CAMILA NOGUEIRA ALVES BEZERRA

**Identificação de proteínas que interagem com a
porção citoplasmática C-terminal do receptor
para Angiotensina II (AT1aR) em células de
tecido renal**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Amaral
Rebouças

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Camila Nogueira Alves

Identificação de proteínas que interagem com a porção citoplasmática C-terminal do receptor para angiotensina II (AT1aR) em células de tecido renal / Camila Nogueira Alves Bezerra. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Nancy Amaral Rebouças.

Descritores: 1.Angiotensina II 2.Receptor tipo 1 de angiotensina 3.Endocitose
4.Proteínas de choque térmico

USP/FM/DBD-355/10

***“Aos meus pais, por nunca terem
medido esforços para a formação
moral e intelectual de seus filhos. Por
serem o meu porto seguro. Por
simplesmente existirem.”***

***“Aos meus irmãos por
nunca me deixarem esquecer o
quanto é bom ter família.”***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, chefe e amiga Nancy Rebouças por todo o incentivo e oportunidades que me proporciona. Pela liberdade de trabalho que sempre me permitiu. Pelo convívio harmônico, amigável e de muito respeito. Por contribuir imensamente com meu crescimento pessoal e intelectual. Por ser um exemplo de inteligência e competência. Registro aqui toda a minha admiração e gratidão!

Aos amigos e companheiros de laboratório Pedro, Mara e Gabi pela ótima convivência. Pela colaboração no bom funcionamento do laboratório. Pelas conversas divertidas e por acreditarem no meu trabalho.

À amiga Thaíssa Pessoa pela ajuda na manipulação dos animais, por ser sempre solícita e pelos cafés da tarde.

Especial à amiga Elida Neri pelo enorme companheirismo, por ser meu “braço direito” no laboratório. Por todo apoio dispensado que precisei nos momentos de dedicação a esse trabalho. Pela ajuda com as figuras do *paper*. Por ser uma ótima companhia!

Ao amigo mais que especial Eduardo Rebelato pela formatação final do texto, re-elaboração das figuras, pelas discussões e contribuições. Pelo incentivo e paciência. Por todo o carinho, companheirismo, amizade e confiança. Por ser uma pessoa com quem sei que poderei contar por toda a minha vida!

Ao amigo Fernando pela frequente disponibilidade em ajudar, pelas correções de textos e pelas agradáveis conversas. Por acreditar na minha capacidade. Pela amizade e carinho!

A pós-doutora do Instituto Butantã Gisele Pidde, pela contribuição técnica no trabalho. Pelos protocolos e dicas que ajudaram a chegar aos resultados alcançados.

Ao Prof. Dr. Rui Curi pela disponibilização do espaço e dos equipamentos para a realização dos experimentos de eletroforese bidimensional.

“É preciso que o discípulo da sabedoria tenha o coração grande e corajoso. O fardo é pesado e a viagem longa.”

Confúcio

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema Renina Angiotensina	1
1.2 Papel da Angiotensina II na Regulação do Transporte Tubular	5
1.3 Receptor de Angiotensina II Tipo 1 (AT1R)	6
1.3.1 Principais Vias de Sinalização Relacionadas à Ligação de Angiotensina II ao Receptor AT1 nos Rins	8
1.3.2 Localização de AT1R nos Rins	11
1.3.3 AT1R na Membrana Nuclear	11
1.3.4 Mecanismos de Dessensibilização e Endocitose Relacionados ao Receptor AT1	12
1.3.5 Importância da Porção Citoplasmática de AT1R na sua Internalização	15
1.3.6 Diferenças Funcionais Entre Receptores AT1 Expressos em Membrana Apical e Basolateral de Células de Túbulos Proximais	19
1.3.7 Proteínas que Interagem com a Cauda C-Terminal de AT1R nos Rins	22
2 OBJETIVO	26
3 MÉTODOS	28
3.1 Obtenção do Constructo AT1aR-GST	28
3.1.1 Extração de RNA de Córtex Renal de Ratos	28
3.1.2 Síntese de cDNA	30
3.1.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) para AT1aR	31
3.1.4 Clonagem do Fragmento no Vetor pGEX-6P-2	33
3.1.5 Purificação do Produto de PCR e Digestão com EcoRI e XhoI	34
3.1.6 Reação de Ligação	35
3.1.7 Obtenção de Células Competentes	36
3.1.8 Transformação do Constructo em <i>E. COLI</i> top 10	37
3.1.9 PCR das Colônias para Confirmação da Inserção do Fragmento de DNA	38
3.1.10 Sequenciamento de AT1-GST + pGEX-6P-2	39
3.1.11 Transformação do Constructo em <i>E. coli</i> BL21	40
3.2 Indução da Expressão da Proteína de Fusão	41

3.2.1 Teste Enzimático para Detecção da Atividade de GST	41
3.2.2 Teste de Tempo de Indução com IPTG.....	43
3.2.3 Teste de Concentração de IPTG e Temperatura de Indução	45
3.3 Purificação da Proteína de Fusão	46
3.3.1 Quantificação das Proteínas Ligadas a Resina	49
3.3.2 Eluição com Glutathione Reduzida.....	50
3.4 Ligação com Proteínas de Membranas Totais (GST Pull-Down Assay)	51
3.4.1 Extração de Proteínas de Membranas Totais de Córtex Renais ..	52
3.5 Eletroforese Bidimensional (EF2D)	55
3.5.1 Eluição das Proteínas da Resina para EF2D	55
3.5.2 Reidratação das Tiras de Gel com Gradiente de pH.....	56
3.5.3 Focalização Isoelétrica	56
3.5.4 Segunda Dimensão.....	59
3.5.4.1 Equilíbrio das Fitas de Gradiente de pH.....	59
3.5.4.2 Eletroforese Vertical	60
3.5.4.3 Coloração dos Géis	61
3.5.5 Identificação dos Spots de Proteína.....	61
3.5.6 Ensaio de <i>Western Blot</i>	62
3.5.7 <i>Western Blot</i> Após GST Pull-Down Assay.....	64
3.5.8 Co-Imunoprecipitação	66
4 RESULTADOS	69
4.1 Identificação dos Spots de Proteína.....	69
4.1.1 Resultado da Análise dos Spots por Espectrometria de Massas..	72
4.2 Confirmação das Interações in vitro.....	73
4.2.1 <i>Western Blot</i> para as Proteínas a Serem Analisadas em Tecido Renal	73
4.2.2 <i>Western Blot</i> das Proteínas que Interagem com a Proteína de Fusão.....	74
4.3 Confirmação das Interações in vivo	76
4.3.1 Co-Imunoprecipitação	76
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	85
7 BIBLIOGRAFIA	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cascata clássica de formação da Angiotensina II e os locais de produção dos seus componentes.....2
- Figura 2.** Comparação entre o Sistema Renina Angiotensina Clássico e o Sistema mais atualizado com seus novos peptídeos (Ang III, Ang IV e Ang (1-7)), enzimas (Aminopeptidase A e M, ACE2) e receptores (AT4 e Mas).....4
- Figura 3.** Representação esquemática de um Receptor Acoplado a Proteína G (GPCR) com seus 7 domínios (hélices) transmembrânicos (7TM), alças adjacentes (EC e IC), domínios intracelulares (Ct) e extracelulares (Nt).....8
- Figura 4.** Principais vias de sinalização relacionadas a ligação de Angiotensina II ao receptor AT1 nos rins.....10
- Figura 5.** Representação do mecanismo de endocitose ligados a formação de vesículas revestidas de clatrina (*Clathrin-coated pits*). Passos da internalização: 1) ativação do receptor, 2) fosforilação por GRK e ligação de β -arrestina, 3) dessensibilização, 4) associação a clatrina e proteínas adaptadoras (AP-2) com formação das vesículas, 5) tráfego para endossomos, 6) desfosforilação por fosfatases, 7) reciclagem para a membrana plasmática e 8) resensibilização.....13
- Figura 6.** Micrografia eletrônica de células epiteliais neuronais mostrando a participação da dinamina na endocitose.....14
- Figura 7.** Micrografia Eletrônica de células endoteliais mostrando a caveola e ao lado um esquema representando uma invaginação característica da caveola e os componentes geralmente encontrados (caveolina, fosfolipídeos, esfingolipídeos e colesterol).....15

Figura 8. Receptor para Ang II com os sete domínios transmembrânicos, a porção N-terminal extracelular, alças intra e extracelulares e a cauda C-terminal intracelular destacada.....	17
Figura 9. Sequência de aminoácidos do receptor AT1a com os principais sítios de regulação na cauda C-terminal do receptor, referenciada abaixo pelos diversos trabalhos publicados.....	18
Figura 10. Imuno-histoquímica de tecido renal com anticorpo monoclonal para AT1Ra. Marcação positiva em túbulos proximais (PT), túbulos distais (DT) e ducto conector (CT).....	19
Figura 11. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.....	30
Figura 12. Estratégia utilizada para o desenho <i>primers</i> para AT1aR.....	32
Figura 13. Gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo.....	33
Figura 14. Vetor de expressão pGEX-6P-2 e os genes contidos em sua sequência: promotor tac, repressor lac, sítios de clivagem para enzimas de restrição (multiple cloning site) e a sequência codificante para a proteína GST.....	34
Figura 15. Quantificação de AT1aR e pGEX-6P-2 em gel de poliacrilamida 8% utilizando marcador de massa e peso molecular.....	35
Figura 16. PCR de colônia para AT1aR.....	39
Figura 17. Eletroferograma obtido da análise do sequenciamento do constructo pGEX-6P-2-AT1R no ABI310.....	40
Figura 18. Representação da proteína de fusão obtida: glutathione-S-transferase (GST), sítio para enzima <i>Precision protease</i> (PP), AT1aR (porção C-terminal).....	41

Figura 19. Reação enzimática entre CDNB e glutathione (GSH) para detecção da expressão de GST.....	42
Figura 20. Leitura da atividade de GST (D.O. X Tempo).....	43
Figura 21. Teste de Tempo de Indução com IPTG.....	45
Figura 22. Gel de poliacrilamida para visualização da ligação das proteínas GST e AT1R-GST a resina de glutathione sefarose.....	49
Figura 23. Curva padrão de BSA.....	50
Figura 24. SDS-PAGE 12% corado com prata.....	51
Figura 25. Esquema do experimento de interação entre proteínas.....	54
Figura 26. Gráfico do protocolo de voltagem obtido durante a focalização isoeletrica das tiras de gradiente de pH 3-10, 7cm.....	58
Figura 27. Perfil da proteína de fusão obtida e determinação do ponto isoeletrico de GST-AT1.....	59
Figura 28. Esquema geral de eletroforese bidimensional.....	60
Figura 29. Estratégia utilizada para confirmação dos resultados de interação obtidos por espectrometria de massas.....	65
Figura 30. Esquema do experimento de co-imunoprecipitação.....	66
Figura 31. Gel correspondente a GST-AT1aR incubada com proteínas de membranas totais de córtex renal.....	70
Figura 32. Gel correspondente a GST-AT1aR sem incubação com proteínas de membranas totais de córtex renal.....	71
Figura 33. Gel correspondente a GST incubada com proteínas de membranas totais de córtex renal.....	71

Figura 34. da expressão das proteínas DPPIV, GRP78, HSC70, ATP síntase subunidade beta, ATP síntase subunidade alpha e actina como controle interno.....	73
Figura 35. <i>Western blot</i> para proteínas identificadas pelo sequenciamento dos <i>spots</i> visualizados após EF2D e anti-GST como controle da quantidade de proteína imobilizada na resina de glutationa sefarose.....	75
Figura 36. Co-imunoprecipitação (IP: AT1R; WB: HSP/HSC70). Anticorpo anti-AT1aR imobilizado em resina proteína A, incubado com proteína de membranas totais de córtex renal e transferido para membrana PVDF. Membrana incubada com anti-HSP/HSC70.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais diferenças funcionais relacionadas aos receptores AT1 expressos em membrana apical e basolateral.....	22
Tabela 2 - Proteínas que interagem com a porção C-terminal de AT1aR identificadas até o momento com expressão renal.....	24
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR para β -actina de rato.....	31
Tabela 4 - <i>Primers</i> para C-terminal de AT1aR de rato.....	32
Tabela 5 - Reações de ligação para a obtenção do constructo PGEX-6P-2 + GST-AT1.....	36
Tabela 6 - <i>Primers</i> para sequenciamento em pGEX.....	39
Tabela 7 - Genótipo das bactérias utilizadas.....	40
Tabela 8 - Anticorpos utilizados nos experimentos de <i>western blotting</i>	63
Tabela 9 - Identificação por espectrometria de massa de possíveis proteínas associadas à cauda C-terminal de AT1R.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	-	adenilato ciclase
ADH	-	hormônio antidiurético
AGT	-	angiotensinogênio
AMPC	-	adenosina monofosfato cíclico
Ang 1-7	-	Angiotensina 1-7
Ang 1-9	-	Angiotensina 1-9
Ang I	-	Angiotensina I
Ang II	-	Angiotensina II
Ang III	-	Angiotensina 2-8
Ang IV	-	Angiotensina 3-8
APA	-	aminopeptidase A
APM	-	aminopeptidase M
AQ2	-	aquaporina 2
ARAP	-	<i>Type 1 Ang II receptor-associated protein</i>
AT1aR	-	receptor de angiotensina II do tipo 1 isoforma a
AT1bR	-	receptor de angiotensina II do tipo 1 isoforma b
AT1R	-	receptor de angiotensina II do tipo 1
AT2R	-	receptor de angiotensina II do tipo 2
AT4R	-	receptor de angiotensina 3-8 do tipo 4
ATP	-	adenosina trifosfato
ATRAP	-	<i>AT1-receptor-associated protein</i>
BSA	-	albumina sérica bovina
CDNB	-	1- cloro- 2,4 dinitrobenzeno
C-terminal	-	carboxi-terminal
DEPC	-	<i>diethylpyrocarbonato</i>
DPPIV	-	dipetidil peptidase IV
ECA	-	enzima conversora de angiotensina
ECA2	-	enzima conversora de angiotensina 2
EF2D	-	eletroforese bidimensional
EGFR	-	receptor para o fator de crescimento epitelial
FAK	-	cinase de adesão focal

GAK	-	<i>cyclin-G-associated kinase</i>
GIPs	-	<i>GPCR interacting proteins</i>
GIT	-	isotiocianato de guanidina
GLP	-	<i>Guanine nucleotide exchanger factor-like protein</i>
GPCRs	-	receptores acoplados a proteína G
GRKs	-	cinases de receptores acoplados a proteína G
GRP78	-	<i>glucose related protein</i>
GST	-	glutathione s-transferase
HAD	-	Hormônio Antidiurético
HSC70	-	<i>heat shock cognate 71kDa protein</i>
HSP70	-	<i>heat shock 72kDa protein</i>
IGF-I	-	fator de crescimento semelhante a insulina 1
IPTG	-	isopropil tio-β-D-galatosídeo
IRAP	-	aminopeptidase regulado por insulina
kDa	-	quilo daltons
LB	-	Luria-Bertani
MAS	-	receptor de angiotensina 1-7
NHE3	-	isoforma 3 do trocador Na ⁺ /H ⁺
NHERF	-	Na ⁺ /H ⁺ <i>exchanger regulatory factor</i>
N-terminal	-	amino-terminal
OK	-	<i>opossum kidney</i>
PAO	-	<i>phenylarsine oxide</i>
PCR	-	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR	-	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDVF	-	<i>polyvinylidene fluoride</i>
PI	-	ponto isoelétrico
PKA	-	proteína quinase A
PKC	-	proteína quinase C
PLA ₂	-	fosfolipase A2
PLC	-	fosfolipase C
PLC	-	fosfolipase C
PLC _γ	-	fosfolipase C _γ

PTH	-	paratormônio
PTH1R	-	receptor para o hormônio da paratireóide
SRA	-	sistema renina angiotensina

Bezerra, CNA. Identificação de proteínas que interagem com a porção citoplasmática C-terminal do receptor para Angiotensina II (AT1aR) em células de tecido renal. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 95p.

