

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

LAS ISOFORMAS DE ENDOGLINA EN LA SEÑALIZACIÓN DEL TGF β 1

Tesis Doctoral

SORAYA VELASCO GONZÁLEZ

Salamanca, 7 de Febrero de 2009





VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

LAS ISOFORMAS DE ENDOGLINA EN LA SEÑALIZACIÓN DEL TGF β 1

Tesis Doctoral

SORAYA VELASCO GONZÁLEZ

Salamanca, 7 de Febrero de 2009

D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por **Dña. Soraya Velasco González** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título: *“Las isoformas de endoglina en la señalización del TGFβ1”* ha sido realizada bajo la dirección conjunta de la Doctora Dña. Alicia Rodríguez Barbero y del Doctor D. José Miguel López Novoa, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 9 de Diciembre de 2008.

Fdo: D. Rafael Jiménez Fernández

LA DOCTORA DÑA. ALICIA RODRÍGUEZ BARBERO, PROFESORA CONTRATADA DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA, CATEDRÁTICO DE FISIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado, *“Las isoformas de endoglina en la señalización del TGFβ1”* presentado por Dña. Soraya Velasco González para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y considerando que cumple las condiciones necesarias lo consideran finalizado, y autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 9 de Diciembre de 2008

Fdo: Dña. Alicia Rodríguez Barbero

Fdo: D. José M. López Novoa

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con las siguientes ayudas:

Beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU)
concedida por el ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Beca del “Instituto Reina Sofía” de la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo

A mi familia
A Miguel

*“Pelea por lo que quieres y no desesperes si algo no va bien...
Hoy puede ser un gran día, y mañana también”.*
-J.M. Serrat-

*“Porque las cosas no se acaban si un final,
la puerta se abre sólo tienes que entrar”*
-Jorge Ruiz -

La tesis es sólo una pequeña parte de todo lo que ha sido mi vida en el laboratorio. En el trabajo del laboratorio pasa como dice la canción *“hay días que parece que nunca se va a apagar el sol, y otros son más tristes que una despedida en la estación”*. La gente que te apoya cada día es la que hace que los días grises sean menos grises, la que hace posible que muchos días brille el sol, la que ha hecho posible esta tesis. Porque esta tesis es el resultado del esfuerzo, comprensión y ayuda que me han brindado un gran número de personas. Me faltaría espacio para agradecer a todos los que han estado a mi lado y desde luego no puedo de dejar de dar las gracias a todos ellos.

En primer lugar agradezco a mis directores de tesis todo su esfuerzo para que esta tesis haya podido tener lugar. A José Miguel tengo que agradecerle que me abriera las puertas de su laboratorio y me invitara a formar parte de él. Gracias por todas las sugerencias, comentarios y correcciones; espero no haberte decepcionado. Y a Alicia, por tu energía, dedicación y perseverancia. Gracias por enseñarme, aconsejarme y apoyarme siempre; por todo lo que has peleado por nosotros, por habernos dado la libertad de crecer y madurar en el laboratorio.

En segundo lugar a mis compañeros del laboratorio, aquellos que te alegran el día a día entre pipetas y tubos de ensayo. Y claro, no podría empezar por otro que no fuera el mío, el S-15. Gracias a todos los que ya no estáis pero estuvisteis, porque también formáis parte de esta tesis, especialmente a Fernando, que me enseñó a valerme en el laboratorio, y a Gabriela, más que una compañera, una amiga (no sabes cuanto te he echado de menos). Y gracias a los que están: Miguel (mi compañero de pupitre desde el primer día de carrera, imposible agradecer en pocas palabras todo lo que has hecho por mí, gracias por pasar esto conmigo), Andrea (que ha tenido que soportarme en los últimos días de mayor estrés; contigo es imposible aburrirse!) y Mónica (nuestra “visita”; el poco tiempo que hemos pasado juntas y el cariño que te tengo). Del resto del grupo, gracias Maite, todo lo que hemos vivido, todo lo que nos hemos reído, y llorado, todo eso, no nos lo va a quitar nadie. Has sido uno de mis grandes apoyos aquí, una amiga la mayor parte del tiempo. Gracias por todos los buenos momentos, que han sido muchos. Y el guión de la serie sigue esperando, je, je. Mis niñas gallegas, María y Bárbara, gracias por la

confianza, por las preguntas y las consultas; pero sobre todo por todos esos abrazos en los días tristes, esos no se olvidan. Os quiero. Penélope, Laura y Begoña, gracias por las charlas, los cafés, Londres, las risas y por vuestro ánimo. Marta, ex-compi del 15 y ahora compañera del 19, porque compartiste gran parte del inicio. Omar, mi colchonero favorito, que gracias por todo, por ser así, por escucharme y por la compañía nocturna en el laboratorio. Rebeca gracias por nuestras charlas, por las tardes de risas y juegos, por nuestros “bailes” y nuestros programas. No cambies nunca. Rodrigo, de Parasitología, (quién sino), gracias por todos los momentos compartidos, por los buenos ratos y las risas en el laboratorio y fuera de él. Y, muchas gracias Luisa, compañera de cada tarde, por todo tu apoyo y por tu cariño. Por supuesto gracias al resto de compañeros: Isa, Sandra, Yaremi, Ana, Anette, Lucía, M^a José, y mis ex-vecinos del S-16 que tanta buena compañía nos han dado, Roula, Nieves y Carlos.

