



Los factores de crecimiento para fibroblastos: relaciones estructura-función en una familia peculiar de proteínas con pluriempleo

G. Giménez Gallego

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

El concepto de pluriempleo aplicado a las proteínas es relativamente nuevo pero ayuda a explicar cómo sólo un 50% más de genes pueden dar lugar a diferencias tan enormes como las que se dan entre un hombre y un gusano. A lo largo de la evolución es obvio que los organismos se las han arreglado para ir desarrollando fisiologías cada vez más sofisticadas, aumentando al mínimo el número de genes que la sustentan. Para ello, los organismos, a medida que evolucionaban fueron desarrollando también una serie de mecanismos que les iban permitiendo sacar cada vez más partido a los genes que habían recibido de sus predecesores. De esta forma se ha llegado a extremos como el del hombre que con probablemente sólo treinta mil genes, puede dar cuenta de unas ciento cincuenta mil funciones bioquímicas diferentes, funciones que requieren siempre de la intervención específica de una proteína¹. Uno de los recursos utilizados disponer de proteínas suficientes para llevar a cabo tantos procesos, economizando lo más posible en genes, ha sido pluriemplearlas.

En la actualidad son numerosos los casos descritos de proteínas con multiplicidad de funciones. Uno de los primeros, si no el primero fue el de la neuroleukina y la glucosa-6-fosfato isomerasa². La neuroleukina es un factor de crecimiento crucial para el desarrollo del sistema nervioso. La glucosa-6-fosfato isomerasa es un enzima intracelular que cataliza el segundo paso de la glucólisis: la interconversión de la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. La caracterización estructural de las proteínas responsables de ambas funciones no deja duda: se trata, en ambos casos, de la misma proteína y cualquiera de ellas sintetizada por ingeniería genética sustituye perfectamente a la otra. Por si fuera poco la glucosa-6-fosfato isomerasa es también el denominado factor de movilidad endocrino, y el denominado mediador de diferenciación y maduración de las células mieloides. Lo curioso además es que en cada uno de estos procesos de señalización interviene un

receptor celular distinto. Como hemos apuntado unas líneas más arriba, el caso de la neuroleukina no es el único. En la actualidad hay más de veinte casos similares descritos². El caso de los factores de crecimiento para fibroblastos podría ser uno de ellos, aunque con sus peculiaridades, como veremos a continuación.

Los primeros en comunicar que existía un factor de crecimiento para fibroblastos fueron Trowell y cols.³ y, más tarde, Hoffman⁴ en los años 1939 y 1949, respectivamente. Sin embargo, no fue hasta 1978 cuando Gospodarowicz y cols. publicaron el primer artículo que daba cuenta de la purificación de este factor⁵. En realidad, lo que purificaban Gospodarowicz y cols. por aquellas fechas no era otra cosa que la proteína básica de mielina, lo que habría constituido el primer caso descrito de pluriempleo de proteínas, si no hubiera sido porque Thomas y cols.⁶ se encargaron poco después de demostrar que lo que Gospodarowicz y cols. purificaban, en realidad, era proteína básica de mielina contaminada con otras proteínas que eran de hecho las que estimulaban a los fibroblastos a entrar en mitosis. En el año 1984 Thomas y cols.⁷ describieron la purificación a homogeneidad, a partir de los preparados que habían descrito Gospodarowicz y cols. en 1978, de un polipéptido que pasó a denominarse factor de crecimiento para fibroblastos ácido para distinguirlo de otros presentes también en la preparación de Gospodarowicz y cols., de punto isoeléctrico básico, que eran capaces también de inducir mitosis en los cultivos de fibroblastos⁷. Meses después Böhlen y cols.⁸ purificaron de los extractos de Gospodarowicz y cols. una proteína con punto isoeléctrico básico con actividad mitogénica similar a la purificada por Thomas y cols.⁷ que pasó a llamarse factor de crecimiento para fibroblastos básico. La secuenciación de ambas proteínas^{9,10} puso de manifiesto que se trataba de dos polipéptidos muy similares, como queda recogido en la figura 1 (el factor de crecimiento para fibroblastos ácido como

