCS-3 expression induced by adrenalectomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R2048-58.

Marine, J. C., McKay, C., Wang, D., Topham, D. J., Parganas, E., Nakajima, H., Pendeville, H., Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A. et al. (1999). SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* **98**, 617-27.

Marrero, M. B., Schieffer, B., Li, B., Sun, J., Harp, J. B. and Ling, B. N. (1997). Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* **272**, 24684-90.

Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Duff, J. L., Berk, B. C. and Bernstein, K. E. (1995a). The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II-mediated intracellular signalling. *Cardiovasc Res* **30**, 530-6.

Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Heerdt, L., Berk, B. C., Delafontaine, P. and Bernstein, K. E. (1995b). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* **375**, 247-50.

Marrero, M. B., Venema, V. J., Ju, H., Eaton, D. C. and Venema, R. C. (1998). Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol* **275**, C1216-23.

Mascareno, E., Dhar, M. and Siddiqui, M. A. (1998). Signal transduction and activator of transcription (STAT) protein- dependent activation of angiotensinogen promoter: a cellular signal for hypertrophy in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5590-4.

Mascareno, E. and Siddiqui, M. A. (2000). The role of Jak/STAT signaling in heart tissue renin-angiotensin system. *Mol Cell Biochem* **212**, 171-5.

Masuhara, M., Sakamoto, H., Matsumoto, A., Suzuki, R., Yasukawa, H., Mitsui, K., Wakioka, T., Tanimura, S., Sasaki, A., Misawa, H. et al. (1997). Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 439-46.

Matsubara, H., Kanasaki, M., Murasawa, S., Tsukaguchi, Y., Nio, Y. and Inada, M. (1994). Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest* **93**, 1592-601.

Matsuguchi, T., Inhorn, R. C., Carlesso, N., Xu, G., Druker, B. and Griffin, J. D. (1995). Tyrosine phosphorylation of p95Vav in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *Embo J* **14**, 257-65.

McKinsey, T. A. and Olson, E. N. (1999). Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 267-74.

McWhinney, C. D., Dostal, D. and Baker, K. (1998). Angiotensin II activates Stat5 through Jak2 kinase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 751-61.

McWhinney, C. D., Hunt, R. A., Conrad, K. M., Dostal, D. E. and Baker, K. M. (1997). The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 2513-24.

Minamoto, S., Ikegame, K., Ueno, K., Narazaki, M., Naka, T., Yamamoto, H., Matsumoto, T., Saito, H., Hosoe, S. and Kishimoto, T. (1997). Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 79-83.

Moellenhoff, E., Blume, A., Culman, J., Chatterjee, B., Herdegen, T., Lebrun, C. J. and Unger, T. (2001). Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT(1)-receptor expression in the rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R1095-104.

Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. and Bernstein, K. E. (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233-6.

Naftilan, A. J., Pratt, R. E. and Dzau, V. J. (1989). Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **83**, 1419-24.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K. et al. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-9.

Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U. and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* **93**, 397-409.

Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D. et al. (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2- binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6493-8.

Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J. and Nicola, N. A. (1999). Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *Embo J* **18**, 375-85.

Novak, U., Mui, A., Miyajima, A. and Paradiso, L. (1996a). Formation of STAT5-containing DNA binding complexes in response to colony-stimulating factor-1 and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* **271**, 18350-4.

Novak, U., Nice, E., Hamilton, J. A. and Paradiso, L. (1996b). Requirement for Y706 of the murine (or Y708 of the human) CSF-1 receptor for STAT1 activation in response to CSF-1. *Oncogene* **13**, 2607-13.

Oppermann, M., Freedman, N. J., Alexander, R. W. and Lefkowitz, R. J. (1996). Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein- coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem* **271**, 13266-72.

Pan, J., Fukuda, K., Kodama, H., Makino, S., Takahashi, T., Sano, M., Hori, S. and Ogawa, S. (1997). Role of angiotensin II in activation of the JAK/STAT pathway induced by acute pressure overload in the rat heart. *Circ Res* **81**, 611-7.

Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D. J., Marine, J. C., Teglund, S., Vanin, E. F., Bodner, S., Colamonici, O. R., van Deursen, J. M. et al. (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385-95.

Paulson, R. F., Vesely, S., Siminovitch, K. A. and Bernstein, A. (1996). Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat Genet* **13**, 309-15.

Paxton, W. G., Marrero, M. B., Klein, J. D., Delafontaine, P., Berk, B. C. and Bernstein, K. E. (1994). The angiotensin II AT1 receptor is tyrosine and serine phosphorylated and can serve as a substrate for the src family of tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 260-7.

Peach, M. J. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* **57**, 313-70.

Peach, M. J. (1981). Molecular actions of angiotensin. *Biochem Pharmacol* **30**, 2745-51.

Pezet, A., Favre, H., Kelly, P. A. and Edery, M. (1999). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* **274**, 24497-502.

Regitz-Zagrosek, V., Auch-Schwelk, W., Neuss, M. and Fleck, E. (1994). Regulation of the angiotensin receptor subtypes in cell cultures, animal models and human diseases. *Eur Heart J* **15 Suppl D**, 92-7.

Regitz-Zagrosek, V., Friedel, N., Heymann, A., Bauer, P., Neuss, M., Rolfs, A., Steffen, C., Hildebrandt, A., Hetzer, R. and Fleck, E. (1995a). Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* **91**, 1461-71.

Regitz-Zagrosek, V., Neuss, M. and Fleck, E. (1995b). Effects of angiotensin receptor antagonists in heart failure: clinical and experimental aspects. *Eur Heart J* **16 Suppl N**, 86-91.

Rivard, N., McKenzie, F. R., Brondello, J. M. and Pouyssegur, J. (1995). The phosphotyrosine phosphatase PTP1D, but not PTP1C, is an essential mediator of fibroblast proliferation induced by tyrosine kinase and G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **270**, 11017-24.

Saad, M. J., Carvalho, C. R., Thirone, A. C. and Velloso, L. A. (1996). Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* **271**, 22100-4.

Sadoshima, J. and Izumo, S. (1993a). Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* **73**, 413-23.

Sadoshima, J. and Izumo, S. (1993b). Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res* **73**, 424-38.

Sadoshima, J. and Izumo, S. (1996). The heterotrimeric G q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *Embo J* **15**, 775-87.

Sadowski, C. L., Choi, T. S., Le, M., Wheeler, T. T., Wang, L. H. and Sadowski, H. B. (2001). Insulin Induction of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA expression in C2C12 Skeletal Muscle Cells Is Mediated by Stat5*. *J Biol Chem* **276**, 20703-10.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I. and Yoshimura, A. (2000). CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* **275**, 29338-47.

Sayeski, P. P., Ali, M. S., Frank, S. J. and Bernstein, K. E. (2001). The angiotensin II-dependent nuclear translocation of Stat1 is mediated by the Jak2 protein motif 231YRFRR. *J Biol Chem* **276**, 10556-63.

Sayeski, P. P., Ali, M. S., Semeniuk, D. J., Doan, T. N. and Bernstein, K. E. (1998). Angiotensin II signal transduction pathways. *Regul Pept* **78**, 19-29.

Schindler, C. and Darnell, J. E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* **64**, 621-51.

Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. and Schaper, F. (2000). SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* **275**, 12848-56.

Schunkert, H., Sadoshima, J., Cornelius, T., Kagaya, Y., Weinberg, E. O., Izumo, S., Riegger, G. and Lorell, B. H. (1995). Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II. *Circ Res* **76**, 489-97.

Sechi, L. A., Griffin, C. A., Grady, E. F., Kalinyak, J. E. and Schambelan, M. (1992). Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res* **71**, 1482-9.

Sengupta, T. K., Schmitt, E. M. and Ivashkiv, L. B. (1996). Inhibition of cytokines and JAK-STAT activation by distinct signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9499-504.

Shenoy, U. V., Richards, E. M., Huang, X. C. and Summers, C. (1999). Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology* **140**, 500-9.

Siewert, E., Muller-Esterl, W., Starr, R., Heinrich, P. C. and Schaper, F. (1999). Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem* **265**, 251-7.

Silvennoinen, O., Ihle, J. N., Schlessinger, J. and Levy, D. E. (1993). Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* **366**, 583-5.

Siragy, H. M. (2000). The role of the AT2 receptor in hypertension. *Am J Hypertens* **13**, 62S-67S.

Smit, L. S., Meyer, D. J., Billestrup, N., Norstedt, G., Schwartz, J. and Carter-Su, C. (1996). The role of the growth hormone (GH) receptor and JAK1 and JAK2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. *Mol Endocrinol* **10**, 519-33.

Smith, R. D., Baukal, A. J., Zolyomi, A., Gaborik, Z., Hunyady, L., Sun, L., Zhang, M., Chen, H. C. and Catt, K. J. (1998). Agonist-induced phosphorylation of the endogenous AT1 angiotensin receptor in bovine adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* **12**, 634-44.

Starr, R. and Hilton, D. J. (1999). Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* **21**, 47-52.

Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A. et al. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-21.

Sugden, P. H. (1999). Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ Res* **84**, 633-46.

Sun, H. and Tonks, N. K. (1994). The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **19**, 480-5.

Suzuki, R., Sakamoto, H., Yasukawa, H., Masuhara, M., Wakioka, T., Sasaki, A., Yuge, K., Komiya, S., Inoue, A. and Yoshimura, A. (1998). CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene* **17**, 2271-8.

Takeshita, T., Arita, T., Higuchi, M., Asao, H., Endo, K., Kuroda, H., Tanaka, N., Murata, K., Ishii, N. and Sugamura, K. (1997). STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* **6**, 449-57.

