



03062

9  
201

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGIA  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

**CARACTERIZACION BIOLOGICA DE PROLACTINAS  
NEUROHIPOFISIARIAS**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA PRESENTA EL  
Q.F.B. FRANCISCO JAVIER LOPEZ GOMEZ**

1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

---

Ciudad Universitaria, Diciembre de 1995.

*La presente tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora, y la cotutoría de los Dres. Carlos Arámburo de la Hoz y Ruy Pérez Montfort en el Centro de Neurobiología de la U.N.A.M. y el Instituto de Fisiología Celular.*

*Jurado asignado:*

*Presidente.*

*Dra. Carmen Clapp Jiménez.*

*Vocal.*

*Dr. Rolando Hernández Muñoz.*

*Secretario.*

*Dr. Alejandro Zentella Dehesa.*

*Suplente.*

*Dr. Fernando López Casillas.*

*Suplente.*

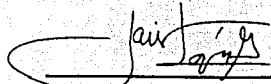
*Dr. Carlos Arámburo de la Hoz.*

*Asesor del tema:*



*Dra. Carmen Clapp Jiménez.*

*Sustentante:*



*Q.F.B. Francisco Javier López Gómez.*

---

## ***Agradecimientos.***

*A la Dra. Carmen Clapp Jiménez por haberme enseñado que la ciencia es siempre un camino de interminables satisfacciones y por su infinito e incondicional apoyo durante mi estancia en su laboratorio.*

*A los Dres. Carlos Arámburo de la Hoz, Gonzalo Martínez de la Escalera y Ruy Pérez Montfort, por su valiosa guía durante mis estudios de Maestría.*

*A mis grandes cuates de laboratorio: Salvador, Yaz, Zulma, Luz, Ana, Ma. Elena, Eva, Julieta, Emilio, Clelia, Mar y Gabriel, con quienes siempre es y será grata, leal y amistosa la competencia diaria.*

*A los miembros del jurado por sus excelentes comentarios hacia el tema presentado.*

*A Martha y Pilar, Secretarias del CNB por su siempre servicial y amable trato y convivencia.*

*A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la U.N.A.M. por haberme apoyado económicamente durante todo el desarrollo de esta tesis.*

## **Indice:**

<b>Introducción.</b>	2
<b>Antecedentes:</b>	
a. PRL.	5
b. PRL 16K.	7
c. Efectos antiangiogénicos de la PRL 16K.	8
c.1. Angiogénesis.	8
c.2. Efectos antiangiogénicos.	9
d. Receptores.	10
e. Sistemas de transducción de señal.	12
f. Fuentes de producción de PRL:	15
f.1. Adenohipófisis.	15
f.2. Sistema inmune	16
f.3. Sistema Nervioso Central	16
<b>Antecedentes Inmediatos:</b>	
a. Fragmentos de PRL en el Sistema Hipotálamoneurohipofisario.	17
<b>Diseño Experimental.</b>	20
<b>Publicaciones.</b>	22
<b>Resultados y Discusión.</b>	24
<b>Conclusiones.</b>	31
<b>Bibliografía.</b>	32

## **Introducción:**

*La existencia de todo ser vivo demanda el mantenimiento de una constancia de su medio interno. Esta, es el resultado de una compleja integración funcional de los elementos celulares que conforman al organismo.*

*Existen diversos niveles de integración funcional, dentro de los cuales se incluyen al celular, tisular, orgánico y sistémico., y de cuya interacción coordinada se definen sus diversas funciones.*

*A nivel celular el mantenimiento de la función depende de mecanismos variables. Estos pueden incluir por ejemplo, la sistematización de una ruta metabólica existente en una célula por sus productos resultantes, o bien, en algunos casos, la implementación de una ruta metabólica nueva mediante la expresión de una enzima o factor de regulación antes inexistente<sup>1</sup>.*

*Sin duda alguna una de las formas más complejas de regulación celular es resultado de la acción de mensajeros químicos capaces de modificar diversas esferas de la función celular. Estos mensajeros son responsables de la comunicación celular y por consiguiente de su funcionamiento coordinado<sup>1,2</sup>.*

*Los mensajeros químicos se pueden clasificar de diversas formas dependiendo de su origen y de su forma de acción. De tal forma los mensajeros de naturaleza hormonal o endócrina se*

*caracterizan por ser sintetizados por una glándula que los secreta hacia el torrente sanguíneo, a través del cual acceden hacia tejidos y células blanco distantes modificando sus acciones<sup>1,2</sup>.*

*Adicionalmente los mensajeros químicos incluidas las hormonas, pueden mediar la comunicación celular local modificando el funcionamiento de la propia célula que los produce (factores autócrinos) y/o de células vecinas diferentes (factores parácrinos)<sup>1,2</sup>.*

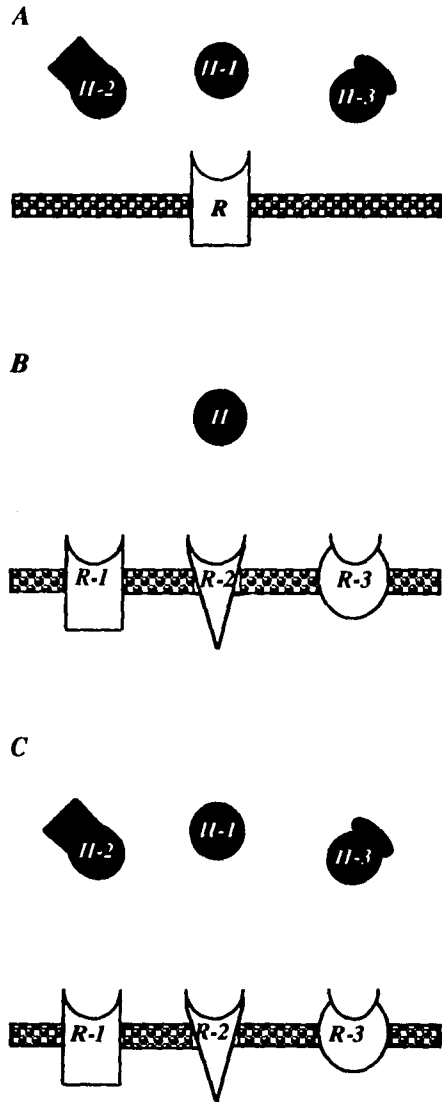
*En última instancia, la selectividad de la acción de los mensajeros químicos y en particular de las hormonas descansa en su interacción con receptores específicos, los cuales son proteínas especializadas capaces de reconocer, transducir y en algunos casos ejecutar el mensaje hormonal de manera específica<sup>1,2</sup>. La ubicación celular de los receptores incluye los diferentes compartimientos celulares y es en general función de la naturaleza química de la propia hormona<sup>2</sup>.*

*Es común que las hormonas ejerzan diferentes efectos sobre la misma célula blanco. Por ejemplo las hormonas de origen peptídico como la insulina son capaces de promover sobre el mismo blanco acciones tan diversas que pueden ir desde la modulación de una ruta metabólica, en este caso particular el transporte de glucosa, hasta la regulación de eventos más tardíos como lo es la progresión del ciclo celular<sup>3,4</sup>.*

Durante mucho tiempo se trató de buscar una explicación para entender la diversidad funcional de las hormonas. Actualmente existen diversas hipótesis que tratan de explicar la multiplicidad de eventos mediados por un mismo mensajero químico. En todas las hipótesis propuestas existe un común denominador: la heterogeneidad molecular de los componentes del sistema i.e; hormona, receptor, y elementos de la señalización intracelular<sup>3,4</sup>. Una de las hipótesis se basa en que la heterogeneidad molecular de una misma hormona define una familia de moléculas similares, pero lo suficientemente diferentes como para ser reconocidas de manera diferencial por un mismo receptor<sup>3,4</sup>. Esta interacción diferencial definiría la transducción de efectos diferentes y, en consecuencia cada miembro de la familia hormonal ejercería funciones específicas (Figura 1). La heterogeneidad molecular de los mensajeros químicos contribuiría así a explicar la diversidad funcional de las hormonas<sup>3-11</sup>.

Otra de las hipótesis propuesta se basa en que es la heterogeneidad molecular de los receptores frente a una misma hormona, les permite acoplarse a mecanismos de transducción diferentes y consecuentemente desencadenar respuestas diferentes (Figura 1)<sup>4-11</sup>.

Finalmente se ha propuesto la combinación de las dos hipótesis



**Figura 1.** Diferentes formas de crear diversidad en la regulación ejercida por agentes químicos. Pueden existir familias de hormonas (A), receptores (B), hormonas y receptores (C). Cada uno de ellos, potencialmente puede regular un evento diferente en el mismo blanco.

anteriores i.e; familias de receptores, acoplados a mecanismos de transducción diferentes, específicos para cada uno de los miembros de la familia hormonal<sup>12,13</sup> (Figura 1).

Uno de los objetivos centrales de nuestro grupo de investigación es justamente el estudiar el significado funcional de la heterogeneidad de los mensajeros químicos teniendo como modelo de estudio a la hormona proteica prolactina (PRL). Por ello el presente trabajo de tesis se enfocó fundamentalmente, a la caracterización biológica de dos antígenos tipo PRL de 23 y 14kDa de peso molecular, recientemente descritos en el sistema hipotálamoneurohipofisario de la rata.

A continuación se presenta una sección que incluye como antecedentes generales de esta tesis una breve revisión de las características de los miembros que integran a la familia proteica de la PRL, sus receptores, mecanismo de transducción y sus sitios de síntesis y secreción. Posteriormente se describen como antecedentes inmediatos los hallazgos sobre las PRLs neurohipofisarias que dieron lugar a esta tesis.



## Antecedentes generales:

### a. Prolactina.

La PRL se caracteriza por involucrarse en la regulación de una gran cantidad de eventos fisiológicos. Es tan versátil que sus acciones incluyen más de 80 efectos conocidos que van desde la regulación de la secreción de la leche durante la lactancia, que es su función más conocida, hasta el desencadenamiento de procesos como son la respuesta inmune y la generación de patologías como el propio cáncer<sup>14-15</sup> (Figura 2).

El hecho de que la PRL promueva respuestas tan diversas se ha tratado de explicar en función de los diferentes mecanismos que generan la diversidad en la mediación de efectos hormonales y que anteriormente fueron enunciados<sup>3,14-17</sup>. Por ejemplo, se sabe que esta hormona en realidad existe como una familia de variantes moleculares y se ha propuesto que cada una de ellas podría promover efectos específicos<sup>15-16</sup>.

Las variantes de la PRL, en la mayoría de los casos descritos, son producto de modificaciones postraduccionales de la forma molecular predominante<sup>15-16</sup>. Esta variante predominante, para el caso de la rata, tiene una secuencia primaria constituida por 198 aminoácidos (Figura 3), y un peso molecular de 23kDa, razón por la

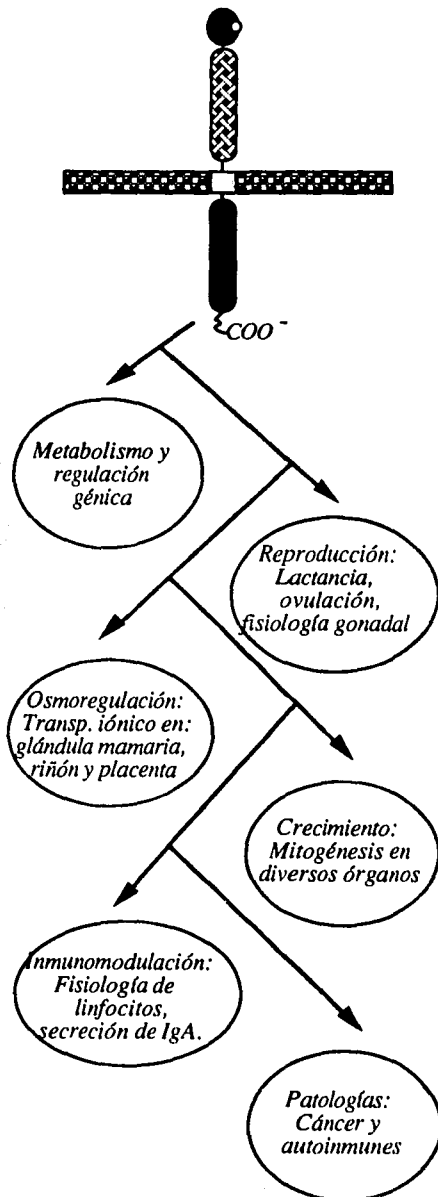
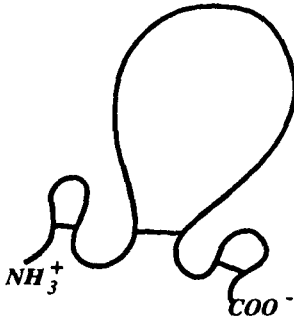


Figura 2. Eventos desencadenados por la prolactina (PRL) al interactuar con su receptor.



**Figura 3.** Estructura de la prolactina de rata. La estructura terciaria de la hormona se estabiliza por la formación de tres puentes disulfuro. Como consecuencia se crean tres asas de diferente longitud. Las más pequeñas se ubican hacia las regiones amino y carboxilo terminal. El asa mayor se ubica en la región central de la molécula.

cual se ha denominado genéricamente como PRL 23K<sup>2,14-16</sup> (Figura 3).

La PRL 23K está sujeta a modificaciones postraduccionales, tales como: fosforilación, desamidación, glicosilación, y proteólisis<sup>15,16</sup>. Por tanto, las variantes moleculares de la PRL, incluyen formas fosforiladas<sup>18-20</sup>, cortadas<sup>21-23</sup>, glicosiladas<sup>16,24</sup>, desamidadas<sup>16</sup> y agregados moleculares que a su vez comprenden dímeros y oligómeros<sup>17,25</sup>. Potencialmente todas estas variantes podrían involucrarse en la modulación de diferentes eventos fisiológicos<sup>15,16</sup>. Para abordar este problema fue requisito indispensable el diseño de bioensayos que pudiesen medir las acciones de cada variante y con ello caracterizarlas biológicamente.

Los ensayos para medir la bioactividad de hormonas "tipo" PRL o

lactogénicas son diversos. Uno de los que primero se utilizaron fue la estimulación del crecimiento y de la actividad secretora de glándulas mamarias poco desarrolladas in vivo e in vitro<sup>15,16,26-28</sup>. Este modelo dió lugar al diseño de bioensayos in vitro más sensibles, basados en la estimulación de la proliferación de células de los epitelios mamarios en cultivo y de su actividad secretora determinada mediante la síntesis de novo de proteínas específicas de la leche, como la caseína<sup>26,27</sup>.

Otro bioensayo, clásico basado en la medición de la actividad mitogénica de la PRL es el que utiliza al buche del pichón. En las aves de la familia Columidae, el epitelio que reviste al buche o saco esofágico, prolifera de forma específica en respuesta a la PRL<sup>28</sup>. Por lo tanto la administración local de PRL en el buche del pichón in vivo es seguida en un aumento en el número celular y peso de este tejido<sup>28</sup>.

Sin embargo, todos estos métodos presentan una gran desventaja: son poco sensibles. Se necesitan niveles hormonales altos (nM-µM), para desencadenar un efecto medible, lo cual constituye un obstáculo importante para valorar la actividad biológica de las variantes moleculares de la PRL presentes en concentraciones endógenas bajas (pM-nM). No fue sino hasta la década de los ochentas cuando Tanaka y colaboradores desarrollaron el bioensayo basado en la estimulación de la

mitogénesis de las células Nb2<sup>29,30</sup>. Estas células se derivan de un linfoma murino generado a partir de linfocitos T en la rata, y poseen la peculiaridad de depender de PRL para proliferar<sup>29,30</sup>. Además de ser un bioensayo específico para PRL, posee una sensibilidad capaz de detectar concentraciones hormonales endógenas con una sensibilidad comparable a la del radioinmunoensayo (pM-nM)<sup>29,32</sup>.

Utilizando uno u otro de estos bioensayos se ha establecido que algunas variantes de la hormona podrían ser capaces de ejercer efectos semejantes a los producidos por la forma monomérica de 23kDa. Por ejemplo, la modificación proteolítica de la PRL 23K por proteasas ácidas de la familia de la catepsina produce un corte en el asa de mayor tamaño a nivel de los aminoácidos Y-144 y L-145, esto genera a la variante conocida como PRL cortada (PRLc)<sup>22,33,34</sup>. La PRLc comparte efectos de la PRL 23K, como son la estimulación de la proliferación de las células Nb2 y la síntesis de caseína por el epitelio mamario en cultivo<sup>15,16,26,28</sup>.

Más importante sin embargo, se observó que la PRLc, además de desencadenar los eventos mencionados, posee efectos nuevos que no son compartidos con la PRL 23K íntegra. Así, a diferencia de la PRL 23K, la PRLc, es capaz de estimular la proliferación de los gonadotropos y tirotropos hipofisarios, i.e; tipos

celulares que se encargan de sintetizar a las gonadotropinas (hormona luteinizante, la hormona estimulante del folículo, y a la hormona estimulante de la tiroides)<sup>2,35,36</sup>. Por tanto, se ha propuesto que la variante cortada de la PRL podría representar un factor parácrino regulador del crecimiento en la adenohipófisis. Dado que la hormona íntegra no ejerce efectos parácrinos, es posible especular sobre la posibilidad de que dichos efectos resulten de la activación de receptores específicos para la PRLc<sup>36</sup>.

Otro ejemplo interesante en el cual se pone a prueba el significado funcional de las variantes de la prolactina para ejercer diferentes acciones lo constituye sin duda alguna el fragmento aminoterminal de 16kDa de la PRL conocido como PRL 16K<sup>22,23,34</sup>.

## **b. Prolactina 16K.**

La PRL 16K resulta de la reducción del puente disulfuro intermedio de la PRLc<sup>22,23,34</sup>. La PRL 16K también ejerce, aunque con menor potencia, muchos de los efectos de la PRL 23K como son la estimulación de la proliferación de los epitelios mamario<sup>26</sup>, y del buche del pichón así como la estimulación de la mitogénesis de las células Nb2<sup>26,27</sup>. Si bien sobre el epitelio mamario su potencia mitogénica es similar a la de la PRL 23K, sobre los

otros dos bioensayos su potencia es menor<sup>27</sup>.

Por otra parte, se ha observado que la unión de la PRL 16K a los receptores de la PRL difiere entre los diferentes órganos blanco<sup>37</sup>. Por ejemplo la afinidad de dicha unión con respecto a la observada para la PRL 23K es menor en el hígado, similar en el cerebro y mayor en el riñón<sup>37</sup>. Este hecho sugiere la posibilidad de que la PRL 16K fuese el ligando natural de los receptores renales y mediar en este tejido los efectos de la PRL<sup>37,38</sup>.