Agradecer también a todos los jefes las facilidades que nos prestan cada día para que nuestro trabajo se lleve a cabo, y por todos los comentarios y sugerencias científicas: Ana, Carlos, Neli, Fran y especialmente a Fernando (por aquí se te echa de menos más de lo que crees. Gracias por tus bromas y por tus buenos consejos).

Por supuesto he de agradecer al doctor Peter ten Dijke, que me brindó la oportunidad de formar parte de su laboratorio durante 4 meses. *Dank u wel*. A todos mis compañeros de allí; en especial a Lia y a Carola que hicieron mi día a día mucho más fácil.

También querría agradecer al Dr. Blanco que me haya resuelto pacientemente tantas dudas, y desde la distancia me haya enseñado unas cuantas cosas sobre la endoglina.

Saliendo de las “cuatro paredes del laboratorio” dar las gracias a Bárbara, autora de la foto de esta tesis (muchas gracias, eres una artistaza), una amiga que forma parte del mundo que hizo que me enamorara del verde y de los castores, un mundo que me ayudó en muchos momentos y que me enseñó grandes cosas. Gracias.

Y llegando al final los agradecimientos más importantes. A mis amigos; a aquellos que conocí en Holanda, que hicieron que mi estancia allí fuera algo especial

e irrepetible: Markel (o el señor Montesdeoca), César (mi maño preferido), Massi y Mario (gracias por hacerme la mejor pasta que he comido nunca) y Paulita. Y especialmente a mis niñas María e Irene, y mis “hermanas” Cinta y Lucía. Gracias, chicas, por ser mi familia, por animarme y apoyarme cada día que salía del laboratorio, por todo lo que vivimos y compartimos. Os quiero mucho.

A mis amigos, los que siempre están ahí, los que me han apoyado, aguantado, querido desde hace ya muchos años. Parte de lo que soy, de lo que hago es culpa de ellos y parte de esta tesis también. Con vosotros me quedo sin palabras. Os quiero muchísimo. Alex, gracias por estar en mi vida, por todo lo que has compartido conmigo, por ser así. Lorena, *Pipistrellus* o “Vine del Norte”, toda una carrera juntas y seguimos en esto juntas, gracias por estos más de diez años y por seguir ahí a pesar de todo. Daddy, gracias por como eres, por tus detalles, tu bondad, por quererme, por tus constantes muestras de apoyo y por la ayuda en las correcciones. Rafa, por ser mi diccionario particular, por las risas y las charlas. Paula, por los momentos compartidos, por los ánimos y por ser “L dispuesta”, tú ya me entiendes. Juan, “que nunca llevo el corazón encima, por si me lo quitan” por seguir ahí, por el apoyo en los momentos difíciles, por vivir muy de cerca el ecuador de esta tesis, por ser Malack.

Y a ti. Gracias Peri, por enseñarme a luchar, por empujarme, por tu apoyo, por estar ahí cada día, por lo que me has enseñado, por todo lo que me has ayudado y animado (“..por eso, ni hambre ni frío, ni miedo ni sueño”). Esta tesis es también tuya. Te quiero.

Y por último, y sin embargo los más importantes, mi familia. Gracias a mis padres, porque son los culpables de que esté aquí, porque me lo han dado todo, porque han creído en mí y me han apoyado desde siempre. A mis hermanas Alicia y Cristina por estar siempre a mi lado. A mis abuelos Rafael y Catalina por su cariño y amor. Muchas gracias. Os quiero mucho.

- Las estrellas se apagan– dijo el Hermano Gris

- ¿Dónde dormiremos hoy? Porque desde ahora, vamos a seguir nuevas pistas

Ruyard Kipling (El libro de las tierras vírgenes)

