

11213
3
71

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. BERNANRDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**REGULACION METABOLICA DE LA EXPRESION DEL GEN
DEL RECEPTOR DE HORMONA DEL CRECIMIENTO: Un
modelo experimental en linfocitos humanos.**

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL DIPLOMA COMO ESPECIALISTA EN

ENDOCRINOLOGIA

PRESENTA:

DRA. MARTHA ALICIA DELGADILLO RUANO

MEXICO D.F.

MARZO, 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

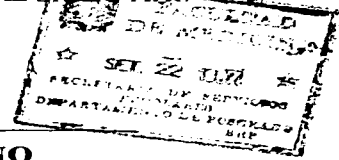
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Wal

DR. NIELS WACHER RODARTE
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION, HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

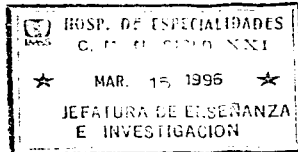


[Signature]

DR. ARTURO ZARATE TREVIÑO
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES
ENDOCRINAS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION
EN ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICION.

[Signature]

DR. MOISES MERCADO ATRI
JEFE DEL SERVICIO DE EDOCRINOLOGIA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, PROFESOR ADJUNTO DEL
CURSO DE ESPECIALIZACION EN ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICION Y
ASESOR DE TESIS.



INTRODUCCION

El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) es miembro de la familia de receptores de citocinas/factores de crecimiento, que incluye a receptores para hormonas como prolactina, eritropoyetina, varias interleucinas y los factores estimuladores de colonias (1,2). Estos receptores se caracterizan por tener un dominio extracelular que une al ligando, una porción transmembrana y una intracelular de tamaño variable, responsable de la transducción de señal (2).

Se piensa que la distribución tisular del GHR en mamíferos superiores es ubicua, si bien estos receptores predominan en hígado y cartilago de crecimiento (2). No obstante lo anterior, esta proteína sólo se encuentra en cantidades suficientes para medición por ensayo de radioreceptor (RRA) en el hígado (3,4). Existen informes aislados y de detección de GHR por RRA en fibroblastos cutáneos (5), células mononucleares periféricas (6) y adipocitos (7) que no se han reproducido en otros experimentos.

GHR es una glucoproteína de 620 aminoácidos, codificado en el cromosoma 17 (8). La porción extracelular está formada por los exones 2 al 7 (10,11) y circula en el

plasma como proteína ligadora de GH (GHP) (12). Estudios recientes han demostrado que existen dos isoformas del RNAm de este receptor, las cuales se generan por la inclusión o exclusión alternativa del exón 3 (13-16). La delección del exón 3 comprende 224 aminoácidos del dominio extracelular. Urbanek y col. en 1992 estudiaron tejidos placentarios humanos y linfocitos IM-9 y sugirieron que la expresión alternativa de las dos isoformas del RNAm del GHR era tejido-especifica (13). En 1993 Sobrier y col. realizaron estudios en riñón e hígado humano, entre otros tejidos y concluyeron también que la expresión de este mensaje es variable entre los diferentes tejidos (14), si bien las proporciones de expresión de los dos RNAm que se encontraron fue diferente de la señalada por Urbanek (13). En 1994 Mercado y col. encontraron en los mismos tejidos de diferentes individuos, distintas proporciones de las dos isoformas por lo se propuso que la expresión alternativa de las dos isoformas era regulada metabólicamente (15). Más recientemente, Wickelgren y col. en un estudio similar al anterior tambien demostro distintas proporciones entre las dos isoformas de RNAm en los tejidos de diferentes individuos apoyando así la regulación metabólica en la expresión alternativa de las dos isoformas (16).