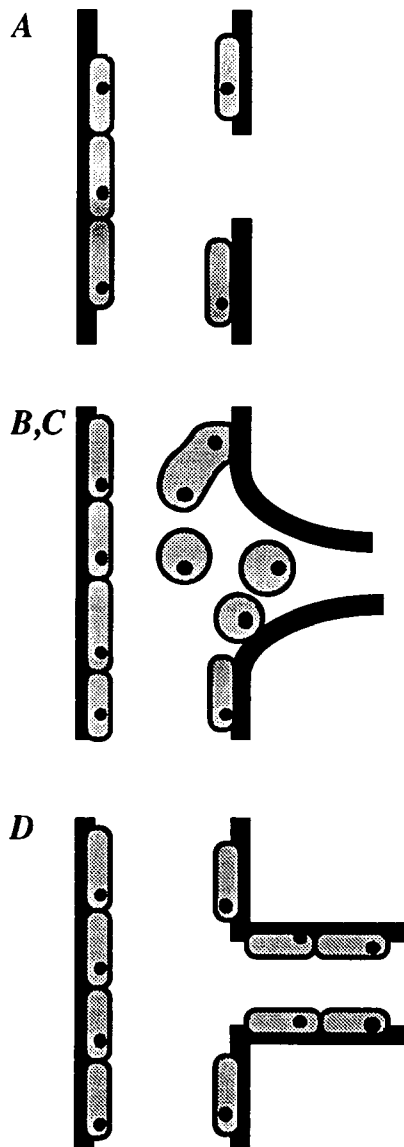
Más significativo es aún el hecho de que se han identificado sitios de unión específicos, saturables y de alta afinidad para la PRL 16K, en membranas aisladas de dichos órganos (cerebro, hígado y riñón). Este hallazgo sugiere su posible identidad de receptores y por tanto, la existencia de funciones propias para la PRL 16K<sup>37,38</sup>.

Recientemente Clapp y colaboradores, mostraron que la PRL 16K, más no la PRL 23K, inhibe la formación de capilares sanguíneos o angiogénesis<sup>39,40</sup>.

### c. Efectos antiangiogénicos de la PRL 16K.

#### c.1. Angiogénesis.

La formación de un nuevo vaso capilar es compleja, ya que demanda la



**Figura 4.** Angiogénesis. En la figura se muestran las fases fundamentales del proceso angiogénico. (a) degradación de la membrana basal, (b) proliferación, (c) migración y (d) diferenciación.

regulación de cuatro fases secuenciales 41-45 (Figura 4):

- a) La degradación de la membrana basal que recubre al capilar;
- b) la proliferación de las células endoteliales ;
- c) la migración y asociación de las células endoteliales en estructuras tubulares; y ,
- d) la diferenciación final del endotelio capilar mediante la producción de una nueva membrana basal.

La degradación de la membrana basal ocurre gracias a la síntesis de proteasas específicas por parte de las propias células endoteliales<sup>40-45</sup>. Una vez que dicha membrana se ha eliminado, las células endoteliales producen y secretan factores angiogénicos que favorecen su propia proliferación, migración y asociación. Estos pertenecen a la familia de los factores de crecimiento<sup>41-43</sup>. Uno de los factores proliferativos más importantes para estas células, descubierto por Hoffman y Gospodarowicz es el bFGF o factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos<sup>46,47</sup>. Existen otra serie de factores que también son capaces de promover la angiogénesis, tal es el caso de la angiogenina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de

crecimiento endotelial vascular entre otros<sup>46,47</sup>.

Sin embargo también existe una regulación negativa del fenómeno angiogénico promovido en muchos casos por factores de tipo peptídico como son el factor natriurético atrial, la trombospondina, el factor antiangiogénico derivado del cartilago y la recientemente descrita PRL 16K<sup>39,40,48-55</sup>.

### c.2. Efectos antiangiogénicos de la PRL 16K.

Las acciones antiangiogénicas de la PRL 16K son de particular interés para nuestro grupo de investigación, debido, entre otros factores, a que dichos efectos antiangiogénicos sugieren que esta variante de PRL podría constituir una nueva hormona involucrada en la regulación de nuevas funciones.

El efecto antiangiogénico de esta variante se ha reportado tanto in vivo como in vitro. En el primer caso la PRL 16K es capaz de abatir la proliferación de células endoteliales de origen bovino y humano estimulada por bFGF<sup>39,40</sup>. El efecto inhibitorio también se presentó sobre la acción proliferativa del factor de crecimiento endotelial vascular<sup>40</sup>. En ambos casos la inhibición de la proliferación fue dependiente de la dosis de PRL 16K y mostró una potencia del orden nM<sup>39,40</sup>. En células endoteliales bovinas cultivadas en matrices de

colágeno la PRL 16K inhibió la asociación celular en estructuras tubulares semejantes a capilares, el efecto sobre la asociación no se debió a un posible efecto tóxico de la PRL 16K hacia las células ya que fue reversible, es decir las células se reasociaban entre sí cuando la PRL 16K era retirada del medio de cultivo<sup>40</sup>.

El efecto antiangiogénico in vivo de la PRL 16K se demostró al inhibir la formación de vasos sanguíneos en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo<sup>40</sup>.

La supresión de la angiogénesis promovida por la PRL 16K no se debe a un antagonismo de la hormona hacia el receptor de bFGF, ya que la PRL 16K no modifica la proliferación de células blanco de este factor como sucede con los fibroblastos<sup>39</sup>. Asimismo, como se menciona más adelante, se ha descrito la existencia de posibles receptores para la PRL 16K en membranas aisladas de células endoteliales<sup>37</sup>.

Dado que la PRL 23K no mostró efectos sobre la angiogénesis los hallazgos indican que sobre el endotelio la forma biológicamente activa es la PRL 16K, y por lo tanto son evidencias en apoyo a que la modificación postraducciona (proteólisis) de la PRL es un mecanismo determinante de su diversidad funcional.

Por otra parte, se ha documentado también la posibilidad de que la heterogeneidad molecular de los

receptores a PRL pudiesen contribuir a explicar la diversidad de sus efectos.

#### **d. Receptores:**

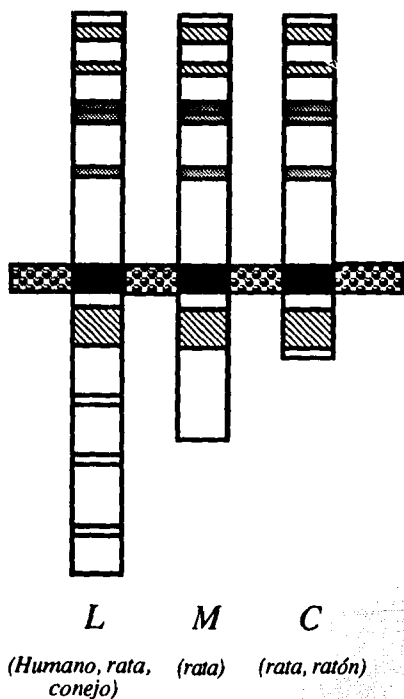
Los receptores de PRL pertenecen genéricamente a la familia de receptores para citocinas en los cuales se incluyen la eritropoyetina, la hormona de crecimiento y las interleucinas<sup>56,57</sup>.

Hasta ahora se sabe que existen tres variantes moleculares de receptores lactogénicos es decir, los responsables de mediar los efectos característicos de la mayoría de las isoformas integrantes de la familia de las PRLs. Adicionalmente se puede incluir a un receptor específico para la variante de PRL 16K que si bien, no se ha caracterizado estructuralmente del todo, no parece pertenecer a esta familia de receptores<sup>37,38</sup>.

Los tres receptores a PRL han sido clonados y se conoce su secuencia primaria y en algunos casos su estructura terciaria<sup>3,37,58,59</sup>. Las tres isoformas son glicoproteínas que están constituidas fundamentalmente por tres dominios estructurales: el extracelular, el transmembranal y el citoplásmico, este último, encargado de llevar a cabo la transducción de la señal hormonal (Figura 5)<sup>3,57-59</sup>.

Los tres receptores se transcriben a partir de un mismo gen y sus diferencias son el resultado del procesamiento alternativo de un transcrito que codifica para una proteína

transmembranal de 592 aminoácidos y un peso molecular estimado de 62 kDa<sup>3,58,59</sup>. El dominio extracelular esta constituido en cada caso por aproximadamente 210 aminoácidos y presenta una elevada homología entre las tres isoformas del receptor<sup>3,58,59</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura de los receptores de PRL. Se comparan los diferentes dominios que componen a cada una de las isoformas (L: forma larga, M: forma mediana, C: forma corta). Los dominios transmembranales se muestran en oscuro. Las regiones rayadas corresponden a sitios con identidad mayor al 68%. Las secciones sombreadas corresponden a sitios con identidad moderada (48-60%).

Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta región y en combinación con estudios de radioreceptor, se ha podido establecer que la homología se comparte también entre los receptores provenientes de especies diferentes<sup>60,61</sup>. El dominio transmembranal del receptor de PRL, también es muy similar para las tres isoformas, y está constituido por 24 aminoácidos<sup>3,58,59</sup> (Figura 5). El dominio citoplásmico a diferencia de los otros dos es altamente variable. Es en éste donde se manifiestan las diferencias que permiten distinguir a cada una de las isoformas<sup>3,57-59</sup>. Estas diferencias se manifiestan fundamentalmente en una extensión variable de dicho dominio citoplásmico que define a los receptores como corto<sup>32,59</sup>, mediano<sup>3,62</sup> y largo<sup>32,58,59</sup> con 33, 42 y 62 kDa de peso molecular respectivamente (Figura 5).

Mediante técnicas de inmunocitoquímica, hibridación in situ y de radioreceptor se ha podido documentar, que la distribución de los receptores corto y largo de la PRL abarca una gran diversidad de tejidos y especies dentro de las cuales se incluyen la rata, el humano y el conejo, entre otras<sup>3</sup>.

Se ha propuesto que cada una de estas variantes del receptor podría participar en la mediación de efectos diferentes. Por ejemplo, la cotransfección de los receptores corto y largo de la PRL en las células COS (derivadas de riñón de

mono) ha mostrado que solamente la forma larga es capaz de inducir la síntesis de novo de la  $\beta$ -lactoglobulina<sup>63</sup>.

A diferencia de los receptores corto y largo, el intermedio se expresa exclusivamente en la rata y específicamente en las células de linfoma Nb2<sup>33</sup>. Por lo tanto, esta isoforma parece promover efectos mitogénicos importantes ya que como se mencionó la PRL estimula la proliferación de estas células con una potencia ubicada en el orden picomolar<sup>33</sup>.

Como antes se señaló, existen evidencias que apoyan la existencia de un receptor que difiere de los anteriormente descritos, ya que es específico para la PRL 16K<sup>37,38</sup>. Estas evidencias son hasta ahora en su mayoría de origen cinético. Estudios de unión con [<sup>125</sup>I]-PRL 16K muestran la presencia de sitios de unión específicos, saturables y de alta afinidad en membranas aisladas de células endoteliales<sup>37,38</sup>. Estos se han propuesto como los receptores mediadores del efecto antiangiogénico de la variante<sup>37,38</sup>. La especificidad del receptor por la PRL 16K es alta, debido a que diferentes factores lactogénicos, que incluyen a la hormona de crecimiento humana (GHh) o la misma PRL 23K y factores de crecimiento como el bFGF no compiten por su unión<sup>37,38</sup>.

Estudios de entrecruzamiento con membranas provenientes de células endoteliales, han mostrado la existencia de al menos dos proteínas que reconocen

a la hormona<sup>38</sup>. Estas tienen pesos moleculares aparentes de 36 y 17 kDa, por lo que podrían corresponder a dominios diferentes del mismo receptor. Esta conclusión se basa en que el análisis tipo scatchard reveló un único sitio de unión para la PRL 16K en membranas de células endoteliales<sup>38</sup>.

Como se mencionó anteriormente además del endotelio, estudios de radioreceptor han mostrado que existen otros órganos que expresan sitios de unión para la PRL 16K. Sin embargo se desconoce si éstos se ubican en el parénquima de los órganos utilizados, o en el endotelio de los mismos<sup>37,38</sup>.

#### **e. Sistemas de transducción de señal asociados con el receptor de PRL.**

De acuerdo en lo expresado en las secciones precedentes, la interacción diferencial de las variantes moleculares de la PRL y/o la estructura diferente de sus receptores se traducirían en la activación de cascadas de señalización diversas, siendo estas determinantes finales de la diversidad funcional de esta hormona.

La disección del mecanismo de transducción desencadenado por los receptores "lactogénicos" o de PRL no ha sido fácil. Los primeros estudios que se realizaron sobre este tema eran controversiales debido a que aparentemente el receptor era capaz de comprometerse con casi todos los

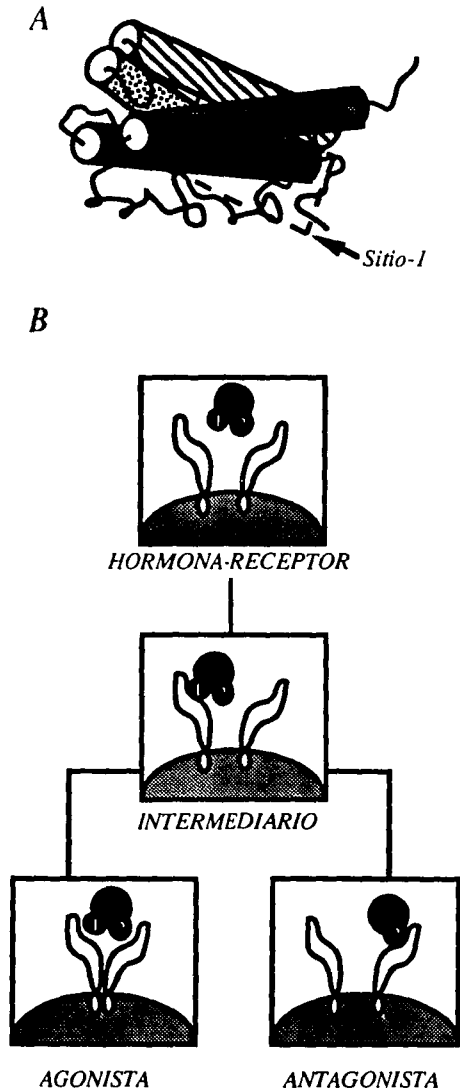


sistemas de señalización que se conocían hasta ese entonces y el conjunto de todos ellos no explicaba satisfactoriamente la mediación de sus efectos<sup>64</sup>. De tal forma se había observado por ejemplo, que el receptor de PRL se asociaba al recambio de fosfoinosítidos/calcio y a la activación de la adenilato ciclasa con la subsecuente generación de los segundos mensajeros: inositol 3,4,5-trifosfato, diacil-glicerol y AMPc respectivamente<sup>3,65,66</sup>.

No es sino hasta que surge la posibilidad de reconstituir a los sistemas de transducción, de clonar y sobreexpresar a las diferentes isoformas del receptor cuando se tuvieron resultados consistentes que fueron desentrañando la hasta entonces oscura señalización relacionada con el receptor de PRL.

La señalización desencadenada por el receptor de PRL es peculiar, ya que se demanda la formación de un complejo dimérico entre los receptores y el ligando<sup>67,68</sup>. Esto implica el reconocimiento de dos sitios de unión en la hormona, donde cada uno de ellos participa en la generación de un complejo PRL-R<sub>2</sub><sup>67,68</sup>. Estudios de cristalografía y mutagénesis dirigida han revelado que el sitio-1 de unión involucra a los aminoácidos que constituyen porciones de las  $\alpha$ -hélices 1 y 4 de la molécula, y el sitio-2 contenido en las  $\alpha$ -hélices 1 y 3 respectivamente (Figura 6A y B)<sup>67,68</sup>.

La génesis del dímero es

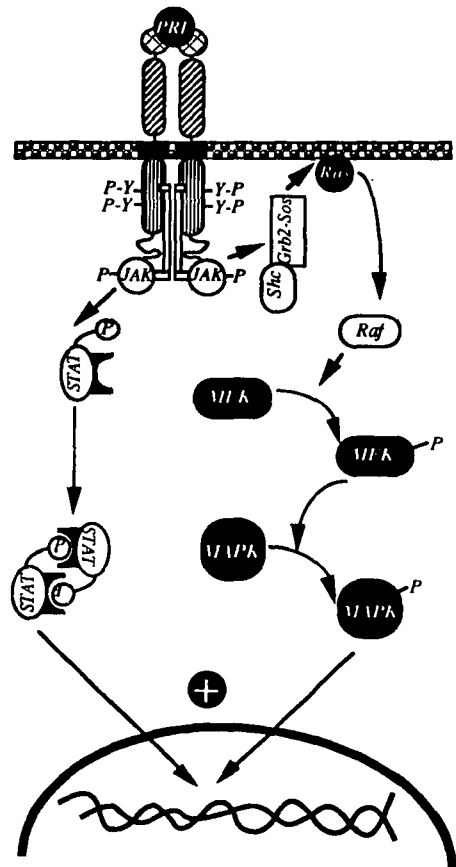


**Figura 6.** A. Estructura terciaria de la PRL. La molécula se constituye de 4  $\alpha$ -hélices unidas por asas de diferentes tamaños. Se muestra el sitio-1 de reconocimiento por el receptor. B. Formación secuencial del dímero PRL-R<sub>2</sub>. La dimerización permite la transducción de la señal hormonal, mientras que el secuestro de alguno de los dos receptores que reconocen a la hormona producen a un antagonista.

secuencial, ya que primero debe reconocerse al primer sitio de unión de la molécula (sitio-1), para que posteriormente se reconozca el segundo sitio (sitio-2)<sup>67</sup> (Figura 6B). El apoyo más contundente a esta proposición se obtuvo mediante la cristalografía del complejo hormona-R<sub>2</sub> y la demostración de que el bloqueo de la dimerización interfiere con los efectos biológicos de la hormona<sup>60,61,69</sup>.

La disección de la señalización inducida por PRL fue impulsada notablemente por los hallazgos sobre el mecanismo de acción de citocinas, como el interferón- $\gamma$ , y de la hormona de crecimiento, cuyos receptores pertenecen a la misma familia que los de la PRL<sup>70</sup>. Así se ha demostrado que como ocurre para dichas moléculas bioactivas, el mecanismo de acción de la PRL involucra la activación de la familia de tirosininas denominada como Janus (JAK)<sup>71-75</sup>. La interacción de la PRL con su receptor incrementa la afinidad de su dominio citoplásmico por la isoforma JAK-2 y permite la formación de un pentámero activo PRL-R<sub>2</sub>-(JAK-2)<sub>2</sub><sup>57,73,76</sup>(Figura 7).

El sustrato de JAK-2 lo constituyen una serie de proteínas citoplásmicas y nucleares denominadas STATs (transductores de señal y activadores de la transcripción)<sup>71</sup>. Al igual que las JAKs, estas proteínas son parte de una familia extensa en constante expansión<sup>71</sup>. La fosforilación de STAT



**Figura 7.** Mecanismo de transducción asociado al receptor de PRL. En primer lugar la hormona forma un pentámero PRL-R<sub>2</sub>-JAK<sub>2</sub><sub>2</sub>. Este pentámero activo se autofosforila en residuos de tirosina para ser completamente activo. Posteriormente el blanco inmediato es la MGF-STAT-5. Esta modifica directamente la transcripción de genes nucleares como c-fos. El pentámero PRL-R<sub>2</sub>-JAK<sub>2</sub><sub>2</sub> también puede regular la actividad de otras proteínas como Ras y Raf las cuales a su vez activan a MAPK. MAPK una vez fosforilada y activa puede regular eventos citoplásmicos y nucleares.

en residuos de tirosina les permite unirse al DNA celular en donde funcionan como factores de transcripción. Hasta ahora se sabe que en respuesta a la PRL ocurre la activación de STAT-5 la cual también se conoce como el factor de transcripción de la glándula mamaria (MGF-STAT-5)<sup>78,79</sup>.

La activación de JAK-2 se ha asociado también con la mediación de los efectos proliferativos de la PRL. Así de manera semejante a lo que ocurre con las interleucinas y la hormona de crecimiento se ha propuesto que la activación de JAK-2 podría mediante la activación de Ras y Raf culminar con la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos o MAPKs y la consecuente activación de la transcripción y progresión del ciclo celular<sup>80</sup>. Existen asimismo evidencias que sugieren la participación de cinasas de la familia src en la activación de las cinasas MAPK por el receptor de PRL (Figura 7)<sup>81-84</sup>.