"Improvisemos un guión definitivo"
- Jorge Ruiz -

Índice



ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
<hr/>	
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Factor de crecimiento transformante β	8
1.1. La superfamilia del TGF β	8
1.2. Síntesis del TGF β	10
1.3. Receptores del TGF β	10
1.4. Efectores intracelulares: Smads	13
1.4.1. Estructura de las Smads	13
1.4.2. Clases de Smads	15
1.5. Vía de señalización	15
1.6. Degradación de las Smads y fin de la vía de señalización	18
1.7. Señalización del TGF β independiente de Smads	21
1.8. Interacciones entre Smads y otras rutas	22
1.9. Funciones biológicas del TGF β	23
1.9.1. Fibrosis	24
1.9.2. Cáncer	25
2. Endoglina	26
2.1. Expresión y distribución celular	26
2.2. Estructura	27
2.3. Funciones celulares de la endoglina	30
2.4. Importancia fisiológica y patológica	33
2.4.1. Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT)	33
2.4.2. Angiogénesis	35
2.4.3. Procesos tumorales	36
2.4.4. Procesos de desarrollo y reparación	37
2.4.5. Procesos de inflamación	38
2.4.6. Endoglina soluble	38
OBJETIVOS	41

MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Materiales	47
2. Métodos de cultivo celular	47
2.1. Cultivos celulares	47
2.2. Técnicas básicas en cultivos celulares	48
2.2.1. Tripsinización celular	48
2.2.2. Recuento del número de células	48
2.2.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares	48
2.3. Tratamiento de los cultivos	49
2.4. Transfecciones	49
2.4.1. Generación de clones estables	49
2.4.2. Transfecciones transitorias de ADN	50
2.4.3. Ensayos de promotor	51
3. Análisis del nivel de expresión de proteínas	52
3.1. <i>Western blot</i>	52
3.1.1. Obtención de extractos de proteínas celulares	52
3.1.2. Obtención de extractos de proteínas nucleares	52
3.1.3. Determinación de la concentración de proteínas	53
3.1.4. Preparación de las muestras y electroforesis	53
3.1.5. Transferencia	54
3.1.6. Bloqueo e incubación con los anticuerpos	54
3.1.7. Revelado	55
3.1.8. Reutilización de membranas	56
3.2. Inmunofluorescencia	56
3.2.1. Marcaje de las células	56
3.2.2. Análisis de las preparaciones	57
3.3. ELISA	58
4. Análisis del nivel de expresión génica	58
4.1. RT-PCR	58
4.1.1. Extracción y cuantificación de ARNm	59
4.1.2. Transcripción inversa	59
4.1.3. PCR semicuantitativa	59
4.1.4. Detección de los amplicones	61

4.1.5. PCR cuantitativa	61
5. Ensayos de proliferación celular	62
5.1. Ensayo de proliferación con MTT	62
5.2. Citometría de flujo	62
5.2.1. Recogida de las células	63
5.2.2. Tinción con yoduro de propidio y pase por el citómetro de flujo	63
6. Análisis estadístico	63
Apéndice 1. Relación de reactivos y productos	64
Apéndice 2. Relación de anticuerpos utilizados	67
Apéndice 3. Relación de material y equipos utilizados	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
1. TGFβ1 activa las vías de señalización ALK5 y ALK1 en mioblastos de rata L₆E₉	73
1.1. Expresión de receptores del TGFβ1	73
1.2. Activación, expresión y localización de R-Smads	74
1.3. Elementos de respuesta al TGFβ1	77
1.4. Interacción entre la ruta de ALK1 y ALK5	79
1.5. Expresión y localización de Smad4	80
1.6. Expresión de Smad7	82
2. Efecto de las isoformas de la endoglina en la señalización del TGFβ1	86
2.1. Expresión de endoglina en mioblastos de rata L ₆ E ₉	86
2.2. Expresión de receptores del TGFβ1	89
2.3. Expresión y activación de las R-Smads	90
2.4. Elementos de respuesta al TGFβ1	95
2.5. Expresión de Smad4	97
2.6. Expresión de Smad7	99
3. Efecto de las isoformas de endoglina sobre diferentes propiedades biológicas	103
3.1. Acumulación de matriz extracelular	103
3.2. Proliferación	107
3.3. Moléculas de inflamación	112

