



UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA
Centro Internacional de Estudos
de Doutoramento e Avanzados
(CIEDUS)

José Antonio
Costoya
Puente

Tese de Doutoramento

La Hormona de
Crecimiento (GH) como
factor de supervivencia
celular

Santiago de Compostela, 1998

Escola de Doutoramento Internacional en Ciencias da Saúde



Universidade de Santiago de Compostela

La Hormona de Crecimiento (GH) como factor de supervivencia celular

José Antonio Costoya Puente

Departamento de Fisioloxía

Facultade de Medicina



D. Jesús Devesa Múgica, Catedrático de Universidad y D. Víctor Manuel Arce Vázquez, Profesor Titular del Departamento de Fisioloxía de la Universidade de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “La Hormona de Crecimiento (GH) como factor de supervivencia celular”, elaborada por el licenciado en Medicina y Cirugía D. José Antonio Costoya Puente, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Fisioloxía de esta Universidad, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, Septiembre de 1998.



Fdo. Jesús Devesa Múgica

Fdo. Víctor Manuel Arce Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A Jesús Devesa y Víctor Arce, directores de este trabajo, por su apoyo continuo a lo largo de todos los años que han estado dirigiendo mi trabajo y de los que he aprendido y sigo haciéndolo día a día.

A Fernando Domínguez y Juan Zalvide por haberme introducido en el mundo de la biología y genética molecular, en lo que contribuyó de forma importante en lo segundo a Ángel Carracedo y todo el Departamento de Medicina Legal.

A Carlos Diéguez y Rosa Señarís por sus consejos y apoyo a lo largo de todo este tiempo.

A mis compañeros de grupo José Ramón, Mónica, Ramón, Marián, por los momentos inolvidables que hemos compartido, algunos especialmente.

A los miembros de los laboratorios de Endocrinología Celular, Microbiología, Bioquímica e Histología, en especial a Rosalía Gallego por su ayuda en parte de la realización de este trabajo.

Al profesor Paul Kelly, director de la Unité 344 del INSERM por haberme aceptado como un miembro más de su unidad durante mi estancia en la misma, y en especial al grupo de la Dra. Jöelle Finidori, entre los cuales destacaré a Soraya, Sébastien , Jérôme, entre los que me he sentido como uno más, y en general a toda la unidad.

Al Dr. Juan Viñuela, del C.H.U.S. por su ayuda en la realización de las citometrías de flujo.

Al Dr. Peter Lobie del Instituto de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Singapur por la cesión del anticuerpo monoclonal anti-GHR.

Al Prof. J.A.F. Tresguerres del Departamento de Fisiología de la Universidad Complutense de Madrid por la cesión del anticuerpo policlonal anti-GH.

A todos los compañeros del laboratorio que a lo largo de todos estos años, desde que comencé como estudiante de esta facultad, han sido muchos. Todos ellos han hecho que el ambiente no sólo científico sino personal haya sido agradable. Sería muy largo el citarlos a todos/as, pero no puedo más que citar a Luis Lima, Gonzalo, Montse, Luli, Puri, Clara y como no Carmen y Anxo, con el que he tenido más que una discusión científica y no científica.



A quien más se lo debo...

ABREVIATURAS

ADN	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>	GHR	<i>Growth Hormone Receptor/</i>
ADNc	<i>Ácido desoxirribonucléico complementario</i>		<i>Receptor de la hormona de crecimiento</i>
AH	<i>Akt Homology</i>	GHR-D3	<i>Growth Hormone Receptor-Deletion exon 3/Receptor de la hormona de crecimiento forma delecionada del exón 3</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>		
ARNm	<i>Ácido ribonucleico mensajero</i>	GRF	<i>Growth Hormone-Releasing Factor/Factor liberador de hormona de crecimiento</i>
BH	<i>Bcl-2 Homology</i>	GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3/Quinasa de la glucógeno sintetasa 3</i>
CNF	<i>Factor neutrófilo ciliar</i>	HBP	<i>Hélix Bundle Peptide</i>
CRE	<i>cAMP Response Element</i>	hCS-L	<i>Human chorionic somatomotropin-L/Somatotropina coriónica-L humana</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>	hCS-A	<i>Human chorionic somatomotropin-A/Somatotropina coriónica-A humana</i>
DMSO	<i>Dimetil sulfoxido</i>	hCS-B	<i>Human chorionic somatomotropin-B/Somatotropina coriónica-B humana</i>
ECACC	<i>Colección Europea de Cultivos Celulares Animales</i>	hGH	<i>Human growth Hormone/Hormona de crecimiento humana</i>
EDTA	<i>Etilén-diamino-tetraacetato</i>	ICE	<i>cysteine protease Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor/Factor de crecimiento epidérmico</i>	IGF-I	<i>Insulin-like Growth factor-I</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor/Receptor del factor de crecimiento epidérmico</i>	INF- α	<i>Interferón α</i>
EPO	<i>Eritropoyetina</i>	INF- β	<i>Interferón β</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>	INF- γ	<i>Interferón γ</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum/Suero Bovino Fetal</i>	IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
FICT	<i>Fluorescein Isotiocianato</i>	Jak-2	<i>Janus kinase-2</i>
G-CSF	<i>Granulocitic-colony stimulatory factor/Factor estimulador de colonias de granulocitos</i>	LIF	<i>Leukemia inhibitory factor/Factor inhibidor de la leucemia</i>
GM-CSF	<i>Granulocitic monocitic-colony stimulatory factor/Factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos</i>	MAPK/Erks	<i>Mitogen Activated Protein Kinases/Extracellular signal</i>
GH	<i>Growth Hormone- Hormona de crecimiento</i>		
GHF-1	<i>Growth Hormone Factor-1</i>		
GHRH	<i>Growth Hormone-Releasing Hormone/Hormona liberadora de hormona de crecimiento</i>		
GH-V	<i>GH variant/Variante de la hormona de crecimiento</i>		

MMLVRT	Regulated Kinases <i>Murine mieloblastic leukemia virus retrotranscriptase/Retrotranscriptasa del virus de la leucemia mieloblástica murina</i>	SDS	rosina Sodium dodecyl sulphate/Dodecilsulfato sódico
PACAPs	<i>Pituitary Adenilate Cyclase Activating Peptides</i>	RAC-PK	Related to the <i>A</i> an <i>C</i> Protein Kinase
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis/Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
PARP	<i>Poly ADP-Ribose Polyribomerase</i>	RPS	<i>Rabitt preimmune serum/Suero preimmune de conejo</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline/Tampón fosfato</i>	RRA	<i>Radio receptor assay/Radioreceptor ensayo</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction/Reacción en cadena de la polimerasa</i>	RT-PCR	<i>Retrotranscriptase-polymerase chain reaction/Retrotranscriptasa- reacción en cadena de la polimerasa</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1</i>	SHP-1	<i>SH2-containing Phosphatase 1</i>
PDK2	<i>Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 2</i>	SHP-2	<i>SH2-containing Phosphatase 2</i>
PH	<i>Pleckstrin-Homology</i>	SRIF	<i>Somatotropin Release-Inhibiting Factor/Factor inhibidor de la liberación de somatotropina</i>
PI3-K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>	SS	Somatostatina
Pit-1	<i>Pituitary-1</i>	STATs	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
PKB	<i>Protein Kinase B/Proteína quinasa B</i>	STH	<i>Somatotropic Hormone-Hormona somatotropa</i>
PKC	<i>Protein Kinase C/Proteína quinasa C</i>	TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
PMSF	<i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i>	TRE	<i>Thyroid Hormone Response Element</i>
PRL	Pro lactina	TRICT	<i>Texas Red Isotiocianato</i>
PTPs	<i>Phosphotyrosine phosphatases/Fosfotirosina-fosfatasas</i>	TUNEL	<i>Terminal UTP nick end labeling</i>
PTyr	<i>Phospho-tyrosine/Fosfoti-</i>		

INDICE

RESUMEN	1
<i>SUMMARY</i>	3
INTRODUCCIÓN	5
I. Hormona de Crecimiento	6
• ASPECTOS GENERALES	6
• ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL GEN hGH-N	8
• ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA GH	10
II. Receptor de la hormona de crecimiento (GHR)	13
• ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL GEN DE GHR	13
• ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE GH	14
• DISTRIBUCIÓN DE GHR	16
• INTERACCIÓN HORMONA-RECEPTOR. MECANISMO DE TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL	17
• ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO	21
III. Supervivencia celular	24
• PAPEL DE LA APOPTOSIS EN EL CONTROL DEL DESARROLLO Y CRECIMIENTO.	24
• PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LAS VÍAS DE INDUCCIÓN DE SUPERVIVENCIA CELULAR	25
OBJETIVOS	29

MATERIALES Y MÉTODOS	31
<i>Cultivos celulares</i>	32
<i>Extractos celulares</i>	32
<i>RT-PCR</i>	33
<i>Western blot</i>	34
<i>Fluoroimmunoensayo</i>	34
<i>Análisis de la fragmentación de ADN</i>	35
<i>TUNEL</i>	35
<i>Ensayo quinasa Akt</i>	35
<i>Inmunohistoquímica estructural</i>	36
<i>Inmunohistoquímica</i>	36
RESULTADOS	38
I. Caracterización del modelo celular	39
II. Papel de la GH en la línea celular	48
HL-60 y vías de señalización implicadas	
III. Vías de señalización inductoras de	
supervivencia celular mediadas por GH	52
DISCUSIÓN	56
<i>DISCUSSION</i>	60
CONCLUSIONES	64
<i>CONCLUSIONS</i>	66
BIBLIOGRAFÍA	68

RESUMEN

RESUMEN

El crecimiento es un complejo proceso que refleja principalmente el incremento en el número de células de un organismo, y que depende del balance entre proliferación y muerte celular. Uno de los principales factores implicado en el control del crecimiento es la hormona de crecimiento (GH), producida principalmente por las células somatotropas de la adenohipófisis, aunque se ha descrito también la existencia de síntesis de GH fuera de la hipófisis. En el presente estudio, analizamos el papel de esta GH extrahipofisaria, en el control del crecimiento celular en células HL-60 (leucemia mieloblástica aguda con diferenciación). Nuestros resultados muestran que las células HL-60 expresan y liberan GH, presentando a su vez receptores activos en su membrana celular. La expresión de GH se encuentra incrementada en células proliferantes en comparación a aquellas que han cesado su proliferación, lo que sugiere que la hormona participa en el control del crecimiento. De acuerdo con esta hipótesis, el bloqueo de la GH producida localmente con anticuerpos anti-GH redujo el crecimiento de las células HL-60. Estudios de la fragmentación de ADN demostraron que este efecto es secundario a un incremento en la apoptosis celular, lo que indica que la GH actúa como un factor de supervivencia autocrino/paracrino. Las vías intracelulares que dirigen este mecanismo fueron investigadas tanto en células HL-60 como en clones de células CHO transfectados con el receptor de GH o con una forma truncada del mismo ($\Delta 454$ GHR) caracterizada ésta por una activación sostenida de Jak-2, la tirosina quinasa asociada al receptor. En todos los casos la activación de GHR produjo un incremento en la fosforilación de Akt, una serina-treonina quinasa que juega un importante papel en las vías de supervivencia celular.



hormona de crecimiento (GH)
receptor
GHR
supervivencia celular
3205 02

SUMMARY



SUMMARY

Growth is a complex process that mainly reflects a continuous increase in cell number which, in turn, depends on the balance between cell proliferation and cell death. One of the best recognised factors involved in systemic control of body growth is growth hormone (GH), a polypeptide hormone that is mainly produced by the somatotropic cells of the adenohypophysis. In this study we evaluated the role of locally-produced growth hormone (GH) in the control of cell growth in HL-60 cells (human acute myeloblastic leukemia with differentiation). Our results show that HL-60 cells express and release immunoreactive GH and bear fully active GH-receptor (GHR) in their plasma membrane. Interestingly GH expression is increased in proliferating cells as compared with arrested cells, suggesting that the hormone may play a role in the control of cell growth. In keeping with this hypothesis, blockade of locally-produced GH with anti-GH antibodies reduced the growth of HL-60 cells. Studies on DNA fragmentation demonstrated that this effect is secondary to an increase in cell apoptosis, thus suggesting that GH is acting as an autocrine/paracrine survival factor. The intracellular pathways underlying this mechanism were investigated in HL-60 cells and in CHO clones transfected with either the wild type GHR, or a truncated form of it ($\Delta 454$ GHR) characterized by a sustained activation of the receptor-associated tyrosine-kinase Jak-2. In all cases GHR activation results in increased phosphorylation of Akt, a serine/threonine kinase that reportedly plays a major role in the stimulation of survival pathways.

INTRODUCCIÓN

I. Hormona de crecimiento

ASPECTOS GENERALES

El crecimiento es un proceso complejo, fruto del continuo incremento en el número de células que resulta del balance entre la proliferación y la muerte celular (Raff, 1996). Uno de los factores que interviene en este proceso es la hormona de crecimiento hipofisaria (GH, *Growth Hormone*), sintetizada por las células somatotropas, particularmente abundantes en las zonas laterales de la adenohipófisis, desde donde es vertida a la circulación.

En condiciones fisiológicas, la hipófisis humana contiene entre 5 y 10 mg de GH, lo que supone prácticamente un 10% del peso en seco de la glándula (Strobl y Thomas, 1994). Aproximadamente un 90% de la GH es una proteína

de 191 aminoácidos, con un peso molecular de 22.650 Da, denominada GH-22K. El 10% restante está constituido principalmente por una proteína de 20.269 Da (GH-20K), que carece de los aminoácidos localizados entre las posiciones 32 y 46. Por último, un pequeño porcentaje de variantes se origina por modificaciones postraduccionales (desamidación, acetilación, agregación) de las formas anteriores (Baumann, 1991).

Tanto la síntesis como la secreción de GH por la hipófisis están controladas por el hipotálamo, fundamentalmente a través de dos neurohormonas: una de carácter estimulador, la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH, *Growth Hormone-Releasing Hormone*), denominada también GRF (*Growth Hormone-*

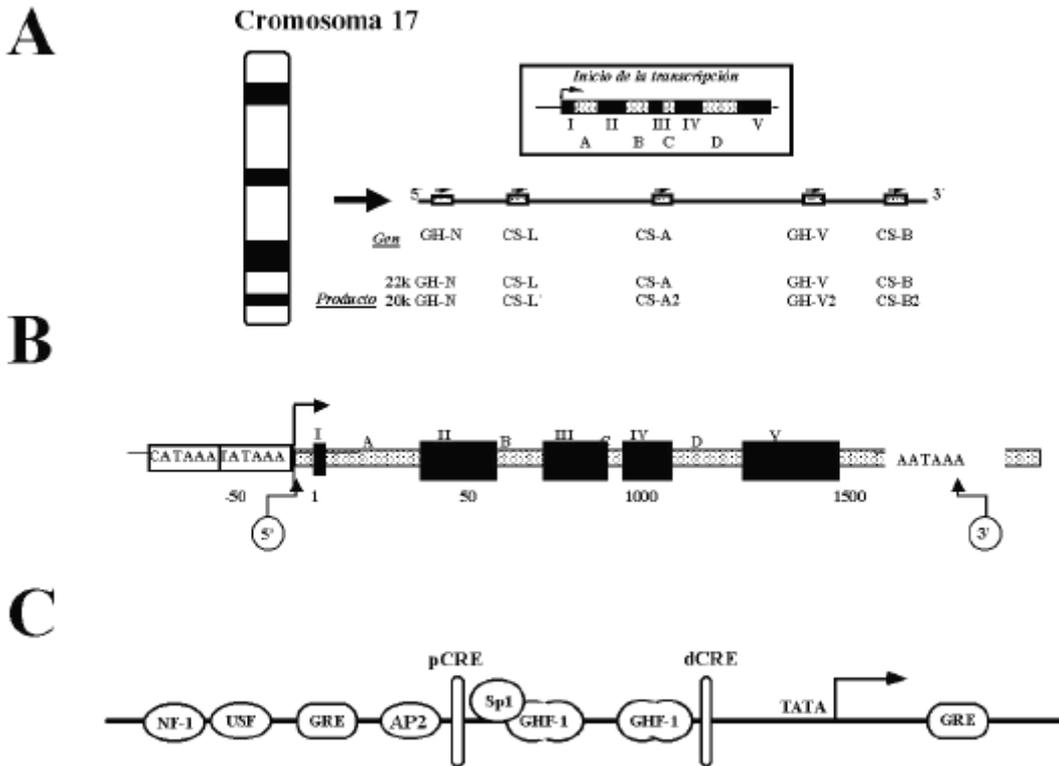


Figura 1. Familia de genes hGH. A. Esquema de la estructura del *cluster* de la familia de genes hGH; B. Organización de exones e intrones en el gen hGH-N; C. Promotor del gen hGH-N, en el que se localizan los diferentes elementos de respuesta de los factores.

Releasing Factor) o somatotropina; y otra de carácter inhibitorio, la somatostatina (SS o SRIF, Somatotropin Release-Inhibiting Factor). A su vez, tanto la síntesis como la liberación de GHRH y SS están regulados por un gran número de neurotransmisores, hormonas y señales metabólicas. Ambas neurohormonas son liberadas de forma rítmica y alternante a la circulación portal (Devesa et al, 1992; Plotsky y Vale, 1985), induciendo una secreción epi-

sódica de GH, en la que cada bolsa de secreción es originada por un aumento de la liberación de GHRH junto con una disminución de la liberación de SS. Existen también datos que sugieren que junto con GHRH y SS, existen otros factores hipotálamicos implicados en el control de la secreción de GH. Este es el caso de los PACAPs (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptides*) (Kimura et al., 1990), o de otros

factores, todavía no identificados, que actuarían como agonistas de los recientemente identificados receptores de una familia de péptidos sintéticos denominados genéricamente GHRPs (*Growth Hormone-Releasing Peptides*) (Bowers et al., 1990; Howard et al, 1996).

Recientemente, se ha descrito la existencia de síntesis de una GH idéntica a la hipofisaria en diversos tejidos extrapituitarios, concretamente, en células hemáticas (Weigent et al, 1988; Kooijman et al, 1997) y en glándula mamaria (Mol et al, 1995a; Mol et al, 1995b). El significado fisiológico de estas variantes extrahipofisarias se desconoce por el momento, pero parece que estarían implicadas en mecanismos de control local del crecimiento.

ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL GEN hGH-N

La GH hipofisaria (así como la sintetizada en las localizaciones extrahipofisarias que acabamos de describir) está codificada por el gen hGH-N, uno de los miembros de la denominada familia de genes GH, constituida por un *cluster* de cinco genes, que junto con el gen de la prolactina (PRL), derivan de

un gen ancestral común. A su vez, tanto la PRL como los miembros de la familia GH se encuentran incluidos dentro de una superfamilia de hormonas estructuralmente relacionadas, las denominadas HBP (*Helix Bundle Peptides*), de la que también forman parte la mayoría de citoquinas.

El *cluster* de genes GH se localiza en la banda q22-q24 del brazo largo del cromosoma 17, y está constituido (además del gen hGH-N), por los genes que codifican la pseudosomatotropina coriónica (hCS-L o *CS-like*), somatomotropina coriónica (hCS-A y hCS-B) y GH variante (hGH-V) (Chen et al., 1989). Todos ellos presentan una organización similar, con 5 exones separados por 4 intrones y una gran homología (en torno al 90%). (Chen et al, 1989). El gen hGH-N es el único de los miembros del *cluster* que se expresa en el período postnatal, ya que el resto de los miembros se expresan en la placenta, durante el período de vida fetal (Figura 1A).

