

Fernanda Alvarez Rojas

**Regulação da proteína Janus Quinase 2 em modelos animais
de resistência à insulina**

Este exemplar entregue à redação final
da tese de mestrado do candidato a:
*Fernanda Alvarez
Rojas*
e aprovada pelo (omissão julgadora)
34/05/98 MHS

*Tese Apresentada no Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título em Mestre em Ciências
Biológicas. Área de Concentração: Fisiologia*

Orientador: Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad

AL86r

36490/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	36490
PROD.	229/99
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/02/99
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00120771-5

AL86r Alvarez Rojas, Fernanda
Regulação da proteína Janus Kinase 2 em tecido
cardíaco em modelos animais de resistência a insulina
Fernanda Alvarez Roja. — Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Mário José Abdalla Saad.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Insulina. 2. Proteína. 3. Fosfatases. 4. Rato como
animal de laboratório. I. Saad, Mário José Abdalla. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.



Campinas, 17 de Abril de 1998

BANCA EXAMINADORA

-Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "MJS" with a stylized flourish.

-Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "A. C. Boschero" in a cursive style.

-Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "E. Magalhães" in a cursive style.

SUPLENTE

-Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brenelli

Dedico esta tese à nova geração da minha família:

Maite e Julia, Marcelita, Ninive, Rodrigo e Luciana e Malena

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu professor Dr. Mário Saad pela orientação não só de uma tese, senão de uma forma de trabalho.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório, a todos aqueles que tiveram a paciência de me ensinar, Sr. Luis e Conceição. A minhas amigas Verônica e Carla.

E agradeço por ter compartilhado comigo estes momentos à Françoise, Lorena, Mônica e sem dúvida à minha família.

SUMÁRIO

Resumo.....	i
1- Introdução.....	1
2- Publicação.....	10
3- Discussão.....	36
4- Referências.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

μCi	microCuri
RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico
Mr	peso molecular
ATP	adenosina trifosfato
IGF-1	insulin-like growth factor-1
kDa	kilodalton
pp185	proteína fosforilada de 185 kDa
Tyr	tirosina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
SH2	segunda homologia ao Src
SH3	terceira homologia ao Src
PI3-quinase	fosfatidilinositol 3-quinase
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
IRS-3	substrato 3 do receptor de insulina
IRS-4	substrato 4 do receptor de insulina
Shc	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
JAKs	proteína citoplasmática quinase da família Janus
EPO	eritropoietina
PRL	prolactina
GH	hormônio do crescimento

Ang	angiotensina
EGF	epidermal growth factor
PDGF	platelet-derived growth factor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Syp	fosfatase tirosina-específica
SHPTP2	fosfatase tirosina-específica
IR	receptor de insulina
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
PKA	proteína quinase A
PTPase	fosfotirosina fosfatase
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
EDTA	ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico
BSA	albumina sérica bovina
DTT	ditiotreitól
I ¹²⁵	iodo marcado radioativamente na posição 125
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma virus Rous

RESUMO

A insulina é um potente hormônio com efeito metabólico e promotor do crescimento atuando no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. O efeito no crescimento é induzido pela participação da insulina na síntese de RNA e DNA, em praticamente todas as células. A insulina inicia suas ações celulares através da ligação ao seu receptor transmembrana. Este receptor comporta-se, funcionalmente, como uma enzima alostérica, com uma subunidade α regulatória e uma subunidade β catalítica, que uma vez ativada se autofosforila e fosforila outros substratos em resíduos tirosina, desencadeando uma cascata de ativações e desativações de proteínas. Têm sido descritos vários substratos endógenos para o receptor de insulina e o nosso laboratório demonstrou que a insulina fosforila uma proteína da família das quinases, a Janus-quinase 2 ou JAK2. Acredita-se que a transmissão do sinal pelas JAKs ocorre através da fosforilação em tirosina de proteínas citoplasmáticas chamadas STATs, provavelmente relacionadas ao crescimento celular. Maegawa et al. (1996) demonstraram que a insulina também é capaz de ativar a interação JAK2/Syp. A proteína Syp é uma tirosina fosfatase também chamada de SHPTP2 ou PTPID. Entretanto a regulação desta nova via de transmissão do sinal insulínico não foi ainda investigado em situações que alteram a sensibilidade à insulina. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi investigar os níveis e grau de fosforilação em tirosina da proteína JAK2, a associação de JAK2 com SHPTP2 e com STAT1 em coração de ratos em três situações de resistência à insulina: jejum prolongado de 72 horas, tratamento crônico com dexametasona e tratamento agudo com adrenalina.

Nossos resultados demonstraram uma diminuição na quantidade de proteína JAK2 nos ratos submetidos a jejum prolongado, apresentando igualmente uma diminuição na estequiometria da fosforilação de 70% ($p < 0.05$). Também foi observado um aumento na associação da JAK2/STAT1 de 160% ($p < 0.05$) e uma redução na associação de JAK2/SHPTP2 de 85% ($p < 0.05$) nos ratos em jejum. Quando os ratos foram tratados durante cinco dias com dexametasona foi observado um importante aumento na quantidade de proteína JAK2 e uma diminuição da estequiometria de fosforilação para 20% ($p < 0.05$). A associação JAK2/STAT1 foi reduzida para 70% ($p < 0.05$) e a

associação JAK2/SHPTP2 apresentou um aumento de 170% ($p < 0.05$) nesses animais. No tratamento agudo com adrenalina não foi observado diferença na fosforilação da proteína JAK2, nem nas associações JAK2/STAT1 e JAK2/SHPTP2.

Em resumo, este trabalho mostra que tanto nos ratos em jejum de 72 horas como nos ratos tratados com dexametasona, duas situações de resistência à insulina, ocorre uma diminuição no grau de fosforilação em tirosina da JAK2 induzido por insulina em coração apesar de uma regulação diferente na quantidade tecidual desta proteína. Esta redução da fosforilação da JAK2 foi acompanhada de alterações inversas na associação desta quinase com as proteínas SHPTP2 e STAT1.

1-INTRODUÇÃO

A insulina é um potente hormônio com efeito metabólico e promotor do crescimento atuando no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. O efeito no crescimento é induzido pela participação da insulina na síntese de RNA e DNA, em praticamente todas as células. Em mamíferos é o principal hormônio regulador da glicemia, que age estimulando a captação da glicose e seu metabolismo, no tecido muscular e adiposo, inibindo a neoglicogênese no tecido hepático (FELIG & BERGMAN, 1990). Em outros tecidos, nos quais a insulina não apresenta um papel relevante na captação de glicose, além de estimular o metabolismo desta hexose, atua frequentemente como um fator de crescimento (KAHN, 1985).

Desde a descoberta da insulina em 1921, muito esforço têm sido dedicado ao entendimento do seu mecanismo molecular e da sua ação. A compreensão desse mecanismo é importante pela prevalência de doenças como Obesidade, Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial e a repercussão metabólica dessas doenças como a intolerância à glicose associada a outras enfermidades endócrinas que apresentam resistência à insulina como um fator importante na sua patogênese.

A insulina inicia suas ações celulares através da ligação ao seu receptor transmembrana (FREYTCHE et al., 1971; CUATRECASAS, 1972; KHAN, 1985). Esse receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas sua concentração varia de aproximadamente 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 receptores em adipócitos e hepatócitos (KAHN, 1985). O receptor de insulina é uma glicoproteína de estrutura heterotetramérica constituída por 2 subunidades α , cada

uma de Mr: 135.000 e duas subunidades β , cada uma de Mr: 95.000, unidas por ligações dissulfeto (KAHN, 1985). A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana, e é a responsável pela transmissão do sinal. A família a que pertence o receptor de insulina contém duas outras moléculas estruturalmente relacionadas: o receptor de “insulin-like growth factor” (I-IGF) e um outro receptor chamado de “insulin related receptor”(IRR) ao qual nenhum ligante ainda foi identificado (SHIER & WATT, 1989).

Um marco importante na compreensão da sinalização transmembrana pelo receptor ocorreu em 1982, quando se demonstrou que a subunidade β do receptor é uma proteína quinase estimulada pela insulina, capaz de autofosforilar-se e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina (KASUGA et al., 1982). Este receptor comporta-se, funcionalmente, como uma enzima alostérica, com uma subunidade α regulatória e uma subunidade β catalítica (KASUGA et al, 1982 a e b). A insulina une-se a subunidade α e estimula a fosforilação de tirosinas da subunidade β do seu receptor. O ATP atua como o doador de fosfato e a fosforilação ocorre em aminoácidos tirosina. A insulina estimula a quinase pelo aumento da velocidade catalítica (V_{max}), mais do que alterando a afinidade pelo substrato (WHITE et al., 1984). O mecanismo exato da estimulação da insulina é desconhecido, mas parece envolver a remoção de um efeito inibitório pela subunidade α na função da subunidade β .

A região citoplasmática da subunidade β pode ser dividida em quatro partes

relacionadas à ação: porção justamembrana, relacionada à ligação dos substratos e à internalização do receptor (CARPENTIER et al., 1993); região catalítica que contém o sítio de ligação de ATP (Lisina 1030), sendo a região com maior semelhança estrutural entre as várias proteínas tirosina-quinases; a região que promove a regulação da atividade quinase; e a porção carboxil-terminal região em que se encontram as maiores diferenças entre os receptores de insulina e IGF-1 e, por isso, tem sido implicada como responsável pela diferenciação entre os efeitos metabólicos e de crescimento da insulina (TAKATA et al., 1988). Há pelo menos, seis locais de fosforilação da tirosina (Tyr): área justamembrana com uma tirosina na posição 972, região da atividade quinase que contém tirosina nas posições 1158, 1162 e 1163; e carboxil-terminal, que apresenta tirosina nas posições 1328 e 1334 (WHITE et al., 1988).

As evidências de que atividade tirosina-quinase do receptor de insulina é necessária para a ação do hormônio vêm de diversas fontes. A maior evidência provém de experimentos com mutagênese, *in vitro*, na qual um resíduo de lisina na posição 1030 é substituído por qualquer outro aminoácido (metionina, arginina ou alanina). Com base na analogia de outras quinases, este resíduo é o sítio de união do ATP na quinase (EBINA et al., 1987 ; ULLRICH et al., 1985). Quando essas mutações são expressas em células, a ligação da insulina ocorre normalmente, mas como quinases são totalmente inativas e ineficientes na mediação da ação metabólica da insulina dessas células (EBINA et al., 1987). Isto é verdadeiro para todos os efeitos da insulina, incluindo efeitos metabólicos e promotores do crescimento. A mutação em um dos sítios de autofosforilação, produz

efeitos similares, mas menos dramáticos (WILDEN et al., 1992).