RESUMO

O receptor para Angiotensina II tipo 1 (AT1R) é expresso tanto em membrana apical quanto basolateral dos túbulos proximais renais. Embora haja evidências de diferenças funcionais entre receptores apicais e basolaterais, como, por exemplo, a dependência do processo de internalização de receptores apicais, mas não de basolaterais, para a efetivação dos efeitos fisiológicos da Angiotensina II, os mecanismos envolvidos na determinação dessas diferenças não são conhecidos. Alguns trabalhos já evidenciaram a importância da porção c-terminal do receptor AT1 na sua internalização. Desta forma, com o intuito de identificar proteínas de membrana que possam interagir com tal região, foi feita a clonagem do fragmento de DNA correspondente a esta no vetor pGEX-6P-2. O produto da transcrição e tradução do gene foi uma proteína de fusão (GST-AT1aR) que possui em torno de 35kDa, a qual foi imobilizada em resina de glutationa sefarose e incubada com proteínas de membranas totais de córtex renal de ratos (GST *pull-down assay*). As amostras foram submetidas à Eletroforese Bidimensional, onde identificamos seis *spots* correspondentes a proteínas que interagem especificamente com a proteína de fusão, mas não com GST. Estes *spots* foram recortados e analisados por espectrometria de massa. Cinco diferentes proteínas foram identificadas como provavelmente associadas ao receptor AT1aR: ATP sintase subunidade beta, ATP sintase subunidade alfa mitocondrial, GRP78 (*heat shock protein* de 78kDa regulada por glicose), HSC70 (*heat shock protein* de 71kDa) e dipeptidil peptidase 4 (DPPIV). Experimentos subsequentes de GST *pull-down* e *western blotting* para as proteínas encontradas, confirmaram interação da cauda C-terminal do receptor com as proteínas ATP sintase subunidade beta, HSC70 (*heat shock protein* de 71kDa) e GRP78 (*heat shock protein* de 78kDa regulada por glicose). No entanto, nos estudos de co-imunoprecipitação foi possível confirmar apenas a interação com HSC70, um membro da família HPS70, uma *heat shock protein*. HSP são também chamadas de chaperonas por estarem envolvidas no dobramento correto de proteínas recém sintetizadas, no redobramento de proteína desnaturadas ou dobradas incorretamente e na degradação de proteínas com danos irreparáveis. No entanto, trabalhos recentes descrevem novos papéis para esta proteína, como a participação em processos de tráfego protéico entre compartimentos intracelulares, reciclagem de proteínas para a membrana plasmática e endocitose mediada por clatrina. Novos estudos serão necessários para se determinar a função fisiológica da interação de HSC70 com a cauda citoplasmática do receptor AT1 e ainda, se essa associação estaria envolvida nas diferenças funcionais observadas quando esse receptor é expresso em membrana apical ou basolateral.

Descritores: Angiotensina II; receptor para Angiotensina tipo 1; endocitose; proteínas de choque térmico.

Bezerra, CNA. Identification of binding-partners interacting with the intracellular c-terminal domain of the angiotensin II receptor AT1aR in rat renal tissue. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 95p.

SUMMARY

The angiotensin II receptor type 1 (AT1R) is expressed in both apical and basolateral membranes in the renal proximal tubules. Although there are evidences that they have functional differences, such as the dependence on internalization for apical, but not basolateral, receptors to trigger physiological effects of angiotensin II, the mechanisms of this peculiar behavior are not clear. The carboxy-terminal tail of the AT1 receptor was shown to be involved in its internalization. Thus, in order to identify possible AT1R c-terminal interacting proteins, we have inserted the cDNA coding the last 53 amino acids of the C-terminus into pGEX-6P-2 vector. The gene translation product was a fusion protein (GST-AT1aR) weighting approximately 35 kDa which was immobilized on Glutathione Sepharose resin and incubated with rat renal cortex total membrane proteins (GST pull-down assay). The samples were then subjected to two dimensional gel electrophoresis. We identified six protein spots that specifically interacted with GST-AT1aR. These spots were cut and analyzed by mass spectrometry. Five different proteins were identified as probably associated with AT1aR, ATP synthase beta subunit, ATP synthase alpha subunit, GRP78 (glucose regulated protein of 78kDa), HSC70 (Heat shock cognate 71kDa protein) and dipeptidyl peptidase 4 (DPPIV). The interaction with ATP synthase beta subunit, HSC70 and GRP78 was confirmed by GST pull-down and western blotting. However, immunoprecipitation of total protein of renal cortex followed by immunoblotting only confirmed the interaction with HSC70. This protein is a member of the Heat Shock Proteins family HSP70 also called chaperones, because their involvement in correct folding of newly synthesized proteins, refolding of partially denatured or misfolded proteins, and in protein degradation of irreparably damaged proteins. Recent studies have described new roles for HSC70, such as the participation in protein trafficking between intracellular compartments, recycling of proteins to the plasma membrane and endocytosis mediated by clathrin. Further studies are necessary to determine the physiological role of this interaction and whether this association is involved in the functional differences observed regarding the activation of the receptor in apical or basolateral membranes.

Decriptors: Angiotensin I; Angiotensin II receptor type 1; endocytosis; heat shock proteins.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina Angiotensina

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é uma cascata multi-enzimática, cujo principal substrato é a α -glicoproteína circulante angiotensinogênio (AGT), que regula a resistência vascular e o volume dos fluidos corporais. Classicamente, o SRA é conhecido por sua natureza sistêmica, sendo seus componentes sintetizados em órgãos distintos. O Angiotensinogênio circulante é derivado principalmente de sua síntese no fígado. A enzima responsável pela proteólise do angiotensinogênio é a renina, uma protease de aspartil produzida no aparelho justaglomerular dos rins, particularmente nas células musculares lisas das arteríolas aferentes, que são os sítios de síntese e armazenamento. São três os principais fatores para o estímulo da secreção de renina pelas células justaglomerulares: a queda na pressão de perfusão renal que é detectada pela arteríola aferente, a ativação das fibras nervosas simpáticas que inervam a arteríola aferente e a redução na carga de NaCl liberada para a mácula densa. Desta forma, as concentrações plasmáticas de renina podem ser alteradas em resposta a mudanças na pressão sanguínea e no balanço de sal.

A proteólise do angiotensinogênio pela renina resulta na formação da Angiotensina I, um decapeptídeo sem ação fisiológica conhecida que tem dois aminoácidos clivados de sua porção carboxi-terminal (C-terminal) pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) para a formação da Angiotensina

II (Ang II). A ECA é ubiquamente expressa na superfície de células endoteliais, porém é particularmente abundante nos pulmões, intestino, placenta e nas membranas de borda em escova dos rins. A Angiotensina II então formada será o principal efetor do sistema no controle do volume do fluido extracelular, da pressão sanguínea e do balanço eletrolítico. Dentre os principais efeitos fisiológicos para essa regulação está o estímulo da secreção de Aldosterona pelo córtex da adrenal, vasoconstrição arteriolar, estímulo de centros da sede no cérebro, secreção de Hormônio Antidiurético (HAD) e ativação de transportadores relacionados à reabsorção de Na^+ nos rins. Estas ações estão ligadas principalmente a interação da Ang II ao seu receptor do tipo 1 (AT1R). A **Figura 1** ilustra esquematicamente a cascata de formação da Angiotensina II e os locais de produção dos seus componentes, sob a visão clássica do Sistema Renina Angiotensina.

Figura 1. Cascata clássica de formação da Angiotensina II e os locais de produção dos seus componentes (Fonte: <http://pharmamotion.com.ar/>).

No entanto, este sistema tem se mostrado muito mais complexo. Outros peptídeos com ações biológicas e outros receptores foram identificados, como a Angiotensina 2-8 (Ang III). Ang III é gerada a partir da Ang II pela Aminopeptidase A (APA) e tem ações similares às da Ang II, via receptores AT1 e AT2, mas parece estar mais relacionada à liberação de vasopressina (1). Há ainda, a Angiotensina 3-8 (Ang IV), gerada a partir da Ang III por ação da Aminopeptidase M (APM) e que exerce suas ações via receptor próprio chamado AT4, mas que parece ser o receptor para aminopeptidase regulada por insulina (IRAP), que não é um GPCR (2). Finalmente, a Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) que por muito tempo acreditou-se não ter ações biológicas, porém teve sua importância reconhecida com a descoberta da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) que é encontrada principalmente nas células endoteliais vasculares do rim, coração, hipotálamo, parede da aorta e testículo. Esta carboxipeptidase cliva um resíduo da Ang I para gerar a Ang 1-9 e um resíduo da Ang II para gerar a Ang 1-7 (3;4). A Ang 1-7 exerce ações opostas às da Ang II ao se ligar ao seu receptor (Mas), como vasodilatação e efeitos antitróficos, aparentemente contrabalançando as diversas ações da Ang II (**Figura 2**).

Figura 2. Comparação entre o Sistema Renina Angiotensina Clássico e o Sistema mais atualizado com seus novos peptídeos (Ang III, Ang IV e Ang (1-7)), enzimas (Aminopeptidase A e M, ECA2) e receptores (AT₄ e Mas). Fonte: modificado de M Kurdi, 2005 (5).

Nas últimas três décadas tem ficado cada vez mais claro que a Ang II pode ser gerada não apenas de modo sistêmico, mas também ser produzida e ter ação localizada em tecidos específicos. (6). O SRA local foi identificado em vários dos órgãos incluindo os rins, vasos, coração, glândula adrenal, olhos, testículos e cérebro (7-9).

Estudos prévios utilizando técnicas como *Northern blotting*, hibridização *in situ* e PCR em tempo real, confirmam que o túbulo proximal renal contém o

SRA completo e parece ser o principal sítio para a síntese local de Ang II (10-12). Essa produção renal localizada de Ang II foi também demonstrada diretamente nos túbulos proximais utilizando técnica de micropunção (13). Além da presença de todos os componentes do sistema, também foi demonstrada a expressão dos receptores AT1 e AT2 nos túbulos proximais (14;15), o que sugere a existência de um sistema local totalmente ativo. A formação de Ang II nos tecidos também está associada à enzima quimase, uma via alternativa à ECA de clivagem da Ang I que parece estar ativa principalmente em certas condições patológicas como aterosclerose de paredes arteriais (16). Mais recentemente foram observadas evidências da existência de um SRA intracelular (17), caracterizado pela presença dos componentes da cascata dentro da célula e dessa forma, a síntese de Ang II pode ocorrer também em um sítio intracelular. Uma nova visão ampliada do sistema, portanto, confere a este além de função endócrina, também parácrina e intrácrina (18).

1.2 Papel da Angiotensina II na Regulação do Transporte Tubular

O controle do sódio corporal é mediado pelos efeitos pró-absortivos da Ang II e da Aldosterona em túbulos proximais e néfron distal, respectivamente. Em túbulos proximais, Ang II aumenta a atividade de NHE3 (isoforma 3 do trocador Na^+/H^+), pelo menos em parte, por estimular a inserção deste transportador na membrana apical, um efeito que requer a integridade do citoesqueleto (19).

A isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) é a mais importante para a reabsorção de Na^+ em túbulos proximais renais (20;21). Análises de sensibilidade a inibidores sugerem que praticamente toda a atividade de troca Na^+/H^+ na membrana de borda em escova de túbulos proximais é mediada por NHE3 (22). Cerca de 67% do sódio filtrado é reabsorvido em túbulos proximais e 75% dessa reabsorção depende direta ou indiretamente da troca de Na^+ por H^+ (23). Considerando a importância quantitativa desse mecanismo de transporte, mudanças, ainda que discretas, na atividade do mesmo podem ter impacto sobre a reabsorção de NaHCO_3 (24) e NaCl em túbulos proximais, com conseqüências para a homeostase de volume e ácido-base, ou ainda sobre o transporte de íons em néfron distal, o qual é significativamente afetado pela carga desses sais que é liberada para esses segmentos.

Nos túbulos distais também há modulação de transportadores de íons pela Ang II, evidenciando seu papel fundamental na reabsorção de sódio nos rins (25-28).

1.3 Receptor Tipo 1 para Angiotensina II (AT1R)

Os principais efeitos fisiológicos da Ang II são mediados pela sua ligação ao receptor AT1. São descritos pelo menos três receptores para Ang II, que em células de mamíferos liga-se com alta afinidade a dois tipos de receptores, AT1 e AT2, que compartilham 30% de identidade na sequência de aminoácidos. Em humanos há apenas um tipo de receptor AT1, enquanto

em roedores foram identificados dois subtipos (AT1a e AT1b) (29). Essas duas isoformas são diferentemente expressas nos tecidos, sendo que AT1a é predominantemente expressa na musculatura lisa vascular, fígado, pulmão e rins e AT1b é mais expressa nas glândulas adrenal e pituitária, sendo muito baixa a expressão renal (30). Ambos são constituídos de 359 aminoácidos, com 96% de identidade e não foi observada nenhuma diferença evidente no que se refere à afinidade ao ligante. Experimentos com camundongos *knockout* para AT1a permitiram concluir que a vasoconstrição causada pela Ang II nas arteríolas aferentes é mediada pelas duas isoformas de AT1, no entanto na eferente parece ser mediada somente por AT1a (31). O efeito da Ang II sobre a reabsorção de Na⁺ em túbulos proximais é bloqueado por inibidores dos receptores AT1a/b, como o losartan (29;32). Os efeitos da ligação de Ang II ao AT2R são antagônicos aos de AT1Ra/b e pouco têm sido explorados em túbulos proximais.

Os receptores AT1 e AT2 são membros da superfamília de Receptores Acoplados a Proteína G (GPCRs) que consiste na maior família de receptores de membrana. De acordo com a classificação filogenética dos GPCRs, os receptores para Ang II fazem parte da Família *Rhodopsin*, ou também chamada de 1 ou A. Todos os GPCRs têm como característica comum serem constituídos por 7 domínios transmembrânicos hidrofóbicos que são conectados por 3 alças intracelulares e 3 alças extracelulares, um domínio amino-terminal (N-terminal) extracelular e um domínio C-terminal intracelular. Cada uma das 7 regiões transmembrânicas é composta por volta de 20 a 27 aminoácidos, enquanto que os domínios N-terminal, C-

terminal e as alças podem variar muito de tamanho de acordo com o subtipo do GPCR (33) (**Figura 3**). A porção C-terminal do AT1aR é composta por 53 aminoácidos, o que confere a ela um tamanho de aproximadamente 6 kDa, sendo que o receptor completo possui 41 kDa.

Figura 3. Representação esquemática de um Receptor Acoplado a Proteína G (GPCR) com seus 7 domínios (hélices) transmembrânicos (7TM), alças adjacentes (EC e IC), domínios intracelulares (Ct) e extracelulares (Nt) Fonte: Oliveira, 2007 (34).

1.3.1 Principais Vias de Sinalização Relacionadas à Ligação de Angiotensina II ao Receptor AT1 nos Rins

A principal ação dos GPCRs é transmitir informações mediadas por estímulos provenientes do meio extracelular pela geração de mensageiros

intracelulares, via ativação da proteína G heterotrimétrica e a subsequente regulação de uma variedade de sistemas efetores. A ligação do agonista ao receptor leva a uma mudança conformacional das alças intracelulares, o que determina a ligação das proteínas G. Essa interação com diferentes proteínas G determina a ativação de maquinarias específicas de transdução de sinal.

Nos rins, a ligação da Ang II ao seu receptor AT1 leva à ativação de proteína G_i seguida pela inibição da adenilato ciclase (AC), diminuição dos níveis de AMPc e aumento da atividade de NHE3, o qual é inibido por fosforilação mediada pela proteína cinase A (PKA) (35). A ativação de AT1 resulta também em ativação de proteínas $G_{q/11}$ e PLC com aumento da produção de IP3 e ativação de proteína cinase C (PKC) (36), mas não está claro se esse fenômeno relaciona-se com a ativação de NHE3. Na linhagem de células de túbulos proximais de porco LLC-PK expressando AT1R de coelho (LLC-PK-AT1R), Ang II (10^{-7} M) ativa fosfolipase A2 (PLA₂) e aumenta produção de ácido araquidônico, e isso está associado à diminuição da atividade de NHE3. O inibidor da PLA₂ independente de Ca^{2+} (HELSS) abole a inibição de NHE3 por Ang II (37).