El gen hGH-N tiene una longitud aproximada de 2300 pares de bases (pb), y en él se pueden distinguir tres regiones que en sentido 5'-3' son: 1) una región 5' no codificante, de aproximadamente 500 pb de extensión, que contiene los elementos reguladores del gen 2) una región que codifica el RNA

primario, que se extiende a lo largo de aproximadamente 1600 pb, y 3) una región 3' no codificante, en la que se encuentra la secuencia de poliadenilación (Figura 1B). La región 5' no codificante contiene el promotor del gen, y en ella se localizan las secuencias consenso CATAAA y TATAAA (*TATA box*) características de los promotores de eucariotas, así como dos secuencias de unión para un factor de transcripción específico denominado GHF-1 o Pit-1 (*Growth Hormone Factor-1* o *Pituitary-1*). En esta región se localizan también elementos de respuesta al AMP cíclico (denominadas pCRE, *proximal cAMP Response Element* y dCRE, *distal CRE*) (Shepard et al, 1994); al receptor de glucocorticoides (Slater et al., 1985; Eliard et al., 1985), al receptor de la vitamina D₃ (Alonso et al, 1998) y a una serie de factores de transcripción ubi-cuos (Theill y Karin, 1993) (Figura 1C).

En la rata, existe además un elemento silenciador, al que se uniría una proteína aún no identificada, de 45.000 Daltons y similar a NF-1 (Pan et al, 1990, Roy et al, 1992) que sería responsable de la represión del gen en aquellos tipos celulares en los que no existe síntesis de GH. En esta misma especie existen también elementos de respuesta para el receptor de hormonas tiroideas (TRE; *Thyroid Hormone Res-*

ponse Element) (Theill y Karin, 1993). Ninguno de estos dos elementos ha sido todavía identificado en humanos.

De todos ellos, el más importante es GHF-1. Se trata de una proteína altamente conservada, perteneciente a la familia de factores de transcripción con dominios POU que forman, a su vez, parte del grupo de genes denominados *homeobox*, implicados en procesos de desarrollo y diferenciación celular (Ruvkun y Finney, 1991; Theill y Karin, 1993). En humanos, el gen que codifica GHF-1 se localiza en el cromosoma 20, y consta de 6 exones separados por 5 intrones (Lew y Elsholtz 1991). En la hipófisis, GHF-1 controla la transcripción de los genes de GH, PRL, cadena β de la TSH, receptor de GHRH y de su propio gen (Theill y Karin, 1993). Además, GHF-1 resulta también esencial para el desarrollo, diferenciación y supervivencia de las células somatotropas, lactotropas y algunas poblaciones de tiotropas (Castrillo et al, 1991).

Además de por GHF-1, la transcripción del gen de GH en humanos es también incrementada por GHRH y por glucocorticoides e inhibida por SS (Theill y Karin, 1993). El efecto de la GHRH está mediado principalmente por un incremento de los niveles de AMP-cíclico intracelular que a su vez originan un aumento de la síntesis de una o va-

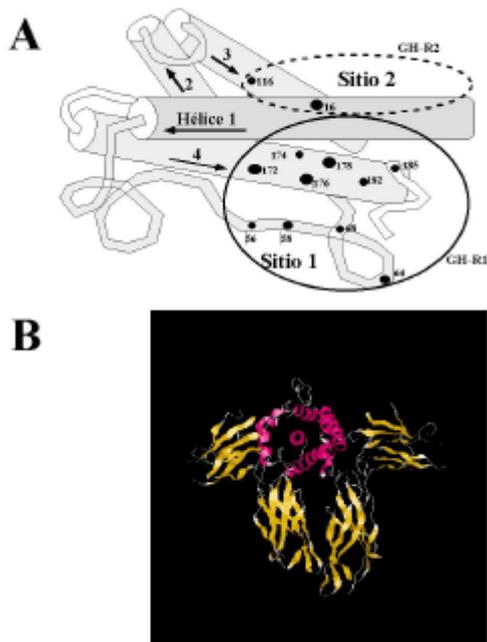


Figura 2. A. Estructura química de la GH, en la que se señalan los dos sitios de unión al receptor, así como la afinidad de los diferentes residuos por el mismo. **B.** Estructura cristalográfica obtenida mediante difracción de rayos X, de la unión de la GH a su receptor (dimerizado) (Protein Data Base, Brookhaven National Laboratory, EE.UU.)

rias proteínas CREB/ATF-1 que se unen a los dos CRE del promotor de GH, incrementando la transcripción del gen.

En la rata, existe además un efecto indirecto de GHRH, mediado por la unión de CREB a secuencias CRE existentes en el promotor del gen de GHF-1. La SS contrarresta estos efectos a través de una inhibición de la síntesis

de AMPc. En el caso de los glucocorticoides, su efecto se produce por acción directa de su receptor sobre los elementos de respuesta localizados a nivel del promotor y del primer exón. Parece ser que los glucocorticoides ejercen una función facilitadora: la unión del receptor de glucocorticoides activado a su elemento de respuesta modificaría la disposición de los nucleosomas sobre el promotor del gen, facilitando así el acceso del resto de factores de transcripción (fundamentalmente GHF-1 y CREB) a sus secuencias de unión específicas (Theill y Karin, 1993). Un mecanismo similar actuaría en la rata en el caso de los receptores de hormonas tiroideas.

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA GH

La variante de 22kDa consta de 191 aminoácidos, dispuestos en una única cadena, con dos puentes disulfuro intracatenarios que unen las cisteínas con ocupan las posiciones 53 y 182 con las localizadas en las posiciones 165 y 189 respectivamente. Estos puentes disulfuro resultan fundamentales para el mantenimiento de la conformación activa de la hormona, cuya estructura

cuaternaria ha sido determinada a partir de estudios cristalográficos (DeVos et al, 1992, Somers et al, 1994). Como ocurre con todas las hormonas HBP, la GH presenta 4 hélices α dispuestas de forma que las dos primeras son paralelas entre sí, pero antiparalelas a las otras dos. Las hélices localizadas en los extremos N-terminal y C-terminal (denominadas hélice 1 y 4 respectivamente) son las más largas (26 y 30 residuos respectivamente, frente a los 21 y 23 residuos de las otras dos). Las hélices 1 y 2 están unidas por un *loop* de 36 aminoácidos, correspondientes a los residuos 35-71, que está, a su vez, unido a la hélice 4 mediante uno de los puentes disulfuro (Cys53-Cys165) (el otro puente disulfuro se establece entre la Cys182 de la hélice 4 y la Cys189 del extremo C-terminal de la molécula). Una conexión similar de 25 aminoácidos existe entre las hélices 3 y 4 (correspondiente a los residuos 129-154), mientras que las hélices 2 y 3 están unidas por un *loop* más corto, de únicamente 12 aminoácidos (residuos 93-105). Además de estas 4 hélices que constituyen el núcleo de la estructura cuaternaria de la GH-22K, se han encontrado otras 3 minihélices. Dos de ellas se encuentran al inicio (residuos

38-47) y al final (residuos 64-70) del *loop* que conecta las hélices 1 y 2, mientras que la tercera está en el *loop* que conecta las hélices 2 y 3 (residuos 94-100). Esta especial disposición, que no la más habitual fuera de esta familia, va a ser fundamental a la hora de determinar la unión de la GH a su receptor, y de hecho todas las hormonas HBP se unen a receptores que presentan una serie de características comunes que los agrupan dentro de la denominada superfamilia de receptores hematopoiéticos (Bazan, 1989).

Dado que la unión de la GH a su receptor se produce en relación 1:2 (una molécula de GH y dos moléculas de receptor), existen dos epitopos de reconocimiento del receptor en cada molécula de GH, localizados en extremos opuestos del núcleo de hélices alfa. El primero de estos epitopos (denominado sitio 1) está constituido por los residuos localizados fundamentalmente en la hélice 4 y en menor medida en la hélice 1 y en la zona de conexión entre las hélices 1 y 2. El segundo epitopo (sitio 2) se corresponde con aminoácidos localizados en las hélices 1 y 3, junto con varios aminoácidos del extremo N-terminal de la molécula (DeVos et al, 1992, Somers et al, 1994) (Figura 2).

II. Receptor de la hormona de crecimiento (GHR)

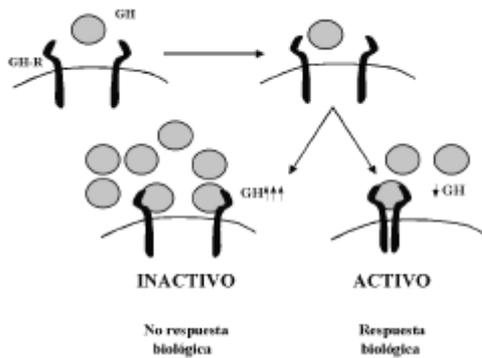


Figura 3. Mecanismo de dimerización de GHR tras la unión del ligando.

Como ya indicamos anteriormente, mediante estudios cristalográficos se ha podido comprobar que la GH forma un complejo con su receptor, con una estequiometría 2:1. Esta dimerización ocurre de forma secuencial: una molécula de receptor se une al sitio 1 de

unión de la hormona, y a continuación un segundo receptor se une al sitio 2 de la misma molécula. Curiosamente, aunque la forma de los dos lugares de unión de la hormona es bastante diferente, los residuos aminoacídicos del receptor implicados son los mismos en ambos casos. Esta característica del proceso de unión de la GH a su receptor determinará, por tanto, que la actividad máxima de la GH se alcance a concentraciones menores de las necesarias para ocupar todos los receptores, ya que a altas concentraciones se impediría la dimerización, y en consecuencia no se desencadenarían las acciones biológicas propias de la hormona (Cunningham et al., 1991; De Vos et al., 1992) (Figura 3).

II. Receptor de la hormona de crecimiento (GHR)

ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL GEN DE GHR

El GHR pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyéticos, implicados en procesos de crecimiento y diferenciación celular. Dentro de esta familia se encuentran incluidos los receptores de diversas interleukinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 e IL-7), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor neutrófilo ciliar (CNF) e interferón α , β y γ (Taga y Kishimoto, 1992; Ihle et al, 1994).

En humanos, GHR está codificado por un único gen, que se extiende a lo largo de 87 Kb del cromosoma 5. Este gen está constituido por 10 exones, de los cuales el exón 2 incluye 11 pb de la región 5' no transcrita y codifica el péptido señal; los exones 3 al 7 codifican el dominio extracelular; el exón 8 el dominio transmembrana y los exones 9 y 10 el dominio citoplásmico (Godowski et al., 1989). En la rata, la

estructura del gen es similar, excepto por la presencia de un exón adicional que codifica una cola hidrofílica que será la que permita la síntesis de la proteína transportadora de GH en esta especie (Figura 4A).

La región promotora del gen del GHR es poco conocida, y en consecuencia, apenas existen datos de cómo se regula su transcripción. En roedores se han identificado secuencias consenso para la *TATA box* entre las posiciones -23 y -52 (Menon et al., 1995) y secuencias consenso de unión para otros factores de transcripción como AP-2, NF/IL6 o CTF/CBP. También en esta especie, se han descrito dos elementos amplificadores (*enhancers*): el denominado FP1 y un segundo elemento al que se unirse factores de transcripción de la familia CTF/NF1 (Zou y Menon, 1995) (Figura 4A).

Tras la transcripción del gen del GHR, se origina un ARN primario, que va a sufrir una serie de procesamientos cuya complejidad tan sólo está comenzando a conocerse en la actualidad. Esta complejidad se ve además aumentada

por la existencia de importantes diferencias entre las distintas especies investigadas, en algunas de las cuales algunas de las moléculas de ARNm originadas en estos procesamientos no van a ser traducidas en moléculas del GHR sino de la proteína transportadora de GH. En este apartado consideraremos únicamente aquellas especies de ARNm que serán traducidas a moléculas de GHR en humanos. La primera variante descrita en la literatura se origina por la exclusión del exón 3 en la molécula de ARNm madura, lo que determina la pérdida de los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 7 y 28. Esta variante (denominada GHR-D3) fue identificada a partir de una biblioteca de ADNc de placenta, y es capaz de ligar (además de las formas de 22 y 20 kDa de la GH hipofisaria) las hormonas de crecimiento placentarias (Barnard et al., 1993; Mercado et al., 1994), lo que llevó a postular que podría tratarse de un receptor específico para la GH-V (Urbanek et al., 1993). En la actualidad se sabe que esta variante representa un polimorfismo de gen del GHR presente en aproximadamente un 10% de individuos (Stallings-Mannet et al., 1996). Por el momento, no se han encontrado diferencias funcionales con la forma no troncada del receptor.

Recientemente han sido identifi-

cadas dos nuevas variantes postranscripcionales del receptor de GH (Ross et al. 1997; Ayling et al., 1997) en las cuales falta la práctica totalidad del dominio intracelular. Aparte de ser receptores biológicamente inactivos (e incluso de actuar como competidores de la forma funcional del receptor), la importancia de estas variantes radica en su mayor susceptibilidad a sufrir los procesos de proteólisis que darán lugar a la generación de proteínas transportadoras de GH de alta afinidad.

ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE GH

Todos los miembros de la clase I de la superfamilia de receptores hematopoyéticos presentan una serie de características comunes como son el poseer un único dominio transmembrana y presentar una baja homología en su dominio extracelular (15-35%), en el que se distinguen dos regiones claramente diferenciadas: desde el aminoácido 1 al 123, y desde el 128 hasta el 238. Cada una de estas regiones contiene siete cadenas β y juntas forman un *sandwich* de dos hojas β antiparalelas, una con cuatro cadenas y otra con tres (De Vos et al., 1992). Presenta, además, tres

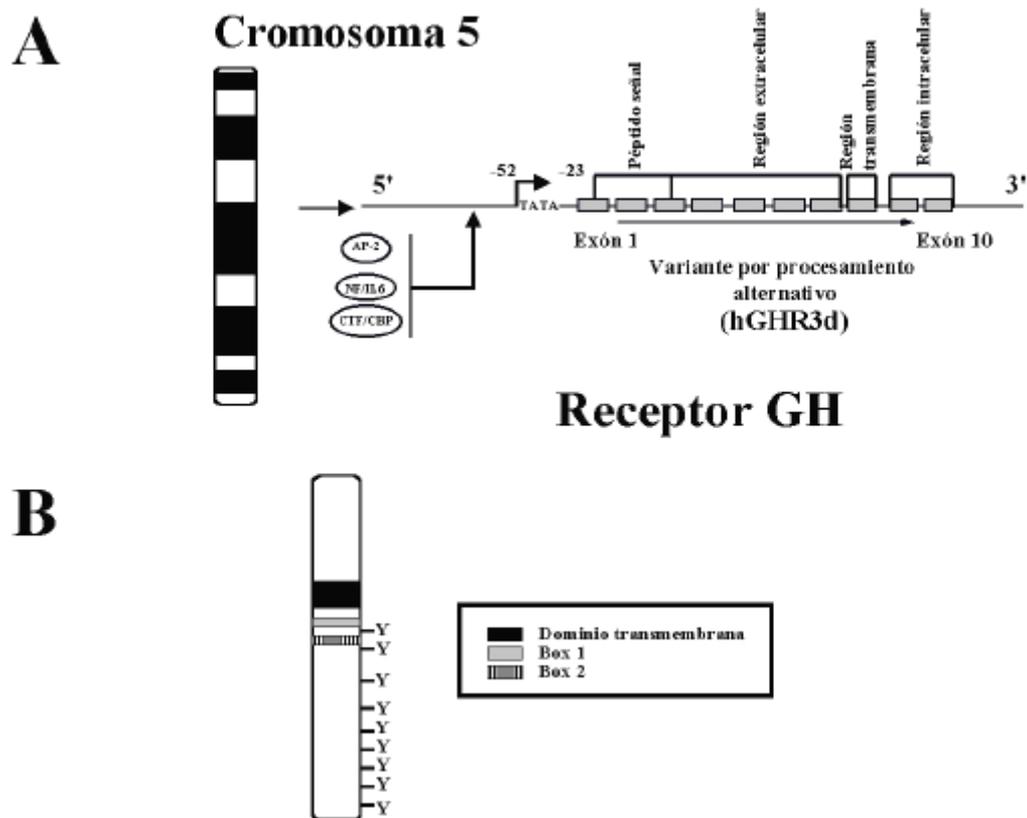


Figura 4. Receptor de GH. A. Estructura de la organización del gen del receptor de GH, en la que se señala a su vez la localización de los elementos de respuesta de los factores de transcripción que regulan su expresión; B. Esquema de GHR en el que se señalan los diferentes dominios.

puentes disulfuro (Cys³⁸-Cys⁴⁸, Cys⁸³-Cys⁹⁴ y Cys¹⁰⁸-Cys¹²²) en el extremo N-terminal, distinguiéndose cuatro zonas dentro de esta región rica en cisteínas: el residuo de triptófano de la posición 104, el motivo WS (Rozakis-Adcock y Kelly, 1992) y los residuos de las posiciones 222 y 226 del motivo YGEFS (Duriez et al. 1993; Baumgartner et al. 1994). Todas ellas

desempeñan un importante papel en la unión del receptor al ligando.

Dentro del dominio intracelular del receptor se pueden distinguir también dos regiones con importantes papeles en la transducción de la señal. Por un lado, la denominada *Box 1* (Dinerstein et al. 1995), una región cercana a la membrana que presenta un dominio rico en prolinas, común a todos los miembros de la superfamilia y que

consta de ocho aminoácidos. El primero de ellos es un residuo hidrofóbico, al que le sigue un grupo de tres aminoácidos, un residuo alifático, y finalmente un par de prolina separadas por un sólo aminoácido. En el caso del receptor de GH, este dominio presenta la secuencia ILPPVPVP (residuos entre las posiciones 297 a 304). Mutaciones realizadas en el dominio *Box 1*, sugieren que las dos últimas prolina del dominio y el aminoácido hidrofóbico son esenciales para la interacción, bien directa o indirecta con Jak-2 (*Janus Kinase-2*), y por tanto de su activación (Dinerstein et al., 1995) (Figura 4B).

La segunda región es la denominada *Box 2*, también común a la mayoría de los receptores de citoquinas. Como ocurría con la *Box 1*, su secuencia comienza con un grupo de aminoácidos hidrofóbicos y finaliza con uno o dos aminoácidos cargados positivamente (Murakami et al., 1991).

En el caso del GHR, la *Box 2* está compuesta de unos 15 aminoácidos, situados aproximadamente a 30 aminoácidos de la *Box 1* en dirección al extremo C-terminal de la proteína (Da Silva et al. 1994).

Por último, recientemente se han localizado en el extremo C-terminal del receptor regiones que resultan imprescindibles no sólo para la activación de

STAT 5 (una de las principales vías de segundos mensajeros activadas por GHR), sino también para la activación de SHP-1 (*SH2-containing Phosphatase 1*), una tirosina-fosfatasa capaz de defosforilar Jak-2 y en consecuencia de regular el *switch-off* del receptor (Riderstrale et al., 1995; Sotiropoulos et al. 1996; Hackett et al, 1997).

DISTRIBUCIÓN DE GHR

La mayor parte de estudios existentes sobre la distribución de GHR han sido realizados en roedores (Tiong

Tejido	Proteína	ARNm
Adrenal	ND/ND	+/+
T. Adiposo	ND/ND	+/+
Aorta	ND/ND	+/ND
Bazo	ND/ND	+/ND
V. Biliar	ND/ND	+/ND
Cerebro	ND/+	ND/+
Corazón	ND/ND	+/+
M. esquelético	ND/+	+/+
T. gastrointes.	ND/+	+/+
Hígado	+/+	+/+
G. mamaria	ND/+	+/+
Gónadas	ND/+	+/+
Páncreas	ND/+	+/ND
Piel	+/+	+/ND
Pulmón	+/+	+/ND
Riñón	+/+	+/+
Tiroides	ND/+	+/-

Tabla I. Distribución del receptor de GH en tejidos humanos/rata (ND:no determinado).

y Herington., 1991; Lobie et al.1992) y, en menor medida, en humanos (Mercado et al., 1994; Kyle et al.,1981), utilizando en ambos casos técnicas tan variadas como *Northern blot*, RT-PCR, inmunohistoquímica o radioreceptor ensayo (RRA). En todos los casos, el GHR ha mostrado una distribución prácticamente ubicua, en concordancia con la gran variedad de acciones de la hormona y el gran número de tejidos sobre los que las ejerce (Tabla 1).

