

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

5

EFFECTOS DE PRL Y PRL-16K SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES Y FIBROBLASTOS DE PULMÓN

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. en C. ANA MARÍA CORBACHO RODRÍGUEZ

ASESOR: DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ

JURIQUILLA, QUERÉTARO

ABRIL, 2000

77354



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.

Este trabajo se realizó en el Centro de Neurobiología de la U.N.A.M., bajo la asesoría de la Dra. Carmen Clapp Jiménez y con el apoyo de la Dirección General de Estudios de Posgrado.

Agradecimientos

A mis tutores: Dra. Carmen Clapp, Dr. Alfonso Cárabez Trejo y Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por su permanente apoyo e interés en mi formación científica.

A mis sinodales:

Dr. Moisés Selman Lama
Dr. Carlos Valverde
Dra. Carmen Clapp
Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
Dr. Luis Alfonso Vaca Rodríguez
Dr. Rolando Hernández
Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Dr. Alfredo Varela

por sus valiosas críticas y comentarios a la tesis.

A Fernando López Barrera y a Gabriel Nava por su experta asistencia técnica y a Pilar Galarza por su apoyo a través de su trabajo en la biblioteca.

Y a todos los miembros presentes y pasados del laboratorio de Carmen Clapp y de Gonzalo Martínez de la Escalera por su apoyo y sus enseñanzas durante los cuatro años y medio de mi estancia en la UNAM (1995-2000).

ÍNDICE

Abstract.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	3
La prolactina (PRL) y sus receptores.....	3
Proteólisis enzimática de la PRL: PRL-16K.....	6
La PRL y el pulmón	7
Óxido Nítrico	9
El NO y el pulmón	13
Efectos de la PRL sobre la producción de NO	14
Planteamiento del problema	16
Hipótesis	16
Objetivos	17
Objetivos generales	17
Objetivos particulares	17
Materiales y métodos	18
Prolactinas	18
Anticuerpos	18
Fibroblastos y epitelio de pulmón de rata fetal	19
Células A549	19
Células NHBE	20

Determinación de nitrato y nitrito: Reacción de Griess	20
Determinación de endotoxinas.....	21
Aislamiento de RNA, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa	21
Análisis por Southern blot	22
Electroforésis y Western blot	22
Incorporación de timidina tritiada al DNA	23
Células Nb2	24
Resultados y discusión	25
Efectos opuestos de PRL y PRL-16K sobre la producción de NO	25
Ausencia de efecto de PRL o PRL-16K sobre la proliferación de células pulmonares	34
Expresión de PRL en fibroblastos y epitelios pulmonares	34
Análisis de posibles efectos autócrinos de las PRLs endógenas	42
Conclusiones y perspectivas	45
Bibliografía	47

ABSTRACT

Prolactin (PRL), originally associated with milk secretion, is now known to possess a wide variety of biological actions and diverse sites of production beyond the pituitary. Recent studies have demonstrated that the 16 kD *N*-terminal proteolytic cleavage product of PRL (16K-PRL) acts as a potent inhibitor of angiogenesis. Despite previous demonstrations of 16K-PRL production *in vivo*, biological functions beyond its antiangiogenic actions remain unknown. Here we show that PRL and 16K-PRL exert opposite effects on the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) production by pulmonary fibroblasts and alveolar type II cells. While PRL inhibits, 16K-PRL stimulates iNOS expression and NO production with potency comparable to the proinflammatory cytokines IL-1 β , IFN- γ and TNF- α . The differential effect of 16K-PRL versus PRL occurs through different receptors. PRL probably acts through the long PRL receptor, while 16K-PRL acts through a specific receptor, distinct from known PRL receptors. Additionally, pulmonary cells express the PRL gene and endogenously produce 16K-PRL, suggesting that this pathway may serve both autocrine and paracrine roles in the regulation of NO production. These results reveal that proteolytic cleavage of PRL confers upon this classical hormone potent iNOS inducing activity suggesting its role in inflammatory/immune processes.

RESUMEN

La prolactina (PRL), hormona originalmente asociada a la síntesis y secreción de leche, posee una amplia gama de funciones biológicas y diversos sitios de producción fuera de la glándula pituitaria anterior. En los últimos años se ha demostrado que el fragmento N-terminal de 16kDa de la PRL (PRL-16K), producto de la proteólisis enzimática de la hormona, actúa como un potente inhibidor de la angiogénesis. Si bien se ha demostrado la producción de PRL-16K *in vivo*, sus acciones biológicas más allá de sus efectos antiangiogénicos se desconocen. Este estudio demuestra por primera vez que la PRL y la PRL-16K tienen efectos opuestos sobre la expresión de la isoforma inducible de la sintetasa del óxido nítrico (iNOS) y sobre la producción de óxido nítrico (NO) por fibroblastos y células epiteliales del pulmón. Mientras la PRL inhibe, la PRL-16K estimula la expresión de iNOS y la producción de NO con una potencia comparable al de citocinas proinflamatorias. Nuestros datos sugieren que el efecto diferencial de PRL versus PRL-16K ocurre a través distintos receptores. La PRL probablemente actúa a través del receptor "largo" de PRL, ya que detectó la expresión del mismo, y la PRL-16K a través de un receptor específico, distinto a los receptores conocidos para PRL. Además, células pulmonares expresan el gen de la PRL y producen PRL-16K endógenamente, sugiriendo que esta vía puede jugar un papel autócrino y parácrino en la regulación de la producción del NO. Estos resultados revelan que la proteólisis de la PRL le confiere a esta hormona clásica propiedades y funciones similares a algunas de las citocinas proinflamatorias y que esto puede contribuir a las funciones inflamatorias previamente atribuidas a la PRL.

INTRODUCCION

La prolactina y sus receptores

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica presente en la mayoría de los vertebrados y si bien originalmente se asoció a la inducción y el mantenimiento de la lactancia en mamíferos, actualmente se le atribuyen más de 300 funciones biológicas distintas^{1, 2, 3}. Además de su participación en la lactancia, la PRL interviene en procesos tan diversos como la osmorregulación en peces, el comportamiento de nidación en aves y la metamorfosis en anfibios^{1, 2, 3}. La PRL es producida principalmente por las células acidófilas (lactotropos o mamotropos) de la hipófisis anterior. Sin embargo, su síntesis ha sido confirmada en múltiples sitios extra-hipofisarios que incluyen varias regiones del sistema nervioso central, la decidua uterina, las glándulas lacrimal y sudorípara, el timo, el sistema inmune, las células del epitelio mamario, los fibroblastos de la piel³ y las células endoteliales^{4, 5}. Además del suero, se ha demostrado la presencia de PRL en varios fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, las lágrimas, la leche, el líquido folicular y el sudor³.

La PRL juega un papel fisiológico dual como hormona, a través de la vía endócrina y como citocina o factor de crecimiento, por vía autocrina-parácrina^{2, 3}. Debido a sus características estructurales y biológicas la PRL pertenece, junto a la hormona de crecimiento (GH) y al lactógeno placentario (L.P), a la familia hormonal PRL/GH/PL^{1, 6}. Estas hormonas tienen un alto grado de similitud en su secuencia primaria lo que sugiere que probablemente se originaron a partir de un gen ancestral común. Todas están constituidas por aproximadamente 190-200 aminoácidos (aa), su

peso molecular es de 22-23 kDa y su estructura tridimensional es muy similar. En particular, la PRL está constituida por una sola cadena polipeptídica de 199-200 aminoácidos, presenta 3 puentes disulfuro y un peso molecular de 23kDa^{1,6}.

La PRL también comparte características biológicas y estructurales con las citocinas. Actúa sobre células del sistema inmune, por ejemplo, estimulando la proliferación celular y la producción de anticuerpos por linfocitos^{3,7}. Por otra parte, presenta un motivo estructural que consiste en una agrupación de 4 α -hélices antiparalelas, el cual es común a otras citocinas como la GH, las interleucinas 2, 4 y 5 y el GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos)^{6,8}. Además, debido a sus características estructurales y su vía de transducción de señal, los receptores de PRL pertenecen a la familia de receptores de citocinas *clase 1* (familia de los receptores de hematopoyetinas). Esta familia incluye a los receptores de la PRL, la GH, la eritropoyetina, el GM-CSF y las IL-2 a la IL-7, excluyendo a la IL-5^{2,9}. Estos receptores son glicoproteínas con un solo dominio transmembranal y presentan el extremo N-terminal orientado hacia el exterior. La región de mayor similitud entre los miembros de esta familia de receptores corresponde al dominio extracelular y consiste en dos pares de cisteínas, unidas por puentes disulfuro, localizadas hacia el extremo N-terminal y un motivo conservado llamado WS (Trp-Ser-X-Trp-Ser) localizado cerca de la región transmembranal^{6,9}. Además, en la mayoría de los receptores de esta familia existe una región rica en prolinas llamada PRM ("proline rich motif") o Box 1 que se localiza en el dominio intracelular y es fundamental para la señalización del receptor^{2,7}. La porción citoplasmática de estos receptores carece de secuencias consenso relacionadas con la actividad de cinasa o alguna otra actividad

enzimática. La vía de señalización intracelular utilizada es la vía JAK/STAT. En el caso de la PRL intervienen las proteínas JAK 1, 2 y 3 (quinasas Janus) y las STAT 1, 3 y 5 (transductores de señal y activadores de la transcripción), siendo las principales JAK 2 y STAT 5⁽²⁾. Finalmente, en esta familia de receptores, la dimerización u oligomerización del receptor es un requisito absoluto para que se inicie la transducción de la señal. En el caso del receptor de PRL, la dimerización ocurre cuando una molécula de la hormona unida a un receptor se une a una segunda molécula de receptor a través de un segundo sitio de unión^{2,6}.

Hasta el momento se han clonado tres receptores de PRL, el “largo” (80kD), el “intermedio” (65kD) y el “corto” (42kD)^{2,7}. Todos tienen el mismo dominio extracelular de unión al ligando y difieren en la longitud y secuencia del dominio intracelular. La información respecto a la función específica de los distintos receptores es aún fragmentaria y hacer generalizaciones resulta muy difícil considerando la diversidad de los efectos de PRL. En general, se considera que las isoformas larga e intermedia son funcionalmente equivalentes mientras que el receptor “corto” es inactivo. En el epitelio mamario el receptor “largo” estimula al promotor de la β -caseína, sin embargo, el receptor “corto” es incapaz de hacerlo y además, cuando se dimeriza con el receptor “largo”, funciona como una isoforma negativa dominante inactivándolo. En relación con los efectos de PRL sobre la proliferación celular, se ha demostrado que la heterodimerización de cualquiera de las isoformas (corto/largo, corto/intermedio e intermedio/largo) da como resultado un receptor inactivo².

Proteólisis enzimática de la PRL: PRL-16K

La PRL presenta una gran variabilidad estructural y se le ha comparado con una prohormona. Esta es inicialmente sintetizada como una molécula precursora y luego es convertida en distintas formas bioactivas a través de modificaciones postraduccionales como glicosilación, fosforilación, proteólisis y agregamiento¹. En particular, la proteólisis enzimática de PRL entre los residuos aminoacídicos Tyr-145 y Leu-146¹⁰, confiere al fragmento N-terminal resultante de 16 kDa, acciones antiangiogénicas no ejercidas por la molécula precursora^{11,12,13}. Este fragmento de la PRL, denominado PRL-16K, se suma a la creciente lista de proteínas que adquieren funciones específicas o son activadas como resultado de la proteólisis de precursores mayores. Este mecanismo de activación es común a otros potentes factores antiangiogénicos, como la angiostatina¹⁴ y la endostatina¹⁵, y de otras citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β ¹⁶ (interleucina 1 β) y el TNF α ¹⁷ (factor de necrosis tumoral α).

La PRL-16K se ha detectado en el suero de la rata, el ratón y el humano¹. Sin embargo, la proporción del fragmento presente en el suero de individuos normales o con hiperprolactinemia se desconoce debido a que la metodología utilizada (RIA o ELISA) no distingue entre las distintas variantes moleculares. Por otra parte, la producción local de PRL y su procesamiento proteolítico para formar PRL-16K podría no reflejarse en los niveles de PRL circulante.

La PRL-16K actúa como un potente inhibidor de la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*^{11, 12,13}. *In vitro*, inhibe la proliferación de células

endoteliales^{11, 12, 13} y la asociación de las mismas para formar estructuras tipo capilar¹², al mismo tiempo que estimula la expresión de PAI-1^{13, 18} (inhibidor del activador del plasminógeno 1), factor que inhibe la degradación de la matriz extracelular. *In vivo*, la PRL-16K inhibe el crecimiento de capilares en modelos como el de la cornea de la rata¹⁹ y la membrana corioalantoidea del embrión de pollo¹². Recientemente, Struman y col. mostraron que fragmentos homólogos a la PRL-16K derivados de GH y LP también inhiben la angiogénesis¹³. Estos autores también demostraron que la PRL, la GH y el LP tienen un efecto opuesto a los fragmentos de 16 kDa, estimulando la angiogénesis. Se ha sugerido que los efectos opuestos de la PRL y la PRL-16K sobre las células endoteliales son mediados por distintos receptores¹³. En apoyo a esta hipótesis experimentos de unión y desplazamiento de ligando sobre células endoteliales mostraron la existencia de un sitio de unión específico y de alta afinidad para PRL-16K²⁰, indicando que el efecto antiangiogénico del fragmento involucra la activación de receptores distintos a los ya conocidos para PRL.

La PRL y el pulmón

La PRL participa en procesos biológicos muy variados, muchos de los cuales son sujeto de controversia y siguen sin ser completamente caracterizados. En el pulmón, la PRL estimula la síntesis de surfactante (sustancia tensioactiva que recubre la superficie alveolar) por las células tipo II del epitelio alveolar^{21, 22, 23, 24, 25}. Varias líneas de evidencia apoyan la relevancia de este efecto de PRL sobre la función pulmonar. Durante el desarrollo fetal, la síntesis de surfactante está bajo control multihormonal siendo estimulada por PRL o insulina en conjunto con

glucocorticoides²². Además, la síntesis de surfactante es precedida por un marcado incremento en la concentración de PRL en el suero fetal entre las semanas 30 y 32 de la gestación en el humano^{22, 24}. Finalmente, bajos niveles de PRL en la circulación fetal se asocian con el síndrome de diestrés del recién nacido. Este síndrome es atribuido a la deficiencia en la producción de surfactante y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del prematuro²².