Um avanço relativamente recente no campo da sinalização de Ang II via AT1R foi a descoberta de que além da sinalização através de proteínas G, a ligação de Ang II a AT1 também promove a fosforilação de receptores tirosina cinase (PDGFR, EGFR e IGF-I) com ativação de MAPK, outras proteínas tirosina cinases que não são receptores (PLC γ , família de cinases *Src*, cinase de adesão focal (FAK)) e ativação da via JAK/STAT (38). Isso

confere a Ang II, além dos efeitos bem conhecidos na vasoconstrição e reabsorção de sódio, efeitos mitogênicos e pró-inflamatórios, agindo também como potente fator de crescimento, promovendo proliferação celular, sendo inclusive relacionada ao desenvolvimento renal (39). A **Figura 4** ilustra as principais vias de sinalização associadas à ligação de Ang II a AT1R e seus efeitos nos rins.

Figura 4. Principais vias de sinalização relacionadas a ligação de Angiotensina II ao receptor AT1 nos rins. Fonte: Modificado de Dinh, 2001 (40).

1.3.2 Localização de AT1R nos Rins

Estudos utilizando imuno-histoquímica para AT1R mostraram que ele está associado a estruturas tubulares e vasculares por todo o rim, com maior marcação nos vasos corticais e no segmento S3 dos túbulos proximais (41). Um trabalho utilizando Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal para AT1R também mostrou marcação em arteríola aferente, artéria interlobular e arqueada, assim como células mesangiais, túbulo proximal (membrana apical e basolateral), mácula densa, túbulos distais (membrana apical e basolateral) e ducto coletor (42). Por meio da técnica de PCR, mRNA de AT1R encontrado nos glomérulos, artéria arqueada, arteríolas aferentes e vasos retos descendentes medulares (43).

1.3.3 AT1R na Membrana Nuclear

Receptores AT1 também estão presentes na membrana perinuclear ou são translocados para lá após a sua internalização. A ligação de AngII a receptores nucleares ocorre em túbulos proximais e está associada ao aumento da transcrição de alguns genes, entre eles TGF-beta e NHE3 (44). A AngII que se liga a esses receptores pode ser proveniente de produção intracelular ou de complexos AT1R/AngII endocitados. Em endossomos, há desligamento do ligante do receptor e este pode ou não ser degradado (44). Além da localização nuclear de AT1R estimulada por Ang II, também foi observada a clivagem da porção C-terminal citoplasmática, estimulada pelo

ligante e a translocação do fragmento liberado com 6 kDa para o núcleo (45).

1.3.4 Mecanismos de Dessensibilização e Endocitose Relacionados ao Receptor AT1

A dessensibilização do receptor é um mecanismo fisiológico que impede a sua hiperestimulação crônica e ocorre como consequência do desacoplamento da proteína G em resposta a fosforilação por proteínas cinases dependentes de segundo mensageiro ou cinases de receptores acoplados a proteína G (GRKs) (46).

A fosforilação mediada por GRK promove a ligação de β -arrestinas, o que não somente desacopla a proteína G, como também direciona muitos GPCRs para a internalização em vesículas revestidas de clatrina (*clathrin-coated pits*) (**Figura 5**). A maioria dos dados disponíveis a respeito da dessensibilização e consequente endocitose de AT1 indicam que esta ocorre principalmente por este mecanismo (47), embora estudos recentes mostrem inúmeros mecanismos de endocitose relacionados a este receptor.

Figura 5. Representação do mecanismo de endocitose ligados a formação de vesículas revestidas de clatrina (*Clathrin-coated pits*). Passos da internalização: 1) ativação do receptor, 2) fosforilação por GRK e ligação de β -arrestina, 3) desensibilização, 4) associação a clatrina e proteínas adaptadoras (AP-2) com formação das vesículas, 5) tráfego para endossomos, 6) desfosforilação por fosfatases, 7) reciclagem para a membrana plasmática e 8) resensibilização. Fonte: Modificado de Sorkin, 2002 (48).

A finalização da formação da vesícula endocítica se dá com a fissão da membrana plasmática. A proteína envolvida nesse desprendimento é conhecida como dinamina, uma grande GTPase de 100kDa que apresenta 3 isoformas em vertebrados, sendo a dinamina-2 expressa ubiquamente (**Figura 6**). Apesar de Hunyady et al. terem demonstrado a importância da dinamina e da β -arrestina na endocitose de AT1 em células CHO e COS-7 tratadas com concentrações fisiológicas de Ang II (49), o mecanismo independente dessa proteína também já foi descrito (50). No entanto, muitas discrepâncias existem a respeito destes mecanismos que muitas vezes são

explicadas pela diferença de linhagens celulares utilizadas nos experimentos.

Figura 6. Micrografia eletrônica de células epiteliais neuronais mostrando a participação da dinamina na endocitose (setas pretas) Fonte: Urrutia, 1997 (51).

Um possível mecanismo mediado por caveola também foi sugerido quando se demonstrou a internalização de AT1 independente de β -arrestina e dinamina em células HEK 293 (50). As caveolas são invaginações em forma de garrafa que constituem regiões especializadas da membrana plasmática ricas em esfingolipídeos, colesterol e proteínas ancoradoras sendo que a caveolina é o principal componente estrutural desses microdomínios (**Figura 7**). De fato, Wyse et al. observaram uma interação direta entre AT1R e caveolina em células BHK e HEK 293. Essa interação se mostrou essencial para o tráfego de AT1R através da via exocítica, mas não resultou em sequestro do receptor para a caveola (52). Além disso, Leclerc et al. identificaram um *motif* poliaromático de ligação a caveolina na cauda citoplasmática de AT1R e também constataram que esse *motif* não promoveu a localização do receptor na caveola, mas parece agir como um sítio de ancoragem para proteínas regulatórias que modulam o seu tráfego e

funcionalidade (53). Apesar disso, Ishizaka et. al, mostraram uma expressiva colocalização de AT1R e caveolina em membranas de células da musculatura lisa vascular após incubação com o agonista (54).

Figura 7. Micrografia Eletrônica de células endoteliais mostrando a caveola (seta preta) e ao lado um esquema representando uma invaginação característica da caveola e os componentes geralmente encontrados (caveolina, fosfolipídeos, esfingolipídeos e colesterol) Fonte: Razani, 2002.

1.3.5 Importância da Porção Citoplasmática de AT1R na sua Internalização

Estudos utilizando construções quiméricas de GPCRs mostram que há determinantes específicos na cauda citoplasmática destes receptores que definem se serão reciclados de volta a membrana, retidos em compartimentos intracelulares, ou direcionados à membrana nuclear ou aos lisossomos (55-57). Além disso, as interações dos receptores com outras estruturas da membrana definem, pelo menos em parte, a via de sinalização ativada por ele. A importância das interações da porção citoplasmática dos receptores com proteínas regulatórias e/ou ancoraduras foram verificadas, por exemplo, para o receptor para o hormônio da paratireóide (PTH1R). Em

membranas em que a proteína NHERF (Na^+/H^+ *exchanger regulatory factor*), está presente, como as membranas apicais de células de túbulo proximal renal, PTH1R ativa fosfolipase C (PLC) e não ativa adenilato ciclase (AC). Em membranas basolaterais, nas quais NHERF não é detectado, PTH1R ativa AC, mas não ativa PLC (58). Assim, a interação com NHERF controla a via de sinalização que será ativada por esse receptor, determinando diferentes funções de acordo com a membrana onde se localiza.

A desensibilização e endocitose de AT1R estão correlacionadas a fosforilação de resíduos de Ser e Thr nos domínios citosólicos do receptor (59-62) (**Figura 8**). Vários trabalhos utilizando mutações e deleções na cauda C-terminal mostraram a importância desta região na regulação de AT1R (**Figura 9**).

Figura 8. Receptor para Ang II com os sete domínios transmembrânicos, a porção N-terminal extracelular, alças intra e extracelulares e a cauda C-terminal intracelular destacada. Fonte: modificado de Dechend R, 2004 (63).

Estudos de Shirai et al. demonstraram o envolvimento dos aminoácidos 306 a 320, assim como da terceira alça intracelular (aminoácidos 216 a 230), na ativação de proteína G (64). O mesmo também foi evidenciado em estudos de Franzoni e cols, (65). Sano e cols mostraram que mutações nos resíduos 309, 312, 313 e 314, levam a perda da capacidade de ativar PLC (66). Não está claro, no entanto, se as mesmas regiões necessárias para ativação de PLC (ativação de $G_{q/11}$) são aquelas necessárias para inibição de AC (ativação de G_i). (35).

10 20 30 40 50 60
 MALNSSAEDG IKRIQDDCPK AGRHSYIFVM IPTLYSIIFV VGIFGNSLVV IVIYFYMKLK
 70 80 90 100 110 120
 TVASVFLNL ALADLCFLLT LPLWAVYTAM EYRWPFGNHL CKIASASVSF NLYASVFLLT
 130 140 150 160 170 180
 CLSIDRYLAI VHPMKSRLRR TMLVAKVTCI IIWLMAGLAS LPAVIHRNVY FIENTNITVC
 190 200 210 220 230 240
 AFHYESRNST LPIGLGLTKN ILGFLFPFLI ILTSYTLIWK ALKKAYEIQK NKPRNDDIFR
 250 260 270 280 290 300
 IIMAIVLFFF FSWVPHQIFT FLDVLIQLGV IHDCKISDIV DTAMPITICI AYFNNCLNPL
 310 320 330 340 350
 FYGFLGKKEKKYFLQLLKYTPPKAKSHSSLSTKMSLSTYRPSDNMSSSAKKPASCFEVE

Cauda C-terminal

G(306) - truncamento nesta posição resulta em falta de expressão na membrana (<i>Thekkumkara e Linas, Am J Physiol Renal Physiol – 2002</i>)
G(306) a L(314) – motif de direcionamento do receptor (<i>Thekkumkara e Linas, Am J Physiol Renal Physiol – 2002</i>)
F(309) ; Y(312) ; F(313) ; L(314) – mutações – perda da capacidade de ativar PLC (<i>Sano T, J Biol Chem – 1997</i>)
Y(312) ; F(313) ; L(314) - acoplamento e ativação de Gq (<i>Shirai, Hypertension - 1995</i>);
Q(315) a I(320) – importante para acoplamento de Gi e Gq (<i>Thekkumkara e Linas, Am J Physiol Renal Physiol – 2002</i>)
G(306) a I(320) – interação com Proteínas G (<i>Franzoni L, J Biol Chem - 1997</i>)
L(316) a Y(319) (necessária para internalização)
S(335) a L(337) – domínio STL (diminuição 80% internalização) (<i>Linas ST, Am J Physiol Renal Physiol- 2002</i>)
T(332) – S(335) – T(336) – S(338) – fosforilação do receptor induzida por ligação da AngII (<i>Hunyady, J Biol Chem -1994</i>)
S(338) – S(348) – fosforilação por PKC (<i>Qian H, Biochem J – 1999</i>)

Figura 9. Acima, a sequência de aminoácidos do receptor AT1a com os principais sítios de regulação na cauda C-terminal do receptor, referenciada abaixo pelos diversos trabalhos publicados.

1.3.6 Diferenças Funcionais Entre Receptores AT1 Expressos em Membrana Apical e Basolateral de Células de Túbulos Proximais

A transdução de sinal de receptores de membrana é mediada pela interação desses receptores ativados com as proteínas de sinalização próximas a eles. As células de epitélio polarizadas apresentam membrana apical e basolateral e os receptores podem estar presentes em apenas um ou ambos os domínios (67). Os receptores para Ang II do tipo AT1 estão presentes em membrana apical (68) e basolateral (69) de células não só de túbulos proximais como também de outros segmentos tubulares (**Figura 10**).

Figura 10. Imuno-histoquímica de tecido renal com anticorpo monoclonal para AT1Ra. Marcação positiva em túbulos proximais (PT), túbulos distais (DT) e ducto conector (CT). A seta única indica marcação para AT1R em membrana apical e a seta dupla em basolateral. Fonte: Harrison-Bernard, 1997 (42).

Algumas diferenças funcionais já foram observadas de acordo com a sua localização na membrana de células dos túbulos proximais. Após demonstrarem que tanto receptores apicais quanto basolaterais ativaram PLC, o que foi observado pelo aumento da formação de IP3 induzida por Ang II. Schelling et. al mostraram que o tratamento com *phenylarsine oxide*

(PAO), um agente oxidante trivalente que impede a endocitose de AT1R por se ligar a grupos sulfidril do receptor, inibiu a formação de IP3 em receptores apicais, mas não em basolaterais após tratamento com Ang II. Esse resultado mostrou que os receptores apicais necessitam sofrer endocitose antes da sinalização por PLC, o que não é necessário para os basolaterais. Além disso, em experimentos com colchicina (que rompe microtúbulos) e citocalasina D (que rompe microfilamentos), os autores mostraram que a endocitose desses receptores é dependente do citoesqueleto (70). Em outro trabalho, esses mesmos pesquisadores viram que o aumento no fluxo de sódio em túbulos proximais causado pela Ang II, mais uma vez foi dependente de endocitose do receptor apical, mas não do basolateral, e que esse aumento no fluxo foi 23 a 56% maior em membrana basolateral (71).

Becker et. al também demonstraram diversas diferenças funcionais em células LLC-PK polarizadas transfectadas com AT1R. Resultados de ensaio de ligação por competição com ^{125}I -Ang II, mostraram que a constante de dissociação do receptor em membrana apical foi maior que a do receptor basolateral, o que significa que o receptor apical se liga com maior afinidade ao agonista. Os receptores também se diferenciaram quanto às taxas de endocitose e reciclagem, sendo que os localizados em membranas apicais sofrem rápida internalização e reciclagem, enquanto que os basolaterais são mais lentos. O mesmo estudo também mostrou que a reciclagem do receptor apical está atrelada a ativação da PLA₂, pois o tratamento com um inibidor dessa enzima (*quinacrine*) aboliu a reciclagem de AT1 para a membrana apical e não alterou a taxa de reciclagem do receptor basolateral (72).

Thekkumkara et. al em experimentos com cultura de células de túbulos proximais provenientes de *opossum* (OK), estudaram as diferenças funcionais entre receptores apicais e basolaterais quanto à estimulação do transporte de sódio por Ang II, relacionado a inibição de G_i e adenilato ciclase. Esses autores observaram que em ambos os lados, após exposição a Ang II, os receptores sofreram rápida internalização, inibiram a adenilato ciclase e aumentaram o transporte transcelular de Na^+ . O truncamento no aminoácido 314 da cauda citoplasmática de AT1R resultou em receptores que eram expressos na membrana apical e basolateral, porém não foram internalizados, não inibiram a AC, nem aumentaram o transporte de Na^+ , mostrando estar provavelmente nesta região o local de acoplamento a proteína G. No entanto, mutantes com truncamento no aminoácido 333 resultando na remoção dos 26 aminoácidos C-terminais contendo domínios ricos em Ser/Thr ou deleção dos aminoácidos 315 a 329, também não foram internalizados, mas preservaram a capacidade de ativação de G_i , com redução nos níveis de AMPc e ativação de NHE3, em membrana basolateral, mas não em membrana apical. Isso levou à pressuposição de que a internalização dos receptores apicais seja essencial para a ativação de NHE3 em membrana apical (35). A **Tabela 1** resume as principais diferenças funcionais entre os receptores apicais e basolaterais.

Diferenças Funcionais	Receptor Apical	Receptor Basolateral
Ativação de Gi e Gq	Necessita internalização	Não necessita internalização
Necessidade do citoesqueleto íntegro para ativar Gq	Sim	Não
Tratamento com PAO	Inibe a internalização	Não inibe a internalização
Fluxo de Na ⁺ dependente de Ang II	Necessita internalização	Não necessita internalização
Taxas de internalização e reciclagem	Rápida	Lenta
Envolvimento da PLA ₂ na reciclagem	Sim	Não

Tabela 1- Principais diferenças funcionais relacionadas aos receptores AT1 expressos em membrana apical e basolateral. **PAO (phenylarsine oxide)**.