INTERACCIÓN HORMONA-RECEPTOR. MECANISMO DE TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL

La unión de la GH a su receptor y la posterior dimerización de éste, van a producir, en primer lugar, la fosforilación de Jak-2 (Argentsinger et al., 1993), una tirosina-quinasa que se encuentra asociada al dominio intracelular de GHR. Jak-2 es una proteína de 121 aminoácidos y con un peso molecular de unos 120 kDa, que pertenece a la familia de las *Janus-kinasas*, dentro de la cual se encuentran también Jak-1, Jak-3 y Tyk-2. Aunque parece que Jak-2 es el miembro de la familia activado principalmente por GH, existen datos que indican que tanto Jak-1 como Jak-3 (y probablemente también Tyk-2) parti-

cipan, aunque en menor medida, en este proceso. Una vez fosforilada, Jak-2 adquiere capacidad tirosina-quinasa, con lo que va a fosforilar a una serie de proteínas implicadas en diferentes vías de transmisión de la señal, de las cuales, las principales son la vía dependiente de la activación de las STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), la vía de las MAPK/Erks (*Mitogen Activated Protein Kinases/Extracellular signal Regulated Kinases*), y la vía dependiente de IRS/PI3-K (*Insulin Receptor Substrate/Phosphatidylinositol-3-Kinase*). Además, la activación de Jak-2 (o bien de alguna de las vías anteriormente citadas) va a determinar la inducción de otras vías como son la vía del Calcio/PKC (*Protein Kinase C*), Grb10 o FAK (*Focal Adhesion Kinase*), aunque su importancia fisiológica no ha sido aclarada todavía (Figura 5).

1- STATs

Probablemente la principal vía implicada en el mecanismo de acción de la GH es la que resulta de la activación de la familia de proteínas denominadas STATs. Aunque hasta el momento se han identificado 6 proteínas diferentes

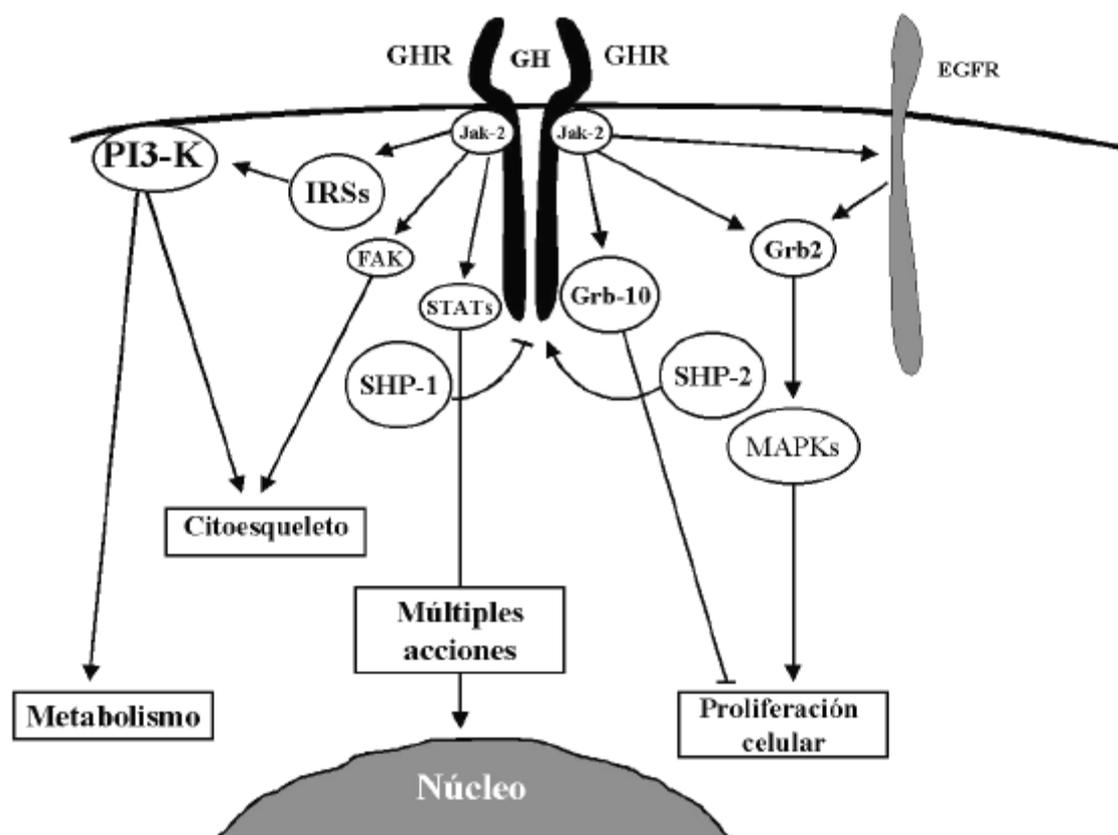


Figura 5. Vías de señalización activadas a través de GHR.

en esta familia, tan sólo tres de ellas (STATs 1, 3 y 5) parecen implicadas en el mecanismo de transmisión de la señal del receptor de GH. Como su nombre indica, las STATs son factores de transcripción, que en su estado inactivo se encuentran en el citoplasma, pero que una vez fosforilados sufren una translocación al núcleo celular, donde se unen a elementos de respuesta específicos, activando o inhibiendo la transcripción de determinados genes. Por tanto, este sistema representa un mecanismo mediante el cual la GH es capaz de activar

(o inhibir) la transcripción génica a través de una vía directa (GHR- Jak-2 - STATs-gen diana).

Aunque el mecanismo de activación de cada una de las STATs es esencialmente similar, y en todos los casos requiere la activación de Jak-2, existen una serie de peculiaridades que pueden ser las responsables de que, dependiendo de las condiciones, una de las STATs se active de forma preferente. Concretamente, se ha propuesto (Yi et al., 1996) que STAT3 presentaría una mayor afinidad por Jak-2, mientras

que STAT5 la tendría por el extremo del dominio intracelular del receptor. Esto supondría que variantes del GHR con dominios intracelulares de distinta longitud podrían activar preferentemente un determinado tipo de STAT (Sotiropoulos et al., 1996), y por lo tanto, que diferentes zonas de GHR producirían efectos distintos, implicándose a STAT3 en fenómenos de proliferación y STAT5 en diferenciación celular.

2-MAPK/Erk

La activación de esta vía es similar a la que se produce con cualquier proteína-quinasa, y depende de la unión de dominios SH2 de la proteína SHC a residuos de fosfotirosina de Jak-2 y/o del dominio intracelular del receptor (Winston et al., 1995). Como resultado de la activación de esta vía, se va a inducir la transcripción de todo el grupo de genes dependientes de MAPK/Erk (Vanderkuur et al., 1997). Recientemente se ha propuesto que la activación de la vía MAPK por GHR es dependiente de la activación del dominio intracelular del receptor de EGF (*Epidermal Growth Factor*) a través de un *crosstalk* con el receptor de GH (Yamauchi et al., 1997).

3- IRSs/PI3-K

Los IRSs fueron inicialmente identificados como tirosina-quinazas asociados al receptor de insulina y posteriormente al de los IGFs (*Insulin-like Growth Factors*). En la actualidad se sabe que, una vez fosforilado, Jak-2 es también capaz de fosforilar IRS 1, 2 y 3 (Argetsinger et al., 1995; Argetsinger et al., 1996; Yamauchi et al., 1998), que a su vez serán los responsables de la activación de PI3K (Ridderstrale et al., 1995). Además, Jak-2 favorece la unión de IRS1/2 a p85, la subunidad reguladora de PI3-K. Se ha propuesto que este mecanismo de acción sería el responsable de los efectos de la GH sobre el metabolismo glucídico y lipídico.

4-Fosfotirosina-fosfatasa (PTPs, Phosphotyrosine phosphatases)

Dentro de esta familia se han identificado dos proteínas denominadas SHP-1 y SHP-2. La importancia de la primera de ellas dentro del mecanismo de transmisión de la señal del GHR es que es la responsable de los denominados fenómenos de *switch-off*, es decir, de limitar en el tiempo la activación del receptor. La función de SHP-1 consiste

en defosforilar a Jak-2 tras su activación (Hacket et al, 1997) y parece depender de la región citoplasmática del receptor situada entre los aminoácidos 520 y 540, aunque no está claro si es capaz de unirse directamente al receptor o si precisa de una proteína acopladora aún no identificada.

Por el contrario, SHP-2 el miembro de la familia identificado más recientemente, desempeña un papel estimulador dentro de la vía de señalización de GHR, probablemente debido a que defosforila una proteína inhibidora de dicha vía (Stofega et al., 1998; Kim et al, 1998).

5- Otros factores

Aunque las vías que acabamos de describir son, hoy por hoy, las que presentan una mayor importancia, existen también datos que sugieren que parte de los efectos biológicos de la GH pueden estar mediados por la activación de otras vías. Una de éstas es la vía dependiente de la proteína-quinasa C (PKC). Se han propuesto dos posibles vías de activación de PKC por GHR, aunque ninguna de ellas ha podido ser demostrada de forma concluyente. Una de ellas sería a través de una fosfolipasa C ligada al receptor de GHR por una proteína G (Rogers et al., 1989), aunque

todavía no ha podido demostrarse la existencia de proteínas G asociadas a GHR/Jak-2. La segunda posible vía sería dependiente de IRS/PI3-K (Toker et al., 1994).

La GH es también capaz de incrementar los niveles de calcio libre intracelular en algunos tipos celulares, probablemente debido a la apertura de canales de calcio localizados en la membrana celular. Aunque se ha propuesto que este incremento de calcio resulta imprescindible para que se produzcan los efectos biológicos de la hormona, hasta el momento no se han podido identificar estos canales, ni tampoco el mecanismo responsable de su apertura. Estudios realizados con mutantes del GHR indican que el incremento de los niveles de calcio es independiente de los residuos de la *Box 1*, lo que a su vez sugiere que se trata de un efecto independiente de Jak-2 (Billestrup et al., 1995).

Mediante estudios *in vitro* se ha podido demostrar la existencia de un gran número de proteínas capaces de unirse al extremo C-terminal del GHR, entre las que se encuentran Shc, p85, Csk, Shb, Grb4 y Grb10. Esta última ejerce una acción inhibitoria sobre la cascada de señalización del GHR dependiente de STAT3, no afectándose, sin embargo, las acciones dependientes

de la activación de STAT5 (Moutoussamy et al., 1998). La última proteína implicada en la cascada de señalización dependiente de GHR es p125 (FAK, *Focal Adhesion Kinase*), que tras su asociación a Jak-2 activado a través de GHR se fosforila, habiéndose postulado que sería la mediadora de las recientemente descritas acciones de GH sobre el citoesqueleto celular (Goh et al., 1997). No obstante todos estos cambios producidos en el citoesqueleto por parte de GH no afectan a la transcripción mediada por STAT (Zhu et al., 1998).

6- Internalización del complejo GH/GHR

Aparte de este mecanismo de acción "clásico" de la GH basado en la generación de segundos mensajeros, se ha visto que la unión de la GH a su receptor induce la internalización del complejo hormona-receptor (Allevato et al., 1995), y su posterior translocación a distintos compartimentos intracelulares entre los que se encuentra el núcleo. Este proceso se produce de forma rápida, probablemente a través de una vía endosomal (Lobie et al., 1994a; Lobie et al., 1994b). Estos fenómenos de internalización son dependientes de la ubiquitinación del receptor (Govers et al.,

1997), aunque también se ha descrito internalización independientemente del sistema de ubiquitina en formas truncadas de GHR (Govers et al., 1998).

Se ha propuesto que esta vía podría representar un mecanismo alternativo de acción, mediante el cual la GH podría activar directamente en el núcleo la transcripción de determinados genes. La demostración de la existencia de forma constitutiva de Jak-2 y STAT en el núcleo parece apoyar esta hipótesis, aunque por el momento no ha podido ser comprobada (Lobie et al., 1996).

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

A diferencia del resto de las hormonas adenohipofisarias, la GH no actúa de forma específica sobre un determinado órgano diana, sino que sus acciones son ejercidas sobre todo el organismo, por lo cual también recibe el nombre de somatotropina u hormona somatotropa (STH, *Somatotropic Hormone*). Se trata de una hormona con un carácter eminentemente pleiotrópico, pero con una finalidad básica: favorecer el crecimiento corporal y contribuir a mantener un entorno metabólico adecuado a las necesidades del organismo

no sólo durante el período de crecimiento sino también una vez que éste ha finalizado. En la literatura estas acciones suelen referirse como acciones de la GH sobre el crecimiento y acciones metabólicas de la GH, sin embargo, en la práctica resulta difícil establecer un límite claro entre ambas. El crecimiento de todo organismo es la consecuencia de un aumento de su número de células, pero para que este aumento se produzca, es necesario que existan, por una parte, factores que induzcan la proliferación celular, pero también factores que creen un *status* metabólico adecuado que permita que las células proliferantes puedan soportar el gasto energético que supone dicho proceso. La GH favorece el crecimiento potenciando ambas vías. Por una parte, es capaz de actuar como un factor inductor de la proliferación en diferentes tipos celulares (Raff, 1996), entre los que se encuentran no sólo los condrocitos del cartílago epifisario (sobre los que la GH actúa conjuntamente con IGF-I), sino también células hemáticas, glándula mamaria, músculo o cerebro (Weigent et al. 1991; Lobie et al., 1993; Zadik et al., 1993; Sacca et al., 1994; Mol et al. 1996).

Además, la GH ejerce importantes efectos sobre el metabolismo intermediario, a través de sus acciones anabolizante, lipolítica (Goodman et al.,

1990; Parini et al., 1995) y diabetógena, que son realizadas de una forma perfectamente integrada para conseguir como efecto final el crecimiento, o la regulación metabólica y nutricional del organismo una vez finalizado aquel. *In vivo*, la GH produce un doble efecto sobre el metabolismo de los hidratos de carbono: de forma aguda incrementa la captación celular de glucosa, favoreciendo así su utilización en el metabolismo celular. Este efecto es probablemente debido a un aumento del reclutamiento de transportadores GLUT1 y GLUT4 (Carter-Su et al., 1996), secundario a la activación de IRS/PI3K. A largo plazo, los efectos de la GH sobre el metabolismo de los hidratos de carbono son más difíciles de valorar, pero consisten fundamentalmente en una disminución de la utilización de la glucosa que puede ser debida, al menos en parte, a un incremento de los niveles circulantes de IGF-I (Herman-Bonert et al., 1995).

Sobre el metabolismo proteico, la GH ejerce un efecto anabolizante (Lo et al., 1997; Garibotto et al., 1997). Este efecto se debe probablemente en parte a las mencionadas acciones de la GH sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, asociados a su capacidad de inducir la transcripción de genes capaces de incrementar la captación celular

INTRODUCCIÓN

de aminoácidos, de disminuir el catabolismo proteico, etc.

Por último, aunque de forma aguda la GH ejerce un efecto antilipolítico, a largo plazo sus acciones son

eminentemente lipolíticas, probablemente mediadas por la activación de una lipasa dependiente de PKC y/o de IRS/PI3K (Herman-Bonert et al., 1995; Carter-Su et al.,1996) .

III. Supervivencia celular

PAPEL DE LA APOPTOSIS EN EL CONTROL DEL DESARROLLO Y CRECIMIENTO

La apoptosis es un fenómeno de muerte celular que implica en su puesta en marcha una serie de cambios de carácter morfológico y bioquímico, que de forma activa conducen a la destrucción celular. Es, por tanto, un proceso diferente a la necrosis celular, en el cual tras un daño importante producido a la célula por un agente externo se desencadena la lisis celular. Las “vías efectoras” del proceso de apoptosis son comunes a casi todas las especies a lo largo de la evolución, y de hecho la mayoría de las proteínas implicadas en estos mecanismos fueron identificadas inicialmente en un nemátodo, el *Caenorhabditis elegans*, caracterizándose posteriormente en mamíferos. Dentro de ellas, las más importantes son las denominadas en conjunto ICE (cysteine protease Interleukin-1 β -Converting En-

zyme), una familia de proteasas de la que forman parte al menos unas diez proteínas. Las ICE son sintetizadas como enzimas inactivas, siendo activadas cuando el mecanismo de muerte celular programada se pone en marcha, produciéndose así la proteólisis de importantes substratos celulares como PARP (*Poly ADP-Ribose Poly-ribomerase*) y lamininas, lo que determina la aparición de los cambios morfológicos celulares característicos de la apoptosis (Cohen et al., 1997).

Durante el desarrollo de la mayoría, sino de todos los seres vivos multicelulares, la apoptosis proporciona un mecanismo eficaz al organismo para la eliminación de aquellas poblaciones celulares no necesarias en las diferentes etapas de desarrollo o recambio celular del individuo. Algunos ejemplos de este tipo de procesos fisiológicos son la maduración de los timocitos, la formación de las hasta ahora mal denominadas zonas necróticas en las áreas interdigitales en la formación de las extremida-

des, la involución mamaria, el desarrollo de las espermatogonias y folículos o la sinaptogénesis entre muchas otras funciones.

Además, la muerte celular programada proporciona un mecanismo de control del crecimiento somático, que no es más que el resultado del equilibrio entre dos procesos contrapuestos como son la proliferación y la apoptosis celular. Del establecimiento de la preponderancia del primero de ellos sobre el otro surgirá la posibilidad de que se produzca un aumento de tamaño del organismo.

Por último, en los últimos años se ha demostrado la relevancia de este mecanismo biológico en determinados procesos patológicos como el cáncer o enfermedades degenerativas. De hecho, proteínas fundamentales en la regulación de las vías de supervivencia como Akt, o algunos miembros de la familia de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X) se sobreexpresan (o presentan una mayor actividad) en determinados tipos de tumores, lo que ha derivado parte de la investigación en oncología básica hacia la posibilidad de que en los procesos tumorales no sólo desempeñe un papel importante la inducción de la proliferación celular, sino también el aumento de la supervivencia celular (McGill et al., 1997).

PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LAS VÍAS DE INDUCCIÓN DE SUPERVIVENCIA CELULAR

1. Akt/PKB

Esta serina/treonina quinasa fue identificada en el año 1991 por tres grupos diferentes, hecho que contribuyó a la existencia de diferentes denominaciones para la misma proteína. Dos de los grupos identificaron una quinasa de aproximadamente 60 kDa con un 73% de homología con el dominio quinasa de PKC ϵ y un 68% con el dominio quinasa de la PKA, esto hizo que recibiese las denominaciones de PKB (*Protein Kinase B*) (Coffer et al, 1991) y de RAC-PK (*Related to the A and C Protein Kinase*) (Jones et al., 1991). Simultáneamente se relacionó esta quinasa con el oncogen v-akt del retrovirus AKT8 aislado en el linfoma de células T en los roedores (Bellacosa et al., 1991). El oncogen retroviral codifica una proteína de fusión entre el Akt celular y la proteína estructural viral Gag.