Datos recientes, acerca de la localización de receptores para PRL durante la ontogenia, plantean posibles nuevos efectos de esta hormona sobre la diferenciación y el desarrollo, así como sobre nuevos órganos blanco^{26, 27,28,29,30}. Se han detectado receptores para PRL en el pulmón de la rata fetal^{27, 28} y adulta³⁰, así como en el pulmón fetal del ratón²⁶ y el humano²⁸. En el pulmón de la rata fetal se ha demostrado la expresión del receptor "largo"²⁷, pero existen datos contradictorios sobre la expresión del receptor "corto"^{27,29}. Por el contrario, en el pulmón de la rata adulta sólo se ha detectado el receptor "corto"³⁰, lo que posiblemente sugiere un efecto diferente de la PRL durante el desarrollo y la vida adulta. La expresión de los receptores para PRL durante el desarrollo embrionario del pulmón tiene un patrón similar en la rata y en el humano²⁸. En la segunda mitad de la gestación de la rata (día 13.5) ocurre la invaginación del mesénquima cortical del pulmón y la formación de ramificaciones en las vías aéreas. Inicialmente se detectan receptores de PRL en el mesénquima y en las células epiteliales basales que se dividen rápidamente para poblar las vías aéreas en desarrollo²⁸. Al final de la gestación, los receptores de PRL se detectan predominantemente en la superficie luminal del epitelio bronquial y bronquiolar^{28, 29}. Dada la localización de los receptores de PRL durante el desarrollo

embrionario, se ha sugerido que las hormonas lactogénicas podrían modular las interacciones entre el mesénquima y el epitelio del pulmón en desarrollo²⁸.

Por otra parte, algunas patologías del pulmón han sido asociadas con niveles alterados de PRL circulante. Algunos estudios han mostrado que pacientes con cáncer de pulmón presentan hiperprolactinemia^{31, 32,33} y que células derivadas de carcinomas de pulmón producen PRL^{34, 35}. Asimismo, la PRL ha sido propuesta como posible factor regulatorio en la patofisiología de la fibrosis cística dado que varios de los síntomas (pérdida de sal en el sudor y la hiper-producción de moco en las vías respiratorias) se relacionan con los efectos osmorregulatorios de la PRL^{36,37}.

En resumen, si bien se ha demostrado que en el pulmón se expresan receptores de PRL y que la misma estimula la producción de surfactante, otros efectos de PRL sobre la fisiología pulmonar se desconocen.

Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO, del inglés "nitric oxide") es un gas altamente reactivo con una vida media de segundos en los sistemas biológicos. El NO juega un papel crítico en la regulación del tono vascular y de la vía aérea, inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, interviene en la neurotransmisión y participa en la respuesta inmune y en mecanismos de defensa del huésped^{38, 39,40}. Los mecanismos moleculares exactos por los cuales el NO es capaz de ejercer tan diversas funciones son aún sujeto de investigación. Sin embargo, se entiende que los distintos efectos del NO se deben a la expresión diferencial de las

enzimas responsables de su síntesis, su regulación, y su química en los distintos tejidos³⁸. El mecanismo de acción mejor estudiado es aquel que depende de la reacción del NO con el grupo hem de la enzima guanilato ciclasa soluble y es el mecanismo por el cual el NO media la relajación vascular y la inhibición de la agregación plaquetaria. Esta reacción provoca un cambio conformacional en la enzima que da como resultado su activación y el consiguiente aumento del GMP cíclico (cGMP) intracelular. El cGMP activa a la proteína-quinasa G (PKG). Para el caso de las células del músculo liso, la activación de esta quinasa lleva a una disminución del Ca^{+2} citosólico, y a la relajación muscular. Concentraciones más elevadas de NO, pueden activar a la proteína-quinasa A (PKA), a través de la formación de cGMP e inhibir la proliferación del músculo liso³⁸. En el sistema inmune, el NO interviene en procesos de eliminación de patógenos y células tumorales donde su acción tóxica puede deberse a efectos que incluyen la inhibición de la división celular, la inhibición de la cadena respiratoria y la citotoxicidad indirecta por la formación de otros radicales libres altamente reactivos³⁸.

El NO actúa como un mediador de la transducción de señal en forma fisiológica cuando se encuentra en bajas concentraciones (pM, nM). Sin embargo, diversas evidencias muestran que a mayor concentración (μM -mM) el NO juega un papel crítico en la regulación de enfermedades inflamatorias, infecciosas y degenerativas. La toxicidad del NO no sólo se relaciona con los niveles de producción del mismo, sino con la presencia de otros radicales libres que reaccionan con éste dando lugar a otros agentes altamente reactivos³⁸. El NO por sí mismo no reacciona directamente con la mayoría de las moléculas biológicas y puede ser

rápidamente eliminado del sistema vascular a través de su reacción con la oxihemoglobina para formar metahemoglobina y nitrato (NO_3^-). Sin embargo, el NO es un radical libre y su reacción con otros radicales libres se encuentra entre las reacciones más veloces *in vivo*. Durante el estrés oxidativo se producen otros radicales libres como el superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que reacciona con el NO para formar peroxinitrito (ONOO^-). El peroxinitrito es altamente tóxico ya que reacciona prácticamente con todos los tipos de biomoléculas llevando a la pérdida de la integridad de membrana, de la función enzimática y proteica y produciendo mutaciones en el DNA. Se piensa que los productos de la reacción del NO con otros radicales libres son los responsables directos de los efectos nocivos del NO durante la inflamación³⁸. En resumen, mientras bajos niveles de NO median muchas acciones fisiológicas normales (relajación del músculo liso, inhibición de la agregación plaquetaria), altas concentraciones de NO en combinación con una elevada producción de oxidantes provoca daño tisular y mayor inflamación.

El organismo se encuentra expuesto a fuentes de NO exógenas y endógenas. Las fuentes exógenas incluyen, al smog y al humo del cigarrillo³⁸. La producción endógena de NO ocurre a través de isoenzimas llamadas óxido nítrico sintetasas (NOS) que catalizan la oxidación de L-arginina a L-citrulina en presencia de varios cofactores. Al menos tres genes diferentes codifican para NOS y éstas enzimas comparten un 50-60% de similitud en su secuencia nucleotídica y aminoacídica³⁸. Hasta el momento, se han descrito tres formas de NOS: la NOS neural, la NOS inducible y la NOS endotelial.

NOS neuronal (nNOS o NOS1)

Esta enzima fue descrita por primera vez en el cerebro y corresponde a la forma constitutiva. La nNOS se expresa en células neuronales, renales, pancreáticas, en el músculo esquelético y en el epitelio del pulmón, del estómago y del útero. El NO producido por esta enzima funciona principalmente como neurotransmisor, pero también interviene en la regulación del tono muscular, por ejemplo en el tracto gastrointestinal y en el músculo esquelético. Esta enzima produce concentraciones picomolares de NO y su actividad es dependiente de Ca^{+2} (38).

NOS inducible (iNOS o NOS2)

Esta NOS fue descubierta en macrófagos activados y corresponde a la forma inducible. La iNOS es inducida en prácticamente todos los tipos celulares de mamíferos por estímulos proinflamatorios que incluyen a lipopolisacáridos (LPS) y citocinas como el $\text{TNF-}\alpha$, la $\text{IL-1}\beta$ y el $\text{IFN-}\gamma$ (interferón- γ). Por el contrario, la inducción de iNOS es atenuada por glucocorticoides, el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el $\text{TGF-}\beta$ (factor de crecimiento transformante- β) y las IL-10 e IL-4 (interleucinas 10 y 4)^{38,39,40}. El NO producido por esta enzima puede alcanzar concentraciones micromolares y funciona principalmente en procesos inflamatorios. Su actividad es independiente de Ca^{+2} (38).

NOS endotelial (eNOS o NOS3)

En la vasculatura, el NO es generado por la eNOS, enzima que también se expresa en forma constitutiva. Esta enzima produce NO en respuesta al aumento intracelular de calcio estimulado por acetilcolina y bradiquinina entre otros factores. El NO producido por esta enzima contribuye al mantenimiento de la homeostasis vascular normal que incluye la regulación de la presión sanguínea y la prevención de la adhesión y activación de plaquetas y leucocitos^{38, 39,40}.

El NO y el pulmón

La capa epitelial que limita las vías respiratorias se encuentra expuesta a una variable concentración de NO exógeno, que puede provenir del humo del cigarrillo y el smog, o ser producido endógenamente por distintos tipos celulares. Las células capaces de producir NO en el pulmón incluyen a macrófagos, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas, mastocitos y células epiteliales, incluyendo al epitelio bronquial y al epitelio alveolar de tipo II⁴². En particular, los fibroblastos^{43, 44,45} y las células epiteliales bronquiales⁴⁶ y alveolares^{46, 47,48} expresan la iNOS y la nNOS, pero no expresan la eNOS⁴⁶.

Una vez más, el NO puede ser benéfico o nocivo. El NO generado en el pulmón produce la relajación del músculo liso vascular y bronquial, regulando así el tono muscular de la vía aérea. Además, inhibe la agregación plaquetaria, modula las interacciones entre células inflamatorias y endoteliales e interviene en la defensa del huésped durante la invasión de la vía aérea por patógenos^{38, 42}. En condiciones de

inflamación severa, las endotoxinas y las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) inducen la expresión de iNOS en distintos tipos celulares, lo que resulta en un brusco aumento en la concentración de NO que en combinación con la generación de oxidantes elevada, lleva a una mayor inflamación y al edema^{38, 42}. Por otra parte, altas concentraciones de NO tienen efecto nocivo sobre el surfactante ya que sufre la modificación química de sus componentes y pierde su actividad superficial^{49, 50}.

Dado que el NO produce la relajación del músculo liso, su inhalación se utiliza como terapia en la hipertensión pulmonar, el broncoespasmo y en otras patologías del pulmón, incluyendo el síndrome de diestrés respiratorio del recién nacido. Sin embargo, debido a los efectos paradójicos del NO es difícil determinar las dosis adecuadas para evitar un mayor daño pulmonar⁵⁰.

Efectos de PRL sobre la producción de NO

La perturbación de la fisiología de la PRL se asocia a efectos significativos sobre el sistema inmune. La presencia de hiperprolactinemia se correlaciona con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple⁵¹. Todas estas patologías también están asociadas con expresión tisular elevada de iNOS y producción de NO⁵². La expresión de iNOS y la producción de NO es regulada por diversas citocinas y, si bien se reconoce a la PRL como una citocina, son escasos los estudios realizados en relación con los efectos de PRL sobre la producción de NO. Recientemente, se ha demostrado que neutrófilos aislados de ratas hiperprolactinémicas producen mayor cantidad de NO⁵³. Sin embargo, no es posible concluir que éste es un efecto directo de PRL y no

mediado indirectamente por alguna otra citocina. Por otra parte, la PRL estimula la producción de NO en macrófagos⁵⁴ y en una línea celular originada a partir de un glioma murino⁵⁵. En el caso de las células de glioma murino, los autores detectan muy bajas concentraciones de NO (<5 μ M) y no detectan síntesis de iNOS por Western blot⁵⁵.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en consideración que:

- 1) la PRL es una hormona con actividad de citocina,
- 2) que durante el desarrollo embrionario y la vida adulta se expresan receptores de PRL en el pulmón,
- 3) que distintas citocinas regulan la producción de NO en el pulmón y
- 4) que existen algunas evidencias de efectos de PRL sobre la producción de NO,

nosotros proponemos la siguiente hipótesis general de trabajo:

HIPOTESIS

En el pulmón, la PRL y la PRL-16K actúan como citocinas regulando la producción de NO y como factores de crecimiento regulando la proliferación celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en consideración que:

- 1) la PRL es una hormona con actividad de citocina,
- 2) que durante el desarrollo embrionario y la vida adulta se expresan receptores de PRL en el pulmón,
- 3) que distintas citocinas regulan la producción de NO en el pulmón y
- 4) que existen algunas evidencias de efectos de PRL sobre la producción de NO,

nosotros proponemos la siguiente hipótesis general de trabajo:

HIPOTESIS

En el pulmón, la PRL y la PRL-16K actúan como citocinas regulando la producción de NO y como factores de crecimiento regulando la proliferación celular.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Determinar si la PRL y la PRL-16K tienen efecto sobre la producción de NO o sobre la proliferación de:

- Cultivos primarios de fibroblastos del pulmón de la rata fetal,
- Cultivos primarios de células alveolares tipo II del pulmón de la rata fetal,
- Línea tumoral A549, originada a partir de un carcinoma de pulmón humano, y
- Cultivos primarios de células epiteliales bronquio-traqueales humanas aisladas de individuos adultos normales.

Objetivos particulares

A) Determinar el efecto de PRL y PRL-16K sobre la producción de NO celular, (1) cuantificando la concentración de nitrito y nitrato acumulado en el medio de cultivo después del tratamiento con una u otra PRL, en ausencia o presencia de inhibidores de NOS y (2) analizando la expresión de iNOS.

B) Determinar el efecto de PRL y PRL-16K sobre la proliferación celular analizando el efecto de la PRL sobre la incorporación de timidina tritiada al DNA de los distintos tipos celulares.

C) Analizar la expresión del gen de la PRL en los distintos tipos celulares determinando la presencia del ARNm de PRL y de PRL inmunorreactiva y biológicamente activa.

MATERIALES Y METODOS

Prolactinas. Se utilizaron preparaciones de referencia de PRL adenohipofisaria humana y de rata de grado biológico (Institutos Nacionales de Salud, EUA), así como PRL y PRL-16K humanas recombinantes (donadas por el Dr. Joseph Martial, Universidad de Lieja, Bélgica). Se utilizó PRL-16K de rata generada mediante proteólisis enzimática⁵⁶. Brevemente, se incubó PRL de rata con una fracción subcelular de extractos de glándula mamaria de ratas lactantes, seguido de la reducción de los puentes disulfuro y el aislamiento por filtración en gel. Finalmente la PRL-16K fue carbamidometilada.

Anticuerpos. Policlonales. Para la detección de iNOS se utilizó un anticuerpo comercial generado contra iNOS de rata (Upstate, Lake Placid, NY, USA). Para la detección de PRL se utilizaron antisueros dirigidos contra PRL humana (α hPRL) y de rata (α rPRL-C1 y -C4) generados en conejo⁵⁹. La especificidad de estos antisueros fue previamente evaluada mediante el análisis de su reactividad cruzada con diversas hormonas⁵⁹.

Monoclonales. El anticuerpo monoclonal INN-hPRL-368 (líquido de ascitis) fue generado contra PRL humana y fue proporcionado por el Dr. Peter Berger (Innsbruck, Austria). El anticuerpo monoclonal 1G8 (IgG) generado contra PRL-16K recombinante humana fue donado por la Dra. Susan Richards (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA).

Fibroblastos y epitelio de pulmón de rata fetal. Ambos tipos celulares fueron aislados en el laboratorio según el método previamente descrito por Caniggia y col.⁵⁷. Brevemente, los pulmones de fetos de ratas Sprague-Dawley de 19-20 días de vida intrauterina fueron extraídos, macerados, resuspendidos y lavados en solución salina de Hank's (Gibco, BRL). El tejido fue incubado en presencia de 0.05% de tripsina (Gibco, BRL) y 0.4 mg/ml DNAsa (Sigma) durante 20 min a 37°C. Posteriormente se realizó una segunda incubación en presencia de 1% colagenasa (Sigma) y 0.2 mg/ml DNAsa. Las células obtenidas se sembraron y se realizaron dos pasos de adhesión diferencial de 45 min cada uno. Después de cada período de adhesión, las células no adheridas fueron recuperadas y resembradas. Las células adheridas durante el primer período de incubación correspondieron a cultivos enriquecidos en fibroblastos. Finalmente, las células que no se adhirieron después del segundo período de incubación fueron resembradas y correspondieron a cultivos enriquecidos en células epiteliales. Las células fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado y antibióticos (1.000 unidades/ml de penicilina - 1.000 ug/ml estreptomycin). Para los ensayos de proliferación y la obtención de medio condicionado se utilizó el mismo medio en ausencia de suero. Para obtener medio condicionado las células se lavaron 3 veces con PBS y se adicionó medio libre de suero por 24 hrs.