Têm sido descritos vários substratos endógenos para o receptor de insulina (BERNIER et al., 1987; WHITE et al., 1985). Estas proteínas são rápida e diretamente fosforiladas em tirosina pela ativação do receptor. A primeira e provavelmente a melhor estudada, é uma banda de aproximadamente 185 kDa chamada de pp185 (WHITE et al., 1985). Em células transfectadas com cDNA de receptor de insulina humano demonstrou-se um importante aumento na fosforilação da pp185 coincidente com o aumento da ação da insulina (SUN et al., 1991). As células que apresentam receptores com mutação no sítio de união ao ATP ou aos sítios de autofosforilação, apresentam uma redução da fosforilação do pp185, proporcionalmente à redução da ativação da quinase do receptor de insulina (WILDEN et al., 1992). Outras evidências do papel da fosforilação da pp185 na ação da insulina foram encontradas inesperadamente em experimentos de mutação *in vitro* do receptor de insulina na tirosina 972. Essas moléculas mutadas do receptor apresentam ligação à insulina e capacidade quinase completamente normais *in vitro*. Isto não surpreende, já que a Tyr-972 não é um sítio de autofosforilação nem um sítio ativo da quinase. Mas, quando esses receptores mutados são transfectados às células, estas não fosforilam a pp185 nem são capazes de transmitir o sinal insulínico, resultando em redução na síntese de glicogênio e menor incorporação de timidina no DNA (WHITE et al., 1988). Em 1991 foi clonado o maior componente da pp185 e denominado substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN et al., 1991). O cDNA do IRS-1 codifica uma proteína de 1.235 amino ácidos com muitas características surpreendentes. Não há um

domínio transmembrana, i.e., IRS-1 é de localização citoplasmática. Quando se analisa a sequência básica, encontram-se muitos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina potencialmente ativáveis. Seis dos sítios de fosforilação em tirosina têm a sequência repetida YMXM onde Y é tirosina, M é metionina, e X é qualquer amino ácido. Dois sítios de fosforilação adicionais têm a sequência YXXM. A sequência YMXM não ocorre no receptor de insulina mas foi observada em outras proteínas tirosina-quinases. Esta sequência parece estar envolvida nas interações não covalentes das proteínas com as moléculas de sinalização. Estas moléculas de sinalização apresentam domínios que unem YMXM a porções SH2 (segunda homologia com src). Neste sentido foi demonstrado uma associação entre a enzima fosfatidilinositol 3'-quinase (PI 3-quinase) com IRS-1 após estímulo insulínico, completando a hipótese de que o IRS-1 fosforilado une-se a moléculas de transmissão do sinal (FOLLI et al., 1992). A PI 3-quinase é uma proteína que contém dois sítios SH2 e um SH3 (CARPENTER e CANTLEY, 1990). A associação entre IRS-1 e PI 3-quinase ocorre provavelmente através de tirosinas fosforiladas do IRS-1 próximas à metioninas (YMXM) e o domínio SH2 da subunidade de 85 kDa da enzima PI3-quinase. Todas as evidências recentes sugerem que a associação da PI 3-quinase com IRS-1 está relacionada com a ativação do transportador de glicose (SANCHES-MARGALET et al., 1994 ; CHEATAHAM e KHAN, 1995). Além do IRS-1, outros substratos do receptor de insulina foram recentemente descritos, como o IRS-2 (SUN et al., 1995), IRS-3 (SMITH-HALL et al., 1997) e IRS-4 (LAVAN et al., 1997) e a proteína Shc (SKOLNIK et al., 1993). A proteína Shc associa-se ao receptor de insulina e é

rapidamente fosforilada em tirosina após estímulo insulínico apresentando, portanto, características de um substrato do receptor. A função dessas proteínas nas vias de transmissão do sinal insulínico não está elucidada, mas parece que o IRS-2, IRS-3 e IRS-4 atuam sinergicamente com o IRS-1 na ativação da PI-3 quinase, tendo portanto um papel importante nos eventos que controlam o transporte de glicose (SUN et al., 1995). A proteína Shc parece desempenhar um papel nas vias de transmissão do sinal insulínico em direção ao controle gênico (KAO et al., 1997).

Experimentos recentes do nosso laboratório demonstraram que a insulina fosforila uma proteína da família das quinases, a Janus-quinase 2 (JAK2). A família das Janus quinases é formada por quatro proteínas: JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2, e elas estão caracterizadas pela presença de um domínio tirosina quinase, um domínio relacionado à quinase e cinco porções conservadas nessas quatro proteínas. As proteínas JAKs além de serem ativadas por citocinas, também são estimuladas por receptores para eritropoietina (EPO) (WITTHUHN et al., 1993), prolactina (PRL) (LEBRUN et al., 1993; RUI et al., 1994), hormônio do crescimento (GH) (ARGENTSINGER et al., 1993) e angiotensina (Ang) (MARRERO et al., 1995), são estimuladas por moléculas que se ligam a receptores com atividade tirosina quinase, como os fatores de crescimento EGF e PDGF (Epidermal Growth Factor e Platelet-Derived Growth Factor) (SHUAI, K. et al., 1993,). Após a união do ligante, ocorre uma homo ou heterodimerização do receptor e a JAK é ativada. Acredita-se que a transmissão do sinal pelas JAKs ocorre através da fosforilação em tirosina de proteínas citoplasmáticas chamadas STATs (Signal Transducers and Activators

of Transcription). Estas proteínas STATs formam complexos homo ou heterodiméricos com outras proteínas STATs, que translocam para o núcleo, onde isoladamente ou em conjunto com outras proteínas de ligação ao DNA, interagem com sequências específicas de DNA e ativam os processos de transcrição (IHLE, J. N. et al., 1995; ZIEMIECKI, A. et al., 1994). Nosso laboratório também demonstrou que a ativação da JAK2 pela insulina é seguida de ligação/ativação entre JAK2/STAT1, sugerindo uma nova via de transmissão do sinal insulínico, provavelmente relacionada ao crescimento.

MAEGAWA et al. em 1996 demonstraram que a insulina também é capaz de ativar a interação JAK2/Syp. A proteína Syp é uma fosfatase também chamada de SHPTP2 ou PTP1D. Essa fosfatase faz parte da família de fosfatases tirosina-específicas, citosólica, de 68 kDa, que apresenta duas porções SH2 na parte N-terminal e uma SH3 na porção carboxil-terminal. Essas porções SH2 controlam a ligação da SHPTP2 com receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF), receptores de fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e do IRS-1 (SUN et al., 1993) levando a ativação dessa fosfatase. Essa porção SH2 também regula a atividade catalítica da SHPTP2. Demonstrou-se que porções SH2 não ocupados mantém a atividade da fosfatase sob inibição, enquanto a ligação de proteínas fosforiladas em tirosina ou peptídios, aumentam esta atividade (YAMAUCHI et al., 1995). Em geral a função da fosfotirosina fosfatase é tida como inibitória ou como inativadora de vias de ativação das quinases. Entretanto, esta fosfatase (SHPTP2) também desempenha função efetora positiva, mas seu papel nas vias de transmissão do sinal insulínico não está completamente esclarecido (YAMAUCHI et al., 1995).

A fosforilação em tirosina do JAK2 induzida pela insulina foi demonstrada no fígado, no músculo, nas células adiposas e no coração de ratos intactos sendo tempo e dose dependentes, em paralelo à autofosforilação de seu receptor. Como descrito anteriormente (Carvalho et al. 1997) a ativação da JAK2 pela insulina é seguida de interação dessa com a STAT1 e também SHPTP2 em tecidos animais. Entretanto, a regulação da JAK2 e suas interações em tecidos insulino-sensíveis em situações de resistência à insulina não foi ainda investigada. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi o grau de fosforilação em tirosina da proteína JAK2 e a associação de JAK2 com SHPTP2 e com STAT1 em coração de ratos em três situações de resistência à insulina: jejum de 72 h, tratados agudamente com epinefrina, e tratados cronicamente com dexametasona.

2- PUBLICAÇÃO

REGULATION OF CARDIAC JAK-2 IN RAT MODEL OF INSULIN RESISTANCE

²Fernanda Alvarez Rojas, Carla R.O. Carvalho, Veronica Paez-Espinosa, ¹Mario JA Saad.

¹Departamento de Clínica Médica, FCM. ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Please address correspondence to:

Mario J.A. Saad, MD

Departamento de Clínica Médica

FCM-UNICAMP

Campinas, SP, Brasil

13081-970

Fax: +55 192 393114

Abstract. It was recently demonstrated that insulin induces JAK2 tyrosine phosphorylation and activation, which then binds STAT1 in insulin sensitive tissues of intact rats. Besides binding STAT1 insulin induce JAK2 association with SHPTP2 demonstrating a new pathway in insulin signal transduction. In the present study we investigated insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation and association with STAT1 and SHPTP2 in heart of rats in three situation of insulin resistance: 72 h fasting, chronic treatment with dexamethasone and acute treatment with epinephrine. Our results demonstrated a decrease in the JAK2 protein level in fasted rats with a decrease in the stoichiometry of the phosphorylation to 70% ($p<0.02$). Furthermore it was observed an increase in the association of the JAK2/STAT1 to $160 \pm 16\%$ ($p<0.05$) and a decrease in the JAK2/SHPTP2 association to $85\% \pm 0.1$ ($p<0.02$) in fasted rats. When the rats were treated for five days with dexamethasone there was a marked increase in the amount of JAK2 protein and a decrease in the stoichiometry of the phosphorylation to 20% ($p<0.05$). The JAK2/STAT1 association was decreased to $70\% \pm 18$, ($p<0.05$) and the JAK2/SHPTP2 association showed a clear increase to $170\% \pm 9$ ($p<0.05$) in the dexamethasone treated rats. After acute treatment with epinephrine there was no difference in the JAK2 tyrosine phosphorylation, JAK2/STAT1 and JAK2/SHPTP2 association. In summary, the results showed that in fasting and dexamethasone treated rats, two insulin-resistant states, there is a decrease in insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation besides differential regulation on JAK2 protein expression. Insulin induced JAK2 association with STAT1 or SHPTP2 showed opposite interactions in each of these situation.

INTRODUCTION

The insulin receptor is the principal mediator of insulin action in the cellular mitogenic and metabolic responses to this hormone. Upon binding insulin, the intrinsic tyrosine kinase activity of the transmembrane β subunit of the receptor increases, allowing it to phosphorylate itself as well as intracellular substrates. Numerous studies have shown that the insulin receptor has various substrates, including insulin receptor substrate 1 (IRS-1), IRS-2, IRS-3, Shc and possibly others (1-10)

The Janus kinase (JAK) family of protein tyrosine kinases constitutes a novel signal transduction pathway activated in response to a wide variety of polypeptide ligands. The kinases of this family are generally involved in intracellular cross-talk between different signaling pathways. Currently, the JAK family of non-receptor protein tyrosine kinases has four known members: JAK1 (11), JAK2 (12,13), JAK3 (14,15), and Tyk2 (16). Each of these proteins are ~130 kDa, has a C-terminal tyrosine kinase domain, an adjacent kinase-related domain and five further domains with amino acid sequences towards the N-terminus that are similar among members of the family (14). Receptors for erythropoietin (17), prolactin (18,19), growth hormone (20) and angiotensin II (21) bind to and activate JAK2. Recently, we demonstrated that JAK2 is phosphorylated in response to insulin in liver, muscle, heart and adipose tissue of the intact rat (22).

Following activation, JAKs phosphorylate STAT (signal transducer and activator of transduction) proteins which then form homodimers and/or heterodimers before translocating to the nucleus and activating target genes by interaction with specific DNA sequences (23-28). Recently, insulin-induced JAK2 activation was shown to be accompanied by association with STAT1 (38). Insulin also stimulated the association of the JAK2 with the phosphotyrosine phosphatase 1D (PT1D), also known as SHPTP2, PTP2C or Syp. SHPTP2 has been suggested to act as a bridge or an adapter between tyrosine phosphorylated IRS-1 and JAK2 kinase, and one possible function of constitutive SHPTP2-JAK2 kinase binding is the translocation of Syp to the

membrane to facilitate association with IRS-1. SHPTP2 activity may also be responsible for the dephosphorylation of JAK2 kinase in HIRc cells (29).