Si bien hasta ahora se ha obtenido una gran cantidad de información acerca de la señalización intracelular que desencadena la activación del receptor de PRL, es poco lo que se sabe acerca de la transducción mediada por el receptor de la variante de 16kDa. D'Angelo y colaboradores han reportado recientemente que la interacción de la PRL 16K con su receptor inhibe la fosforilación y la consecuente activación de la MAPK en respuesta a el factor de crecimiento vascular endotelial y que

dicho evento es distal a la fosforilación del receptor a este factor de crecimiento presente en las células endoteliales<sup>85</sup>.

En conclusión la información anteriormente descrita fundamenta las hipótesis propuestas para explicar la versatilidad funcional de la PRL. A través de los ejemplos en donde se ilustra que variantes moleculares de dicha hormona son capaces de activar receptores propios con funciones nuevas, se documenta la siguiente hipótesis: la PRL es una molécula madre donde el procesamiento postraduccionnal de ésta es fuente directa de su diversidad funcional.

De acuerdo a estas consideraciones los mecanismos responsables del procesamiento postraduccionnal de la PRL desempeñarían un papel determinante sobre su efecto hormonal. La heterogeneidad molecular de la PRL ha sido reportada en todas las fuentes endógenas de su producción.

## **f. Fuentes de producción de prolactinas:**

### **f.1. Adenohipófisis.**

Desde hace mucho tiempo se sabe que la fuente principal de síntesis y secreción de la PRL circulante es la adenohipófisis<sup>2,16,86</sup>. Las células adenohipofisarias encargadas de sintetizar y secretar PRL se han

denominado lactotopos. Este tipo celular puede constituir del 30 al 50% del total de las células que integran la adenohipófisis<sup>87,88</sup>.

La PRL adenohipofisaria es molecularmente heterogénea, a ella corresponden la mayor parte de las variantes que integran a la familia de la PRL. Por ejemplo, las PRLs adenohipofisarias incluyen a variantes fosforiladas, desamidadas, agregados de alto peso molecular, fragmentos y variantes glicosiladas, entre otras. Sin embargo el significado funcional de las mismas no se sabe con exactitud, a excepción de las variantes de PRLc y la PRL 16K que como se ha enunciado anteriormente es en donde se tiene mayor información<sup>88,89</sup>. El análisis por electroforesis-transferencia e inmunotinción de homogenados tisulares ha revelado la existencia de las PRLs cortada y 16K en la adenohipófisis de la rata<sup>89</sup>. Asimismo en el medio de incubación de células adenohipofisarias en cultivo se ha detectado a la variante cortada, este hallazgo se refuerza con el hecho de que la adenohipófisis también contiene a las enzimas capaces de generar a dicha variante<sup>33,90</sup>.

Aunque la adenohipófisis es el sitio de producción principal de PRL, también se han descrito fuentes productoras de PRL dentro del sistema inmune y el cerebro. Es decir, la PRL se produce por los tres componentes del gran sistema de integración funcional del

organismo: el sistema Neuroendócrino-inmune.

### **f.2. Sistema inmune.**

En épocas recientes se ha documentado ampliamente el que el sistema inmune además de ser blanco de la PRL es un tejido productor de esta familia hormonal<sup>91-94</sup>. Se sabe que los linfocitos, esplenocitos y timocitos producen a la PRL 23K y a variantes de alto peso molecular que incluyen a PRLs de 46, 29, y 27kDa<sup>91-94</sup>. También se ha demostrado que estos tipos celulares expresan el ARNm que codifica para la PRL 23K, y otro mensajero de mayor tamaño documentado exclusivamente en esplenocitos y timocitos de ratón. Se ha propuesto que la PRL producida por las células inmunes es necesaria para la progresión de su ciclo celular, aunque, la hormona por si sola no es capaz de ejercer este efecto<sup>91-94</sup>. A diferencia de los linfocitos normales en la línea tumoral Nb2, la PRL y demás factores lactogénicos son los únicos factores que por si solos pueden estimular su proliferación, promoviendo la transición de las fases G1 a S del ciclo celular<sup>91-94</sup>.

### **f.3. Sistema nervioso central.**

Desde hace varios años evidencias basadas en inmunocitoquímica, radioinmunoanálisis y bioensayos específicos han sustentado la producción

de PRL por el sistema nervioso central<sup>95-97</sup>.

En el cerebro material inmunorreactivo tipo PRL ha sido consistentemente detectado en neuronas y tractos nerviosos hipotalámicos, mediante técnicas de inmunocitoquímica<sup>95-97</sup>. El análisis cromatográfico y electroforético ha identificado material inmunorreactivo tipo PRL en homogenados de la médula espinal, el tallo cerebral y el hipotálamo, así como en el líquido cefalorraquídeo de la rata<sup>22, 23, 97, 99-101</sup>. Se ha demostrado que el material inmunorreactivo a la PRL obtenido después del fraccionamiento cromatográfico de distintas áreas cerebrales posee efectos mitogénicos sobre las células Nb2, aunque con una potencia menor que las de la PRL adenohipofisaria<sup>102, 103</sup>.

Diversas evidencias sugieren que el cerebro, en especial el hipotálamo, pudiera ser capaz de producir algunas de las variantes de la PRL. Emanuele y colaboradores reportaron la presencia de tres fracciones cromatográficas con inmunoreactividad de PRL en extractos de médula espinal, tallo cerebral y encéfalo<sup>102, 103</sup>. Dos de estas fracciones mostraron un peso molecular aproximado de 44 y 23kDa, mientras que la fracción restante se constituyó por fragmentos de menor tamaño que no fueron identificados<sup>102, 103</sup>. DeVito ha documentado la presencia de PRL cortada en el hipotálamo de rata, y la capacidad

del hipotálamo para modificar proteolíticamente a la PRL 23K hacia dicha variante hormonal<sup>100</sup>.

La producción de PRLs por el sistema nervioso central y su origen independiente de la adenohipófisis se apoya en las siguientes observaciones:

a) La presencia del RNA mensajero que codifica para la PRL en distintas regiones del sistema nervioso central<sup>104-106</sup>, y;

b) la prevalencia del material inmunorreactivo a PRL en el cerebro de animales hipofisectomizados en los que no se detecta PRL en el suero por métodos inmunoquímicos convencionales<sup>95, 96</sup>.

## Antecedentes inmediatos:

### a. Fragmentos de PRL en el sistema hipotálamoneurohipofisario.

Estudios recientes en nuestro laboratorio han documentado la existencia de posibles fragmentos moleculares de la PRL en el sistema hipotálamo neurohipofisario (SHN)<sup>107</sup>. El SHN está constituido por neuronas localizadas en dos núcleos del hipotálamo anterior conocidos como supraóptico (SO) y paraventricular (PV)<sup>108-110</sup>. Estas neuronas se caracterizan por ser de mayor tamaño (>20 $\mu$ ) que las del resto del hipotálamo razón por la cual se denominan como magnocelulares<sup>108-110</sup>. Estas neuronas se especializan en producir un gran número de péptidos bioactivos, de los cuales predominan las hormonas vasopresina y ocitocina. Las neuronas de los núcleos PV y SO emiten proyecciones nerviosas que pasan a través de la lámina interna de la eminencia media hasta formar la neurohipófisis. En la neurohipófisis las terminales nerviosas de estas neuronas desembocan en numerosos vasos capilares sanguíneos donde las hormonas y péptidos neurohipofisarios son vertidos hacia la circulación<sup>108-110</sup> (Figura 8).

El hallazgo de que el SHN podría expresar miembros de la familia de las PRLs surgió de nuestro interés en investigar la presencia endógena de la

PRL 16K. Si bien se sabe que la PRL 16K inhibe eventos tan complejos como la angiogénesis, no se habla documentado su presencia endógena de manera contundente<sup>37,38</sup>. Esto en gran medida era reflejo de la carencia de herramientas adecuadas como son anticuerpos específicos dirigidos contra esta variante necesarios para su estudio y caracterización selectiva. Por consiguiente nuestro grupo de trabajo generó un antisuero dirigido contra la PRL 16K producida mediante la proteólisis de la PRL. Para caracterizar dicho antisuero se emplearon inmunoensayos específicos<sup>107</sup>.

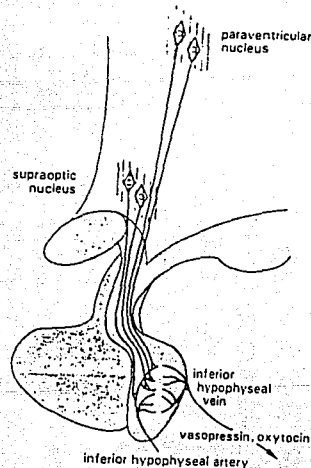


Figura 8. Representación esquemática del sistema hipotálamoneurohipofisario. En la figura se muestran las conexiones neurales de las células hipotálamicas magnocelulares y el lóbulo posterior de la pituitaria o neurohipófisis.

En el RIE para PRL 16K los anticuerpos generados mostraron una afinidad mayor (200 veces) para unirse a

la PRL 16K que a la PRL 23K, al tiempo que no reconocieron moléculas homólogas como por ejemplo a la GH<sup>107</sup>. Por otra parte el antisuero dirigido contra la PRL 16K en combinación con técnicas de inmunocitoquímica marcó positivamente a los lactotrofos adenohipofisarios como se esperaba. Sin embargo para nuestra sorpresa el antisuero también mostró inmunorreactividad de PRL en la neurohipófisis. Este hallazgo fue novedoso porque nunca antes se había mostrado la presencia de PRL en la neurohipófisis<sup>107</sup>. En apoyo a que dicha inmunotinción se asociaba con antígenos tipo PRL, observamos su bloqueo cuando el antisuero previamente se preabsorbía con PRLs 16K, y 23K más no con péptidos característicos de este sistema como son la ocitocina, vasopresina, neurofisinas-1 y 2 entre otras<sup>107</sup>.

En franca correspondencia con los resultados anteriores se identificó la presencia de antígenos tipo PRL en los somas de las neuronas magnocelulares de los núcleos PV y SO del hipotálamo y en sus proyecciones vía la lámina interna de la eminencia media hacia la neurohipófisis<sup>107</sup>.

El análisis por electroforesis e inmunotransferencia de homogenados de neurohipófisis determinó que los antígenos tipo PRL se asociaban con proteínas inmunorreactivas con pesos moleculares aparentes de 14, 23 y 25kDa,

siendo la primera de ellas la proteína inmunorreactiva predominante<sup>107</sup>.

En apoyo a que los antígenos observados en el SHN pertenecían a la familia de las PRLs, en estudios de retrotranscripción y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) del ARN total proveniente de núcleos PV aislados observamos la presencia del ARN mensajero para PRL en este sistema. El tamaño del transcrito correspondió al del que codifica para la PRL 23K por lo que se propuso que las otras variantes inmunorreactivas pudiesen ser el resultado de un procesamiento postraduccional de la PRL 23K, tal como ocurre para su generación en la mayoría de los tejidos productores de esta hormona<sup>107</sup>.

Estos hallazgos nos permitieron proponer la hipótesis de que el sistema hipotálamoneurohipofisario constituye una fuente de producción y secreción de PRLs<sup>107</sup>. Dadas las propiedades neuroendócrinas de dicho sistema las PRLs neurohipofisarias podrían asimismo verterse hacia la circulación con la consecuente posibilidad de ejercer efectos hormonales sobre tejidos distantes.

Cabe mencionar que de acuerdo a nuestros hallazgos en donde se muestra que la proteína inmunorreactiva de 14kDa es el antígeno predominante, el SHN sería el primer sistema productor de PRLs en el cual la forma predominante no fuera la PRL 23K sino un fragmento molecular

de la misma. En particular un fragmento que comparte determinantes antigénicos con la PRL 16K y que pudiese por tanto mediar efectos de ésta, como lo es la inhibición de la angiogénesis.

### **Objetivos.**

*Con el objetivo general de analizar la hipótesis antes enunciada que plantea la posibilidad de que el SHN produzca PRLs biológicamente activas, los objetivos particulares de esta tesis fueron:*

*1. Analizar la naturaleza tipo PRL de las proteínas neurohipofisarias mediante el estudio de sus propiedades biológicas:*

*a. en un bioensayo específico para PRLs: la proliferación de las células Nb2.*

*b. en un bioensayo específico para la PRL 16K: la inhibición de la proliferación de las células endoteliales en cultivo.*

*2. Analizar si la proteína inmunorreactiva de 14kDa pudiese resultar de la proteólisis de la PRL neurohipofisaria por enzimas presentes en el SHN.*



### **Diseño experimental.**

La metodología utilizada para este estudio se describe detalladamente en las publicaciones anexas por lo que en esta sección solamente se hace referencia de manera general a los procedimientos empleados.

Para obtener a las proteínas inmunorreactivas de 14 y 23kDa se recurrió a la obtención de un medio condicionado por la incubación de neurohipófisis en cultivo debido a que dicho medio se encontraba enriquecido con las proteínas inmunorreactivas de 14 y 23kDa, y se encontraba exento de muchas de las proteínas presentes en un homogenado neurohipofisiario. Para ello hipófisis de ratas macho se disecaron bajo el microscopio, se lavaron con una disolución de Krebs-Ringer deficiente de calcio, para posteriormente ser cultivadas durante 1h en solución Krebs-Ringer completa<sup>108</sup>. El medio condicionado resultante se centrifugó y almacenó a -70°C.

La concentración de cada una de las proteínas inmunorreactivas contenidas en el medio condicionado se estimó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes seguida de inmunotransferencia e inmunotinción (análisis tipo western) usando un antisuero específico dirigido contra la PRL 16K, calibrado contra una curva estándar de PRL de rata procesada simultáneamente<sup>108</sup>.

La bioactividad tipo PRL presente en el medio condicionado se analizó mediante el bioensayo de células Nb2 (donación del Dr. Peter Gout, Cancer Control Agency of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada) de acuerdo al método descrito<sup>107,108</sup>. La potencia del medio condicionado para inducir la proliferación de estas células se comparó con la obtenida en respuesta a las preparaciones de referencia de PRL 23K (PRL de rata grado biológico, Institutos Nacionales de Salud U.S.A.) y PRL 16K respectivamente, esta última variante generada en el laboratorio mediante proteólisis de la PRL 23K tal como se ha descrito anteriormente<sup>107</sup>.

La especificidad del efecto del medio condicionado por neurohipófisis en cultivo se determinó mediante el bloqueo del mismo por la coincubación con los antisueros específicos dirigidos contra la PRL 23K o 16K.

Para analizar la posible actividad antiangiogénica de las PRLs neurohipofisarias probamos los efectos del MCNH sobre la proliferación estimulada por bFGF de las células endoteliales en cultivo<sup>107</sup>. Este bioensayo es específico para medir actividad tipo PRL 16K ya que como se ha descrito la PRL 23K no tiene efectos sobre este sistema<sup>37,38</sup>.

Asimismo, la potencia del efecto antiangiogénico del medio condicionado se comparó con la de la preparación referencia de PRL 16K de rata y la

*especificidad del efecto del medio condicionado se determinó mediante el uso de antiseros específicos dirigidos contra la PRL 16 y 23K<sup>108</sup>.*

*Finalmente para determinar el posible procesamiento postraducciona de la PRL neurohipofisaria, se analizó la presencia de las enzimas capaces de producir a la variante cortada de la PRL en la fracción subcelular de 25,000 x g proveniente de núcleos paraventriculares aislados y neurohipófisis de rata. La obtención de dichas fracciones se realizó mediante el método descrito<sup>107</sup> y su actividad enzimática se analizó utilizando como sustrato a la preparación de referencia de PRL 23K y el método previamente establecido<sup>107</sup>.*

### **Publicaciones:**

Los resultados generados durante el desarrollo de esta tesis se publicaron en dos artículos que se presentan a continuación.

El primero de ellos ( Trabajo A) se publicó en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1994) **91**: 10384-10388 y se titula:

***The prolactin gene is expressed in the hypothalamicneurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin.***

Por los autores:

Carmen Clapp., Luz Torner., Gabriel Gutiérrez-Ospina., Eva Alcántara., **Francisco J. López-Gómez.**, Makoto Nagano., Paul A. Kelly., Salvador Mejía., Miguel Morales y Gonzalo Martínez de la Escalera.

En este trabajo se presentan los hallazgos que fueron el antecedente directo de este trabajo de tesis, así como algunos resultados que se obtuvieron del trabajo de la misma. Específicamente se aportan evidencias de tipo inmunocitoquímico sobre la presencia de neuronas inmunorreactivas a PRL 16K en el sistema hipotálamo neurohipofisario de la rata. Se muestra la detección de PRLs inmunorreactivas de 25, 23 y 14kDa en

extractos neurohipofisarios y en el medio condicionado por neurohipófisis en cultivo, y se reporta la expresión del gen de la PRL en el SHN de la rata por análisis de RT-PCR. La aportación a este trabajo resultado de esta tesis, consiste en la demostración de que el medio condicionado enriquecido con la proteína inmunorreactiva de 14kDa inhibe la proliferación de las células endoteliales en cultivo, y que este efecto es bloqueado por el antisuero dirigido contra la PRL 16K. Asimismo en este trabajo se demuestra la presencia de las enzimas capaces de procesar a la PRL 23K en la variante cortada, y se propone que dicha variante pudiese corresponder a la proteína inmunorreactiva de 25kDa y constituir el posible precursor de la proteína inmunorreactiva de 14kDa o PRL 14K.

El segundo trabajo (Trabajo B) se publicó en la revista *Endocrine* (1995) **3**: 573-578 y se titula:

***Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin.***

Por los autores:

**F.J. López-Gómez.**, L. Torner., S. Mejía., G., Martínez de la Escalera y C. Clapp.

*Este trabajo toma como base el anterior, y se enfocó fundamentalmente en caracterizar las propiedades biológicas de los antígenos de 14 y 23kDa presentes en el eje hipotálamo-neurohipofisario de la rata, mediante ensayos de proliferación específicos tanto para la PRL 16K como para la PRL 23K.*

*Además se documenta la inmunorreactividad tipo PRL de las proteínas presentes en el medio condicionado neurohipofisario utilizando diferentes antisueros específicos tanto para la PRL 16K como para la PRL 23K.*

## The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin

CARMEN CLAPP<sup>†</sup>, LUZ TORNER\*, GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA\*, EVA ALCÁNTARA\*, FRANCISCO J. LÓPEZ-GÓMEZ\*, MAKOTO NAGANO<sup>‡</sup>, PAUL A. KELLY<sup>‡</sup>, SALVADOR MEJÍA\*, MIGUEL A. MORALES\*, AND GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA\*

\*Centro de Neurobiología e Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México; and <sup>†</sup>Unité 344, Endocrinologie Moléculaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Faculté de Médecine Necker, 75730 Paris Cedex 15, France

Communicated by Howard A. Bern, June 27, 1994

**ABSTRACT** The 23-kDa form of prolactin (PRL) has been proposed to function as both a mature hormone and a prohormone precursor for different uniquely bioactive forms of the molecule. We have shown that the 16-kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL) inhibits angiogenesis via a specific receptor. In addition, 16K PRL stimulates natriuresis and diuresis in the rat, and kidney membranes contain high-affinity specific binding sites for this PRL fragment. 16K PRL can be derived from an enzymatically cleaved form of PRL (cleaved PRL). With the use of a specific 16K PRL antiserum, we have localized a 14-kDa immunoreactive protein in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus and in the neurohypophysis. Reverse transcription-polymerase chain reaction of RNA from isolated paraventricular nuclei showed the expression of the full-length PRL mRNA. The neurohypophysis was found to contain the enzymes that produce cleaved PRL, small amounts of PRL, and cleaved PRL. Medium conditioned by neurohypophyseal cultures, enriched with the 14-kDa immunoreactive protein, has antiangiogenic effects that are blocked by the 16K PRL antiserum. These results are consistent with the expression of PRL in the hypothalamic-neurohypophyseal system, and the preferential processing of the protein into a 14-kDa fragment with biological and immunological properties of 16K PRL.