Tais diferenças funcionais nos levam a aventar a possibilidade desses receptores estarem ligados a diferentes mecanismos de endocitose e reciclagem de acordo com a membrana onde estão expressos.

1.3.7 Proteínas que Interagem com a Cauda C-Terminal de AT1R nos Rins

Os GPCRs não interagem somente com proteínas G, mas também com proteínas acessórias chamadas GIPs (GPCR *interacting proteins*). Metodologias recentes permitiram a identificação de mais de 50 GIPs (73). A grande maioria delas se associa com a cauda C-terminal dos receptores

regulando suas funções. Esta interação pode ser restrita a alguns GPCRs ou exclusiva para um único receptor, o que determina maior especificidade às suas funções.

Às GIPs já foram atribuídas várias funções entre elas a de regular o tráfego e o direcionamento dos receptores para os compartimentos subcelulares e o controle da endocitose e reciclagem para a membrana. Assim, as GIPS podem estar relacionadas ao ajuste fino das vias de sinalização ligadas ao receptor com o qual interagem, ou servirem como ancoradoras em um complexo multiprotéico.

A natureza dessas funções também pode mudar de acordo com o tipo de célula e tecido em que estão expressas. Nos rins, até o momento são descritas 3 proteínas que se associam à cauda C-terminal de AT1R, são elas a ATRAP (*AT1-receptor-associated protein*), ARAP1 (*Type 1 Ang II receptor-associated protein*) e GLP (*Guanine nucleotide exchanger factor-like protein*) (**Tabela 2**).

A proteína ATRAP, identificada por ligar-se exclusivamente ao domínio C-terminal de AT1R, é transmembrânica e parece agir como um regulador negativo do receptor, já que a sua ligação promove aumento da internalização (74), diminuindo assim o conteúdo de AT1R disponível na membrana plasmática. Ação contrária a essa está associada a ARAP1, que ao se ligar à cauda citosólica do receptor, aparentemente, promove a sua reciclagem para a membrana (75). Camundongos transgênicos com superexpressão desta proteína especificamente nos túbulos proximais

apresentaram hipertensão (76). Diferentemente, a proteína GLP foi relacionada à hipertrofia nos túbulos proximais e células da musculatura lisa vascular de ratos (77).

PROTEÍNA IDENTIFICADA	MÉTODO E BIBLIOTECA DE CDNA UTILIZADA	TAMANHO	DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL	DISTRIBUIÇÃO CELULAR
ATRAP	<i>Yeast two-hybrid screen</i> de rim de camundongo	18kDa	Rim, coração e testículo	3 domínios transmembrânicos
ARAP1	<i>Yeast two-hybrid screen</i> de embrião de camundongo	57kDa	Ubíquo	Citosólica
GLP	<i>Yeast two-hybrid screen</i> de embrião de camundongo	58 kDa	Rim, pâncreas e coração	Citosólica

Tabela 2 - Proteínas que interagem com a porção C-terminal de AT1aR identificadas até o momento com expressão renal.

O crescente número de trabalhos que evidenciam a importância da porção c-terminal de AT1R e das proteínas que se associam a ela, para as funções desse receptor, nos levou a acreditar que provavelmente outras proteínas, já conhecidas ou ainda não conhecidas, podem também estar relacionadas às diferenças observadas na funcionalidade do re expresso nas diferentes membranas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visou identificar proteínas que interagem com a cauda c-terminal de AT1aR em membranas de células de córtex renal de ratos, especialmente túbulos proximais, com a finalidade de aventar os possíveis mecanismos responsáveis pelas diferenças funcionais entre receptores expressos em membranas apicais e basolaterais.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

Para todos os experimentos de extração de RNA e proteínas, foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em temperatura controlada, ciclo claro/escuro, 60% de umidade e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.1 Obtenção do *Constructo* AT1aR-GST

3.1.1 Extração de RNA de Córtex Renal de Ratos

Depois de retirados, os rins foram decapsulados e tiveram a parte cortical e medular separadas. Os córtex separados foram então totalmente fragmentados em Polytron (Brinkmann) após ter sido adicionado 1 ml de isotilcianato de guanidina (GIT) 4M e 8 μ l de β -mercaptoetanol para cada rim. Foram adicionados depois 100 μ l de Acetato de Sódio 2M, pH 4,0 e 600 μ l de fenol/clorofórmio/álcool isoamil (25:24:1) pH 4,7 e após bem homogeneizadas as amostras foram deixadas em banho de gelo por 15 min. O próximo passo foi uma centrifugação a 4° C por 15 minutos a 14.000 rpm.

O sobrenadante foi recolhido para tubos limpos, a eles foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado e após bem misturados os tubos foram transferidos o freezer -80°C onde foram deixados por 1 hora no mínimo ou *overnight*.

As amostras foram então descongeladas em gelo e centrifugadas a 20800Xg por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 200 μl da solução Tris-HCl 10mM pH7,5, EDTA 1mM, SDS 0,5% em água DEPC. Foram adicionados 200 μl de clorofórmio/álcool isoamil (24:1), homogeneizados e centrifugados a 20800Xg por 10 min. a 4°C . Foram acrescentados a cada tubo 1/10 do volume de Acetato de Sódio 2M pH 5,0 e igual volume de isopropanol gelado e as amostras foram novamente transferidas freezer -80°C por no mínimo 30 minutos. As amostras foram retiradas do freezer, descongeladas em gelo e centrifugadas a 20800Xg por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 2 ml de etanol 75%. As amostras foram então centrifugadas a 20800Xg, por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Os tubos foram deixados invertidos por alguns minutos para que o excesso de etanol evaporasse e o *pellet* foi ressuscitado em 50 a 100 μl de H_2O DEPC autoclavada. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro ou estocadas a -80°C até o uso. A qualidade da extração foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (**Figura 11**).

Figura 11. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linha 1: RNA de córtex renal. Linha 2 : RNA de tecido medular.

3.1.2 Síntese de cDNA

Aproximadamente 5 μ g do RNA total extraído foi utilizado para a síntese de cDNA de córtex renal. A síntese é feita por reação de transcrição reversa, onde as fitas únicas de RNA são copiadas em fitas de cDNA por ação de uma transcriptase reversa. A enzima que utilizamos foi a Super Script III (Invitrogen). Para checar a eficiência da síntese foi feita uma reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando *primers* (**Tabela 3**) para β -actina de rato. A enzima utilizada foi a *Taq polymerase* (Invitrogen).

Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: *Primer sense* 100nM; *Primer antisense* 100nM; MgCl₂ 1,5mM; dNTPs 200nM; *Taq polymerase* 0,05U/ μ l; cDNA: 1 μ l (produto total diluído 1:5).

Primers para β -actina de rato

sense 5' CTC CAT CGT GGG CCG CCC TA 3'

antisense 3' CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT 3'

Tabela 3 - Primers utilizados na reação de PCR para β -actina de rato.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) utilizando as seguintes condições:

95° C – 2min → 95° C – 30seg → 60° – 30min → 72° C – 1min → 72° C – 7 min → 4° C ∞

25 ciclos

3.1.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) para AT1aR

Para obtenção da região codificante correspondente a cauda C-terminal do receptor de Angiotensina II foram desenhados *primers* de forma que fossem inseridas regiões de corte para enzimas de restrição nas pontas do fragmento obtido para facilitar a sua clonagem no plasmídeo (**Figura 12**).

Também foi necessária a inserção de 2 bases no primer *sense* para que o fragmento fosse ligado *in frame* com a região codificante de GST (vetor pGEX) e a proteína fosse traduzida de maneira correta (**Tabela 4**).

1141 TTTAACAACCTGCCTGAACCC TCTG **TTCTAC GGC TTT CTG GGAAG** AAATTTAAAAAGTAT
 1201 **TTCTCCAGCTCCTGAAATATATCCCCCAAAGGCCAAGTCCCACTCAAGCCTGTCTACG**
 1261 **AAAATGAGCACGCTTTCTTACCGGCC TTCGGATAACATGAGCTCATCGGCCAAAAAGCCT**
 1321 **GCGTCTTGTT TTGAGGTGGAGTGA CAGGTTCAAAG** CACACTGGCAATGTAATGCCCTGAC

mRNA C-terminal (159bp) STOP CODON

Figura 12. Estratégia utilizada para o desenho *primers* para AT1aR

sense: 5' **CAGAGATTCTG** **TTC TAC GGC TTT CTG GGG AAG** 3'
 - **Sítio para EcoRI**
 - **nucleotídeos adicionados para que o fragmento entre no vetor *in frame***

antisense: 5' **AGACCTCGAGCT** **TTG AAC CTG TCA CTC CAC CTC** 3'
 - **Sítio para XhoI**
 - **Stop códon**

Tabela 4 - *Primers* para C-terminal de AT1aR de rato.

A PCR para obtenção do fragmento foi feita com 1µl do cDNA obtido transcrição reversa, diluído 1:5 em água autoclavada, utilizando-se a enzima *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Stratagene).

Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: *Primer sense* 400nM; *Primer antisense* 400nM; MgCl₂ 1,5mM; dNTPs 200nM; *Herculase II polymerase* 0,05U/µl; cDNA: 1µl (produto total diluído 1:5).

As reações de amplificação foram feitas em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) utilizando as seguintes condições:

95° C – 5min → 95° C – 30seg → 60° – 30min → 72° C – 30seg → 72° C – 7min' → 4° C ∞

 30 ciclos

O fragmento obtido por reação de PCR utilizando a enzima *HERCULASE II Fusion DNA Polymerase* (Stratagene) corresponde ao tamanho esperado (213pb) (**Figura 13**).

Figura 13. Gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular. Linha 1: Controle negativo. Linha 2 : Banda correspondente ao fragmento AT1aR de rato.

3.1.4 Clonagem do Fragmento no Vetor pGEX-6P-2

O vetor escolhido pra a expressão da proteína de fusão foi o pGEX-6P-2 (GE Healthcare), o qual possui em seu sítio múltiplo de clonagem sequências de reconhecimento para digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (**Figura 14**). Este plasmídeo possui também a sequencia codificante para a proteína GST (Glutathione-S-transferase), o promotor *tac* induzível por IPTG (isopropil tio- β -D-galatosídeo), operador *lac*, o gene que confere resistência à ampicilina e sítio de reconhecimento para a enzima *Precision Protease*, para remoção da GST do produto de fusão.

Figura 14. Vetor de expressão pGEX-6P-2 e os genes contidos em sua sequência: promotor *tac*, repressor *lac*, sítios de clivagem para enzimas de restrição (*multiple cloning site*) e a sequência codificante para a proteína GST.

3.1.5 Purificação do Produto de PCR e Digestão com EcoRI e XhoI

O produto de PCR obtido (cauda C-terminal AT1) foi aplicado em gel de agarose, purificado com *Qiaquick gel extraction kit* (Qiagen) e ligado no vetor (pGEX-6P-2) após ambos serem submetidos à digestão com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI. Antes da ligação as amostras foram quantificadas por densitometria em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo utilizando um marcador de massa e peso molecular (*Low DNA Mass ladder*- Invitrogen) como padrão (**Figura 15**).

Figura 15. Quantificação de AT1aR e pGEX-6P-2 em gel de poliacrilamida 8% utilizando marcador de massa e peso molecular (M - Low Mass DNA ladder).

3.1.6 Reação de Ligação

Após purificação e quantificação do DNA a ser clonado, foram calculadas as quantidades de inserto e vetor na proporção 3 (inserto) :1 (vetor), para a reação de ligação (**Tabela 5**), utilizando-se a fórmula:

$$\frac{50\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{3 \text{ kb (tamanho do vetor)}} \times \frac{3}{1} = X \text{ ng (inserto)}$$

Reagentes	Amostra	Controle (+)	Controle (-)
2X rapid buffer	5µl	5µl	5µl
pGEX 6-P-2 (50ng)	1µl	1µl	1µl
DNA amostra	xµl	—	—
DNA controle	—	2µl	—
T ₄ DNA ligase	1µl	1µl	1µl
H ₂ O q.s.p.10µl	3µl-x	1µl	3µl

Tabela 5 - Reações de ligação para a obtenção do *constructo* pGEX-6P-2 + GST-AT1.

As amostras foram então incubadas à 4° C *overnight*.

3.1.7 Obtenção de Células Competentes

A transformação do *constructo* obtido foi feita em bactérias TOP 10 competentes. No 1º dia do protocolo, uma alçada do estoque de *E. coli* TOP 10 foi semeada em placa com meio LB (Luria-Bertani) sólido sem antibiótico e incubada a 37 °C por 16h. No 2º dia, uma colônia foi isolada e inoculada em 8 mL de meio LB líquido com 50µg/ml e que foi submetido a agitação a 37 °C por 16h. No 3º dia, 400µl deste meio foi adicionado em 40 mL de meio LB e novamente foi feita uma incubação a 37 °C sob agitação até obtenção de densidade ótica entre 0,4 e 0,6 (OD₅₀₀ = 0,4-0,6).

Estas bactérias foram então centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos a 4 °C, sendo depois incubadas no gelo. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 20 mL de CaCl₂ 100 mM gelado que posteriormente foi mais uma vez incubado no gelo por 20 minutos. Após

centrifugação por 5 minutos a 4 °C foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi novamente ressuspensionado em 4 mL de CaCl₂ 100 mM gelado com adição de 706 µL de glicerol autoclavado. Depois de homogeneizadas, as amostras foram aliquotadas e guardadas à -20 °C e no último dia do protocolo, os tubos foram submetidos a banho de gelo seco e etanol e estocados no freezer à -80 °C até o uso.

3.1.8 Transformação do *Cronstructo* em *E. COLI* top 10

O *constructo* obtido foi primeiramente clonado em bactéria *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) para a manutenção do DNA clonado, já que a bactéria utilizada para a expressão da proteína de fusão (*E. coli* BL21) não mantém os plasmídeos inseridos após certo período de estocagem no freezer -80° C. Para a transformação das bactérias foi utilizada a técnica de *heat shock*. Desta forma, primeiramente as bactérias TOP 10 foram tornadas competentes, ou seja, aptas a receber plasmídeos. Para cada amostra a ser transformada 100µl de bactérias competentes foram descongeladas. Foi adicionado a cada tubo com bactérias 1,7µl de β-Mercaptoetanol diluído em água na proporção de 1:10 e esses tubos foram incubados em banho de gelo por 10 minutos. Após isso, juntou-se a essa mistura 5 a 10µl do produto de ligação (inserto+vetor) nos tubos correspondentes. No tubo controle positivo foi adicionado 1µl (10ng) de vetor controle (plasmídeo fechado sem inserto) e no tubo controle negativo não foi acrescentado nada. Assim, foram incubados mais uma vez em banho de gelo por 30 minutos. Após esse tempo, as amostras foram transferidas para banho-maria a 42° C por

exatamente 45 segundos e transferidas imediatamente para o banho de gelo (choque térmico) por pelo menos 2 minutos. Foram adicionados a cada tubo, 0,9 ml de meio de cultura SOC (*Bacto-tryptone* 20%; *Bacto-yeast extract* 5%; NaCl 0,5%; KCl 250 mM e glicose 20 mM) previamente aquecido a 42° C, os quais foram incubados sob agitação a 37° C por uma hora (para que as bactérias passassem a expressar o gene de resistência a ampicilina) até serem plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) (*Bacto-yeast extract* 5%; *Bacto-tryptone* 10%; NaCl 10%, acrescido de agar (*Select Agar*) 15%; e 50 µg/mL de ampicilina.

3.1.9 PCR das Colônias para Confirmação da Inserção do Fragmento de DNA

Como o plasmídeo pGEX-6P-2 não possui os elementos necessários para a alfa-complementação da beta-galactosidase, foi necessário fazer PCR das colônias para confirmar se houve ligação do fragmento no vetor durante a reação de ligação. Para isso parte da colônia era coletada com alça e colocada diretamente no tubo de reação de PCR. Para garantir a integridade da possível colônia positiva, antes de ser adicionada ao tubo de reação, a colônia era semeada em uma placa contendo ampicilina, chamada placa espelho. A reação de amplificação utilizada foi a mesma para a obtenção do fragmento, porém com volume final de 15 µl (**Figura 16**).