Hasta el momento, se han descrito 3 isoformas de Akt, denominadas (Akt1/PKB α /RAC-PK α , Akt2/PKB β /RAC-PK β y RAC-PK γ). En todas ellas se pueden distinguir: i) un dominio PH (*Pleckstrin-Homology*), localizado en su extremo N-terminal, que comprende

los aminoácidos 1-106. ii) un dominio quinasa que comprende los aminoácidos 148-411 y en el que se encuentra la treonina 308, fundamental en el proceso

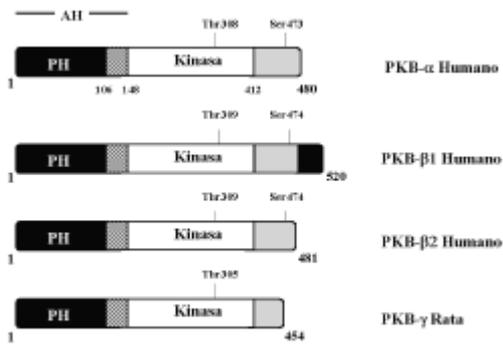


Figura 6. Estructura de los diferentes miembros de la familia de proteínas Akt.

de activación de la proteína. iii) una región AH (*Akt Homology*, aminoácidos 1-147) situado entre los anteriores y iv) una región C-terminal (aminoácidos 412-480) en la que se encuentra la serina 473, también básica en el proceso de activación (Figura 6).

La activación de Akt depende de la vía de inosítoles de membrana (Franke et al., 1997) que son, a su vez, activados por PI3-K (Burgering et al., 1995). Una vez activados los fosfoinosítoles de membrana se produce el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática, uniéndose a ella mediante su dominio PH, y permitiendo así el acceso de la quinasa PDK1

(*Phosphoinositide-Dependent protein Kinase*) a la treonina localizada en la posición 308 (Pullen et al., 1998; Alessi et al., 1998). PDK-1 es una serina/treonina quinasa que está constitutivamente activada de forma que tras su unión a Akt se produce la fosforilación de dicha treonina. Posteriormente, se produce la fosforilación de la serina 473 por acción de otra PDK (PDK2) que a diferencia de la anterior aún no ha sido identificada, pero cuya activación es dependiente de fosfatidilinositol (3,4,5) P_3 . Una vez fosforilada en ambos residuos, Akt se encuentra ya totalmente activada, pudiendo a su vez fosforilar una serie de moléculas diana.

Uno de los principales objetivos en los últimos años ha sido la búsqueda de substratos *in vivo* de Akt. La secuencia que reconoce es RxRyz(S/T)hy, siendo x cualquier aminoácido, z e y residuos de pequeño tamaño exceptuando la glicina, y hy un grupo hidrofóbico (Alessi et al., 1996).

Hasta ahora los substratos conocidos son la GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) (Cross et al., 1995), p70^{s6k} (Burgering et al., 1995) y BAD, un miembro de la familia de Bcl-2 (Del Peso et al., 1997; Datta et al., 1997). La primera de ellas, GSK3 se inactiva al ser fosforilada por Akt/PKB, produciéndose así una activación de la síntesis

sis de glucógeno. Además, esta quinasa está implicada en la regulación de multitud de vías de señalización intracelular, así como el control de factores de transcripción como AP1 y CREB, en la regulación del gen supresor de tumores APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) y de diversos genes implicados en vías de desarrollo de invertebrados (McGill et al., 1997).

En el caso de p70^{s6k} aunque no hay evidencia de que sea un sustrato directo, se relaciona su activación con la de Akt. La función de esta proteína es la de fosforilar la proteína s6 ribosomal, cuya función no está todavía muy clara aunque se cree que participa en el control de la transcripción y traducción de diversas proteínas (Proud et al., 1996).

De todos ellos, el principal sustrato implicado en apoptosis es BAD. En su forma no fosforilada, BAD promueve la muerte celular programada, formando heterodímeros e inactivando a otro miembro de la familia de Bcl-2 denominado Bcl-X_L. Por el contrario, cuando BAD es fosforilado por Akt, disminuye su afinidad por Bcl-X_L, y aumenta su afinidad por otra proteína denominada 14-3-3. Esto permite que Bcl-X_L se libere pudiendo así ejercer sus acciones antiapoptóticas (Datta et al., 1997).

2. Familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas de la familia Bcl-2 constituyen uno de los grupos de proteínas más relevantes dentro de aquellos que regulan la apoptosis celular durante la fase efectora. El gen Bcl-2 fue inicialmente identificado tras el estudio de la translocación cromosómica t(14;18) que aparecía en ciertos linfomas de células B. Actualmente se sabe que Bcl-2 es uno de los miembros de una amplia familia de genes que regulan la apoptosis celular, entre los cuales se encuentran tanto antagonistas de la muerte celular como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 y A1) como agonistas de la misma: Bax, Bak,

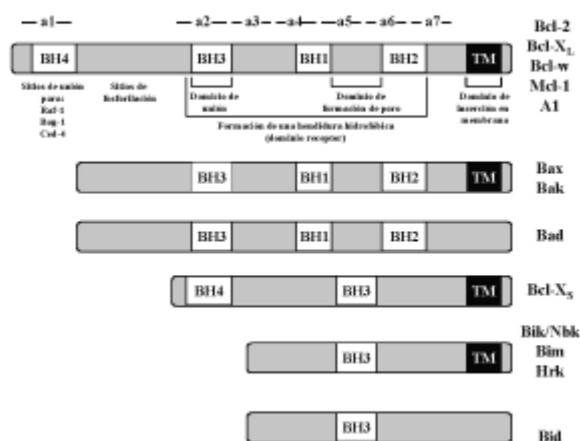


Figura 7. Estructura de los diferentes miembros de la familia de proteínas Bcl-2.

Bcl-X_S, Bad, Bid, Bik y Hrk (Thompson et al., 1995; Yang et al., 1996).

La diferencia que existe entre los miembros de la familia en su función a la hora de regular de forma positiva o negativa la muerte celular se basa principalmente en las diferencias estructurales que existen entre ellos. La mayoría de los miembros de la familia, a excepción de Bid y Bad, poseen un dominio transmembrana (TM) en su región C-terminal, que condiciona su localización subcelular en la membrana mitocondrial y por tanto su función (Kroemer et al., 1997). La mitocondria juega un importante papel en el desencadenamiento del

proceso de muerte celular, en esta organela, las proteínas Bcl-2 estabilizarían su membrana dificultando la activación de proteínas implicadas en la inducción de muerte celular como citocromo c y otros activadores de caspasas (VanderHeiden et al., 1997). Otros dominios comunes a todas las proteínas de la familia son los BH (*Bcl-2 Homology*) que aparecen de forma variable en número en los diferentes miembros de la familia (de BH1 a BH4), y cuya función se cree que es la de servir como regiones de posible interacción con otras proteínas (Figura 7).

OBJETIVOS



OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue analizar el papel desempeñado por la GH extrahipofisaria, concretamente, su papel en el control del crecimiento celular. Para ello tratamos de:

1. Caracterizar un modelo celular que nos permitiese analizar las acciones auto-crino/paracrina de la GH extrahipofisaria.
2. Estudiar las acciones de la GH en dicho modelo.
3. Estudiar las vías de señalización implicadas.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares

En este estudio han sido utilizadas como modelo experimental dos líneas celulares:

1. HL-60. La línea celular HL-60 (leucemia humana mieloblástica aguda con diferenciación) fue obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC). Las células fueron cultivadas en medio RPMI (pH 7,4), suplementado con L-glutamina (2 mM) y 10% de suero bovino fetal (FBS). Se mantuvieron en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda y con CO₂ al 5%.

2. CHO wtGHR y CHO Δ454GHR. Los clones CHO-wt GHR y CHO-Δ454GHR fueron desarrollados en la U344 del INSERM (París) transfec-tando células CHO (derivadas de ovario de hamster) con el receptor de GH o con una forma truncada en la que faltan los aminoácidos a partir de la posición 454.

Ambos fueron cultivados en medio HAM-F12 (Life Technologies, Reino Unido) suplementado con 10% FBS (Life Technologies, Reino Unido) y L-glutamina (2 mM) (Sigma, EE.UU.), y mantenidos a una temperatura de 37°C en una atmósfera húmeda al 5% CO₂.

Extractos celulares

Las células fueron centrifugadas (100 x g, 3 min, 4°C), resuspendidas en PBS (*phosphate-buffered saline*) frío, y centrifugadas de nuevo. El *pellet* resul-tante fue incubado durante 15 min. en solución de lisis fría (Hepes 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; 10% Glicerol; 1% Triton X-100; EGTA 5mM; MgCl₂ 1,5 mM; Na₄P₂O₇ 20 mM; Na₃VO₄ 20 mM; 50 mg/mL aprotinina; PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) 4 mM; 1ml de tampón/5x10⁷ células), tras lo cual fue centrifugado (15000 x g, 15 min., 4°C). Las proteínas totales fueron cuantificadas a partir del sobrenadante

obtenido mediante el método BioRad de cuantificación de proteínas.

RT-PCR

Una de las técnicas empleadas para la detección de la expresión del RNAm de GH y de GHR ha sido la retrotranscripción del RNAm a ADNc y su posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Extracción del ARNm. La extracción de ARNm se realizó mediante la utilización de un kit comercial de aislamiento de polyA⁺ (Quick Prep Micro mRNA Purification Kit, Pharmacia Biotech, Suecia). El ARNm obtenido fue almacenado hasta el momento de su procesamiento a -20°C.

2. Síntesis de ADNc. Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó la siguiente reacción en un volumen final de 30 µL:

- 10µL de ARNm
- 200U de transcriptasa reversa (MMLVRT, Pharmacia Biotech, Suecia.)
- dNTPs 1 mM
- 30U de un inhibidor de

ARNasas (RNAsin, Promega, EE.UU.)

- *random hexamer* oligonucleótido, 1x10⁻⁶ M.

- 6 µL de tampón (Tris HCl 50mM, pH 8,3; KCl 50mM; MgCl₂ 5mM.

La muestra fue sometida a un ciclo de 37°C durante 50 min., 42°C durante 15 min. y 95°C durante 5 min., utilizando un termociclador (PTC 150, MJ Research, EE.UU.).

3. Amplificación del ADNc mediante PCR.

La amplificación de la secuencia del ADNc de GH y de su receptor, así como del gen utilizado como control interno hHPRT se realizaron mediante PCR, utilizando *primers* específicos diseñados para amplificar selectivamente regiones de los exones 3 y 5 del gen de hGH (5' CCGACACCCTCCAACAGGGA 3' y 5' CCTTGTCCATGTCCTTCCTG 3'); así como del exón 9 y 10 de su receptor (Godowski et al., 1989) 5'CCCCAGTTCCAGTTCCCAAAG3' (nt 83-122, exón 9), 5'GTCTGTCTGTGTCTGATT CCT3' (nt 191-202, exón 10). Para la amplificación del *housekeeping gene*, gen utilizado como control se utilizaron los siguientes *primers* 5' CAGCCCTGGCGTCGTGATTA 3' y 5' GCAAGACG TTCAGTCCTGTC. En este caso los

primers fueron dirigidos hacia regiones en los exones 1 y 3.

En la reacción de amplificación se utilizaron:

- 1 μ L de la reacción de retro-transcripción.
- 25 pM de cada uno de los primers.
- 1U de Taq ADN polimerasa (Promega, EE.UU.),
- dNTPs, 2 mM
- 5 μ L tampón (Tris-HCl 18,6 mM, KCl 45,9 mM, MgCl₂ 3 mM).

El volumen final de reacción fue de 50 μ l. La muestra fue sometida a 30 ciclos de: 94° C durante 1 min., 55°C durante 1 min., 72° C durante 1 min. y un ciclo final de extensión de 10 min. a 72° C.

Los productos obtenidos tras la amplificación se resolvieron en un gel de agarosa al 1%. La visualización de las bandas se realizó por fluorescencia tras tinción con bromuro de etidio en el sistema de tratamiento GelDoc (BioRad, EE.UU.).

Western blot



Para el análisis mediante western blot de los extractos de proteínas obtenidos se emplearon geles PAGE

(Electroforesis en geles de poliacrilamida) no-desnaturalizante y SDS-PAGE (según se especifique en cada caso), posteriormente fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot Transfer Medium, BioRad, EE.UU.). La membrana fue incubada durante 1 h. con un primer anticuerpo (se especificará en cada caso en el epígrafe de Resultados), tras varios lavados, fue de nuevo incubada durante 45 min. en presencia de proteína A-HRP (*horseradish peroxidase*, Amersham International, Reino Unido). La detección de las proteínas se realizó mediante métodos quimioluminiscentes ECL Western Blotting kit (Amersham International, EE.UU.) ó Western-Light Chemiluminescent Detection System (Tropix, Perkin-Elmer, EE.UU.), y autorradiografía (HyperfilmECL, Amersham International, Reino Unido).

Fluoroimmunoensayo

Para la detección de la GH secretada al medio se utilizó el fluoroimmunoensayo (Delfia, Pharmacia, España) según las especificaciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 0,02 μ g/l y coeficientes de variación de 6,3% (0,4 μ g/l.) y 5,3% (10,2 μ g/l.). Las concentraciones de GH fue-

ron estimadas en el medio de cultivo en condiciones basales y tras estimulación con 60mM de KCl. Como control fue analizado medio sin células.

Análisis de la fragmentación de ADN

Las células fueron recogidas y lisadas mediante el empleo de solución de lisis (10 mM Tris; 1mM EDTA, pH 8; 0,2 % Triton X-100), se incubaron durante 20 min. a 4°C y se centrifugaron a 13000 x g durante 10 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron precipitados durante 16 h. a -20°C en 50% isopropanol y 0,5 M NaCl, el *pellet* ADN precipitado fue obtenido tras su centrifugación a 13000 x g durante 10 min. Los *pellets* así obtenidos fueron resuspendidos, tratados con RNasa A (100µg/ml, 1 h., 37°C) y proteinasa K (300 µg/ml, 2h., 50°C) y finalmente resueltos en un gel de agarosa al 1,5%. La fragmentación del ADN fue visualizada en el sistema Gel Doc System (BioRad, EE.UU.) tras su tinción con bromuro de etidio.



Para el ensayo TUNEL, las células fueron sometidas a un *cytospin*. Y posteriormente fijadas con 4% paraformaldehído y 2% sacarosa. El ensayo

TUNEL se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Alemania). El citoesqueleto celular fue visualizado mediante tinción con *phalloidin*-TRITC (Sigma-Aldrich Co., USA).

Ensayo quinasa Akt

Para la realización del ensayo quinasa de Akt, las células fueron lisadas en presencia de solución de lisis (Tris/HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, β-glicerolfosfato 25 mM, pirofosfato sódico 1mM, ortovanadato sódico 1 mM, 10% glicerol, 1% Nodidet P-40, PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) 1 mM, 5 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina y 1 µg/ml pepstatina) durante 15 min. a 4°C. Los lisados celulares fueron centrifugados (25000 g durante 15 min.) y el sobrenadante fue inmunoprecipitado en presencia de anticuerpos anti-Akt (New England Biolabs, EE.UU.). Los inmunoprecipitados fueron lavados sucesivamente en solución de lisis, PBS con ortovanadato sódico 1mM y tampón quinasa (Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 10 mM (pH 7,4), tras lo cual el inmunoprecipitado obtenido fue incubado en presencia 0,5 µCi de [³²P]ATP en una mezcla de reacción conteniendo

ATP 100 mM, DTT 10 mM, y 0,2 mg/ml Histona H2B en tampón de reacción quinasa. Tras 15 min. a 30°C, las reacciones fueron detenidas mediante la adición de tampón de muestra, posteriormente las reacciones fueron resueltas en un gel al 15% SDS-PAGE, y finalmente autorradiografiado (Hyperfilm, Amersham, Reino Unido). Para evaluar la eficiencia de la inmunoprecipitación de Akt, una fracción del inmunoprecipitado fue resuelto en un gel al 15% SDS-PAGE, transferido e incubado en presencia de anticuerpos anti-Akt como se ha descrito previamente.

Inmunohistoquímica ultraestructural

Las células fueron centrifugadas y fijadas en 2% paraformaldehído-0.2% glutaraldehído en PBS 100 mM (pH 7,4) durante 10 min. a 4°C. Tras varios lavados en PBS, las muestras fueron deshidratadas en etanol, incluidas en LR White (The London Resin Co, Reino Unido) y polimerizada a 60°C durante 8 h., evitando el contacto entre la resina y el oxígeno. Las secciones (60 nm de grosor) fueron situadas sobre una rejilla de níquel de 300-mesh. El marcaje fue realizado a temperatura ambiente según el siguiente protocolo: 1) Suero de cabra (NGS, Dakopatts, Dinamarca), 1:50 en

PBS conteniendo 0.5% ovoalbumina (5 min.); 2) anticuerpo anti-GH humana (Chemicon, EE.UU.), 1:50 en PBS conteniendo 1% ovoalbumina (16 h.); 3) PBS (2 veces cada 5 minutos); 4) 0.5% ovoalbumina en Tris-HCl 50 mM (pH 8,4) (5 min.); 5) anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo de cabra conjugado con oro 10 nM (Biocell, Cardiff, EE.UU.) 1:20 en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), conteniendo 1% ovoalbumina (1 h.); 6) Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) (5 min.); y 7) agua destilada (5 min.). El contraste se obtuvo mediante el tratamiento con 2% uranil acetato durante 2 min.

Inmunohistoquímica

Las células control y las tratadas IFN- γ fueron centrifugadas sobre portas de vidrio (APES, Sigma, EE.UU.). Las células tratadas con TPA fueron cultivadas sobre cubres de vidrio (Marien Field, Alemania). En todos los casos, las células fueron procesadas siguiendo el siguiente protocolo: 10% formaldehído (15 min.), PBS (5 min.), metanol absoluto (4 min. a -20°C), acetona (2 min. a -20°C), y PBS (5 min., dos veces).

La inmunoreactividad GH y GHR fue detectada mediante el empleo

del complejo avidin-biotin-peroxidasa (ABC). La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada mediante el tratamiento con 0.3% peróxido de hidrógeno en PBS. Las células fueron incubadas sucesivamente en: 1) NGS, dilución 1:10 en PBS para 30 min.; 2) anticuerpo anti-GH (Dako, dilución 1:100, 1 h.) ó anticuerpo monoclonal anti-GHR (Mab263, dilución 1:100, 1 h.); 3) anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra biotinado (Dakopatts, dilución de 1:400,

durante 30 min.); 4) el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite Kit, Vector, EE.UU.) preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante, durante 30 min.; y 5) 0.06% 3,3' diaminobenzidina-tetrahidrocloro (0.003% de peróxido de hidrógeno durante 5 min. Entre los diferentes pasos, las muestras fueron lavados con (Sigma Chemical Co., EE.UU.) con PBS y, tras el paso 5, con agua destilada.

RESULTADOS

I. Caracterización del modelo celular

Aunque la función desempeñada por la GH extrahipofisaria no se conoce por el momento, los datos existentes en la literatura sugieren que actuaría como un factor de crecimiento local. Así, la GH producida en las células del epitelio mamario actuaría como un factor paracrino capaz de estimular la proliferación de dicho epitelio (Mol et al., 1996). De forma similar, la GH actuaría también como un factor paracrino en el sistema hematopoyético, controlando el crecimiento y/o la diferenciación de los precursores hemáticos. De hecho, las acciones de la GH sobre las células hematopoyéticas y el sistema inmune son conocidas desde hace tiempo, aunque siempre fueron atribuidas a la hormona producida en la hipófisis (Kooijman et al., 1996). (Weigent et al., 1988; Baglia et al., 1992; Lytras et al., 1993; Mol et al., 1995a; Mol et al., 1995b).