Prolactin (PRL) is a multifunctional protein hormone involved in the control of a wide variety of physiological processes in vertebrates, including osmoregulation, reproduction, immune responses, growth, and development (1, 2). PRL exists in several molecular forms that result from posttranslational modifications of the predominant form, which is a single polypeptide chain with three disulfide loops and a molecular mass of 23 kDa (23K PRL; ref. 3). Molecular heterogeneity of PRL occurs not only in the anterior hypophysis (3) but also in the immune system (4) and the brain (5). These findings have led to the suggestion that PRL can be a prohormone that becomes processed to biologically active peptides capable of mediating unique functions (3).

We have shown that the 16-kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL), while retaining some PRL-like bioactivities (6), has specific effects not shared with the parent PRL molecule. 16K PRL, obtained after the proteolysis of rat PRL with mammary gland enzymes, and recombinant human 16K PRL, but not rat or human PRL, inhibit angiogenesis—i.e., the formation of new capillary blood vessels (7, 8). Furthermore, this antiangiogenic effect appears to be mediated by a unique 16K PRL receptor (9). Besides angiogenesis, other functions appear to be affected by 16K PRL. We have

recently found that 16K PRL, but not PRL, stimulates natriuresis and diuresis in the anesthetized rat (C.C. and W. K. Samson, unpublished observations). Moreover, kidney membranes contain high-affinity specific binding sites for 16K PRL (10). Therefore PRL-derived molecules may be specifically involved in the regulation of angiogenesis, natriuresis, and possibly other functions.

16K PRL can be derived from the reduction of the intermediate disulfide bond that holds together a form of PRL with a cleavage in the large disulfide loop (11). In the rat, the known site of cleavage occurs at Tyr-145, leaving an N-terminal polypeptide with a molecular mass of 16,364 Da (12, 13). Cleaved PRL, the immediate precursor of 16K PRL, has been identified in the anterior pituitary gland and in the circulation (3, 12), and the cleaving enzymes have been found in several target tissues of PRL (3, 5, 11, 14). Detection of endogenous 16K PRL has been limited by its low cross-reactivity with the PRL antibody (6).

Here we report findings consistent with the expression of PRL in the hypothalamic-neurohypophyseal system and its posttranslational processing into a 14-kDa fragment with biological and immunological properties of 16K PRL.

### MATERIALS AND METHODS

**16K PRL.** 16K PRL was isolated after the enzymatic proteolysis of 23K PRL [rat B-6; National Hormone and Pituitary Program (NHPP)] by a particulate fraction from rat mammary gland homogenates, disulfide-bond reduction, and gel filtration as reported (11).

**16K PRL RIA.** An RIA was established, using an antiserum raised in rabbits against the 16K PRL preparation, at a final dilution of 1:20,000. The specificity of the 16K PRL antiserum was tested by competition with 16K PRL and 23K PRL (rat B-6; NHPP). No crossreactivity was observed with rat growth hormone (NHPP), vasopressin, oxytocin, angiotensin II, and neurophysins I and II (Sigma),  $\beta$ -lipotropin (NHPP),  $\beta$ -endorphin (Pierce), [Met]enkephalin (Peninsula Laboratories), and adrenocorticotropin (residues 1–39; Bachem).

**Animals.** Female Wistar rats (200–250 g) were used in the day of estrus, as determined by daily examination of vaginal smears for two or three consecutive cycles.

**Immunocytochemistry.** Rats were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused with phosphate-buffered

Abbreviations: PRL, prolactin; 23K and 16K PRL, 23- and 16-kDa PRL; NHPP, National Hormone and Pituitary Program; bFGF, basic fibroblast growth factor; PVN, paraventricular nucleus; SON, supraoptic nucleus; RT, reverse transcriptase.

<sup>†</sup>To whom reprint requests should be addressed at: Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México DF, México.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

saline (PBS; pH 7.4) for 5 min followed by neutral buffered 4% paraformaldehyde for 45 min. Brain and hypophyses were fixed for 24 h at 4°C, then transferred to 30% (wt/vol) sucrose until they sank. Tissues were sectioned in a cryostat and subjected to immunocytochemistry using the ABC kit from Vector Laboratories. Positive staining with the 16K PRL antiserum was visible in the anterior and neurohypophyses, starting at 1:10,000 and 1:100,000 dilutions, respectively. Most results were obtained with a 1:500 dilution of either anti-16K PRL or anti-PRL (rat S-9; NHPP) antisera.

**Western Blot Analysis.** Neurohypophysal lobes were sonicated [ $1 \text{ mg}/50 \text{ } \mu\text{l}$  of  $0.01 \text{ M}$  Tris-HCl/ $0.14 \text{ M}$  NaCl/ $1\%$  Triton X-100 (pH 8) with aprotinin at  $0.2 \text{ unit}/\text{ml}$  and  $1 \text{ mM}$  phenylmethylsulfonyl fluoride] and subjected to SDS/PAGE (11). Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes, probed with the 16K PRL antiserum (1:500), and developed by using the alkaline phosphatase second antibody kit (Bio-Rad).

**Incubation of Neurohypophyses.** Neurohypophysal lobes were washed in  $\text{Ca}^{2+}$ -deficient Krebs-Ringer solution for 10 min at 37°C and cultured in  $20 \text{ } \mu\text{l}$  of Krebs-Ringer solution for 1 h at 37°C. The resulting conditioned media were pooled and stored at  $-70^\circ\text{C}$ .

**Endothelial Cell Growth Bioassay.** Bovine brain capillary endothelial (BBCE) cells were isolated and grown and the proliferation assay was performed as previously reported (8). The effect of 4 days of incubation with 16K PRL, 23K PRL, or neurohypophysal-conditioned medium was compared with the stimulation induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) ( $50 \text{ pM}$ ; GIBCO/BRL) in the presence or absence of the 16K PRL antiserum (1:1000 dilution).

**RNA Isolation.** Hypothalamic paraventricular nuclei (PVNs) were isolated from frozen brain slices by the micro-punching technique (15). Total RNA was extracted from the PVN, cerebral cortex, and anterior hypophysis according to the guanidinium thiocyanate/phenol procedure (16).

**Primers for PCR and Southern Blot Analysis.** Four different primers specific for rat (r) PRL cDNA were synthesized. Two of them were forward primers: rPRL-A ( $5'$ -TGTTCTGGTGCGACTGCCAGACACCT- $3'$ ) from exon 2 and rPRL-B ( $5'$ -ACTTCTCCCTAGCTACTCTGAAGAC- $3'$ ) from exon 3. The two downstream primers were rPRL-C ( $5'$ -TATCTTTTCGATCCCTCGAGAACCGG- $3'$ ) from exon 4 and rPRL-D ( $5'$ -GCAGTGTGTTTATGGACAATTGGCA- $3'$ ) from exon 5. For the full-length PRL mRNA, the combinations rPRL-A and -C and rPRL-A and -D should generate products of 388 and 586 bp, respectively, whereas rPRL-B and -C and rPRL-B and -D generate products of 220 and 418 bp, respectively. Primers for the amplification of rat cyclophilin were rCyc-1 ( $5'$ -CGACATCACGGCTGATGGCAGGCC- $3'$ ) and rCyc-2 ( $5'$ -TTACAGGGTATTCGGAGCAGATGGGG- $3'$ ).

**Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).** Five micrograms of total RNA was reverse transcribed for 1 h at 37°C in  $30 \text{ } \mu\text{l}$  containing  $20 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 8.3),  $50 \text{ mM}$  KCl,  $2.5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1 \text{ mM}$  each dNTP,  $1 \text{ } \mu\text{g}$  of oligo(dT) primer,  $1 \text{ } \mu\text{g}$  of random primer, 25 units of RNasin (Promega), and 200 units of RT (Moloney murine leukemia virus). After incubation, the RT mixture was heated at  $96^\circ\text{C}$  for 5 min and chilled on ice. Six microliters of the RT reaction mixture was added to the PCR mixture in  $50 \text{ } \mu\text{l}$  containing  $20 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 8.3),  $50 \text{ mM}$  KCl,  $2 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $200 \text{ } \mu\text{M}$  each dNTP,  $50 \text{ pmol}$  of each primer, and 1 unit of *Taq* DNA polymerase. After denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 1 min and 30 sec, amplification was performed for 30 cycles ( $94^\circ\text{C}$  for 30 sec,  $65^\circ\text{C}$  for 1 min, and  $72^\circ\text{C}$  for 1 min and 30 sec), followed by  $72^\circ\text{C}$  for 10 min at the end of the amplification.

**Southern Blot Analysis.** Five to  $10 \text{ } \mu\text{l}$  of the RT-PCR reaction mixture was loaded on a 1.8% agarose gel and blotted onto Zeta-Probe GT membranes (Bio-Rad). Membranes were hybridized with primer rPRL-B at  $42^\circ\text{C}$  for 16 h

in a solution containing  $5 \times \text{SSC}$  ( $1 \times = 150 \text{ mM}$  NaCl/ $15 \text{ mM}$  sodium citrate, pH 7.0),  $0.02 \text{ M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 7% SDS,  $10 \times$  Denhardt's solution, and salmon sperm DNA at  $100 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$ , washed at  $50^\circ\text{C}$ , and exposed to Kodak XAR-5 film at  $-80^\circ\text{C}$ .

**Analysis of PRL-Cleaving Activity.** A  $14,000 \times \text{g}$  particulate fraction from isolated PVN or neurohypophysal lobe homogenates was prepared and incubated with rat PRL (B-6; NHPP) as described (11). The PRL cleavage products were analyzed by Western blots probed with the 16K PRL antiserum.

## RESULTS

**Specificity of the 16K PRL Antiserum.** The 16K PRL antiserum was characterized in a 16K PRL RIA (Fig. 1A). Increasing concentrations of 16K PRL displaced radioiodinated 16K PRL from the 16K PRL antiserum with an  $\text{EC}_{50}$  of  $1/100$  that of 23K PRL ( $0.2$  vs.  $20 \text{ nM}$ , respectively). Western blots probed with the 16K PRL antiserum stained the 23K and 16K PRL standards with similar intensities (Fig. 1B).

**Immunocytochemical Detection of a 16K PRL-Like Antigen in the Hypothalamic-Neurohypophysal System.** Immunocytochemistry performed with the 16K PRL antiserum showed a positive signal throughout the anterior hypophysis (Fig. 2B), indistinguishable from that obtained with the 23K PRL antiserum (Fig. 2A). In the neurohypophysis the 16K PRL antiserum showed positive staining homogeneously distributed throughout the section (Fig. 2B), whereas no positive immunoreaction was observed when the 23K PRL antiserum was used (Fig. 2A). Neither antiserum stained the intermediate hypophysal lobe (Fig. 2A and B). 16K PRL immunostaining was eliminated from both the anterior and neurohypophyses by preabsorption with 16K PRL ( $1 \text{ } \mu\text{M}$ ; Fig. 2C) and 23K PRL ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ; not shown). However, the immunoreaction was not modified by preabsorption with vasopressin ( $200 \text{ } \mu\text{M}$ ), oxytocin ( $200 \text{ } \mu\text{M}$ ), neurophysins I or II ( $20 \text{ } \mu\text{M}$ ; not shown). Cells that corresponded in size to magnocellular neurons were heavily stained with the 16K PRL antiserum in both the hypothalamic PVN and the SON (Fig. 2D and E). Consistent with the location of the immunoreactive perikarya in the above nuclei, nerve fibers were labeled in the internal lamina of the median eminence (Fig. 2F), the pathway of magnocellular neuronal projections from both nuclei towards the neurohypophysis (17).

**Western Blot Detection of 16K PRL-Like Antigens in the Hypothalamic-Neurohypophysal System.** Neurohypophysal extracts and the medium from incubated neurohypophyses were analyzed by Western blots probed with the 16K PRL antiserum (Fig. 3). In neurohypophysal extracts, the immunoreactivity was associated with a predominant protein band with a migration rate corresponding to an apparent molecular mass of  $14 \text{ kDa}$  and with less-abundant proteins with appar-

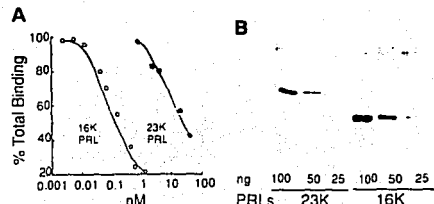


FIG. 1. (A) Displacement of  $^{125}\text{I}$ -16K PRL from the 16K PRL antiserum (1:20,000) by increasing concentrations of 16K and 23K PRL standards. Values are means of triplicate determinations. (B) Different concentrations of the 23K and 16K PRL standards separated by SDS/PAGE, blotted into a nitrocellulose membrane, and probed with the 16K PRL antiserum (1:500).

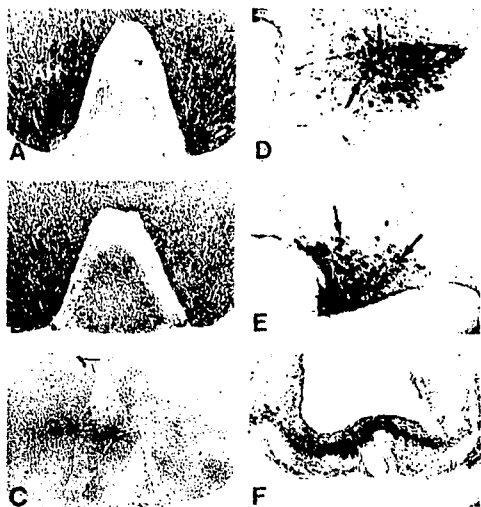


FIG. 2. (A–C) Hypophyseal horizontal sections showing the anterior (AH), intermediate (IH), and neural (NH) lobes: immunoreaction with 23K PRL (A) or 16K PRL (B and C) antisera (1:500). In C, the 16K PRL antiserum was preabsorbed with 16K PRL (1  $\mu$ M). (D–F) Immunoreaction with 16K PRL antiserum (1:500) in the hypothalamic PVN (D) and supra-thalamic nucleus (SON) (E) and in the internal lamina of the median eminence (F). Labeled magnocellular neurons (arrows) are indicated. Results are representative of 10 independent experiments. ( $\times 10$ .)

ent molecular masses of 23 and 25 kDa. The 14- and 23-kDa immunoreactive proteins were present both under nonreducing conditions and after reduction of the proteins with 5% (vol/vol) 2-mercaptoethanol, whereas the 25-kDa protein disappeared under reducing conditions. Medium conditioned by neurohypophysial cultures, while being devoid of many of the proteins in the neurohypophysial extract, consistently showed the presence of the 14- and the 23-kDa immunoreactive proteins. A 5-fold higher concentration of the 14-kDa over the 23-kDa immunoreactive protein was found (15 and 3 ng/ $\mu$ l, respectively) in the conditioned medium by densitometric analysis calibrated with different concentrations of the 23K PRL standard. No 25-kDa immunoreactive protein was detected in the conditioned medium by nonreducing

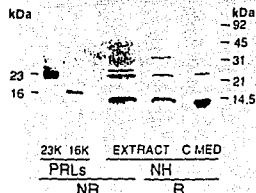


FIG. 3. Blots probed with the antiserum to 16K PRL (1:500) from a neurohypophysial (NH) extract and medium conditioned (C Med) by incubated neurohypophyses (1 h in Krebs–Ringer solution at 37°C). Proteins were separated by SDS/PAGE under nonreducing (NR) or reducing (R) conditions. The migration positions of 23K and 16K PRL standards and molecular mass markers are indicated at left and right, respectively.

Western blots (not shown). When an equal amount of the 16K PRL standard was added to either the neurohypophysial extract or the conditioned medium before Western blot analysis, two bands that comigrated with the 16K PRL standard and the 14-kDa immunoreactive protein were observed in both mixtures (not shown).

**Inhibition of Endothelial Cell Proliferation by the Conditioned Medium of Incubated Neurohypophyses.** At 12.5 nM, 16K PRL inhibited the bFGF-stimulated proliferation of BBCE cells, while the same concentration of 23K PRL had no effect (Fig. 4A). The neurohypophysial conditioned medium (1:75) inhibited the endothelial cell proliferation stimulated by bFGF, whereas the nonconditioned medium was inactive (Fig. 4B). The inhibition of bFGF-stimulated BBCE cell proliferation by the above concentrations of 16K PRL and the neurohypophysial conditioned medium was blocked by coincubation with the 16K PRL antiserum (1:1000) (Fig. 4).

**Detection of PRL mRNA in the PVN.** Total RNA prepared from isolated PVNs was reverse transcribed and amplified by using primers A, B, C, and D complementary to nucleotides in exons 2, 3, 4, and 5 of the rat PRL gene, respectively. Southern blot analysis of the PCR products after an amplification of 30 cycles is shown in Fig. 5. Amplification of the PVN samples with the PRL primer combinations A/C, A/D, B/C, and B/D yielded fragments of 388, 586, 220, and 418 bp, respectively. The sizes of the amplified products were con-

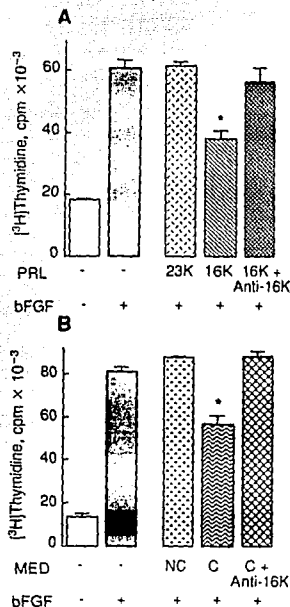


FIG. 4. [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation into BBCE cells was measured in response to the following conditions: (A) bFGF (50 pM) alone or in combination with 12.5 nM 23K PRL, 16K PRL, or 16K PRL together with the 16K PRL antiserum (1:1000 dilution). (B) bFGF (50 pM) alone or in combination with nonconditioned (NC) or conditioned (C) media (1:75) or conditioned medium together with the 16K PRL antiserum (1:1000 dilution). Conditioned medium contained the 14-kDa immunoreactive protein at 12.5 nM in the final concentration tested. Values are means of triplicate determinations. \*,  $P < 0.05$  vs. corresponding controls.