Se desconoce que repercusión fisiológica tiene la existencia de dos isoformas de RNAm de GHR. Hasta ahora, nadie ha demostrado que la isoforma carente del exón 3

se exprese, y que si esto ocurre, se ignora si llega localizarse en la membrana celular (16). Estudios in vitro, se han expresado artificialmente las dos isoformas de GHR en células de ovario de ratón chino (CHO) (17). Las proteínas así expresadas, tienen la misma afinidad por los ligandos considerados como "clásicos" del GHR (GH-N 20 y 22 K, GH-V) (17). Así mismo la estequiometría de unión es la misma; interacción 1:2, entre hormona y receptor (17).

Si la expresión alternativa de estas dos isoformas de GHR está regulada metabólicamente, entonces factores como la insulina y la glucosa ambiente deben tener un impacto sobre la manera que el RNAm de GHR es procesado. En relación a esto, se sabe que estados de hipoinsulinemia como la diabetes y la desnutrición protéico-calórica se acompañan de una baja expresión del gen de GHR y niveles plasmáticos de GHBP disminuidos (18).

HIPOTESIS

1. Los linfocitos Jurkat expresan las dos isoformas de RNAm del receptor de GH, y además expresan la proteína en la membrana celular.
2. La insulina modifica la proporción de las dos isoformas de RNAm que codifican al receptor de GH en células Jurkat en cultivo.

OBJETIVO

1. Determinar si los linfocitos Jurkat expresan el RNAm del receptor de GH y la proteína correspondiente.
2. Medir la proporción de las dos isoformas del RNAm que codifica para el receptor de GH en células Jurkat modificadas metabólicamente por la sustracción o adición de insulina.

MATERIAL Y METODOS

CULTIVO CELULAR Y PROTOCOLO DE ESTIMULACION CON INSULINA.

Para los experimentos se utilizaron linfocitos T humanos provenientes de una línea de linfoma (Jurkat), los cuales se cultivaron en medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino al 10 o 20%. Se les dejó crecer hasta fase estacionaria (2×10^7 por ml), para entonces privarlas de suero fetal bovino mediante centrifugación a 2000 rpm por 10 min. y lavado con PBS. Las células se resuspenden en RPMI sin suero y se dejan reposar por 12 hr. para después proceder a la estimulación con las diferentes concentraciones de insulina por los distintos tiempos.

Primero se estimularon las células con dosis supra fisiológicas de insulina (300 mUI/L) por 1, 2, 4, 8 y 16 hr. Una vez establecido el tiempo de estimulación ideal, se procede a establecer una curva "dosis-respuesta" con concentraciones crecientes de insulina en el margen fisiológico (2.5, 5, 10, 20, 30 mUI/L).

ENSAYO DE RADIORECEPTOR.

La búsqueda de receptores en membrana de células Jurkat se realizó mediante ensayo de radioreceptor de GH de acuerdo al método de Lesniak y col. (19). Las células se cultivaron hasta fase estacionaria y posteriormente se centrifugaron y lavaron con PBS, para después resuspenderlas en medio RPMI fresco sin suero fetal bovino; así se incubaron por 16 hr. Posteriormente, se centrifugaron y lavaron nuevamente con PBS, para resuspenderlas en una solución de ensayo que contiene Hepes 100 mM, NaCl 120mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl 2.5 mM, ácido acético 15 mM, glucosa 10 mM, EDTA 1 mM, BSA 1 mg/ml. El ensayo se realizó en alícuotas de aproximadamente 1.5×10^7 células, a las cuales se les agregó aproximadamente 50 000 cpm de ¹²⁵I-hGH (iodinada mediante el método de la lactoperoxidasa) y hGH "fría" a concentraciones crecientes

de 0-1000 ng/ml. Esta mezcla se incubó por 90 minutos a 30°C con agitación continua. Posteriormente, se centrifugaron las células y el "botón" se contó en un contador gamma. Se consideró como "unión total" al porcentaje de radiactividad en el sistema y "unión no-específica" a la radiactividad del "botón" obtenido de la alícuota incubada en presencia de un exceso de hGH "fría" (1000 ng/ml).

EXTRACCION DE RNAm Y PROTOCOLO DE RT-PCR.