Con el objeto de profundizar en el estudio del papel de la GH extrahipofisaria, nuestro primer paso fue caracterizar un modelo experimental adecuado:

células no sólo capaces de expresar GH, sino también de responder a esta hormona. Para ello utilizamos la línea celular HL-60, desarrollada a partir de una leucemia mieloblástica aguda con diferenciación (M2). Esta línea celular presenta diversas alteraciones citogenéticas, entre las que podemos destacar una gran deleción del gen que codifica la proteína p53, así como múltiples ampliaciones del gen c-myc (Birnie et al., 1988). Las células HL-60 presentan una serie de características que las convierten en idóneas para nuestro estudio. En primer lugar, son células capaces de responder a la administración exógena de GH incrementando su proliferación *in vitro* (Estrov et al., 1991). En segundo lugar, son células hemáticas y, como ya señalamos en la introducción, el sistema hematopoyético es el principal lugar de síntesis de GH extrahipofisaria. De hecho, se ha demostrado la existencia de síntesis de GH en múltiples tipos de células hemáticas, tanto normales como tumorales (Weigent et

al., 1988; Baglia et al., 1992; Lytras et al., 1993; Kooijman et al., 1996). Por último, las células HL-60 pueden ser fácilmente diferenciadas con diferentes compuestos (Collins et al., 1987; Birnie et al., 1988), lo que las convierte en un buen modelo para el estudio de posibles correlaciones entre los niveles de una determinada proteína y el estado de diferenciación en el que la célula se encuentre (Smith et al., 1993). Además, las diferentes vías de diferenciación hacia las que estas células pueden ser inducidas dependen de la naturaleza de los agentes empleados: compuestos polares planares como el dimetil sulfóxido (DMSO), y otros tan diversos como ácido retinóico y actinomicina D inducen diferenciación a granulocitos; mientras que la 1,25-dihidroxitamina D₃, ésteres de forbol (TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate), butirato sódico o interferón γ (INF- γ) inducen la diferenciación hacia monocitos/macrófagos (Collins et al., 1987; Birnie et al., 1988; Smith et al., 1993). Este último presenta, a su vez, otra interesante propiedad y es que permite la diferenciación celular sin llevar asociado, a diferencia de los otros, un cese en la proliferación, permitiendo así el estudio diferencial entre cambios asociados a diferenciación celular y a

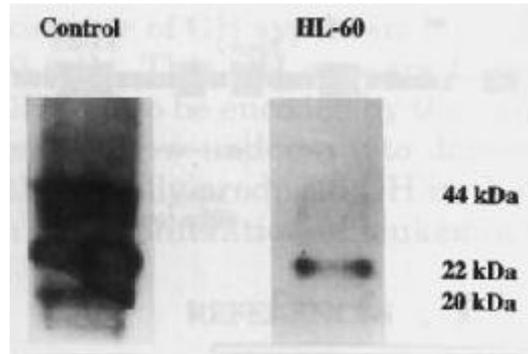


Figura 8. Western blot de extractos de proteína obtenidos a partir de hipófisis humana (control) y células HL-60. Los extractos se resolvieron mediante PAGE al 15%, se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-GH(1:1000). Las bandas con inmunoreactividad GH se visualizaron con un sistema de quimioluminiscencia. Al margen se señalan los pesos moleculares de las variantes de GH detectadas.

proliferación (Smith et al., 1993).

Para la caracterización de la expresión de GH en nuestro modelo celular, comenzamos por estudiar, mediante western blot, la presencia de inmunoreactividad GH en extractos celulares. Como puede verse en la Figura 8, tras incubar los extractos con anticuerpos anti-GH se observa una banda mayoritaria de aproximadamente 22 kDa, junto con bandas de menor intensidad de aproximadamente 20 y 44 kDa. Por tanto, estos resultados no sólo indican la existencia de inmunorreactividad GH en células HL-60, sino que sugieren un procesamiento similar al que se produce en la hipófisis.

Los resultados obtenidos por western blot fueron confirmados mediante

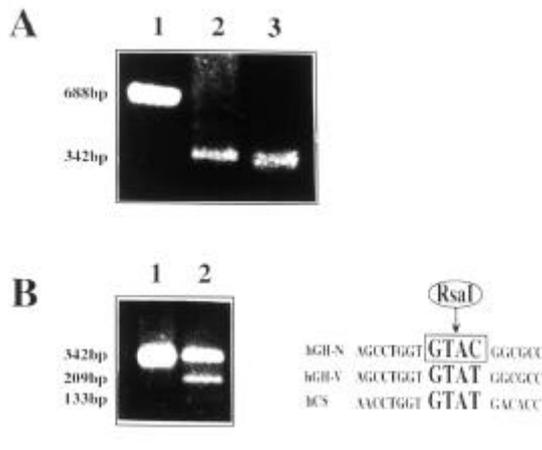


Figura 9. A. Productos PCR obtenidos a partir de la amplificación de: ADN genómico (calle 1); ADNc obtenido a partir de células HL-60 (calle 2); ADNc obtenido a partir de hipófisis humana (calle 3). B. Corte con el enzima de restricción *RsaI* (Boehringer Mannheim, Alemania) (se señala el punto de corte específico para el gen hGH-N en el esquema adjunto) del producto obtenido a partir de la amplificación del ADNc de células HL-60: producto no digerido (calle 1); fragmentos obtenidos tras el corte con el enzima (calle 2).

RT-PCR. La amplificación del ADNc dio como resultado la aparición de una banda con un tamaño aproximado de 342 pb, similar al control (obtenido al amplificar ADNc de hipófisis humana). Pudo observarse además una segunda banda de 688 pb que corresponde a la amplificación de ADN genómico (Figura 9A). Para caracterizar de forma precisa, cuál de los miembros de la familia de genes GH es el expresado en estas células, se realizó un análisis de restricción del producto amplificado mediante el corte con un enzima (*RsaI*) que reconoce una secuencia que está

presente en el gen hGH-N, pero que no existe en los otros miembros del *cluster*. El corte enzimático dio lugar a la aparición de dos bandas, (de 209 pb y 133

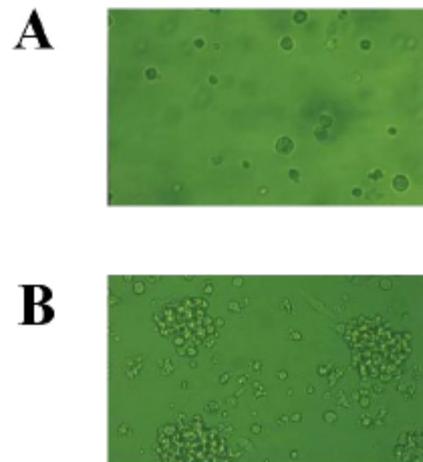


Figura 10. A. Células HL-60 en cultivo sin tratamiento con inductores de diferenciación celular. B. Células HL-60 en cultivo tratadas con TPA, agente inductor de diferenciación celular hacia la vía de monocito-macrófago, tras el que se pueden apreciar los cambios morfológicos producidos.

pb) confirmando que el gen GH expresado en células HL-60 es el hGH-N, al igual que ocurre en la hipófisis (Figura 9B).

Una vez demostrada la expresión de GH en células HL-60, nuestro siguiente paso fue investigar la existencia de cambios en dicha expresión en relación con el estado de proliferación/diferenciación de estas células. Como ya señalamos anteriormente, las

células HL-60 pueden diferenciarse fácilmente con diferentes compuestos entre los cuales elegimos el TPA y el INF- γ . La principal diferencia entre ambos es que mientras el TPA induce diferenciación y cese de proliferación, el INF- γ diferencia las células pero éstas siguen proliferando activamente. La eficacia del tratamiento con TPA pudo demostrarse fácilmente por los cambios morfológicos inducidos (Figura 10A y 10B), principalmente la aparición de adherencia a las placas de cultivo y el desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas largas y finas. En el caso del INF- γ hubo que recurrir al estudio de marcadores de superficie, concretamente la disminución de la expresión de CD13 y CD33 (van der Schoot et al., 1987) (Figura 11A). En este último caso, la existencia de proliferación celular a pesar de haber inducido la diferenciación se demostró a partir de los datos obtenidos en el estudio del ciclo celular a través del marcaje del ADN celular con yoduro de propidio y posterior análisis mediante citometría de flujo (Figura 11B).

Además de inducir diferenciación y cese de proliferación, la adición de TPA al medio de cultivo determinó una clara disminución tanto de los niveles de ARNm de GH (determinados

mediante RT-PCR) (Figura 12A) como de la inmunoreactividad GH determinada por western blot (Figura 12B) e inmunohistoquímica (Figura 12C, 12D y 12E). Esta última técnica permite observar que aquellas células que presentaban un mayor grado de diferenciación eran las que mostraban una menor inmunoreactividad. Por el contrario, no se encontró disminución

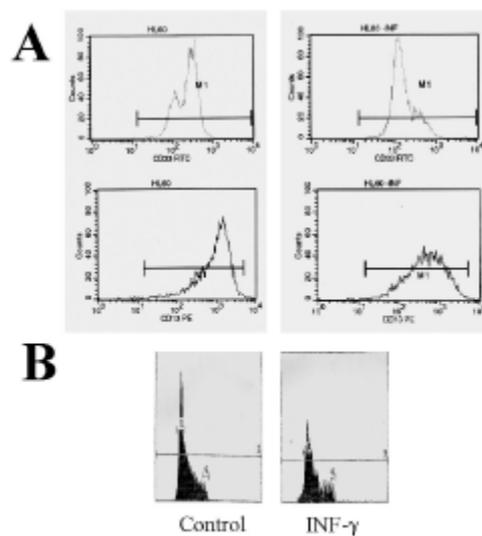


Figura 11. Las células diferenciadas con INF- γ hacia monocito-macrocito, no cesan su proliferación celular. A. Efecto del tratamiento sobre la diferenciación celular demostrado mediante el estudio de los marcadores de superficie CD13 y CD33. B. Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo tras el tratamiento con el agente inductor.

de la expresión de GH con ninguna de las técnicas empleadas (Figura 12) en el grupo tratado con INF- γ . En conjunto, estos resultados demuestran la

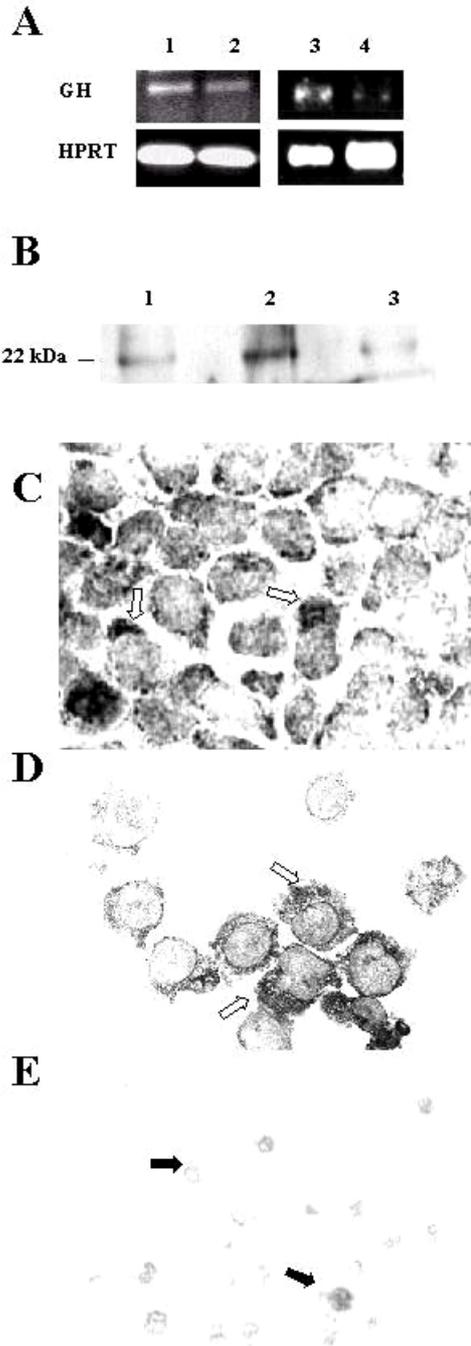


Figura 12. Efecto del tratamiento con TPA o $\text{INF-}\gamma$ sobre la expresión de GH en células HL-60: **A.** RT-PCR a partir de ARNm obtenido de células HL-60. Células control (calle 1 y 3); células tratadas con $\text{INF-}\gamma$ (calle 2); células tratadas con TPA (calle 4). **B.** Western blot a partir de extractos celulares de células HL-60. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas empleando un anticuerpo policlonal específico (cedido por el Prof. Tresguerres), tras lo cual fueron resueltas en un gel SDS-PAGE al 15%, transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas en presencia de un anticuerpo policlonal específico (1:1000). Células control (calle 1); células tratadas con $\text{INF-}\gamma$ (calle 2); células tratadas con TPA (calle 3). **C, D y E.** Inmunohistoquímica de células HL-60 tras diferentes estados de diferenciación celular, en la que se ha empleado para la detección un anticuerpo anti-GH : **C.** Células control; **D.** Células tratadas con $\text{INF-}\gamma$; **E.** Células tratadas con TPA. Es posible la detección de inmunorreactividad GH en el citoplasma de las células control y tratadas con $\text{INF-}\gamma$ (flechas blancas). En el caso de las células tratadas con TPA, sólo se visualiza el marcaje nuclear tras la contratinción con verde de metilo (flechas negras). El objetivo utilizado fue 60X. Todos los datos presentados en esta figura son representativos de al menos tres experimentos independientes.

expresión de GH se correlaciona con el *status* proliferativo de las células, pero es independiente de su grado de diferenciación. Resulta interesante resaltar que una asociación similar se ha

visto en esta misma línea celular para otras dos proteínas como son c-myc y protimosina α (Smith et al., 1993) que desempeñan un papel clave en el control de la proliferación en múltiples tipos de células (Marcu et al., 1992; Smith et al., 1995). Por lo tanto, los datos obtenidos hasta el momento sugieren que la GH producida por las células HL-60 puede intervenir en el control de su proliferación, actuando como

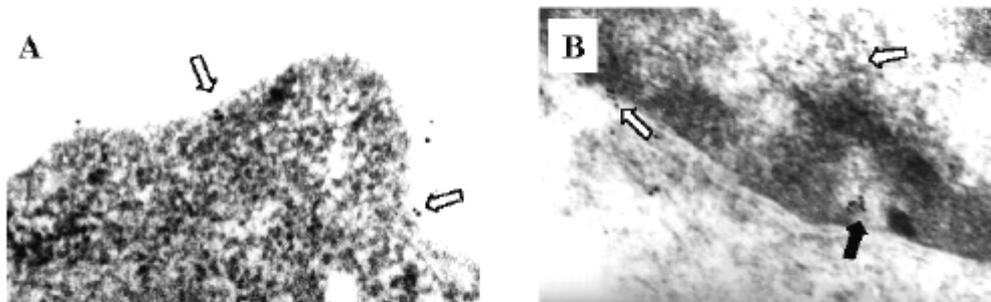


Figura 13. Localización ultraestructural de la inmunorreactividad GH en células HL-60: A. Localización de GH asociada a procesos de membrana, sugestivos de secreción y/o internalización de la hormona; B. Localización nuclear de GH (flechas blancas), en la que se puede observar inmunorreactividad GH en el interior de un poro nuclear (flecha negra).

un factor autocrino/paracrino. Sin embargo, para poder demostrar plenamente esta posibilidad, es necesario comprobar que i) la hormona es liberada al medio y ii) que las células HL-60 presentan en su membrana receptores de GH capaces de ser estimulados por la hormona. El principal problema a la hora de determinar la existencia de secreción de GH, es la baja concentración a la que se encontraría en el medio de cultivo, lo que nos obligó a utilizar una técnica altamente sensible: el fluoroinmunoensayo. En condiciones basales, los niveles de GH detectados en el medio fueron muy bajos ($0,024 \mu\text{g/l}$)

muy próximos a la sensibilidad del ensayo. Sin embargo, la despolarización celular inducida por la adición de KCl al medio de cultivo produjo un importante incremento de los mismos ($0,095 \mu\text{g/l}$), sugestivo de la existencia de fenómenos de secreción. En ningún caso, se detectó inmunorreactividad GH en el medio de cultivo.

Estos resultados fueron confirmados mediante inmunohistoquímica ultraestructural, en la que se pudo observar una importante asociación de GH a la membrana celular, indicativo de la existencia de procesos de exocitosis, aunque no puede descartarse la existen-

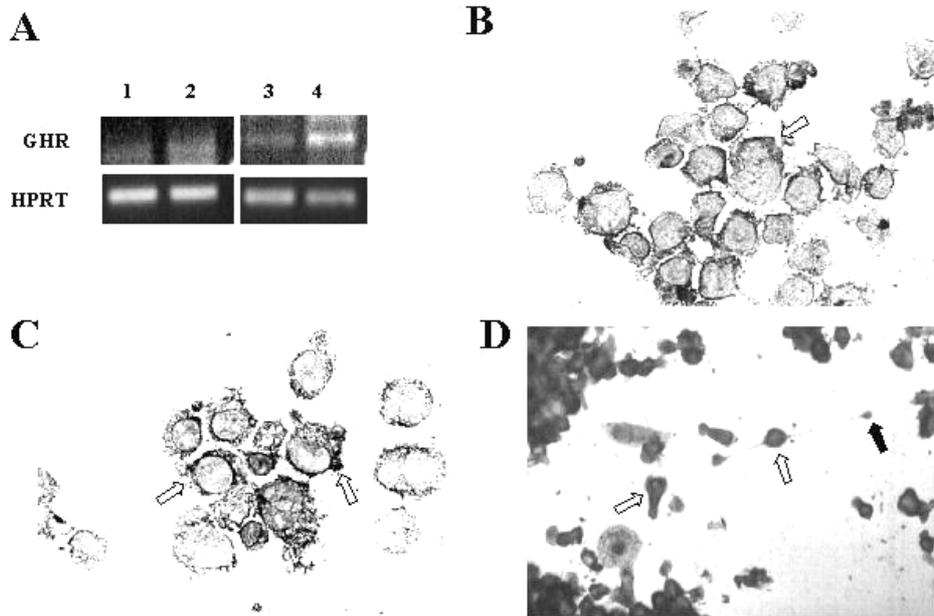


Figura 14. Efecto del tratamiento con TPA e INF- γ sobre la expresión del receptor GH: A. RT-PCR de ADNc obtenido a partir de células HL-60, células control (calles 1 y 3); células tratadas con INF- γ (calle 2); células tratadas con TPA. B-D. Inmunohistoquímica de células HL-60 tras diferentes estados de diferenciación celular, en la que se ha empleado para la detección un anticuerpo monoclonal anti-GHR (Mab263 cedido amablemente por el Dr. Lobie); B. Células control; C. Células tratadas con INF- γ ; D. Células tratadas con TPA. La inmunorreactividad GHR se localiza a nivel citoplasmático y en la membrana celular (flechas blancas). El nivel de detección obtenido en las células tratadas con TPA permite la visualización de los cambios morfológicos inducidos tras la diferenciación celular (flechas negras). El objetivo utilizado fue 60X. Todos los datos presentados en esta figura son representativos de al menos tres experimentos independientes.

cia de fenómenos de internalización de la hormona (Figura 13A). En este sentido es importante señalar la importante inmunoreactividad GH localizada en el núcleo celular, observándose incluso procesos de transporte desde el citoplasma al interior del núcleo a través de los poros nucleares (véase detalle en la Figura 13B). La existencia de internalización y posterior transporte al nú-

cleo de la GH ha sido ya descrito por otros autores, aunque la importancia fisiológica de estos procesos no se conoce todavía (Lobie et al., 1994a). Se ha propuesto que podrían constituir una vía alternativa de acción de la hormona que, de esta forma, podría activar (o inhibir) la transcripción de genes diana a través de un mecanismo de acción directo.