Tambascia, R. C., Fonseca, P. M., Corat, P. D., Moreno, H., Jr., Saad, M. J. and Franchini, K. G. (2001). Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. *Hypertension* **37**, 1423-8.

Taubman, M. B., Berk, B. C., Izumo, S., Tsuda, T., Alexander, R. W. and Nadalginard, B. (1989). Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J Biol Chem* **264**, 526-30.

Tauchi, T., Feng, G. S., Shen, R., Hoatlin, M., Bagby, G. C., Jr., Kabat, D., Lu, L. and Broxmeyer, H. E. (1995). Involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp in erythropoietin receptor signal transduction pathways. *J Biol Chem* **270**, 5631-5.

Thomas, W. G. (1999). Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regul Pept* **79**, 9-23.

Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T. and Herblin, W. F. (1991). Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 55-62.

Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. and Smith, R. D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* **45**, 205-51.

Tollet-Egnell, P., Flores-Morales, A., Stavreus-Evers, A., Sahlin, L. and Norstedt, G. (1999). Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* **140**, 3693-704.

Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitononkov, A., Imyanitov, E., Ullrich, A. and Bohmer, F. D. (1995). Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C. *J Biol Chem* **270**, 21277-84.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (1993). Signal transduction in hypertension: Part II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2**, 17-26.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* **52**, 639-72.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.

Tsai, J. C., Jain, M., Hsieh, C. M., Lee, W. S., Yoshizumi, M., Patterson, C., Perrella, M. A., Cooke, C., Wang, H., Haber, E. et al. (1996). Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N- acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271**, 3667-70.

Tsuda, T., Kawahara, Y., Shii, K., Koide, M., Ishida, Y. and Yokoyama, M. (1991). Vasoconstrictor-induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **285**, 44-8.

Tsui, H. W., Siminovitch, K. A., de Souza, L. and Tsui, F. W. (1993). Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* **4**, 124-9.

Valius, M., Bazenet, C. and Kazlauskas, A. (1993). Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor beta subunit and are required for binding of phospholipase C gamma and a 64- kilodalton protein, respectively. *Mol Cell Biol* **13**, 133-43.

Velloso, L. A., Folli, F., Sun, X. J., White, M. F., Saad, M. J. and Kahn, C. R. (1996). Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12490-5.

Venema, R. C., Ju, H., Venema, V. J., Schieffer, B., Harp, J. B., Ling, B. N., Eaton, D. C. and Marrero, M. B. (1998). Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G- protein-coupled AT1 receptor. *J Biol Chem* **273**, 7703-8.

Watling, D., Guschin, D., Muller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Rogers, N. C., Schindler, C., Stark, G. R., Ihle, J. N. et al. (1993). Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* **366**, 166-70.

Weber, K. T. and Brilla, C. G. (1991). Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin- angiotensin-aldosterone system. *Circulation* **83**, 1849-65.

Welham, M. J., Dechert, U., Leslie, K. B., Jirik, F. and Schrader, J. W. (1994). Interleukin (IL)-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce

tyrosine phosphorylation, activation, and association of SHPTP2 with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem* **269**, 23764-8.

Witte, K. and Lemmer, B. (1996). Signal transduction in animal models of normotension and hypertension. *Ann NY Acad Sci* **783**, 71-83.

Wong, J., Chou, L. and Reid, I. A. (1993). Role of AT1 receptors in the resetting of the baroreflex control of heart rate by angiotensin II in the rabbit. *J Clin Invest* **91**, 1516-20.

Wood, T. J., Sliva, D., Lobie, P. E., Pircher, T. J., Gouilleux, F., Wakao, H., Gustafsson, J. A., Groner, B., Norstedt, G. and Haldosen, L. A. (1995). Mediation of growth hormone-dependent transcriptional activation by mammary gland factor/Stat 5. *J Biol Chem* **270**, 9448-53.

Wright, J. H., Drueckes, P., Bartoe, J., Zhao, Z., Shen, S. H. and Krebs, E. G. (1997). A role for the SHP-2 tyrosine phosphatase in nerve growth-induced PC12 cell differentiation. *Mol Biol Cell* **8**, 1575-85.

Xiao, S., Rose, D. W., Sasaoka, T., Maegawa, H., Burke, T. R., Jr., Roller, P. P., Shoelson, S. E. and Olefsky, J. M. (1994). Syp (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor-stimulated mitogenic signal transduction. *J Biol Chem* **269**, 21244-8.

Yamada, T., Horiuchi, M. and Dzau, V. J. (1996). Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 156-60.

Yasukawa, H., Hoshijima, M., Gu, Y., Nakamura, T., Pradervand, S., Hanada, T., Hanakawa, Y., Yoshimura, A., Ross, J., Jr. and Chien, K. R. (2001). Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest* **108**, 1459-67.

Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N. et al. (1999). The JAK-binding pro-

tein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* **18**, 1309-20.

Yasukawa, H., Sasaki, A. and Yoshimura, A. (2000). Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* **18**, 143-64.

Yi, T. and Ihle, J. N. (1993). Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol Cell Biol* **13**, 3350-8.

Yi, T., Mui, A. L., Krystal, G. and Ihle, J. N. (1993). Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol* **13**, 7577-86.

Yin, T., Shen, R., Feng, G. S. and Yang, Y. C. (1997). Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *J Biol Chem* **272**, 1032-7.

Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G. (1996). Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein- coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**, 18302-5.

Zhang, J. G., Farley, A., Nicholson, S. E., Willson, T. A., Zugaro, L. M., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G. et al. (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2071-6.

Zhuang, H., Patel, S. V., He, T. C., Sonsteby, S. K., Niu, Z. and Wojchowski, D. M. (1994). Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase-deficient form of Jak2. *J Biol Chem* **269**, 21411-4.

VII – ANEXOS

Molecular dynamics of angiotensin II signaling through JAK2 in heart of living rats

Molecular mechanisms of AII signaling

Vivian C. Calegari, Wilson Nadruz Jr., Kleber G. Franchini,
Mario J. A. Saad, Lício A. Velloso

Department of Internal Medicine, University of Campinas, Brazil

Corresponding author: Lício A. Velloso, Departamento de Clínica Médica – FCM,
UNICAMP, 13081 970 – Campinas SP, Brazil

Email: lavelloso@fcm.unicamp.br

Fax +55 19 37888950

Summary

A complex interplay of tyrosine phosphorylation/dephosphorylation events accompanied by protein-protein association/dissociation participates in the activation and deactivation of the angiotensin II signal. In the present series of experiments, a complete characterization of the molecular dynamics of the angiotensin II signal in cardiac tissue of living animals is reported. Evaluation of signaling events was performed by immunoprecipitation, immunoblotting, immunohistochemistry and subcellular fractionation. Most of JAK2 immunoreactivity is detected associated with SHP2 in a cytosolic compartment and presenting a low tyrosine phosphorylation status. AT1, mostly located in a membrane compartment, presents low tyrosine phosphorylation and is associated with SHP1 while AT2 is associated with a restricted pool of JAK2, SHP1 and SHP2. Following angiotensin II stimulus, SHP1 dissociates from AT1 and AT2, which is followed by a rapid tyrosine phosphorylation of SHP2 that migrates together with JAK2 from the cytosolic compartment to a membrane – AT1 associated fraction. After 15-30 min of the angiotensin II pulse SHP1 becomes tyrosine phosphorylated and binds to JAK2, participating on its tyrosine dephosphorylation inducing its dissociation from AT1 and return to the cytosolic and the AT2-bound fraction. In parallel, SOCS-3 is induced by angiotensin II and after 20 minutes a rise on its protein levels is detected in a membrane fraction in association with JAK2.

Key words. Angiotensin II / AT1 / AT2 / JAK2 / Signal transduction / SOCS3.

Introduction

The octapeptide hormone angiotensin II (AII) is the active component of the renin-angiotensin system, resulting from the cleavage of angiotensin I by angiotensin-converting-enzyme (ACE) in the lungs (10, 32, 39). It acts through two members of the G-protein coupled receptor superfamily, the angiotensin receptor 1 (AT1) and the angiotensin receptor 2 (AT2), which are seven-spanning-transmembrane proteins of approximately 51 kDa (3, 22), equally distributed on cardiomyocytes (27, 38). AII activates transcription of proto-oncogenes (such as c-fos, c-jun, c-myc and Egr-1), genes encoding extracellular matrix proteins (such as collagen and fibronectin) and growth factors (such as platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β) (34, 19). The binding of AII to AT1 promotes the activation of several different intracellular signal transduction pathways that use the well-known signal transducers protein kinase A, protein kinase C, MAP kinase, and src (34, 11, 6). In addition to the signal transduction pathways above, AII also activates the JAK/STAT pathway.