However, the modulation of these new insulin pathway in insulin-sensitive tissue of intact animals was not investigated. In the present study, we investigated the regulation of insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation and its association with STAT1 and SHPTP2 in the hearts of three rat models of insulin resistance: 72 h fasted, chronic dexamethasone treated and acute epinephrine treated rats.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The reagents and apparatus for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). Tris, phenylmethylsulfonylfluoride (PSMF), aprotinin, silicone and dithiothreitol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium amobarbital and human recombinant insulin (Humulin R) were purchased from Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). Protein A-Sepharose 6MB was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). [¹²⁵I] Protein A was obtained from Amersham (Aylesbury, UK), and nitrocellulose (BA85; 0.2 µm) was obtained from Schleicher and Schuell (Keene, NH). Male Wistar rats were from the UNICAMP Central Animal Breeding Center. Monoclonal antiphosphotyrosine antibodies were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-JAK2 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Animals

Male wistar rats 6 weeks old (mean body weight of 131 g ± 6 g) were fed standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12-14 h before the experiments for the epinephrine and dexamethasone treated rats and their respective controls. To examine the influence of starvation, some rats were fasted for 72 h. Chronic hypercortisolism was induced with dexamethasone administered for five days (1 mg/kg/day, i.p.). In experiments with epinephrine (NE) the rats were injected with 25µg /100g body weight 5 min before the abdominal cavity was

opened. All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

Methods

The rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, ip) and used 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of foot and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the cava vein exposed and 6 μ g of insulin was injected. The heart was removed 90 s after the infusion of insulin, minced coarsely, and homogenized immediately in approximately 10 volumes of solubilization buffer A at 4 °C, using a Polytron PT 10/35 homogenizer fitted with a PTA 20S blade (Brinkmann Instruments) operated at maximum speed for 30 s. Buffer A (for solubilization) consisted of 1% Triton X-100, 50 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.1 mg of aprotinin/ml.

The heart was extracted in an way identical fashion in each model studied. The extracts were centrifuged at 15,000 rpm in a Beckman 70.1 Ti rotor at 4 °C for 20 min to remove insoluble material, and the resulting supernatant was used for immunoprecipitation with 13 μ l of polyclonal anti-JAK2 antibody. The immune complexes were precipitated with protein A-Sepharose 6MB and were washed three times with 50 mM Tris (pH 7.4), 2 mM sodium vanadate, and 0.1% Triton X-100.

Protein analysis by immunoblotting

After washing, the pellet was resuspended in Laemmli sample buffer with 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 min. The samples were subjected to SDS-PAGE (6.5% Tris-acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin *et al.* Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (3% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The prestained molecular mass standards used were myosin (206 kDa), β -galactosidase (120 kDa), bovine serum albumin (85 kDa), and ovalbumin (47 kDa). The nitrocellulose filter thus treated was then incubated for 4

h at 22°C with anti-phosphotyrosine antibody (0.5 µg/ml, diluted in blocking buffer) and then washed for 30 min in blocking buffer without BSA. The blots were then incubated with ¹²⁵I-Protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 1 h at 22°C and washed again. ¹²⁵I-Protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -70 °C for 12-48 h. Band intensities were quantified by optical densitometry (Molecular Dynamics) of the developed autoradiogram.

Statistical analysis: The experiments were always performed by studying the physiological or pathological group of rats in parallel with a control group. Comparison of the JAK2 levels in fed (0) vs. fasted (72 h), control vs. epinephrine-treated and control vs. dexamethasone-treated rats were analyzed using unpaired Student's *t* test. The level of significance employed was $p < 0.05$.

RESULTS

To investigate the tyrosine phosphorylation of JAK2 following stimulation by insulin in physiological and pathophysiological states of insulin resistance, we infused insulin into the portal vein of rats and then removed and homogenized the heart and immunoprecipitated the proteins with a polyclonal JAK2 antibody. The JAK2 immunoprecipitates were analyzed for tyrosyl phosphorylation by immunoblotting with a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody. The nitrocellulose membranes were also stripped and reblotted with anti-SHPTP2 and anti-STAT1 antibodies, in order to assess the association of these proteins with JAK2.

1- Effect of fasting on insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation in the heart of intact rats

JAK2 protein levels decreased to $68 \pm 9\%$ ($p < 0.003$) in the hearts of fasted rats compared to fed rats, as determined by immunoprecipitation and immunoblotting with the anti-JAK2 antibody (Fig 1A). Immunoprecipitation with anti-JAK2 antibodies followed by blotting with anti-phosphotyrosine antibodies showed that there was no difference in the phosphorylation levels of heart samples from fed rats before and after insulin infusion. There was an important increase in JAK2 tyrosine phosphorylation in the heart extracts of 72 h fasted rats following insulin infusion.

However, the tyrosine phosphorylation level after insulin infusion in fasted rats was significantly reduced when compared to fed rats (fasted $49.5 \pm 19\%$, fed $100 \pm 15\%$, $p=0.02$) (Fig. 1B). Furthermore, when the data for fasted rats were expressed as a function of the amount of JAK2 protein, there was a decrease in the stoichiometry of JAK2 phosphorylation to 70% ($p<0.02$) of that seen in fed animals (Fig. 1B).

Previous studies have suggested that there is a relatively stable, high affinity interaction between JAK2/STAT1, such that both proteins are coprecipitated by antibodies to either protein. In heart samples previously immunoprecipitated with anti-JAK2 antibody and then immunoblotted with anti-STAT1 antibody, a band corresponding to the latter protein was seen in both fed and fasted rats. After stimulation with insulin, the intensity of this band increased in both groups of rats, in agreement with the formation of a stable association between JAK2 and STAT1. Comparison of the bands corresponding to stimulation by insulin showed that the amount of STAT1 associated with JAK2 increased to $160 \pm 16\%$ ($p<0.05$) in the hearts from fasted rats (Fig. 1C). When the same membrane were blotted with anti-SHPTP2 antibody JAK2 co-immunoprecipitated with this tyrosine phosphatase in the basal state, and insulin increased this association. Comparison of the JAK2/SHP2 association after insulin stimulation between the fed and fasted rats, showed that in 72 h fasted rats, this association decreased to $85 \pm 0.1\%$ ($p<0.002$) of that seen in fed rats (Fig. 1D). There was no change in STAT1 and SHPTP2 protein levels in heart of fasted rats (data not shown).

2- Effect of dexamethasone on insulin induced JAK2 tyrosine phosphorylation in the heart of intact rats

Figure 2 shows the effect of the glucocorticoid dexamethasone on JAK2 protein expression in rats heart. The amount of JAK2 protein increase markedly ($463\% \pm 19$, $p<0.05$) in rats treated with dexamethasone (Fig 2A). Immunoblotting of the homogenates with anti-phosphotyrosine antibody showed a non-significant decrease to $81\% \pm 31\%$, $p>0.05$ in insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation levels in dexamethasone treated rats (Fig.2B). In contrast,

correction of the data for the amount of protein, revealed a dramatic decrease in the stoichiometry of the JAK2 phosphorylation to 20% ($p < 0.05$) in dexamethasone-treated rats. The insulin-induced JAK2/STAT1 association (Fig. 2C) showed a reduction to $70\% \pm 18$, $p < 0.05$ in heart samples from dexamethasone-treated rats.

Heart extracts previously immunoprecipitated with anti-JAK2 antibody were blotted with anti-SHPTP2 antibody (Fig. 2D) and a significant increase to $170\% \pm 9\%$, $p < 0.05$ in the insulin-induced JAK2/SHP2 association was seen in dexamethasone-treated rats. There was an increase to 150% in SHP2 protein levels in heart of dexamethasone treated rats, but no change in STAT1.

3- Effect of epinephrine on insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation in the heart of intact rats

There was no change in JAK2 protein expression after acute stimulation with epinephrine (Fig. 3A). Similarly, there was no difference in the insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation between epinephrine-treated and control rats (control $100 \pm 15\%$, epinephrine $78 \pm 11\%$, N.S.; Fig. 3B). In agreement with this, the stoichiometry of insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation did not change in the catecholamine-treated rats.

Analysis of the insulin-induced JAK2/STAT1 association showed no significant change in this association in epinephrine-treated rats (control $100 \pm 1\%$, epinephrine $107 \pm 5\%$, N.S.; Fig. 3C). Similar results were obtained for the insulin-induced JAK2/SHP2 association (control $100 \pm 1\%$; epinephrine $93 \pm 3\%$, N.S.; Fig. 3D).

DISCUSSION

JAK2 belongs to the Janus kinase family of proteins which in addition to an active kinase domain, also possess a second kinase-like domain but have no Src homology 2 (SH2), Src homology 3 (SH3) or membrane spanning region (11-13,16). The receptors for erythropoietin (17), prolactin (18,19), growth hormone (20), and angiotensin II (21) bind to and activate JAK2. We have recently

shown that after the infusion of insulin JAK2 is rapidly tyrosine phosphorylated and is activated in insulin-sensitive tissues of the intact rat (23). JAK2 was also found to co-immunoprecipitate with the insulin receptor and IRS-1, suggesting that this cytoplasmic kinase is involved in insulin signal transduction (22).

Following activation by different hormones and cytokines, JAK2 phosphorylates STAT proteins, which in turn form homodimers and/or heterodimers before being translocated to the nucleus where they activate target genes by interaction with specific DNA sequences. We have demonstrated that insulin induces STAT1 tyrosine phosphorylation in a time and dose-dependent fashion, and that after insulin infusion there is a clear association between JAK2 and STAT1, suggesting that the latter is activated by the former (40). There is a close correlation between the time course of insulin-induced STAT1 phosphorylation and the binding of this protein to JAK2. Furthermore, JAK2 has kinase activity towards STAT1 following exposure to insulin (40). SHPTP2 has been suggested to act as a bridge or an adapter between tyrosine phosphorylated IRS-1 and JAK2 kinase following stimulation by insulin. One possible function of constitutive JAK2 kinase-SHPTP2 binding is the translocation of Syp to the membrane to allow easier association with IRS-1. SHPTP2 activity has also been implicated in the dephosphorylation of JAK2 kinase in HIRc cells (29).

Prolonged fasting in rats is characterized by insulin deficiency and insulin resistance, despite an increase in insulin receptor number (30,31). In the heart of fasting rats there is an increase in the insulin-induced insulin receptor phosphorylation level (32) which is paralleled by an increase in IRS-1 tyrosine phosphorylation (32). We have shown here that after a 72 h fast there is a decrease in JAK2 protein expression and a more marked decrease in insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation. This results suggest a tissue-specific regulation of JAK2 tyrosine phosphorylation level, since in the liver of 72 h fasted rats the insulin-induced tyrosine phosphorylation of this kinase is increased (22).

The insulin-induced association of JAK2 with other proteins was differentially regulated with an increase in JAK2/STAT1 and a decrease in JAK2/SHP2 association in hearts from 72 h fasted rats. The reason for this divergence regulation in association, which was also observed in dexamethasone-treated rats, is presently unknown (seen below).

The reduced JAK2 protein expression and tyrosine phosphorylation in hearts from fasted rats may be of limited biological significance since the association of this kinase with STAT1, which seems to be an important mitogenic pathway, is preserved. JAK2 has been described as an alternative pathway

for insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation. However, tyrosine phosphorylation of IRS-1 in hearts from 72 h fasted rats is increased in parallel with an increase in insulin-induced insulin receptor phosphorylation, suggesting that the insulin receptor is the main modulator of IRS-1 tyrosine phosphorylation in this situation.

An excess of epinephrine has long been known to cause insulin resistance (33-37). Catecholamines antagonize the action of insulin by stimulating gluconeogenesis, glycogenolysis and lipolysis and by inhibiting peripheral glucose use via a β -adrenergic mechanism that may also involve a decrease in cellular glucose transport (32). High intracellular cyclic AMP levels seem to induce insulin resistance at both receptor and post-receptor levels (34,38). We have recently shown that epinephrine reduces insulin-induced insulin receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation levels in liver, muscle and heart (39). This decrease may be secondary to an increased activity of PKA which can phosphorylate insulin receptor and probably IRS-1 at serine, thereby reducing insulin receptor kinase activity and autophosphorylation as well as IRS-1 tyrosine phosphorylation levels. Epinephrine did not change the insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation level and the JAK2 association with STAT1 and SHPTP2. The reason for this differential regulation of the insulin receptor/IRS-1 and JAK2 in hearts from epinephrine-treated rats is difficult to explain but may indicate that PKA does not phosphorylate JAK2 at serine or that serine phosphorylation of JAK2 does not have a regulatory role. Alternatively, epinephrine may activate phosphotyrosine phosphatases that can dephosphorylate the insulin receptor and IRS-1 but not JAK2.