Figura 16 - PCR de colônia para AT1aR. M: marcador 25pb. Linhas 1 e 2: ligação 1:3 (proporção vetor:inserto). Linha 3: ligação 1:7. Linha 4: ligação 1:1. Linha 5: controle positivo (produto de PCR AT1aR).

3.1.10 Sequenciamento de AT1-GST + pGEX-6P-2

Era necessário assegurar que o fragmento tinha sido inserido corretamente no vetor, por isso o *constructo* foi sequenciado e para isso foram feitas reações de sequenciamento com o *BigDye terminator sequencing kit* (Applied Biosystems) as quais foram analisadas no equipamento ABI 310 (Applied Biosystems) (**Figura 17**). Os *primers* para o sequenciamento eram específicos para o plasmídeo pGEX (**Tabela 6**).

5' pGEX (*sense*) 5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG 3'

3' pGEX (*antisense*) 5' CCG-GGAGCTGCATGTGTCAGAGG 3'

Tabela 6 - Primers para sequenciamento em pGEX.

Figura 17. Eletroferograma obtido da análise do sequenciamento do constructo pGEX-6P-2-AT1R no ABI310.

3.1.11 Transformação do *Constructo* em *E. coli* BL21

Para que ocorra a expressão de proteína de fusão sem que haja degradação da mesma é ideal que a bactéria utilizada seja isenta de genes que codificam proteases, deste modo utilizamos para este fim a *E. coli* BL21. Também foi testada a expressão da proteína em bactérias ORIGAMI, mas esta foi insatisfatória. Os genótipos das bactérias utilizadas neste trabalho estão detalhados na **Tabela 7**.

TOP 10: <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>
BL21: <i>E. coli B F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal</i>
ORIGAMI: <i>F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm lacY1 ahpC gor522:: Tn10 trxB (KanR, TetR)</i>

Tabela 7 - Genótipo das bactérias utilizadas.

O protocolo de transformação nesta bactéria foi o mesmo utilizado para a transformação em *E. coli* TOP10.

3.2 Indução da Expressão da Proteína de Fusão

O produto da transcrição e tradução do gene para GST contido na sequência do plasmídeo pGEX-6P-2, mais o fragmento (C-terminal de AT1R) inserido é uma proteína de fusão (AT1aR-GST) que possui em torno de 35kDa, sendo 29 kDa correspondentes a GST (**Figura 18**). A transcrição da proteína só ocorre após a ativação do promotor *tac* que é reprimido pelo repressor *lac* e pode ser ativada pelo IPTG (isopropil tio- β -D-galatosídeo). Consequentemente, este promotor é útil para o controle da expressão de genes externos em altos níveis em *Escherichia coli*.

Figura 18. Representação da proteína de fusão obtida: glutathione-S-transferase (GST), sítio para enzima Precision protease (PP), AT1aR (porção C-terminal).

3.2.1 Teste Enzimático para Detecção da Atividade de GST

O ensaio enzimático com CDNB (1- cloro- 2,4 dinitrobenzeno) é um método rápido de detecção de atividade de GST. Pode ser usado como um *screening* em um ensaio e como uma estimativa do nível de expressão relativa da amostra. O ensaio é feito com uma alíquota do lisado total de bactérias após sonicação no qual estará contida a enzima (GST) que

catalisará a reação entre CDNB e a glutathiona reduzida (**Figura 19**). O produto da reação é um conjugado do substrato com um grupo tiol da glutathiona reduzida que é medido por colorimetria, onde a absorbância da amostra é determinada no comprimento de onda de 340 nm em espectrofotômetro. Para o ensaio da atividade enzimática da GST os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: CDNB (1- cloro-2,4 dinitrobenzeno) 1mM; glutathiona reduzida 0,1mM; KH_2PO_4 100mM; amostra - 10 μl de extrato celular sonicado; H_2O q.s.p. 250 μl .

Figura 19. Reação enzimática entre CDNB e glutathiona (GSH) para detecção da expressão de GST.

Para cada ensaio era feita uma reação sem amostra (branco) e um controle negativo com extrato de células não induzidas com IPTG. Dessa forma, em um primeiro momento, o ensaio enzimático com CDNB foi realizado para avaliar se havia expressão da proteína de fusão em bactérias induzidas a 37° C com IPTG 1mM durante 2 horas. Foram usados como controles negativos a bactéria BL21 não transformada, transformadas com pGEX-6P-2 (GST sem fusão) sem indução e transformadas com GST-AT1aR sem indução. E como controles positivos a bactéria transformada com pGEX e induzida por 2 horas. Foram feitas leituras das amostras em

intervalos para acompanhar a produção do conjugado que foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340nm (**Figura 20**).

Foi possível observar que em relação aos controles negativos houve um aumento na quantidade do produto com o passar do tempo, indicando que havia atividade de GST na amostra.

Figura 20. Leitura da atividade de GST (D.O. X Tempo). BL21: Bactéria não transformada; GST: GST não induzida; GST +IPTG: GST induzida com IPTG 1mM; GST-AT1R: proteína de fusão não induzida; GST-AT1R +IPTG: GST induzida com IPTG 1mM.

3.2.2 Teste de Tempo de Indução com IPTG

Vários parâmetros de indução foram testados com o intuito de aperfeiçoar as condições de expressão da proteína de fusão. O primeiro teste realizado foi o tempo de indução com IPTG. Após crescerem *overnight* a 37° C em 5ml de meio LB contendo glicose e ampicilina, as bactérias foram semeadas em um volume maior do mesmo meio, na proporção de 1:100 e cresceram até atingir densidade ótica entre 0,3 e 0,5 em

comprimento de onda de 600nm Neste momento uma alíquota do meio era retirada e correspondia ao tempo de indução igual a zero. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG a uma concentração final de 1mM e de hora em hora uma alíquota era retirada para se acompanhar a expressão da proteína. O plasmídeo vazio também foi clonado e a indução da proteína GST sem fusão era utilizada como controle positivo. A expressão da proteína foi visualizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. As alíquotas de 1 ml da cultura eram retiradas, centrifugadas e os pellets obtidos eram misturados com tampão *Laemmli sample buffer* (azul de bromofenol 0,05%, SDS 2%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 2%, Tris-HCl 5mM, pH6,8). Depois de aquecidas a 100° C por 5 minutos eram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese para a separação das proteínas.

Após a eletroforese, o gel foi fixado por uma hora na solução (metanol 50% e ácido acético 10% em água), corado *overnight* a temperatura ambiente em solução de *Coomassie Blue (Briliant Blue G solution – Sigma)* e descorado na solução (metanol 40%, ácido acético 7% em água) por algumas horas para a visualização das proteínas (**Figura 21**).

Pode-se observar uma bandas bem evidentes na altura correspondente ao tamanho da proteína de fusão (35kDa) que aumentam de intensidade entre 1 e 4 horas de indução com IPTG 1mM à 37° C.

Figura 21. Teste de Tempo de Indução com IPTG. M: marcador de peso de proteínas. Linha 1: BL21 não transformada. Linha 2: BL21 transformada com pGEX-6P-2 mas sem indução com IPTG. Linha 3: BL21 transformada com pGEX-6P-2 e induzida com IPTG por 4 horas. Linha 4: BL21 transformada com AT1-GST mas sem indução. Linhas 5-8: BL21 transformada com AT1-GST e indução com IPTG por 1, 2, 3 e 4 horas respectivamente.

A partir deste experimento foi definido como sendo de 4 horas o melhor tempo de indução com IPTG, já que experimentos subsequentes com 5 e 6 horas de indução não demonstraram um aumento na expressão da proteína de fusão em relação às 4 horas.

3.2.3 Teste de Concentração de IPTG e Temperatura de Indução

Era necessário definir a concentração ideal de IPTG para a indução da expressão da proteína. As concentrações testadas foram 0,1mM, 0,5mM e 1mM. Os métodos de avaliação foram o enzimático com CDNB e a visualização da proteína em gel de poliacrilamida corado com *Coomassie*

Blue. A expressão da proteína foi muito baixa com 0,1mM e ligeiramente maior com 0,5mM em relação à 1mM. A temperatura de indução também foi testada, sendo que 30° C foi a temperatura que mostrou ser a mais adequada para a expressão, tanto pela maior abundância quanto pela maior solubilidade da proteína.

3.3 Purificação da Proteína de Fusão

Com os parâmetros de indução definidos o próximo passo foi purificar a proteína de fusão em resina de glutathione sefarose (Glutathione sepharose 4B - GE Healthcare). Para isso foram necessários vários testes com diversos tampões de solubilização. O grande desafio foi definir um tampão que além de solubilizar satisfatoriamente a proteína, também permitisse a ligação desta na resina. A melhor solubilização foi com a utilização de um tampão que, dentre outros componentes, continha 2% de SDS. Porém não houve nenhuma ligação de proteínas na resina. Após vários testes de tampões com detergentes que incluíram Triton X-100, *Lauryl Sarcozyl*, *CellLytic IB Solubilization Reagent (Sigma)* , o único que promoveu solubilização da proteína e permitiu a sua ligação foi um tampão com 0,5% do detergente NP-40 (*NP solution*: NaCl 500mM; Tris 50mM, pH7,6; EDTA 5mM; EGTA 5mM; NP-40 0,5%).

Desta forma, foi primeiramente semeada uma alíquota de bactérias BL21 transformadas com os plasmídeos para GST e GST-ATa1R em 5ml de meio LB contendo 50µg/ml de ampicilina. As bactérias cresceram *overnight* a 37°

C sob agitação. No dia seguinte 1ml desta cultura foram semeados em 100ml de LB também contendo 50µg/ml de ampicilina e assim cresceram por mais algumas horas a 37° C até atingirem uma densidade ótica entre 0,4 e 0,5 ($OD_{600} = 0,4-0,5$). Tendo atingido a densidade necessária algumas alíquotas eram retiradas das amostras e correspondiam ao tempo de indução igual a zero que foram usados como controle em outros experimentos. Neste momento, era adicionado IPTG 0,5mM para indução da expressão das proteínas por 4 horas a 30° C sob agitação. A cultura de bactérias foi centrifugada a 3000 RPM, a 4° C por 30 minutos para retirar o meio LB. Logo depois o *pellet* era ressuspensionado em PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) contendo coquetel de inibidores de protease (*Complete protease inhibitors cocktail* – ROCHE) para logo depois ser novamente centrifugado a 4° C, 3000 RPM por 15 minutos para retirar o PBS e ser finalmente ressuspensionado em 5ml de tampão de lise (*NP solution*) também contendo coquetel de inibidores de protease. As amostras eram então sonicadas por aproximadamente 10 minutos em gelo, em pulsos, para minimizar a degradação da proteína de fusão. A amostra era então centrifugada a 4000 RPM, por 30 minutos a 4° C para retirar *debris* de células lisadas ou células inteiras. O sobrenadante era novamente centrifugado a 20800Xg, 4° C por mais 15 minutos para garantir que restariam realmente apenas proteínas solubilizadas.

Durante o tempo de indução, a resina de glutathiona sefarose era lavada para posteriormente ser incubada com o sobrenadante obtido. Foi utilizado aproximadamente 200µl de resina para os 5ml de sobrenadante. A alíquota

de resina a ser utilizada foi primeiramente centrifugada a 2000xg por 2 minutos para retirar o etanol que serve como preservativo durante a estocagem. Após isso, a resina era lavada mais 3 vezes com PBS nas mesmas condições para no final ser lavada com tampão de lise *NP solution*. Assim, o sobrenadante e a resina eram incubados a 4° C sob agitação por no mínimo 2 horas ou *overnight*. Neste momento foi feita a adição de 5mM de glutatona reduzida, pH 8,0 com o intuito de minimizar a ligação inespecífica de proteínas na resina.

Após esta incubação a resina foi centrifugada a 2000xg por 2 minutos. O sobrenadante era guardado e correspondia às proteínas que não se ligaram a resina (*flow-through*), e foi utilizado como um controle da quantidade de proteína de fusão que poderia não ter se ligado. A resina era novamente ressuspendida em tampão de lise e lavada mais 2 vezes. Mais 3 lavagens eram feitas com um tampão de lavagem nomeado TEE (Tris 200mM pH8,0, EDTA 5mM, EGTA 5mM).

Para visualização do resultado da ligação e integridade da proteína, uma alíquota da resina era incubada com *Laemmli sample buffer* e aquecidas a 100° C para que as proteínas fossem eluídas e depois aplicadas em SDS-PAGE 12% que logo após a eletroforese era corado com prata (**Figura 22**).

Para visualização do resultado da ligação, uma alíquota da resina era incubada com *Laemmli sample buffer* e aquecidas a 100° C para que as proteínas fossem eluídas e depois aplicadas em SDS-PAGE que logo após a eletroforese era corado com prata. A visualização da integridade era necessária, já que a proteína de fusão mostrou-se muito instável no decorrer

de todo o processo de padronização do experimento. Alguns produtos de degradação abaixo da banda correspondente a proteína íntegra continuaram visíveis, porém em quantidade muito pequena já que a coloração do gel com prata é muito sensível, provavelmente na coloração com *coomassie blue* estas bandas nem seriam visíveis. Por outro lado, o controle GST sempre pareceu muito estável nos vários tipos de testes realizados.

Figura 22. Gel de poliácridamida para visualização da ligação das proteínas GST e AT1R-GST a resina de glutatona sefarose. M: marcador de peso molecular de proteínas. Linha 1: GST; linha 2: flow-through de 1 após centrifugação; Linha 3: GST-AT1R.

3.3.1 Quantificação das Proteínas Ligadas a Resina

A quantificação das proteínas ligadas a resina foi feita por densitometria comparando-se os valores obtidos com uma curva de diluição de BSA (Figura 23).

Figura 23. Curva padrão de BSA. Linha 1. Marcador de peso molecular; Linhas 2 a 8. 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 40 μ g de BSA respectivamente. Linha 9 e 10. Proteína de fusão.

3.2.2 Eluição com Glutathione Reduzida

A interação da GST ou GST-AT1aR com a resina de glutathione sefarose é desfeita na presença de glutathione reduzida em tampão Tris 50mM, pH 8,0. No entanto a concentração de glutathione necessária e o tempo de incubação tiveram de ser padronizados. Além disso, durante este teste foi possível determinar a máxima concentração de glutathione reduzida que poderia ser adicionada ao tampão de ligação sem que houvesse nenhum desligamento da proteína de fusão e esta concentração passou a ser utilizada no sentido de minimizar a ligação inespecífica de proteínas a resina.

Após vários testes definiu-se que a concentração ideal de glutathione era de 50mM e que a incubação deveria ser *overnight* a 4° C.

3.4 Ligação com Proteínas de Membranas Totais (GST Pull-Down Assay)

Com as proteínas de fusão imobilizadas na resina de glutathiona sefarose, a etapa seguinte foi a incubação desse complexo com proteínas de membranas totais de córtex renal de ratos para se tentar identificar alguma interação entre elas.

Como observado na **Figura 24**, várias proteínas renais provavelmente interagiram de forma específica com GST-AT1R, já que não se observa ligações no controle GST incubado com proteínas renais (Linha 7) e algumas poucas bandas ligadas a resina somente (Linha 2).

Figura 24. SDS-PAGE 12% corado com prata. M: marcador. Linha 1: Proteínas de membranas totais de córtex renal. Linha 2: Resina apenas, incubada com membranas totais. Linha 3: resina com GST-AT1 imobilizada. Linha 4: resina com GST-AT1 após incubação com proteínas de membranas totais. Linha 5: *flow-through* de 4. Linha 6: resina com GST. Linha 7: resina com GST após incubação com proteínas de membranas totais. Linha 8: *flow-through* de 7.