Para este propósito se utilizó un estuche comercial de extracción de RNAm y RT-PCR (USB, Cleveland, Ohio, USA). Las células se rompieron y las RNAasas se inactivaron por medio de una solución de lisis (a razón de 2×10^7 células por ml), que contiene tiocianato de guanidino 4 M, citrato de sodio 25 mM y N-lauril sarcosina al 0.5%. La solución con las células se agita vigorosamente en vórtex y se enfría en hielo, para después agregar 20 µl del lisado a microtubos que contenían membranas de poli-T, que capturan RNAm que tiene colas de poli-A. Posteriormente, se agregaron 20 µl de solución bloqueadora (NaCl 500 mM, Nonidet-P40 al 1%) y se centrifugó 30 min. a 150 rpm. Se descarta el sobrenadante y al "botón" se le agregó 200 µl del amortiguador de reacción (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.3, a concentración 10X) y se agita en vórtex. Se descartó el sobrenadante y al "botón" se le agregan 20

μl de agua, 4 μl de amortiguador de reacción, 8 μl de MgCl₂ 25 mM, 2 μl de dNTP 10 mM, 20 U de inhibidor de RNasa y 20 U AMV RT y 10 pMol del oligonucleótido 3' (antisentido); se incuba a 42°C durante 30 minutos, se inactiva la enzima a 99°C por 5 min, y posteriormente se enfría a 4°C y se centrifuga para recolectar el condensado. A lo anterior se agrega un amortiguador de PCR que contiene una concentración 10X de amortiguado de reacción, 25 mM de MgCl₂ y 5 U de Taq polimerasa, así como 10 pMol de los oligonucleótidos 5' (sentido) (Fig. 1). Se procedió a la amplificación por PCR de acuerdo a los siguientes parámetros: primer ciclo con desnaturalización larga de 5 min. a 92°C, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 92°C por 15 seg., alineación a 52°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 2 min.. Los productos de PCR se analizarán mediante electroforesis en gel de agarosa al 5% teñidos con bromuro de etidio y la intensidad de las bandas se cuantificará mediante densitometría de rayo laser.

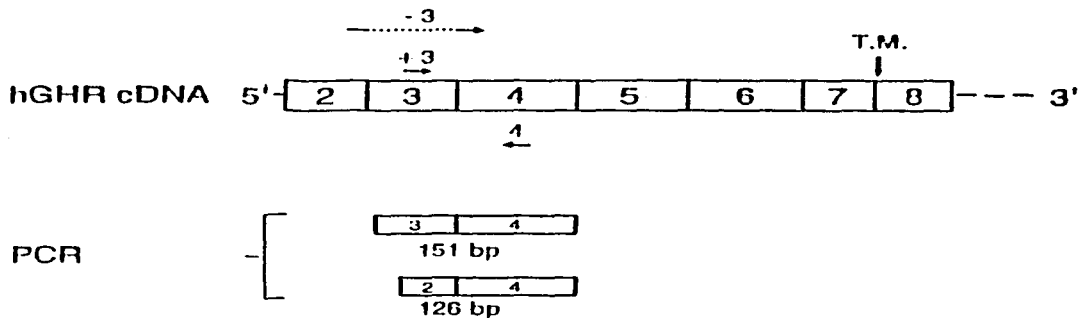


Fig. 1: Mapa exónico de la porción extracelular del gen del receptor de GH. Se ilustra la localización de los oligonucleótidos sentido ("-3" y "+3") y antisentido ("4") y el tamaño de los productos de PCR esperados.

RESULTADOS

RECEPTORES DE GH EN LA MEMBRANA DE CELULAS JURKAT:

En promedio, el porcentaje de unión de la GH-¹²⁵I fue del 5%. La hormona marcada no fue desplazada en lo absoluto por concentraciones crecientes de GH "fría". Lo anterior indica que la unión del 5% de la GH marcada es inespecífica y no corresponde a unión con receptores somatogénicos (Fig. 2).