4. Resumen de los efectos de las isoformas de endogлина	118
3.1. Sobre la ruta de señalización del TGF β 1	118
3.2. Sobre diferentes propiedades biológicas	119
DISCUSIÓN GENERAL	121
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXO	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y formas latentes del TGF β 1	10
Figura 2. Representación de los receptores del TGF β 1	12
Figura 3. Representación de los receptores accesorios del TGF β 1	13
Figura 4. Organización estructural y papel de los dominios de las Smads	14
Figura 5. Señalización del TGF β a través de las proteínas Smads	16
Figura 6. El complejo R-Smad/Co-Smad en el núcleo	18
Figura 7. Regulación negativa de la señalización del TGF β	19
Figura 8. Balance de la fosforilación y defosforilación de las R-Smads	20
Figura 9. Señalización del TGF β a través de otras vías	21
Figura 10. Interacción entre distintas vías de señalización	23
Figura 11. Representación esquemática del dímero de endoglina	28
Figura 12. Procesamiento alternativo del ARN mensajero de la endoglina	29
Figura 13. Modelo de regulación de la señalización del TGF β 1 a través de la endoglina en células endoteliales	31
Figura 14. Otras funciones de la endoglina	32
Figura 15. Telangiectasias en pacientes con HHT	33
Figura 16. Formación de una fístula arterio-venosa	34
Figura 17. Expresión de endoglina en tumores sólidos	37
Figura 18. Mioblastos de rata L ₆ E ₉ creciendo en medio de cultivo DMEM	47
Figura 19. Núcleos aislados de mioblastos de rata L ₆ E ₉	53
Figura 20. Expresión de los receptores del TGF β 1	74
Figura 21. Efecto de distintas concentraciones de TGF β 1 sobre la activación de Smad1 y Smad2 en mioblastos de rata L ₆ E ₉	74
Figura 22. Efecto del TGF β 1 sobre la fosforilación de Smad1, Smad2 y Smad3 en mioblastos L ₆ E ₉	75
Figura 23. Efecto del TGF β 1 sobre la expresión de Smad1, Smad2 y Smad3 en mioblastos L ₆ E ₉	75
Figura 24. Entrada de las R-Smads al núcleo tras el tratamiento con TGF β 1	76
Figura 25. Localización de las R-Smads en mioblastos L ₆ E ₉	77
Figura 26. Estudio de la actividad de los promotores Bre, ARE y CAGA	78
Figura 27. Estudio de la expresión de Id1 en mioblastos L ₆ E ₉ en respuesta al TGF β 1	79
Figura 28. Estudio de la expresión de PAI-1 en mioblastos L ₆ E ₉ en respuesta	79

al TGFβ1	
Figura 29. Efecto del inhibidor SB431542 sobre la activación de las Smads en respuesta al TGFβ1	80
Figura 30. Efecto del TGFβ1 sobre la expresión de Smad4 en mioblastos L ₆ E ₉	81
Figura 31. Entrada de Smad4 al núcleo tras el tratamiento con TGFβ1	81
Figura 32. Localización de Smad4 en mioblastos L ₆ E ₉	81
Figura 33. Estudio de la expresión de Smad7 en mioblastos L ₆ E ₉ en respuesta al TGFβ (I)	83
Figura 34. Estudio de la expresión de Smad7 en mioblastos L ₆ E ₉ en respuesta al TGFβ (II)	83
Figura 35. Expresión de las isoformas de endogлина humana en mioblastos L ₆ E ₉	87
Figura 36. Inmunofluorescencia de endogлина humana en mioblastos de rata L ₆ E ₉	88
Figura 37. Expresión de los receptores de la ruta del TGFβ1	90
Figura 38. Efecto del TGFβ1 sobre la activación y expresion de Smad1, Smad2 y Smad3 en mioblastos L ₆ E ₉ Mock, L-Endo y S-Endo	75
Figura 39. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la activación y expresión de las R-Smads	92
Figura 40. Efecto de las isoformas de endogлина sobre la expresión del ARNm de las R-Smads (I)	93
Figura 41. Efecto de las isoformas de endogлина sobre la expresión del ARNm de las R-Smads (II)	93
Figura 42. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la actividad del inhibidor SB431542	94
Figura 43. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la ruta de señalización de ALK1	95
Figura 44. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la ruta de señalización de ALK5	96
Figura 45. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre expresión de PAI-1	97
Figura 46. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la ruta de señalización de ALK1	95
Figura 47. Efecto de las isoformas de endogлина sobre la expresión del ARNm de Smad4	98
Figura 48. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la expresión de Smad7	99
Figura 49. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la expresión de colágeno I	99

Figura 50. Participación de las rutas del TGF β 1, ALK1 y ALK5 en la acumulación de colágeno I	99
Figura 51. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la expresión de CTGF	106
Figura 52. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la proliferación celular	108
Figura 53. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre el ciclo celular	109
Figura 54. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la expresión de ciclinas y PCNA	110
Figura 55. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la expresión de COX-2	
Figura 56. Efecto de las isoformas de endogлина sobre la expresión del ARNm de COX-2	
Figura 57. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la actividad del promotor de COX-2	
Figura 58. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la síntesis de PGE ₂	
Figura 59. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la expresión de iNOS	
Figura 60. Modelo hipotético del papel de las isoformas de endogлина en la ruta de señalización del TGF β 1	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familia del TGF β	9
Tabla 2. Mediadores moleculares de la vía de señalización de los miembros de la familia del TGF β	11
Tabla 3. Volumen de reactivos para la transfección celular transitoria con <i>jetPEI</i> TM	50
Tabla 4. Vectores reporteros empleados	51
Tabla 5. Anticuerpos y diluciones utilizados para <i>Western blot</i>	54
Tabla 6. Anticuerpos y diluciones utilizados para inmunofluorescencia	57
Tabla 7. Lista de cebadores utilizados	61