Most studies on the characterization of AII-induced JAK/STAT signaling were performed in isolated cultured cells. From those studies we have learned that differently than the paradigmatic concept of pre-association between the receptor and JAK2, in AT1 transduced signal JAK2 is not previously associated with the receptor (24, 28). Following the binding of AII to AT1, JAK2 binds to SHP2, which functions as an adapter protein for JAK2 association with AT1 receptor, facilitating JAK2 phosphorylation and activation (25). The previous tyrosine phosphorylation of JAK2 (2), and the molecular integrity of the sites ³¹⁹YIPP of AT1 (1) and ²³¹YRFRR of JAK2 (37) are necessary for the activation of the pathway. Once activated, JAK2 engages at different time points the signal transducers STAT1 and STAT3, which will carry the signal towards the nucleus and participate in the transcriptional activation or inactivation of several (most of

them unknown) genes. Although the cytoplasmic proteins that transduce the signal are relatively well-defined and include Janus kinase (JAK) family of tyrosine kinases and signal transducers and activators of transcription (STAT) factors (9, 18), little is known about the shutting-down of the AII signaling through the JAK/STAT pathway. In cultured vascular cells, SHP1 seems to be the phosphatase that dephosphorylates JAK2 following AII-induced JAK2 phosphorylation (25). Thus, like erythropoietin receptor signaling in hematopoietic cells (27, 38), and in G protein-coupled AT1 receptor signaling in cultured vascular cells (3), it is believed that the interaction of JAK2 with the activated tyrosine phosphatase (SHP1) is responsible for turning off the signal in living hearts. Also, the JAK/STAT pathway can be regulated by several mechanisms, including receptor internalization and degradation by the proteosome pathway (43). In recent years many members of the cytokine I and cytokine II receptor families were shown to induce, on a ligand-receptor activation basis, the expression and functional activation of suppressor-of-cytokine-signaling (SOCS) proteins. This new class of proteins (already counting on 8 members: CIS and SOCS1-7) (42, 26) is characterized by the possession of a highly conserved C-terminal domain, the SOCS box, a SH2 domain at its core and a variable N-terminal head (40). SOCS proteins are induced by the activation of JAK/STAT pathway by leptin (5, 12), insulin (35), growth hormone (41, 13) and prolactin (15, 31), and when expressed they inhibit signaling and biological activities of inducers (5, 12, 13, 15, 31, 35, 41). These facts suggest that SOCS proteins can function as inducible intracellular negative regulators of cytokine, leptin and insulin signal transduction. Recently we were able to demonstrate the induction of SOCS3 in the heart and hypothalamus of living rats, acutely treated with physiologic doses of AII (unpublished data). Thus, it seems that in addition to SHP1, the JAK/STAT signaling system induced by AII may be regulated by yet another mechanism.

In the present series of experiments we characterize the dynamics of tyrosine phosphorylation and subcellular migration of members of the AT1/JAK2 and AT2/JAK2 signaling pathway in the heart of living rats. Moreover, it is demonstrated the time course of expression and the subcellular location of the association between JAK2 and the newly identified candidate for controlling the AII signal, SOCS3.

Results

The dynamics of AT1, AT2, JAK2, SHP1 and SHP2 tyrosine phosphorylation in response to AII in heart

Following the intravenous injection of 0.02 ml of 10^{-6} M AII in anesthetized rats, fragments of tips of hearts were obtained at different time points and homogenized to prepare protein extracts. The tyrosine phosphorylation status of proteins participating in the transduction of the AII signal was evaluated using specific target antibodies for immunoprecipitation and anti-phosphotyrosine antibodies for blotting. Before the AII pulse, AT1 presents a low-level basal tyrosine phosphorylation, which starts to increase after 90 sec of AII treatment. It peaks at 10 min, and is back to pre-busting standards at 30 min (Fig. 1a). AT2 presents a discrete level of tyrosine phosphorylation in basal state, reaching high phosphorylation level between 3 and 6 min, and is back to basal status after 10 min (Fig. 1b). Similarly, JAK2 is weakly tyrosine-phosphorylated before the AII pulse, it starts to incorporate phosphorus in tyrosine residues at 3 min following AII injection, peaks at 10 min and is back to basal standards at ~30 min (Fig. 1c). The tyrosine phosphatase SHP1 presents a different pattern of tyrosine phosphorylation. It is weakly tyrosine-phosphorylated before AII treatment, then its tyrosine phosphorylation status presents a subtle

and transient rise around 90 sec after stimulation, decreases between 3 and 10 min, becoming heavily tyrosine-phosphorylated at 15 min and returning to basal levels at 30 min (Fig. 1d). Finally, SHP2 presents a discrete level of tyrosine phosphorylation before AII pulse. Following hormone injection it becomes rapidly phosphorylated at 90 sec, presenting a peak at 3 min and returning to basal levels at 30 min (Fig. 1e). The AT1, JAK2, SHP1 and SHP2 phosphorylation levels at 60 and 120 min following AII stimulus presents no significant differences to that of control (not shown, $n = 3$).

The dynamics of association/dissociation among participants in the AT1/JAK2 and AT2/JAK2 signaling systems in response to AII in the heart of rats

In isolated cell systems the association/dissociation of the participants in the AT1/JAK2 signaling system seems to play an important role in transmission and control of the signal. Therefore, we performed a series of time-course immunoassociation experiments to investigate the dynamics of molecular interaction between participants of this signaling system in heart of adult rats. To examine the role of AII upon the association of AT1 and AT2 with JAK2, rats were treated with 10^{-6} M AII for the times specified, and the tip of the heart was excised and homogenized as described in "Methods". Proteins were immunoprecipitated with anti-AT1 or anti-AT2 antibodies, separated by gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and then immunoblotted with anti-JAK2 antibody. As shown in Fig. 2a, AII stimulates the association between AT1 and JAK2 in heart with a time-course beginning at 6 min which is sustained up to the 10th min and returning to basal levels at 30 min. Interestingly, the time-course of association AT1/JAK2 is the same as for phosphorylation of AT1 (6 - 10 min) and JAK2 (6 - 10 min) after AII stimuli, as shown in Figs. 1a and 1b. Differently than AT1/JAK2 association, AT2 is apparently encountered in association

with JAK2 before AII pulse. Thereafter, the association diminishes by approximately 20%, reaching a nadir at 15 min and is back to near-basal levels at 120 min.

In the next step the role of AII upon the association of SHP1 and SHP2 with AT1, AT2 and JAK2 was examined. Firstly, to verify whether the AII-induced changes in tyrosine phosphorylation state of SHP1 and SHP2 are correlated with modulation of SHP1 and SHP2 expression, 200 μ g of total protein extracts obtained from hearts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-SHP1 or anti-SHP2 antibodies. Equal amounts of SHP1 and SHP2 are shown to be present at each time point, demonstrating that AII exerts no direct modulatory role upon the expression of either protein (not shown, $n = 3$). In order to evaluate the association of SHP1 and SHP2 with participants in the AII signaling pathway, immunoprecipitates (anti-SHP1 and anti-SHP2) obtained from heart protein extracts were immunoblotted with anti-AT1, anti-AT2 or anti-JAK2. As shown in Fig 3a, the anti-SHP1 antibody co-immunoprecipitates a large amount of AT1 in basal state. However, within 3 min after AII stimulus, the amount of co-precipitating AT1 is greatly decreased, remaining for 15 min and returning to basal levels at 30 min. Small amounts of SHP2 co-precipitates with AT1 at basal state. However, significant co-immunoprecipitation is observed after 3 min of AII stimulus, reaching a maximum peak at 6 min, remaining as a stable complex for at least 10 min, and then returning to basal levels (Fig. 3c). As shown in Fig. 3b, SHP1 is associated at high levels with AT2 in basal state. Following AII stimulus the association rapidly falls between 15 and 90 sec, increasing again at 3 min and reaching a peak at 10 min. At 120 min the association AT2/SHP1 is low once again. Similarly, AT2 is associated with SHP2 at non-stimulated condition, diminishing after AII stimulus and returning to associate between 3 min and 10 min; thereafter the association decreases to lower-than basal levels (Fig. 3d). AT2 receptor stimulation inhibits the AT1 receptor-mediated tyrosine phosphoryla-

tion of STATs, whereas AT2 receptor does not affect the tyrosine phosphorylation of JAK2 (16). Thus, it is suggested that AT2 receptor-activated PTPases may directly dephosphorylate the tyrosine residues of STATs (16). Recently the activation of SHP1 via AT2 receptor was reported (4), suggesting that SHP1 is one of the phosphatases that mediate dephosphorylation of STATs by AT2 receptor stimulation. The evaluation of the mechanism of dephosphorylation of JAK may further reveal the mechanism of the distinct dephosphorylation of STAT and JAK via AT2 receptor. As shown in Fig. 3e, SHP1 co-precipitates a small amount of JAK2 (130 KDa) at basal state. After AII chase, a very small amount of JAK2 is co-immunoprecipitated with SHP1, reaching a nadir at 6 min and remaining constant until 10 - 15 min, returning finally to basal levels at 30 min. On the other hand, AII-induced complex formation between JAK2 and SHP2, follows a completely different time-course. When the immunoprecipitates from anti-SHP2 are immunoblotted with anti-JAK2 antibody, we observe low association level at pre-treatment time, which increases progressively and reaches a maximum level at 6 min returning to lower-than-basal levels at 30 min (Fig. 3f). Hence, in heart of rats SHP2 seems to form an early complex with JAK2 in response to AII, which continues to exist for at least 15 min. It is observed that the maximal association of JAK2 with SHP2 following AII stimulus occurs within 3 to 10 min, during the same period when JAK2 undergoes tyrosine phosphorylation. In contrast, the complex formation of JAK2 with SHP1 is temporally correlated with JAK2 dephosphorylation, consistent with the possibility that SHP1 is the PTPase that dephosphorylates JAK2 in heart of living rats, such as in VSMC according to what has been described by Marrero and coworkers (25). The same results were obtained when the order of the precipitating antibodies was reversed (data not shown, $n = 3$).