EXPRESION DE RNAm DE GHR EN CELULAS JURKAT EN ESTADO BASAL:

Con la técnica de RT/PCR a partir de RNAm, se logró amplificar el mensaje del receptor de GH. Se encontraron ambas isoformas de este RNAm y en cantidades aproximadamente iguales. Los productos de amplificación son de 151 pb para la isoforma +3 y de 126 pb para la isoforma -3. En el experimento que se muestra (Fig. 3), todos los canales contienen la misma cantidad de cDNA: el primer canal contiene oligonucleótido común (antisentido o 3') y oligonucleótido -3 (sentido o 5'), el

segundo, oligonucleótido común (3') y oligonucleótido +3 (5') y el tercer canal, una mezcla de ambos oligonucleótidos.

Actualmente, estamos realizando experimentos de estimulación metabólica de células Jurkat para poder probar o descartar nuestra hipótesis de que la regulación en la transcripción de este mensaje depende de factores metabólicos.

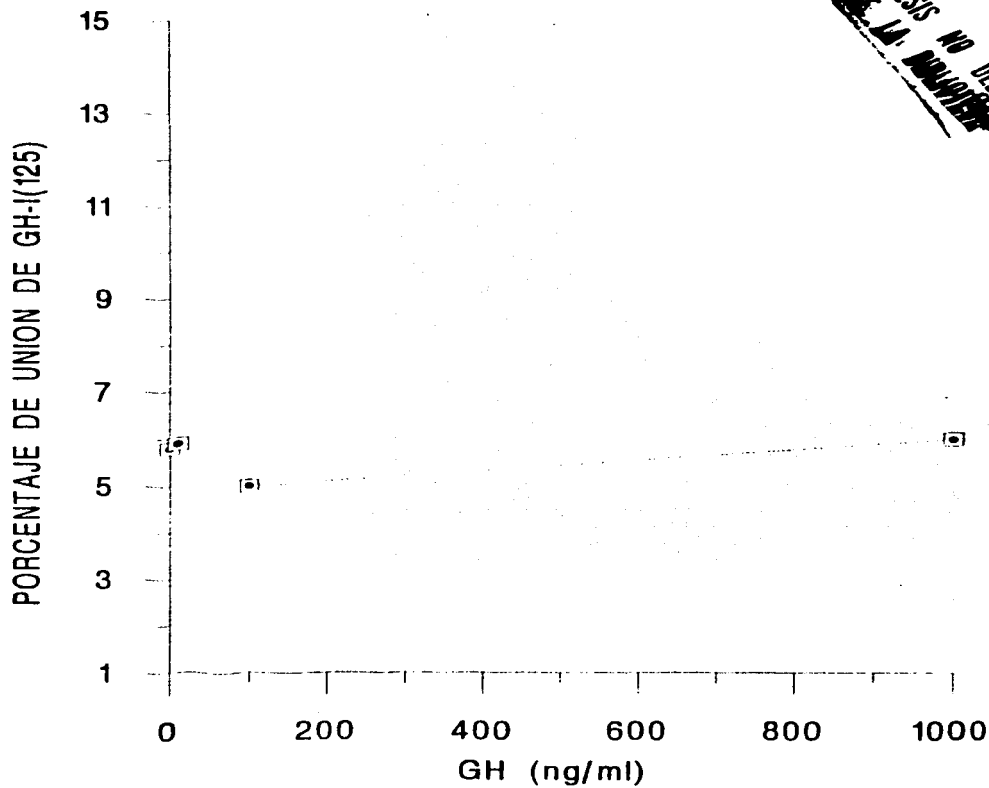


Fig. 2: Ensayo de radiorreceptor de GH en células Jurkat. La GH marcada tiene un porcentaje de unión del 5.7%, mismo que no es desplazado por concentraciones crecientes de GH fra, por lo que se trata de unión "no específica".