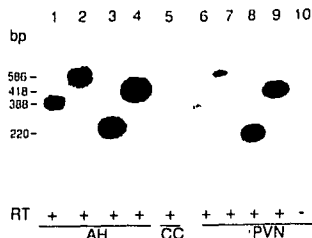


Fig. 5. Southern blot analysis of PCR fragments from reverse-transcribed total RNA from the anterior hypophysis (AH), cerebral cortex (CC), and PVN, amplified (30 cycles) with different rat PRL cDNA primer combinations. Lanes 1 and 6, amplified fragment with primer A and C (388 bp); lanes 2 and 7, primers A and D (586 bp); lanes 3 and 8, primers B and C (220 bp); lanes 4, 5, 9, and 10, primers B and D (418 bp); lane 10, without RT (negative control with RNA). Hybridization was with primer B. The size of the fragments is indicated. Autoradiographs for PVN and CC were exposed for 16 h with an enhancing screen and the autoradiograph for AH, 1 h without screen.

sistent with the predicted sizes for the full-length 23K PRL mRNA and identical to those amplified by the same primer combinations in the anterior hypophysis-positive control. No positive signal was observed in cerebral cortex, where no immunostaining was detected (not shown). Similarly, no signal was detected in the absence of RT (negative controls). The cyclophilin gene was amplified in the PVN and anterior hypophysis (not shown). No smaller products were detected that could relate to an alternative spliced transcript even after a 60-cycle amplification (not shown).

**PRL-Cleaving Enzymes in the Hypothalamic-Neurohypophyseal System.** The incubation of 23K PRL with acidified membrane extracts from the PVN or neurohypophysis resulted in the proteolysis of added PRL to yield cleaved PRL, as evidenced by Western blots probed with the 16K PRL antiserum carried out under nonreducing and reducing conditions. A 25-kDa immunoreactive protein was generated (not shown), which upon reduction dissociated into 16K PRL (Fig. 6). The PRL-cleaving enzymatic activity of the PVN was less potent than that of the neurohypophysis, since some 23K PRL remained after incubation with the PVN extract but not after the incubation with the neurohypophyseal extract.

## DISCUSSION

This report demonstrates the presence of PRL mRNA in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat and indicates at this site not only the synthesis of PRL but also its preferential posttranslational processing into a lower molecular weight form. In addition, we have found a case in which a small molecular weight form of PRL, a 14-kDa fragment, predominates over the full-length 23K PRL. We also show that this 14-kDa molecular form shares immunological and biological properties with 16K PRL, a fragment of PRL with

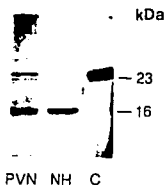


Fig. 6. Reducing Western blot probed with the 16K PRL antiserum showing the proteolysis of PRL (2  $\mu$ g) after incubation with membranes (3  $\mu$ g of protein) from the PVN, the neurohypophysis (NH), or in the control incubated without tissue (C). Results are representative of three independent experiments.

well-characterized antidiuretic properties and recently discovered natriuretic effects.

PRL synthesis has been reported in several extrahypophyseal tissues, including the brain. Production of brain PRL has been supported by immunocytochemical, RIA, and bioassay data from normal and hypophysectomized animals (18–20). Using RT-PCR, Emanuele and colleagues (21) demonstrated the presence of PRL mRNA in whole hypothalamus and in several brain extrahypothalamic regions, indicating the expression of PRL in the brain. Evidence for the molecular heterogeneity of brain PRL has been provided. Different antigenic determinants have been proposed to exist in brain and pituitary PRLs (22), and Western blot analysis has indicated the presence of cleaved PRL in homogenates of whole hypothalamus (5). Moreover, the brain was shown to contain not only the 23K PRL mRNA but also a deletion mutant that encodes a protein with a predicted molecular mass of 16 kDa (21).

In this study we have used polyclonal antibodies directed against the 16-kDa N-terminal fragment of PRL coupled with immunocytochemical techniques to investigate the endogenous localization of 16K PRL-like proteins. The antiserum is specific for 16K PRL with low potency to react with 23K PRL in solution and has no crossreactivity with several major peptides from the hypothalamic-neurohypophyseal system. Immunocytochemical images are consistent with the localization of 16K PRL-like antigens in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat. The immunoreaction was found in magnocellular neurons within the PVN and SON, in their neuronal projections towards the neurohypophysis (internal lamina of the median eminence), and in the neurohypophysis itself.

The finding of PRL in the hypothalamic-neurohypophyseal system is somehow surprising. Using antisera raised against 23K PRL, most reports failed to detect immunoreactive PRL in the PVN and in the neurohypophysis, although they did indicate PRL-immunopositive cells in the SON, but only after the inhibition of axonal transport by colchicine treatment (19). Considering that PRL fragments such as 16K PRL have low immunoreactivity with 23K PRL antibodies (6), we propose that the failure to detect PRL immunoreactivity in this system by prior studies was due to the predominance of small fragments of the protein.

To further characterize the 16K PRL-like antigens found in the hypothalamic-neurohypophyseal system, we analyzed neurohypophyseal extracts by Western blots probed with the 16K PRL antiserum. The immunoreactivity found in the neurohypophysis was associated with a protein of an apparent molecular mass of 14 kDa, and with less abundant 23- and 25-kDa proteins, indicating that the 14-kDa molecule is the main protein recognized by the 16K PRL antiserum in the immunocytochemical studies. In support of the 14-kDa protein as a PRL fragment, we have observed that the discrepancy of  $\approx$ 2 kDa between this protein and 16K PRL does not appear to involve an artefactual protein mobility due to interference with material from the neurohypophyseal samples. 16K PRL standard added to neurohypophyseal extracts or conditioned media migrates to a 16-kDa position as a band distinct from that of the 14-kDa immunoreactive protein. The 14-kDa protein could correspond to a proteolytically processed product of 16K PRL or to an independent product of PRL proteolysis. During recombinant synthesis of primate PRL, Cole and colleagues (23) observed a cleavage site at Ile-133 that could generate a PRL fragment of approximately 14 kDa. Two other immunoreactive proteins were detected in the neurohypophysis that comigrated with 23K PRL and cleaved PRL, respectively. The fact that the 25-kDa protein disappeared under reducing conditions favors its nature as cleaved PRL. However, the 25-kDa protein did not resolve into a 16-kDa band under reducing conditions as would have



been expected for cleaved PRL, albeit a slight contribution of the 25-kDa protein to the 14-kDa band cannot be ruled out. The relatively low amounts of 23K PRL found are in agreement with its lack of detection by immunocytochemical studies.

We found an additional 16K PRL-like property of the 14-kDa immunoreactive protein by analyzing the antiangiogenic bioactivity of the conditioned media of neurohypophysial cultures. The *in vitro* inhibition of endothelial cell proliferation is a specific effect of 16K PRL not shared with 23K PRL (7, 8). The conditioned medium inhibited BBCE cell proliferation, and this inhibition was blocked by the 16K PRL antiserum. Accordingly, inhibition of endothelial cell proliferation by the conditioned medium involves immunoreactive 16K PRL-like molecules. We have shown that this medium contains two such molecules, a 14-kDa and a 23-kDa protein. The inhibition is not likely to involve the 23-kDa protein, since, as previously reported, and confirmed in this study, 23K PRL is incapable of inhibiting growth of endothelial cells. On the other hand, the 14-kDa immunoreactive protein is present in conditioned medium in a higher concentration (5-fold) than 23K PRL. In fact, the tested dose of the conditioned medium contained the 14-kDa protein at 12.5 nM and displayed an inhibition of magnitude (40%) similar to that produced by 12.5 nM 16K PRL. These results support the idea that the 14-kDa protein could correspond to an endogenous form of PRL with 16K PRL-like actions. Definitive identification of the 14-kDa protein awaits determination of its primary amino acid sequence.

We have investigated whether these members of the PRL family are synthesized locally and whether the 14-kDa form could result from an alternatively spliced PRL message or the posttranslational modification of 23K PRL. In isolated PVNs, RT-PCR amplification and Southern analysis revealed products with the same size of those predicted for the full-length 23K PRL mRNA, and thus, identical to those amplified in the anterior hypophysis. Emanuele and colleagues (21) detected a deletion mutant mRNA in the rat hypothalamus, which lacks exon 4. We failed to detect such a fragment, even when a probe specific to exon 3 was used. These results indicate that the full-length PRL mRNA is expressed in the PVN, and thus support the conclusion that PRLs found in the hypothalamic-neurohypophysial system are produced locally. Furthermore, the results show that the 14-kDa immunoreactive protein is generated not by an alternative splicing but by the proteolysis and reduction of the 23K PRL molecule. These conclusions are substantiated by the finding of small amounts of 23K PRL and cleaved PRL, together with the PRL-cleaving enzymes in the PVN and the neurohypophysis.

The functional implication of an antiangiogenic factor produced in the hypothalamic-neurohypophysial system is not clear. Of interest is the fact that magnocellular neurons in both the PVN and SON express high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA (24). A more direct implication for the localization of a 16K PRL-like bioactive molecule at this site is derived from the observation that systemically administered 16K PRL, but not 23K PRL, stimulates sodium and water excretion in the anesthetized rat (C. C. and W. K. Samson, unpublished observations). This finding is consistent with the well-known role of the hypothalamic-neurohypophysial system in the regulation of fluid and electrolyte homeostasis (25). In this regard it has long been claimed that the neurohypophysis secretes a natriuretic peptide that acts as a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor (26). Recently the 2.5-kDa joining peptide of the proopiomelanocor-

tin molecule was purified from neurohypophysis as a Na<sup>+</sup> pump inhibitor, although it has lower activity than expected (27). The presence of the biologically active 14-kDa PRL-like molecule found in the hypothalamic-neurohypophysial system could contribute to the natriuretic activity found at this site.

We acknowledge the support and critical review of the manuscript by Dr. Willis K. Samson. We thank the National Hormone and Pituitary Program-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases for their generous gifts of rat PRL and anti-rat PRL antiserum. This work was supported by Grant IN201992 from the National University of Mexico and Grant 1893-N9212 from the National Council of Science and Technology of Mexico.

- Nicoll, C. S. (1980) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **39**, 2563-2566.
- Russell, D. H. (1989) *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 40-44.
- Sinha, Y. N. (1992) *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 100-106.
- Montgomery, D. W., Shen, G. K., Ulrich, E. D., Steiner, L. L., Parrish, P. R. & Zukoski, C. F. (1992) *Endocrinology* **131**, 3019-3026.
- DeVito, W. J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 599-604.
- Clapp, C., Sears, P., Russell, D., Richards, J., Levay-Young, B. & Nicoll, C. S. (1988) *Endocrinology* **122**, 2892-2898.
- Ferrara, N., Clapp, C. & Weiner, R. I. (1991) *Endocrinology* **129**, 896-900.
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delrue, F. & Weiner, R. I. (1993) *Endocrinology* **133**, 1292-1299.
- Clapp, C. & Weiner, R. I. (1992) *Endocrinology* **130**, 1380-1386.
- Clapp, C., Sears, P. S. & Nicoll, C. S. (1989) *Endocrinology* **125**, 1054-1059.
- Clapp, C. (1987) *Endocrinology* **121**, 2055-2064.
- Andries, M., Tillemans, D. & Deneef, C. (1992) *Biochem. J.* **281**, 393-400.
- Baldocchi, R. A., Tan, L., King, D. S. & Nicoll, C. S. (1993) *Endocrinology* **133**, 935-938.
- Compton, M. M. & Witorsch, R. J. (1984) *Endocrinology* **115**, 476-484.
- Palkovits, M. (1983) *Methods Enzymol.* **103**, 368-376.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Swanson, L. W. & Sawchenko, P. E. (1983) *Annu. Rev. Neurosci.* **6**, 269-324.
- Toubeau, G., Desclain, J., Parmentier, M. & Pasteels, J. L. (1979) *J. Endocrinol.* **83**, 261-266.
- Harlan, R. E., Shivers, B. D., Fox, S. R., Kaplove, K. A., Schachter, B. S. & Pfaff, D. W. (1989) *Neuroendocrinology* **49**, 7-22.
- Emanuele, N. V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T. C., Beer, C. T., Martinson, D., Gout, P. W., Kirsteins, L. & Lawrence, A. M. (1986) *Neuroendocrinology* **44**, 217-221.
- Emanuele, N. V., Jurgens, J. K., Halloran, M. M., Tentler, J., Lawrence, A. M. & Kelley, M. R. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 35-42.
- Harlan, R. E. & Scammell, J. G. (1991) *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 221-224.
- Cole, E. S., Nichols, E. H., Lauziere, K., Edmunds, T. & McPherson, J. M. (1991) *Endocrinology* **129**, 2639-2646.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. & Leung, D. W. (1993) *Endocr. Rev.* **13**, 18-32.
- Van Wimersma Greidanus, T. B. & Hellebrekers, L. J. (1991) in *Brain Endocrinology*, ed. Motta, M. (Raven, New York), pp. 377-401.
- De Wardener, H. E. & Clarkson, E. M. (1985) *Physiol. Rev.* **65**, 658-759.
- Hamakubo, T., Furuta, H., Ichimura, M., Appalsamy, M., Mosqueda-Garcia, R., Robertson, D. & Inagami, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 691-696.



# Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin

F.J. López-Gómez, L. Torner, S. Mejía, G. Martínez de la Escalera & C. Clapp

Neurobiology Center, National University of Mexico, 04510 Mexico City, Mexico

We have described the expression of the prolactin (PRL) gene and the occurrence of PRL-like immunoreactive proteins in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat. Here, we investigated the nature of neurohypophyseal PRL-like antigens, by studying the biological activity of medium conditioned by incubated neurohypophyses in specific bioassays for PRL and for the 16 kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL). Neurohypophyseal conditioned medium (NHCM) obtained after incubating neurohypophyseal lobes (1 h at 37°C) was enriched with proteins of 14 kDa and 23 kDa, that crossreacted with PRL- and 16K PRL-directed antisera. The NHCM stimulated in a dose-dependent fashion the proliferation of Nb2-lymphoma PRL-dependent cells. This effect paralleled that of PRL and 16K PRL standards and was neutralized by different dilutions of both PRL- and 16K PRL-antisera. Also, the NHCM inhibited the proliferation of endothelial cells in culture, an antiangiogenic-effect exerted by 16K PRL. The antiangiogenic effect of the NHCM was parallel to that of 16K PRL standard and neutralized by 16K PRL antiserum in a dose-dependent fashion. These results indicate that NHCM contains proteins that share receptor activation properties as well as antigenic determinants with both PRL and 16K PRL.

**Keywords:** brain prolactin; prolactin isoforms; neurohypophysis; angiogenesis; Nb2 cells

## Introduction

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone that exhibits a wide spectrum of molecular polymorphism. The major variant form of PRL, constituted by a single polypeptide chain with a molecular mass of 23 kDa (23K PRL), is known to be subjected to post-translational modifications that include glycosylation, phosphorylation and specific proteolytic processing (Sinha, 1992). Posttranslational events have been proposed as mechanisms for generating diversity in the biological actions of PRL (Sinha, 1992). Accordingly, it has been shown that the proteolytic cleavage and subsequent reduction of 23K PRL generates molecular variants with specific functions. Cleaved PRL, a variant with a nick at Tyr 145, specifically enhances proliferation of gonadotropes and thyrotropes, an effect not caused by 23K PRL (Andries *et al.*, 1992). Moreover the 16 kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL) inhibits the proliferation of endothelial cells as well as other events of angiogenesis, i.e., the formation of new capillary blood vessels (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993). 23K PRL does not affect such events of the angiogenic process (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993).

Although the anterior pituitary gland is known to be the major site for the synthesis and secretion of the PRL family of hormones, there are other known sources, including the brain (Dutt *et al.*, 1994). It has been recognized that the PRL gene is expressed in the central nervous system, particularly in the hypothalamus, although the PRL transcript is present

in very low abundance (Wilson *et al.*, 1992; Dutt *et al.*, 1994). The molecular heterogeneity of brain PRL is substantiated by described differences in the molecule's epitopes (Harlan & Scammell, 1991), size (Emanuele *et al.*, 1986, 1987; DeVito, 1988) and bioactivity (Emanuele *et al.*, 1986) with respect to anterior pituitary PRL. Moreover, both a PRL mRNA with identical sequence to that of anterior pituitary PRL (Wilson *et al.*, 1992), as well as an alternatively spliced PRL mRNA have been identified in brain tissue (Emanuele *et al.*, 1992).

In a recent study, with the use of the reverse transcription-polymerase chain reaction we found the full size PRL mRNA in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat (Clapp *et al.*, 1994). Consistent with this result, PRL-immunoreactive proteins with a predominant molecular mass of 14 and 23 kDa were detected in neurohypophyseal extracts and found to be secreted by neurohypophyses in culture (Clapp *et al.*, 1994; Torner *et al.*, 1994). Moreover the medium conditioned by incubated neurohypophyses inhibited the proliferation of endothelial cells in culture (Clapp *et al.*, 1994). Thus we have hypothesized that PRL gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and that the protein is modified, through tissue-specific mechanisms, to yield variant forms with specific functions.

In this paper, we have tested the above hypothesis by investigating the nature of the neurohypophyseal PRL-immunoreactive proteins through the characterization of their biological activities in cell proliferation assays specific for 16K PRL (endothelial cells in culture) and 23K PRL (Nb2 lymphoma cells).

## Results

### Western blot detection of PRL-like antigens in medium conditioned by incubated neurohypophyses

Crossreactivity of proteins in medium conditioned by incubated neurohypophyses with PRL antisera was examined by Western blot analysis. As previously described (Clapp *et al.*, 1994), Western blots probed with the 16K PRL antiserum showed that the predominant immunoreactive protein present in the neurohypophyseal conditioned medium (NHCM) has an apparent molecular mass of 14 kDa (Figure 1). A 23 kDa immunoreactive protein was also consistently observed. These two immunoreactive proteins present in NHCM were also detected by an antiserum raised against 23K PRL (Figure 1A). Both the 14 kDa and the 23 kDa proteins were detected after reducing or not the samples with 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (Figure 1B). In Western blots probed with pre-immune serum, no bands of 14 kDa or 23 kDa were detected (Figure 1A).

### Effect of medium conditioned by incubated neurohypophyses on proliferation of Nb2 cells

The biological activity of NHCM was tested on the proliferation of Nb2 cells in culture and compared to the activities of 23K PRL and 16K PRL standards (Figure 2). Both PRL standards stimulated the proliferation of Nb2 cells in a dose-

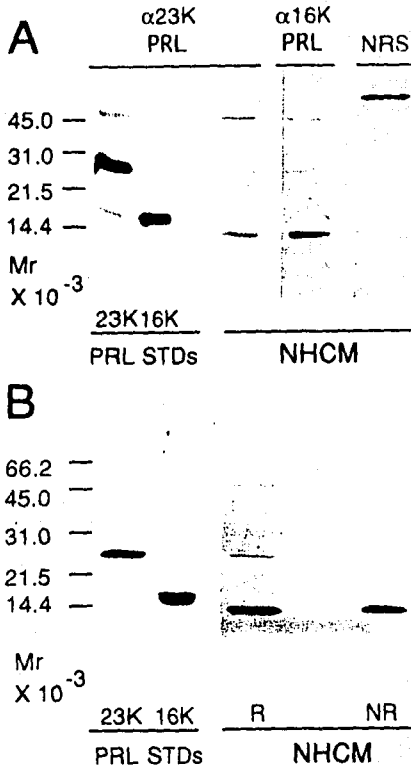


Figure 1 Western blot identification of PRL-like antigens in the medium conditioned by incubated neurohypophyses. (A) Blots from neurohypophysial conditioned medium (NHCM, neurohypophyses were incubated 1 h in Krebs Ringer at 37°C), were probed with a 1:500 dilution of the 23K PRL antiserum ( $\alpha$ 23K PRL), 16K PRL antiserum ( $\alpha$ 16K PRL) or normal rabbit serum (NRS). (B) Blots from NHCM were probed with the antiserum to 16K PRL (1:500) under non-reducing (NR) or reducing (R) conditions. The migration rate ( $M_r$ ) of molecular weight markers are indicated at left.