An excess of glucocorticoids is a well known situation of insulin resistance. Hypercortisolemia is associated with increased glucose production by the liver, decreased peripheral glucose transport and utilization, decreased protein synthesis, and increased protein degradation in muscle (43-45). In contrast to their catabolic effect on skeletal muscle, glucocorticoids are anabolic in the heart. The increased accumulation of total cardiac protein during glucocorticoid administration is mediated entirely via increased rates of synthesis. In agreement with this we have shown here that a glucocorticoid excess markedly increased JAK2 protein expression in the rat heart. However, the stoichiometry of the insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation was reduced by 80% in rats exposed to an excess of glucocorticoid. Since JAK2 may have a role in insulin-induced IRS-1 phosphorylation (40), the reduction in JAK2 tyrosine phosphorylation following dexamethasone treatment may contribute to the reduced IRS-1 tyrosine phosphorylation observed in rats (40), although this was not the case in fasted

rats. Dexamethasone differentially modulated the interactions of JAK2 with SHPTP2 and STAT1. The insulin-induced association of JAK2/SHPTP2 was increased while that of JAK2/STAT1 was decreased in hearts from dexamethasone-treated rats. These results from fasted and dexamethasone-treated rats suggest that in situations of reduced insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation there are a competitive interaction between JAK2/STAT1 and JAK2/SHPTP2, such that when one interaction increases the other decreases. The mechanisms responsible for this dissociation are presently unknown, but at least three possibilities should be considered. First, a differential coupling between JAK2 and STAT1 or SHPTP2, modulated by the reduced JAK2 tyrosine phosphorylation of specific tyrosines, may drive the interaction. Second, as we observed an increase in SHPTP2 protein levels in dexamethasone treated rats, it is possible that this change may have contributed to the increased interaction of JAK2/SHPTP2 in this specific situation. Third, STAT1 and SHPTP2 may be competing for the same or similar binding site on JAK2, since each of these proteins appears to have opposing interactions with JAK2.

In summary, in fasting and dexamethasone-treated rats,(two insulin-resistant states) there is a decrease in insulin-induced JAK2 tyrosine phosphorylation as well as differential regulation of JAK2 protein expression in which the insulin-induced JAK2 association with SHPTP2 and STAT1 showed opposite interactions with the kinase.

REFERENCES

- 1-WHITE MF, MARON R, KAHN CR, Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein intact cells. *Nature* 318: 183-186, 1985;
- 2-KARASIK A, PEPINSKY RB, SHOELSON SE, KAHN CR, Lipocortins 1 and 2 as substrates for the insulin receptor kinase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 1988, 263: 11862-118676.
- 3-SUN XL, ROTHENBERG PA, KAHN CR, BACKER JM, ARAKI E, WILDEN P, CAHILL DA, GOLDSTEIN BJ, WHITE MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a

unique signal transduction protein. *Nature* 1991, 352: 73-77.

4-ROTHENBERG P.L., LANE W.S., KARASIK A., BACKER J., WHITE M.F., KAHN C.R. Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol. Chem.*, 1991, 266: 8302-8311.

5-TAMEMOTO H, KADOWAKI T, TOBE K, YAGI T, SAKURA H, HAYAKAWA T, TERAUCHI Y, UEKI K, SATOH S, SECCHARA H, YOHIOKA S, HORIKOSHI H, FURUTA Y, IKAWA Y, KASUGA M, YAZAKI Y, AIZAWA S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, 1994, 372: 182-186.

6-ARAKI E, LIPES MA, PATTI MA, BRUNING JC, HAAG B, JOHNSON RS, KAHN CR. Alternative pathway of insulin signaling. *Nature*, 1994, 372: 186-190.

7-SUN XJ, WANG LM, PATTI MA, BRUNING JC, HAAG B, JOHNSON RS, KAHN CR. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, 1995, 373: 173-177.

8-SKOLNIK EY, LEE CH, BATZER A, VICENTINI LM, ZHOU M, DALY R, MYERS MG, BACKER JM, ULLRICH A, WHITE MF, SCHLESSINGER J. The SH2/SH3 domain-containing protein Grb 2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS-1 and Shc: implication for insulin control of ras signalling. *EMBO J.*, 1993, 12: 1929-1936.

9- OKADA T., KAWANO Y., SAHARA T., HAZEKI O., UI M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 3568-3573.

10-SMITH-HALL J., PONS S., PATTI M.E., BURKS D.J., YENUSH L., SUN X.L., KAHN C.R., WHITE M.F. The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry*. 1997, 36, 27: 8304-10.

11-WILKS, A.F, HARPUR A.G., KIRBAN R.R, ROOPH, S.J., ZUERCKER G., ZIEMIECKI, A. Two novel protein-tyrosine kinase, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 11, 2057-2065.

12-HARPUR, A.G., ANDRES A.C., ZIEMECKI, A., ASTON R.R., AND WILKS A.F. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinase. 1992, *Oncogene* 7, 1347-1350.

13-SILVENNOINEN O., WITTHUHN, B.A., QUELLE, F.W., CLEVELAND, J.L., YI T. AND IHLE J.N. Structure of the Jak2 protein tyrosine kinase and its role in IL-3 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 8429-8433.

14-JOHNSTON J.A., KAWAMURA M., KIRKEN R.A., CHEN Y.Q., BLAKE T.B., SHIBUYA K., ORTALDO J.R., Mc VICAR D.W., and O'SHNEA J.J. Phosphorylation and activation of the Jak3 Janus Kinase in response to interleukin-2. *Nature*, 1994, 370, 151-153,.

15-WITTHUHN B.A., SILVENNOINEN O., MIURA O., LAI K.S., CWIK C., LIU E.T., and IHLE J.N. Involvement of the Jak3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature*, 1994, 370, 153-157,.

16-FIRMBACH-KRAFT I., BYERS M., SHOWS T., DALLA-FAVERA R., and KROLEWSKI J.J., Tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene* 1994, 5, 1329-1336.

17-WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., SILVENNOINEN O., YI T., TANG B., MIURA O., and IHLE J.N. JAK2 associated with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, 1993, 74, 227-236.

18-LEBRUN J.J., ALI S., SOFER L., ULLRICH A., and KELLY P.A. Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 14021-14026.

19-RUI H., KIRKEN R.A., and FARRAR W.L. Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 5364-5368.

20-ARGENTSINGER L.S., CAMPBELL G.S., YANG X., WITTHUHN B.A., SILVENNOINEN O., IHLE J.N., and CARTER-SU. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*, 1993, 74, 237-244.

21-MARRERO M.B., SCHIEFFER B., PAXTON W.G., HEERDT L., BERK B.C., DELAFONTAINE P., and BERSTEIN K.E. Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the Angiotensin II AT1 receptor. *Nature*, 1995, 375, 247-250.

22-SAAD M.J.A., CARVALHO C.R.O., THIRONE A.C.P., VELLOSO L.A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of intact rat. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 22100-22104.

23-IHLE J.N., WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., YAMAMOTO K., THIERFELDER W.E., KREIDER B., SILVENNOINEN O. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19, 222.

24-SHUAI K., HORVATH C.M., TSAI HUANG L.H., QUERESHI S.A., COWBURN D., DARNELL J.E. Interferon activation of the transcription factor STAT91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 1994, 76: 821.

25-NICHOLSON S.E., OATES A.C., HARPUR A.G., ZIEMIECKI A., WILKS A.F., LAYTON J.E. Tyrosine kinase JAK1 is associated with the granulocyte-colony stimulating factor receptor and both become tyrosine phosphorylated after receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91:2985.

26-DONG F., VAN PAASSEN M., VAN BUITENEN C., HOEFSLOOT L.H., LOWENBERG B., TONW I.P. A point mutation in the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) gene in a overexpression of a novel G-CSF-R isoform. *Blood*, 1995, 85: 902,.

27-TIAN S-S, LAMB P., SEIDEL H.M., STEIN R.B., ROSEN J. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1994, 84: 1760,.

28-DE KONING J.P., DONG F., SMITH L., SHELEN A.M., BARGE R.M., van der PLAS D.C., HOEFSLOOT L.H., LOWENBERG B., TONW I.P. The membrane-distal cytoplasmatic region of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for STAT3 but not

STAT1 homodimer formation. *Blood*, 1996, 87: 1335,.

29-MAEGAWA H., KASHIWAGI A., FUJITA T., UGI S., HASEGAWA M., OBATA T., NISHIO Y., KOJIMA H., HIDAKA H., KIKKAWA R. SHPTP2 serves adapter protein linking between Janus Kinase 2 and insulin receptor substrates. *Bioc. and Bioph. Reserch Communications*, 1996 228, 122-127.

28-DeFRONZO R.A., HENDLER R. AND SIMONSON D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, 1982, 31: 795-801.

30-PENICAUD L., KANDE J. AND LeMAGNEN J. Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp. *American Journal of Physiology*, 1985 249: E514-E518.

31-SILVA L.A.C.V., CARVALHO C.R.O., AND SAAD M.J.A. Effect of fasting on insulin signal in the aorta of intact rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1996, 29: 1611-1615.

32-CHIASOON J.L., SHIKAMA H., CHU D.T.W. and EXTON J.H. Inhibitory effect of epinephrine on insulin-stimulated glucose uptake by rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 1981, 68, 706-713.

33-KIRSCH D., KEMMLER W. AND HARING H.U. Cyclic AMP modulates insulin binding and induces post-receptor insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 197, 762-768.

35-PESSIN J.E., GITOMER W., OKA Y., OPPENHEIMER C.L., and CZECH M.P. Beta-adrenergic regulation of insulin and epidermal growth factor receptors in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 7386-7394.

36-WALLBERG-HENRIKSSON H. Glucose transport into skeletal muscle. Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. *Acta Physiol. Scand.*, 1987, (Suppl.) 564, 1-80.

37-BONEN A., MEGENEY L.A., MCCARTHY S.C., McDERMOTT J.C. and TAN M.H. Epinephrine administration stimulates GLUT4 translocation but reduces glucose transport in muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 187, 685-691.

38-KURODA M., HONNOR R.C., CUSHMAN S.W., LONDOS C. and SIMPSON I.A. Regulation of insulin-stimulated glucose transport in the isolated rat adipocyte. cAMP-independent effects of lipolytic and antilipolytic agents. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 245-353.

39-SAAD M.J.A., HARTMANN L.G.C., CARVALHO D.S., GALORO C.A.O., BRENELLI S.L. and CARVALHO C.R.O. Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. *Endocrine*, 1995, 3, 755-759.

40-SAAD J.A.M., CARVALHO C.R.O., THIRONI A.C.P., VELLOSO L.A. (1996). Insulin stimulates JAK2 tyrosine phosphorylation in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *Diabetes* 45, suppl. 2.

41-KAHN CR, GOLDFINE ID, NEVILLE DM, DEMEYTS P. Alterations in insulin binding induced by changes *in vivo* in the levels of glucocorticoids and growth hormone. *Endocrinology*, 1978, 103: 1054-1066.

42-CARO JF & AMATRUDA JM. Glucocorticoid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 69: 866-875, 1982.

43-AMATRUDA JM, LIVINGSTON JN, LOCKWOOD DH. Cellular mechanism in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. *Diab. Metab. Rev.*, 1985, 3: 293-317.

44-KNUTSON VO. The acute and chronic effects of glucocorticoids on insulin receptor and insulin responsiveness. Transient fluctuations in intracellular receptor level parallel transient fluctuations in responsiveness. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261: 10306-10312.

45-MOLLER DE, FLIER JS. Insulin resistance-mechanism, syndromes, and implications. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325: 939-948.