*“Piensa como piensan los sabios,
mas habla como habla la gente sencilla”
- Aristóteles -*

Abreviaturas

- Ac:** Anticuerpo
- AcM:** Anticuerpo monoclonal
- AcP:** Anticuerpo policlonal
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- ALK:** Quinasa similar al receptor de activina (de *Activin receptor-Like Kinase*)
- APS:** Amonio Persulfato
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- BMPs:** Proteínas morfogénicas del hueso (de *Bone Morphogenetic Proteins*)
- BMPR:** Receptor de BMP (de *BMP Receptor*)
- BRE:** Elemento de respuesta a BMP (de *BMP-responsive element*)
- BSA:** Albúmina sérica bovina (de *Bovine Serum Albumin*)
- CAGA:** Secuencia consenso para la unión de Smad3
- COX:** Ciclooxygenasa
- CTGF:** Factor de crecimiento de tejido conectivo (de *Connective Tissue Growth Factor*)
- Cy^{TM3}:** Cianina 3 (de *Cyanine 3*)
- DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco (de *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMSO:** Dimetil sulfóxido
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético
- EEM:** Error Estándar de la Media
- ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción enzimática (de *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*)
- ENG:** Endogлина
- eNOS:** Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (de *Endothelial Nitric Oxide Synthase*)
- ERK:** Quinasas reguladas por señales extracelulares (de *Extracellular signal-Regulated Kinases*)
- FBS:** Suero bovino fetal (de *fetal calf serum*)
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (de *Fluorescein Isothiocyanate*)
- iNOS:** Óxido Nítrico Sintasa Inducible (de *Endothelial Nitric Oxide Inducible*)
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (de *Glycealdehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
- HHT:** Telangiectasia hemorrágica hereditaria (de *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*)
- HRP:** Peroxidasa de rábano picante (de *Horseradish Peroxidase*)

IgG: Inmunoglobulina G

JNK: Quinasas Jun amino-terminal (de *Jun N-terminal Kinases*)

kDa: Kilodalton

L-endoglina: Endoglina larga (de *Large endoglin*)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (de *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MEC: Matriz extracelular

MTT: Metil tetrazolio

NO: óxido nítrico (de *nitric oxide*)

PAGE: Gel de poliacrilamida para electroforesis (de *Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*)

PAI: Inhibidor del activador de plasminógeno (de *Plasminogen Activator Inhibitor*)

PGE₂: prostaglandina E₂

PKC: Protein quinasa C

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino (de *Phosphate Buffered Saline*)

PBS-CM: PBS con iones Calcio y Magnesio

PVDF: Difluoruro de polivinilideno (de *Polyvinylidene Fluoride*)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (de *Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction*)

SBE: Elemento de unión a Smads (de *Smad Binding Element*)

SDS: Dodecilsulfato sódico (de *Sodium Dodecyl Sulfate*)

S-endoglina: Endoglina corta (de *Short endoglin*)

TβR: Receptor de TGFβ (de *TGFβ Receptor*)

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta (de *Transforming Growth Factor beta*)

URL: Unidades Relativas de luz

ZP: Zona Pelúcida

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía.”
- Mary Shelley (Frankenstein) -*

Introducción

El estudio de los procesos de señalización celular es uno de los campos de investigación de mayor relevancia en la actualidad y que ha tenido una progresión espectacular en los últimos veinte años. Una de las vías de señalización más estudiadas es la del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). El interés suscitado por el conocimiento profundo de cada uno de los componentes implicados en esta vía de señalización y su función, se debe a la importancia de encontrar alternativas terapéuticas que impidan el desarrollo de enfermedades muy graves en las que el TGF β tiene un papel muy importante, entre las que figuran las patologías fibróticas, angiogénesis, progresión tumoral, etc.

En este contexto, nuestro grupo de investigación lleva varios años dedicado al estudio de la **endoglina**, una glicoproteína de membrana involucrada en la señalización de diversas moléculas de la superfamilia del TGF β . Nuestros resultados y los de otros grupos, demuestran que la endoglina modula las respuestas celulares del TGF β entre ellas la proliferación, la migración y la producción de componentes de la matriz extracelular. Además, la endoglina participa de forma importante en la regulación de la angiogénesis, el remodelado vascular y el desarrollo cardiovascular. La mutación del gen de endoglina causa una enfermedad llamada telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT). Así mismo, los ratones *knockout* para el gen de endoglina mueren durante el desarrollo embrionario debido a la formación deficiente de los vasos sanguíneos.

A pesar de que hace ya más de diez años se describió la existencia de dos isoformas de endoglina: L (larga) y S (corta), generadas por *splicing* alternativo del mismo gen, prácticamente todos los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* se han centrado en el estudio de la isoforma mayoritaria, la isoforma larga, pero apenas conocemos nada del papel fisiológico de la otra isoforma, la isoforma corta.