Células A549. Las células A549 (línea celular epitelial derivada de un adenocarcinoma de pulmón humano) fueron suministradas por la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) y cultivadas en medio F12 (Gibco, BRL) suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (1.000

unidades/ml de penicilina - 1.000 ug/ml estreptomina, Gibco, BRL). Para los ensayos de proliferación y la obtención de medio condicionado se utilizó el mismo medio en ausencia de suero. Para obtener medio condicionado se lavaron las células 3 veces con PBS y se adicionó medio libre de suero por 24 hrs.

Células NHBE (Normal Human Bronquio/tracheal Epithelial Cells). Las células NHBE corresponden a cultivos primarios de células epiteliales provenientes de los bronquios mayores y de la tráquea de humanos adultos normales. Estas células fueron suministradas por Clonetics (BioWhitaker, San Diego, CA, USA) y cultivadas en el medio BEBM (Clonetics) suplementado con extracto de pituitaria bovina (2 ml/ 500 ml), insulina (2.5 mg/ 500 ml), hidrocortisona (0.25 mg/ 500 ml), ácido retinoico (0.05 mg/500 ml), transferrina (5 mg/500 ml), triyodotironina (3.25 mg/500 ml), epinefrina (0.25 mg/ml), factor de crecimiento epidérmico humano (0.25 mg/500 ml) y antibióticos (todos los factores utilizados fueron proporcionados por Clonetics). Para los ensayos de proliferación y la obtención de medio condicionado se utilizó medio BEBM libre de extracto de pituitaria bovina. Para obtener medio condicionado se lavaron las células 3 veces con PBS y se adicionó medio BEBM libre de extracto de pituitaria bovina por 24 hrs.

Determinación de nitrato y nitrito: Reacción de Griess. Alícuotas de los medios de incubación de las células fueron utilizadas para medir los productos estables de la oxidación del NO, nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-). Las muestras fueron inicialmente incubadas con la enzima reductasa de nitrato proveniente de E. Coli (ATCC) con el propósito de convertir a nitrito todo el nitrato presente en las muestras. Posteriormente, se evaluó la presencia neta de nitrito mediante la reacción de Griess⁴⁸.

Se utilizó como estándar una solución de nitrato de sodio diluido en el mismo medio en que fueron incubadas las células. Para determinar la especificidad del efecto estimulador de la producción de NO las células fueron incubadas en presencia de un inhibidor específico de la actividad de NOS (L-NAME) o en presencia de un isómero inactivo (D-NAME).

Determinación de endotoxinas. La concentración de endotoxinas en las preparaciones de PRL y PRL-16K fue determinada mediante el ensayo de lisado de *Limulus* ameocyte (E-Toxate, Sigma), utilizando lipopolisacáridos de *E coli* (Serotipo 0111:B4, Sigma) como preparación estándar de endotoxinas.

Aislamiento de RNA, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El RNA total de los distintos tipos celulares se extrajo de acuerdo al procedimiento de tiocianato de guanidina/fenol⁵⁸. El RNA total (5mg) fue retrotranscrito por 1 hr a 37 °C en 25 ml conteniendo Tris 20 mM (ph 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1mM de dNTPs, 1 mg de cada cebador oligo (dT), 1 mg de un cebador inespecífico, 25 unidades de Rnasina (Promega) y 200 unidades de retrotranscriptasa (proveniente del virus de leucemia murina Moloney). Después de la retrotranscripción se realizó el PCR en 50 ml conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 50 pMol de cada cebador, y una unidad de Taq ADN polimerasa. Después de su desnaturalización a 97 °C por 30 seg, la amplificación fue llevada a cabo por 40 ciclos (94 °C por 30 seg, 65°C por 1 min, y 72 °C por 1 min y 30 seg) seguido de la incubación a 71 °C por 10 min, al final de la amplificación⁵⁹. Para la detección de iNOS, se utilizaron cebadores complementarios para iNOS de rata (para el extremo 5': 5'GTGTTCCACCAGGAGATGTTG3' y para

el extremo 3': 5'CTCCTGCCCACTGAGTTCGTC3'). Para la detección de los receptores de PRL se utilizó una secuencia común complementaria al extremo 5' (5' ATCCTGGGACAGATGGAGGAC3') y diferentes cebadores 3' complementarios a secuencias específicas del receptor corto (5' TGGCTGAGGCTGACAAAAGAG3'), o "largo" (5'AGACAGTGGGGC TTTTCTCCT3'). Se amplificó el mRNA de la β -actina como control de la eficiencia de cargado⁵⁹. Para la detección del mensajero de PRL se utilizaron dos cebadores específicos para el cDNA de la PRL humana o de rata. Para la PRL humana, el cebador del extremo 5' correspondió al exón 2 del gen de la PRL (5'-GCAGTT-GTTGTTGTGGATGATT-3') y el del extremo 3' correspondió al exón 5 (5'-GATGCCAGGTGACCCTTCGAGA-3'). Para la PRL de rata, el cebador del extremo 5' correspondió al exón 2 (5'-TGTTCTGGTGGCGACTGCCAGACACCT-3') y para el extremo 3' correspondió al exón 4 (5'-TATCTTTTCGATCCCTTCGAGAAGCCG-3').

Análisis por Southern blot. Parte de la mezcla de reacción amplificada por PCR fue cargada en geles de agarosa al 1.8% y transferidos a membranas Zeta-Probe GT (Bio-Rad). Las membranas fueron hibridizadas con el cebador correspondiente a 42 °C durante 16 hr en una solución conteniendo 5 X SSC (1X = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de Na, pH 7.0), 0.02 M NaH₂PO₄, 7% SDS, 10 X solución Denhart, y ADN de esperma de salmón 100mg/ml. Posteriormente se lavó a 50 °C, y se expuso para autorradiografía con placas Kodak XAR-5 a -70°C⁵⁹.

Electroforesis y Western blots. Las células fueron lisadas en buffer RIPA (Tris 50mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0.1%, PMSF 100 ug/ml, aprotinina 1 ug/ml). Para el caso de la detección de PRL, las células fueron

previamente lavadas con PBS e incubadas en ausencia de suero por 24hr. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford. Se realizó el análisis de las proteínas en los lisados celulares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, bajo condiciones desnaturizantes (SDS) y reductoras (b-Mercaptoetanol 5%) a 140V durante 45min. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o electrotransferidos a papel de nitrocelulosa a 40V durante 12hrs. Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas durante 2 hr en PBS/Tween 0.05%/BSA 2%, posteriormente incubadas por 2 hr con el anticuerpo primario (2.5 µg/ml de anti-iNOS; dilución 1:500 de INN-hPRL-368 o 1:1000 de los antisueros) y finalmente 1hr con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Entre cada período de incubación la membrana fue lavada en NaCl 150 mM/Tween 0.05%. El color se desarrolló mediante el uso de un sistema para revelar fosfatasa alcalina de los laboratorios Bio-Rad (Hercules, California)⁵⁹.

Incorporación de timidina tritiada al DNA. Las células fueron sembradas con el tratamiento correspondiente a una densidad de 10,000 células/pozo en cajas de 24 pozos. A las 48 hrs se colocó medio fresco e igual tratamiento y se incubaron las células con 500,000 cpm (0.6 µCi, actividad específica 20.1 Ci/mmol) de timidina tritiada por 12-15 hrs. Al cabo de las 60 hrs del bioensayo las células se fijaron con 5% (w/v) de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C por 30 min. Los precipitados resultantes fueron lavados dos veces con 5% TCA y solubilizados adicionando 250µl de NaOH 0.25M a 50°C por 30min. La radioactividad de ³H fue medida en número de cuentas por minuto⁴.

Células Nb2. Las células Nb2 corresponden a una línea celular derivada de un linfoma de células T de rata cuya proliferación es dependiente de lactógenos y se utiliza como un bioensayo para caracterizar la actividad tipo-PRL⁶⁰. Células Nb2 (donadas por P. Gout, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada), fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia máxima de 10^6 células/ml en medio DMEM-alto en glucosa, 10% de suero fetal bovino, 10% de suero equino, 1,000 unidades/ml de penicilina – 1mg/ml estreptomicina y 10^{-4} M de β -mercaptoetanol. Las células se sincronizaron durante 24h antes en el medio recién descrito pero con sólo 1% de suero fetal bovino. Para realizar el bioensayo se sembraron 15,000 células/100 μ l de medio en ausencia total de suero fetal bovino. Se determinó la presencia de bioactividad tipo-PRL en medios condicionados por los distintos tipos celulares incubando las células Nb2 durante 48 hr con distintas cantidades de medio condicionado concentrado (5,10 y 20 ml) o con estándar de PRL en presencia o ausencia del antisuero homólogo (1:300). Al término del bioensayo las células Nb2 fueron incubadas en presencia de MTT durante 4hrs a 37 °C. El formazán precipitado al cabo de este período fue solubilizado con HCl-SDS durante 30 min a TA. Finalmente se midió la absorbancia de cada pozo a λ 590 nm⁶¹.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efectos opuestos de PRL y PRL-16K sobre la producción de NO

Con el propósito de evaluar la influencia de PRL y PRL-16K sobre la producción de NO, se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos y células alveolares tipo II del pulmón de rata fetal y células A549, originadas a partir de un carcinoma de pulmón humano. La producción de NO se cuantificó indirectamente, midiendo en el medio de cultivo la concentración de los productos estables de la oxidación del NO, nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Inicialmente, se analizó el efecto de dosis crecientes de PRL y PRL-16K en comparación con una mezcla de citocinas proinflamatorias (IL- 1β , IFN- γ y TNF- α) capaces de estimular la producción de NO^(43,44,45,46,47,48). Como se muestra en la figura 1, la PRL de rata y la PRL-16K humana tuvieron efectos opuestos sobre la producción de NO por fibroblastos. La PRL inhibió la producción basal de NO, mientras la PRL-16K tuvo un efecto fuertemente estimulatorio comparable al obtenido con la mezcla de citocinas proinflamatorias. El efecto de ambas PRLs fue dependiente de la dosis.

Con el propósito de caracterizar este nuevo efecto de PRLs sobre la producción de NO, se utilizaron distintos tipos celulares. La PRL inhibió la producción basal de NO en fibroblastos y en células A549 (Fig. 2), sin embargo, no se detectó efecto inhibitorio sobre las células alveolares tipo II (no se muestra). La detección del efecto inhibitorio de PRL se ve limitada por la sensibilidad de la reacción de Griess, ya que la producción basal de NO está muy próxima al límite inferior de detección del ensayo (1-5 μM o nmoles nitrito /mg proteína).

Por otra parte, PRL-16K humana estimuló la producción de NO por fibroblastos y células alveolares tipo II de rata, pero no tuvo efecto sobre células A549 (Fig. 3). La PRL-16K de rata también estimuló la producción de NO en forma dependiente de la dosis, pero fue menos potente que la humana (Fig. 4). Se obtuvo una estimulación máxima con 100 y 10 nM de PRL-16K de rata y humana, respectivamente. La mayor potencia de la PRL-16K humana confirma observaciones previas en relación con su efecto antiangiogénico¹². La producción de NO estimulada por PRLs-16K o citocinas fue completamente suprimida por L-NAME (1mM), un inhibidor competitivo de NOS, pero no fue afectada por el isómero inactivo D-NAME (Fig. 5), indicando la especificidad del efecto a través de la actividad de una de las sintetasas del NO. Para excluir la posibilidad de que el efecto estimulador de PRL-16Ks fuera inespecífico debido a la contaminación con lipopolisacáridos (LPS), se determinó la concentración de endotoxinas en las distintas preparaciones de PRLs. Este análisis indicó que las concentraciones de PRL-16K utilizadas tuvieron un contenido de endotoxinas menor o equivalente (0.03-0.5 ng LPS/ml) al presente en las preparaciones de PRL (0.15-0.5 ng LPS/ml). Este resultado demostró que el efecto estimulador de PRL-16K sobre la producción de NO no se debió a contaminación con LPS ya que la PRL tuvo el efecto opuesto aun cuando contenía una concentración de LPS equivalente o mayor. El cambio en la producción de NO, en un rango detectable con la reacción de Griess, puede deberse a un cambio en la expresión de iNOS o a la modificación de la actividad enzimática. Debido a que la producción de NO estimulada por citocinas proinflamatorias se debe principalmente a un aumento en la expresión de iNOS, nos propusimos evaluar si la PRL y la PRL-16K, tanto humanas como de rata, afectan la expresión de esta enzima. El RNA total de

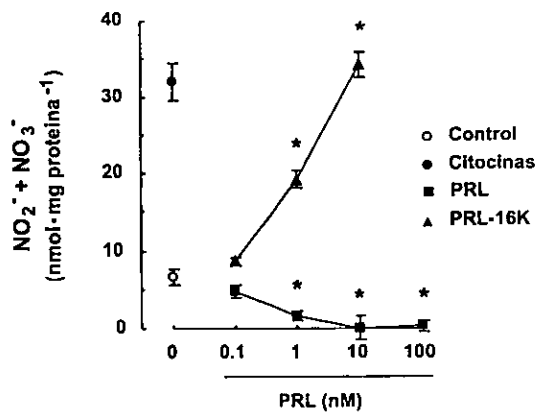


Figura 1

Efectos opuestos de PRL y PRL-16K sobre la producción de NO por fibroblastos. Producción de NO por fibroblastos en ausencia (○) o presencia de citocinas (●) o concentraciones crecientes de PRL de rata (■) y PRL-16K humana (▲). La producción de NO fue medida como la acumulación de nitrato y nitrito en el medio de cultivo después de 72 hr de tratamiento. La mezcla de citocinas utilizada fue: IL-1 β (5 ng/ml), TNF α (25 ng/ml) y IFN γ (100 U/ml). Los valores representan la media \pm SEM.

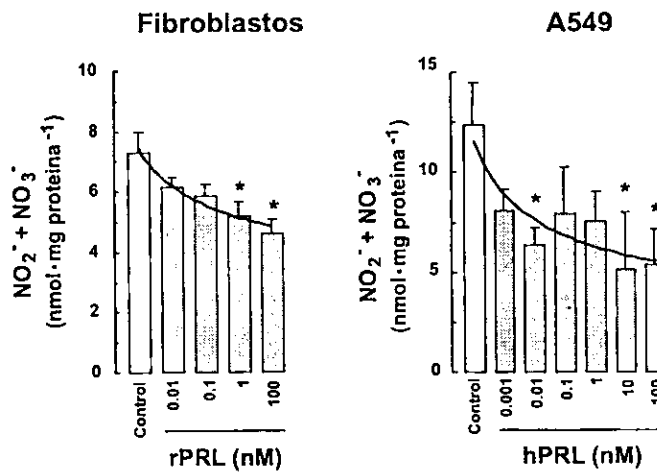


Figura 2

PRL inhibe la producción de NO por fibroblastos y células A549. Producción de NO por fibroblastos y células A549 en ausencia de citocinas (barra blanca) o en presencia de concentraciones crecientes de PRL (barras grises). La producción de NO fue medida como la acumulación de nitrato y nitrito en el medio de cultivo después de 72 hr de tratamiento. La mezcla de citocinas utilizada fue: IL-1 (5 ng/ml), TNF (25 ng/ml) y IFN (100 U/ml). Los valores representan la media \pm SEM.