The dynamics of SOCS3 induction by AII and its association with JAK2 in the heart of rats

To examine the participation of SOCS3 protein in AT1/JAK2 signaling dynamics, the rats received intravenous injection of 0.02 ml 10^{-6} M AII for the times specified and the tips of the hearts were excised and homogenized. Heart extracts were employed in two different experimental approaches. Initially total protein extracts were resolved by SDS-PAGE, and nitrocellulose transfers were blotted with polyclonal goat anti-SOCS3 (data not shown, $n = 3$). Secondly protein extracts were immunoprecipitated with polyclonal rabbit anti-SOCS3 and immunoblotted with polyclonal goat anti-SOCS3. Both approaches revealed similar results. As shown in Fig. 4a, the time-course of SOCS3 expression is dependent on AII treatment. The figure shows that SOCS3 expression is present at low levels under basal conditions. Its protein level begins to increase after approximately 10 min, reaching significant expression after 2 h of AII stimulus and returning to basal levels at 6 h. The association between SOCS3 and JAK2 following AII stimulus was also studied. The same immunoprecipitation blots used to verify SOCS3 expression were stripped and re-probed with anti-JAK2 antibody. As shown in Fig. 4b, AII-induced JAK2/SOCS3 association follows a similar time-dependent fashion as observed for SOCS3 protein expression. When the order of antibody was reversed the same results were obtained (data not shown, $n = 3$).

Characterization of the subcellular trafficking of elements participating in AII signaling through the AT1/JAK2 pathway

To investigate the subcellular localization of JAK2 and SOCS3 after AII treatment, we first performed the fractionation of rat hearts. As previously described, electron microscopic observation showed that the 1,000 $\times$ g pellet (nuclear fraction) contains the nuclei and myofibrils and that the 100,000 $\times$ g pellet (membrane fraction) includes membrane vesicles and mitochondria (29). For

control of fractional contamination, an antibody against histone H1, a nuclear protein, was used showing its exclusive localization to the nuclear fraction of our samples (not shown, $n = 3$). The fractions were analyzed by immunoblotting using antibodies against JAK2 or SOCS3. As shown in Fig. 5a, in non-AII-stimulated hearts, JAK2 is found equally distributed between the cytosolic (44 %) and membrane fraction (49 %). The amount of JAK2 in the cytosolic fraction decreases after 6 min of AII chase (40 %), reaching a nadir at 20 min, which is accompanied by its concomitant increase in the membrane fraction (49 %). After 12 min, JAK2 level reaches a maximum in the membrane fraction (61 %) remaining steady until 30 min, thereafter it returns to lower-than-basal levels, while the cytosolic fraction of JAK2 increases during the same period. Small amounts of JAK2 were found in nuclear extracts. On the other hand, SOCS3 protein predominates in the nuclear fraction in untreated hearts (43 %), whereas the membrane and cytosol fractions contain only 28 % each (Fig. 5b). The amount of SOCS3 in the membrane fraction decreases significantly from 12 (40 %) to 20 min, with a concomitant decrease in its nuclear fraction (29 %). At 20 min, the amount of SOCS3 in the membrane fraction suffers subtle decrease (21 %), increasing again at 30 min (40 %), and returning to basal levels at 120 min. During the same interval, the cytosolic fraction content of SOCS3 suffers a subtle increase at 20 min (62 %) and a decrease to 29 % at 30 min, for finally reaching, at 2 hs, the same values as for 20 min. After 2 h of AII stimulus, the amount of SOCS3 in the membrane fraction reaches levels comparable to basal while the cytosolic fraction is greatly increased (56 %). When the fractions were analyzed by immunoprecipitation with JAK2 and immunoblotting with SOCS3, we observed that JAK2/SOCS3 association is initially low in cytosolic and membrane fractions. It increases initially in cytosolic fraction (at 6 min) and afterward in membrane fraction (from 12 to 60 min). Finally at 120 min there is a similar amount of JAK2/SOCS3 complex in both fractions. Since

there is an enormous difference in JAK2 and SOCS3 amounts in nucleus fraction, we believe that the apparent high association of both proteins detected in nuclear extracts at pre-stimulus time reflects the unequal stoichiometrics and the plotting of results as a fraction of total amounts (Fig. 6). Thus, it is demonstrated that SOCS3 binds to JAK2 after AII stimulus, initially in a membrane compartment, meanwhile JAK2 is associated with SHP2 and AT1, and at later stages in a cytosolic compartment. The association between AT1 and SOCS3 and AT2 and SOCS3 was not observed (data not shown, $n = 3$) demonstrating that, differently than cytokines (36, 30), SOCS3 binds only to JAK2 in this particular signaling system.

Co-location of JAK2 and SOCS3 in heart after AII stimulus

To confirm the previous results, we examined the location of JAK2 and SOCS3 in ventricle and atrium in basal conditions and after AII treatment. Following AII or saline acute treatment (20 min), hearts were excised, fixed, permeabilized and incubated with specified primary antibodies followed by fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-goat immunoglobulin G antibody and rhodamine-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G antibody. Immunofluorescence microscopy revealed that prior to AII treatment (Fig. 7a) or following saline treatment (data not shown, $n = 2$) there are high amounts of JAK2 in the cytoplasm of cardiomyocytes present in the ventricle and atrium, and at lower magnitude in ventricle and atrium endocardium. Under the non-chased situation only a faint SOCS3 expression is observed mostly in ventricle and atrium endocardium (Fig. 7b). Treatment with AII leads to an increase in SOCS3 immunostaining, mostly in endocardium, and to an impressive co-localization of JAK2 and SOCS3 in several areas of the ventricular and atrial endocardium (Figs. 7c and 7d). These observations, taken together with the immunoblotting and fractionation studies show that AII treatment induces the expression of SOCS3 in heart mus-

cle and endocardium. Moreover they provide evidences that following hormone-induced-expression SOCS3 migrates to the cytoplasm and associates with the kinase JAK2 initially at a membrane and later at a cytosolic fraction site.

Discussion

Several clinical studies have provided evidences that pharmacological blockade of AII action is protective for the loss of cardiac function in patients at risk for ischemic heart disease (8,21). Both reduction of peripheral resistance and the control of *in situ* growth promoting effects of AII in heart are pointed as candidate targets for the beneficial effects of ACEIs and AT1 blockers (20, 23). Therefore, the characterization of molecular events that lead to termination or control of AII signal in heart may provide new targets for pharmaco-therapeutic approaches in hypertrophic and ischemic heart disease.

Besides traditional signaling through the activation of Gq-protein which leads to IP3 generation and rise in cytosolic calcium, AII is known to activate transcription through a series of intracellular tyrosine kinase reactions. The activation of JAK2/STAT (so far including STATs 1, 2, 3 and 5) rapidly drives the signal towards the nucleus and potentially participates in the activation or control of expression of several candidate genes (17). In cultured cellular systems employing a series of mutants, the characterization of sequential events involved in AII signal transduction through AT1 depicts the following picture; after the binding of AII to AT1, SHP2 is tyrosine phosphorylated and apparently mediates the binding of JAK2 to AT1 through the ³¹⁹YIPP site (2, 16). Subsequently JAK2 undergoes autophosphorylation and may mediate the tyrosine phosphorylation of AT1. After at least 10 min SHP1 becomes tyrosine phosphorylated, binds to JAK2

and mediates its dephosphorylation participating thus in signal termination. The blockade of SHP2 abrogates JAK2 phosphorylation and continuation of AII signal transduction through the STAT pathway (25). On the other hand, hampering of SHP1 activity prolongs JAK2 tyrosine phosphorylation time (25).

In the present series of experiments the dynamics of molecular events involved in AT1/JAK2 signaling pathway was characterized in heart of living rats. Most of the outcomes occurring in isolated cell systems are reproduced in living undisrupted tissue but some differences in timing of tyrosine phosphorylation and association events seem to occur. Moreover, based on recent findings of the group (unpublished results) the participation of the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) in the dynamics of AII signaling in living hearts is evidenced for the first time. It is demonstrated that SOCS3 expression and JAK2/SOCS3 association is time-dependent of AII stimulus. Once induced by AII SOCS3 associates with JAK2 initially in a membrane compartment, thereafter migrating to the cytosol. In the ventricles, JAK2 immunoreactivity is present before AII chase, while SOCS3 is undetectable by immunohistochemistry but evidenced at low levels by. Twenty minutes after AII stimulus, SOCS3 becomes detectable and JAK2/SOCS3 are co-localized in several areas of the ventricles and atria, demonstrating that AII stimulates the expression of SOCS3 and its association with JAK2. Accordingly, it is suggested that SOCS3 participates in moderate and long term control of AII signaling through the JAK/STAT pathway and may sum to the already described effects of SHP1 in the mechanisms of shooting down the AII signal in heart.

Based on the present findings a model for AII signaling through AT1/JAK2 system is proposed. Thus, as shown in Figure 8, in resting state AT1 and AT2 present low level of phosphorylation. Following AII stimulus, SHP1 that is encountered bound to AT1 and AT2, dissoci-

ates from both classes of receptor and undergoes rapid and transitory tyrosine phosphorylation in a cytosolic location. Thereafter SHP1 binds to AT2, possibly participating on the induction of its phosphorylation which is followed by SHP2 binding. In parallel, a tyrosine phosphorylated SHP2 binds to JAK2, forming a complex that translocate, bind to AT1 and may participate in the receptor tyrosine phosphorylation at about 6 to 10 min after AII stimulus. At 15 min a heavily tyrosine phosphorylated SHP1 binds to AT1 and may mediate the initial steps of the termination of AII signal by inducing AT1 dephosphorylation, and release and dephosphorylation of JAK2 and SHP2. Meanwhile SOCS3 protein, which is present at low protein levels in the nucleus during the initial phase of AII stimulus, is induced and increasing levels are detected in the cytosol from the 3rd to the 6th min after AII stimulus. Beginning at the 15th min a complex JAK2/SOCS3 is detected transitorily in a membrane bound compartment and lately at the cytosol where it lasts for at least 120 min. In the final part of the scheme the reorganization of the AII sensing apparatus may couple with receptor recycling, and reassembly of an effective protein complex system that allows for a new signal to be delivered appropriately.