Legends

Fig.1. Effect of fasting on JAK2 (Janus Kinase 2) tyrosine phosphorylation levels in cardiac tissue. Rats were anesthetized, and the abdominal wall incised to expose viscera. Normal saline or 6 μ g of insulin was infused into the cava as a bolus injection and 90 s later the heart was excised and homogenized in extraction buffer A as described in *Material and Methods*. The cardiac tissue from fed and fasted rats were immunoprecipitated with anti-JAK2 and immunoblotted with anti-JAK2 (A) and with anti-phosphotyrosine antibody (B), with anti-STAT1 (C) and anti-SHPTP2 (D) antibody. The bar graphs represent the mean \pm S.E.M. of the scanning densitometry of six experiments.

Fig.2 Insulin-stimulates JAK2 tyrosine phosphorylation in the cardiac tissue of dexamethasone-treated rats. Rats were anesthetized, and the abdominal wall incised to expose viscera. Normal saline or 6 μ g of insulin was infused into the cava as a bolus injection and 90 s later the heart was excised and homogenized in extraction buffer A as described in *Material and Methods*. The cardiac tissue from

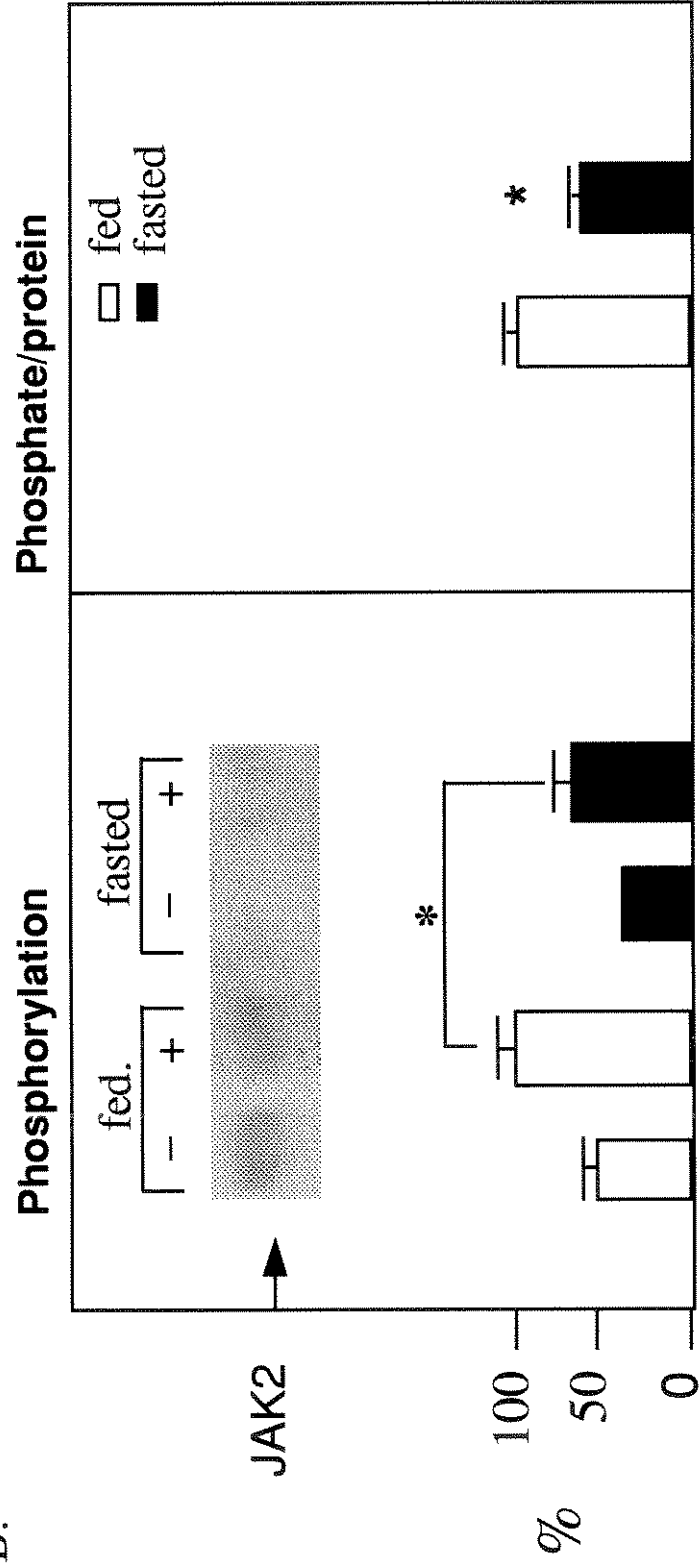
dexamethasone and control rats were immunoprecipitated with anti-JAK2 and immunoblotting with anti-JAK2 (A) and with anti-phosphotyrosine antibody (B), with anti-STAT1 (C) and anti-SHPTP2 (D) antibody. The bar graphs represent the mean \pm S.E.M. of the scanning densitometry of six experiments.

Fig.3 Insulin stimulates JAK2 tyrosine phosphorylation in the cardiac tissue of epinephrine-treated rats. Rats were anesthetized, and the abdominal wall incised to expose viscera. Normal saline or 6 μ g of insulin was infused into the cava as a bolus injection and 90 s later the heart was excised and homogenized in extraction buffer A as described in *Material and Methods*. The cardiac tissue from epinephrine and control rats were immunoprecipitated with anti-JAK2 and immunoblotting with anti-JAK2 (A) and with anti-phosphotyrosine antibody (B), with anti-STAT1 (C) and anti-SHPTP2 antibody (D). The bar graphs represent the mean \pm S.E.M. of the scanning densitometry of six experiments.

A.

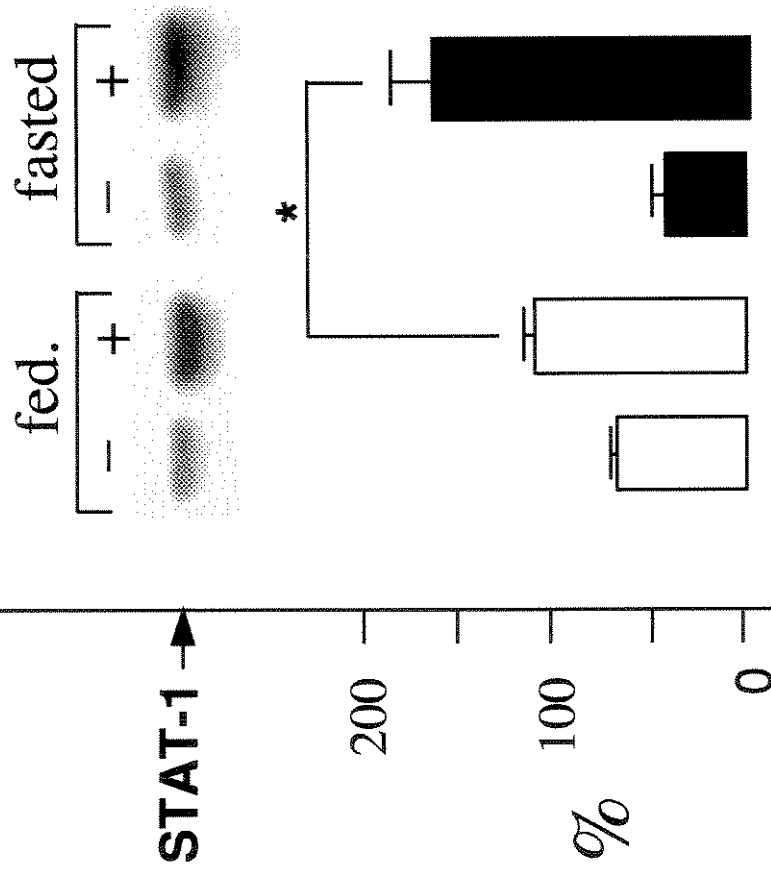


B.



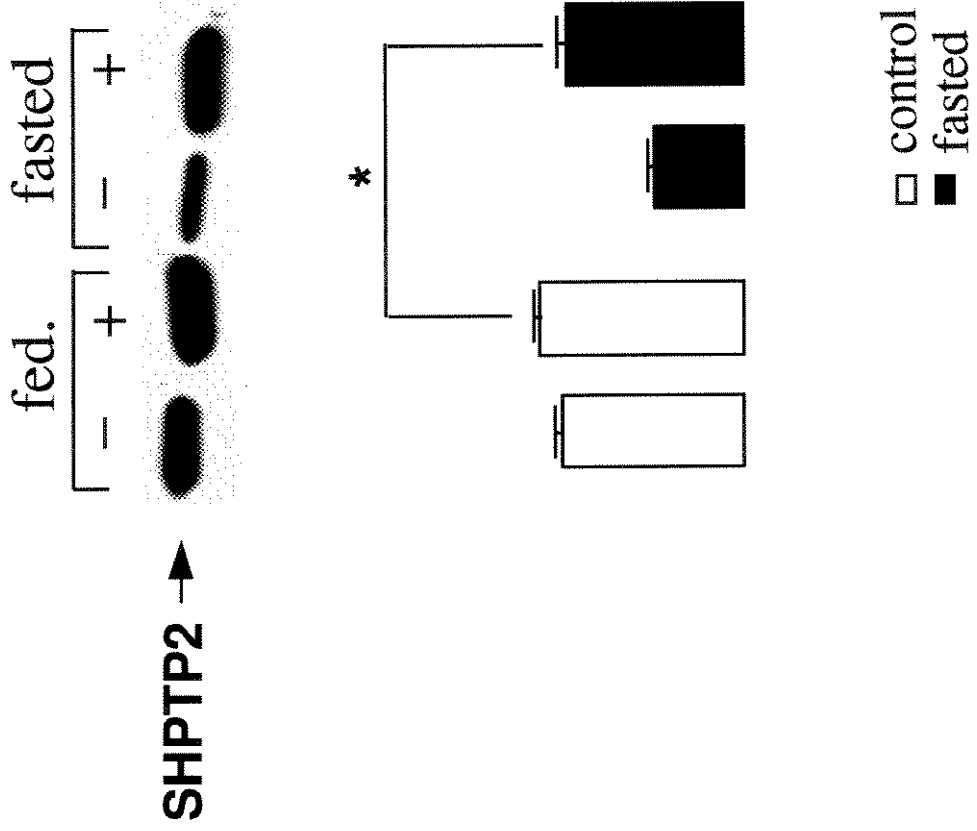
Association

C.



Association

D.



A.

cont. dexta.

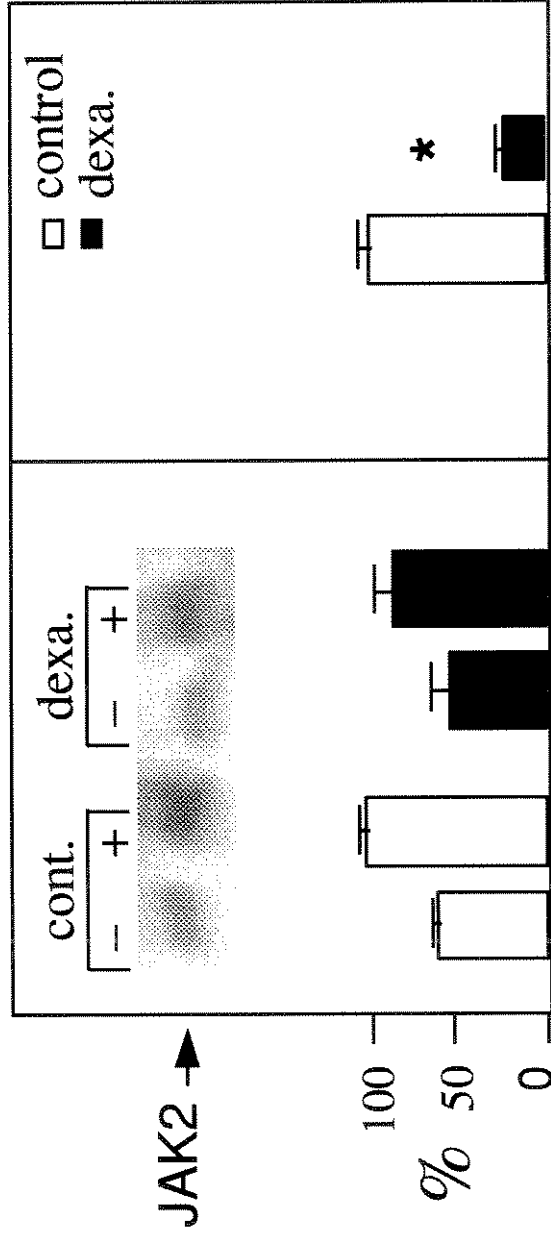
JAK2 →



B.