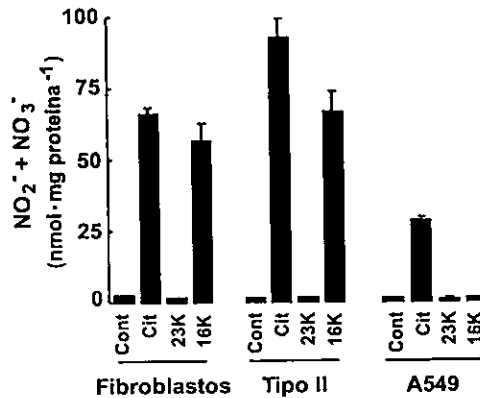


Figura 3

La PRL-16K estimuló la producción de NO por fibroblastos y células alveolares tipo II de rata. Producción de NO por fibroblastos, células alveolares tipo II y A549 en ausencia (Cont) o presencia de citocinas (Cit), PRL (23K) humana (100 nM) o PRL-16K (16K) humana (10 nM). La producción de NO fue medida como la acumulación de nitrato y nitrito en el medio de cultivo después de 72 hr de tratamiento. La mezcla de citocinas utilizada fue: IL-1 β (5 ng/ml), TNF α (25 ng/ml) y IFN γ (100 U/ml). Los valores representan la media \pm SEM.

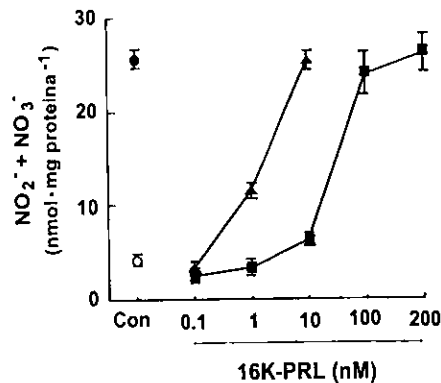


Figura 4

PRL-16K estimuló la producción de NO en forma dependiente de la dosis. Producción de NO por fibroblastos en ausencia (O) o presencia de citocinas (●) o concentraciones crecientes de PRL-16K humana (▲) o de rata (■). La producción de NO fue medida como la acumulación de nitrato y nitrito en el medio de cultivo después de 72 hr de tratamiento. La mezcla de citocinas utilizada fue: IL-1 β (5 ng/ml), TNF α (25 ng/ml) y IFN γ (100 U/ml). Los valores representan la media \pm SEM.

fibroblastos tratados con PRLs-16K, PRL o citocinas fue sometido a RT-PCR y Southern blot. El resultado observado fue consistente con los hallazgos obtenidos sobre la producción de NO. Se detectó expresión basal de iNOS en las células control y mientras las citocinas y la PRL-16K estimularon, la PRL inhibió la expresión de iNOS, siendo casi indetectable para el caso de las células tratadas con PRL humana (Fig. 6). Se amplificaron cantidades equivalentes de β -actina para todos los casos.

La síntesis de iNOS fue confirmada por Western blot. iNOS fue claramente detectada en lisados de fibroblastos tratados con citocinas o PRL-16K, mientras que no se detectó iNOS en los lisados de células control o tratadas con PRL (Fig. 7A). La estimulación de la expresión de iNOS por PRL-16K fue dependiente de la dosis (figura 7B) confirmando los resultados mostrados en la figura 4. L-NAME no afectó la expresión de iNOS estimulada por citocinas o PRL-16K (Fig. 7B). Este resultado muestra que el L-NAME inhibió la producción de NO (ver Fig. 5) por iNOS sin afectar la expresión de la enzima. La presencia de iNOS fue evidente a las 8 hrs después del tratamiento con PRL-16K (no se muestra).

Nuestros resultados indican que la PRL y la PRL-16K tienen efectos opuestos sobre la producción de NO en fibroblastos y epitelios pulmonares. Mientras la PRL inhibe, la PRL-16K estimula dramáticamente la producción de NO y la expresión de la iNOS con un efecto máximo comparable al de citocinas proinflamatorias.

Con el propósito de caracterizar el efecto opuesto de PRL y PRL-16K sobre la producción de NO, se analizó la expresión de receptores para PRL en fibroblastos y células tipo II de pulmón de rata fetal. En las células tipo II se

detectaron productos de amplificación de 1343 y 1016 pb correspondientes a los receptores “largo” y “corto”, respectivamente (Fig. 8). En fibroblastos sólo se detectaron muy bajos niveles de expresión del receptor “largo” después de la sobreexposición (24 hr) de la autorradiografía correspondiente al Southern blot (Fig. 8). Se utilizó como control positivo la amplificación del cDNA del receptor largo de PRL. No se detectó señal positiva en ausencia de retrotranscripción (control negativo).

PRL y PRL-16K tienen efectos opuestos sobre la producción de NO por fibroblastos y estas células sólo expresan muy bajos niveles del receptor “largo” para PRL. Estos resultados sugieren la existencia de un nuevo receptor para PRL-16K diferente a los receptores ya conocidos. Resultados recientes de nuestro grupo apoyan esta hipótesis. La unión de [125 I] PRL-16K de rata a preparaciones de membranas de fibroblastos de pulmón de rata fetal es de alta afinidad ($K_d = 7.3$ nM), saturable ($B_{max} = 10.4$ pmol/mg proteína) y es potentemente desplazada por PRL-16K de rata pero no por PRL. Esto es consistente con observaciones previas de Clapp y col. que revelaron la presencia de un sitio de unión específico para PRL-16K sobre células endoteliales²⁰. Este resultado revela que los fibroblastos de pulmón de rata fetal expresan un receptor específico para PRL-16K.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que PRL-16K estimula la expresión de iNOS a través de un receptor propio y que PRL la inhibe actuando a través del receptor “largo”. Sin embargo, las células alveolares tipo II también expresan el receptor “largo” pero no se observa un efecto inhibitorio de PRL sobre la producción de NO por estas células. Por otra parte, el efecto inhibitorio de PRL sobre

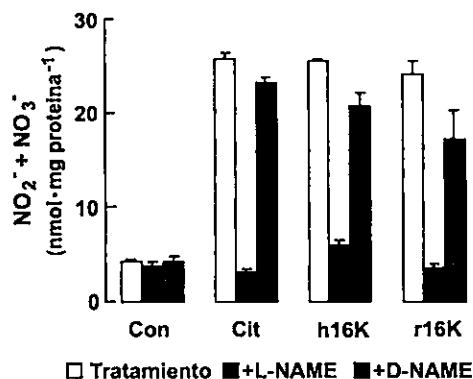


Figura 5

La producción de NO estimulada por PRL-16K es inhibida por el inhibidor de NOS L-NAME, pero no por el isómero inactivo D-NAME. Cultivos de fibroblastos fueron crecidos en ausencia (Cont) o presencia de citocinas (Cit), PRL-16K humana (10 nM, h16K) o de rata (100 nM, r16K). Los tratamientos se realizaron en ausencia (barras blancas) o presencia de 1 nM de L-NAME (barras negras) o de D-NAME (barras grises). La producción de NO fue medida como la acumulación de nitrato y nitrito en el medio de cultivo después de 72 hr de tratamiento. La mezcla de citocinas utilizada fue: IL-1 β (5 ng/ml), TNF α (25 ng/ml) y IFN γ (100 U/ml). Los valores representan la media \pm SEM.

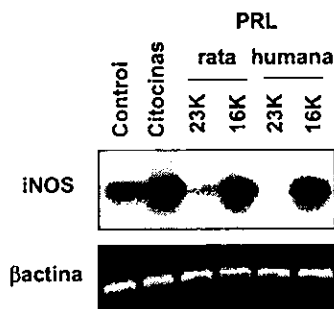
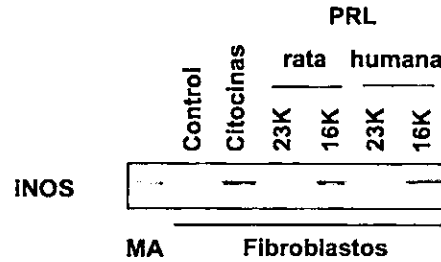


Figura 6

PRL-16K induce la expresión del mRNA de iNOS en fibroblastos de pulmón de rata fetal. RT-PCR y Southern blot del RNA total de fibroblastos después de 20 hr de tratamiento en ausencia (Control) o presencia de citocinas (Citocinas), PRL-16K (16K) humana (10nM) o de rata (100 nM) y PRL (23K) humana (100 nM) o de rata (100 nM). La mezcla de citocinas utilizada fue: IL-1 β (5 ng/ml), TNF α (25 ng/ml) y IFN γ (100 U/ml). Se muestra la amplificación de β -actina como control de cargado.

A



B

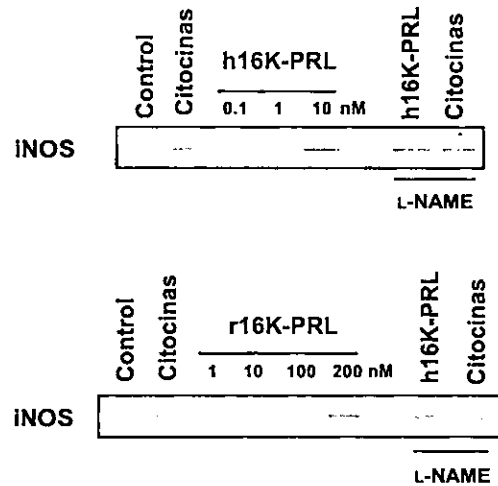


Figura 7

La PRL-16K estimula la síntesis de iNOS en fibroblastos.

A) Detección de iNOS en Western blot de lisados de fibroblastos después de 72 hr de tratamiento en ausencia (Control) o presencia de citocinas (Citocinas), PRL-16K humana (10 nM) o de rata (100 nM) o PRL humana (100 nM) o de rata (100 nM). Se muestra como control positivo de iNOS el lisado celular de macrófagos activados con citocinas (MA).

B) Detección de iNOS en respuesta a dosis crecientes de PRL-16K humana (arriba) o de rata (abajo). Células tratadas con citocinas o PRL-16K humana (10 nM) o de rata (100 nM) fueron incubadas en presencia de L-NAME.

La mezcla de citocinas utilizada fue: IL-1 (5 ng/ml), TNF (25 ng/ml) y IFN (100 U/ml).

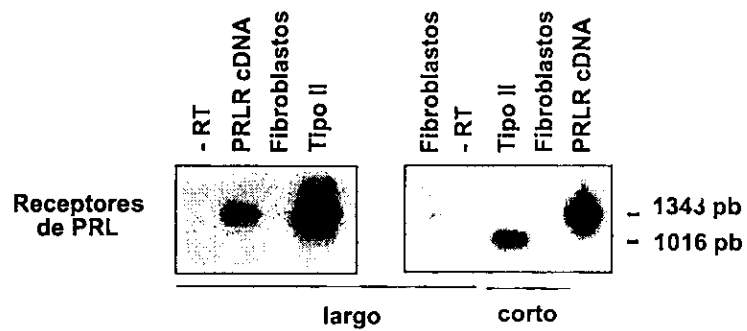


Figura 8

Expresión de receptores de PRL en fibroblastos y células alveolares tipo II de rata fetal. RT-PCR y Southern blot del RNA total de fibroblastos y células alveolares tipo II, utilizando cebadores específicos para detectar el receptor "largo" o "corto" para PRL de rata. Se muestra como control positivo la amplificación del cDNA del receptor "largo" y como control negativo la ausencia de retrotranscripción (-RT). La figura de la derecha corresponde a una exposición de la placa sobre el Southern blot de 5 min y la de la derecha corresponde a 24 hr.

la producción de NO contradice recientes hallazgos de Raso y col. en los que PRL tuvo un efecto levemente estimulador (<5 μ M) sobre la producción de NO por células de un glioma de rata (C6)⁵⁵. Esta discrepancia sugiere que los efectos de PRL sobre la producción de NO podrían ser tipo celular específicos. Por otra parte, el efecto estimulador mínimo de PRL sobre esta línea celular podría ocurrir de forma indirecta después del procesamiento local de PRL para producir PRL-16K y ésta podría ser la responsable del aumento en la producción de NO.

Ausencia de efecto de PRL o PRL-16K sobre la proliferación de células pulmonares

La PRL y la PRL-16K no tuvieron efecto sobre la proliferación de fibroblastos y células alveolares tipo II de rata fetal y células A549. En el caso de las células NHBE, mientras PRL no tuvo efecto, PRL-16K tuvo un efecto levemente inhibitorio que no llegó a ser significativo (Fig. 9). Estos resultados no permiten descartar que bajo otras condiciones experimentales o, para el caso de las células fetales, en otras etapas del desarrollo las PRLs tengan efecto sobre la proliferación de estos tipos celulares.