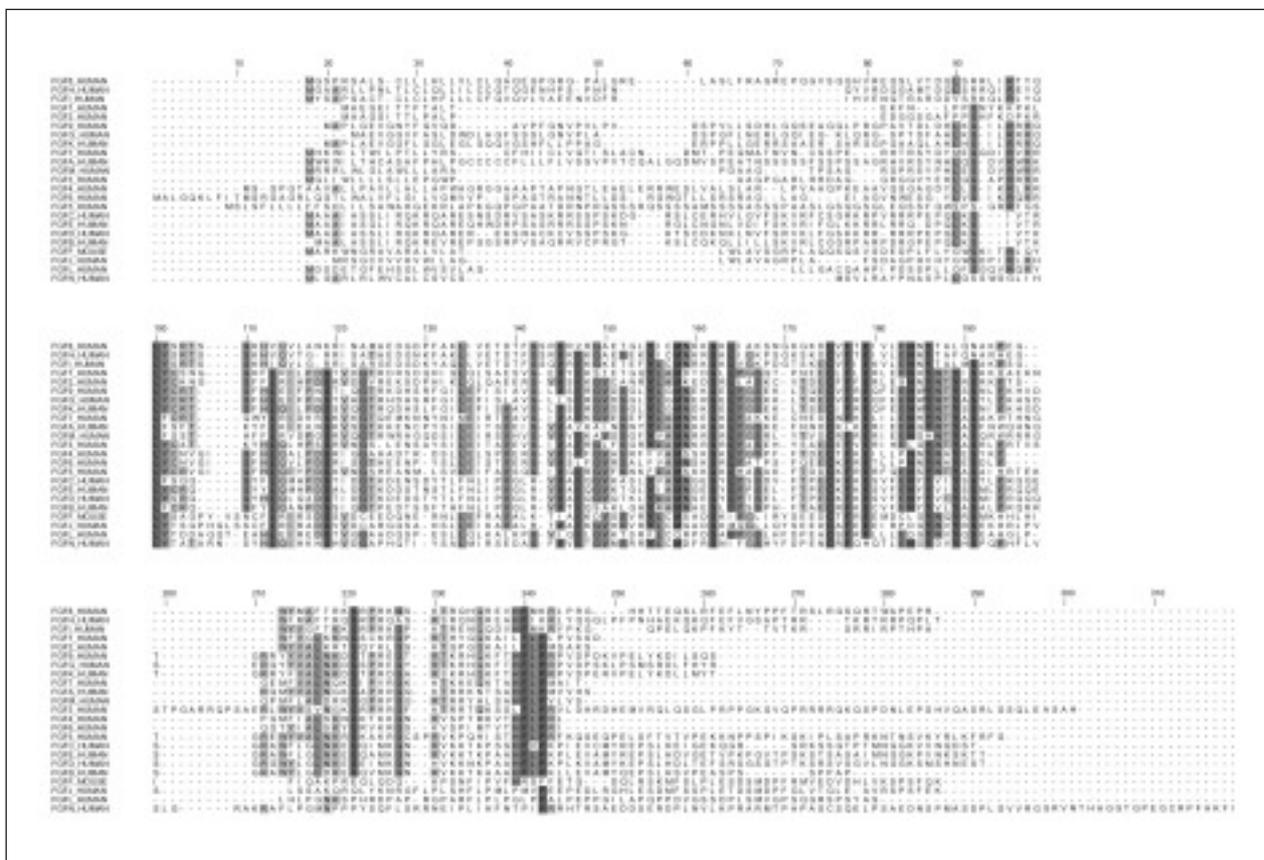


Fig. 1.—Homología de las secuencias de los veintiún factores de crecimiento para fibroblastos identificados en la actualidad.