Por tanto, en este trabajo nos planteamos estudiar la implicación de ambas isoformas de la endoglina en la vía de señalización del TGF β y si estas isoformas modulan de manera diferencial las respuestas biológicas de esta citoquina.

1. Factor de crecimiento transformante- β

Desde su identificación a principios de los años 80, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β , de *Transforming Growth Factor Beta*), se ha considerado un importante regulador de la homeostasis de tejidos y del desarrollo embrionario en metazoos (Massague *et al.*, 2000). El TGF β se identificó como un producto de células transformadas por el virus del sarcoma murino. Actualmente se sabe que es sintetizado por diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células del riñón, células de la placenta y plaquetas, así como células tumorales (Massague, 1998).

El TGF β es una citoquina implicada en numerosos procesos celulares que puede tener efectos biológicos opuestos dependiendo del tipo celular. Así, puede regular la proliferación celular o la apoptosis, procesos de desarrollo, diferenciación celular y migración. También puede inducir la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (MEC), estimular la producción de inhibidores de proteasas previniendo la rotura enzimática de la MEC y modular la respuesta inmune (Shi y Massague, 2003).

1.1. La superfamilia del TGF β

La superfamilia del TGF β engloba un gran número de factores de crecimiento y diferenciación, relacionados estructuralmente entre sí, que están presentes en una gran variedad de organismos, desde insectos hasta humanos. Incluye a los factores de crecimiento transformantes beta (TGF β), las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs de *Bone Morphogenetic Protein*), activinas, inhibinas, factores de crecimiento y diferenciación (GDFs de *Growth and Differentiation Factor*), y la hormona anti-Mülleriana (AMH, también llamada sustancia inhibitoria Mülleriana o MIS), entre otros (Massague, 1998) (Tabla 1). Estos factores controlan funciones celulares como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis y la respuesta inmune (Massague, 1998). A nivel tisular controlan el desarrollo, la homeostasis y la reparación de prácticamente todos los tejidos del organismo.

Subfamilia	Componentes
BMP2	BMP2, BMP4
BMP5	BMP5, BMP6/Vrgl, BMP7/OP1, BMP8/OP2
GDF5	GDF5/CDMP1, GDF6/CDMP2, GDF7
BMP3	BMP3/Osteogenina, GDF10
BMP9	BMP9/GDF2, BMP10
Miembros intermedarios	Nodal, Dorsalina, GDF8, GDF9
Activina	Activina β A, Activina β B, Activina β C, Activina β E
TGF β	TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3
Miembros distantes	MIS/AMH, Inhibina α , GDNF

Tabla 1. Familia del TGF β . Todos los componentes de la tabla han sido identificados en humanos y/o ratón. GDF: *Growth and Differentiation Factor*. CDMP: *Cartilage-Derived Morphogenetic Protein*. MIS/AMH, *Müllerian Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone*. GDNF: *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*. OP: *osteogenic protein*. (Adaptado de Massague, 1998; Mazerbourg y Hsueh, 2006)

Se han descrito cinco isoformas del TGF β con un 64-82% de similitud entre ellas, siendo las isoformas β 1, β 2 y β 3 características de mamíferos (Massague, 1990), TGF β 4 es típica de aves (Jakowlew *et al.*, 1991) y TGF β 5 de anfibios anuros (Vempati y Kondaiah, 1998). En mamíferos, el TGF β 1 es la isoforma más abundante; está implicado en procesos de desarrollo y diferenciación, inhibe el crecimiento de células epiteliales y endoteliales, así como las funciones inmune y hematopoyética, promueve el crecimiento del tejido conectivo, favorece la quimiotaxis de fibroblastos, macrófagos y linfocitos y estimula los procesos de reparación de tejidos. También está implicado en procesos patológicos, como la producción excesiva de matriz extracelular, que desencadena fibrosis tisular, y la síntesis de otros factores de crecimiento (Sporn y Roberts, 1992; ten Dijke y Hill, 2004). Todas estas funciones dependen del tipo celular, del balance de expresión del TGF β 1 y

otras citoquinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa (Massague, 1998).

1.2. Síntesis del TGF β

El TGF β es sintetizado como un propéptido de alto peso molecular. Antes de su secreción, una furin-convertasa escinde el propéptido, quedando la región LAP (*Latency-Associated Peptide*) asociada de forma no covalente al TGF β biológicamente activo (Figura 1A); esta molécula recibe el nombre de complejo latente pequeño (Miyazono *et al.*, 1993; Dubois *et al.*, 1995).