Expresión de PRL en fibroblastos y epitelios pulmonares

Los hallazgos previos muestran que la PRL y la PRL-16K modifican la producción de NO por células pulmonares y sugieren que estas moléculas podrían regular la producción de NO en el pulmón *in vivo*. El pulmón puede ser blanco de la

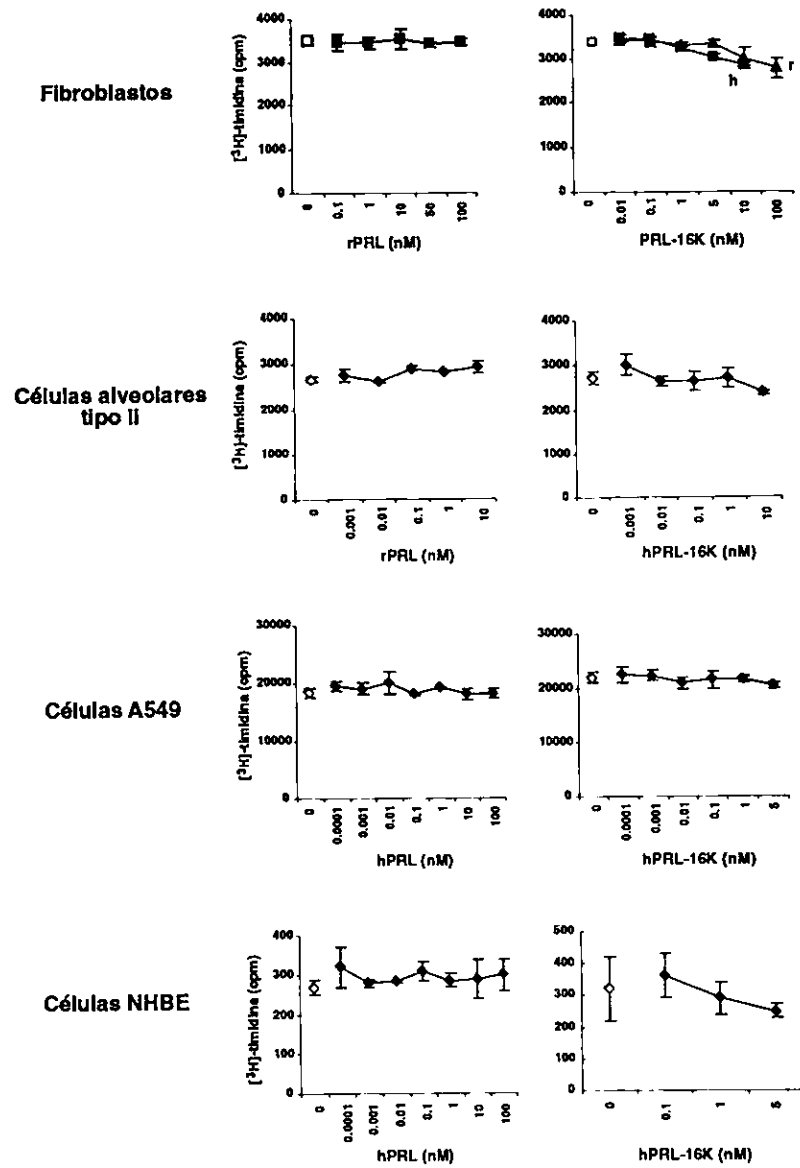


Figura 9

Ausencia de efecto de PRL y PRL-16K sobre la proliferación de células pulmonares. Las células fueron incubadas por 60 hr en ausencia (◇) o presencia (◆) de PRL (derecha) o PRL-16K (izquierda). Se midió la incorporación de timidina tritiada al DNA como índice de proliferación. Los valores representan la media \pm SEM.

PRL y la PRL-16K presentes en la circulación o, eventualmente, estas moléculas podrían ser producidas localmente por células pulmonares.

Con el propósito de determinar la producción de PRL por células pulmonares, RNA total de fibroblastos, células alveolares tipo II y células A549 fue sometido a RT-PCR utilizando cebadores derivados del cDNA de la PRL pituitaria de rata o humana, respectivamente. Se detectó expresión de PRL en fibroblastos (Fig. 10a) y en células A549 (Fig. 10b), pero no en células alveolares tipo II (Fig. 10a). Se obtuvieron productos de amplificación de 388 pb y 560 pb para fibroblastos de rata y células A549 humanas, respectivamente. La diferencia en el tamaño de los productos amplificados se debe a que en el caso de la PRL de rata se amplificó entre los exones 2 y 4 del gen y para la PRL humana entre los exones 2 y 5. Se utilizó como control positivo cDNA de pituitaria de rata o placenta humana, respectivamente. No se detectó señal positiva en ausencia de retrotranscripción (control negativo).

Consistentemente con la expresión del gen, el análisis por Western blot de lisados celulares reveló la presencia de PRL en fibroblastos (Fig. 11) y células A549 (Fig. 12). Para el caso de los fibroblastos, el antisuero α hPRL-C4 detectó dos bandas inmunorreactivas con pesos moleculares aparentes de 23 y 16 kDa. Estas proteínas comigraron con los estándares de PRL y PRL-16K de rata de pesos moleculares de 23 (muy tenue, ver figura 13) y 26 kDa, respectivamente (Fig. 12). En lisados de células A549 se detectaron proteínas inmunorreactivas con pesos moleculares aparentes de 23, 16 y 12 kDa (Fig. 10). Estas bandas fueron reconocidas por anticuerpos poli (α hPRL) y monoclonales (INN-hPRL-368). Se muestran

estándares de PRL y PRL-16K humanas, con pesos moleculares de 23 y 14 kDa, respectivamente.

Además, en lisados de células de epitelio bronquio/traqueal humano normal (NHBE) también se detectó la presencia de bandas inmunorreactivas de 23 y 16 kDa (Fig. 13). Mientras las bandas de 23 y 16 kDa de las células NHBE tuvieron una intensidad similar, la intensidad de la banda de 16kDa fue claramente mayor en las células A549.

Con el propósito de determinar si las células A549 y NHBE secretan PRL, se analizó el efecto de medio condicionado de células A549 o NHBE sobre la proliferación de células Nb2. En la figura 14 se compara el efecto de medios condicionados no concentrados de A549 y NHBE sobre Nb2. El medio condicionado de NHBE estimuló la proliferación de las células Nb2 en forma dependiente de la dosis, mientras que el de A549 no tuvo efecto. El antisuero α hPRL neutralizó completamente el efecto estimulador del medio condicionado de NHBE sobre la proliferación de Nb2, indicando la especificidad del efecto de PRL. La concentración de PRL estimada en el medio condicionado de NHBE fue de 160 pg/ml. El medio condicionado concentrado (8X) de A549 estimuló la proliferación de las células Nb2 en forma dependiente de la dosis y esta estimulación fue parcialmente inhibida por el α hPRL (1:300) (Fig. 15a). La figura 15b muestra el efecto del estándar de hPRL en ausencia o presencia de α hPRL (1:300). El α hPRL neutralizó completamente el efecto de PRL excepto para la dosis más alta (100 ng/ml). Estos resultados indicaron la presencia de pequeñas cantidades de PRL biológicamente activa en el medio condicionado de A549. La concentración de PRL estimada fue de 20.5 pg/ml. La

porción del efecto estimulador no neutralizado por los anticuerpos se debió probablemente a la presencia de IL-2 en el medio condicionado de A549⁶², interleucina que también estimula la proliferación de las células Nb2⁶³.

Estos resultados indican diferencias entre las células A549 y NHBE en el procesamiento de la PRL. En el caso de las células A549, el Western blot de homogenados celulares revela una mayor abundancia de PRL-16K y mediante el bioensayo con Nb2 se detectaron muy bajos niveles de PRL bioactiva en el medio condicionado. Estos datos indican que las células A549 expresan el gen de la PRL y la mayor parte de la proteína sintetizada se procesa proteolíticamente para dar PRL-16K. Dado que la PRL-16K carece de parte del sitio 1 de unión al receptor de PRL que incluye a las α -hélices 1 y 4 ⁽²⁾, se piensa que es incapaz de activar la vía de señalización que se traduce en un aumento de la proliferación de Nb2.

Por otra parte, las células NHBE también producen PRL la cual es parcialmente procesada a PRL-16K, sin embargo se detecta mayor cantidad de PRL en el Western blot y mayor bioactividad tipo PRL en el medio condicionado.

Estos resultados indican que el procesamiento proteolítico de la PRL para formar PRL-16K está favorecido en el epitelio de tipo canceroso en comparación con el epitelio normal. Esta diferencia entre células cancerosas y normales tiene posibles implicaciones sobre la regulación de la angiogénesis y/o sobre la producción de NO. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis hace falta profundizar en la investigación.

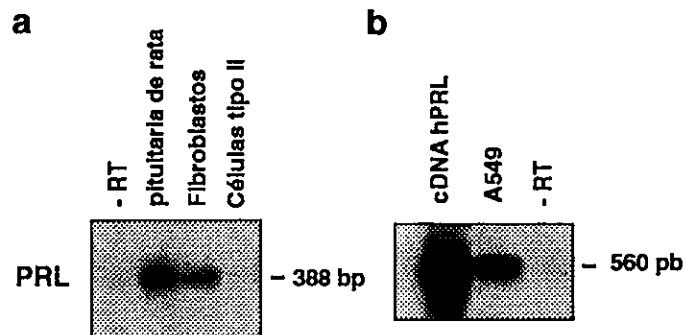


Figura 10

Expresión del mRNA de PRL en fibroblastos de pulmón de rata fetal y células A549. a) RT-PCR y Southern blot del RNA total de fibroblastos y células alveolares tipo II. Se utilizó como control positivo RNA total de la pituitaria de rata y la ausencia de retrotranscripción como control negativo (-RT).

b) RT-PCR y Southern blot del RNA total de células A549. Se muestra como control positivo la amplificación del cDNA de la PRL humana y como control negativo la ausencia de retrotranscripción (-RT).

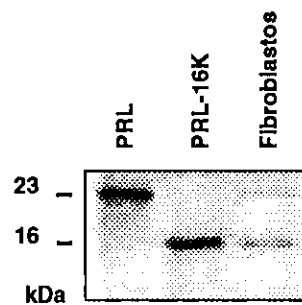


Figura 11

Identificación de proteínas inmunorreactivas tipo PRL en lisados de fibroblastos. Western blot de homogenados de fibroblastos utilizando α PRL-C4. Se muestran los estándares de PRL (50 ng) y PRL-16K (50 ng) de rata.

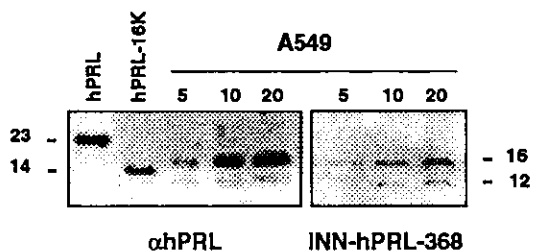


Figura 12

Identificación de proteínas inmunorreactivas tipo PRL en lisados de células A549. Western blot de homogenados de células A549 utilizando α hPRL o Mab INN-hPRL-368. Se muestran 5, 10 y 20 μ g de proteína total para los homogenados celulares y 50 ng de los estándares de PRL y PRL-16K humanas.

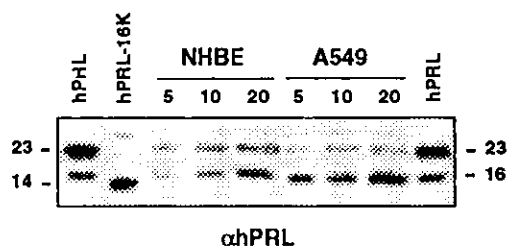


Figura 13

Identificación de proteínas tipo PRL en lisado de células NHBE en comparación con células A549. Western blot de homogenados de NHBE o A549 utilizando α hPRL. Se muestran 5, 10 y 20 μ g de proteína total para los homogenados celulares y 50 ng de los estándares de PRL y PRL-16K humanas.

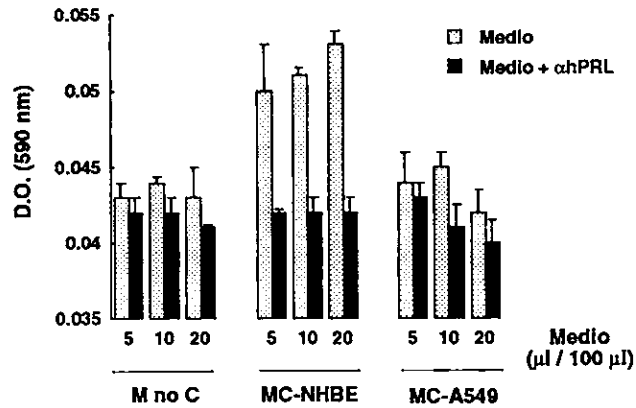


Figura 14

Identificación de actividad tipo PRL en el medio condicionado de NHBE.
 a) Proliferación de células Nb2 en presencia de medio condicionado de NHBE o A549 (0, 5, 10, 20 µl) en ausencia (barras grises) o presencia de αhPRL (1:300) (barras negras). Después de 60 hr de incubación se midió la reducción de MTT como índice del número de células. Los valores representan la media ± SEM.

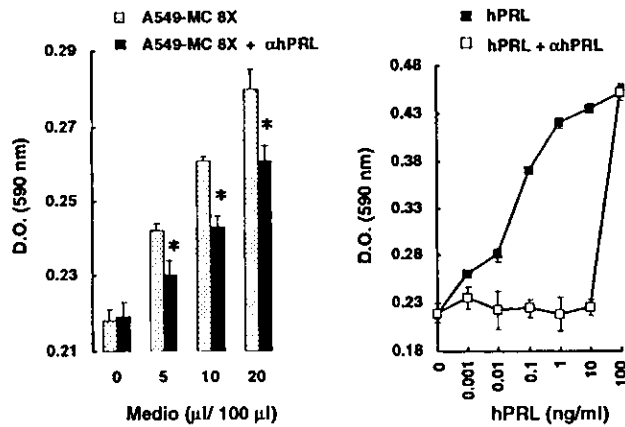


Figura 15

Identificación de actividad tipo PRL en el medio condicionado de A549.
 a) Proliferación de células Nb2 en presencia de medio condicionado de A549 8X (0, 5, 10, 20 µl).
 b) Proliferación de células Nb2 en presencia de hPRL (■) o hPRL más αhPRL (1:300) (□).
 Después de 60 hr de incubación se midió la reducción de MTT como índice del número de células. Los valores representan la media ± SEM.

Análisis de posibles efectos autócrinos de las PRL endógenas

Con el fin de analizar el posible efecto autócrino de las PRLs epiteliales sobre la proliferación, las células A549 o NHBE fueron cultivadas en presencia de IgG aisladas de los antisueros α hPRL y α rPRL-C1; IgG de suero normal de conejo (SN) e IgG monoclonales anti-PRL 16K humana (1G8). Los anticuerpos no tuvieron efecto sobre la incorporación de timidina tritiada al DNA de ninguno de los tipos celulares (Fig.16 y 17).

Con el propósito de analizar el posible efecto autócrino de las PRLs endógenas sobre la producción de NO, las células A549 fueron cultivadas en presencia de IgG aisladas de los antisueros α hPRL y α rPRL-C1; IgG de suero normal de conejo (IgG SN) e IgG monoclonales anti-PRL-16K humana (1G8). El tratamiento con IgGs aisladas del α hPRL estimuló la producción de NO, mientras que el tratamiento con otras IgGs no tuvo efecto (Fig. 18). L-NAME inhibió el aumento en la producción de NO estimulada por IgG policlonales anti-PRL 23K humana así como el de las citocinas estimulantes $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ y $\text{IL-1}\beta$ (Fig. 19). Estos resultados indican la presencia de proteínas tipo PRL con efecto autócrino inhibitorio sobre la producción basal de NO por células A549. Como se mencionó anteriormente, la PRL-16K no tuvo efecto estimulador sobre la producción de NO por células A549, en cambio PRL tuvo un efecto inhibitorio. Esto sugiere que la pequeña cantidad de PRL secretada por las células A549 es capaz de inhibir en forma autócrina la producción basal de NO de estas células.

A549

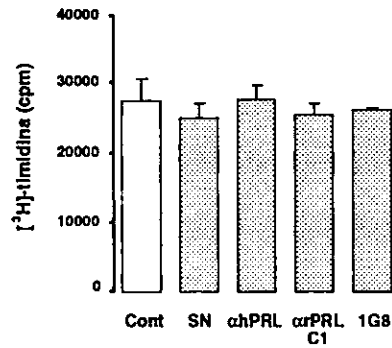


Figura 16

Ausencia de efecto de anticuerpos anti-PRL sobre la proliferación de células A549. Incorporación de timidina tritiada al DNA de células A549 en respuesta a 10µg/ml de IgG de suero normal de conejo (SN), αhPRL, αrPRL-C1 o 1G8. Los valores representan la media ± SEM.