FGF1 y el básico como FGF2). Desde esas fechas hasta nuestros días el grupo de los factores de crecimiento para fibroblastos ha ido haciéndose cada vez mayor de forma que, como aparece en la misma figura, comprende, en estos momentos, veintitrés polipéptidos distintos. Muchos de estos polipéptidos se han detectado a través de sus genes y no han estado disponibles aún en cantidades y condiciones adecuadas para su caracterización bioquímica y química.

La mayor parte de los estudios fisiológicos, al nivel de célula y organismo completo, se han llevado a cabo utilizando los factores de crecimiento ácido y básico que juegan el papel de arquetipo de todo el grupo. Estos estudios han implicado a estas proteínas en numerosas y muy variadas funciones fisiológicas. En muchos casos, estas funciones no son sino procesos de crecimiento, diferenciación, y mantenimiento de la viabilidad celular. Sin embargo, en muchos otros el papel de los factores de crecimiento para fibroblastos se asemeja más al de una hormona clásica que al de un factor de crecimiento típi-

co¹¹. Es tan elevado ya hoy día el número de este tipo de actividades de tipo hormonal que se han descrito que parece obvio que los FGF1 y FGF2 deben de incluirse en el grupo de las proteínas con pluriempleo. Hasta qué punto es del todo ajustada esta clasificación, hoy por hoy, es difícil de saber, pues podría ocurrir que muchas de estas funciones estén encomendadas en el organismo a los distintos miembros de la familia de los recogidos en el figura 1. Sin embargo, ello implicaría, por lo menos, que algunos miembros de la familia como los FGF1 y FGF2 tienen una cierta capacidad de pluriemplearse y hacerse cargo de las funciones encomendadas a otros miembros de la familia. Este tipo de sustitución no debe ser algo sólo de laboratorio, sino que debe ocurrir también a nivel del organismo completo. Nosotros, por ejemplo, hemos demostrado que la aparición de la hipertensión de las llamadas «ratas espontáneamente hipertensas» va asociada a una desaparición progresiva del FGF2 asociado al endotelio, pero que la situación de normotensión puede restablecerse suministrándole al endotelio FGF1¹².

Una sustitución de este tipo debe, probablemente, andar detrás de las observaciones de Miller y cols.¹³, que generaron una estirpe de ratones con los genes que codifican para el FGF1 y el FGF2 bloqueados, sin que ello tuviera consecuencias aparentemente importantes para su fisiología. Nuestros estudios estructurales apoyan también la idea de que al menos en determinadas formas del factor de crecimiento para fibroblastos se da también el pluriempleo.

Una de las características típicas de las proteínas con varias funciones, es que estas últimas, a veces, están encomendadas especialmente a zonas específicas diferentes de su estructura tridimensional^{1,2}. Cuando Cuevas y cols.¹⁴ describieron la función vasodilatadora aguda de los factores de crecimiento para fibroblastos, pusimos de manifiesto también que determinadas formas del FGF1 obtenidas mediante ingeniería de proteínas, que no eran mitogénicas, seguían siendo vasodilatadoras. Se trataba de unas observaciones parecidas a las llevadas a cabo por Isacchi y cols.¹⁵ con respecto a la actividad mitogénica y a la capacidad de estimular la síntesis de activador del plasminógeno por las células endoteliales. Al tratar de determinar a nivel estructural por qué en determinadas formas del FGF1 desaparecía la actividad mitogénica mientras continuaba prácticamente intacta la actividad vasodilatadora, Lozano y cols.¹⁶ se encontraron con que una de las nuevas formas de la proteína que tuvieron que generar a lo largo de su trabajo tenía una actividad vasodilatadora claramente baja y una capacidad prácticamente normal de inducir mitogénesis. La determinación y la subsiguiente comparación recíproca de las estructuras tridimensionales de las formas i) nativa, ii) no mitogénica y vasoactiva, y iii) mitogénica y no vasoactiva del FGF1, puso de manifiesto que las actividades mitogénica y vasodilatadora, respectivamente, del FGF1 dependen de zonas específicas diferentes de la proteína¹⁶. Es muy probable que la zona vasodilatadora sea también la responsable principal de los efectos cardioprotectores y neuroprotectores agudos de los factores de crecimiento para fibroblastos, así como de sus efectos sobre la conducta¹⁷⁻¹⁹.