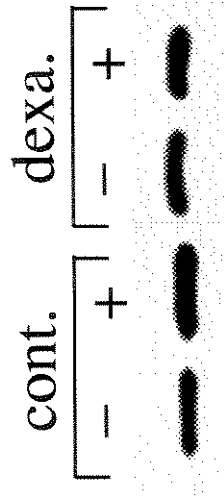
Phosphorylation

Phosphate/protein

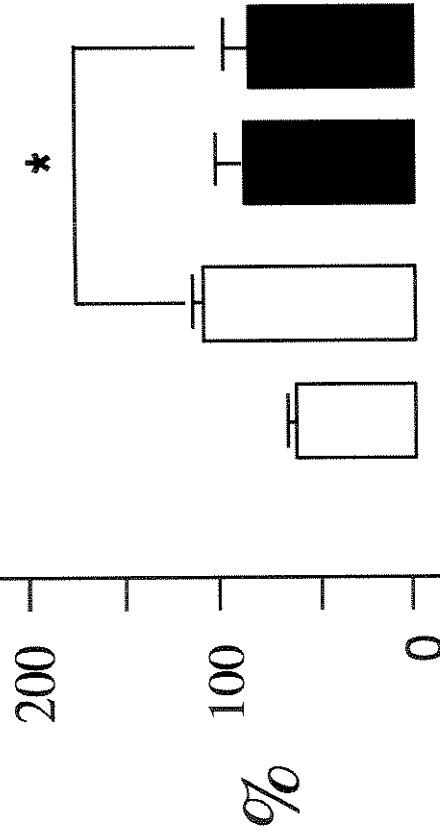


Association

C.



STAT-1 →

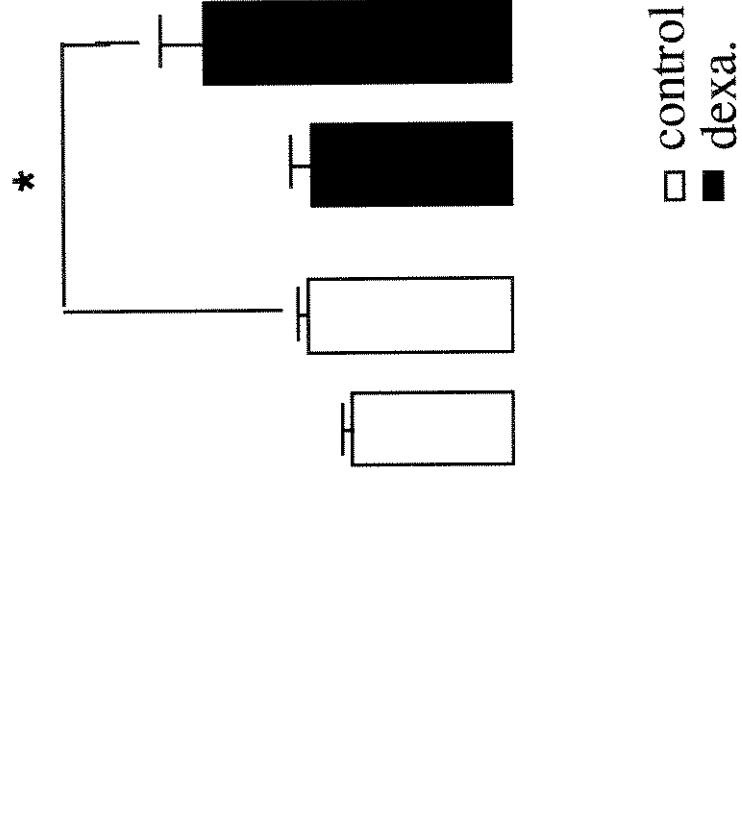


Association

D.



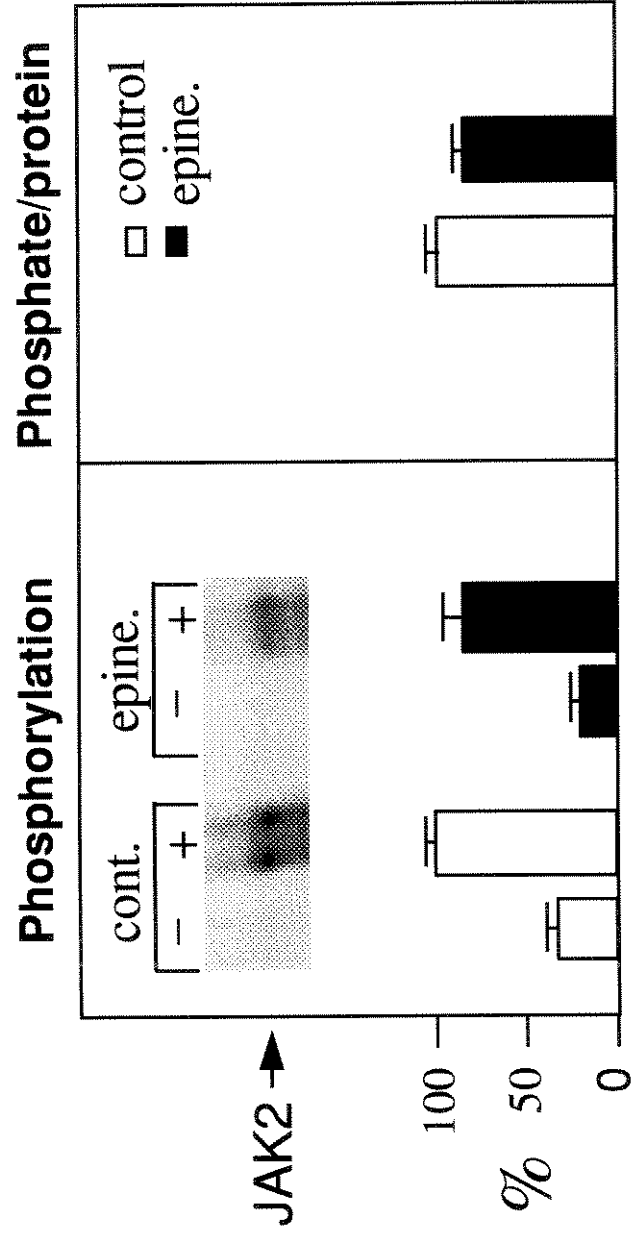
SHPTP2 →



A.

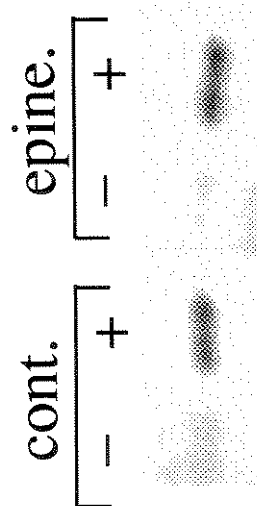


B.



Association

C.



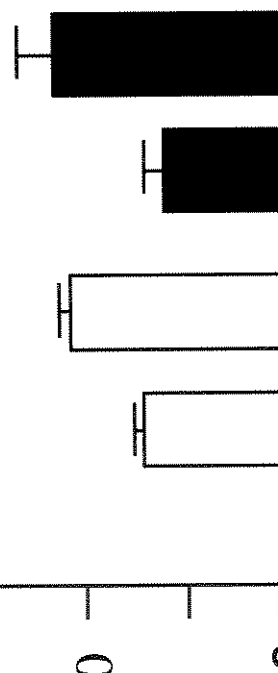
STAT-1 →

200

100

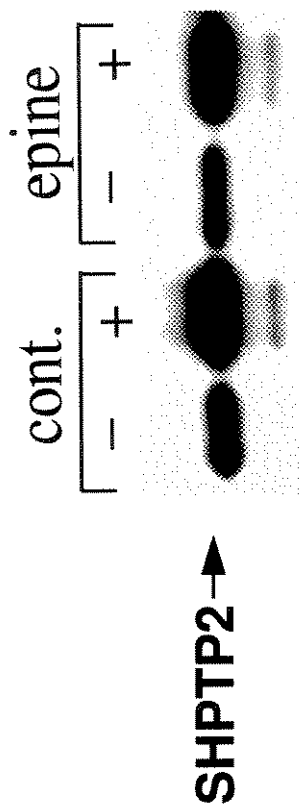
0

%

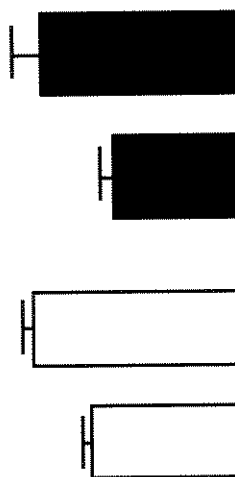


Association

D.



SHPTP2 →



□ control
■ epine.

3-DISSCUSSÃO

A insulina tem como mediador inicial, para suas ações celulares em processos metabólicos e de crescimento celular, o seu receptor de membrana. A ligação da insulina na subunidade α do seu receptor, ativa a capacidade tirosina quinase da subunidade β em direção a ela mesma, autofosforilando-se, e em direção a substratos endógenos como o IRS-1 (SUN *et al.*, 1992), o IRS-2 (SUN *et al.*, 1995), o IRS-3 (SMITH-HALL *et al.*, 1997; LAVAN *et al.*, 1997), IRS-4 (LAVAN *et al.*, 1997), Shc (SKOLNIK *et al.*, 1993; OKADA *et al.*, 1995) e a JAK2 (SAAD *et al.*, 1996) e provavelmente outras proteínas.

O estudo da regulação do receptor de insulina e das etapas iniciais da ação insulínica em modelos animais, pode ser realizada *in vitro*, através de receptores de insulina parcialmente purificados e substratos exógenos, ou *in vivo* após a infusão de insulina.

O protocolo experimental utilizado neste trabalho, estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização do tecido cardíaco em condições apropriadas para imunoprecipitação e posterior “imunoblotting” com anticorpos específicos, permitiu uma avaliação de uma das etapas iniciais possíveis da ação insulínica.

Nos estudos iniciais sobre a fisiologia molecular do receptor de insulina foram utilizados receptores parcialmente purificados, e a atividade quinase foi determinada *in vitro*, em direção a substratos exógenos como histonas (ROHENBERG, WHITE, KAHN, 1990). Embora sejam ensaios informativos, esses procedimentos são susceptíveis a artefatos bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e purificação do receptor,

como proteólise e desfosforilação do receptor por fosfases contaminantes (KATHURIA *et al.*, 1986). A remoção do receptor da membrana plasmática interfere em interações com outros componentes celulares e pode influenciar a atividade quinase do receptor (FEHLMAN *et al.*, 1985). Finalmente, há diferenças importantes na atividade quinase do receptor manifestas *in vitro*, dependendo do substrato exógeno utilizado (ROTHENBERG *et al.*, 1990). O método utilizado aqui não está sujeito a estas implicações, permitindo uma determinação direta do grau de fosforilação da proteína JAK2 bem como de sua associação com Syp e com STAT1.