En la mayoría de las células, esta forma latente del TGF β se une a una tercera proteína conocida como proteína de unión al TGF β latente (LTBP de *Latent TGF β Binding Protein*) mediante un puente disulfuro, el complejo resultante se conoce como complejo latente grande, el cual se ancla a la matriz extracelular (Figura 1B). Una vez en ella, el TGF β es liberado en su forma biológicamente activa por la acción de proteasas como plasmina, furina, trombospondina o metaloproteasas. (Ruiz-Ortega *et al.*, 2007).

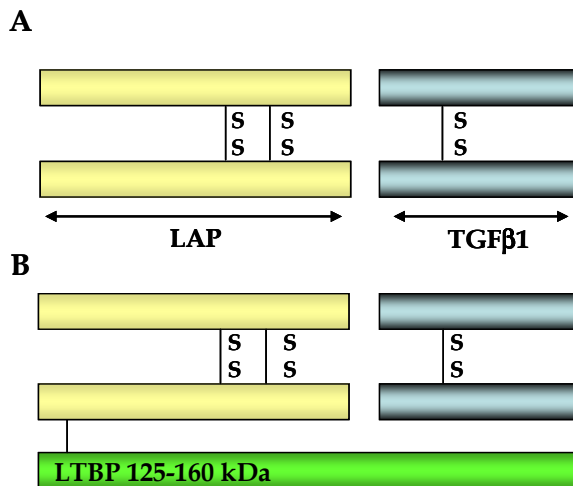


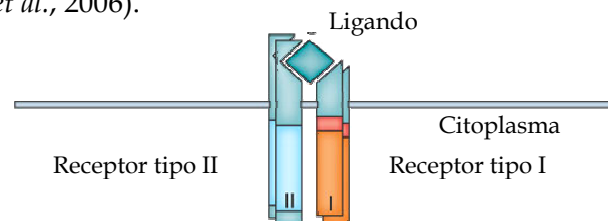
Figura 1. Estructura y formas latentes del TGF β 1. A. Complejo latente pequeño. B. Complejo latente grande. (Modificado de Schnaper *et al.*, 2003).

1.3. Receptores del TGF β

La superfamilia de factores del TGF β transmite sus señales intracelulares a través de glicoproteínas de membrana de tipo serina-treonina quinasa, que forman la familia de receptores del TGF β . Basándose en sus propiedades estructurales y funcionales, esta familia se ha dividido en dos subfamilias denominadas receptores tipo I y tipo II (Massague, 1998). En mamíferos se han descrito siete receptores tipo I

y cinco receptores tipo II para los ligandos pertenecientes a la superfamilia del TGF β (Miyazawa *et al.*, 2002). Los receptores tipo I también se denominan ALK (*Activin Like Kinase*). Cada ligando perteneciente a la superfamilia del TGF β interacciona de forma específica con una combinación característica de ambos receptores. Por otro lado, cada receptor tipo II tiene afinidad por un receptor tipo I concreto (Tabla 2).

En el caso del TGF β , al receptor II se le denomina T β RII. En la mayoría de los tipos celulares el T β RII se asocia con el receptor tipo I (T β RI), ALK5. Sin embargo, existen otros T β RI implicados en la señalización del TGF β (Massague y Wotton, 2000): en células endoteliales, el TGF β señala a través de los receptores tipo I, ALK1 y ALK5 (Goumans *et al.*, 2003a). Además, algunos autores han relacionado a ALK2 en la señalización del TGF β , en procesos relacionados con el desarrollo cardíaco (Olivey *et al.*, 2006).



Ligando	Receptores tipo II	Receptores tipo I	R-Smad	Co-Smad
BMP	BMPRII, ActRII ó ActR-IIB	ALK2, ALK3 (BMPRIA), ALK6 (BMPRIB)	Smad1, Smad5, Smad8	Smad4
TGF β	T β RII	ALK1 ALK5 (T β RI)	Smad2, Smad3	
Activina	ActRII ó ActRIIB	ALK4 (ActRIB),		

Tabla 2. Mediadores moleculares de la vía de señalización de los miembros de la familia del TGF β . La tabla representa un esquema de algunos miembros de la superfamilia del TGF β , y su relación con los receptores y las proteínas citoplasmáticas (Smads) existentes en los mamíferos. (Adaptado de Bertolino *et al.*, 2005).

Los receptores tipo I y tipo II tienen estructuras similares con una pequeña secuencia extracelular rica en cisteína, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad quinasa de residuos de serina y treonina (Figura 2). El receptor tipo II, que está constitutivamente fosforilado, incluso en ausencia de ligando, es capaz de unir TGF β (ten Dijke y Hill, 2004).

Una vez que el TGF β se une al T β RII, éste recluta y fosforila al receptor tipo I. La fosforilación se produce en una región rica en residuos serina-treonina que se encuentra en un dominio yuxtamembrana altamente conservado conocido como el "dominio GS" (Wrana *et al.*, 1994; Wieser *et al.*, 1995). La fosforilación induce un cambio conformacional en el receptor tipo I que le permite fosforilar a sus sustratos citoplasmáticos, las proteínas Smads. Estas proteínas se translocan en forma de complejos al núcleo donde regulan la transcripción de los genes diana (Massague, 1998).