Los factores de crecimiento para fibroblastos son reconocidos por el mismo tipo de receptor celular, y presentan una afinidad notable por la heparina. Los receptores para los factores de crecimiento para fibroblastos son muy numerosos. Se ha calculado que podría haber hasta 96 diferentes²⁰. Todos ellos derivan por modificación postranscripcional de cuatro genes cuyos productos tienen también una secuencia altamente homóloga²¹. Excepto en el caso del FGF1 que es reconocido por todos los receptores estudiados, la afinidad de los dife-

rentes receptores por los distintos miembros de la familia de los factores de crecimiento para fibroblastos puede variar mucho de un caso a otro²². De acuerdo con los principios de la biología estructural clásica cabría esperar que las distintas actividades, por ejemplo, del FGF1 estuvieran mediadas por receptores celulares distintos que reconocieran bien la región «vasoactivadora» o bien la región «mitogénica». Es lo que ocurre con otras proteínas con pluriempleo. Es obvio que entre la amplísima variedad de receptores para los factores de crecimiento que pueden generarse a partir de los cuatro genes que los codifican podrían existir unos que fueran específicos para el reconocimiento de la zona «vasodilatadora» de la proteína y otros para el de la «mitogénica». Los primeros transmitirían una señal vasodilatadora y los segundos una mitogénica. Sin embargo, podría ocurrir también que con el mismo receptor se formaran tipos distintos de complejo con el ligando que, consecuentemente, transmitieran señales diferentes a la célula, en función del peso del reconocimiento del factor de crecimiento para fibroblastos por la zona «vasodilatadora» o «mitogénica», respectivamente, a la hora de formarse el complejo. Sería, incluso, probable que el contexto celular o tisular tenga un papel determinante decisivo en que ocurra un tipo u otro de reconocimiento. Que pueden formarse diferentes complejos receptor:factor de crecimiento para fibroblastos, que darían lugar a respuestas celulares distintas, es algo que queda claramente demostrado en los estudios de Kudla y cols.²³. La existencia de diferentes señales intracelulares puestas en marcha por la unión del factor de crecimiento para fibroblastos a su receptor fue demostrada ya hace algún tiempo^{24,25}. Recientemente, Dell'Era y cols.²⁶ han demostrado que de los siete residuos de tirosina que se pueden autofosforilar en el dominio intracelular del receptor del factor de crecimiento para fibroblastos al formarse el complejo receptor:ligando, los implicados en hacer que la célula ponga en marcha la síntesis del activador del plasminógeno y la mitogénesis son distintos.