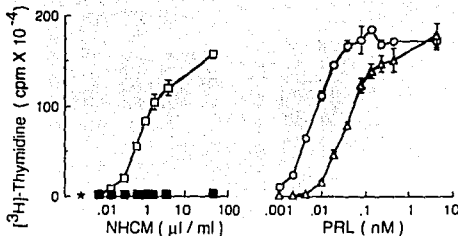


Figure 2 Stimulation by neurohypophysial conditioned medium of Nb2 cell proliferation. [ $^3$ H] thymidine incorporation into Nb2 cells was measured in response to increasing concentrations of neurohypophysial conditioned medium (NHCM) ( $\square$ ), and compared to the effects of increasing concentrations of 23K PRL ( $\circ$ ), 16K PRL ( $\Delta$ ), or preconditioned medium ( $\blacksquare$ ). The basal incorporation of [ $^3$ H] thymidine is shown (\*). Starting at the 0.02  $\mu$ l/ml concentration, the NHCM values were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than basal values.

dependent fashion. The proliferative effect induced by 16K PRL showed a lower potency than the one induced by 23K PRL, i.e., 16K PRL had a one-half maximal response concentration ( $EC_{50}$ ) seven times greater than that of 23K PRL or 45 pM vs 6 pM, respectively. Increasing concentrations of the NHCM stimulated the proliferation of Nb2 cells in a manner parallel to that of both PRL standards, while pre-conditioned medium had no effect. The concentration of the NHCM to give a half-maximal proliferative effect was 1  $\mu$ l/ml. Western blotting and densitometric analysis of the NHCM, calibrated against different concentrations of 23K PRL standard; were used to estimate the concentration of the 23 kDa and the 14 kDa immunoreactive proteins in the medium as 1.2 and 7.2 ng/ $\mu$ l, respectively. Thus, the activity of the NHCM to stimulate the proliferation of Nb2 cells, expressed as a function of the estimated concentrations of either the 23 kDa or the 14 kDa immunoreactive proteins gave  $EC_{50}$  values of 0.05 and 0.45 nM, respectively.

*Inhibition of the Nb2 cell proliferative effect of neurohypophysial conditioned medium by 23K PRL and 16K PRL antisera*

The ability of antisera raised against 16K PRL and 23K PRL to inhibit the mitogenic activity of NHCM was tested (Figure 3). Nb2 cells were incubated with NHCM (1  $\mu$ l/ml) to obtain a half-maximal proliferative effect, in the presence or absence of either PRL antisera. Serial concentrations of 23K PRL or of 16K PRL antisera inhibited in a dose-dependent fashion the stimulation of Nb2 cell proliferation induced by NHCM or by 23K PRL standard. Pre-immune serum had no effect.

*Effect of neurohypophysial conditioned medium on bFGF-stimulated proliferation of bovine brain capillary endothelial (BBCE) cells*

Increasing concentrations of NHCM were tested on the proliferation of BBCE cells stimulated by bFGF and their effects

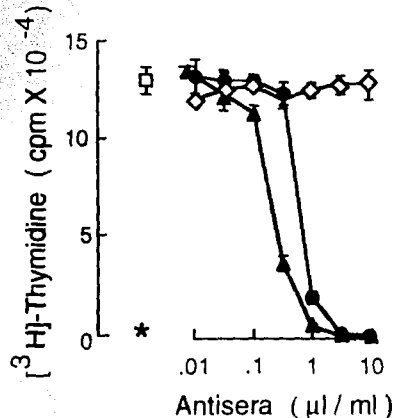


Figure 3 Blockage by PRL antisera of the stimulation of Nb2 cell proliferation induced by neurohypophysial conditioned medium. [ $^3$ H] thymidine incorporation into Nb2 cells was measured in response to neurohypophysial conditioned medium (NHCM, at the  $EC_{50}$  value of 1  $\mu$ l/ml) in combination with increasing concentrations of 23K PRL antiserum ( $\bullet$ ), 16K PRL antiserum ( $\blacktriangle$ ) or normal rabbit serum ( $\circ$ ). The basal incorporation of [ $^3$ H] thymidine (\*), and that induced by NHCM alone ( $\square$ ) are shown. The values for the anti-16K PRL and the anti-23K PRL antisera co-culture, starting at the 0.5 and 1.0  $\mu$ l/ml antiserum concentrations, respectively, were significantly ( $P < 0.05$ ) lower than that of NHCM alone.

were compared to those of different concentrations of carbamidomethylated 16K PRL standard (CAM-16K PRL) (Figure 4). CAM-16K PRL was used for this purpose, since blockage of disulfide bond formation by carbamidomethylation enhances the potency of 16K PRL to inhibit endothelial cell proliferation (Ferrara *et al.*, 1991). Administration of NHCM inhibited the bFGF-stimulated proliferation of BBCE cells in a dose-dependent fashion that paralleled the inhibitory effect of CAM-16K PRL. The activity of NHCM to inhibit BBCE cells proliferation expressed as a function of the estimated concentration of the 14 kDa immunoreactive protein (7.2 ng/ $\mu$ l) gave an EC<sub>50</sub> value of 5.4 nM, close to the EC<sub>50</sub> value of 13 nM observed for CAM-16K PRL.

**Blockage of the effect of neurohypophysial conditioned medium on endothelial cell proliferation by 16K PRL antiserum**

We next examined whether increasing concentrations of PRL-directed antisera were capable of neutralizing the inhibitory effect of NHCM on the bFGF-stimulated-BBCE cell proliferation. BBCE cells were incubated with NHCM (12  $\mu$ l/ml) to give a half maximal inhibition of cell proliferation, in the presence or absence of either PRL antisera. Increasing concentrations of 16K PRL antiserum blocked, in a dose-dependent manner, the inhibition by NHCM of bFGF-stimulated BBCE cell proliferation (Figure 5). Conversely, 23K PRL antiserum or pre-immune serum at dilutions of up to 1:100 had no significant effects on the inhibitory activity of NHCM.

**Discussion**

Our results demonstrate that PRL-like immunoreactive proteins found in the medium conditioned by incubated neurohypophyses share bioactivities with both PRL and 16K PRL. Proliferation of lymphoma Nb2 PRL-dependent cells was stimulated by NHCM, and this effect was neutralized by a 23K PRL-directed antiserum. Proliferation of endothelial cells was also inhibited by NHCM, and this effect was neu-

tralized by a 16K PRL antiserum. These results indicate that biologically active PRLs are secreted by the hypothalamic-neurohypophysial system, including a predominant 14 kDa PRL-like fragment with antiangiogenic effects.

In a recent study we described the presence of immunoreactive PRLs in the hypothalamic-neurohypophysial system. With the use of an antiserum directed against the N-terminal 16 kDa fragment of PRL, we found that the hypothalamic-neurohypophysial system contained two PRL-like antigens, i.e., a predominant 14 kDa protein and small amounts of a 23 kDa protein (Clapp *et al.*, 1994). The PRL nature of both antigens and their local production was substantiated by the amplification, via the polymerase chain reaction, of the full size PRL mRNA in isolated hypothalamic paraventricular nuclei (Clapp *et al.*, 1994). These results were consistent with the expression of PRL in the hypothalamic-neurohypophysial system and with its posttranslational modification into a lower molecular weight fragment. The precise nature of the neurohypophysial immunoreactive proteins requires further analysis.

In the present study we have confirmed that the neurohypophyses secrete 14 kDa and 23 kDa proteins that react with the 16K PRL antiserum, and showed that these two proteins also crossreact with an antiserum directed against 23K PRL. Thus it is concluded that both immunoreactive proteins share antigenic determinants with the 16K and the 23K PRL molecules.

We further investigated the identity of the neurohypophysial PRL-like immunoreactive proteins, by analysing biological activities of the NHCM. In support to the PRL-like nature of the neurohypophysial immunoreactive proteins, the NHCM stimulated in a dose-dependent fashion the proliferation of Nb2 lymphoma cells. The effect was parallel

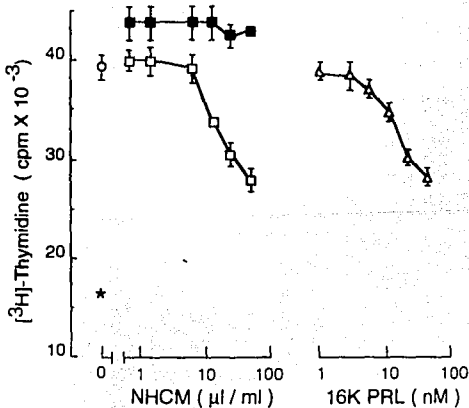


Figure 4 Inhibition by neurohypophysial conditioned medium of bFGF-stimulated proliferation of endothelial cells. [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation into BBCE cells was measured in response to bFGF (50 pM) alone (O) or in combination with increasing concentrations of neurohypophysial conditioned medium (NHCM) (□), pre-conditioned medium (■), or 16K PRL (Δ). The basal incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine (\*) is shown. Starting at the 12.5  $\mu$ l/ml concentration, both the NHCM and the 16K PRL values were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than that of bFGF alone.

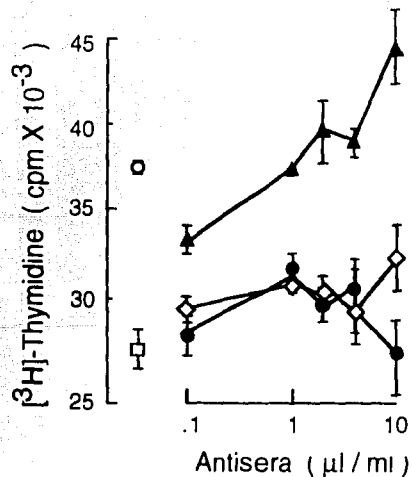


Figure 5 Blockage by 16K PRL antiserum of the inhibition by neurohypophysial conditioned medium of bFGF-stimulated proliferation of endothelial cells. [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation into BBCE cells was measured in response to bFGF (50 pM) alone (O) or in combination with neurohypophysial conditioned medium (NHCM, at the EC<sub>50</sub> value of 10  $\mu$ l/ml) in the absence (□) or presence of increasing concentrations of 16K PRL antiserum (▲), 23K PRL antiserum (●) or normal rabbit serum (○). All values for the anti-16K PRL co-culture were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than the NHCM (□) control. Values of 23K PRL antiserum- or normal rabbit serum- co-cultures were not significant from the NHCM control value.

to that elicited by 23K and 16K PRL standards, and was blocked by both 23K and 16K PRL-directed antisera. Accordingly, in addition to antigenic determinants, the proteins of the NHCM share PRL-receptor activation properties with both 23K and 16K PRL.

The Nb2 cell proliferation activity of the NHCM could be due to the combined action of both the 14 kDa and the 23 kDa PRL antigens, or to the independent effect of either one of them. The bioactivity of the NHCM expressed in terms of the sum of the estimated concentrations of both antigens gave an  $EC_{50}$  value 10- to 80-fold higher than the values obtained with 16K PRL and 23K PRL standards respectively. The apparently low biological potency of both PRL antigens could be explained in one of several ways. It is possible that the concentration of both antigens was overestimated, perhaps due to a high reactivity of these proteins with the PRL antisera. Alternatively, both neurohypophysial PRLs could have a low biological activity. This possibility is consistent with previous determinations of PRL-like bioactivity from hypothalamic extracts in which a low PRL bioassay to immunoassay ratio was demonstrated (Emanuele *et al.*, 1986, 1987). A low biological potency can be expected for PRL fragments. The  $EC_{50}$  value observed for 16K PRL (45 pM) was 7.5 times higher than that of 23K PRL (6 pM). An additional possibility would be that the 14 kDa antigen is acting as an antagonist of the PRL receptor. According to this possibility the 23 kDa antigen would be expected to have a reduced effect in the presence of the 14 kDa immunoreactive protein. Accordingly, the bioactivity of the conditioned medium expressed solely in terms of the 23 kDa antigen showed an  $EC_{50}$  value (0.05 nM) 8-fold higher than the respective value of 23K PRL standard (0.006 nM).

Possibilities like the ones raised above have been considered for the understanding of PRL signaling mechanisms. PRL fragments are currently being conceived as partial agonists and/or antagonists of the PRL receptor (Fuh *et al.*, 1993). It is now well accepted that PRL activates the PRL receptor by a sequential dimerization process that yields an active PRL-(receptor) complex (Cunningham *et al.*, 1991; Fuh *et al.*, 1993; Hooper *et al.*, 1993; Rui *et al.*, 1994). This mode of activation implies that there are two receptor binding sites on the PRL molecule and that PRL binds through the first site (Site 1) to a receptor and then through the second site (Site 2) to a second receptor. PRL analogs with mutations at Site 1 or Site 2 act as partial agonists or antagonists of the receptor, respectively. For instance mutants of hGH which bind tightly with Site 1 but not with Site 2 are potent antagonists of the PRL receptor and virtually inactive on Nb2 lymphoma cells (Fuh *et al.*, 1993). On the other hand a hGH mutant with Site 2 intact, but with a compromised Site 1, acted as a partial agonist on Nb2 cells, with an  $EC_{50}$  value 12 times higher than that of native hGH (Cunningham & Wells, 1991; Fuh *et al.*, 1993). In a similar way, 16K PRL could be acting as a partial agonist for the PRL receptor because the C-terminal end of the molecule is at Tyr 145 (Baldocchi *et al.*, 1993) and thus a group of amino acid residues (167-191), presumed to be part of Site 1 (Cunningham & Wells, 1989), have been lost. Along the same line a role for the neurohypophysial 14 kDa PRL as a partial agonist and/or antagonist at the PRL receptor level are open possibilities that need to be addressed following the purification and sequencing of the protein.

The functional significance of the PRL variants found in the hypothalamic-neurohypophysial system may lie on their ability to subserve different functions. For instance, 16K PRL while being a weak agonist of the PRL receptor, is a potent inhibitor of angiogenesis (Clapp *et al.*, 1988, 1993; Ferrara *et al.*, 1991), an effect not shared with 23K PRL. We previously showed that the PRL-like molecules present in the hypothalamic-neurohypophysial system exert an antiangiogenic-effect similar to that attributed to 16K PRL (Clapp *et al.*, 1994). Here we show that inhibition of endothelial cell

proliferation by the NHCM occurs in a dose-dependent fashion that parallels the dose-related antiangiogenic effect of 16K PRL standard. In addition, serial dilutions of the 16K PRL antiserum neutralize, in a dose dependent manner, the antiangiogenic-effect of the NHCM. In support to the 14 kDa protein as the likely antiangiogenic-molecule, we found that the activity of the NHCM expressed in terms of the estimated concentration of the 14 kDa PRL antigen, showed an  $EC_{50}$  value close to that obtained with 16K PRL standard.

The 23K PRL antiserum, even at a 1:100 dilution, did not neutralize the antiangiogenic effect of the NHCM. The selectivity of the 23K PRL antiserum to neutralize the NHCM effect on Nb2 cells, but not on endothelial cells, could be explained in one of several ways. It is possible that this antiserum recognizes epitopes in neurohypophysial PRLs that are part of the binding region to the PRL receptor but not to the 16K PRL receptor, and thus block the activation of the former but not of the latter. High affinity, specific binding sites for 16K PRL are present on endothelial cell membranes and have been proposed as the receptors mediating the antiangiogenic effect of 16K PRL (Clapp & Weiner, 1992). These 16K PRL receptors differ structurally from the PRL receptor and do not bind 23K PRL (Clapp & Weiner, 1992). Thus it is likely that epitopes associated to the 16K PRL receptor-binding region are not present in 23K PRL and thus not recognized by the 23K PRL antiserum. Alternatively, the 23K PRL antiserum may bind to epitopes distinct to either receptor-binding region. Once bound, the antibodies could alter the molecular conformation required for binding to the PRL receptor but not the one required for binding to the 16K PRL receptor. Similar mechanisms have been proposed to explain the selective neutralization activity of PRL monoclonal antibodies of the action of PRLs from different species. (Scammell *et al.*, 1990).

At any event, it is likely that the 23K PRL antiserum does not recognize all the epitopes of the neurohypophysial PRLs that are recognized by the 16K PRL antiserum. This is plausible since differences in three-dimensional structure of 16K PRL, attributed to the lost C-terminal end of the 23K PRL molecule, might have created new epitopes that are now recognized by 16K PRL-directed antibodies. Accordingly in assays where the three-dimensional structure of the molecules is preserved, the specificity of both the 23K PRL- and the 16K PRL-antisera increases. For instance, there is a low (1-2%) crossreactivity of 16K PRL and 23K PRL in the corresponding radioimmunoassays (Clapp *et al.*, 1988, 1994). Moreover, with immunocytochemistry, the 16K PRL antiserum clearly recognizes PRL-like antigens in the hypothalamic-neurohypophysial system (Clapp *et al.*, 1994), while the 23K PRL antiserum fails to detect the neurohypophysial PRL-like immunoreactivity (Siaud *et al.*, 1980; Harlan *et al.*, 1989; Paut-Pagano *et al.*, 1993).

In support to the biosynthesis of the PRL variants by the hypothalamic-neurohypophysial system we have detected the PRL mRNA in isolated paraventricular nuclei (Clapp *et al.*, 1994). Moreover, these prolactin variants appear to enter the neurohypophysial secretory pathway, as indicated by the observed *in vitro* release of PRL-like immunoreactive proteins following potassium-induced depolarization of hypothalamic-neurohypophysial explants (Torner *et al.*, 1994). On the other hand, we have not detected the 14 kDa PRL-like immunoreactive protein in extracts of anterior pituitary glands, isolated lactotropes, or in the medium of cultured lactotropes (Torner *et al.*, 1994, unpublished observations). Moreover, we have not been able to detect immunoreactive PRLs in the hypophysial intermediate lobe (Clapp *et al.*, 1994). These data allow excluding a possible contamination of neurohypophysial PRLs with PRLs from adenohypophysial lactotropes or hypophysial-intermediate lobe cells. Furthermore PRL-like antigens were detected throughout the hypothalamic-neurohypophysial system, i.e. somas, axonal

projections and terminals of magnocellular neurons from the paraventricular and supraoptic hypothalamic nuclei (Clapp *et al.*, 1994).

It is not clear what are the functional implications of neurohypophysial PRLs and, in particular, of an anti-angiogenic-PRL molecule at this site. An effect on local vascularization is plausible. For instance, magnocellular neurons within hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei are known to express high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA (Ferrara *et al.*, 1992). On the other hand, the presence of this PRL variant in a neuroendocrine system raises its potential hormonal action upon distant target tissues. Accordingly, we have observed  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of the 14 kDa antigen by incubated neurohypophyses and detected a 14 kDa PRL immunoreactive molecule in the circulation of the rat (unpublished observations).

The involvement of PRL-like molecules in the control of angiogenesis is being increasingly supported. Proliferin and proliferin-related protein, two proteins with extensive amino-acid sequence homology to PRL, were shown to stimulate and inhibit angiogenesis, respectively (Jackson *et al.*, 1994). Similarly our results suggest that the neurohypophysial 14 kDa PRL, may constitute a new member of the PRL family likely to be involved in the regulation of angiogenesis, as well.

## Materials and methods

### PRLs

Rat PRL [B-6; National Hormone and Pituitary Program (NHPP)] was used as the 23K PRL standard and as the source for the production of 16K PRL. 16K PRL was isolated after the enzymatic proteolysis of 23K PRL by a particulate fraction from rat mammary gland homogenates, disulfide-bond reduction and gel filtration as reported (Clapp, 1987). A portion of the 16K PRL preparation was carbamidomethylated (CAM-16K PRL) by its reduction with dithiothreitol under denaturing conditions and subsequent alkylation with iodoacetamide (Ferrara *et al.*, 1991).