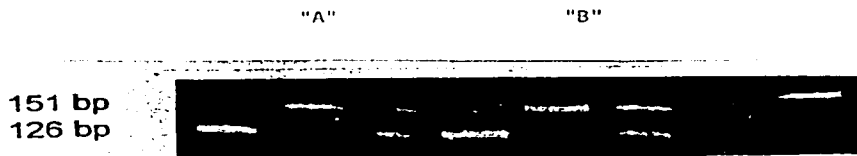


Fig. 3: Experimentos de RT/PCR de cDNA de receptor de GH en células Jurkat. El experimento "A" se realizó con 1 μ g de cDNA y el "B" con 10 μ g. Todos los experimentos fueron realizados con el oligo antisentido común "4". Los carriles 1 y 4 son experimentos hechos con el oligo sentido "-3"; los carriles 2 y 5 son experimentos hechos con el oligo sentido "+3"; los carriles 3 y 6 usan ambos oligos sentido. El carril en blanco usa agua en vez de cDNA. En el último carril corren los marcadores de peso molecular.

DISCUSION

El presente estudio demostró que la línea celular de linfocitos T humanos Jurkat expresa el RNAm de las dos isoformas conocidas del receptor de GH. No se logró demostrar la presencia de proteína de receptor de GH en la membrana de estas células, lo cual es, uno de los problemas principales en el estudio del receptor de GH, ya que pocos tejidos expresan la proteína en cantidades suficientes como para poder ser detectadas por el ensayo de radioreceptor. Hasta ahora se ha documentado consistentemente que sólo el hígado (20) y la línea celular humana de mieloma IM-9 (21) expresan receptores de GH en membrana en cantidades detectables.

El no haber detectado receptores de GH en membrana mediante ensayo de radioreceptor puede tener cualquiera de las siguientes explicaciones: a) el mensaje de esta proteína es traducido, pero la proteína no "madura" lo suficiente postraduccionalmente como para llegar a "anclarse" en la membrana celular; b) el mensaje es traducido, pero la proteína sufre ataque proteolítico antes de llegar a la membrana; c) el gen de este receptor es transcrito adecuadamente pero el RNAm resultante no es traducido; d) la transcripción y traducción de este gen suceden pero a bajos niveles, en ciertos tejidos, por lo que no se genera suficiente cantidad de proteína

para que esta sea detectada por los ensayos disponibles. En base a nuestros experimentos de RT/PCR, se sugiere que la última explicación es la más posible. En estos experimentos encontramos que ambas isoformas del RNAm del receptor de GH son expresadas en las células Jurkat, lo cual demuestra que el gen de este receptor es transcrito. Dado el poder de amplificación de las técnicas basadas en PCR, no se sabe si la transcripción del gen en esta línea celular ocurre a niveles biológicamente relevantes.

La presencia de dos isoformas alternativas del RNAm del receptor de GH ha sido documentada en varios tejidos humanos (13-16). Aunque en un principio se pensó que la isoforma -3 generaba un receptor específico para alguna de las isoformas de GH (GH-N 20K y GH-V eran los posibles candidatos), actualmente se sabe que los receptores -3 y +3 expresados in vitro poseen una afinidad y especificidad idénticas (17). Si bien lo anterior ha sido documentado experimentalmente, no se sabe si la proteína que corresponde a la forma -3 del receptor es expresada en condiciones fisiológicas in vivo. Por otra parte se ha postulado que la proporción en la que se expresan las dos isoformas del RNAm del receptor de GH es específica de cada tejido (13,14) o bien regulada ontogénicamente (16). Otros estudios han concluido que la proporción con la que se expresan estas dos isoformas de RNAm depende del

ambiente metabólico en el que se encuentre la célula en cuestión (15). En apoyo a esta última teoría se encuentran los estudios que demuestran que las concentraciones ambiente de insulina son un factor importante en la regulación del receptor de GH (22). Por otra parte, los diabéticos insulino-dependientes poseen niveles disminuidos de proteína ligadora de GH (GHBP), la cual es una molécula circulante que corresponde a la porción extracelular del receptor de GH (23). Esto último también está a favor de una regulación metabólica del receptor de GH. Actualmente, se están realizando experimentos de estimulación metabólica con insulina para determinar si eso tiene algún efecto en la proporción con la que se expresan las dos isoformas del RNAm del receptor de GH.