3.4.1 Extração de Proteínas de Membranas Totais de Córtex Renais

Depois de retirados dos ratos e decapsulados, os rins tinham a parte cortical separada e imediatamente colocada em um recipiente contendo tampão K-HEPES (Manitol 200mM pH8,0, HEPES 80mM, KOH 41mM, pH 7,5) e coquetel de inibidores de proteases (ROCHE). Com o uso de uma lâmina, o tecido foi fragmentado em pedaços muito pequenos e misturados a um volume de K-HEPES correspondente a 5 vezes o volume de tecido. Toda a mistura foi então transferida para um recipiente apropriado para ser homogeneizado em um *Douncer Homogenizer*. Neste equipamento a amostra foi passada de 15 a 20 vezes pela haste de homogeneização.

O homogenato foi transferido para um tubo de polipropileno e centrifugado a 4500 RPM, por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi salvo e submetido a mais uma ultracentrifugação a 36000 RPM por 1 hora a 4° C. O sobrenadante foi descartado (proteínas solúveis) e o pellet foi solubilizado em 1ml de tampão contendo CHAPS (*CHAPS solution*: NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 20mM, NaVO₄ 2mM, NaF 10 mM, CHAPS 10mM, pH 8,2) para cada rim, por 3 horas ou *overnight* a 4° C sob agitação. Testes com diversos tampões de solubilização foram feitos até se encontrar o mais adequado. Este método de solubilização foi adaptado do trabalho de Maurice P., 2008.

As proteínas que ficaram solubilizando por 3 horas a 4° C foram centrifugadas por 1 hora a 10.000xg a 4° C. O sobrenadante correspondia às proteínas de membranas totais solubilizadas que logo em seguida foram incubadas por no mínimo 1 hora com 100µl de resina glutathione sefarose para a ligação de possíveis proteínas inespecíficas que pudessem interagir

diretamente com a resina (*pre-clearing*). As amostras foram centrifugadas para separação da resina com as proteínas inespecíficas ligadas e as proteínas que ficaram no sobrenadante foram quantificadas pelo método de *Bradford* utilizando-se o Reagente de *Bradford* comercialmente vendido (Biorad) seguindo as especificações do fabricante. Os cálculos foram feitos com base em uma curva padrão de BSA.

Após a quantificação foi juntado o correspondente a aproximadamente 100µg de proteínas ligadas previamente à resina de glutathione sefarose mais 10mg de proteínas de membranas totais de córtex renal que foram incubados sob agitação a 4° C por 3 horas. Além de ser feita a mesma incubação com GST sem fusão mais proteínas totais, também foram preparados tubos somente com resina e proteínas de fusão para assegurar que não houvesse a identificação de nenhuma proteína de bactéria que possa ter sobrado ligada a resina após as lavagens durante a purificação da proteína de fusão. As amostras foram então centrifugadas a 2000xg por 2 minutos a 4° C e o sobrenadante foi separado e guardado (proteínas que não ligaram – *flow-through*). O *pellet* resultante correspondia à resina com a proteína de fusão mais as proteínas de rim que poderiam ter interagido. Este *pellet* foi lavado 3 vezes com 1 ml da solução de solubilização das proteínas de membranas, mais uma vez com 1 ml de PBS e finalmente mais uma vez com 1 ml de Tris 50mM pH 8,0, para retirada de excesso de sal das amostras. Neste momento uma alíquota de cada amostra foi retirada para avaliação das possíveis ligações em gel unidimensional. Às alíquotas foi adicionado *Laemmli sample buffer*, que foram aquecidas a 100° C e

aplicadas em SDS-PAGE 12% que logo após a eletroforese foi corado com prata (**Figura 24**). O esquema do experimento completo de interação está representado na **Figura 25**.

Figura 25. Esquema do experimento de interação entre proteínas.

A determinação de interações era feita identificando-se bandas existentes na linha onde foi aplicada a amostra GST-AT1R após incubação com proteínas de membranas totais e que não aparecessem na linha correspondente a GST mais proteínas totais ou a proteínas totais mais resina apenas ou ainda que não aparecesse na linha correspondente à resina mais proteína de fusão apenas.

3.5 Eletroforese Bidimensional (EF2D)

O passo seguinte seria a incisão das bandas do gel unidimensional para posterior análise das proteínas que interagiram. Porém a dificuldade em se separar uma única proteína neste tipo de gel, nos levou a necessidade de uma separação melhor destas proteínas por eletroforese bidimensional.

A eletroforese bidimensional consiste inicialmente na separação de proteínas (primeira dimensão) em um gel de gradiente de pH de acordo com o ponto isoelétrico da proteína (focalização isoelétrica). Em uma segunda etapa, estas proteínas são separadas em SDS-PAGE de acordo com seus pesos moleculares.

3.5.1 Eluição das Proteínas da Resina para EF2D

O primeiro desafio foi definir como e em que tampão eluir as proteínas para que fossem analisadas por eletroforese bidimensional. Após muitos testes, a eluição foi feita diretamente na solução utilizada para a reidratação do gel da primeira dimensão (*DeStreak solution*- GE Healthcare). Desta forma, ao final das lavagens pós-incubação com proteínas renais, todo o líquido foi removido da amostra e foram adicionados 125 µl de *DeStreak solution* que ficaram sob agitação por 3 horas a 4° C. A amostra foi então centrifugada e o sobrenadante correspondia ao tampão de reidratação mais as proteínas eluídas.

3.5.2 Reidratação das Tiras de Gel com Gradiente de pH

A primeira dimensão do experimento de EF bidimensional é feita em gel com gradiente de pH. Para cada amostra uma tira de gradiente de pH deve ser utilizada. Esses géis são vendidos comercialmente na forma de tiras desidratadas (*Immobiline DryStrip gel* – GE Healthcare). Foram utilizadas as tiras de 7 cm com faixa de pH de 3 a 10. Dessa forma, o primeiro passo era a reidratação dessas tiras em uma solução já contendo as amostras a serem analisadas. Essa reidratação foi feita *overnight* a temperatura ambiente em um suporte de acrílico específico para esse procedimento (*Immobiline DryStrips Reswelling Tray* - GE Healthcare) (reidratação passiva). Antes, porém, foram adicionados à amostra 20µl de coquetel de inibidores de protease (*Protease inhibitor mix* - GE Healthcare) e 1µl de IPG *buffer* (GE Healthcare). O IPG *buffer* é uma mistura de tampões anfólitos de diversos pHs utilizado para promover uma condutibilidade mais uniforme às proteínas durante a focalização isoeletrica. Depois de colocadas no suporte de reidratação as tiras foram cobertas com um fluido oleoso para evitar a evaporação das amostras durante a reidratação (*Dry Strip Cover Fluid* -GE Healthcare).

3.5.3 Focalização Isoeletrica

No dia seguinte, foi feita a focalização isoeletrica das amostras, ou seja, a separação das proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico. O ponto isoeletrico (PI) de uma proteína é o pH específico no qual a carga resultante da proteína é zero. As proteínas são positivamente carregadas em valores

de pH abaixo do seu PI e negativamente carregadas acima de seu PI. Em um gradiente de pH sob influência de um campo elétrico, a proteína irá se mover em direção a posição no gradiente onde a sua carga resultante é zero. Uma proteína com carga resultante positiva irá migrar em direção ao catodo, tornando-se progressivamente menos positivamente carregada à medida que chega próxima ao local no gradiente correspondente ao seu PI, e neste local ela para de migrar. O oposto ocorre com proteínas carregadas negativamente.

O equipamento utilizado nesse procedimento foi o *Ettan™ IPGphor™ 3 Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare). A focalização isoelétrica é feita a altas voltagens e é controlada pelo *software Ettan IPGphor III Control Software*, pelo qual são determinados os parâmetros da focalização como a quantidade e a intensidade de voltagem que será aplicada a amostra para que ocorra a separação ideal das proteínas (**Figura 26**). O protocolo utilizado para focalização isoelétrica (fita 7 cm - pH 3-10) foi:

- ✓ **Step 1: Step 300V 900 Vhr**
- ✓ **Step 2: Grad 1000V 300 Vhr**
- ✓ **Step 3: Grad 5000V 4000 Vhr**
- ✓ **Step 4: Step 5000V 5000 Vhr**

A última coluna corresponde à quantidade de voltagem que foi programada para incidir sobre a amostra em voltz/hora.

Figura 26. Gráfico do protocolo de voltagem obtido durante a focalização isoeletrica das tiras de gradiente de pH 3-10, 7cm.

A focalização mostrada na figura foi muito bem sucedida, pois a linha azul que corresponde à evolução ideal de voltagens que deveriam ter atingido as amostras e a vermelha a evolução real das voltagens. Pode-se observar que as linhas quase se sobrepõem. Geralmente a voltagem máxima não é atingida quando a focalização é feita em tiras curtas ou quando a amostra tem baixa condutibilidade. Ambas as condições se aplicam as amostras utilizadas, já que foram focalizadas em tiras de 7 cm e por se tratarem de amostras de proteínas purificadas tem baixa condutibilidade.

Após a focalização isoeletrica as fitas poderiam ser submetidas logo em seguida a segunda dimensão ou congeladas a -20°C por até 1 semana ou por até um ano a -80°C . Como a proteína de fusão foi eluída juntamente com as proteínas que supostamente interagiram com ela, foi feita a análise dos parâmetros físico-químicos da proteína no *site* EXPASY

(<http://www.expasy.ch>), onde indica foi indicado que a proteína de fusão GST-AT1 apresenta peso molecular 36 kDa e seu ponto isoelétrico é 8,37 (Figura 27).

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLE
 FPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRY
 GVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFML
 YDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWWQ
 ATFGGGDHPPKSDLEVLFGGPLGSPEFPGRLERPLQEVLFGGPLGSPGIR
 FYGFIGKKFKKYFLQLLKYIPPKAKSHSSLSTKMSTLSYRPSDNMSSSAKK
 PASCFEVEXQVQSPRP

Figura 27. Perfil da proteína de fusão obtida e determinação do ponto isoelétrico de GST-AT1 (letras verdes – porção correspondente a GST; letras laranjas – parte do pGEX -6P-2 antes da cauda C-terminal; letras pretas – cauda C-terminal de AT1aR; letra vermelha – stop códon; letras cinzas – parte não traduzida).

3.5.4 Segunda Dimensão

3.5.4.1 Equilíbrio das Fitas de Gradiente de pH

Na segunda dimensão da eletroforese bidimensional as proteínas são separadas de acordo com o peso molecular por eletroforese em SDS-PAGE. No entanto, as fitas focalizadas foram antes equilibradas. Esse processo foi feito em dois 2 passos. O primeiro passo foi feito em solução de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM, pH 8,8; Uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) acrescida de 10mg/ml de ditiltreitol (DTT). As tiras ficaram mergulhadas nesta solução sob agitação por 15 minutos para que as proteínas fossem mantidas no estado reduzido. No passo seguinte, uma nova alíquota da solução de equilíbrio foi acrescida 25mg/ml de

iodacetamida e novamente as tiras ficaram mergulhadas sob agitação por 15 minutos para que grupamentos tióis fossem inseridos nas proteínas, prevenindo a sua reoxidação durante a eletroforese.

3.5.4.2 Eletroforese Vertical

Logo após o equilíbrio, as fitas foram colocadas em contato com gel de poliacrilamida a 16% com espessura de 1mm para que mesmo proteínas de baixo peso molecular ficassem bem definidas. A **Figura 28** ilustra esquematicamente a sobreposição dos géis.

Figura 28. Esquema geral de eletroforese bidimensional.

3.5.4.3 Coloração dos Géis

Cada tira de gradiente de pH resultou em um gel de poliacrilamida com spots de proteínas que foram corados com Coomassie Blue coloidal de acordo com um protocolo adaptado de Candiano et. al para conferir maior sensibilidade a esse tipo de coloração. Essa solução diferenciada de coomassie é chamada *Blue Silver Micellar solution* (H_3PO_4 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%, Metanol 20%, Coomassie G-250 0,1%) (78).

Logo depois de retirados do aparato da eletroforese vertical, os géis foram colocados na solução de fixação (metanol 50%; ácido fosfórico 2%) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A solução de fixação foi trocada pela solução de coloração e seguiu-se com incubação *overnight* sob agitação. Este protocolo não necessita da descoloração dos géis, por isso no dia seguinte foi feito apenas um enxágüe com água destilada para retirar o excesso de corante.

3.5.5 Identificação dos *Spots* de Proteína

Depois de corados os géis tiveram suas imagens capturadas e digitalizadas com o uso do analisador de imagens *ImageScanner III* e o *software* LabScan (GE Healthcare). Os *spots* específicos foram recortados e colocados em tubos de polipropileno e enviados ao Yale Cancer Center Mass Spectrometry & Proteomics Resource of the W. M. KECK FOUNDATION – BIOTECHNOLOGY RESOURCE LABORATORY, Yale University, New Haven, CT, USA, onde as amostras foram digeridas com tripsina e submetidos a análise por espectrometria de massas no

equipamento LTQ Orbitrap. Os espectros obtidos foram analisados automaticamente com o uso do software MASCOT comparando-se os peptídeos obtidos após a digestão com tripsina a um banco de dados de sequências de proteínas de rato.

3.5.6 Ensaio de *Western Blotting*

Para se determinar aproximadamente os níveis de expressão das proteínas a serem analisadas em tecido renal utilizamos a técnica de *Western Blotting*. Para isso, foram extraídas proteínas de membranas totais de tecido renal e proteínas de membranas de borda em escova. Foram preparadas membranas de PDVF com diferentes quantidades de proteínas (50µg, 100µg e 200µg). Na extração das proteínas de borda em escova, a parte cortical renal foi separada da medular e o protocolo utilizado para a extração foi o descrito por Aronson P. S. (1978) (79).

As amostras depois de extraídas foram quantificadas pelo método de *Bradford* (80) e as quantidades de amostra desejadas foram misturadas ao *sample buffer* (azul de bromofenol 0,05%, SDS 2%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 2%, Tris-HCl 5mM, pH6,8), aquecidas a 100° C por 5 minutos, aplicadas em gel de poliacrilamida 8% e submetidas a eletroforese. As proteínas separadas em gel foram então transferidas para membrana de PVDF (Immobilon - Millipore) utilizando-se equipamento de transferência (Semidry – OWL) a 400mA por 3 horas. As membranas contendo as proteínas foram então coradas em solução de Ponceau S 5% para avaliação da eficiência da transferência, enxaguadas em água destilada e secas a

temperatura ambiente. Em seguida foram bloqueadas com solução *blotto* (PBS, tween 20 0,1%, leite em pó desnatado 5%) por 1 hora a temperatura ambiente antes de serem incubadas com os anticorpos primários.

Os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio e incubados com as membranas a 4° C, *overnight* sob leve agitação. A tabela abaixo indica os anticorpos utilizados neste trabalho para os experimentos de *western blotting* (tabela 8).

Anticorpo primário	Fabricante	Diluição	Anticorpo secundário
Anti-DPPIV	Cell sciences	1:500	Anti-mouse IgG
Anti-HSC70	Stressgen	1:5000	Anti-rabbit IgG
Anti-GRP78	Stressgen	1:1000	Anti-rabbit IgG
Anti-ATPS β	ABCAM	1:5000	Anti-mouse IgG
Anti-ATPS α	Invitrogen	1:1000	Anti-mouse IgG
Anti-GST	GE	1:2000	Anti-goat IgG
Anti-actina	BD	1:5000	Anti-mouse IgM

Tabela 8. Anticorpos utilizados nos experimentos de *western blotting*.

Depois da incubação *overnight*, as membranas foram submetidas a 5 lavagens de 10 minutos com solução de bloqueio e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário (diluição 1:2000) a temperatura ambiente. Transcorrida 1 hora, as membranas foram novamente submetidas a 5 lavagens com solução de bloqueio e mais uma lavagem com PBS. Os anticorpos secundários utilizados eram conjugados a enzima peroxidase (*horsehadish peroxidase*), assim a visualização das bandas foi feita ao se

banhar as membranas em reagente ECL (GE Healthcare) que contém o substrato da peroxidase, por aproximadamente 2 minutos e expondo-as a um filme hipersensível (BioMax-Kodak). As imagens obtidas foram capturadas no ImageScanner (GE Healthcare).