### PRL antisera

The anti-rat 23K PRL serum (S-9) distributed by the NHPP was used. 16K PRL has a low crossreactivity (2% that of 23K PRL) with this antiserum in the 23K PRL RIA (Clapp *et al.*, 1988). The 16K PRL antiserum was raised in rabbits against the 16K PRL non-carbamidomethylated preparation described above. The specificity of this antiserum in the 16K PRL RIA has been reported previously (Clapp *et al.*, 1994). Briefly, 23K PRL has a reduced crossreactivity (1% that of 16K PRL) with the 16K PRL antiserum, while growth hormone, oxytocin, vasopressin, neurophysins I and II and other peptides known to be present in the hypothalamic-neurohypophysial system, do not show crossreactivity with this antiserum (Clapp *et al.*, 1994).

### Animals

Adult male Wistar rats (200–250 g) were kept in an environment of constant temperature and controlled day-night cycles and received food and water *ad libitum*. Their pituitary glands were removed following decapitation and the anterior lobes were dissected out under the microscope.

### Incubation of neurohypophyses

The neurohypophysial lobes were washed in  $\text{Ca}^{2+}$ -deficient Krebs-Ringer solution for 10 min at 37°C and incubated individually in 20  $\mu\text{l}$  of Krebs-Ringer solution for 1 h at

37°C. The resulting conditioned media were pooled, concentrated ( $10 \times$ , Centricon 10, Amicon, Beverly, MA) and stored in aliquots at  $-70^\circ\text{C}$ .

### Western blot-densitometric analysis

Conditioned medium (10  $\mu\text{l}$ ) was subjected to SDS-PAGE as previously described (Clapp *et al.*, 1994). Medium proteins were blotted onto nitrocellulose membranes, probed with a 1:500 dilution of the 16K PRL or the 23K PRL-antisera, and developed by using the alkaline phosphatase second antibody kit (Bio-Rad Labs). To determine the concentration of the 16K PRL reference preparation and of the PRL immunoreactive proteins of the conditioned media, different dilutions of the respective samples were blotted and probed with the 16K PRL antiserum. The blots were then subjected to a densitometric analysis (Fotoanlyst-Fotodyne, Greensboro, NC, USA) calibrated with different concentrations of the 23K PRL standard processed within the same blot, as previously described (Clapp, 1987).

### Cell proliferation assays

**Nb2 cells** The PRL activity of the conditioned media was measured using the lactogen-dependent rat T cell lymphoma Nb2 cell line as detailed previously (Tanaka *et al.*, 1980). Briefly, the cells (kindly provided by Dr. Peter Gout, Cancer Control Agency of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada) were maintained as suspension cultures in high glucose-Dulbecco's Modified Eagle's medium supplemented with 10% horse serum, 10% fetal calf serum,  $10^{-4}\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol and penicillin streptomycin (50 U/ml). The effect of the conditioned or non-conditioned media was tested on Nb2 cell growth, in the presence or absence of the PRL antisera. Cell proliferation was determined in triplicate 12-mm tissue culture wells at a starting density of  $2.5 \times 10^4$  cells in 0.25 ml of the above incubation medium, but without fetal calf serum. The cells were incubated for 72 h, after which [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation into cellular DNA was measured as an index of cell proliferation (Ferrara *et al.*, 1991).

**Bovine brain capillary endothelial cells** Bovine brain capillary endothelial (BBCE) cells were isolated as previously described (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993) and grown in low glucose-Dulbecco's Modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine (2 mM) and antibiotics (50 U/ml penicillin/streptomycin) as reported (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993). To assess cell proliferation, BBCE cells were plated at  $2.5 \times 10^3$  cells per 12 mm culture wells in 0.25 ml of the above culture medium, bFGF (50 pM; GIBCO/BRL) alone or together with medium conditioned or not by incubated neurohypophyses were added to the wells every other day for 4 days. For immunoneutralization studies different dilutions of either PRL antisera were added together with the conditioned medium. On day 4, [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation into cellular DNA was measured as reported (Ferrara *et al.*, 1991).

### Data analysis

The data in Figures 2 to 5 are presented as means  $\pm$  SEM of triplicate determinations of representative experiments. Comparisons of means were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls test for determining statistical differences between two treatment means in multitreatment experiments.

### Acknowledgements

We thank the National Institute of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases as well as the National Hormone and

Pituitary Program for their generous gifts of rat PRL and anti-rat PRL antiserum. This work was supported by Grant IN201992 from the National University of Mexico and by

Grant 1893-N9212 from the National Council of Science and Technology of Mexico.

#### References

- Andries, M., Tilemans, D. & Denef, C. (1992). *Biochem. J.*, **281**, 393-400.
- Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S. & Nicoll, C. (1993). *Endocrinology*, **133**, 935-938.
- Clapp, C. (1987). *Endocrinology*, **121**, 2055-2064.
- Clapp, C., Sears, P.S., Russell, D.H., Richards, J., Levay-Young, B.K. & Nicoll, C.S. (1988). *Endocrinology*, **122**, 2892-2898.
- Clapp, C. & Weiner, R.I. (1992). *Endocrinology*, **130**, 1380-1386.
- Clapp, C., Martini, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F. & Weiner, R.I. (1993). *Endocrinology*, **133**, 1292-1299.
- Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Nagano, M., Kelly, P.A., Mejía, S., Morales, M.A. & Martínez de la Escalera, G. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10384-10388.
- Cunningham, B.C. & Wells, J.A. (1989). *Science*, **244**, 1081-1085.
- Cunningham, B.C. & Wells, J.A. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3407-3411.
- Cunningham, B.C., Ullsch, M., de Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R. & Wells, J.A. (1991). *Science*, **254**, 821-825.
- DeVito, W.J. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 599-604.
- Dutt, A., Kaplitt, M.G., Kow, L.M. & Pfaff, D.W. (1994). *Neuroendocrinology*, **59**, 413-419.
- Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Martinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. & Lawrence, A.M. (1986). *Neuroendocrinology*, **44**, 217-221.
- Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Martinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. & Lawrence, A.M. (1987). *Brain Res.*, **421**, 255-262.
- Emanuele, N.V., Jurgens, J.K., Halloran, M.M., Tentler, J.J., Lawrence, A.M. & Kelley, M.R. (1992). *Mol. Endocrinol.*, **6**, 35-42.
- Ferrara, N., Clapp, C. & Weiner, R.I. (1991). *Endocrinology*, **129**, 896-900.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. & Leung, D.W. (1992). *Endocr. Rev.*, **13**, 18-32.
- Fuh, G., Colosi, P., Wood, W.I. & Wells, J.A. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 5376-5381.
- Harlan, R.E., Shivers, B.D., Fox, S.R., Kaplove, K.A., Schachters, B.S. & Pfaff, D.W. (1989). *Neuroendocrinology*, **49**, 7-22.
- Harlan, R.E. & Scammell, J.G. (1991). *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 221-224.
- Hooper, K.P., Padmanabhan, R. & Ebner, K.E. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 22347-22352.
- Jackson, D., Volpert, O.V., Bouck, N. & Linzer, D.J.H. (1994). *Science*, **266**, 1581-1584.
- Paut-Pagano, L., Roky, R., Valatx, J-L., Kitahama, K. & Jouvet, M. (1993). *Neuroendocrinology*, **58**, 682-695.
- Rui, H., Lebrun, J-J., Kirken, R.A., Kelly, P.A. & Farrar, W.L. (1994). *Endocrinology*, **135**, 1299-1306.
- Scammell, J.G., Wear, L.B. & Von Haven, R. (1990). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **71**, 125-131.
- Siaud, P., Manzoni, O., Balmefrezol, M., Barbanel, G., Assenmacher, I. & Alonso, G. (1980). *Cell Tissue Res.*, **255**, 107-115.
- Sinha, Y.N. (1992). *Trends Endocrinol. Metab.*, **3**, 100-106.
- Tanaka, T., Shiu, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L. & Friesen, H.G. (1980). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1058-1063.
- Torner, L., López, F., Mejía, S., Uribe, E., Noris, G., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G. & Clapp, C. (1994). *76th Annual Meeting of the Endocrine Society*, Anaheim: CA, p 429 (abstract).
- Wilson III, D.M., Emanuele, N.V., Jurgens, J.K. & Kelley, M.R. (1992). *Endocrinology*, **131**, 2488-2490.

## Resultados y Discusión:

Los resultados de este trabajo de tesis consignados en las publicaciones anteriores muestran la presencia en el eje hipotálamo neurohipofisario de proteínas con inmunoreactividad tipo PRL.

En homogenados neurohipofisarios las proteínas inmunorreactivas mostraron pesos moleculares aparentes de 23 y 14kDa respectivamente. Su masa molecular y el hecho de que fueran reconocidas por anticuerpos policlonales específicos contra la PRL 16K en el propio tejido nos hizo pensar que probablemente se tratasen de la propia PRL 23K y de un fragmento molecular de ésta.

De tal forma, en primer lugar nos propusimos ahondar en la naturaleza tipo PRL de ambas proteínas mediante el diseño de una estrategia que nos permitiera evaluar sus propiedades biológicas e inmunológicas.

Para la caracterización biológica se obtuvieron medios condicionados por la incubación de neurohipófisis en cultivo (MCNH). El MCNH resultó una preparación enriquecida con la proteína inmunorreactiva de 14kDa ya que permitió eliminar a muchas de las proteínas presentes en el homogenado neurohipofisario.

La caracterización de las proteínas inmunorreactivas a PRL presentes en el MCNH se realizó mediante electroforesis,

transferencia e inmunotinción con un antisuero específico dirigido contra la PRL 16K. De ésta forma se determinó al igual que en los homogenados neurohipofisarios la presencia predominante de la proteína inmunorreactiva de 14kDa, y en menor proporción la de 23kDa (Figura 3, Trabajo A y Figura 1, Trabajo B). Más aún, determinamos que un antisuero dirigido contra la PRL 23K también era capaz de reconocer a ambas proteínas (Figura 1, Trabajo B). Estos resultados demostraron que las proteínas inmunorreactivas de 14 y 23kDa presentes en la neurohipófisis comparten determinantes antigénicos con las PRLs 23 y 16K respectivamente. Cuando se utilizó un suero preinmune no se detectó inmunoreactividad positiva (Figura 1, Trabajo B), con lo cual se validaba en cierta medida la especificidad de nuestros antisueros.

La proteína de 14kDa se observó tanto en condiciones reductoras como no reductoras en el MCNH y en el homogenado de neurohipófisis (Figura 3, Trabajo A). Esto nos indicó que la molécula estaba presente como tal y no era el resultado de la reducción de una forma cortada de PRL durante el procesamiento de la muestra.

La proteína inmunorreactiva de 23kDa posee la misma masa molecular que la PRL 23K por lo que podría corresponder a ésta variante de PRL, cuya presencia ya se ha descrito en el



cerebro<sup>95-97</sup>, aunque nunca antes en la neurohipófisis<sup>107</sup>. Por otro lado la proteína inmunorreactiva de 14kDa podría representar un fragmento de la PRL.

El hecho de que este antígeno de 14kDa comparta eptopes con la PRL 16K sugiere la posibilidad de que la similitud estructural entre ambas moléculas le permita ejercer efectos similares, como sería la inhibición de la angiogénesis. Para analizar si estas proteínas neurohipofisarias pertenecían a la familia de las PRLs analizamos sus propiedades biológicas mediante el bioensayo de células Nb2.

Como se mencionó diversos grupos han documentado que las células Nb2 son dependientes de PRL para proliferar<sup>29,30</sup>. Por tanto, este bioensayo nos resultó una herramienta poderosa para investigar si el MCNH contenía PRLs biológicamente activas.

Lo primero que realizamos a este respecto fue la validación del sistema. Hicimos una curva dosis-respuesta a la PRL 23K de rata y a la PRL 16K (Tabla I, Figura 1, Trabajo B).

La respuesta obtenida para cada una de las preparaciones de referencia fue dependiente de la dosis adicionada (Figura 1, Trabajo B). La concentración de hormona capaz de producir la mitad de la respuesta máxima (EC<sub>50</sub>) para el caso particular de la PRL 23K fue de 6pM, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores y pone de manifiesto la sensibilidad del bioensayo<sup>29,30</sup>.

**Tabla I.** Resumen de los resultados obtenidos para el bioensayo de las células Nb2. Se muestran las dosis medias obtenidas para cada efecto y la susceptibilidad de ser bloqueado por antisueros específicos dirigidos contra la PRL 23K y 16K. Las dosis medias (EC<sub>50</sub>) encontradas para el MCNH se reportan en función exclusiva de las proteínas inmunorreactivas de 23 y 14kDa.

Bioensayo Nb2				
Agonista	EC <sub>50</sub> μl/ml	EC <sub>50</sub> nM	α23K	α16K
PRL 23K	-	0.006	+	+
PRL 16K	-	0.045	+	+
MCNH 23K	1.0	1.05	+	+
MCNH 14K	1.0	10.3	+	+

La preparación de referencia de PRL 16K si bien estimuló la mitogénesis de las células Nb2 con la misma eficiencia que la PRL 23K lo hizo con una potencia siete veces menor (EC<sub>50</sub>: 45pM) (Figura 2, Trabajo B). Además la pendiente de la curva dosis-respuesta fue paralela a la observada para la PRL 23K. Este resultado concuerda con reportes previos que muestran la capacidad de la PRL 16K para estimular la proliferación de las células Nb2 y, por lo tanto, su capacidad para activar a los receptores de PRL presentes en estas células<sup>27,29,30</sup>.

Cuando el MCNH se probó sobre la estimulación mitogénica de las células Nb2 se observó una estimulación dependiente de la dosis y paralela a la observada en respuesta a las preparaciones de referencia de las PRLs

23 y 16K (Figura 2, Trabajo B). Este resultado sugirió la presencia de factores lactogénicos con bioactividad de PRL en dicho medio.

La adición de diferentes diluciones de un medio precondicionado no afectó la proliferación de estas células, y por tanto el efecto proliferativo dependió de la presencia de la neurohipófisis en el medio de cultivo.

El efecto mitogénico sobre las células Nb2 inducido por del MCNH fue bloqueado por anticuerpos dirigidos contra las PRLs 23 y 16K respectivamente (Figura 3, Trabajo B), y dicho bloqueo fue dependiente de la dilución de anticuerpo adicionada (Figura 3, Trabajo B).

Estos hallazgos mostraron que el MCNH contenía antígenos tipo PRL capaces de activar a los receptores de esta familia hormonal.

Podrían los antígenos de 14 y 23kDa presentes en el MCNH explicar la estimulación de la proliferación obtenida sobre las células Nb2?

La  $EC_{50}$  obtenida para el medio condicionado fue de 1  $\mu$ l/ml (Tabla 1). Esta dilución a su vez contiene una concentración de 50pM de la proteína inmunorreactiva de 23kDa y de 450pM de la de 14kDa, es decir, concentraciones de 10-80 veces mayores que los valores observados para las preparaciones de referencia de PRL 23K y 16K respectivamente (Tabla 1).

Es posible entonces considerar que si el efecto del MCNH se debe a las proteínas inmunorreactivas de 23 y 14kDa, la potencia biológica de las PRLs neurohipofisiarias sea baja. Esta posibilidad es consistente con otros reportes en donde la actividad biológica de PRLs cerebrales mostró una menor potencia que la de la preparación de referencia de PRL 23K sobre el bioensayo de las células Nb2<sup>102,103</sup>. Por otra parte es posible esperar que el fragmento de la PRL pudiese tener una potencia biológica relativamente baja. En este y previos reportes hemos observado que la PRL 16K posee una menor potencia que la preparación de referencia de PRL 23K, tal es el caso de la mitogénesis estimulada sobre las células Nb2 y la estimulación de la mitogénesis del epitelio mamario<sup>27</sup>. En este sentido los fragmentos de la PRL han sido propuestos como agonistas parciales o incluso como antagonistas del receptor de PRL. Esta hipótesis se fundamenta en el hecho de que la PRL 23K forma un complejo dimérico con su receptor<sup>67-70,109-113</sup>. Como se había mencionado previamente la formación de este complejo dimérico demanda el reconocimiento de dos sitios diferentes de la molécula denominados como sitio-1 y 2, los cuales involucran segmentos de las  $\alpha$ -hélices 1, 3 y 4 de la PRL 23K<sup>67-70,109-113</sup>. Debido a que la PRL 16K carece de una gran parte de la hélice número 4, a esta variante le falta uno de

los dos sitios de reconocimiento (sitio-1) involucrados justamente en la génesis del dímero<sup>67-70,109-113</sup>. Si la molécula carece de este sitio de unión la capacidad de esta variante para transducir señal puede verse alterada y por tanto, el efecto inducido se propagaría con una menor eficiencia y actuar como un agonista parcial<sup>67-70</sup>, o bien podría no transducirse y desempeñarse como un antagonista al secuestrar a uno de los receptores involucrados en la dimerización<sup>109-113</sup>. Así es posible que la PRL 14K pudiese actuar como antagonista del receptor de PRL y por tanto, modular negativamente la bioactividad de la variante de 23kDa. En apoyo a esta posibilidad existen trabajos en donde al generar mutantes de la hormona de crecimiento humana (GHh) se consigue sintetizar a un agonista parcial del receptor y en ocasiones al deletar todo un sitio de reconocimiento de la GHh generar un antagonista del receptor<sup>67-70,109-113</sup>.

Finalmente es posible que la concentración de las PRLs neurohipofisarias haya sido sobreestimada debido a que dichas PRLs posean una inmunoreactividad aumentada a los antisueros utilizados y que por lo tanto su potencia biológica real sea similar a la de las preparaciones de referencia.

En el bioensayo de células endoteliales el MCNH inhibió la proliferación estimulada por bFGF de

dichas células en cultivo. Esta inhibición fue dependiente de la dosis y mostró una  $EC_{50}$  de 5.4nM (Tabla 2, Figura 4, Trabajo A y B), similar a la de la preparación de referencia (Tabla 2).

La adición de diferentes diluciones de medio precondicionado no afectó la proliferación de estas células.

**Tabla 2.** Resumen de los resultados obtenidos para el bioensayo de células endoteliales (CE). En la tabla se muestran las dosis medias ( $EC_{50}$ ) obtenidas para cada efecto y su susceptibilidad de ser bloqueado por el uso de antisueros específicos. La concentración del MCNH esta referida exclusivamente en función del antígeno de 14kDa (SE: sin efecto).

Bioensayo CE				
Agonista	$EC_{50}$ µl/ml	$EC_{50}$ nM	α23K	α16K
PRL 23K	SE	SE	SE	SE
PRL 16K	-	13	-	+
MCNH 23K	SE	SE	SE	SE
MCNH 14K	12	5.4	-	+

El efecto antiangiogénico del MCNH parece ser mediado por la proteína inmunorreactiva de 14kDa y no por la de 23kDa, ya que la PRL 23K no tiene efectos sobre estas células. Esta conclusión es reforzada por el hecho de encontrar valores de  $EC_{50}$  prácticamente similares entre la preparación de referencia de PRL 16K y la proteína inmunorreactiva de 14kDa presente en el MCNH (Tabla 2).

En apoyo a la especificidad del efecto, la inhibición inducida por la concentración media máxima de la preparación de referencia y del MCNH se bloqueó mediante su coincubación con el antisuero dirigido contra la PRL 16K (Tabla 2). Estos hallazgos indican que el MCNH inhibe la angiogénesis y que este efecto está mediado por factores que comparten determinantes antigénicos con la PRL 16K.