Al menos tan importante como

RESULTADOS

investigar la existencia de secreción de GH es demostrar que las células HL-60 presentan GHR funcionales en su membrana. Dada la gran similitud que existe entre GHR y otros miembros de la superfamilia de receptores hematopoyéticos, existe la posibilidad de que los efectos atribuibles a la GH se deban, en realidad, a la estimulación de otros miembros de la familia. De hecho, este mecanismo de acción ha sido ya propuesto con anterioridad (Estrov et al., 1991). Para demostrar la existencia de GHR utilizamos nuevamente las técnicas de RT-PCR e inmunohistoquímica (Figura 14). A diferencia de lo encontrado al analizar la expresión de GH, no se observaron variaciones en la expresión de GHR con ninguno de los tratamientos utilizados ni en los niveles de ARNm (Figura 14A), ni en los de proteína, lo que indica la existencia de expresión de GHR independientemente del grado de diferenciación o del estado proliferativo de las células.

Como cabría esperar, la mayor inmunorreactividad GHR se localizó en la membrana celular. Sin embargo, resulta también interesante destacar la existencia de un claro marcaje en el núcleo (Figura 14B, 14C y 14D). Aunque al igual que ocurría con la GH, el papel del receptor en esta localización no ha sido aclarado todavía, podría re-

presentar la existencia de un mecanismo de acción en el núcleo. De hecho, se ha descrito también la presencia de su tirosina quinasa asociada (Jak-2) en esta localización (Lobie et al., 1994a; Lobie et al., 1994b; Lobie et al., 1996).

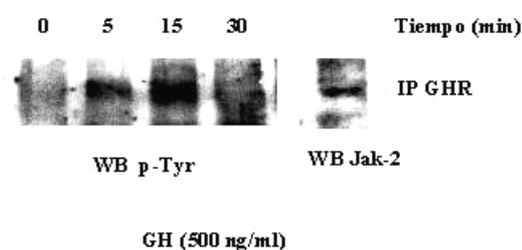


Figura 15. La GH induce la activación de la tirosina-quinasa asociada al receptor de GH (Jak-2) en células HL-60. Las células fueron estimuladas con GH (Serono, España) (500 ng/ml) a los 0, 5, 15 ó 30 minutos, los extractos celulares obtenidos fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal anti-GHR (Mab263) y analizados mediante western blot tras resolver las proteínas en un gel SDS-PAGE 7,5% e incubación con anticuerpos anti-fosfotirosina (PTyr) (1:1000) (Upstate Biotechnology Inc., EE.UU.) ó anti-Jak-2 (1:1000) (Sta. Cruz Biotechnology, EE.UU.). Todos los datos presentados en esta figura son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Para demostrar la funcionalidad del receptor expresado, las células HL-60 se trataron con GH y se analizó el nivel de fosforilación de GHR y de Jak-2 mediante western blot. Como puede observarse en la figura 15, tras inmunoprecipitar el complejo GHR con anticuerpos anti-GHR, pudo detectarse una

proteína fosforilada cuyo peso molecular correspondía al de Jak-2. El grado de fosforilación de esta proteína presentó un claro incremento a los 5 minutos y decayendo hasta los 30 minutos (Figura 15). En conjunto, estos datos relativos a las posibles modificaciones en los niveles de expresión del receptor, así como a su funcionalidad nos permiten

conocer la vía mediante la cual la GH juega su papel en estas células. La funcionalidad del receptor nos permite demostrar que la activación de las diferentes vías de señalización son específicas de la acción de GH, conclusión imposible de conseguir partiendo de datos obtenidos a partir del análisis mediante citometría de flujo realizado en otras líneas celulares (Giesbert et al., 1997).

II. Papel de la GH en la línea celular HL-60 y vías de señalización implicadas

Aunque los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la GH puede participar en el control de la proliferación de las células HL-60, para comprobar este posible papel, se procedió a bloquear sus acciones mediante la adición de anticuerpos anti-GH humana al medio de cultivo. De hecho, esta aproximación experimental había sido realizada previamente, aunque en ese caso, para el bloqueo de la acción de GH administrada exógenamente (Estrov et al., 1991). Como controles se utilizaron células tratadas con GH recombinante, suero preinmune de conejo ó vehículo.

No se observaron diferencias tras siete días de estudio entre el grupo control (tratados con vehículo) y los tratados con GH (número de células al séptimo día $2705,7 \pm 161.8$ y $2777,5 \pm 252.1$ respectivamente). Sin embargo sí existieron diferencias significativas entre el grupo al que le fueron añadidos anti-

cuerpos anti-GH y su respectivo control (tratados con suero preinmune de conejo) (número de células al séptimo día, 2201 ± 82.3 y 2688.3 ± 154.4 respectivamente con una $p < 0.05$ vs. los otros grupos) (Figura 16A). Esta disminución en el número de células comenzó a observarse al quinto día de tratamiento, siendo significativa a partir del sexto día. Para descartar que la reducción en el crecimiento celular observado en el grupo tratado con anticuerpos anti-GH fuese debido a cambios en los niveles de expresión de la hormona inducidos por la serodeprivación de las células, estos fueron determinados mediante western blot, no observándose modificaciones aparentes en los mismos (Figura 16B). Estos resultados son acordes a los obtenidos en otros modelos celulares de expresión endógena de la hormona en los que se ha demostrado la ausencia de inducción de proliferación celular por parte de la GH, cuando

ésta es administrada de forma exógena (Baglia et al., 1992), lo que podría justificar la disparidad entre los diferentes autores a la hora de considerar la acción proliferativa de GH en neoplasias de carácter hematológico, ya que ésta dependería de la presencia o no de la hormona endógena, que sería suficiente para mantener el crecimiento celular. Existen datos en la literatura que apoyan el papel de la GH en este tipo de patologías (Rogers et al., 1977; Rappaport et al., 1989; Zadik et al., 1993), en contra de otros autores que afirman que tal relación no existe (Fradkin et al., 1993; Allen et al., 1997).

Tras la ausencia de modificaciones significativas en el patrón de crecimiento celular, cinco días después de comenzado el tratamiento con anticuerpos anti-GH, nos planteamos la posibilidad de que el patrón de proliferación no se estuviese viendo afectado, y sí lo estuviese la supervivencia celular. Para evaluar esta hipótesis de trabajo, se realizó la detección de células apoptóticas en ambos grupos, control y tratadas con anticuerpos anti-GH, a los 7 días del estudio. En estas condiciones se pudo constatar de forma clara la fragmentación del ADN, indicativa de presencia de apoptosis, en el grupo de células tratadas con anticuerpos anti-GH (figura

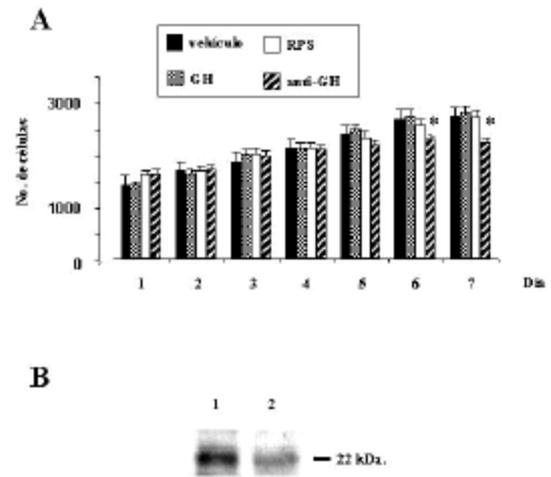


Figura 16. Efecto de GH o de anticuerpos policlonales anti-GH sobre el crecimiento celular de células HL-60. Las células fueron serodeprivadas y tratadas con GH (Serono, España) (300 ng/ml), vehículo, anticuerpos policlonales anti-GH (Sigma-Aldrich, Co., EE.UU.) (50 μ l, dilución final 1:100) o suero preimmune (RPS) (igual dilución que la empleada de anticuerpo): **A.** Número de células a lo largo de 7 días de estudio. Cada gráfico de barras muestra la media \pm SEM de platos por triplicado en dos experimentos independientes $*=p<0,05$ vs los otros grupos; **B.** Contenido de GH tras 7 días de serodeprivación evaluado mediante western blot. Células control, no serodeprivadas (calle 1); Células serodeprivadas (calle 2).

17A). Resultados similares al observado se pudieron constatar tras el estudio de ambos grupos mediante la técnica TUNEL (Figura 17B).

Como es sabido la GH puede actuar en parte a través de un incremento en la síntesis y liberación de *Insulin-like Growth factor-I* (IGF-I), cuyo papel como factor de supervivencia celular es

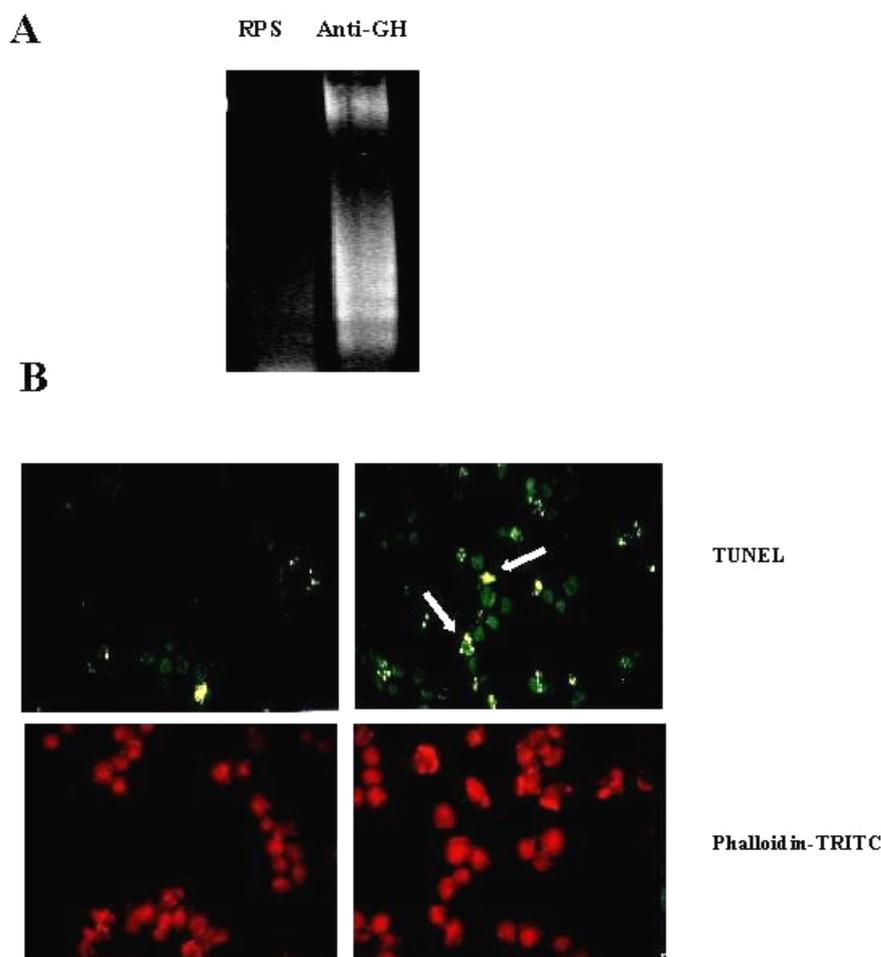


Figura 17. Inducción de apoptosis de células HL-60 mediante el tratamiento con anticuerpos anti-GH (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.): A. Inducción de fragmentación de ADN tras 7 días de tratamiento con anticuerpos anti-GH, indicativo de presencia de apoptosis celular, en comparación a la detectada en el grupo control (RPS) debida a la serodeprivación; B. Ensayo TUNEL, las flechas incican las células apoptóticas. Contratinción del citoesqueleto con Phalloidin-TRITC. Objetivo 40X.

suficientemente conocido (Raff et al., 1996). A su vez, se conoce la existencia tanto de expresión del propio factor como de su receptor en esta línea celular, con lo que a partir de nuestros resultados no podemos descartar que el papel de GH sobre la supervivencia celular observado, pueda ser mediado

de forma indirecta a través de IGF-I. Para investigar esta posibilidad estudiamos la activación por GH de vías de señalización implicadas en supervivencia celular. Para ello realizamos tratamientos a corto plazo con GH e investigamos el grado de actividad de Akt. La adición de GH al medio de cul-

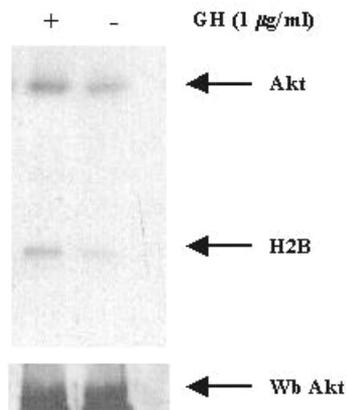


Figura 18. GH estimula la fosforilación de Akt *in vitro*. Células HL-60 fueron serodeprivadas durante 16 h., y tratadas posteriormente con 1µl/ml de GH (Serono, España) durante 10 min. Las células fueron lisadas de acuerdo a lo especificado en el apartado *Materiales y Méodos* e inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Akt (New England Biolabs, EE.UU.). Los precipitados protéicos así obtenidos fueron utilizados para la realización de un ensayo quinasa. Para el control de carga se realizó la detección de inmunorreactividad Akt mediante western blot.

tivo indujo un rápido incremento (10 min.) en los niveles de actividad quinasa de Akt, evaluada ésta como el grado de fosforilación *in vitro* del substrato histona H2B y su nivel de autofosforilación (Figura 18). Esta rápida activación de Akt nos demuestra una acción directa de la hormona sobre vías de supervivencia celular, común a otros miembros de la familia de citoquinas (Ahmed et al., 1997; Songyang et al., 1997).

III. Vías de señalización inductoras de supervivencia celular mediadas por GH

Aunque las células HL-60 manifiestan una serie de características que nos permitieron llevar a cabo los estudios anteriores, presentan también una serie de limitaciones, la principal de las cuales es que se trata de células difíciles de transfectar. Debido a este motivo, para poder analizar con más detalle las vías de señalización implicadas en las acciones antiapoptóticas de la GH utilizamos células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) transfectadas con el receptor de GH (wt GHR) o con una forma truncada ($\Delta 454$ GHR), en la que han sido eliminados todos los aminoácidos a partir de la posición 454. Esta modificación impide la acción de SHP-1, lo que origina una fosforilación sostenida de Jak-2 y en consecuencia de las proteínas fosforiladas por ella, como IRS-1 (Argetsinger et al., 1995; Sotiropoulos et al., 1996). La consecuencia de todo esto es una activación mantenida de las vías de señalización del GHR y, en definitiva, una mayor facilidad de estudio. Uno de los principales estímulos para la inducción de apoptosis en cultivo es la sero-

deprivación, por lo que comenzamos por analizar el efecto de 32 horas de serodeprivación sobre la supervivencia celular. De acuerdo con los datos existentes en la literatura (Barres et al., 1993) la serodeprivación indujo una rápida aparición de fenómenos de apoptosis en las células transfectadas con wtGHR, ya evidente a las 8 horas y siendo máxima a las 32 h (Figura 19A) mientras que el tratamiento con hGH disminuyó el grado de apoptosis, aunque sólo parcialmente. La presencia de cierto grado de apoptosis en el grupo de células wt-GHR tratadas podría ser atribuible a la dependencia de la supervivencia celular de múltiples factores, no pudiendo ser revertida la muerte celular sólo con el tratamiento con GH (Barres et al., 1993; Meyer-Franke et al., 1995).

Sin embargo, los efectos más evidentes se encontraron en los clones que habían sido transfectados con la forma truncada del receptor. En este caso, el número de células apoptóticas estaba claramente disminuído, incluso

tras 32 horas de serodeprivación (Figura 19B). También a diferencia de lo encontrado en los clones transfectados con la forma completa del receptor, en este caso la administración de GH exógena produjo un efecto escasamente relevante. Este último hallazgo resulta especialmente interesante, ya que es similar al que ya habíamos encontrado en las células HL-60. Como ya señalamos anteriormente, en estas células la administración de GH apenas incrementa la supervivencia celular porque debido a la existencia de síntesis exógena de la hormona, el eje se encuentra ya óptimamente activado. En el caso de las clon $\Delta 454$ GHR, no existe síntesis endógena de GH, pero la activación sostenida de las vías antiapoptóticas que se observa a las 32 horas de serodeprivación, determina también una activación óptima del eje. Una vez confirmado el efecto de GH en este modelo celular, similar al obtenido en la línea celular HL-60, aprovechamos las posibilidades que estos clones celulares nos ofrecían, para el estudio más profundo de la vía antiapoptótica que la GH estaba activando a través de su receptor. Para ello, y ya que PI3-K es una de las quinasas activadas a través del receptor de GH (Ridderstrale et al. 1995), y a su

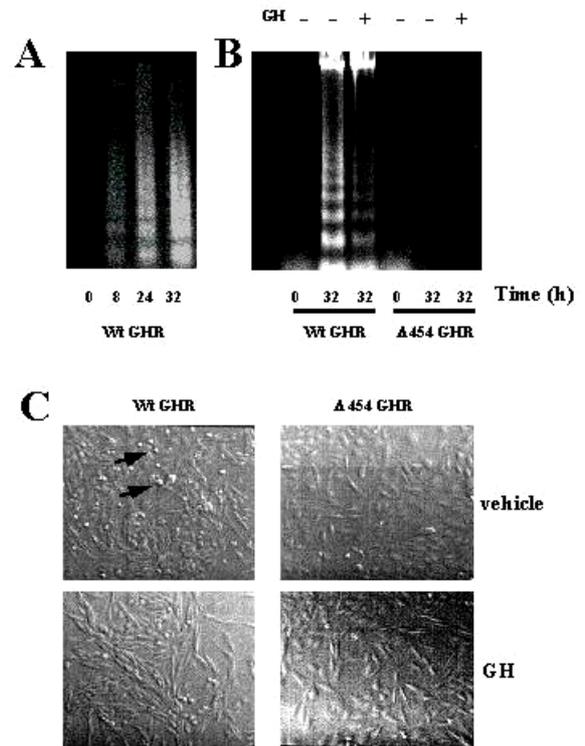


Figura 19. Inducción de apoptosis o supervivencia celular en ambos clones de células CHO (wt GHR y $\Delta 454$ GHR): A. La serodeprivación del clon wtGHR induce fragmentación de su ADN, ésta comienza a las 8 horas de serodeprivación; B. El tratamiento con GH ($1\mu\text{g/ml}$ al tiempo 0) (Serono, España) inhibe parcialmente la muerte celular en el clon wtGHR tras 32 h. de serodeprivación, mientras que en el clon $\Delta 454$ GHR apenas existe fragmentación de ADN. C. Fotomicrofotografías realizadas con modulación de contraste de Hofman tras 32 h. de serodeprivación tanto en células tratadas con hGH como con vehículo (control). Las flechas indican los cambios morfológicos producidos en las células apoptóticas.

vez, la principal quinasa implicada en la fosforilación de Akt, quisimos demostrar si GH podría activar la fosforilación de Akt y si ésta, en este caso, también era dependiente de la activación de PI3-K. Para ello utilizamos anticuerpos mo-