3.5.7 Western Blot Após GST Pull-Down Assay

Com o intuito de confirmar as interações mostradas no seqüenciamento dos *spots* identificados na eletroforese bidimensional, o experimento de GST *pull-down* foi reproduzido, porém após as lavagens da resina, as proteínas ligadas foram eluídas em *sample buffer*, aplicadas em SDS-PAGE 8% e o procedimento seguido foi o mesmo descrito acima no protocolo de *western blotting*. A figura abaixo resume a estratégia utilizada (**Figura 29**).

Figura 29. Estratégia utilizada para confirmação dos resultados de interação obtidos por espectrometria de massas.

Para se assegurar que estavam sendo utilizadas as mesmas quantidades de proteína de fusão (GST-AT1R) e GST (controle negativo) imobilizadas em resina de glutiona sefarose, foi feito primeiramente um experimento de *western blotting* utilizando-se anticorpo primário anti-GST (GE Healthcare).

3.5.8 Co-Imunoprecipitação

No ensaio de co-imunoprecipitação o objetivo é determinar a ligação entre duas proteínas. Desta forma, é utilizado um anticorpo contra uma delas (antígeno) para que a outra em questão seja indiretamente purificada devido a sua interação com este. O anticorpo, por sua vez, será precipitado juntamente com todo o imunocomplexo ao ligar-se a uma resina por afinidade (proteína G/A sefarose) (**Figura 30**).

Figura 30. Esquema do experimento de co-imunoprecipitação (Fonte: <http://thunder.biosci.umbc.edu>).

Neste experimento, 500µg de proteínas de membranas totais solubilizadas em solução CHAPS (NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 20mM, NaVO₄ 2mM, NaF 10 mM, CHAPS 10mM, pH 8,2) foram incubadas com 50µl de proteína A/G sefarose a 4° C por 1 hora. Este passo é chamado de *pre-clearing* e é realizado com o intuito de eliminar ou minimizar ligações

inespecíficas de proteínas com a resina de sefarose. Depois de 1 hora a mistura foi centrifugada por 2 minutos a 2000xg e o sobrenadante foi incubado com 5µg de anticorpo primário (anti-AT1aR) em solução CHAPS em um volume total de 500µl, *overnight* a 4° C sob leve agitação. No dia seguinte foram adicionados às amostras 50µl de proteína A/G sefarose, os quais foram incubados sob leve agitação a 4° C por 2 horas. Depois de 2 horas, as amostras foram centrifugadas 2 minutos a 2000xg a 4° C e os sobrenadantes, contendo as proteínas que não se ligaram foram descartados. O *pellet* (resina com proteínas ligadas) foi então lavado 5 vezes com 500µl de solução CHAPS. Depois da última lavagem foi adicionado às amostras 50µl de *sample buffer* que foram então aquecidas a 100° C por 5 minutos para que as proteínas fossem eluídas e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de PVDF e incubadas com anticorpos primários de acordo com o protocolo de *western blotting* já descrito.

O anticorpo anti-AT1aR foi utilizado como “isca” nos experimentos de co-imunoprecipitação e assim, no passo de *western blotting* foram utilizados os anticorpos para as proteínas que se desejava investigar as interações encontradas no sequenciamento dos *spots* da eletroforese bidimensional e que tinham sido confirmadas nos experimentos de *western blotting* após GST *pull-down*. Os anticorpos primários utilizados e suas diluições estão descritos na **tabela 8**).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Identificação dos Spots de Proteína

Depois de corados os géis (**Figura 31; 32; 33**) tiveram suas imagens capturadas e digitalizadas com o uso do *ImageScanner III* (GE Healthcare). A análise dos géis foi feita com o uso do *software* ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare).

Foram considerados *spots* possíveis de serem proteínas que interagiram especificamente com AT1R os que apareceram no gel correspondente à proteína de fusão GST-AT1aR incubadas com proteínas renais e que:

- 1) Não apareceram no gel correspondente a GST-AT1aR sem incubação com proteínas renais (**Figura 32**);
- 2) Não apareceram no gel correspondente a GST incubada com proteínas renais (**Figura 33**).

Figura 31. Gel correspondente a GST-AT1aR incubada com proteínas de membranas totais de córtex renal. Os *spots* sinalizados com setas foram encontrados nessa amostra e não nas amostras controle.

Figura 32. Gel correspondente a GST-AT1aR sem incubação com proteínas de membranas totais de córtex renal. Os *spots* encontrados nesse gel foram desconsiderados se fossem encontrados no gel AT1aR mais proteínas renais. Este gel serviu como controle para eventuais proteínas de bactérias que pudessem ter sobrado durante a purificação da proteína de fusão.

Figura 33. Gel correspondente a GST incubada com proteínas de membranas totais de córtex renal. Os *spots* encontrados nesse gel foram desconsiderados se fossem encontrados no gel AT1aR mais proteínas renais. Este gel serviu como controle para eventuais proteínas renais que pudessem ter interagido inespecificamente com a proteína GST.

4.1.1 Resultado da Análise dos Spots por Espectrometria de Massas

As proteínas com maior grau de confiabilidade na identificação, determinada pelo *score* obtido durante a análise no MASCOT (**Tabela9**). Quanto maior o *score* e menor o *expectation number* (probabilidade que a identidade observada ocorra por acaso), maior a probabilidade de a proteína ser realmente a identificada pela MS.

Nº do spot	Score	Expectation	Nome da Proteína	Peso molecular	% recuperação
1	725	1,2E-68	ATP sintase subunidade beta mitocondrial	56318	43,9
2	1597	0	HSPa5 proteína de 78kDa regulada por glicose	72302	33,5
3	622	2,7E-58	Dipeptidil peptidase 4	88033	20,6
4	1461	0	HSPa8 proteína <i>heat shock</i> de 71kDa	70827	41,5
5	119	5,2E-8	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59717	23
6	193	2,2E-15	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	59717	16,6

Tabela 9 - Identificação por espectrometria de massa de possíveis proteínas associadas à cauda C-terminal de AT1R.

4.2 Confirmação das Interações *in vitro*

4.2.1 *Western Blot* para as Proteínas a Serem Analisadas em Tecido Renal

A revelação dos filmes após incubação com os anticorpos primários específicos mostrou que todas as proteínas estudadas são expressas em membranas de tecido renal (**Figura 34**).

Figura 34. Avaliação da expressão das proteínas DPPIV, GRP78, HSC70, subunidade beta da ATP síntase e subunidade alpha da ATP síntase em membranas totais de córtex renal e membranas de borda em escova (BBM), Experimento não realizado para ATP síntase beta em BBM. Actina como controle interno.

4.2.2 *Western Blot* das Proteínas que Interagem com a Proteína de Fusão

O experimento de *pull-down* de GST foi reproduzido, no entanto, após incubação das proteínas de fusão (GST e GST-AT1aR) com proteínas renais, as proteínas que se ligaram ao invés de submetidas a EF2D, foram transferidas para membrana de PVDF e incubadas com os anticorpos para as proteínas identificadas por espectrometria de massas. A **figura 35** mostra que houve confirmação da interação das proteínas HSC70, GRP78 e ATP sintase subunidade beta. As proteínas DPPIV e ATP sintase subunidade alfa, anteriormente identificadas por espectrometria de massas, não confirmaram a interação com a proteína de fusão GST-AT1aR. Por esse motivo não foram incluídas nos experimentos de imunoprecipitação.

Como controle das quantidades de proteína de fusão (GST-AT1R) e da GST sem fusão (controle negativo) imobilizadas em resina de glutathione sefarose, foi feito um experimento de *western blot* utilizando-se anticorpo primário anti-GST (GE Healthcare) (**Figura 35**).

Figura35. *Western blot* para proteínas identificadas pelo sequenciamento dos *spots* visualizados após EF2D e anti-GST como controle da quantidade de proteína imobilizada na resina de glutationa sefarose. (A) Extrato de proteínas de membranas totais de tecido renal. (B) Proteína G sefarose incubada com extrato de membranas totais de córtex renal. (C) GST-AT1aR incubada com extrato de membranas totais de córtex renal. (D) GST incubada com extrato de membranas totais de córtex renal. (E) Proteína G sefarose incubada com extrato de membranas totais de medula renal. (F) GST-AT1aR incubada com extrato de membranas totais de medula renal. (G) GST incubada com extrato de membranas totais de medula renal.

4.3 Confirmação das Interações *in vivo*

4.3.1 Co-Imunoprecipitação

No experimento de co-imunoprecipitação foi possível observar que houve interação entre a proteína HSC70 e AT1aR que foi precipitado pelo anticorpo anti-AT1aR quando incubado com proteínas de membranas totais de tecido renal (linhas C, D e E). Não houve precipitação de HSC70 nos controles negativos (linha B: resina proteína A sefarose incubada com proteínas de membranas totais e linha F: anticorpo anti-B1 incubado com proteínas de membranas totais). O anticorpo anti-B1 foi inserido no experimento como controle negativo, para se assegurar que a proteína em questão não estaria ligando-se inespecificamente a qualquer anticorpo (**Figura 36**).

Figura 36. Co-imunoprecipitação (IP: AT1R; WB: HSP/HSC70). Anticorpo anti-AT1aR imobilizado em resina proteína A, incubado com proteína de membranas totais de córtex renal e transferido para membrana PVDF. Membrana incubada com anti-HSP/HSC70. (A) Extrato de membranas totais (50g). (B) Proteína A sefarose incubada com proteínas de membranas totais. (C) Anti-AT1R – Millipore, (D) Anti-AT1R – ABCAM e (E) Anti-AT1R – Santa Cruz: todos incubados com proteínas de membranas totais. (F) Anti-B1 incubada com proteínas de membranas totais (controle negativo). Seta indicando a banda correspondente a proteína HSC70.

Não foi possível confirmar por co-imunoprecipitação se a interação entre a cauda C-terminal de AT1R e as proteínas GRP78 e subunidade beta da ATP sintase também ocorre *in vivo* como confirmado *in vitro*.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A proposta do trabalho foi buscar interações específicas entre a cauda C-terminal de AT1aR e proteínas de membrana apical e basolateral de túbulos proximais. Foram identificadas por espectrometria de massa, cinco proteínas (a enzima Dipeptidil Peptidase 4 (DPPIV); as subunidades α e β da ATP sintase; GRP78 e a HSC70) possíveis candidatas a interação com a cauda C-terminal de AT1aR de rato. A interação de três dessas proteínas (subunidade β da ATP sintase; GRP78 e HSC70) com a cauda C-terminal de AT1aR foi confirmada *in vitro*. As especulações a respeito de uma possível interação entre AT1aR e a DPPIV não foram aprofundadas, já que não encontramos evidências experimentais (ensaio de GST *pull-down*) de que a interação fosse específica. O mesmo ocorreu para a subunidade alfa da ATP sintase. De fato, essas duas proteínas foram as que apresentaram menor *score* de identidade nos resultados obtidos pela análise dos resultados da espectrometria de massa no software MASCOTE, apontando para a possibilidade de não corresponderem às proteínas contidas nos *spots* observados no gel após eletroforese bidimensional.

A ATP sintase é uma enzima com múltiplas subunidades ligada à membrana mitocondrial cuja função é catalisar a síntese de ATP utilizando o gradiente eletroquímico de prótons. A princípio, nos pareceu improvável a interação específica das duas subunidades (α e β) de ATP sintase mitocondrial com AT1aR, devido à localização mitocondrial desse complexo

protéico, no entanto, vários trabalhos recentes têm mostrado a presença deste na membrana plasmática de diversos tipos de células (81-86). Esta proteína já foi encontrada na superfície celular de hepatócitos (85), onde é apontada como receptor para apolipoproteína A-I (ApoA-I) e sua ativação estaria relacionada a endocitose de HDL (86).

Nós conseguimos demonstrar a interação de AT1aR com a subunidade beta da ATP sintase apenas no experimento *in vitro*, onde o ensaio de GST *pull-down* foi reproduzido e a interação foi confirmada por *western blotting* com o uso de anticorpo primário anti-subunidade beta da ATP sintase. Nos experimentos de imunoprecipitação e immunoblotting a partir de proteínas totais de córtex renal, não foi possível detectar essa proteína porque seu peso molecular é 52 kDa e ela foi encoberta pela cadeia pesada da imunoglobulina com peso molecular de 55 kDa. Desta forma, ainda não está excluída a interação entre a subunidade beta de ATP sintase e a cauda carboxi-terminal de AT1aR. Isso poderá ser confirmado em experimentos futuros com reagentes mais apropriados.

Outras duas proteínas identificadas por espectrometria de massa pertencem à família HSP das *Heat shock proteins* (HSP). As HSPs são classificadas em 5 sub-famílias, de acordo com o seu peso molecular. São elas: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e as pequenas HSPs, (87). Os membros desta classe específica de proteínas são também chamadas de chaperonas, que é um termo utilizado para designar proteínas que participam transitoriamente do dobramento de outras proteínas e na montagem de proteínas em estruturas oligoméricas. São caracterizadas pela

sua capacidade de se ligarem a proteínas não-nativas, dificultando interações intra ou intermoleculares incorretas, facilitar o transporte de proteínas a localizações intracelulares específicas e dar suporte na degradação de proteínas irreversivelmente danificadas. Em nosso trabalho, identificamos duas *Heat shock proteins* da família HSP70, a GRP78 e a HSC70.

A proteína GRP78, também chamada de *immunoglobulin heavy chain binding protein* (BiP) ou *glucose-regulated protein*, participa no dobramento correto e montagem de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático (RE), local onde é residente e auxilia no processo de translocação de proteínas pós-tradução para o RE (88). Estudos recentes mostram também a expressão desta proteína na membrana plasmática de diversos tecidos, onde está relacionada à transdução de sinal (89). A interação da GRP78 com o AT1R poderia ser parte do processo de movimentação do AT1R durante sua síntese e processamento.

Apesar de a interação de AT1aR com a GRP78 não ter sido observada nos experimentos de co-imunoprecipitação (*in vivo*), esta pôde ser confirmada nos experimentos *in vitro* (*western blot* após *GST pull-down*). É possível que a interação *in vitro* tenha sido observada devido à grande quantidade de proteína de fusão, mas não tenha sido observada *in vivo* devido à falta de sensibilidade da técnica, já que a quantidade de receptores AT1 no extrato protéico é muito menor que a quantidade de proteína de fusão imobilizada na resina.

A expressão da maioria das chaperonas é induzida por estresse físico ou metabólico, como calor ou baixa concentração de ATP, no entanto, muitas delas são constitutivamente expressas (88), como é o caso da outra HSP identificada no trabalho (HSC70). A HSP73, também chamada de HSC70 (71 kDa *heat shock cognate protein*) é o principal membro da família HSP70 constitutivamente expresso (88). Por meio de experimentos de *western blot* foi observado que há quantidades similares de HSC70 distribuídas por todas as zonas dos rins de ratos normais (90). Estudos sugerem que HSC70, juntamente com duas proteínas auxiliares, chamadas de co-chaperonas (*auxilin* e *cyclin-G-associated kinase* - GAK) são necessárias para a dissociação irreversível do revestimento de clatrina ao final do ciclo de endocitose. Além disso, há evidências de que HSC70 atue como chaperona para a clatrina dissociada no citosol e para a re-ligação de clatrina e de proteína acessória 2 (AP-2) para a membrana plasmática quando há nova formação de vesícula (91).

A endocitose mediada por clatrina é um dos principais mecanismos de internalização de proteínas, como o receptor para Angiotensina II, em células eucarióticas. Atualmente, é bem aceito que esse processo de endocitose é regulado por HSC70, a qual é uma ATPase que atua na reciclagem de clatrininas, retirando-as de vesículas internalizadas e reinserindo-as na membrana plasmática. A participação da HSC70 nesse processo foi comprovada pela inibição da endocitose com o uso de dominantes negativos para essa proteína (92).