Foi demonstrado recentemente no nosso laboratório que após a infusão de insulina, a JAK2 é rapidamente fosforilada em tirosina, ativando-se a sua capacidade quinase em direção a outras proteínas, como STAT1 e IRS-1, em tecidos insulino-sensíveis de ratos (Carvalho, 1996). A JAK2 foi co-imunoprecipitada com o receptor de insulina (IR) e com o substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) sugerindo que essa quinase citoplasmática esteja envolvida na transmissão do sinal insulínico.

As proteínas STATs quando ativadas por JAKs, formam homodímeros e (ou) heterodímeros, se translocam ao núcleo ativando sequências específicas de DNA. Em nosso laboratório foi demonstrado que a insulina induz a fosforilação em tirosina da STAT1, sendo tempo e dose-dependente, ocorrendo uma clara associação entre JAK2 e STAT1 sugerindo que esta proteína seria ativada pela JAK2 (CARVALHO *et al.*, 1997).

MAEGAWA *et al.* em 1996 demonstraram que após o estímulo com insulina a fosfotirosina fosfatase SHPTP2 atuaria como ponte ou adaptador entre o IRS-1 fosforilado

em tirosina e a JAK2, e que possivelmente essa associação constitutiva entre SHPTP2 e a JAK2 permitiria ao SHPTP2 uma localização perto da membrana, facilitando a sua associação com IRS-1. Nesse mesmo estudo sugeriu-se que a atividade fosfatase SHPTP2 seria a responsável pela desfosforilação da JAK2 em cultura de células HIRc (MAEGAWA *et al.*, 1996).

Portanto, a insulina induz a fosforilação em tirosina da JAK2 e promove a ativação da sua atividade quinase além de induzir a sua associação com STAT1 e com SHPTP2, sugerindo que esta seja uma nova via de sinalização da insulina. Entretanto, ainda não foi investigada a regulação dessa via em tecidos insulino sensíveis de ratos em situações que alteram a sensibilidade a este hormônio. Neste trabalho foi estudado a indução pela insulina da fosforilação em tirosina da JAK2 e a sua associação com STAT1 e SHPTP2 no coração de ratos em três situações de resistência à insulina: jejum prolongado de 72 horas, tratamento crônico durante cinco dias com o glicocorticoide dexametasona e tratamento agudo com adrenalina. Estudou-se o coração porque nesse tecido há uma expressão protéica do JAK2 maior e uma possibilidade melhor de observação da fosforilação após o estímulo com insulina, em relação aos outros tecidos insulino dependentes.

A situação de um jejum prolongado em ratos está caracterizado por apresentar hipoinsulinemia e resistência à insulina (ALMIRA & REDDY, 1979; OKAMOTO *et al.*, 1986; FRIEDENBERG *et al.*, 1985; PENICAUD *et al.*, 1985). Nesta situação descreve-se uma redução da ação insulínica tanto em tecidos periféricos quanto em tecido hepático,

associada a um aumento no número de receptores de insulina nestes tecidos (ALMIRA & REDDY, 1979; OKAMOTO *et al.*, 1986). Em tecido cardíaco de ratos submetidos a jejum prolongado ocorre um aumento no grau de fosforilação do receptor de insulina de forma paralela a um aumento no nível de fosforilação em tirosina do IRS-1 após o estímulo insulínico (SILVA *et al.*, 1997). Entretanto, nossos resultados demonstraram que nessa situação ocorre uma diminuição na quantidade de proteína JAK2 e uma diminuição ainda maior no grau de fosforilação em tirosina com uma estequiometria de 70%. Nessa mesma situação de resistência à insulina o grau de fosforilação da JAK2 em tecido hepático é maior do que em animais alimentados (SAAD *et al.*, 1996), sugerindo uma regulação tecido específica dessa quinase citoplasmática.

De modo interessante, quando foi estudada a associação da JAK2 após o estímulo insulínico com as outras proteínas, houve um aumento na interação da JAK2 com STAT1 e uma diminuição com SHPTP2, em tecido cardíaco de ratos em jejum prolongado. Ainda não foi elucidada a razão dessa regulação diferenciada, visto que também acontece na situação dos ratos tratados cronicamente com dexametasona, e será posteriormente discutida. A diminuição nos níveis protéicos e da fosforilação em tirosina da JAK2 nessa situação de resistência à insulina parece ter pouco significado biológico, já que a sua associação com STAT1 está preservada, e esta aparentemente tem um importante papel nas vias mitogênicas.

Por outro lado, a JAK2 foi descrita como uma proteína participante de uma via alternativa da insulina na indução da fosforilação do IRS-1 (SAAD *et al.*, 1996), e uma

redução da fosforilação da JAK2 poderia diminuir o grau de fosforilação do IRS-1. Entretanto, a fosforilação em tirosina do IRS-1 no coração de ratos em jejum de 72 h está aumentada conjuntamente com o aumento na fosforilação do receptor de insulina (VIEIRA *et al.*, 1997) em resposta ao estímulo com insulina, sugerindo que o maior modulador da fosforilação do IRS-1 nessa situação deve ser o receptor de insulina.

A elevação dos níveis circulantes de catecolaminas induz resistência à insulina (MOLLER & FLIER, 1991). A adrenalina antagoniza a ação da insulina, estimulando a neoglicogênese, a glicogenólise e inibindo a captação periférica de glicose. A ação central desse hormônio é elevar a concentração intracelular de AMPc. Um aumento nos níveis intracelulares de AMPc, induz resistência à insulina em nível de receptor e pós-receptor (KIRSCH *et al.*, 1983; HARING *et al.*, 1986). A redução no grau de fosforilação e na atividade tirosina-quinase do receptor de insulina foi descrita em receptores parcialmente purificados e utilizando-se substratos exógenos, em situações onde estavam elevados os níveis de AMPc *in vivo* e *in vitro* (STADMAUER & ROSEN, 1986; ROTH & BEAUDOIN, 1987). Recentemente foi demonstrado que a epinefrina reduz os níveis de fosforilação em tirosina do receptor de insulina e do IRS-1 após o estímulo insulínico no fígado, no músculo e no coração de ratos (SAAD *et al.*, 1995; VIEIRA *et al.*, 1997). O mecanismo pelo qual a adrenalina exerce tais efeitos nas etapas iniciais da ação insulínica não está completamente elucidado, mas pelo menos duas alternativas devem ser consideradas. Primeiro, é bem estabelecido que agentes que elevam as concentrações intracelulares de AMPc, induzem fosforilação do receptor em serina e treonina, o que

reduz a capacidade tirosina-quinase do receptor de insulina e sua autofosforilação (STADMAUER & ROSEN, 1986; ROTH & BEAUDOIN, 1987; TAKAYAMA *et al.*, 1988). Assim, o AMPc pode atenuar a ação insulínica alterando o estado de fosforilação do receptor de insulina. Não está ainda estabelecido se o aumento do AMPc induz fosforilação em serina do IRS-1, mas como a atividade tirosina-quinase do receptor está reduzida, espera-se uma menor fosforilação do principal substrato do receptor, o IRS-1. Outra possibilidade deriva de uma descrição relativamente recente, demonstrando que o aumento na concentração intracelular de AMPc, ativando a proteína quinase A (PKA), ativa fosfotirosinas fosfatases (PTPases), levando a uma sequência de desfosforilações (WILSON *et al.*, 1993). Os nossos resultados mostraram, de forma interessante, que a adrenalina não promove mudanças na fosforilação em tirosina da JAK2 em resposta ao estímulo com insulina. Da mesma forma, as associações da JAK2 com STAT1 e com SHPTP2 nos ratos tratados agudamente com adrenalina, não sofreram alterações. Ainda não se conhece a razão da regulação diferencial do receptor de insulina/IRS-1 e do JAK2 no tecido cardíaco de ratos tratados com adrenalina, mas é possível sugerir que a proteína quinase A não induz fosforilação da JAK2 em serina, ou que a fosforilação em serina dessa proteína não exerce nenhum papel regulatório. De forma equivalente, a epinefrina poderia estar ativando fosfotirosinas fosfatases que desfosforilam o IR e o IRS-1 mas não o JAK2.

O tratamento de ratos com dexametasona induz resistência à insulina. A hipercortisolemia está associada a um aumento na produção de glicose pelo fígado, a uma

diminuição da síntese protéica, a uma diminuição na captação e utilização periférica de glicose e a um aumento na degradação protéica em músculo (KAHN *et al.*, 1978; CARO & AMATRUDA, 1982; AMATRUDA *et al.*, 1985; KNUTSON, 1986; MOLLER & FLIER, 1991). O mecanismo pelo qual os glicocorticóides exercem esses efeitos não está inteiramente esclarecido. Em contraste com os efeitos catabólicos que eles exercem no músculo, os glicocorticóides produzem um efeito anabólico no coração (BENSKY *et al.*, 1996). No tratamento com dexametasona ocorre um aumento da quantidade de proteínas totais no coração, que é devido ao aumento na taxa de síntese protéica. De maneira interessante, nossos resultados demonstraram um aumento marcante na quantidade de proteína JAK2 no coração dos ratos após o tratamento crônico com dexametasona. Apesar disto, a estequiometria da fosforilação em tirosina do JAK2 induzida por insulina, nessa situação, foi reduzida em aproximadamente 80%. Como discutido anteriormente, a JAK2 pode ter um papel na fosforilação em tirosina do IRS-1 induzida pela insulina, e em ratos tratados com dexametasona a redução da fosforilação do JAK2 pode contribuir para a diminuição de fosforilação do IRS-1 descrita nesses animais por CARVALHO *et al.*, 1997, apesar de não se observar a mesma regulação na situação de jejum prolongado. Os ratos tratados com dexametasona também apresentaram uma regulação diferenciada da associação, induzida pela insulina, da JAK2 com SHPTP2 e com STAT1. Observou-se um aumento na interação com SHPTP2 e uma diminuição com STAT1 no tecido cardíaco desses ratos.

Quando são analisados em conjunto os resultados obtidos nos ratos submetidos a

jejum de 72 h e nos ratos tratados cronicamente com excesso de glicocorticóides, observa-se uma relação entre a diminuição do grau de fosforilação em tirosina da JAK2 após o estímulo com insulina, e alteração na associação desse com as outras duas proteínas. Em ambas situações ocorre uma relação inversa: quando a interação do JAK2/SHPTP2 diminui a associação do JAK2/STAT1 aumenta. Não são conhecidos os mecanismos responsáveis por essa resposta dissociada, mas três possibilidades devem ser consideradas. Como a JAK2 tem mais que uma tirosina que pode ser fosforilada (WILKS et al., 1991) é possível que as interações com SHPTP2 e STAT1 ocorram através de tirosinas diferentes. Assim a redução da fosforilação em tirosinas específicas pode reduzir uma das interações, facilitando a ligação da outra proteína. Em segundo lugar deve-se considerar a possibilidade da SHPTP2 e da STAT1 competir pelo mesmo sítio ou sítio semelhante de interação e que o aumento de uma interação seria paralelamente acompanhado de diminuição da outra. Finalmente, deve ser considerado os níveis teciduais das proteínas SHPTP2 e STAT1 nas duas situações de resistência. Neste sentido, o aumento dos níveis de SHPTP2 em ratos tratados com dexametasona, pode ter favorecido a interação desta à JAK2, o que deve ser específico desta situação por que não foi observado nos animais submetidos a jejum prolongado.

Em resumo, este trabalho mostra que tanto nos ratos em jejum de 72 horas como nos ratos tratados com dexametasona, duas situações de resistência à insulina, ocorre uma diminuição no grau de fosforilação em tirosina da JAK2 induzido por insulina em coração apesar de uma regulação diferente na quantidade tecidual desta proteína. Esta redução da

fosforilação da JAK2 foi acompanhada de alterações inversas na associação desta quinase com as proteínas SHPTP2 e STAT1.