RESULTADOS

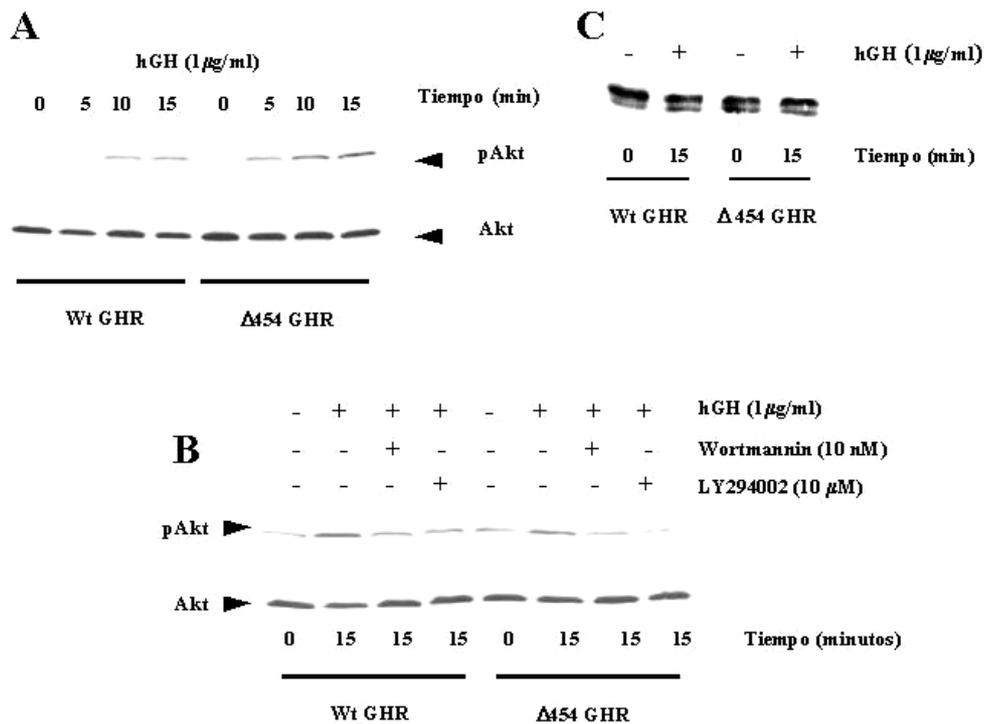


Figura 20. Activación de vías antiapoptóticas mediadas por GHR en células CHO: **A.** Previamente a la estimulación, las células fueron cultivadas 48 h. en 1% de suero fetal bovino, tras lo que fueron serodeprivadas 2 h. Para la determinación de la inmunorreactividad Akt (1:1000) y de Akt fosforilado en la Ser₄₇₃ (1:1000) se emplearon anticuerpos específicos (New England Biolabs, EE.UU.); **B.** La fosforilación de Akt inducida por el tratamiento con GH (Serono, España) fue bloqueado con la exposición de los cultivos a wortmannin y LY294002 (Sigma-Aldrich Co. EE.UU.), demostrándose así la implicación en la vía activada de PI3-K; **C.** El contenido celular de Bcl-2 fue determinado mediante western blot empleando para ello el anticuerpo policlonal anti-Bcl-2 específico (Sta. Cruz Biotechnology, EE.UU.) (1:1000). No se observaron cambios tras la estimulación con hGH.

noclonales capaces de distinguir entre formas no fosforiladas de Akt, y aquellas fosforiladas en el residuo Ser₄₇₃ (y por tanto activadas). En ambos clones, la administración de GH produjo un rápido incremento de la fosforilación de Akt, con un máximo a los 15 minutos (Figura 20A). Para demostrar que esta estimulación es dependiente de PI3-K,

repetimos el experimento en presencia de dos inhibidores de esta vía: wortmannin y LY290042 (Figura 20B), cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la actividad catalítica de PI3-K.

Aunque, como ya señalamos en la introducción, los mecanismos *downstream* a la activación de Akt no se conocen en detalle, se ha visto reciente-

mente que una vez activada, Akt induce la fosforilación de Bad, miembro de la familia Bcl-2 implicado en la inducción de apoptosis, por lo que Akt inactivaría la función de éste, explicando así el mecanismo de inhibición de apoptosis mediado por esta serina-treonina quinasa (Datta et al., 1997).

Sin embargo, existe también la posibilidad de que otras vías antiapoptóticas independientes de Bad puedan ser activadas por Akt. De estas, la más importante por el momento es la vía dependiente de Bcl-2. Algunos autores

han descrito que Akt es capaz de estimular la transcripción del gen que codifica Bcl-2, aunque este no ha sido un hallazgo universal. Para analizar esta posibilidad, estudiamos el efecto de la administración de GH sobre los niveles de Bcl-2 en células CHO. En ninguno de los dos clones se produjeron cambios. Estos resultados están de acuerdo a otros previamente publicados (Kennedy et al., 1997), en los que se ha demostrado la activación exclusivamente de la vía de Akt, independientemente de Bcl-2.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La regulación del crecimiento corporal depende de la interacción de múltiples hormonas y factores de crecimiento, entre los cuales, la GH desempeña el principal papel, al menos durante el período de vida postnatal. La GH es el principal regulador del crecimiento longitudinal desde el nacimiento hasta el final de la pubertad, y en ausencia de la hormona, la velocidad de crecimiento se ve reducida de forma drástica. Un efecto similar se produce ante cualquier alteración de su bioactividad o en su receptor (Laron et al., 1966), como demuestran los resultados obtenidos en ratones *knockout* del receptor de GH (Zhou et al., 1997). Por el contrario, un exceso de secreción de GH durante el período de crecimiento determinará un incremento de la talla corporal, fácilmente observable tanto en humanos como en ratones transgénicos (Palmiter et al., 1983; Daughaday et al., 1992).

La GH ejerce sus acciones en parte de forma indirecta, induciendo un incremento de la síntesis y liberación de IGF-I. IGF-I es producida principalmente en el hígado (aunque también en otros tejidos), y es un potente estimulador del crecimiento en múltiples tipos celulares (Raff, 1996).

El hecho de que a lo largo los últimos años se haya descrito la existencia de expresión de GH en diversas localizaciones extrahipofisarias, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas de carácter neoplásico (Weigent et al., 1988; Baglia et al., 1992; Lytras et al., 1993; Mol et al., 1995a; Mol et al., 1995b) sugiere que, junto con su papel de regulador sistémico del crecimiento la GH ejercería un control local de este proceso en determinados tejidos. El control sistémico es necesario para la coordinación del crecimiento de los diferentes órganos a lo largo del desarrollo, no obstante la mayoría de los procesos de crecimiento que se producen en el individuo son dependientes del control local mediado por señales de origen autocrino-paracrino. Hasta el momento, los datos existentes en la literatura relativos al papel que la hormona pudiese jugar a este nivel eran escasos, y sólo era posible extraer de los mismos conclusiones relativas a la posible asociación de la presencia de GH y el aumento de la celularidad en los modelos estudiados (Baglia et al., 1992; Lytras et al., 1993; Mol et al., 1995a; Mol et al., 1995b).

Como ocurre en la regulación del crecimiento corporal, el tamaño de cada órgano o cada tejido vendrá determinado por el balance entre división y muerte celular

(Raff, 1996). Por tanto, cualquier factor que promueva el crecimiento de un tejido puede actuar de dos maneras: incrementando la tasa de división celular o aumentando la supervivencia de las células existentes (o a través de una combinación de ambas). En el caso de la hormona de crecimiento, y contra lo que cabría esperar, nuestros datos indican que su efecto está mediado por un incremento de la supervivencia celular, si bien los resultados de este estudio no permiten descartar que la hormona pueda ejercer también un efecto mitogénico.

De acuerdo con este planteamiento, el efecto de la GH sería común al de la mayoría de citoquinas, cuyos receptores, como ya se indicó, pertenecen a la misma familia del GHR. En esta familia de receptores, el papel principal de las señales antiapoptóticas es desempeñado por PI3-K, una proteína-quinasa que induce la fosforilación de inositoles de membrana, cuyo efecto final será la activación de Akt. Akt es, a su vez, uno de los principales reguladores de las vías encargadas de mantener la supervivencia celular (Marte y Downward, 1997).

En base a todo lo expuesto, nuestros resultados sugieren la existencia de un nuevo mecanismo de acción para la GH, ejercido al menos a nivel local. La principal conclusión de este planteamiento es que la GH hipofisaria ejercería una acción similar, de forma que su capacidad de potenciar el crecimiento corporal puede deberse, al menos en parte, a su capacidad de incrementar la supervivencia celular. Este mecanismo de acción encaja plenamente en los modelos actuales de regulación del crecimiento corporal, en los que el tamaño corporal depende casi exclusivamente del número de células de cada individuo, determinado a su vez por el balance entre muerte y supervivencia.

No podemos descartar, al menos de momento que también a nivel sistémico la GH ejerza un efecto mitogénico, directo o secundario a la inducción de liberación de IGF-I. De hecho, IGF-I otro importante regulador del crecimiento capaz de actuar tanto de forma sistémica como local, ejerce sus acciones por un doble mecanismo ya que es capaz de estimular la proliferación de determinados tipos celulares como determinar un incremento de la supervivencia en otros.

En resumen, el conocimiento de las vías que GH activa, relacionadas con el efecto de bloqueo de vías apoptóticas, a través de la activación de Akt dependiente de PI3-K (Figura 21), hacen pensar que la hormona lleva a cabo un efecto directo positivo sobre la supervivencia celular, lo que sería una nueva acción, hasta ahora no descrita dentro de este puzzle genético, molecular y metabólico que es lo que conocemos como hormona de crecimiento.

DISCUSIÓN

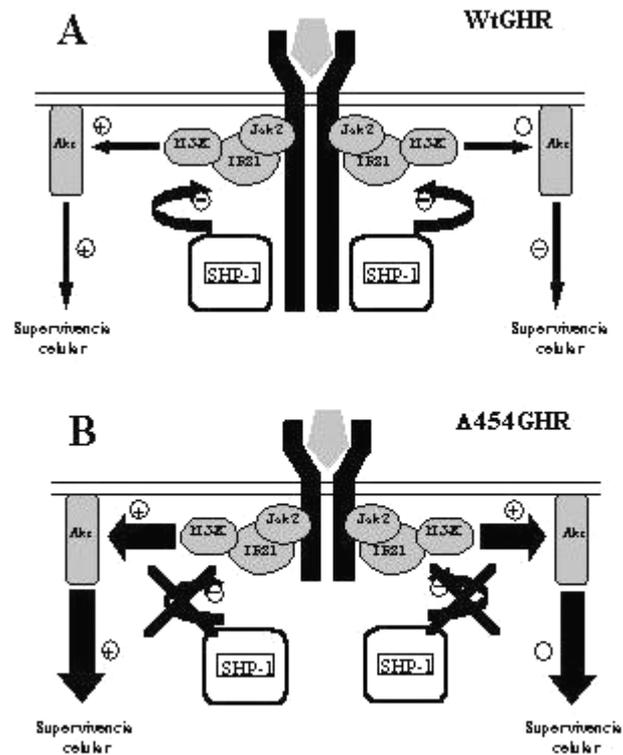


Figura 21. Modelo de la vía de señalización mediada a través de GHR que induce la supervivencia celular. A. En el clon de células CHO (wtGHR), GH induce la dimerización del receptor y la posterior activación de forma secuencial de Jak-2, IRS-1 y PI3-K/Akt. Este proceso es regulado de forma negativa por PTP SHP-1; B. En el clon $\Delta 454$ GHR la ausencia de la cola C-terminal del receptor, permite una activación mantenida de Jak-2 y por tanto un incremento de la señalización mediada por GHR, probablemente debido a la imposibilidad de activación de la fosfatasa SHP-1.

DISCUSSION

DISCUSSION

Somatic growth regulation depends on the interaction of multiple hormones and growth factors. Among these, GH plays the main role in control of longitudinal growth from birth to the end of puberty. When the hormone levels are low, the growth rate is drastically reduced. A similar effect is observed when there is a defect in its receptor (Laron et al., 1966), as it has been shown in knockout mice of the GH receptor (Zhou et al., 1997). In contrast, an excess of GH secretion will determinate an increase of height both in both humans and transgenic mice (Palmiter et al., 1983; Daughaday et al., 1992).

GH exerts its actions partially indirectly, by inducing an increase of IGF-I synthesis and release. IGF-I is mainly produced in the liver (although it is synthesized in other tissues too), and is a potent stimulator of growth in multiples cellular types (Raff, 1996).

Recently it has been described GH expression in different extra-pituitary tissues, in both physiological and pathological situations (in special neoplasms) (Weigent et al., 1988; Baglia et al., 1992; Lytras et al., 1993; Mol et al., 1995a; Mol et al., 1995b). This like us suggests that, GH besides its role in the systemic growth control, also exerts a local regulation of the cell growth process in different tissues. The systemic control is needed in order to coordinate the growth of different organs. Nevertheless the majority of cell growth process produced depends on autocrine-paracrine signals. Until now the possible role of GH on the local control of cell growth is poorly understood (Baglia et al., 1992; Lytras et al., 1993; Mol et al., 1995a; Mol et al., 1995b).

As it occurs in the regulation of body growth, the size of each organ or tissue will be fixed by the balance between cellular division and cell death (Raff, 1996). Therefore, any factor that promotes tissue growth can act in two ways: by increasing the cellular division rate or by increasing the survival (or through a combination of both mechanisms). Our results indicate that unexpectedly growth hormone effect is mediated by an increase of the cellular survival, but it is not possible to rule out a mitogenic effect too.

GHR belongs to the cytokine receptor family. In this family of receptors, the main antiapoptotic signals are PI3-K-dependent. This protein kinase induce the

phosphorylation of membrane inositols, activating finally Akt finally. Akt is one of the main regulators survival pathways (Marte and Downward, 1997). Our data show that the effect of GH on cellular growth is common to the majority of cytokines.

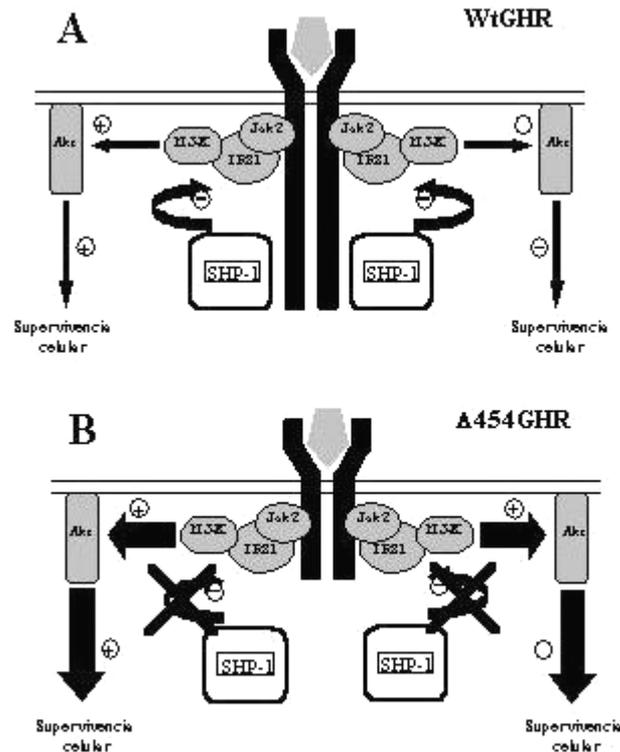


Figure 21. Model of GHR signalling on survival pathways. A) In CHO cells bearing the wild type form of GHR, GH-induced receptor dimerization promotes the sequential activation of Jak-2, IRS-1 and PI3-K/Akt. This process is negatively modulated by the PTP SHP-1. B) Absence C-terminal tail in $\Delta 454$ GHR results in persistent Jak-2 activation and, therefore, in increasing GHR signalling. We propose that this effect is secondary to loss of SHP-1 action.

Therefore, our results suggest the existence of a new local mechanism of action of GH. The main conclusion of this propose is that pituitary GH exerts a similar action, acting on body growth through an increase cellular survival. This mechanism of action is accord with recent somatic growth regulation models, this growth depends of the number of cells in each subject, conditioned through the balance between cell death and survival.

DISCUSSION

Nevertheless we cannot rule out, for the moment that GH play a systemic mitogenic effect, directly or secondary to the release induction of IGF-I. In fact, IGF-I, another important growth regulator be able to act both systemic and local level, exerts its actions through a double mechanism: stimulating the proliferation of different kind of cells and increasing the survival of others.

In summary, the blockade of apoptotic pathways by GH through the PI3-K-dependent Akt activation (Figure 21), suggests that the hormone carries out a direct positive effect on the cellular survival, a new action, not described until now into this genetic, molecular and metabolic puzzle knowing as growth hormone.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La hormona de crecimiento actúa como un factor autocrino-paracrino en el crecimiento de la línea celular HL-60.
2. Sus acciones son dependientes de un incremento de la supervivencia celular mediada a través de las vías antiapoptóticas dependientes de Akt.
3. Aunque no descartamos un efecto de la GH sobre la proliferación celular, nuestros resultados sugieren que la hormona de crecimiento actúa como un factor de supervivencia celular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. Growth hormone acts as an autocrine-paracrine factor in the growth of the HL-60 cell line.
2. GH actions are dependent of an increase of the cellular survival through Akt dependent antiapoptotic pathways.
3. Although we do not discard an effect of GH on cellular proliferation, our results suggest that the growth hormone acts as a cellular survival factor.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, N.N., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Chan, T.O., and Tsichlis, P.N. (1997). Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94 , 3627-3632.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399, 333-338.
- Alessi, D.R. and Cohen, P. (1998). Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8, 55-62.
- Allen, D.B., Rundle, A.C., Graves, D.A., and Blethen, S.L. (1997). Risk of leukemia in children treated with human growth hormone: review and reanalysis. *J.Pediatr.* 131, S32-S36.
- Allevato, G., Billestrup, N., Goujon, L., Galsgaard, E.D., Norstedt, G., Postel-Vinay, M.C., Kelly, P.A., and Nielsen, J.H. (1995). Identification of phenylalanine 346 in the rat growth hormone receptor as being critical for ligand-mediated internalization and down- regulation. *J.Biol.Chem.* 270, 17210-17214.
- Alonso, M., Segura, C., Dieguez, C., and Perez-Fernandez, R. (1998). High-Affinity Binding Sites to the Vitamin D Receptor DNA Binding Domain in the Human Growth Hormone Promoter. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 247, 882-887.
- Argetsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., and Carter-

BIBLIOGRAFÍA

- Su, C. (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74, 237-244.
- Argetsinger, L.S., Hsu, G.W., Myers, M.G.J., Billestrup, N., White, M.F., and Carter-Su, C. (1995). Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J.Biol.Chem.* 270, 14685-14692.
- Argetsinger, L.S., Norstedt, G., Billestrup, N., White, M.F., and Carter-Su, C. (1996). Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. *J.Biol.Chem.* 271, 29415-29421.
- Ayling, R.M., Ross, R., Towner, P., Von, L.S., Finidori, J., Moutoussamy, S., Buchanan, C.R., Clayton, P.E., and Norman, M.R. (1997). A dominant-negative mutation of the growth hormone receptor causes familial short stature. *Nat.Genet.* 16, 13-14.
- Baglia, L.A., Cruz, D., and Shaw, J.E. (1992). Production of immunoreactive forms of growth hormone by the Burkitt tumor serum-free cell line sfRamos. *Endocrinology* 130, 2446-2454.
- Barnard, R., Southard, J.N., Edens, A., and Talamantes, F. (1993). Growth hormone receptor and growth hormone-binding protein messages in mouse placenta contain the exon analogous to human exon 3. *Endocrinology* 133, 1474-1477.
- Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M., and Raff, M.C. (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118, 283-295.
- Baumann, G. (1991). Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr.Rev.* 12, 424-449.
- Baumgartner, J.W., Wells, C.A., Chen, C.M., and Waters, M.J. (1994). The role of the WSXWS equivalent motif in growth hormone receptor function. *J.Biol.Chem.* 269, 29094-29101.
- Bazan, J.F. (1989). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 164, 788-795.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsichlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-

BIBLIOGRAFÍA

threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.