NHBE

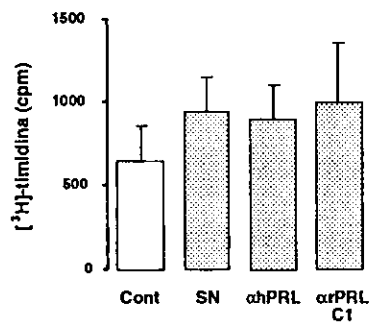


Figura 17

Ausencia de efecto de anticuerpos anti-PRL sobre la proliferación de células NHBE. Incorporación de timidina tritiada al DNA de células NHBE en respuesta a 10µg/ml de IgG de suero normal de conejo (SN), αhPRL o αrPRL-C1. Los valores representan la media ± SEM.

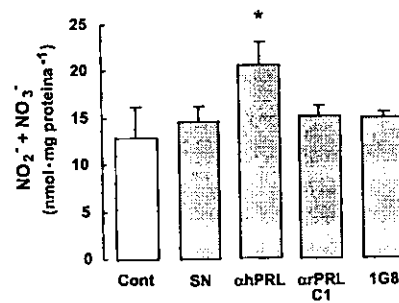


Figura 18

Anticuerpos anti-hPRL estimulan la producción basal de NO por células A549. Producción de NO por células A549 en ausencia (barra blanca) o presencia (barras grises) de 10µg/ml de IgG de suero normal de conejo (SN), αhPRL, αrPRL-C1 o 1G8. Los valores representan la media ± SEM.

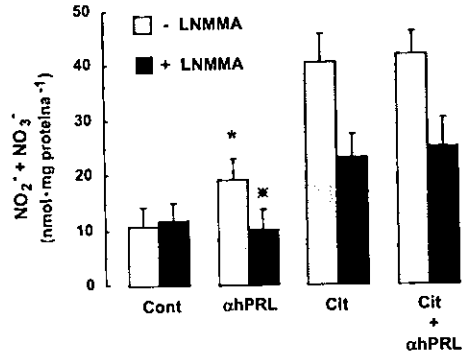


Figura 19

L-NAME inhibe el efecto estimulador de αhPRL sobre la producción de NO por A549. Producción de NO por células A549 en ausencia (Cont) o presencia de αhPRL (24 µg/ml); citocinas (Cit) o αhPRL más citocinas (Cit + αhPRL). Todos los tratamientos se realizaron en ausencia (barras grises) o presencia de 1mM de L-NAME (barras negras). La mezcla de citocinas utilizadas fue: IL-1β (5 ng/ml), TNFα (25 ng/ml) y IFNγ (100 U/ml). Los valores representan la media ± SEM.

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la PRL y la PRL-16K no afectan la proliferación de las células pulmonares bajo las condiciones analizadas. Sin embargo, con los resultados obtenidos no es posible descartar completamente un efecto sobre la proliferación celular durante otras etapas del desarrollo o bajo otras condiciones experimentales.

Por otra parte, los resultados muestran que la PRL y la PRL-16K tienen efectos opuestos sobre la expresión de iNOS y la producción de NO por fibroblastos y células epiteliales pulmonares. Mientras que la PRL tiene un efecto inhibitorio, la PRL-16K tiene un efecto fuertemente estimulador comparable al de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IFN- γ y TNF- α). Los resultados sugieren que la PRL actúa a través del receptor "largo" de PRL, ya que se detectó la expresión del mismo, y sugieren que el efecto estimulador opuesto de la PRL-16K ocurre a través de un receptor específico distinto a los receptores conocidos para PRL. Experimentos de unión y desplazamiento de ligando en los que se detectó un sitio de unión específico para PRL-16K en fibroblastos de pulmón de la rata fetal, apoyan esta posibilidad.

Por otra parte, nuestros resultados indican que fibroblastos y células epiteliales del pulmón producen PRL y PRL-16K. Esto sugiere que ambas PRLs pueden tener efectos autócrinos y parácrinos en la regulación de la producción de NO en el pulmón. La producción local de PRL puede contribuir a mantener bajos niveles basales de NO y por el contrario la PRL-16K podría contribuir a la producción de

altos niveles de NO, producidos por la actividad de iNOS durante procesos inflamatorios y de defensa del huésped del tracto respiratorio.

En vista de las propiedades únicas de PRL-16K versus PRL, la(s) proteasa(s) responsables del procesamiento de PRL jugarían un papel fundamental en la regulación local de la producción de NO. En este sentido, recientemente se ha observado que los estrógenos son capaces de regular el procesamiento proteolítico de PRL para dar lugar a PRL-16K en el sistema neurohipofisario⁵⁹. La posibilidad de que el corte de PRL para formar PRL-16K sea un proceso regulado le confiere un significado adicional a las propiedades opuestas de estas proteínas y garantiza nuevos estudios.

Finalmente, estos resultados revelan que la proteólisis de la PRL le confiere a esta hormona propiedades y funciones que reflejan aquellas de las citocinas proinflamatorias y esto puede contribuir a efectos sobre el sistema inmune previamente atribuidas sólo a la PRL.

BIBLIOGRAFIA

1. Sinha, Y.N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Rev.* **16**, 354-369 (1995).
2. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. & Kelly P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Rev.* **19**, 225-268 (1998).
3. Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L. & Steinmetz, R.W. Extrapituitary prolactin: distribution, functions, and clinical aspects. *Endocrine Rev.* **17**, 639-669 (1996).
4. Clapp, C., López-Gómez, F.J., Nava, G., Corbacho, A., Torner, L., Macotela, Y., Dueñas, Z., Noris, G., Acosta, E., Garay, E. & Martínez de la Escalera, G. Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J. Endocrinol.* **158**, 137-144 (1998).
5. Corbacho, A.M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Dueñas, Z., Noris, G., Morales, M.A., Martínez de la Escalera, G. & Clapp, C. Umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinol.* En prensa (2000).
6. Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A. & Martial, J. A. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocrine Rev.* **17**, 385-410 (1996).
7. Yu-Lee L. Molecular actions of prolactin in the immune system. *P.S.E.B.M.* **215**, 35-52 (1997).

8. Bazan, J.F. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoitin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 788-795 (1989).
9. Cosman, D., Lyman, S.D., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P., Park, L.S., Goodwin, R.G. & March C.J. A new cytokine receptor superfamily. *Trends in Biochemistry*, **15**, 265-270 (1990).
10. Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S. & Nicoll, C.S. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* **133**, 935-938 (1993).
11. Ferrara, N., Clapp, C. & Weiner, R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* **129**, 896-900 (1991).
12. Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F. & Weiner, R.I. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**, 1292-1299 (1993).
13. Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R.I. & Martial, J.A. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: An efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1246-1251 (1999).
14. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. & Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis

- inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**, 315-28 (1994).
15. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. & Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-85 (1997).
16. Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-74 (1992).
17. Moss, M.L., Jin, S.L., Becherer, J.D., Bickett, D.M., Burkhart, W., Chen, W.J., Hassler, D., Leesnitzer, M.T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J. & Willard, D. Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J. Neuroimmunol.* **72**, 127-129 (1997).
18. Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J. & Weiner, R.I. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: Activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression *Endocrinol.* **139** (9), 3696-3703 (1998).
19. Dueñas, Z., Torner, L., Corbacho, A.M., Ochoa, A., Gutiérrez-Ospina, G., López-Barrera, F., Barrios, F.A., Berger, P., Martínez de la Escalera, G. & Clapp, C. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **40** (11), 2498-2505 (1999).

20. Clapp, C. & Weiner, R.I. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* **130**, 1380-1386 (1992).
21. Mendelson, C.R., Johnston, J.M., MacDonald, P. & Snyder, J.M. Multihormonal regulation of surfactant synthesis by human fetal lung *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **53**(2), 307-317 (1981).
22. Mendelson, C. R. & Boggaram, V. Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 415-40 (1991).
23. Hamosh, M & Hamosh P. The effect of prolactin on the lecithin content of fetal rabbit lung. *J. Clin. Investi.* **59**, 1002-1005 (1977).
24. Hauth, J.C., Parker, C.R.Jr., MacDonald, P.C., Porter, J.C. & Johnston, J.M. A role of fetal prolactin in lung maturation. *Obstet. Gynecol.* **51**, 81-88 (1978).
25. Porreco, R.P., Merrit, T.A. & Gluck L. Effect of prolactin on phospholipid biosynthesis by alveolar cell carcinoma (A549) in monolayer tissue culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **136**(8), 1071-1074 (1980).
26. Brown-Borg, H. M., Zhang, F., Huhtaniemi, I. & Bartke, A. Developmental aspects of prolactin receptor gene expression in fetal and neonatal mice. *Euro. J. Endocrinol.* **134**, 751-7 (1996).
27. Freemark, M., Nagano, M., Edery, M. & Kelly, P.A. Prolactin receptor gene expression in the fetal rat. *J. Endocrinol.* **144**, 285-292 (1995).

28. Freemark, M., Driscoll, P., Maaskant, R., Petryk, A. & Kelly, P.A. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *J. Clin. Invest.* **99**(5), 1107-1117 (1997).
29. Royster, M., Driscoll, P., Kelly, P.A. & Freemark, M. The prolactin receptor in the fetal rat: cellular localization of messenger ribonucleic acid, immunoreactive protein, and ligand-binding activity and induction of expression in late gestation. *Endocrinol.* **136**(3), 3892-3900 (1995).
30. Ouhtit, A., Morel, G. & Kelly, P.A. Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in the rat. *Endocrinol.* **133**(1), 135-144 (1993).
31. Gropp, C., Havemann, K. & Scheuer, A. Ectopic hormones in lung cancer patients at diagnosis and during therapy. *Cancer* **46**(2), 347-354 (1980).
32. Recchione, C., Galante, E., Secreto, G., Cavalleri, A., & Dati, V. Abnormal serum hormone levels in lung cancer. *Tumori.* **69**(4), 293-298 (1983).
33. Bhatavdekar, J.M., Patel, D.D., Chikhikar, P.R., Mehta, R.H., Vora, H.H., Karelia, N.H., Ghosh, N., Shah, N.G., Suthar, T.P., Neeman, J.P., et al. Levels of circulating peptide and steroid hormones in men with lung cancer. *Neoplasma* **41**(2), 101-103 (1994).
34. Sorenson, G.D., Pettengill, O.S., Brinck-Johnsen, T., Cate, C.C. & Maurer L.H. Hormone production by cultures of small-cell carcinoma of the lung. *Cancer* **47**(6), 1289-1296 (1981).

35. Fields, K., Kulig, E. & Lloyd, R. Detection of prolactin messenger RNA in mammary and other normal and neoplastic tissues by polymerase chain reaction. *Lab. Invest.* **68**(3), 354-360 (1993).
36. Robertson M.T. & Kulczycki L.L. Prolactin action in cystic fibrosis. *Materia Medica Polona.* **22**(2), 68-9 (1990).
37. Robertson MT. Prolactin, human nutrition and evolution, and the relation to cystic fibrosis. *Medical Hypotheses* **29**(2):87-99 (1989).
38. Eiserich, J.P., Patel, R.P. & O'Donnell, V. Pathophysiology of nitric oxide and related species: Free radical reactions and modification of biomolecules. *Molecular aspects of medicine* **19** (4), 221-358 (1999).
39. Mayer, B. & Hemmens, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **22**(12), 477-81(1997).
40. Moncada, S., Palmer, R.M.J. & Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142 (1991).
41. Nathan, C. & Xie, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 13725-13728 (1994).
42. van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Shigenaga, M.K. & Cross, C.E. Reactive nitrogen species and tyrosin nitration in the respiratory tract. Epiphenomena or pathobiologic mechanism of disease?. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 1-9 (1999).

43. Jorens, P.G., Van Overveld, F.J., Vermiere, P.A., Bult, H. & Herman, A.G. Synergism between interleukin-1 β and the nitric oxide synthase inducer interferon- γ in rat lung fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* **224**, 7-12 (1992).
44. Willis, R.A., Nussler, A.K., Fries, K.M., Geller, D.A. & Phipps, R.P. Induction of nitric oxide synthase in subsets of murine pulmonary fibroblasts: effect on fibroblast interleukin-6 production. *Clinical Immunology & Immunopathology* **71**(2), 231-9 (1994).
45. Lavnikova, N. & Laskin, D.L. Unique patterns of regulation of nitric oxide production in fibroblasts. *J. Leukoc. Biol.* **58**, 451-458 (1995).
46. Asano, K., Chee, C.B.E., Gaston, B., Lilly, C.M., Gerard, C., Drazen, J.M. & Stamler, J.S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10089-10093 (1994).
47. Robbins, R.A., Springall, D.R., Warren, J.B., Kwon, O.J., Buttery, L.D.K., Wilson, A.J., Adcock, I.M., Riveros-Moreno, V., Moncada, S., Polak, J. & Barnes, P.J. Inducible nitric oxide synthase is increased in murin lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **198**(3), 835-843 (1994).
48. Gutiérrez, H.H., Pitt, B.R., Schwarz, M., Watkins, S.C., Lowenstein, C., Caniggia, I., Chumley, P. & Freeman B.A. Pulmonary alveolar epithelial inducible NO synthase gene expression: regulation by inflammatory mediators. *Am. J. Physiol.* **268** (Lung Cell. Mol. Physiol. 12):L501-L508 (1995).

49. Hallman, M. Molecular interactions between nitric oxide and lung surfactant. *Biol Neonate* **71**(1), 44-48 (1997).
50. Hallman, M. & Bry, K. Nitric oxide and lung surfactant. *Seminars in Perinatology* **20**(3), 173-185 (1996).
51. Chikanza, I.C. Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Annals N.Y. Acad. Sci.* **876**, 119-30 (1999).
52. Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* **100**, 2417-2423 (1997).
53. Meli, R., Raso, G.M., Gualillo, O., Pacilio, M., & Di Carlo, R. Prolactin modulation of nitric oxide and TNF- α production by peripheral neutrophils in rats. *Life Sci.* **61**, 1395-1403 (1997).
54. Kumar, A., Singh, S.M. & Sodhi, A. Effect of prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production of murine peritoneal macrophages: role of Ca⁺⁺ and protein kinase C. *Int. J. Immunopharmac.* **19**(3), 129-133 (1997).
55. Raso, G.M., Meli, R., Gualillo, O., Pacilio, M. & Di Carlo, R. Prolactin induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J. Neurochem.* **73**, 2272-2277 (1999).
56. Clapp, C., Sears, P.S., Russell, D.H., Richards, J., Levay-Young, B.K. & Nicoll, C.S. Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinol.* **122**, 2892-2898 (1988).