In summary, a complete characterization of the AII-induced tyrosine phosphorylation/molecular association events occurring at the membrane and submembrane location in the heart of living rats is presented for the first time. In concert with isolated cell studies and with evaluations obtained from targeted-disrupted-protein systems, it seems that the activation of JAK2 through AT1 depends on the participation of SHP2 and that termination of signal occurs after SHP1 engagement. Moreover, it is shown that a controller of cellular signaling traditionally involved in cytokine signal termination, SOCS3, forms a late complex with JAK2 on an AII dependent basis, and thus may play a role in control of AII signal in cardiac tissues.

Materials and Methods

Antibodies and chemicals

Reagents for SDS/PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Hepes, PMSF, aprotinin, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glycerol, AII and BSA (fraction V) were from Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), 125 I-Protein A and nitrocellulose membranes were from Amersham Corp. (Aylesbury, UK). Polyclonal antibodies against AT1, AT2, JAK2, SHP1, SHP2 and SOCS-3, monoclonal antibodies against phosphotyrosine (pY) and histone H1, and conjugated to fluorescein isothiocyanate and rhodamine complexes utilized in immunofluorescence were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Sodium amobarbital was from Eli Lilly (Indianapolis, IN).

Animals

Male Wistar rats (*rattus norvegicus*) (48 days old/150-200 g) obtained from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised 1996). The animals were allowed free access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12 h before the experiments. Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium amobarbital (15 mg/kg body weight), and the experiments were performed after the loss of corneal and pedal reflexes.

AII treatment and tissue extraction

The abdominal cavity was opened, the vena cava exposed and 0.02 ml of normal saline (0.9% NaCl), with or without 10^{-6} M AII, was injected. After different intervals (described in text on results), the tip of the heart was excised and immediately homogenized in approximately 5 volumes of solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2,0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml] with the Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 s. For immunohistochemistry rats were anesthetized, the abdominal cavity was opened and saline or 10^{-6} M AII (0.02 ml) were injected. After 20 min the heart was removed and processed for histological studies as described below.

Protein analyses by immunoblotting

Insoluble material was removed by centrifugation (15,000 x g, 25 min, 4°C). The protein concentration of the supernatants was determined with the Bradford dye binding method (7) using Bio-Rad reagent. Aliquots of the resulting supernatants containing 5 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against AT1, AT2, JAK2, SHP1, SHP2 or SOCS3 at 4°C overnight, followed by SDS/PAGE and Western blotting with antiphosphotyrosine or anti-AT1, -AT2, -SHP1, -SHP2, -JAK2 or -SOCS3 antibodies as described (14, 33).

Subcellular fractionation

Subcellular fractionation was performed essentially as described previously (29) with minor modifications. Tips of ventricles were minced and homogenized in 2 volumes of STE buffer at

4°C [0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM sodium fluoride, 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 0.1 mg aprotinin/ml] in a Polytron homogenizer. The homogenates were centrifuged (1,000 x g, 25 min, 4°C) to obtain pellets. The pellet was washed once with STE buffer (1,000 x g, 10 min, 4°C) and suspended in Triton buffer [1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 200 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM sodium pyrophosphate, 0.1 mg aprotinin/ml], kept on ice for 30 min and centrifuged (15,000 x g, 30 min, 4°C) to obtain the nuclear fraction. The supernatant was centrifuged (100,000 x g, 60 min, 4°C) to obtain the cytosol fraction and the pellet, which was suspended in STE buffer plus 1% Nonidet P-40, kept on ice for 20 min and centrifuged (100,000 x g, 20 min) to obtain the membrane fraction. The fractions were treated with Laemmli buffer with 100 mM dithiothreitol, heated in a boiling water bath for 5 min, and aliquots (200 µg of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with anti-JAK2 or anti-SOCS3 antibodies as described (14, 33).

Immunofluorescence detection of JAK2/SOCS3 association by light microscopy

The hearts of rats treated or not with AII as stated above, were fixed in buffered 4% paraformaldehyde in 0.2 M phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 24 h, embedded in paraffin, and 3 µm sections were obtained. The glass-mounted sections were cleared of paraffin with xylene and rehydrated by sequential washings with graded ethanol solutions (70-100%). After permeabilization with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline, pH 7.4, for 10 min at room temperature, the sections were washed with phosphate-buffered saline, and incubated in blocking buffer [8% glycine, 2.5% BSA, 2% nonfat dry milk, 0.1 M PBS, (pH 7.4)] for 1h at room temperature. The sections were then incubated with the first primary antibody (SOCS3 anti-goat polyclonal),

1:20 dilution in 1% BSA in phosphate-buffered saline, overnight at 4°C in a moisture chamber, followed by the second primary antibody (JAK2 anti-rabbit polyclonal), 1:20 dilution in 1% BSA in phosphate-buffered saline, for 2 h at room temperature. The sections were washed as described and incubated with the first secondary antibody in 1% BSA in phosphate-buffered saline, for 2 h at room temperature, followed by incubation with the second secondary antibody in 1% BSA in phosphate-buffered saline, for 2 h at room temperature. Appropriate secondary anti-rabbit and anti-goat antibodies, conjugated to either fluorescein isothiocyanate (FITC) or rhodamine were used at a dilution of 1:200. After incubation with the secondary antibodies, the sections were washed and mounted using Vectashield mounting media (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining. The images were obtained using a fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and the figures were prepared using the Adobe Photoshop software.

Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the ScionCorp software (Scion Image). Student's unpaired *t* test was used for statistical analysis. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Acknowledgements. This study was financed by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

References

1. Ali, M. S., Sayeski P. P. , et al. (1997). Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem.* 272: 23382-8.
2. Ali, M. S., Sayeski P. P., et al. (1998). Janus kinase 2 (Jak2) must be catalytically active to associate with the AT1 receptor in response to angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun.* 249: 672-7., 1998.
3. Baker, K. M., and Aceto J. F. (1990). Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol.* 259: H610-8.
4. Bedecs, K., Elbaz N., et al. (1997). Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J.* 325: 449-54.
5. Bjorbaek, C., Elmquist J. K. , et al. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell.* 1: 619-25.
6. Booz, G. W., and Baker K. M. (1995). Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 30: 537-43.
7. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
8. Brenner, B. M., Cooper M. E., et al. (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 345: 861-9.
9. Darnell, J. E., Jr., Kerr I. M., et al. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 264: 1415-21.

10. Dorer, F. E., Khan J. R. et al. (1972). Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circ Res.* 31: 356-66.
11. Duff, J. L., Marrero M. B., et al. (1995). Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovasc Res.* 30: 511-7.
12. Emilsson, V., Arch J. R., et al (1999). Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett.* 455: 170-4.
13. Favre, H., Benhamou A., et al. (1999). Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett.* 453: 63-6.
14. Folli, F., Saad M. J., et al. (1992). Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem.* 267: 22171-7.
15. Helman, D., Sandowski Y., et al. (1998). Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT5 signaling. *FEBS Lett.* 441: 287-91.
16. Horiuchi, M., Hayashida W., et al. (1999). Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res.* 84: 876-82.
17. Horvath, C. M., and Darnell J. E. (1997). The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 233-9.
18. Ihle, J. N., and Kerr I. M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11: 69-74.
19. Kang, P. M., Nakouzi A., et al. (1996). Role of endogenous renin-angiotensin system in c-fos activation and PKC- epsilon translocation in adult rat hearts. *Am J Physiol.* 270: H2177-83.

20. Kim, S., Kawamura M., et al. (1995). Angiotensin II type 1 receptor blockade inhibits the expression of immediate-early genes and fibronectin in rat injured artery. *Circulation*. 92: 88-95.
21. Ledermann, J. A., Leonard P., et al. (2001). Recommendation for caution with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 345: 145-6.
22. Lindpaintner, K., and Ganten D. (1991). The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res*. 68: 905-21.
23. Marrero, M. B., Schieffer B., et al. (1997). Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 272: 24684-90.
24. Marrero, M. B., Schieffer B., et al. (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*. 375: 247-50.
25. Marrero, M. B., Venema V. J., et al. (1998). Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol*. 275: C1216-23.
26. Masuhara, M., Sakamoto H., et al. (1997). Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 239: 439-46.
27. Matsubara, H., Kanasaki M., et al. (1994). Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest*. 93: 1592-601.
28. McWhinney, C. D., Hunt R. A., et al. (1997). The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 29: 2513-24.

29. Mizukami, Y., Yoshioka K., et al. (1997). A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem.* 272: 16657-62.
30. Nicholson, S. E., De Souza D., et al. (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2- binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 6493-8.
31. Pezet, A., Favre H., et al. (1999). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem.* 274: 24497-502.
32. Phillips, M. I., Speakman E. A., et al. (1993). Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept.* 43: 1-20.
33. Saad, M. J., Folli F., et al. (1995). Insulin and dexamethasone regulate insulin receptors, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in Fao hepatoma cells. *Endocrinology.* 136: 1579-88.
34. Sadoshima, J., and Izumo S. (1993). Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res.* 73: 424-38.
35. Sadowski, C. L., Choi T. S., et al. (2001). Insulin Induction of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA expression in C2C12 Skeletal Muscle Cells Is Mediated by Stat5*. *J Biol Chem.* 276: 20703-10.
36. Sasaki, A., Yasukawa H., et al. (2000). CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem.* 275: 29338-47.
37. Sayeski, P. P., Ali M. S., et al. (2001). The angiotensin II-dependent nuclear translocation of Stat1 is mediated by the Jak2 protein motif 231YRFRR. *J Biol Chem.* 276: 10556-63.