Além da função na reciclagem de clatrinas, HSC70, assim como HSP70, parecem exercer algum papel na função de Aquaporina-2 (AQ2). Embora ambas as HSPs mostrem interação com AQP2, estas apresentam papéis fisiológicos distintos no tráfego dessa proteína, já que o tratamento *in vivo* com vasopressina levou ao direcionamento apenas de HSC70 e AQ2 para a membrana plasmática, o que não ocorreu com HSP70. *In vitro* o mesmo tratamento aumentou a interação entre AQ2 e HSC70, o que poderia sugerir que HSC70 levasse a diminuição da quantidade de AQ2 na membrana por aumento da sua internalização. No entanto, o estímulo com AVP (arginina vasopressina) levou a acúmulo de AQ2 na membrana, o que permite especular que HSC70 auxilie também na reinserção dessa proteína na membrana plasmática (93).

Levando-se em conta os aspectos levantados, uma possível interação de HSC70 com AT1R poderia ter função no tráfego intracelular desse receptor. Fisiologicamente, o mecanismo de endocitose de AT1R mediado pela interação com HSC70 poderia levar tanto a dessensibilização da célula em relação a Ang II por diminuir a quantidade de receptores na membrana, como promover a internalização do complexo AT1R-Ang II, permitindo o transporte de Ang II para o citosol e uma ação intracelular desse hormônio. Pode-se ainda especular que sob diversos estímulos, poderia ocorrer aumento de inserção de AT1R na membrana por aumento na interação com HSC70, como proposto para AQ2 em resposta ao AVP.

Embora muitos pesquisadores tenham por muito tempo tratado HSC70 e HSP70 (o membro da família que é induzível por estresse) como proteínas

equivalentes, muitas funções atribuídas a HSC70 não são associadas a HSP70. Goldfarb et. al demonstraram bioquímica e funcionalmente que essas proteínas possuem efeitos antagônicos na função, expressão na superfície celular e no tráfego intracelular do canal para sódio (Enac) em *Xenopus oocytes* (94).

A interação da cauda C-terminal de AT1R e HSP70, foi previamente observada por Lancot et. al em um trabalho onde a intensidade dessa ligação foi empregada como medida de avaliação da integridade do receptor quando submetido a glicosilações em diversos sítios das alças extracelularesuma vez que ele assumiu que essa interação se deve à função da HSP70 como chaperona. (95).

O resultado obtido por espectrometria de massa em nosso trabalho apontou, com elevado score de identificação, a proteína HSC70 como provável candidata a interação com a cauda C-terminal do receptor AT1, o que sugere possíveis novas funções para a interação de AT1R com membros da família HSP70, além do papel como chaperonas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que existe uma provável interação da cauda citoplasmática C-terminal do receptor AT1a com as proteínas HSC70, HRP78 e com a subunidade beta da ATP sintase, aventando possíveis vias de regulação do AT1aR pela interação com essas proteínas em membranas totais de tecido renal.

BIBLIOGRAFIA

7 BIBLIOGRAFIA

- (1) Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct 15;93(21):11968-73.
- (2) Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001 Dec 28;276(52):48623-6.
- (3) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000 Sep 1;87(5):E1-E9.
- (4) Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007 Mar;16(2):122-8.
- (5) Kurdi M, De Mello WC, Booz GW. Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 Jul;37(7):1357-67.
- (6) Haulica I, Bild W, Serban DN. Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2005 Dec;6(3):121-31.
- (7) Paul M, Poyan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006 Jul;86(3):747-803.
- (8) Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006 Jan;15(1):8-13.
- (9) Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med* 2008 Jun;86(6):615-21.
- (10) Ingelfinger JR, Pratt RE, Ellison K, Dzau VJ. Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest* 1986 Nov;78(5):1311-5.
- (11) Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J Clin Invest* 1990 Feb;85(2):417-23.

- (12) Moriyama T, Murphy HR, Martin BM, Garcia-Perez A. Detection of specific mRNAs in single nephron segments by use of the polymerase chain reaction. *Am J Physiol* 1990 May;258(5 Pt 2):F1470-F1474.
- (13) Seikaly MG, Arant BS, Jr., Seney FD, Jr. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 1990 Oct;86(4):1352-7.
- (14) Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 2000 Jan;13(1 Pt 2):31S-8S.
- (15) Douglas JG. Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. *Am J Physiol* 1987 Jul;253(1 Pt 2):F1-F7.
- (16) Kokkonen JO, Lindstedt KA, Kovanen PT. Role for chymase in heart failure: angiotensin II-dependent or -independent mechanisms? *Circulation* 2003 May 27;107(20):2522-4.
- (17) Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 2007 Jul;18(5):208-14.
- (18) Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008 Sep;264(3):224-36.
- (19) du CD, Chalumeau C, Defontaine N, Klein C, Kellermann O, Paillard M, et al. Angiotensin II stimulates NHE3 activity by exocytic insertion of the transporter: role of PI 3-kinase. *Kidney Int* 2003 Sep;64(3):939-49.
- (20) Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, et al. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* 1998 Jul;19(3):282-5.
- (21) Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M. Role of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 Mar;278(3):F375-F379.
- (22) Wu MS, Biemesderfer D, Giebisch G, Aronson PS. Role of NHE3 in mediating renal brush border Na⁺-H⁺ exchange. Adaptation to metabolic acidosis. *J Biol Chem* 1996 Dec 20;271(51):32749-52.
- (23) Aronson PS. Mechanisms of active H⁺ secretion in the proximal tubule. *Am J Physiol* 1983 Dec;245(6):F647-F659.

- (24) Wang T, Yang CL, Abbiati T, Schultheis PJ, Shull GE, Giebisch G, et al. Mechanism of proximal tubule bicarbonate absorption in NHE3 null mice. *Am J Physiol* 1999 Aug;277(2 Pt 2):F298-F302.
- (25) Harris PJ, Young JA. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflugers Arch* 1977 Jan 17;367(3):295-7.
- (26) Han HJ, Park SH, Koh HJ, Taub M. Mechanism of regulation of Na⁺ transport by angiotensin II in primary renal cells. *Kidney Int* 2000 Jun;57(6):2457-67.
- (27) Li Y, Yamada H, Kita Y, Kunimi M, Horita S, Suzuki M, et al. Roles of ERK and cPLA2 in the angiotensin II-mediated biphasic regulation of Na⁺-HCO₃⁻ transport. *J Am Soc Nephrol* 2008 Feb;19(2):252-9.
- (28) Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Froissart M, Poggioli J, Paillard M. Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na/H antiport activity in proximal tubule. *Kidney Int* 1996 Nov;50(5):1496-505.
- (29) Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 1992 Feb 24;298(2-3):257-60.
- (30) Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Mar 31;183(3):1090-6.
- (31) Harrison-Bernard LM, Monjure CJ, Bivona BJ. Efferent arterioles exclusively express the subtype 1A angiotensin receptor: functional insights from genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 May;290(5):F1177-F1186.
- (32) Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 1999 Jan;10 Suppl 11:S30-S39.
- (33) Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 Sep;3(9):639-50.
- (34) Oliveira L, Costa-Neto CM, Nakaie CR, Schreier S, Shimuta SI, Paiva AC. The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure. *Physiol Rev* 2007 Apr;87(2):565-92.
- (35) Thekkumkara T, Linas SL. Role of internalization in AT(1A) receptor function in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Apr;282(4):F623-F629.

- (36) Schelling JR, Hanson AS, Marzec R, Linas SL. Cytoskeleton-dependent endocytosis is required for apical type 1 angiotensin II receptor-mediated phospholipase C activation in cultured rat proximal tubule cells. *J Clin Invest* 1992 Dec;90(6):2472-80.
- (37) Becker BN, Cheng HF, Harris RC. Apical ANG II-stimulated PLA2 activity and Na⁺ flux: a potential role for Ca²⁺-independent PLA2. *Am J Physiol* 1997 Oct;273(4 Pt 2):F554-F562.
- (38) Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 2002 Sep;35(9):1001-15.
- (39) Balbi AP, Francescato HD, Marin EC, Costa RS, Coimbra TM. Roles of mitogen-activated protein kinases and angiotensin II in renal development. *Braz J Med Biol Res* 2009 Jan;42(1):38-43.
- (40) Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 2001 May;100(5):481-92.
- (41) Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW, Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 1999 Sep;277(3 Pt 2):F437-F446.
- (42) Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, el-Dahr SS. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 1997 Jul;273(1 Pt 2):F170-F177.
- (43) Zhuo J, Dean R, Maric C, Aldred PG, Harris P, Alcorn D, et al. Localization and interactions of vasoactive peptide receptors in renomedullary interstitial cells of the kidney. *Kidney Int Suppl* 1998 Sep;67:S22-S28.
- (44) Li XC, Zhuo JL. Intracellular ANG II directly induces in vitro transcription of TGF-beta1, MCP-1, and NHE-3 mRNAs in isolated rat renal cortical nuclei via activation of nuclear AT1a receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008 Apr;294(4):C1034-C1045.
- (45) Cook JL, Mills SJ, Naquin RT, Alam J, Re RN. Cleavage of the angiotensin II type 1 receptor and nuclear accumulation of the cytoplasmic carboxy-terminal fragment. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 Apr;292(4):C1313-C1322.
- (46) Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:289-319.

- (47) Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gaborik Z. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept* 2000 Jul 28;91(1-3):29-44.
- (48) Sorkin A, Von ZM. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 Aug;3(8):600-14.
- (49) Gaborik Z, Szaszak M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt KJ, et al. Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol* 2001 Feb;59(2):239-47.
- (50) Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 1996 Aug 2;271(31):18302-5.
- (51) Urrutia R, Henley JR, Cook T, McNiven MA. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Jan 21;94(2):377-84.
- (52) Wyse BD, Prior IA, Qian H, Morrow IC, Nixon S, Muncke C, et al. Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. *J Biol Chem* 2003 Jun 27;278(26):23738-46.
- (53) Leclerc PC, Auger-Messier M, Lanctot PM, Escher E, Leduc R, Guillemette G. A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* 2002 Dec;143(12):4702-10.
- (54) Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension* 1998 Sep;32(3):459-66.
- (55) Innamorati G, Sadeghi HM, Tran NT, Birnbaumer M. A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 3;95(5):2222-6.
- (56) Trejo J, Coughlin SR. The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem* 1999 Jan 22;274(4):2216-24.
- (57) Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SS. Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol* 2000 Dec;14(12):2040-53.

- (58) Mahon MJ, Donowitz M, Yun CC, Segre GV. Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature* 2002 Jun 20;417(6891):858-61.
- (59) Thomas WG, Baker KM, Motel TJ, Thekkumkara TJ. Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic face of a putative amphipathic helix. *J Biol Chem* 1995 Sep 22;270(38):22153-9.
- (60) Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ. Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J Biol Chem* 1994 Dec 16;269(50):31378-82.
- (61) Tang H, Guo DF, Porter JP, Wanaka Y, Inagami T. Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res* 1998 Mar 23;82(5):523-31.
- (62) Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA, Mihalik B, Jayadev S, Catt KJ. Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT1a receptor is localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol* 1998 Dec;54(6):935-41.
- (63) Dechend R, Muller DN, Wallukat G, Homuth V, Krause M, Dudenhausen J, et al. AT1 receptor agonistic antibodies, hypertension, and preeclampsia. *Semin Nephrol* 2004 Nov;24(6):571-9.
- (64) Shirai H, Takahashi K, Katada T, Inagami T. Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 1995 Apr;25(4 Pt 2):726-30.
- (65) Franzoni L, Nicastro G, Pertinhez TA, Tato M, Nakaie CR, Paiva AC, et al. Structure of the C-terminal fragment 300-320 of the rat angiotensin II AT1A receptor and its relevance with respect to G-protein coupling. *J Biol Chem* 1997 Apr 11;272(15):9734-41.
- (66) Sano T, Ohyama K, Yamano Y, Nakagomi Y, Nakazawa S, Kikyo M, et al. A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A. *J Biol Chem* 1997 Sep 19;272(38):23631-6.
- (67) Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 1989 Aug 18;245(4919):718-25.
- (68) Brown GP, Douglas JG. Angiotensin II binding sites on isolated rat renal brush border membranes. *Endocrinology* 1982 Dec;111(6):1830-6.

- (69) Brown GP, Douglas JG. Angiotensin II-binding sites in rat and primate isolated renal tubular basolateral membranes. *Endocrinology* 1983 Jun;112(6):2007-14.
- (70) Schelling JR, Hanson AS, Marzec R, Linas SL. Cytoskeleton-dependent endocytosis is required for apical type 1 angiotensin II receptor-mediated phospholipase C activation in cultured rat proximal tubule cells. *J Clin Invest* 1992 Dec;90(6):2472-80.
- (71) Schelling JR, Linas SL. Angiotensin II-dependent proximal tubule sodium transport requires receptor-mediated endocytosis. *Am J Physiol* 1994 Mar;266(3 Pt 1):C669-C675.
- (72) Becker BN, Cheng HF, Burns KD, Harris RC. Polarized rabbit type 1 angiotensin II receptors manifest differential rates of endocytosis and recycling. *Am J Physiol* 1995 Oct;269(4 Pt 1):C1048-C1056.
- (73) Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L. The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett* 2003 Jul 3;546(1):65-72.
- (74) Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, Griesse DP, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem* 1999 Jun 11;274(24):17058-62.
- (75) Guo DF, Chenier I, Tardif V, Orlov SN, Inagami T. Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Oct 31;310(4):1254-65.
- (76) Guo DF, Chenier I, Lavoie JL, Chan JS, Hamet P, Tremblay J, et al. Development of hypertension and kidney hypertrophy in transgenic mice overexpressing ARAP1 gene in the kidney. *Hypertension* 2006 Sep;48(3):453-9.
- (77) Guo DF, Tardif V, Ghelima K, Chan JS, Ingelfinger JR, Chen X, et al. A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. *J Biol Chem* 2004 May 14;279(20):21109-20.
- (78) Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004 May;25(9):1327-33.
- (79) Aronson PS. Energy-dependence of phlorizin binding to isolated renal microvillus membranes. Evidence concerning the mechanism

of coupling between the electrochemical Na⁺ gradient the sugar transport. *J Membr Biol* 1978 Jul 21;42(1):81-98.

- (80) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7;72:248-54.
- (81) Osanai T, Tomita H, Kushibiki M, Yamada M, Tanaka M, Ashitate T, et al. Coupling factor 6 enhances Src-mediated responsiveness to angiotensin II in resistance arterioles and cells. *Cardiovasc Res* 2009 Mar 1;81(4):780-7.
- (82) Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, et al. An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiotensin on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 2005 Jan 21;280(3):1740-5.
- (83) Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, et al. Angiotensin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Mar 16;96(6):2811-6.
- (84) Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, et al. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiotensin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jun 5;98(12):6656-61.
- (85) Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003 Jan 2;421(6918):75-9.
- (86) Fabre AC, Vantourout P, Champagne E, Terce F, Rolland C, Perret B, et al. Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y (13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cell Mol Life Sci* 2006 Dec;63(23):2829-37.
- (87) Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007 Jan;81(1):15-27.
- (88) Beck FX, Neuhofer W, Muller E. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 Aug;279(2):F203-F215.
- (89) Quinones QJ, de Ridder GG, Pizzo SV. GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. *Histol Histopathol* 2008 Nov;23(11):1409-16.

- (90) Muller E, Neuhofer W, Ohno A, Rucker S, Thureau K, Beck FX. Heat shock proteins HSP25, HSP60, HSP72, HSP73 in isoosmotic cortex and hyperosmotic medulla of rat kidney. *Pflugers Arch* 1996 Feb;431(4):608-17.
- (91) Eisenberg E, Greene LE. Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 2007 Jun;8(6):640-6.
- (92) Chang HC, Newmyer SL, Hull MJ, Ebersold M, Schmid SL, Mellman I. Hsc70 is required for endocytosis and clathrin function in *Drosophila*. *J Cell Biol* 2002 Nov 11;159(3):477-87.
- (93) Lu HA, Sun TX, Matsuzaki T, Yi XH, Eswara J, Bouley R, et al. Heat shock protein 70 interacts with aquaporin-2 and regulates its trafficking. *J Biol Chem* 2007 Sep 28;282(39):28721-32.
- (94) Goldfarb SB, Kashlan OB, Watkins JN, Suaud L, Yan W, Kleyman TR, et al. Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Apr 11;103(15):5817-22.
- (95) Lanctot PM, Leclerc PC, Clement M, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, et al. Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem J* 2005 Aug 15;390(Pt 1):367-76.