57. Caniggia, I., Tseu, I., Han, R.N., Smith, B.T., Transwell, K. & Post, M. Spatial and temporal differences in fibroblast behavior in fetal rat lung. *Am. J. physiol.* **261** (Lung Cell. Mol. Physiol. 5), L424-L433 (1991).
58. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
59. Torner, L., Nava, G., Dueñas, Z., Corbacho, A., Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G. & Clapp, C. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J. Endocrinol.* **161**, 423-432 (1999).
60. Tanaka, T., Shiu, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L. & Friesen, H.G. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: Measurement of Prolactin and Growth Hormone in human serum. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* **5**, 1058-1063 (1980).
61. Green, L.M., Reade, J.L. & Ware, C.F. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *Journal of Immunological Methods* **70**, 257-268 (1984).
62. Mc Millan, D.N., Kernohan, N.M., Flett, M.E., Heys, S.D., Deehan, D.T., Sewell, H.F, Walker, F. & Eremin, O. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumor cells in situ and in vitro: evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. *International Journal of Cancer* **60**(6), 766-772 (1995).

63. Too, C.K., Murphy, P.R. and Friesen, H.G. G-proteins modulate prolactin- and interleukin-2-stimulated mitogenesis in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinol.* **124**(5), 2185-92 (1989).

Proteolytic Cleavage Confers Nitric-oxide Synthase Inducing Activity upon Prolactin*

(Received for publication, February 1, 2000, and in revised form, February 24, 2000)

Ana M. Corbacho‡, Gabriel Nava‡, Jason P. Eiserich§, Gino Noris‡, Yazmin Macotela‡, Ingrid Struman¶, Gonzalo Martínez de la Escalera‡, Bruce A. Freeman§, and Carmen Clapp‡¶

From the ‡Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, 76001 Querétaro, Qro, México, the §Departments of Anesthesiology, Biochemistry, and Molecular Genetics and the UAB Center for Free Radical Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35233, and the ¶Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Belgium

Prolactin (PRL), originally associated with milk secretion, is now known to possess a wide variety of biological actions and diverse sites of production beyond the pituitary. Proteolytic cleavage is a common post-translational modification that can either activate precursor proteins (i.e. cytokines, matrix metalloproteinases) or confer upon the peptide fragment unique biological actions not exerted by the parent molecule (i.e. antiangiogenic factors such as angiostatin and endostatin). Recent studies have demonstrated that the 16-kDa N-terminal proteolytic cleavage product of PRL (16K-PRL) acts as a potent inhibitor of angiogenesis. Despite previous demonstrations of 16K-PRL production *in vivo*, biological functions beyond its antiangiogenic actions remain unknown. Here we show that 16K-PRL, but not full-length PRL, acts to promote the expression of the inducible isoform of nitric-oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) production by pulmonary fibroblasts and alveolar type II cells with potency comparable with the proinflammatory cytokines interleukin-1 β , interferon γ , and tumor necrosis factor α . The differential effect of 16K-PRL versus PRL occurs through a receptor distinct from known PRL receptors. Additionally, pulmonary fibroblasts express the PRL gene and endogenously produce 16K-PRL, suggesting that this pathway may serve both autocrine and paracrine roles in the regulation of NO production. These results reveal that proteolytic cleavage of PRL confers upon this classical

hormone potent iNOS inducing activity, suggesting its role in inflammatory/immune processes.

Although PRL¹ was originally identified as a lactotrophic hormone secreted by the pituitary gland, accumulating evidence has implicated PRL in a strikingly diverse array of physiological functions, including osmoregulation, reproduction, and behavioral modifications (1, 2). PRL synthesis has been demonstrated in numerous extra-pituitary tissues, including endothelial (3), neuronal, and immune cells (i.e. lymphocytes, mononuclear cells, and thymocytes) (1). Moreover, the emerging role of PRL in immunoregulation has led to the concept of a dual function for PRL as both a circulating hormone and a cytokine (1). The tenet of PRL as a cytokine is further established by studies demonstrating its structural similarity to members of the cytokine/hematopoietin family (4) and that PRL receptors belong to the cytokine/hematopoietin receptor superfamily (5). Perturbation of PRL physiology appears to have significant immunologic effects in humans, where hyperprolactinemia is associated with autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and uveitis (6). All these conditions are also associated with elevated tissue iNOS expression and NO production (7). Consistent with these observations, hyperprolactinemia has been associated with elevated NO levels in a rat model of acute inflammation (8).

PRL can be post-translationally processed by proteolytic cleavage, giving rise to 16K-PRL, a fragment that has unique antiangiogenic actions not shared with the full-length molecule (9–11). 16K-PRL has been detected in the pituitary and serum of humans, rats, and mice (12, 13) and acts as a potent inhibitor of angiogenesis *in vivo* and *in vitro*, inhibiting endothelial cell proliferation (9, 10, 11) and stimulating type 1 plasminogen activator inhibitor expression (11). Finally, 16K-PRL has been shown to increase endothelial cell cAMP levels (14), an occurrence that has been shown to induce iNOS expression (15). 16K-PRL adds to a growing list of proteins that acquire specific functions or become activated as the result of the proteolytic cleavage of large precursors. This is the case of other potent antiangiogenic factors, like angiostatin (16) and endostatin (17), some cytokines, like TNF α (18) and IL-1 β (19), and matrix metalloproteinases (20).

Although PRL manifests cytokine-like signaling properties and can be elevated in conditions where iNOS expression is increased, the influence of the proteolytic processing to 16K-PRL on NO production and iNOS expression remains unknown. Here we report that 16K-PRL, but not full-length PRL, promotes the expression of iNOS and NO production by rat pulmonary fibroblasts and alveolar type II cells. The stimulatory effect of 16K-PRL appears to occur through a receptor distinct from known PRL receptors, since a specific, high affinity, saturable binding site for 16K-PRL was found, while classical PRL receptors were not expressed at detectable levels in

* This work was supported by Howard Hughes Medical Institute Grant 75197-554801, National Council of Science and Technology of México Grant 27950-N, National Autonomous University of México Grant IN226799 (to C. C.), and National Institutes of Health Grants RO1-HL6493, RO1-HL58115, and P6-HL58418 (to B. A. F. and J. P. E.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla-Querétaro, Qro., México 76001. Tel.: 525-623-4028; Fax: 5242-340-344; E-mail: clapp@servidor.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: PRL, prolactin; 16K-PRL, 16 kDa N-terminal proteolytic cleavage product of PRL; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; NO, nitric oxide; IL-1 β , interleukin 1 β ; IFN- γ , interferon γ ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; L-NAME, L-N^G-arginine methyl ester; D-NAME, D-N^G-arginine methyl ester; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

resting pulmonary fibroblasts. Additionally, pulmonary fibroblasts express the PRL gene and endogenously produce 16K-PRL, suggesting a local function of this fragment in the regulation of NO production in the lung.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—Rat pituitary PRL was from the National Hormone and Pituitary Program (NHPP). Rat 16K-PRL was generated after enzymatic proteolysis of PRL by an extract from rat mammary gland (10). Human recombinant PRL and 16K-PRL were generated as described previously (10). Endotoxins were determined by the *Limulus* amoebocyte lysate assay (E-Toxate, Sigma). Recombinant murine interleukin-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor α (TNF- α) were from R & D Systems (Minneapolis, MN). L- and D-N^G-Arginine methyl ester (L- and D-NAME) were from Sigma.

Cell Culture—Rat lung fibroblasts and type II alveolar epithelial cells were isolated from Harlan Sprague-Dawley rat fetuses of 19–20 days of gestational age (21). Rat aortic smooth muscle cells were isolated as described previously (22). All cells were cultured in Ham's F-12 medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Cells grown to confluence were treated with human 16K-PRL (0.1–10 nM), rat 16K-PRL (1–100 nM), or full-length PRL (100 nM, human or rat). For comparison, additional cells were treated with a combination of IL-1 β (5 ng/ml), IFN- γ (100 units/ml), and TNF- α (500 units/ml).

Nitrite and Nitrate Assay—The oxidation products of NO, nitrite (NO₂⁻), and nitrate (NO₃⁻) were determined in cell culture medium as described previously (23).

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and Southern Blot—For rat iNOS detection, complementary primers (forward: 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3'; reverse: 5'-CTCCTGCCCATGAGTT CG1C-3'), 30 cycles, and an annealing temperature of 60 °C were used. For rat PRL detection, RT-PCR and Southern blot were performed as described previously (24). For the rat PRL receptors a common forward primer (5'-ATCCTGGGACAGATGGAGAC-3') and a common reverse primer (5'-ATCCACACGGTTGTGTCCTTC-3') were used to detect the short, intermediate, and long isoforms. Reverse primers were used to specifically detect the short (5'-TGGCTGAGGCTGACAAAAGAG-3') or long (5'-AGACAGTGGGGCTTTTCTCTCT-3') isoforms. Forty cycles and an annealing temperature of 56 °C were used. Amplification of β -actin mRNA was used as control for efficiency as described previously (24).

Western Blot—Fibroblasts were homogenized in lysis buffer and subjected to reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as described previously (24). Proteins were electroblotted onto nitrocellulose, probed with 2.5 μ g/ml anti-iNOS polyclonal IgG (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) or 1:500 16K-PRL rabbit antiserum (13) and developed as described previously (24).

PRL Cleavage—The activity of the enzymes that cleave PRL to 16K-PRL was assayed in fibroblast homogenates as described previously (10).

PRL Binding Assays—Binding of 16K-PRL to isolated fibroblast membranes was performed as described previously (25). Binding parameters (K_d and B_{max}) were derived from the competition studies using the LIGAND program (26).

RESULTS AND DISCUSSION

To evaluate the influence of PRL and 16K-PRL on NO production and iNOS expression, primary cultures of fetal rat lung fibroblasts, fetal rat alveolar type II cells, and rat aortic smooth muscle cells were utilized to model the response to proinflammatory stimuli. Quantitation of NO production was determined by measurement of its metabolites nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) accumulated in culture media. While human (Fig. 1a) and rat PRL (not shown) had no stimulatory effect, 16K-PRL potently stimulated NO production by rat fibroblasts and type II cells, but not by aortic smooth muscle cells (Fig. 1a). Increasing concentrations of 16K-PRL stimulated NO production by fibroblasts in a dose-dependent manner, with highest effects observed with 10 and 100 nM of human and rat 16K-PRL, respectively (Fig. 1b). The higher potency of human compared with rat 16K-PRL is consistent with previous observations in regard to their antiangiogenic effect (10). The maximal effect of 16K-PRL was comparable with that exerted by a mixture of proinflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , and IL-

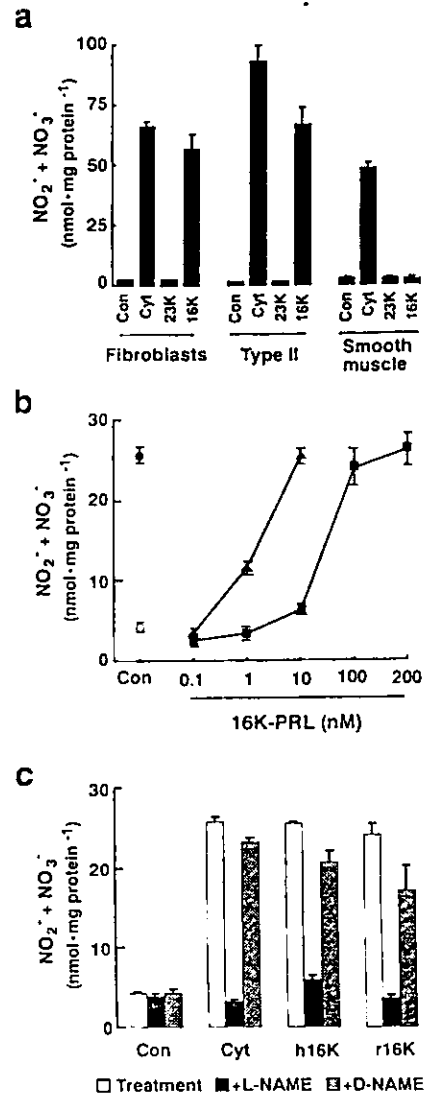


FIG. 1. The 16-kDa N-terminal proteolytic fragment of PRL, but not full-length PRL, stimulates NO production by rat pulmonary fibroblasts and alveolar type II cells. *a*, production of NO by rat fibroblasts, alveolar type II epithelial cells, and smooth muscle cells in the absence (Con) or presence of cytokines (Cyt), 10 nM human 16K-PRL (16K) or 100 nM human PRL (23K) (▲) and rat (■) 16K-PRL on NO production by fibroblasts. For comparison, cells were cultured in the absence (C) or presence of cytokines (●). *c*, 16K-PRL-induced NO production by fibroblasts is inhibited by the NOS inhibitor L-NAME, but not the inactive isomer D-NAME. Cells were cultured in the absence (Con) or presence of cytokines (Cyt), 10 nM human (h16K) or 100 nM rat 16K-PRL (r16K), in absence (open bars) or presence of 1 mM L-NAME (black bars) or D-NAME (shaded bars). In all cases, cytokine treatment (Cyt or Cytokines) consisted of a mixture of IL-1 β (5 ng/ml), IFN- γ (100 units/ml), and TNF- α (500 units/ml). NO production was measured by accumulation of NO₂⁻ + NO₃⁻ in culture medium after 72 h. Values are the mean \pm S.E.

1 β). Stimulation of NO production by 16K-PRL or cytokines was completely suppressed by L-NAME (1 mM), a competitive inhibitor of iNOS, but was not affected by the inactive isomer D-NAME (Fig. 1c). The possibility of a nonspecific action of 16K-PRL due to endotoxin contamination was excluded, because native PRL had no positive effect on iNOS expression even though the concentration used had higher or equivalent endotoxin content (0.15–0.5 ng of lipopolysaccharide/ml of medium) than 16K-PRL (0.03–0.5 ng of lipopolysaccharide/ml of medium) as determined by the *Limulus* amoebocyte lysate assay.

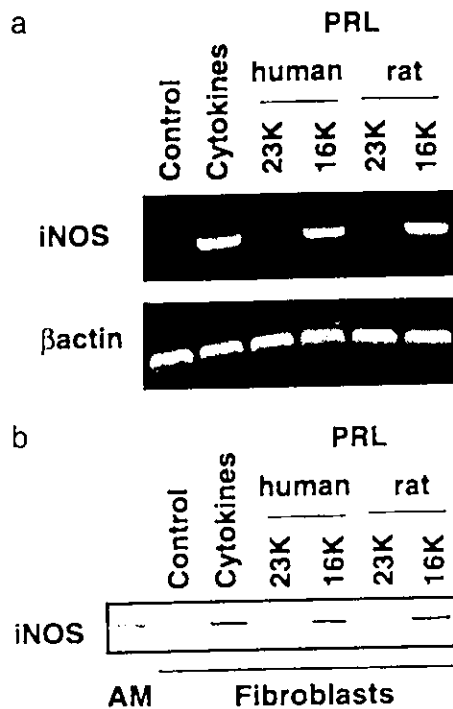


FIG. 2. 16K-PRL induces nitric-oxide synthase (iNOS) mRNA and protein expression in rat lung fibroblasts. *a*, RT-PCR was performed on total RNA extracted from fibroblasts cultured for 20 h in the absence (Control) or presence of a mixture of cytokines (Cytokines), human (10 nM) or rat (100 nM) 16K-PRL (16K), or human or rat PRL (100 nM) (23K). Amplification of β -actin is shown as a loading control. *b*, Western blot detection of iNOS in fibroblasts following treatment (72 h) in the absence (Control) or presence of cytokines, human or rat PRL (23K), or 16K-PRL (16K). Doses were the same as in Fig. 2*a*. A cell lysate of cytokine-activated murine macrophages is shown as a positive control (AM). Cytokine treatment consisted of a mixture of IL-1 β (5 ng/ml), IFN- γ (100 units/ml), and TNF- α (500 units/ml).