38. Sechi, L. A., Griffin C. A., et al. (1992). Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res.* 71: 1482-9.
39. Skeggs, L. T., Lentz K. E., et al. (1967). Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. *Fed Proc.* 26: 42-7.
40. Starr, R., Willson T. A., et al. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature.* 387: 917-21.
41. Tollet-Egnell, P., Flores-Morales A., et al. (1999). Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology.* 140: 3693-704.
42. Yasukawa, H., Sasaki A., et al. (2000). Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol.* 18: 143-64.
43. Zhang, J. G., Farley A., et al. (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 2071-6.

Legends of the Figures

Figure 1 – AII-induced tyrosine phosphorylation of AT1, AT2, JAK2, SHP1 and SHP2 in heart. Rats were treated with 10^{-6} M AII for the indicated times, the tips of ventricles were excised and homogenized. Protein extracts were submitted to immunoprecipitation with antibodies against AT1 (a), AT2 (b), JAK2 (c), SHP1 (d), and SHP2 (e). Following transfer to nitrocellulose membranes immunoblotting was performed using an antibody against phosphotyrosine (pY). The bar graphs show the relative phosphorylation of AT1, AT2, JAK2, SHP1 and SHP2 as determined by

ScionCorp quantitation. Data are presented as mean $\pm$ SE from 3 separate experiments ($n=3$, mean $\pm$ SEM, $*p<0.05$ as compared to control time 0 min).

Figure 2 – AII-induced complex formation AT1/JAK2 (a) and AT2/JAK2 (b) in heart. Rats were treated with 10^{-6} M AII for the indicated times, the tips of the ventricles were excised and homogenized. AT1 or AT2 were immunoprecipitated utilizing specific antibodies, complexed proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and immunoblotted with anti-JAK2 antibody. Data are representative of three independent experiments ($n=3$, mean $\pm$ SEM, $*p<0.05$ as compared to control time 0 min).

Figure 3 – The dynamics of association/dissociation among participants of the AT1/JAK2 and AT2/JAK2 signaling systems. Rats were treated with 10^{-6} M AII for the indicated times, the tips of the ventricles were obtained and homogenized. SHP1 and SHP2 were immunoprecipitated utilizing specific antibodies, complexed proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and immunoblotted with anti-AT1 (a, b), anti-AT2 (c, d) and anti-JAK2 (e, f) antibodies as indicated below. The bar graphs shown the relative association/dissociation of SHP1 or SHP2 with AT1, AT2 or JAK2 as determined by ScionCorp quantitation. Data are representative of three independent experiments ($n=3$, mean $\pm$ SEM, $*p<0.05$ as compared to control time 0 min).

Figure 4 – Effect of AII on the endogenous expression of SOCS3 protein in rat's heart (a), and association of SOCS3 with JAK2 (b) after AII stimulus. Rats were stimulated with 10^{-6} M AII for the times indicated. The tip of ventricles were excised and homogenized. The cellular extracts

were immunoprecipitated with polyclonal rabbit anti-SOCS3 antibody and analyzed by Western blot by using polyclonal goat anti-SOCS3 (A). The same membranes were stripped and reprobed with anti-JAK2 antibody (B). Data are representative of three independent experiments ($n=3$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $*p<0.05$ as compared to control time 0 min).

Figure 5 – Characterization of the subcellular trafficking dynamics of JAK2 (a) and SOCS3 (b) after AII stimulus. Subcellular fractions were prepared from hearts after AII stimulus for the times indicated and submitted to SDS-PAGE. The nitrocellulose membranes were incubated with anti-JAK2 (A) or anti-SOCS3 (B) antibodies. *M*, membrane (■); *C*, cytosol (●); and *N*, nuclear (▲) fractions. Each point represents the mean of triplicates. Data are representative of three independent experiments ($n = 3$).

Figure 6 – Localization of association between JAK2 and SOCS3 in heart after AII stimulus. Subcellular fractions were prepared as described in Figure 5. The fractions were immunoprecipitated with anti-JAK2 antibody and immunoblotted with anti-SOCS3 antibody. *M*, membrane (■); *C*, cytosol (●); and *N*, nuclear (▲) fractions. Each point represents the mean of triplicates. Data are representative of three independent experiments ($n = 3$).

Figure 7 – Double antibody immunofluorescence staining of JAK2 and SOCS3 in heart of rats treated with AII. After stimuli, hearts were removed, and processed as described in Materials and Methods. Anti-SOCS3 antibody was used initially, followed by anti-JAK2 antibody and respective secondary antibodies labeled with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-goat immunoglobulin G antibody and rhodamine-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G antibody. Loca-

tion of JAK2 (A) and SOCS3 (B) in control conditions; location of JAK2 (C) and SOCS3 (D) after 20 min of the stimuli with AII. Results shown are representative of 2 separate experiments ($n=2$). Magnification: 700 x.

Figure 8– Diagrammatic representation of AII signaling cascade. At time 0' AT1 and AT2 present a low magnitude tyrosine phosphorylation, AT1 is associated with SHP1 and AT2 with SHP1, SHP2 and JAK2. Moreover, at 0' there is a pool of JAK2 and SHP2 in the cytoplasm and some SOCS3 mostly located in the nucleus. Shortly after AII stimulus SHP1 becomes transitorily tyrosine phosphorylated, SHP2 and JAK2 form a complex and migrate to AT1. Meanwhile SHP1, SHP2 and JAK2 are released from their association with AT1 which binds to a tyrosine phosphorylated SHP1 and increase its tyrosine phosphorylation status. At 6 min both AT1 and AT2 are heavily tyrosine phosphorylated and there is already some SOCS3 protein in a cytosolic location. From 10 to 15 min both AT1 and AT2 present a reduction in their tyrosine phosphorylation levels and the complex SHP2/JAK2 migrate to the cytosol. SOCS3 levels are high and bound to JAK2, initially in a membrane compartment and lately in the cytosol, where they last for as long as 120 min. At last, recycling and reassembling of the AII signaling apparatus prepare the machinery for a new coming stimulus.