4-REFERÊNCIAS

- ALMIRA E.C., REDDY W.J. - Effect of fasting on insulin binding to hepatocytes and liver plasma membranes from rats. **Endocrinology**, 104: 205-211, 1979.
- AMATRUDA J.M., LIVINGSTON J.N., LOCKWOOD D.H. - Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. **Diabetes and metabolism Review**, 3: 297-317, 1985.
- ARGENTSINGER L.S., CAMPBELL G.S., YANG X., WITTHUHN B.A., SILVENNOINEN O., IHLE J.N., and CARTER-SU. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. **Cell** 74, 237-244, 1993.
- BACKER J. M., KAHN C. R., WHITE M. F.-Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor during insulin-stimulated internalization in rat hepatoma cells. **J. Biol. Chem.**, 264: 1694-1701, 1989.
- BENSKY A.S., KOTHADIA J.M., COVITZ W.- Cardiac effect of dexamethasone in very low birth weight infants. **Pediatrics**, 97: 818-821, 1996.
- BERNIER M., LAIRD D. M., LANE M. D. - Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 84: 1844-1848, 1987.
- CARO J.F., AMATRUDA J.M. - glucocorticoid-induced insulin resistance. **J. of Clinical Investigation**, 69: 866-875, 1982.
- CARPENTER C. L., CANTLEY I. C. - Phosphoinositide kinases. **Biochem.**, 29: 11147-11156, 1990.

CARPENTER J. L., PACCAUD J. P. BACKER J., GILBERT A., ORCI L., KAHN C.R. - Two steps of insulin receptor internalization depend on different domains of β -subunit. **J. Cell Biol.**, 122: 1243-1252, 1993.

CHEATAM B., KHAN C. R. - Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, 16: 117-142, 1995.

CHEATAM B., VLAHOS C. J., CHEATAM L., WANG L., BLENIS J., KAHN C.R. - Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol. Cel. Biol.**, 14: 4902-4911, 1994.

CUATRECASAS P. - Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. **Proc. Natl. cad. Sci. U.S.A.**, 69:1277-1281, 1972.

EBINA Y., ARAKI E., TAIRA M., SHIMADA F., MORI M., CRAIK C. S., SIDDLE K., PIERCE S. B., ROTH R. A., RUTTER W. J. - Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 84: 704-798, 1987.

FEHLMAN M., PERYRON J., SAMSON M., VAN OBBERGHEN E., BRANDENBURG D., BROSSETE N. - Molecular association between major histocompatibility complex class I antigen and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 82: 8634-8637, 1985.

FELIG P., BERGMAN M. - Integrated physiology of carbohydrate metabolism. In: Rifkin, H.; Porte, D., eds. - **Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus**. 4.ed.

Elsevier, New York, 1990.

FOLLI F., SAAD M. J. A., BACKER J. M., KAHN C. R. - Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, 267:22171-22177, 1992.

FREYCHET P., ROTH J., NEVILLE JR D.M.- Insulin receptor in the liver: Specific binding of [¹²⁵I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 68:1833-1837, 1971.

FRIEDENBERG G., KLAEBIN H.H., CORDERA R., OLEFSKY J. - Insulin receptor kinase activity in rat liver: regulation by fasting and high carbohydrate feeding. **J Biol. Chem.** 260:12444-12453, 1985.

HARING H., KIRSCH D., OBERMAIER B., ERMEL B., MACHICAO F. - Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro. **Biochem. J.**, 234:59-66, 1986.

KAHN C. R. -Current concepts of the molecular mechanism of the insulin action. **Annu. Rev. Med.**, 36: 429-451, 1985.

KAHN C.R., GOLDFINE I.D., NEVILLE D.M., DEMEYTS P.- Alterations in insulin binding induced by changes *in vivo* in the levels of glucocorticoids and growth hormone. **Endocrinology**, 103: 1054-1066, 1978.

KAO A.W., WATERS S.B., OKADA S., PESSIN J.E. insulin stimulates the phosphorylation of the 66- and 52-kilodalton Shc isoforms by distinct pathways. **Endocrinology**, 138, 6:2474-80, 1997.

- KASUGA M., HEDO J.A., YAMADA K. M., KAHN C.R. - Structure of insulin receptor and its subunits. **J. Biol. Chem.**, 257: 10392-10399, 1982a.
- KASUGA M., KARLSSON F.A., KAHN C.R. - Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 dalton subunits of its own receptor. **Science**, 215:185-187, 1982b.
- KASUGA M., ZICK Y., BLITHE D. L. CRETZ M., KAHN C. R. - Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, 298:667-669, 1982c.
- KATHURIA S., HARTMAN S., GRUNFELD C., RAMMACHANDRAN J., FUJITA YAMAGUCHI Y. - Differential sensitivity of two functions of the insulin receptor to associated proteolysis: Kinase action and hormone binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 83:8570-8574, 1986.
- KIRSCH D., KEMMLER W., HARING H.U. Cyclic AMP modulates insulin binding and induces post-receptor insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. **Biochem Biophys. Res. Comm.**, 115: 398-405, 1983.
- KNUTSON V.P. - The acute and chronic effect of glucocorticoids on insulin receptor and insulin responsiveness. Transient fluctuations in intracellular receptor level parallel transient fluctuations in responsiveness. **J. Biol. Chem.** 261: 10306-10312, 1986.
- LAVAN B.E., FANTIN V.R., CHANG E.T., LANE W.S., KELLER S.R., LIENHARD G.E.- A novel 160 kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. **J. Biol. Chem.**, 272:21403-21407, 1997.

- LAVAN B.E., LANE W.S., LIENHARD G.E.- The 60 kDa phosphotyrosine-protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **J. Biol. Chem.**, 272 (17): 11439-43, 1997.
- LEBRUN J.J., ALI S., SOFER L., ULLRICH A., and KELLY P.A. **J. Biol. Chem.** 269, 14021-14026, 1993.
- MAEGAWA H., KASHIWAGI A., FUJITA T., UGI S., HASEGAWA M., OBATA T., NISHIO Y., KOJIMA H., HIDAKA H., KIKKAWA R. - SHPTP2 serves as a adapter protein linking between Janus Kinase 2 and insulin receptor substrates. **Bio. and Bioph. Reserch Communication**, 228, 122-127.
- MARRERO M.B., SCHIEFFER B., PAXTON W.G., HEERDT L., BERK B.C., DELAFONTAINE P., and BERSTEIN K.E. Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. **Nature**, 375, 247-250, 1995.
- MOLLER D.E., FLIER J.S. - Insulin resistance-mechanisms, syndromes, and implications. **N. Engl. J. Med.**, 325:939-948, 1991.
- OKADA T., KAWANO Y., SAHIHARA T., HAZEKI O., UI M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with selective inhibitor wortmannin. **J. Biol. Chem.**, , 269: 3568-3573, 1994.
- OKAMOTO M., WHITE M.F., MARON R., KAHN C.R.- Autophosphorylation and kinase activity of insulin receptor in diabetic rats. **Am. J. Physiol.**, 251: E542-550.
- OLEFSKY J.M.- Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and

glucose oxidation of isolated rat adipocytes. **J. of Clinical Investigation**, 56: 1499-1508, 1975.

PENICAUD L., KANDE J., LE MAGNEN J.- Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp. **Am. J. Physiol.**, 249:E 514-518, 1985.

ROTH R.A., BEAUDOIN J. - phosphorylation of purified insulin receptor by cAMP kinase. **Diabetes**, 36: 123-126, 1987.

ROTHENBERG P.L., WHITE M.F., KAHN C.R. - The insulin receptor tyrosine kinase. In: Cuatrecasas P, Jacobs S, eds. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 92. Berlin: Springer-verlag, 209-243, 1990.

RUI H., KIRKEN R.A., and FARRAR W.L. Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. **J. Biol. Chem.** 269, 5364-5368, 1994.

SAAD M.J.A., CARVALHO C.R.O., THIRONE A.C.P., VELLOSO L.A. - Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of intact rat. **J Biol. Chem.**, 271:22100-22104, 1996.

SAAD M.J.A., HARTMANN L.G.C., CARVALHO D.S., GALORO C.A.O., BRENELLI S.L., CARVALHO C.R.O.- Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. **Endocrine**, 3: 755-759, 1995.

SANCHES-MARGALET V., GOLDFINE I. D., VLAHLOS C. J., SUNG C. K. - Role of the phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY294002. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 157: 140-145, 1994.

SHIER P., WATT V.M. - Primary structure of a putative receptor for a ligand of the

insulin family. **J. Biol. Chem.**, 264, 14605-14608, 1989.

SILVA L.A.C.V., CARVALHO C.R.O., SAAD M.J.A.- Effect of fasting on insulin signal in the aorta of intact rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, 29: 1611- 1615, 1996.

SKOLNIK EY, LEE CH, BATZER A, VICENTINI LM, ZHOU M, DALY R, MYERS MG, BACKER JM, ULLRICH A, WHITE MF, SCHLESSINGER J. The SH2/SH3 domain-containing protein Grb 2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS-1 and Shc: implication for insulin control of ras signalling. **EMBO J.** 12,1929-1936, 1993.

SMITH-HALL J., PONS S., PATTI M.E., BURKS D.J., YENUSH L., SUN X.L., KAHN C.R., WHITE M.F.- The 60 kDa receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. **Biochemistry**, 36(27): 8304-10, 1997.

STADMAUER L., ROSEN O.M. - Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of the insulin receptor. **J. Biol. Chem.**, 261:3402-3407, 1986.

SUN X. J., ROTHENBERG P. A., KAHN C. R. - Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 352: 73-77, 1991.

SUN X. J., WANG L. M., PATTI M. A., BRUNING J. C., HAAG B., JOHSON R. S., KAHN C. R. - Role of the IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337: 173-177, 1995.

SUN X.L., MIRALPEIX M., MYERS M.G. Jr., GLASHEEN E., BACKER J.M., KAHN C.R., WHITE M.F. - Expression and function of IRS-1 in signal transmission. **J. Biol.**

Chem., 2667: 26662-22672, 1992.

TAKATA Y., WEBSTER N. J. G., OLEFSKY J. M. - Mutation of the two carboxyl terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signaling properties. **J. Biol. Chem.**, 263:8912-8917, 1988.

TAKAYAMA S., WHITE M.F., KAHN C.R.- Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. **J. Biol. Chem.**, 263:3440-3477, 1988.

WHITE M. F., HARING H. U., KASUGA M., KAHN C. R. - Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified receptor from hepatoma cells. **J. Biol. Chem.**, 259:255-264, 1984.

WHITE M. F., SHOELSON S. E., KEUTMAN H., KAHN C. R. - A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the insulin receptor. **J. Biol. Chem.**, 263: 2969-2980, 1988.

WHITE M. F., SHOELSON S. E., KEUTMAN H., KAHN C. R. - Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, 260: 9470-9478, 1985.

WILDEN P.A., KAHN C. R., SIDDLE K., WHITE M. F. -Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic functions. **J. Biol. Chem.**, 267: 16660-16668, 1992.

WILKS A.F., HARPUR A.G., KURBAN R.R., RALPH S.J., ZURCHER G. AND ZIEMIECKI A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second

phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. **Mol. Cell. Biol.**, 11, 2057-2065, 1991.

WILSON G.F., KACZMAREK L.K. Mode-switching of a voltage-gated cation channel is mediated by a protein kinase A-regulated tyrosine phosphatase. **Nature**, 366, 433-438, 1993.

WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., SILVENNOINEN O., YI T., TANG B., MIURA O., and IHLE J.N. JAK2 associated with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. **Cell** 74, 227-236 1993.

YAMAUCHI K., MILARSKI K., SALTIEL A.R., PESSIN JF. - Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 92:664-668, 1995.

YAMAUCHI K., RIBON V., SALTIEL A.R., PESSIN JF.- Identification of the major SHPTP2-binding protein that is tyrosine-phosphorylated in response to insulin. **J. Biol. Chem.**, 270 (30):17716-17722, 1995.