Sorprendentemente la adición del antisuero generado contra la PRL 23K no fue capaz de bloquear el efecto antiangiogénico tanto del MCNH como de la PRL 16K. Probables explicaciones al respecto se relacionan con el hecho de que el receptor en las células endoteliales responsable de los efectos antiangiogénicos parece ser específico para la PRL 16K y por lo tanto diferente al receptor de PRL expresado en las células Nb2. Por ello, puede esperarse que el dominio estructural de la hormona reconocido por uno y otro receptor sea diferente. Entonces, anticuerpos dirigidos contra esta región de la PRL 16K involucrada en su unión al receptor de células endoteliales bloquearían las acciones antiangiogénicas de la hormona. Dado que dicha región no está presente en la PRL 23K anticuerpos dirigidos contra esta variante no reconocerían ese sitio y serían incapaces de bloquear el efecto.

Alternativamente el antisuero dirigido contra la PRL 23K podría unirse a epítopes diferentes que los involucrados

en la región de reconocimiento por el receptor. Una vez unidos, los anticuerpos podrían alterar la conformación requerida para la unión de la PRL a su receptor pero no la requerida para unirse al receptor de la PRL 16K. Mecanismos semejantes han sido propuestos para explicar la neutralización selectiva de anticuerpos monoclonales sobre las acciones de PRLs de diferentes especies<sup>114,115</sup>.

Otra posibilidad es que el antisuero dirigido contra la PRL 23K no reconozca a todos los epítopes que reconoce el antisuero dirigido contra la PRL 16K. Esta posibilidad es probable ya que la estructura terciaria de la PRL 16K podría ser diferente a la de la PRL 23K debido a que le falta la parte carboxilo terminal, con lo cual sean creados nuevos epítopes que puedan ser reconocidos solamente por el antisuero dirigido contra la PRL 16K. En concordancia con este hecho en ensayos donde la estructura terciaria de la molécula se conserva, la especificidad de ambos antisueros se conserva, por ejemplo, existe una muy baja reactividad cruzada (1-2%) entre los RIEs de PRL 23K y 16K correspondientes<sup>107</sup>. Más aún, en la inmunocitoquímica donde se utiliza un antisuero dirigido contra la PRL 16K, dicho antisuero claramente reconoció antígenos tipo PRL en el SHN, mientras que el antisuero dirigido contra la PRL 23K fue incapaz de detectar dichos antígenos<sup>107</sup>.

Estos resultados en su conjunto, indican la presencia de PRLs biológicamente activas en el eje hipotálamoneurohipofisario de la rata, y particularmente sugieren que la proteína de 14kDa podría involucrarse en la regulación de la angiogénesis.

Pero cuál es el origen de esta proteína de bajo peso molecular? Es resultado de un procesamiento proteolítico de la forma precursora de 23kDa?

En respuesta a estas preguntas se determinó que el ARNm presente en el sistema hipotálamoneurohipofisario corresponde en tamaño al que codifica para la PRL 23K. En ningún caso se detectaron transcritos de menor tamaño que pudiesen codificar para la proteína inmunorreactiva de 14kDa (Figura 5, Trabajo A). Este hecho contrasta con un reporte del grupo de Emanuele<sup>102</sup> en donde detectan un transcrito que carece del exón 4 del gen y que codifica aparentemente para una proteína de 16kDa. En nuestro estudio se descartó esa posibilidad utilizando como cebador (primer) para la amplificación justamente ese exón.

Esto nos sugirió que la proteína de 14kDa podía ser resultado del procesamiento postraducciona de la PRL 23K, tal como ocurre para la mayoría de las variantes moleculares de la misma. Para probar esta hipótesis analizamos si el sistema hipotálamoneurohipofisario contenía enzimas capaces de procesar

proteolíticamente a la PRL y generar a la variante cortada, precursor inmediato de la PRL 16K y posible precursor de la proteína de 14kDa.

El análisis de inmunotransferencia de los sobrenadantes de cada incubación, en condiciones no reductoras, mostró que ambos tejidos eran capaces de generar una forma cortada, y el procesamiento de la misma mostró, bajo condiciones reductoras al fragmento de 16kDa (Figura 6, Trabajo A). Estos resultados sugieren que la PRL 14K probablemente es resultado de la proteólisis y reducción de la forma predominante de 23kDa.

Hasta ahora no es claro las implicaciones funcionales que pudiesen tener las PRLs neurohipofisarias, y especialmente las que pudiese tener la producción de una molécula antiangiogénica en el SHN. Probablemente la PRL 14K se pueda involucrar en la regulación de eventos de vascularización locales. Esta posibilidad es consistente con el hecho de que las neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos PV y SO son capaces de producir grandes cantidades del ARNm para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) el cual es un potente factor angiogénico<sup>116</sup>.

Sin embargo la naturaleza de la variante de 14kDa requiere de mayor estudio. Es requisito indispensable el obtener su secuencia primaria para su caracterización bioquímica y funcional.

## **Conclusiones:**

*Los resultados obtenidos sugieren como posibles conclusiones las siguientes:*

- 1. El eje hipotálamoneurohipofisario expresa el gen de la PRL.*
- 2. El transcrito codifica para una proteína de 23kDa, la cual se modifica postraduccionalmente por proteólisis generando a una variante de 14kDa.*
- 3. La PRL 16K es capaz de mediar efectos mitogénicos, lo cual sugiere que es capaz de formar el complejo dimérico activo con los receptores lactogénicos, y que probablemente conserva los dos sitios de reconocimiento.*
- 4. Las proteínas de 23 y 14kDa son bioactivas y corresponden a la propia PRL 23K y a un fragmento nuevo con un peso molecular aparente de 14kDa.*
- 5. La variante de 23kDa es capaz de mediar efectos mitogénicos en las células Nb2 aunque aparentemente lo hace con una potencia menor que la de la preparación de referencia.*
- 6. La variante de 14kDa promueve efectos antiangiogénicos propios sobre las células endoteliales, y su potencia es semejante a la de la mostrada por la preparación de referencia.*

## Bibliografía.

1. Herman, R.H. (1980) *The principles of metabolic control*. Inc. N.Y.
2. Bailieu, E.E. and Kelly, P.A. (1990) *Hormones: from molecules to disease*. Herman, Publishers, Paris France.
3. Kelly, P.A., Djiane, J., Postel-Vinay, M. and Edery, M. (1991) *Endoc. Rev.* **12**: 235-251.
4. Milligan, G. (1993) *TIBS* **14**: 239-244.
5. Gilman, A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 615-649.
6. Cali, J.J., Balcueva, E.A., Rybalkin, I. and Robshaw, J.D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 24023-24027.
7. Birnbaumer, L. and Brown, A.M. (1988) *Am. J. Physiol.* **254**: H401-H410.
8. Kleuss, C., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G. and Wittig, B. (1993) *Science* **259**: 832-834.
9. Kleuss, C., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G. and Wittig, B. (1992) *Nature* **358**: 424-426.
10. Kleuss, C., Hescheler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Schultz, G. and Wittig, B. (1991) *Nature* **353**: 43-38.
11. Tang, W. and Gilman, A.G. (1991) *Science* **254**: 1500-1503.
12. Taylor, S.S., Buechler, J.A. and Yonemoto, W. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 971-1005.
13. Charbonneau, H. and Tonks, N.K. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 463-493.
14. Nicoll, C.S. (1980) *Fed. Proc.* **39**: 2563-2566.
15. Sinha, Y.N. (1995) *Endoc. Rev.* **16**: 354-369.
16. Sinha, Y.N. (1992) *TEM* **3**: 100-106.
17. Smith, C.R. and Norman, M.R. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **27**: 542-550.
18. Walker, A.M. (1994) *TEM* **5**: 195-200.
19. Brooks, C.L. and Kim, B.G. (1993) *Biochem. J.* **296**: 41-47.
20. Oetting, W.S., Tuazon, P.T., Traugh, J.A. and Walker, A.M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 1649-1652.
21. Andries, M., Tilemans, D. and Denef, C. (1992) *Biochem. J.* **281**: 393-400.
22. Mitra, I. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 1750-1759.
23. Mitra, I. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 1760-1767.
24. Young, K.H., Buih, W.C., Horseman, N., Davis, J., Kraeling, R., Linzer, D. and Bazer, F.W. (1990) *Mol. Cell. Endocrinol.* **71**: 155-162.
25. Fraser, I.S. and Lun, Z.G. (1990) *Obstetrical and Gynecol. Survey* **45**: 515-519.
26. McGrath, M., Palmer, S. and Nandi, S. (1985) *J. Cell Physiol.* **125**: 182-188.
27. Clapp, C., Sears, P.S., Russell, D.H., Richards, J., Levay-Young, B.K. and Nicoll, C.S. (1988) *Endocrinology* **122**: 2892-2898.
28. Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P.A. and Djiane, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 824-828.
29. Tanaka, T., Shiu, R.P., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L. and Friesen, H.G. (1980) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**: 1058-1063.
30. Russell, D.H., Buckley, A.R., Montgomery, D.W., Larson, N.A., Gout, P.W., Beer, C.T., Putman, C.W., Zukoski, C.F. and Kibler, R. (1987) *J. Immunol.* **138**: 276-284.
31. Subramanian, M.G. and Gala, R.R. *J. Clin. Immunoassay* **9**: 42-52.
32. Smith, C.R. and Norman, M.R. (1990) *Ann. Clin. Biochem.* **27**: 542-550.
33. Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S. and Nicoll, C.S. (1993) *Endocrinology* **133**: 935-938.
34. Clapp, C. (1987) *Endocrinology* **121**: 2055-2064.
35. Sinha, Y.N., Gilligan, T.A., Lee, D.W., Hollingsworth, D. and Markoff, E. (1985) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**: 239-243.
36. Andries, M., Tilemans, D. and Denef, C. (1992) *Biochem. J.* **281**: 393-400.
37. Clapp, C. and Weiner, R.J. (1992) *Endocrinology* **130**: 1380-1386.
38. Clapp, C., Sears, P.S. and Nicoll, C.S. (1989) *Endocrinology* **125**: 1054-1059.
39. Ferrara, N., Clapp, C. and Weiner, R. (1991) *Endocrinology* **129**: 896-900.
40. Clapp, C., Martial, J.A., Guzmán, R.C., Rentier-Delrue, F. and Weiner, R.J. (1993) *Endocrinology* **133**: 1292-1298.
41. Klagsbrun, M. and Folkman, J. (1985) *Growth Factors. Chapter 37*.
42. Folkman, J. (1984) *Lab. Investigation* **51**: 601-604.
43. Folkman, J. (1985) *Adv. Cancer Res.* **43**: 175-199.
44. Liotta, L.A., Steeg, P.S. and Stetler-Stevenson, W.G. (1991) *Cell* **64**: 327-336.
45. Folkman, J. and Haudenschild, C. (1980) *Nature* **288**: 551-556.
46. Basilico, C. and Moscatelli, D. (1992) *Adv. Cancer Res.* **59**: 115-165.
47. Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987) *Science* **235**: 442-447.
48. Auerbach, W. and Awerbach, R. (1994) *Pharmac. Ther.* **63**: 265-311.
49. Moses, M.A., Sudhalter, J. and Langer, R. (1990) *Science* **248**: 1408-1410.
50. Taraborelli, G., Roberts, D., Liotta, L.A. and Giavazzi, R. (1990) *J. Cell Biol.* **111**: 765-772.

51. Heimark, R.L., Twardzik, D.R. and Schwartz, S.M. (1986) *Science* 233: 1078-1080.
52. Yang, E.Y. and Moses, H.L. (1990) *J. Cell Biol.* 111: 731-741.
53. Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C. and Taylor, S. (1983) *Science* 221: 719-725.
54. Crum, R., Szabo, S. and Folkman, J. (1986) *Science* 230: 1375-1378.
55. Ingber, D.E., Madri, J.A. and Folkman, J. (1986) *Endocrinology* 119: 1768-1775.
56. Bazan, J.F. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 788-795.
57. Taniguchi, T. (1995) *Science* 268: 251-255.
58. Boutin, J.M., Jolicœur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Edery, M., Shiota, M., Banville, D., Dusanter-Fourt, I., Djiane, J. and Kelly, P.A. (1988) *Cell* 53: 69-77.
59. Ouhiti, A., Morel, G. and Kelly, P.A. (1993) *Endocrinology* 133: 135-144.
60. Katoh, M., Raguét, S., Zachwieja, J., Raguét, S. and Kelly, P.A. (1987) *Endocrinology* 120: 793-749.
61. Okamura, H., Zachwieja, J., Raguét, S. and Kelly, P.A. (1989) *Endocrinology* 124: 2499-2508.
62. Shiu, R.P.C., Elsholtz, H.P., Tanaka, T., Friesen, H.G., Gout, P.W., Beer, C.T. and Noble, R.L. (1983) *Endocrinology* 113: 159-165.
63. Lesueur, L., Edery, M., Paly, J., Clark, J., Kelly, P.A. and Djiane, J. (1990) *Mol. Cell. Endocrinol.* 71: R7-R12.
64. Wallis, M. (1988) *Hormones and their actions Part II*. Chapter 14. Elsevier Science Publishers, BV.
65. Berridge, M.J. (1993) *Nature* 361: 315-325.
66. Tang, W.J. and Gilman, A.G. (1992) *Cell* 70: 869-872.
67. Fhu, G., Colosi, P., Wood, W.I. and Wells, J.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 5376-5381.
68. de Vos, A.M., Ullrich, A. and Kossiakoff, A.A. (1992) *Science* 255: 306-312.
69. Rui, H., Lebrun, J.J., Kirken, R.A., Kelly, P.A. and Farrar, W.L. (1994) *Endocrinology* 135: 1299-1306.
70. Russell, S.M., Johnston, J.A., Noguchi, M., Kawamura, M., Bacon, C.M., Friedmann, M., Berg, M., McVicar, D.W., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Goldman, A.S., Schmalstieg, F.C., Ihle, J.N., O'Shea, J.J. and Leonard, W.J. (1994) *Science* 266: 1042-1047.
71. Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B. and Silvennoinen, O. (1994) *TIBS* 19: 222-227.
72. Argetsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., J.N. and Carter-Su, C. (1993) *Cell* 74: 237-244.
73. Lebrun, J.J., Ali, S., Sofer, L., Ullrich, A. and Kelly, P.A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 14021-14026.
74. Stahl, N. and Yancopoulos, G.D. (1993) *Cell* 74: 587-590.
75. Darnell, J.E., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994) *Science* 264: 1415-1421.
76. DaSilva, L., Haward, O.M.Z., Rui, H., Kirken, R.A. and Ferrar, W.L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 18267-18270.
77. Pawson, T. and Gish, G.D. (1992) *Cell* 71: 359-362.
78. Hiroshi, W., Schmitt-Ney, and Bernd, G. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 16365-16370.
79. Wakao, H., Gouylleux, F. and Groner, B. (1994) *EMBO J.* 13: 2182-2191.
80. Kishimoto, T., Taga, T. and Akira, S. (1994) *Cell* 76: 253-262.
81. Horsman, N.D. (1994) *Endocrinology* 135: 1289-1291.
82. Cobrinik, D., Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Mlynarczyk, S. and Weinberg, R.A. (1992) *TIBS* 20: 312-315.
83. Kouzarides, T. (1993) *TICB* 3: 211-213.
84. Levine, A.J. (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62: 623-651.
85. D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J. and Weiner, R.I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6374-6378.
86. Wilson, J.D. and Foster, D.W. (1992) *Text book of Endocrinology*. 4th Ed. M.K. Belgrade, Yugoslavia.
87. Gutiérrez-Ospina, G. (1995) *Localización inmunocitoquímica de un antígeno inmunorreactivo a la PRL 16K en el sistema hipotálamo-neurohipófisis de la rata*. Tesis de grado.
88. Torner, L. (1993) *Detección de la PRL 16K en la circulación e hipófisis de la rata*. Tesis de grado.
89. Torner, L., Mejía, S., López-Gómez, F.J., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G. and Clapp, C. (En prensa) *Endocrinology*.
90. Mendoza-Sierra, L.A. (1993) *Caracterización de la secreción de la PRL cortada y la PRL 16KD por células adenohipofisarias de rata*. Tesis de Licenciatura.
91. Hardman, D.P., Holaday, J.W. and Berntson, E.W. (1989) *FASEB J.* 3: 2194-2202.
92. Rillema, J.A. and Lawson, D.M. (1994) *PSEBM* 205: 75-79.
93. Gala, R.R. and Shevach, E.M. (1993) *PSEBM* 205: 12-19.
94. Montgomery, D.W., Shen, G.K., Ullrich, E.D., Steiner, L.L., Parrish, P.R. and Zukoski, C.F. (1992) *Endocrinology* 131: 3019-3026.



95. Fuxe, K., Hokfelt, T., Eneroth, P., Gustavsson, J. and Skett, P. (1977) *Science* **196**: 899-900.
96. DeVito, J.W., Connors, J.M. and Hedge, G.A. (1987) *Neuroendocrinol.* **46**: 155-161.
97. Harlan, R.E. and Sacamell, J.G. (1991) *J. Histochem. and Cytochem.* **39**: 221-224.
98. Toubeau, G., Desclin, J., Parmentier, M. and Pasteels, J.L. (1979) *J. Encocr.* **83**: 261-268.
99. Dutt, A., Kaplitt, N.C., Kow, L. and Pfaff, D.W. (1994) *Neuroendocrinol.* **59**: 413-419.
100. DeVito, W.J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 599-604.
101. Shah, G.N. and Hymer, W.C. (1989) *Mol. Cellular Endocrinol.* **61**: 97-107.
102. Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Marinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. and Laurence, A.M. (1986) *Neuroendocrinol.* **44**: 217-221.
103. Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Marinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. and Laurence, A.M. (1987) *Brain Res.* **421**: 255-262.
104. Chiu, S., Koos, R.D. and Wise, P.M. (1992) *Endocrinology* **130**: 1747-1749.
105. Scharter, B.S., Durgierian, S., Harlan, R.E., Pfaff, D.W. and Shivers, B.D. (1984) *Endocrinology* **114**: 1947-1949.
106. Wilson III D.M., Emanuele, N.V., Jurgens, J.K. and Kellei, M.R. (1992) *Endocrinology* **131**: 2488-2490.
107. Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Nagano, M., Kelly, P., Mejía, S., Morales, M. and Martínez de la Escalera, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10384-10388.
108. López-Gómez, F.J., Torner, L., Mejía, S., Martínez de la Escalera, G. and Clapp, C. (1995) *Endocrine* **3**: 573-578.
109. Fhu, G., Cunningham, C., Fukanaga, R., Nagata, S., Goeddel, D.V. and Wells, J.A. (1992) *Science* **256**: 1677-1680.
110. Cunningham, B.C. and Wells, J.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 3407-3411.
111. Cunningham, B.C. and Wells, J.A. (1989) *Science* **244**: 1081-1085.
112. Wang, X., Moller, C., Norstedt, G. and Carter-Su, C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 3563-3579.
113. Rui, H., Djeu, J.Y., Evans, G.A., Kelly, P.A. and Farrar, W.L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 24076-24081.
114. Scammell, J.G., Wear, L.B. and VonHaven, R. (1990) *Mol. Cell Endocrinol.* **71**: 125-131.
115. Scammell, J.G., Scatt, M.G., Outlaw, K.K., Thompson, M.E., Seung, J.O. and Belen, R.B. (1990) **38**: 117-122.