En resumen, el factor de crecimiento para fibroblastos presenta características típicas de las proteínas con pluriempleo: actividades diversas; implicación de regiones diversas de su estructura en esta diversidad de funciones. Por otra parte, y esto es lo peculiar, existe una gran redundancia de formas con funciones equivalentes, lo que parece estar en contradicción con la interpretación generalmente más aceptada, que el fenómeno de pluriempleo tiene su origen en la necesidad de ahorrar material genético.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a Rosa M. Lozano las sugerencias y la corrección del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Petsko GA: Size doesn't matter. *Genome Biol* 2: 1003.1-1003.2, 2001.
2. Jeffery C: Moonlighting proteins. *Trends in Biol Sci* 24: 8-11, 1999.
3. Trowell OA, Chir B, Willmer EN: Growth of tissues *in vitro*. VI. The effects of some tissue extracts on the growth of periosteal fibroblasts. *J Exp Biol* 16: 60-70, 1939.
4. Hoffman RS: The growth-activating effect of extracts of adult and embryonic tissues of the rat on fibroblast colonies in culture. *Growth* 4: 361-376, 1940.
5. Gospodarowicz D, Mescher AL, Birdwell CR: Control of cellular proliferation by the fibroblast ad epidermal growth factors. *Natl Cancer Inst Monogr* 48: 109-130, 1978.
6. Thomas KA, Riley MC, Lemmon SK, Baglan NC, Bradshaw RA: 1980. Brain fibroblast growth factor: nonidentity with myelin basic protein fragments. *J Biol Chem* 255: 5517-5520.
7. Thomas KA, Rios-Candelore M, Fitzpatrick S: Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 357-361, 1984.
8. Böhlen P, Baird A, Esch F, Ling N, Gospodarowicz D: Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5364-5368, 1984.
9. Giménez-Gallego G, Rodkey J, Bennett C, Rios-Candelore M, DiSalvo J, Thomas KA: Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science* 230: 1385-1388, 1985.
10. Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Böhlen P, Guillemin R: Primary structure of bovine pituitary fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6507-6511, 1985.
11. Giménez-Gallego G, Cuevas P: Fibroblast growth factor, a protein with a broad spectrum of biological activities. *Neurological Res* 16: 313-316, 1994.
12. Cuevas P, García-Calvo M, Carceller F, Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Muñoz-Willery I, Martínez-Coso V, Lamas S, Giménez-Gallego G: Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11996-12001, 1996
13. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C: Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Molecular and Cellular Biology* 20: 2260-2268, 2000.
14. Cuevas PF, Carceller S, Ortega M, Zazo I, Nieto G, Giménez-Gallego: Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 254: 1208-1210, 1991.
15. Isacchi A, Statuto M, Chiesa R, Bergonzoni L, Rusnati M, Sarmientos P, Ragnotti, Presta MG: A six-amino acid deletion in basic fibroblast growth factor dissociates its mitogenic activity from its plasminogen activator-inducing capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2628-2632, 1991.
16. Lozano RM, Pineda-Lucena A, González C, Jiménez MA, Cuevas P, Redondo-Horcajo M, Sanz JM, Rico M, Giménez-Gallego G: Non-mitogenic, vasodilatory, ischemia-protector and neuromodulatory acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 39: 4982-4993, 2000.
17. Cuevas P, Carceller F, Lozano RM, Zazo M, Giménez-Gallego G: Protection of rat myocardium by mitogenic and non-mitogenic fibroblast growth factor during post-ischemic reperfusion. *Growth Factors* 15: 29-40, 1997.
18. Cuevas P, Carceller F, Muñoz-Willery I, Giménez-Gallego G: Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury. *Surg Neurol* 49: 77-84, 1998.
19. Guaza C, García-Andrés C, Sandi C, Muñoz-Willery I, Cuevas P, Giménez-Gallego G: Fibroblast growth factor decreases locomotor activity in rats. *Neuroscience* 75: 805-813, 1996.
20. Xu JM, Nakahara M, Crabb JW, Shi EG, Matuo Y, Fraser M, Kan M, Hou JZ, Mckeehan WL: Expression and immunohistochemical analysis of rat and human fibroblast growth factor receptor (flg) isoforms. *J Biol Chem* 267: 17792-17803, 1992.
21. Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA: Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases -molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1135: 185-199, 1992.
22. Ornitz DM, Xu JS, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao GX, Goldfarb M: Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271: 15292-15297, 1996.
23. Kudla AJ, Jones NC, Rosenthal RS, Arthur K, Clase KL, Olwin BB: The FGF receptor-1 tyrosine kinase domain regulates myogenesis but is not sufficient to stimulate proliferation. *J Cell Biol* 142: 241-250, 1998.
24. Mohammadi M, Dionne CA, Li W, Li N, Spivak T, Honegger AM, Jaye M, Schlessinger J: Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature* 358: 681-684, 1992.
25. Spivak-Kroizman T, Mohammadi M, Hu P, Jaye M, Schlessinger J, Lax I: Point mutation in the fibroblast growth factor receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 269: 14419-14423, 1994.
26. Dell'Éra P, Mohammadi M, Presta M: Different tyrosine autophosphorylation requirements in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis. *Mol Biol Cell* 10: 23-33, 1999.