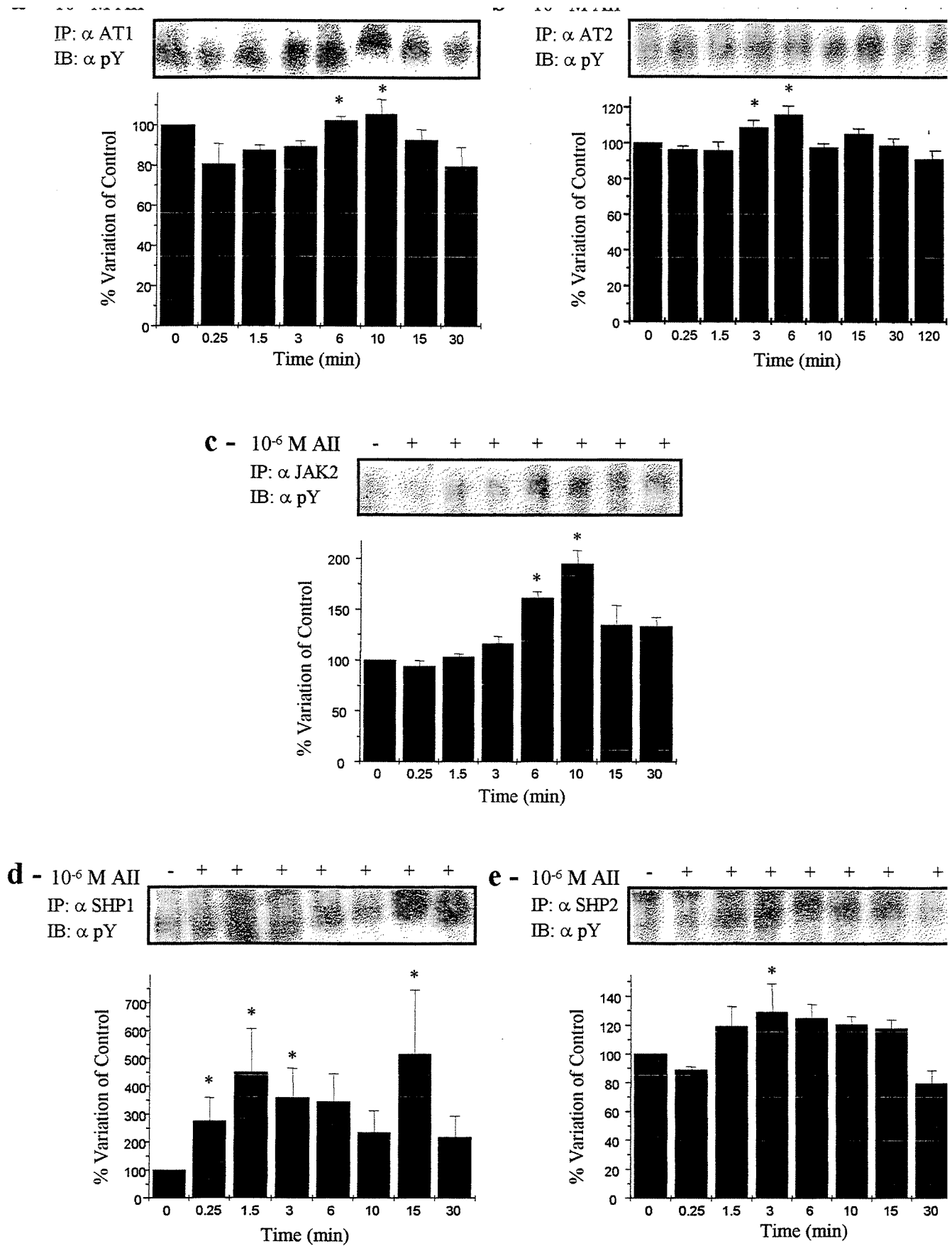


Figure 1

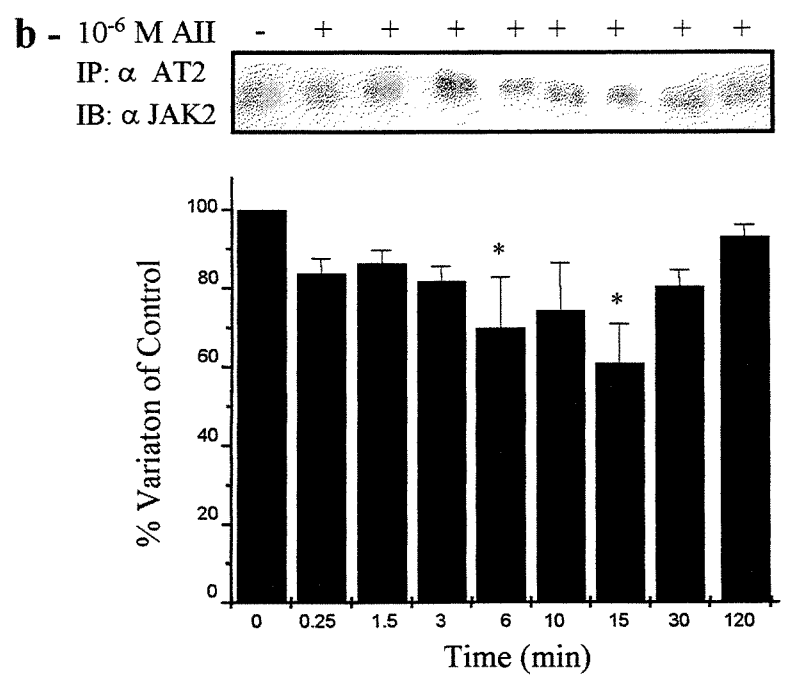
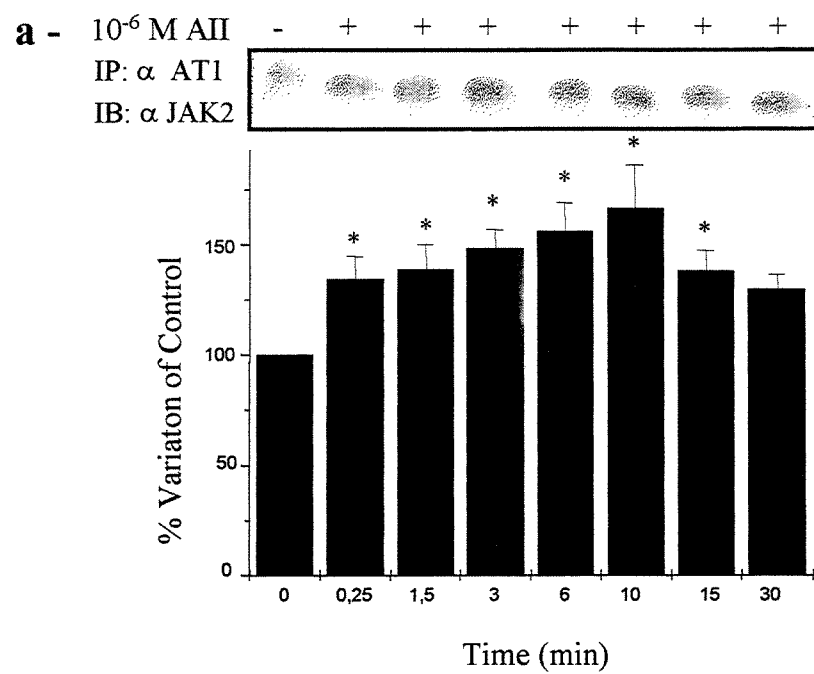


Figure 2

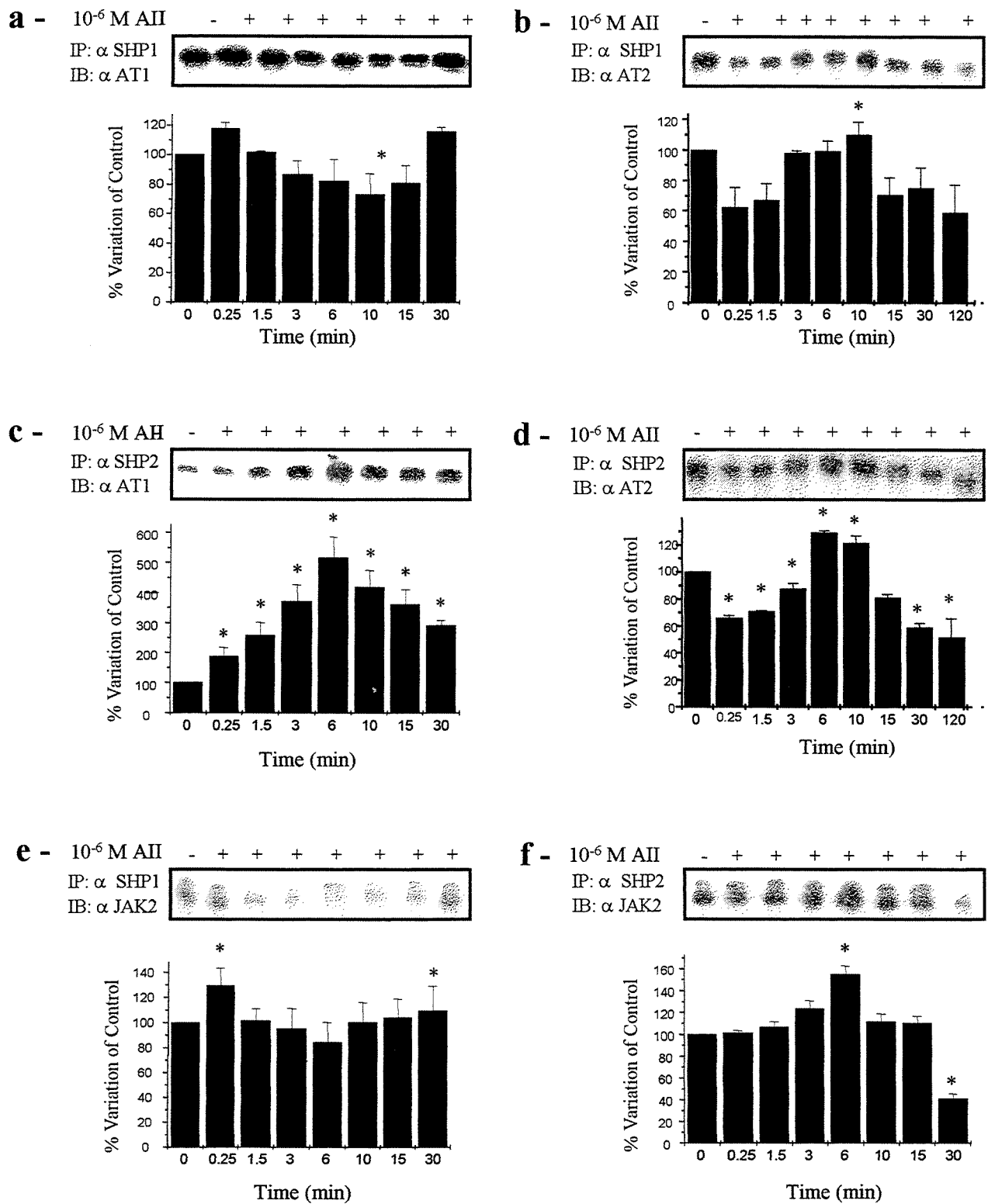
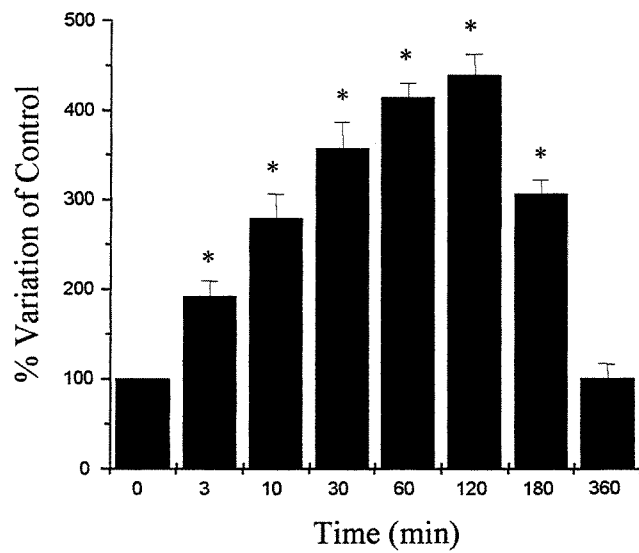