To determine whether NO production induced by 16K-PRL was mediated through iNOS expression, total RNA of fibroblasts treated with 16K-PRL, PRL, or cytokines was subjected to RT-PCR. Inducible NOS cDNA was detected following exposure of fibroblasts to 16K-PRL and cytokines, with no detectable iNOS expression in control or PRL-treated cells (Fig. 2*a*). Similar amounts of amplified products for β -actin were observed in all cases. Inducible NOS protein synthesis was confirmed by Western blot of fibroblast lysates probed with an anti-iNOS polyclonal antibody (Fig. 2*b*). Human and rat 16K-PRL dramatically increased iNOS protein expression, while iNOS was not detectable in lysates from control or PRL-treated cells. Expression of iNOS was clearly evident as early as 8 h following stimulation with 16K-PRL (not shown).

The expression of PRL receptors by lung fibroblasts and type II cells was studied to further characterize these novel actions of 16K-PRL. The presently identified PRL receptors arise from the same transcript by alternative splicing and differ in the length and composition of the cytoplasmic domain (2). Expression of the long (Fig. 4*a*) and short (not shown) PRL receptors was demonstrated in type II cells, while no PRL receptor variants were observable in fibroblasts. Although type II cells express PRL receptors, the influence of 16K-PRL on NO production seems to be independently mediated, since PRL, the natural ligand, has no stimulatory effect. Moreover, 16K-PRL stimulated fibroblast iNOS expression and NO production in the absence of detectable PRL receptors, motivating investigation of a possible specific binding site for 16K-PRL on these cells. Binding of 125 I-labeled rat 16K-PRL by fibroblast membrane preparations was high affinity ($K_d = 7.3 \pm 3.9$ nM),

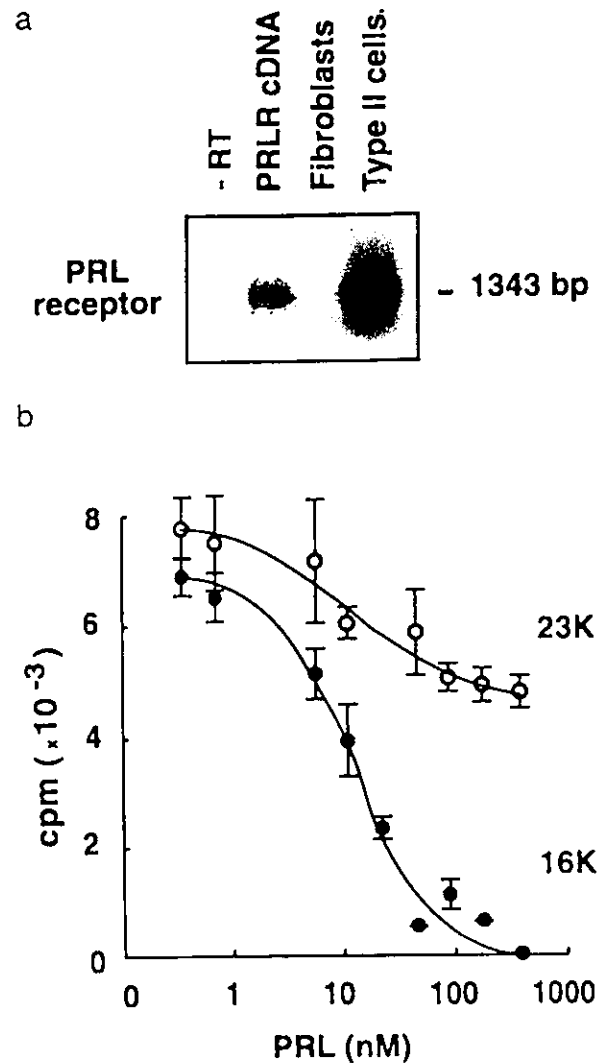


FIG. 3. Detection of a specific 16K-PRL binding site in rat lung fibroblasts. *a*, Southern blot analysis of the long PRL receptor mRNA expression in rat fibroblasts and alveolar type II epithelial cells. Total RNA was subjected to RT-PCR and Southern blot as described under "Experimental Procedures." PRL receptor cDNA (PRLR cDNA) with or without reverse transcriptase (-RT) are shown as controls. *b*, displacement of 125 I-labeled rat 16K-PRL binding to fibroblast membranes by increasing concentrations of unlabeled rat 23K-PRL (\circ) and 16K-PRL (\bullet).

saturable ($B_{max} = 7200 \pm 1730$ receptors/cell) and potently displaced by rat 16K-PRL but not by full-length PRL (Fig. 3*b*). This is consistent with a previously observed specific binding site for 16K-PRL in vascular endothelium (25) and suggests that lung fibroblasts express a specific receptor for 16K-PRL.

Although 16K-PRL has been detected in serum (12), the proportion of the fragment present in patients with elevated PRL levels is unknown, since the methodology used to detect PRL in serum (radioimmunoassay or enzyme-linked immunosorbent assay) does not distinguish between molecular variants. Moreover, local cell production of PRL and its cleavage to 16K-PRL may not be reflected in circulating PRL levels and this could be a source of 16K-PRL in the lung. To reveal the possibility of pulmonary PRL production, total RNA from fibroblasts and type II cells was subjected to RT-PCR using primers derived from rat pituitary PRL cDNA. PRL gene expression was detected in fibroblasts, but not in type II cells (Fig. 4*a*), and both PRL and 16K-PRL protein was demonstrated by Western blot analysis of cell lysates from fibroblasts (Fig. 4*b*). Moreover,

F3

F4

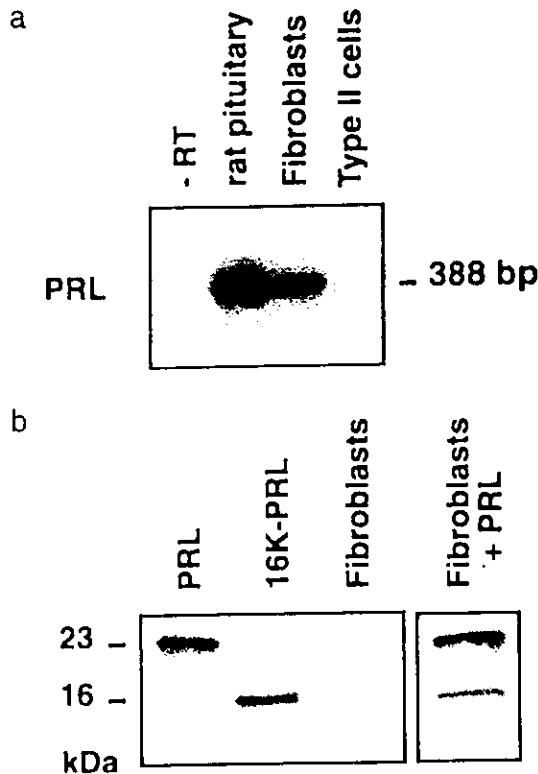


FIG. 4. Prolactin expression and proteolytic cleavage of PRL by rat lung fibroblasts. *a*, Southern blot analysis of PRL mRNA expression in rat fibroblasts and alveolar type II epithelial cells. RNA from rat anterior pituitary was used as a positive control, and omission of reverse transcriptase (-RT) served as a negative control. Total RNA was subjected to RT-PCR and Southern blot analysis as described under "Experimental Procedures." *b*, Western blot analysis of endogenous PRL immunoreactive proteins in homogenates from rat lung fibroblasts maintained in serum-free medium for 24 h (Fibroblasts). Exogenous PRL is proteolytically cleaved following incubation with fibroblast homogenates (Fibroblasts + PRL). PRL and 16K-PRL standards are shown.

incubation of exogenous PRL with fibroblast lysate resulted in the formation of 16K-PRL (Fig. 4b), demonstrating that fibroblasts can locally process PRL to the fragment. These results suggest that paracrine and autocrine effects of 16K-PRL can occur in the lung.

This study shows that 16K-PRL acts as a potent proinflammatory cytokine that stimulates iNOS expression and NO production by pulmonary fibroblasts and type II cells, a biological effect not shared by full-length PRL. The differential effect of 16K-PRL versus PRL appears to occur through a specific receptor for 16K-PRL, since a specific, high affinity, saturable binding site for 16K-PRL was apparent, and no PRL receptor expression was detectable in pulmonary fibroblasts under the culture conditions. Moreover, pulmonary fibroblasts are competent to both express the PRL gene and produce 16K-PRL, suggesting that this PRL fragment can exert autocrine and paracrine roles in the regulation of pulmonary inflammatory NO production. The absence of a stimulatory effect of PRL contradicts recent studies where the full-length molecule stimulated NO production by the rat glioma cell line C6 (27), suggesting that PRL effects on NO production are cell-type specific or that proteolytic processing of PRL to 16K-PRL was occurring. The minimal effect of PRL on iNOS expression and NO production (<5 μM) by rat glioma cell line C6 (27) suggests that PRL cleavage to 16K-PRL could be responsible for NO

production.

The results reported herein reveal that proteolytic cleavage of PRL confers a potent iNOS-inducing activity on prolactin reminiscent of proinflammatory cytokines such as IL-1β, IFN-γ, and TNF-α (23, 28, 29). Locally produced 16K-PRL may contribute to the high levels of NO produced by iNOS activity during inflammatory and host defense processes of the respiratory tract (30–32). In view of the unique properties of 16K-PRL versus PRL, the protease(s) responsible for processing PRL also would critically influence local regulation of NO production. Thus, the observation that estrogens regulate the enzymatic cleavage of PRL to 16K-PRL in the rat neurohypophyseal system (24) adds additional significance to pathways regulating PRL processing and warrants further investigation.

Acknowledgments—We thank Fernando López Barrera, Andrés Falcon, Thaddeus V. Bamberg, and Phillip H. Chumley for their expert technical assistance.

REFERENCES

- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., and Steinmetz, R. W. (1996) *Endocr. Rev.* 17, 639–669
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P. A. (1998) *Endocr. Rev.* 19, 225–268
- Clapp, C., López-Gómez, F. J., Nava, G., Corbacho, A., Torner, L., Macotela, Y., Duenas, Z., Noris, G., Acosta, E., Garay, E., and Martínez de la Escalera, G. (1998) *J. Endocrinol.* 158, 137–144
- Bazan, J. F. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 788–795
- Cosman, D., Lyman, S. D., Idzerda, R. L., Beckman, M. P., Park, L. S., Goodwin, R. G., and March, C. J. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 265–270
- Chikanza, I. C. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 876, 119–130
- Nathan, C. (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 2417–2423
- Meli, R., Raso, G. M., Gualillo, O., Pacilio, M., and Di Carlo, R. (1997) *Life Sci.* 61, 1395–1403
- Ferrara, N., Clapp, C., and Weiner, R. (1991) *Endocrinology* 129, 896–900
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delrue, F., and Weiner, R. I. (1993) *Endocrinology* 133, 1292–1299
- Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R. I., and Martial, J. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1246–1251
- Sinha, Y. N. (1995) *Endocr. Rev.* 16, 354–369
- Torner, L., Mejía, S., López-Gómez, F. J., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (1995) *Endocrinology* 136, 5454–5460
- D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J., and Weiner, R. I. (1999) *Mol. Endocrinol.* 13, 692–704
- Imai, T., Hirata, Y., Kanno, K., and Marumo, F. (1994) *J. Clin. Invest.* 93, 543–549
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., and Folkman, J. (1994) *Cell* 79, 315–328
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. (1997) *Cell* 88, 277–285
- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhardt, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Scatton, T., Schoonen, F., Warner, J., and Willard, D. (1997) *J. Neuroimmunol.* 72, 127–129
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., et al. (1992) *Nature* 356, 768–774
- Nagase, H., and Woessner, J. F., Jr. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 21491–21494
- Caniggia, I., Tseu, I., Han, R. N., Smith, B. T., Transwell, K., and Post, M. (1991) *Am. J. Physiol.* 261, L424–L433
- Travo, P., Barret, G., and Burnstock, G. (1980) *Blood Vessels* 17, 110–116
- Gutierrez, H. H., Pitt, B. R., Schwarz, M., Watkins, S. C., Lowenstein, C., Caniggia, I., Chumley, P., and Freeman, B. A. (1995) *Am. J. Physiol.* 268, L501–L508
- Torner, L., Nava, G., Duenas, Z., Corbacho, A., Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (1999) *J. Endocrinol.* 161, 423–432
- Clapp, C., and Weiner, R. I. (1992) *Endocrinology* 130, 1380–1386
- Munson, P. J., and Rodbard, D. (1980) *Anal. Biochem.* 107, 220–259
- Raso, G. M., Meli, R., Gualillo, O., Pacilio, M., and Di Carlo, R. (1999) *J. Neurochem.* 73, 2272–2277
- Jorens, P. G., Van Overveld, F. J., Vermiere, P. A., Bult, H., and Herman, A. G. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* 224, 7–12
- Asano, K., Chee, C. B. E., Gaston, B., Lilly, C. M., Gerard, C., Drazen, J. M., and Stamler, J. S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10089–10093
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1991) *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142
- Gaston, B., Drazen, J. M., Loscalzo, J., and Stamler, J. S. (1994) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 538–551
- van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Shigenaga, M. K., and Cross, C. E. (1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1–9

Journal of Endocrinology



Editor-in-Chief: Professor S G Hillier
Associate Editor: Professor J R E Davis

Dr C Clapp
Centro de Neurobiologia
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apartado Postal 1-1141
76001 Queretaro, Qro
Mexico

Editorial Office
17/18 The Courtyard
Woodlands
Bradley Stoke
Bristol BS32 4NQ
United Kingdom

Tel: +44 (0)1454 616046
Fax: +44 (0)1454 616071
Email: editorial@endocrinology.org
<http://www.endocrinology.org>

12 January 2000

Dear Dr Clapp

JOE3684 Research Paper UK
Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin-like isoforms

Thank you for sending the above paper to the *Journal of Endocrinology*. It has been reviewed by a member of the editorial board and appropriate referees whose report(s) are enclosed.

I am pleased to inform you that your paper is potentially acceptable, but some points have been raised by the referees and the Scientific Editor which require modification to the manuscript. **It is essential that the scientific points raised in the editorial reports are addressed before the paper can be finally accepted for publication.**

I enclose some information on how to submit your revised paper. I look forward to receiving this as soon as possible, to minimise the time to publication.

Yours sincerely

S G Hillier
Editor-in-Chief

Encs: - notes on submission of revised papers
- all available editorial reports

N.B. All of this faxed communication will follow immediately by post.

The Society for
Endocrinology
Company Limited
by Guarantee