BIBLIOGRAFIA

1. Wells JA. Structural and functional basis for hormone binding and receptor oligomerization. *Curr Opin Biol* 1994;6:163-73.
2. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991;12:235-51.
3. Carr D, Friessen HG. Growth hormone and insulin binding to human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:484-93
4. Hocquette JF, Postel-Vinay MC, Kayser C, de Hemptine B, Amar Costesec A. The human liver growth hormone receptor. *Endocrinology* 1989;125:2167-74.
5. Murphy LJ, Vrhovsek E, Lazarus L. Identification and characterization of specific growth hormone receptor in cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:1117-24.
6. Kiess W, Butenandt O. Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cell: reexpression, identification, and characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:740-746.

7. Gavin Jr. Growth hormone receptors in canine and human adipocytes: probes for structural determinants of growth hormone binding and action. (Abstract). Proc of the 63rd Annual Meet The Endocrine Soc. 1981; 325.
8. George DL, Phillips III Ja, Francke U, Seeburg Ph. The genes for growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of human chromosome 17 in region q21-pter. Hum Gen 1981;57:138-41.
9. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G. et al. Growth hormone receptor end serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature 1987;330:537-43.
10. Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR. 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 USA 1989;86:8083-87.
11. Pekhlets RI, Chernov BK, Rubtsov PM. Variants of the 5'-untranslated sequence of human growth hormone receptor mRNA. Mol Cell Endocrinol 1992;90:103-9.
12. Baumann G. Minireview: growth hormone-binding proteins. Proc Soc Exp Biol Med 1993;202:392-400.
13. Urbanek M, MacLeod JN, Cooke EN, Liebhaber SA. Expression of a human growth (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. Mol Endocrinol 1992;6:279-87.

14. Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Amselem S, Goossens M. Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor. *FEBS Lett.* 1993;319:16-20.
15. Mercado M, Davila N, McLeod JF, Baumann G. Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:731-35.
16. Wickelgren RB, Landin KLL, Ohlsson C, Carlsson LMS. Expression of exon 3-retaining and exon3-excluding isoforms of the human growth hormone-receptor is regulated in an interindividual, rather than a tissue-specific, manner. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2154-57.
17. Bass SH, Mulkerrin MG, Wells JA. A systematic mutational analysis of the hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4498-4502.
18. Mercado M, Baumann G. Characteristics of the somatotrophic axis in insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Med Res* 1995;26:101-9.
19. Lesniak M, Roth J, Gorden P, Gavin JR. Human growth hormone radioreceptor assay using cultured human lymphocytes. *Nature New Biology* 1973;241:20-1.
20. Roupas P, Herrington AP. Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1989;61:1-20.

21. Lesniak MA, Gorden P, Roth J, Gavin JR. Binding of ¹²⁵I-human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes. J Biol Chem 1974;249:1661-7.
22. Baxter RC, Turtle JR. Regulation of hepatic growth hormone receptors by insulin. Biochem Biophys Res Commun 1978;84:350-5.
23. Mercado M, Molitch ME, Baumann G. Low plasma growth hormone binding protein in IDDM. Diabetes 1992;41:605-10.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a la QFB Dalila Pascoe, de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Endocrinas, al Dr. Armando Isibasi, Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica y a los Doctores Vianney Francisco Ortiz, Constantino Roberto III López de la misma Unidad de Investigación por la valiosa asesoría prestada para el termino de este proyecto. Asimismo, deseo agradecer al Dr. José Moreno, Jefe de la Unidad de Investigación Médica de Reumatología e Inmunobiología por las facilidades y ayuda prestadas.

Esta tesis fue parcialmente financiada por un donativo de CONACYT (3418-M39309).