

RESUMEN

La hormona paratiroidea (PTH) es un importante mediador de la remodelación ósea y actúa como regulador esencial de la homeostasis del calcio. Dependiendo del tipo y del contexto celular, PTH puede también inhibir o promover la apoptosis. La apoptosis, una forma de muerte celular programada, es un proceso fundamental para el crecimiento y desarrollo normal, la respuesta inmune, la remodelación de los tejidos, y la homeostasis del epitelio intestinal.

En este trabajo de tesis se demostró, por primera vez, la localización y expresión del receptor de PTH tipo 1 (RPTH1) en las células epiteliales Caco-2, derivadas de adenocarcinoma de colon humano. El receptor, se localiza en la membrana plasmática, el citoplasma y el núcleo de estas células intestinales. Se comprobó que en las células Caco-2 el tratamiento con PTH disminuye el número de células viables e induce cambios morfológicos consistentes con la apoptosis: alteración de los filamentos de actina y consecuentemente de la forma celular, pérdida de las uniones intercelulares, externalización de la fosfatidilserina de membrana, distribución perinuclear de las mitocondrias, condensación nuclear y fragmentación del ADN.

Además, el tratamiento con PTH en estas células resultó en la desfosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad, su disociación de la proteína 14-3-3 y su translocación a las mitocondrias con la consecuente liberación de los factores pro-apoptóticos citocromo c y Smac/Diablo desde las mitocondrias al citosol resultando finalmente en la activación de la enzima pro-apoptótica caspasa-3 y el clivaje de su sustrato PARP.

En estas células, la hormona provocó la desfosforilación de Akt (quinasa que controla el balance entre la supervivencia celular y la apoptosis e induce la fosforilación de Bad) mediante la serina/treonina fosfatasa PP2A. PTH además indujo la asociación de Akt con la subunidad catalítica de PP2A (PP2Ac), promovió la translocación de PP2Ac del citosol a las mitocondrias e incrementó la actividad de esta fosfatasa vía el AMP_c. PP2A también participó en la regulación de la viabilidad de las células Caco-2 dependiente de PTH y en el clivaje del sustrato de caspasa-3, PARP.

PTH no modificó los niveles de expresión proteica de p53, sugiriendo que, en estas células, la hormona es un estímulo apoptótico que induce la muerte celular por un mecanismo independiente de la expresión de p53.

PTH aumentó los niveles de la proteína 14-3-3 en el citosol y no se detectó la asociación entre 14-3-3 y RPTH1 en condiciones basales ni luego del tratamiento hormonal, sugiriendo que 14-3-3 no regularía la localización subcelular del RPTH1 en las células Caco-2.

Los resultados de este trabajo de tesis demuestran que PTH desencadena efectos pro-apoptóticos en las células Caco-2, y aportan información sobre los mecanismos moleculares de señalización que son estimulados por la hormona en estas células intestinales.

SUMMARY

Parathyroid hormone (PTH) functions as a major mediator of bone remodeling and as an essential regulator of calcium homeostasis. Depending on the cell type involved, PTH also inhibits or promotes the apoptosis. Apoptosis, a form of programmed cell death, is a fundamental process to normal growth and development, immune response, tissue remodeling, and homeostasis of the intestinal epithelium.

In this thesis work, we demonstrated, for the first time, the localization and expression of the PTH receptor type 1 (PTH1R) in the epithelial Caco-2 cells, a cell line derived from human colorectal adenocarcinoma. The receptor is present in plasma membrane, cytoplasm and nucleus of these intestinal cells.

In Caco-2 cells, PTH treatment diminished the number of viable cells. Moreover, the hormone induced disruption of actin filaments with changes to cellular shape, alteration of cell-to-cell junctions, externalization of membrane phosphatidylserine, mitochondrial cellular distribution to the perinuclear region, chromatin condensation and DNA fragmentation of the nucleus, which are morphological features consistent with apoptosis.

In addition, the treatment with PTH in these cells resulted in Bad dephosphorylation, its dissociation of 14-3-3 protein and its translocation to the mitochondria with the subsequent release of cytochrome c and Smac/Diablo to the cytosol which resulted in activation of downstream caspase-3 and degradation of its substrate PARP.

The hormone also decreased the phosphorylation of Akt (a kinase which controls the balance between cell survival and apoptosis and induces the phosphorylation of Bad) via the serine/threonine phosphatase PP2A. PTH also induced an association of Akt with the catalytic subunit of PP2A (PP2Ac), promoted the translocation of PP2Ac from the cytosol to the mitochondria and increased its phosphatase activity via the AMPK pathway. Furthermore, PP2A plays a role in hormone-dependent Caco-2 cells viability and in the cleavage of caspase-3 substrate PARP.

PTH did not modify the protein levels of p53, suggesting that the hormone is an apoptotic stimulus that induces cell death by a p53-expression independent mechanism in these cells.

PTH increased the amount 14-3-3 protein in the cytosol. However, the association of 14-3-3 with PTH1R was not detectable under basal conditions or after PTH treatment, suggesting that 14-3-3 does not regulate the subcellular localization of PTH1R in Caco-2 cells.

The results of this thesis provide, for the first time, evidence of pro-apoptotic effects of PTH in Caco-2 cells and information about the molecular mechanisms of PTH-mediated signaling pathway in these intestinal cells.