Figure 3

a - 10^{-6} M AII - + + + + + + +

IP: rabbit α SOCS3
IB: goat α SOCS3



b - 10^{-6} M AII - + + + + + + +

IP: α SOCS3
IB: α JAK2

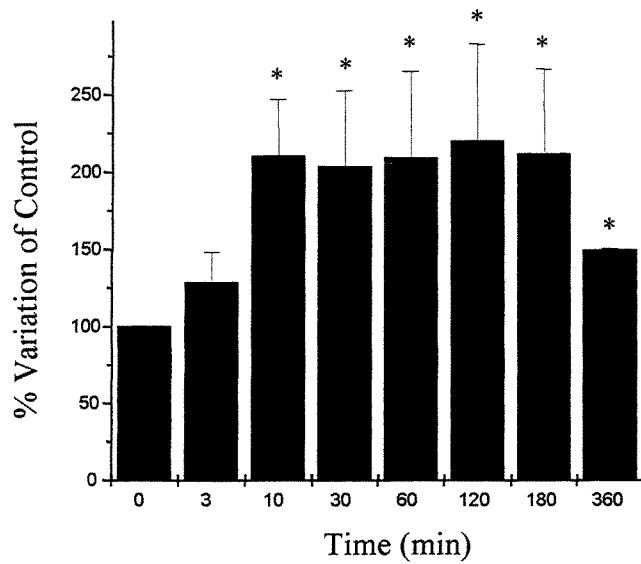
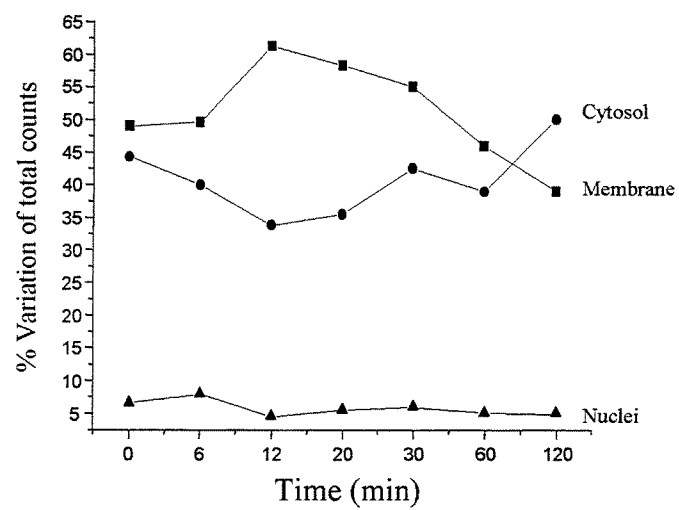


Figure 4

a - IB: α JAK2



b - IB: α SOCS3

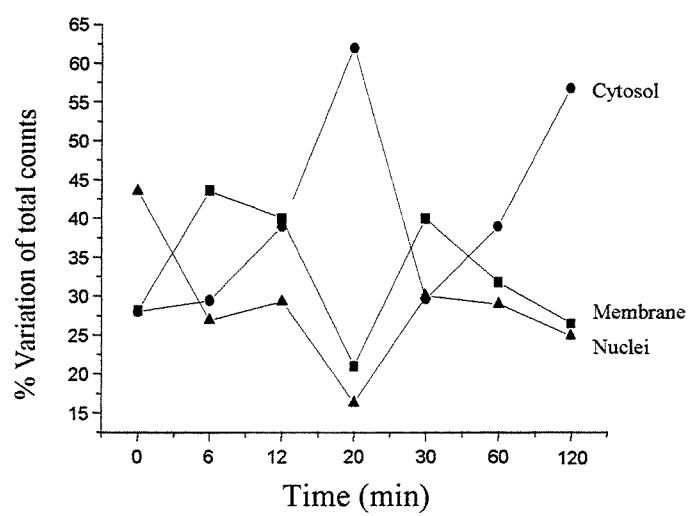


Figure 5

IP: α JAK2
IB: α SOCS3

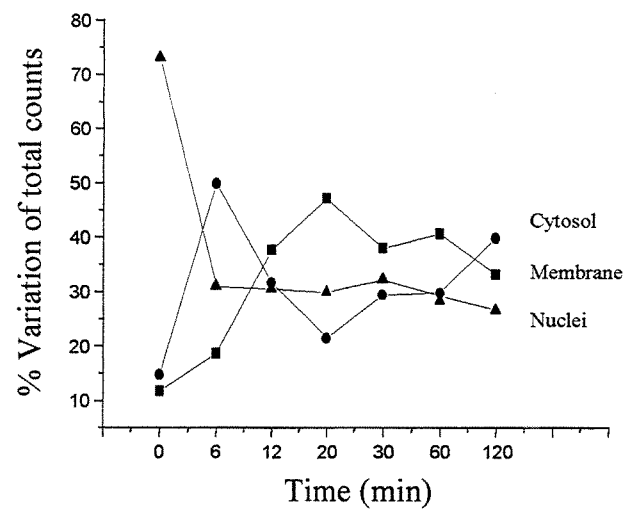


Figure 6

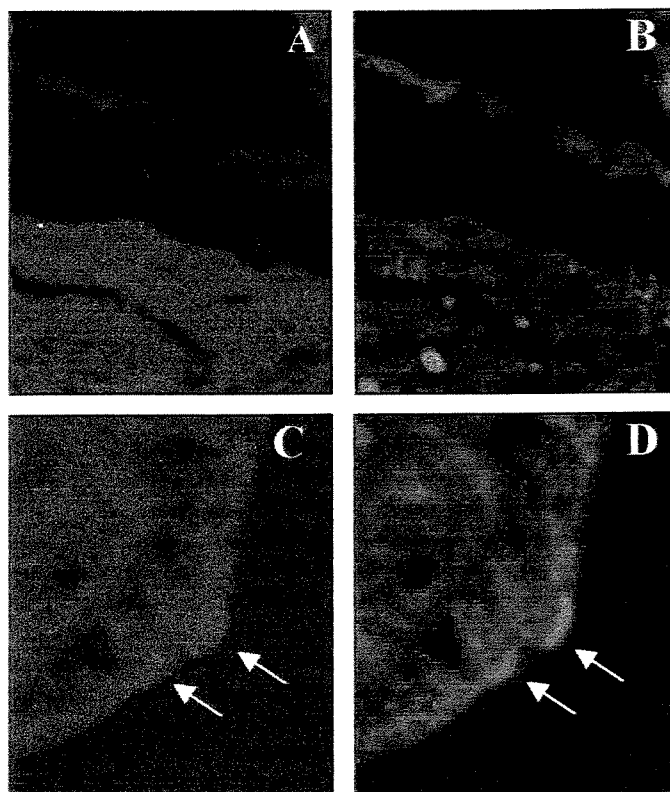


Figure 7

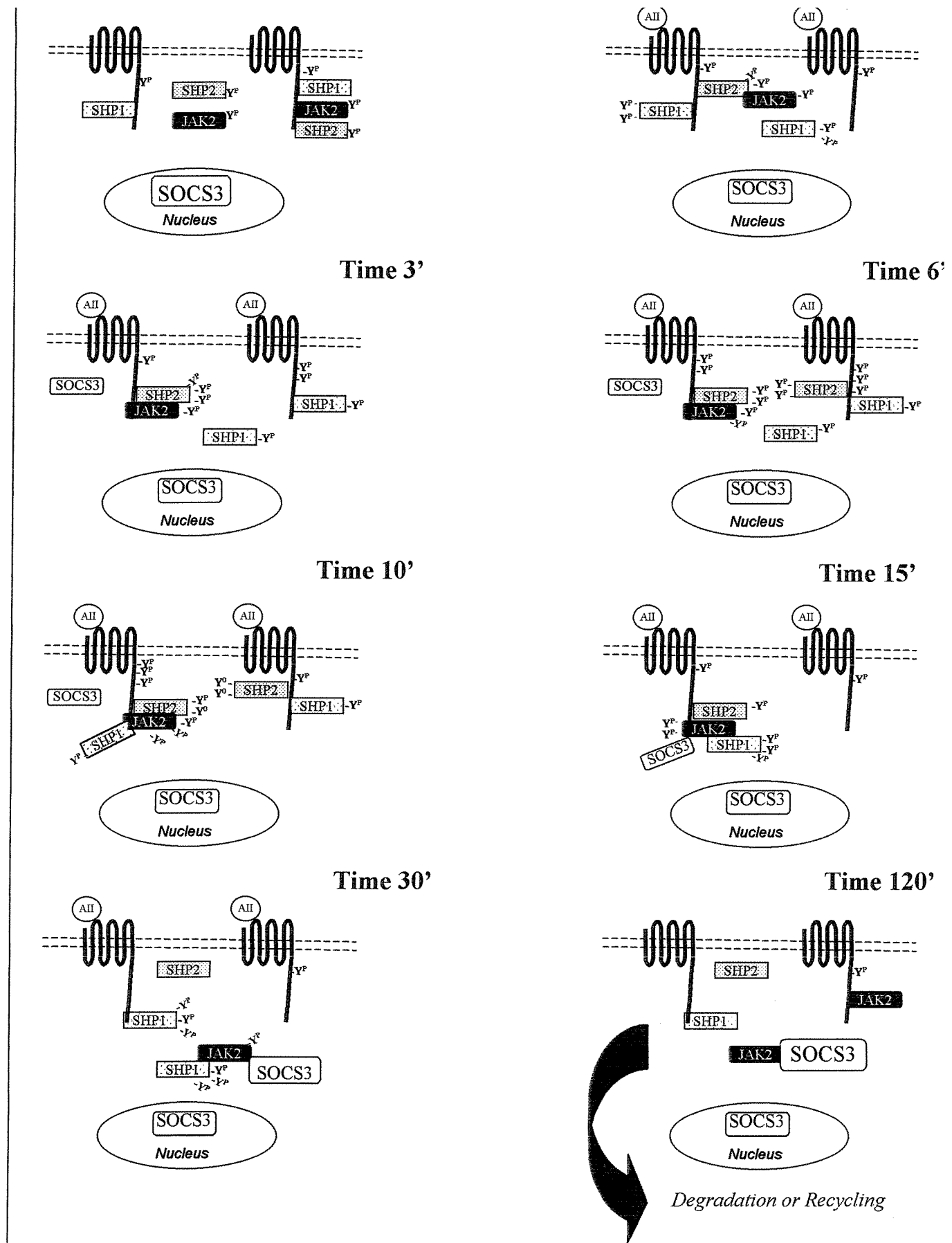


Figure 8