Billestrup, N., Bouchelouche, P., Allevato, G., Ilondo, M., and Nielsen, J.H. (1995). Growth hormone receptor C-terminal domains required for growth hormone-induced intracellular free Ca²⁺ oscillations and gene transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 2725-2729.

Birnie, G.D. (1988). The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br.J.Cancer Suppl.* 9, 41-45.

Bowers, C.Y., Reynolds, G.A., Durham, D., Barrera, C.M., Pezzoli, S.S., and Thorner, M.O. (1990). Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 70, 975-982.

Burgering, B.M. and Coffey, P.J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.

Carter-Su, C., Schwartz, J., and Smit, L.S. (1996). Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu.Rev.Physiol.* 58, 187-207.

Castrillo, J.L., Theill, L.E., and Karin, M. (1991). Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* 253, 197-199.

Chen, E.Y., Liao, Y.C., Smith, D.H., Barrera-Saldana, H.A., Gelinas, R.E., and Seeburg, P.H. (1989). The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4, 479-497.

Coffey, P.J. and Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families [published erratum appears in *Eur J Biochem* 1992 May 1;205(3):1217]. *Eur.J.Biochem.* 201, 475-481.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* 326, 1-16.

Collins, S.J. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70, 1233-1244.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein

BIBLIOGRAFÍA

- kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Cunningham, B.C., Ultsch, M., De, V.A., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R., and Wells, J.A. (1991). Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254, 821-825.
- DaSilva, L., Howard, O.M., Rui, H., Kirken, R.A., and Farrar, W.L. (1994). Growth signaling and JAK2 association mediated by membrane-proximal cytoplasmic regions of prolactin receptors. *J.Biol.Chem.* 269, 18267-18270.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Daughaday, W.H. (1992). Pituitary gigantism. *Endocrinol.Metab.Clin.North Am.* 21, 633-647.
- De, V.A., Ultsch, M., and Kossiakoff, A.A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.
- del, P.L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Devesa, J, Lima, L, and Tresguerres, J. A. F. (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends.Endocrin.Met.* 3, 175-183.
- Dinerstein, H., Lago, F., Goujon, L., Ferrag, F., Esposito, N., Finidori, J., Kelly, P.A., and Postel-Vinay, M.C. (1995). The proline-rich region of the GH receptor is essential for JAK2 phosphorylation, activation of cell proliferation, and gene transcription. *Mol.Endocrinol.* 9, 1701-1707.
- Duriez, B., Sobrier, M.L., Duquesnoy, P., Tixier-Boichard, M., Decuypere, E., Coquerelle, G., Zeman, M., Goossens, M., and Amselem, S. (1993). A naturally occurring growth hormone receptor mutation: in vivo and in vitro evidence for the functional importance of the WS motif common to all members of the cytokine receptor superfamily. *Mol.Endocrinol.* 7, 806-814.
- Eliard, P.H., Marchand, M.J., Rousseau, G.G., Formstecher, P., Mathy-Hartert, M., Belayew, A., and Martial, J.A.

- (1985). Binding of the human glucocorticoid receptor to defined regions in the human growth hormone and placental lactogen genes. *DNA* 4, 409-417.
- Estrov, Z., Meir, R., Barak, Y., Zaizov, R., and Zadik, Z. (1991). Human growth hormone and insulin-like growth factor-1 enhance the proliferation of human leukemic blasts. *J.Clin.Oncol.* 9, 394-399.
- Fradkin, J.E., Mills, J.L., Schonberger, L.B., Wysowski, D.K., Thomson, R., Durako, S.J., and Robison, L.L. (1993). Risk of leukemia after treatment with pituitary growth hormone. *JAMA* 270, 2829-2832.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Garibotto, G., Barreca, A., Russo, R., Sofia, A., Araghi, P., Cesarone, A., Malaspina, M., Fiorini, F., Minuto, F., and Tizianello, A. (1997). Effects of recombinant human growth hormone on muscle protein turnover in malnourished hemodialysis patients. *J.Clin.Invest.* 99, 97-105.
- Giesbert, S., Panzer, S., Kovar, H., Fischer, S., Printz, D., Gadner, H., and Panzer-Grumayer, E.R. (1997). Acute leukemias express a functional receptor for the human growth hormone. *Ann.Hematol.* 74, 253-257.
- Godowski, P.J., Leung, D.W., Meacham, L.R., Galgani, J.P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P.S., Parks, J.S., Laron, Z., and Wood, W.I. (1989). Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86, 8083-8087.
- Goh, E.L., Pircher, T.J., Wood, T.J., Norstedt, G., Graichen, R., and Lobie, P.E. (1997). Growth hormone-induced reorganization of the actin cytoskeleton is not required for STAT5 (signal transducer and activator of transcription-5)- mediated transcription. *Endocrinology* 138, 3207-3215.
- Goodman, H.M., Schwartz, Y., Tai, L.R., and Gorin, E. (1990). Actions of growth hormone on adipose tissue: possible involvement of autocrine or paracrine factors. *Acta Paediatr.Scand.Suppl.* 367, 132-136.
- Govers, R., van, K.P., Schwartz, A.L., and Strous, G.J. (1997). Linkage of the

- ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. *EMBO J.* *16*, 4851-4858.
- Govers, R., van, K.P., Schwartz, A.L., and Strous, G.J. (1998). Di-leucine-mediated internalization of ligand by a truncated growth hormone receptor is independent of the ubiquitin conjugation system. *J.Biol.Chem.* *273*, 16426-16433.
- Hackett, R.H., Wang, Y.D., Sweitzer, S., Feldman, G., Wood, W.I., and Larner, A.C. (1997). Mapping of a cytoplasmic domain of the human growth hormone receptor that regulates rates of inactivation of Jak2 and Stat proteins. *J.Biol.Chem.* *272*, 11128-11132.
- Herman-Bonert, V. and Fagin, J.A. (1995). Molecular pathogenesis of pituitary tumours. *Baillieres.Clin.Endocrinol.Metab.* *9*, 203-223.
- Horseman, N.D. and Yu-Lee, L.Y. (1994). Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr.Rev.* *15*, 627-649.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee, K.K., Pong, S.S., Chaung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevicz, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.S., Dean, D.C., Melillo, D.G., and Van der Ploeg LH (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* *273*, 974-977.
- Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B., and Silvennoinen, O. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends.Biochem.Sci.* *19*, 222-227.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., and Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *88*, 4171-4175.
- Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., and Hay, N. (1997). The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* *11*, 701-713.

- Kim, S.O., Jiang, J., Yi, W., Feng, G.S., and Frank, S.J. (1998). Involvement of the Src homology 2-containing tyrosine phosphatase SHP-2 in growth hormone signaling. *J.Biol.Chem.* 273, 2344-2354.
- Kimura, C., Ohkubo, S., Ogi, K., Hosoya, M., Itoh, Y., Onda, H., Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.R., and Stibbs, H.H. (1990). A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 166, 81-89.
- Kooijman, R., Hooghe-Peters, E.L., and Hooghe, R. (1996). Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv.Immunol.* 63, 377-454.
- Kooijman, R., Malur, A., Van Buul-Offers, S.C., and Hooghe-Peters, E.L. (1997). Growth hormone expression in murine bone marrow cells is independent of the pituitary transcription factor Pit-1. *Endocrinology* 138, 3949-3955.
- Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis [published erratum appears in *Nat Med* 1997 Aug;3(8):934]. *Nat.Med.* 3, 614-620.
- Kyle, C.V., Evans, M.C., and Odell, W.D. (1981). Growth hormone-like material in normal human tissues. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 53, 1138-1144.
- Laron, Z., Pertzalan, A., and Mannheimer, S. (1966). Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone--a new inborn error of metabolism? *Isr.J.Med.Sci.* 2, 152-155.
- Lew, A.M. and Elsholtz, H.P. (1991). Cloning of the human cDNA for transcription factor Pit-1. *Nucleic.Acids.Res.* 19, 6329
- Lo, H.C., Hirvonen, M.D., Kritsch, K.R., Keeseey, R.E., and Ney, D.M. (1997). Growth hormone or insulin-like growth factor I increases fat oxidation and decreases protein oxidation without altering energy expenditure in parenterally fed rats. *Am.J.Clin.Nutr.* 65, 1384-1390.
- Lobie, P.E., Garcia-Aragon, J., Lincoln, D.T., Barnard, R., Wilcox, J.N., and Waters, M.J. (1993). Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 74, 225-233.

BIBLIOGRAFÍA

- Lobie, P.E., Mertani, H., Morel, G., Morales-Bustos, O., Norstedt, G., and Waters, M.J. (1994a). Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. *J.Biol.Chem.* *269*, 21330-21339.
- Lobie, P.E., Wood, T.J., Chen, C.M., Waters, M.J., and Norstedt, G. (1994b). Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J.Biol.Chem.* *269*, 31735-31746.
- Lobie, P.E., Ronsin, B., Silvennoinen, O., Haldosen, L.A., Norstedt, G., and Morel, G. (1996). Constitutive nuclear localization of Janus kinases 1 and 2. *Endocrinology* *137*, 4037-4045.
- Lytras, A., Quan, N., Vrontakis, M.E., Shaw, J.E., Cattini, P.A., and Friesen, H.G. (1993). Growth hormone expression in human Burkitt lymphoma serum-free Ramos cell line. *Endocrinology* *132*, 620-628.
- Marcu, K.B., Bossone, S.A., and Patel, A.J. (1992). myc function and regulation. *Annu.Rev.Biochem.* *61*, 809-860.
- Marte, B.M., and Downward, J. (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends.Biochem.Sci.* *22*, 355-358.
- McGill, G. (1997). Apoptosis In Tumorigenesis And Cancer Therapy. *Front.Biosci.* *2*, d353-d379
- Menon, R.K., Stephan, D.A., Singh, M., Morris, S.M.J., and Zou, L. (1995). Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene. Identification of a developmentally regulated enhancer element. *J.Biol.Chem.* *270*, 8851-8859.
- Mercado, M., DaVila, N., McLeod, J.F., and Baumann, G. (1994). Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* *78*, 731-735.
- Meyer-Franke, A., Kaplan, M.R., Pfrieder, F.W., and Barres, B.A. (1995). Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* *15*, 805-819.
- Mol, J.A., van, G.E., Selman, P.J., Wolfswinkel, J., Rijnberk, A., and Rutteman, G.R. (1995a). Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J.Clin.Invest.* *95*, 2028-2034.
- Mol, J.A., Henzen-Logmans, S.C., Hageman, P., Misdorp, W.,

BIBLIOGRAFÍA

- Blankenstein, M.A., and Rijnberk, A. (1995b). Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 80, 3094-3096.
- Mol, J.A., van, G.E., Rutteman, G.R., and Rijnberk, A. (1996). New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 57, 67-71.
- Moutoussamy, S., Renaudie, F., Lago, F., Kelly, P.A., and Finidori, J. (1998). Grb10 Identified as a Potential Regulator of Growth Hormone (GH) Signaling by Cloning of GH Receptor Target Proteins. *J.Biol.Chem.* 273, 15906-15912.
- Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 11349-11353.
- Palmiter, R.D., Norstedt, G., Gelinas, R.E., Hammer, R.E., and Brinster, R.L. (1983). Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222, 809-814.
- Pan, W.T., Liu, Q.R., and Bancroft, C. (1990). Identification of a growth hormone gene promoter repressor element and its cognate double- and single-stranded DNA-binding proteins. *J.Biol.Chem.* 265, 7022-7028.
- Parini, P., Angelin, B., Lobie, P.E., Norstedt, G., and Rudling, M. (1995). Growth hormone specifically stimulates the expression of low density lipoprotein receptors in human hepatoma cells. *Endocrinology* 136, 3767-3773.
- Plotsky, P.M. and Vale, W. (1985). Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science* 230, 461-463.
- Proud, C.G. (1996). p70 S6 kinase: an enigma with variations. *Trends.Biochem.Sci.* 21, 181-185.
- Pullen, N., Dennis, P.B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S.C., Hemmings, B.A., and Thomas, G. (1998). Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279, 707-710.

BIBLIOGRAFÍA

- Raff, M.C. (1996). Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell* 86, 173-175.
- Rappaport, R. and Brauner, R. (1989). Growth and endocrine disorders secondary to cranial irradiation. *Pediatr.Res.* 25, 561-567.
- Ridderstrale, M., Degerman, E., and Tornqvist, H. (1995). Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3- kinase in primary adipocytes. *J.Biol.Chem.* 270, 3471-3474.
- Rogers, P.C., Komp, D., Rogol, A., and Sabio, H. (1977). Possible effects of growth hormone on development of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2, 434-435.
- Rogers, S.A. and Hammerman, M.R. (1989). Growth hormone activates phospholipase C in proximal tubular basolateral membranes from canine kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86, 6363-6366.
- Ross, R.J., Esposito, N., Shen, X.Y., Von, L.S., Chew, S.L., Dobson, P.R., Postel-Vinay, M.C., and Finidori, J. (1997). A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol.Endocrinol.* 11, 265-273.
- Roy, R.J., Gosselin, P., Anzivino, M.J., Moore, D.D., and Guerin, S.L. (1992). Binding of a nuclear protein to the rat growth hormone silencer element. *Nucleic.Acids.Res.* 20, 401-408.
- Rozakis-Adcock, M. and Kelly, P.A. (1992). Identification of ligand binding determinants of the prolactin receptor. *J.Biol.Chem.* 267, 7428-7433.
- Ruvkun, G. and Finney, M. (1991). Regulation of transcription and cell identity by POU domain proteins. *Cell* 64, 475-478.
- Sacca, L., Cittadini, A., and Fazio, S. (1994). Growth hormone and the heart. *Endocr.Rev.* 15, 555-573.
- Shepard, A.R., Zhang, W., and Eberhardt, N.L. (1994). Two CGTCA motifs and a GHF1/Pit1 binding site mediate cAMP-dependent protein kinase A regulation of human growth hormone gene expression in rat anterior pituitary GC cells. *J.Biol.Chem.* 269, 1804-1814.
- Slater, E.P., Rabenau, O., Karin, M., Baxter, J.D., and Beato, M. (1985). Glucocorticoid receptor binding and

BIBLIOGRAFÍA

- activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol.Cell Biol.* 5, 2984-2992.
- Smith, M.R., al-Katib, A., Mohammad, R., Silverman, A., Szabo, P., Khilnani, S., Kohler, W., Nath, R., and Mutchnick, M.G. (1993). Prothymosin alpha gene expression correlates with proliferation, not differentiation, of HL-60 cells. *Blood* 82, 1127-1132.
- Smith, M.R. (1995). Prothymosin alpha: in search of a function. *Leuk.Lymphoma.* 18, 209-214.
- Somers, W., Ultsch, M., De, V.A., and Kossiakoff, A.A. (1994). The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature* 372, 478-481.
- Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R., and Franke, T.F. (1997). Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 11345-11350.
- Sotiropoulos, A., Moutoussamy, S., Renaudie, F., Clauss, M., Kayser, C., Gouilleux, F., Kelly, P.A., and Finidori, J. (1996). Differential activation of Stat3 and Stat5 by distinct regions of the growth hormone receptor. *Mol.Endocrinol.* 10, 998-1009.
- Stallings-Mann, M.L., Ludwiczak, R.L., Klinger, K.W., and Rottman, F. (1996). Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 12394-12399.
- Stofega, M.R., Wang, H., Ullrich, A., and Carter-Su, C. (1998). Growth hormone regulation of SIRP and SHP-2 tyrosyl phosphorylation and association. *J.Biol.Chem.* 273, 7112-7117.
- Strobl, J.S. and Thomas, M.J. (1994). Human growth hormone. *Pharmacol.Rev.* 46, 1-34.
- Taga, T. and Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J.* 6, 3387-3396.
- Theill, L.E. and Karin, M. (1993). Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr.Rev.* 14, 670-689.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

BIBLIOGRAFÍA

- Tiong, T.S. and Herington, A.C. (1991). Tissue distribution, characterization, and regulation of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor and serum binding protein in the rat. *Endocrinology* *129*, 1628-1634.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M., and Cantley, L.C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J.Biol.Chem.* *269*, 32358-32367.
- Urbanek, M., Russell, J.E., Cooke, N.E., and Liebhaber, S.A. (1993). Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J.Biol.Chem.* *268*, 19025-19032.
- van der Schoot CE, von dem Borne AE, and Tetteroo, P.A. (1987). Characterization of myeloid leukemia by monoclonal antibodies, with an emphasis on antibodies against myeloperoxidase. *Acta Haematol.* *78 Suppl 1*, 32-40.
- Vander, H.M., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., and Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* *91*, 627-637.
- Vanderkuur, J.A., Butch, E.R., Waters, S.B., Pessin, J.E., Guan, K.L., and Carter-Su, C. (1997). Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* *138*, 4301-4307.
- Weigent, D.A., Baxter, J.B., Wear, W.E., Smith, L.R., Bost, K.L., and Blalock, J.E. (1988). Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB J.* *2*, 2812-2818.
- Weigent, D.A. and Blalock, J.E. (1991). The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell Immunol.* *135*, 55-65.
- Winston, L.A. and Hunter, T. (1995). JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J.Biol.Chem.* *270*, 30837-30840.
- Yamauchi, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Tsuji, Y., Stark, G.R., Kerr, I.M., Tsushima, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Tobe, K., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1998). Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine

BIBLIOGRAFÍA

- phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *J.Biol.Chem.* 273, 15719-15726.
- Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Tamemoto, H., Sekine, N., Wada, M., Honjo, M., Takahashi, M., Takahashi, T., Hirai, H., Tushima, T., Akanuma, Y., Fujita, T., Komuro, I., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1997). Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 390, 91-96.
- Yang, E. and Korsmeyer, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401.
- Yi, W., Kim, S.O., Jiang, J., Park, S.H., Kraft, A.S., Waxman, D.J., and Frank, S.J. (1996). Growth hormone receptor cytoplasmic domain differentially promotes tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 5b and 3 by activated JAK2 kinase. *Mol.Endocrinol.* 10, 1425-1443.
- Zadik, Z., Estrov, Z., Karov, Y., Hahn, T., and Barak, Y. (1993). The effect of growth hormone and IGF-I on clonogenic growth of hematopoietic cells in leukemic patients during active disease and during remission--a preliminary report. *J.Pediatr.Endocrinol.* 6, 79-83.
- Zhou, Y., Xu, B.C., Maheshwari, H.G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T.E., Baumann, G., and Kopchick, J.J. (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 13215-13220.
- Zhu, T., Goh, E.L., and Lobie, P.E. (1998). Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation and association of p125 focal adhesion kinase (FAK) with JAK2. Fak is not required for stat-mediated transcription. *J.Biol.Chem.* 273, 10682-10689.
- Zou, L. and Menon, R.K. (1995). A member of the CTF/NF-1 transcription factor family regulates murine growth hormone receptor gene promoter activity. *Endocrinology* 136, 5236-5239.

El crecimiento es un complejo proceso que refleja principalmente el incremento en el número de células de un organismo, y que depende del balance entre proliferación y muerte celular. Uno de los principales factores implicado en el control del crecimiento es la hormona de crecimiento (GH), producida principalmente por las células somatotropas de la adenohipófisis, aunque se ha descrito también la existencia de síntesis de GH fuera de la hipófisis. En el presente estudio, analizamos el papel de esta GH extrahipofisaria, en el control del crecimiento celular en células HL-60 (leucemia mieloblástica aguda con diferenciación). Nuestros resultados muestran que las células HL-60 expresan y liberan GH, presentando a su vez receptores activos en su membrana celular.