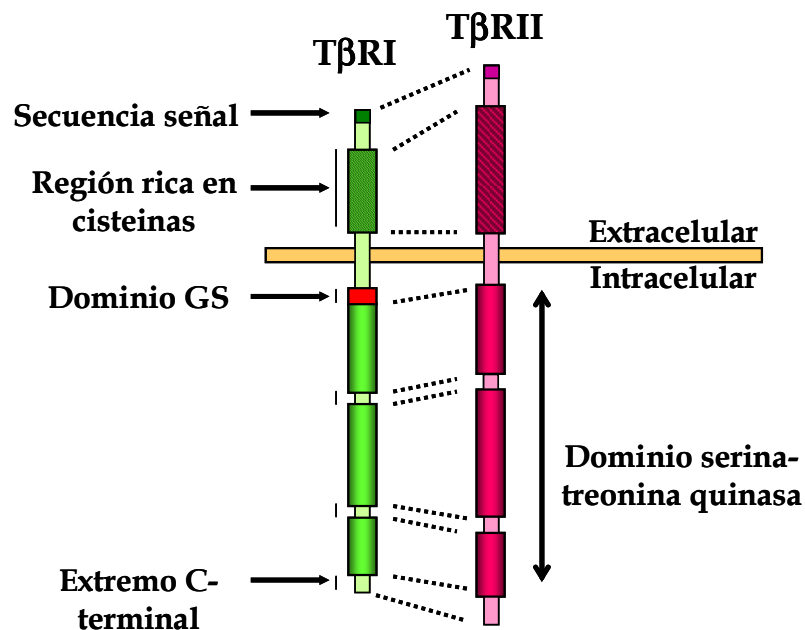


Figura 2. Representación de los receptores del TGF β 1. El receptor tipo I para TGF β (T β R1) a la izquierda y el receptor tipo II (T β R2) a la derecha son proteínas serina/treonina quinasa transmembrana. El dominio extracelular es rico en cisteínas (Modificado de Lebrin *et al.*, 2005).

Además, existen otros receptores accesorios denominados tipo III: betaglicano y endogлина. Los receptores tipo III no poseen dominios quinasa, pero son capaces de unirse a los T β R1 y T β R2 y regular la señalización del TGF β (Derynck y Feng, 1997). En su parte extracelular contienen sitios potenciales para el

corte por metaloproteasas (Figura 3). La endoglina y el betaglicano poseen una alta similitud con un 71% de homología entre sus dominios citoplasmáticos (Cheifetz *et al.*, 1992). No obstante, desempeñan funciones distintas (Letamendia *et al.*, 1998b); además, al contrario que la endoglina, el betaglicano es capaz de unir el TGF β *per se*, favoreciendo la accesibilidad del factor de crecimiento a sus receptores (Lopez-Casillas *et al.*, 1994). Puesto que este trabajo estudia el posible papel de esta proteína en la señalización del TGF β , hablaremos detenidamente de ella más adelante.

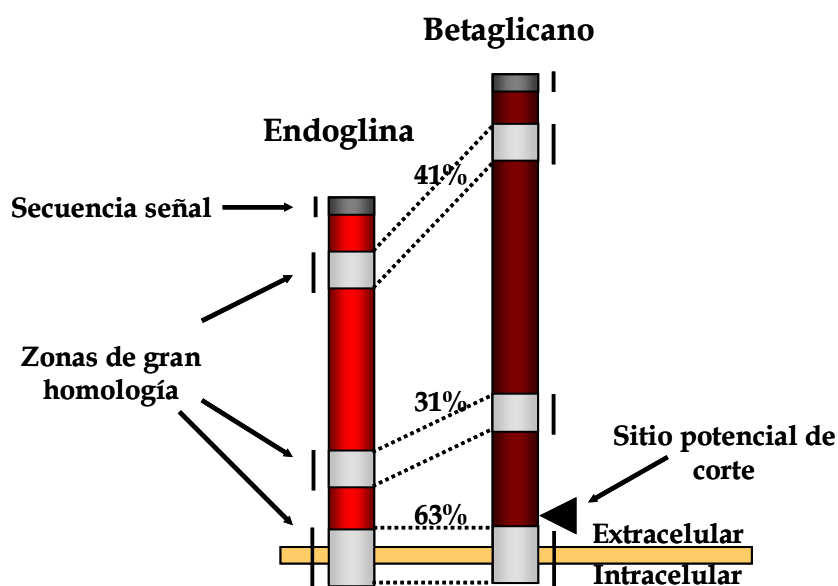


Figura 3. Representación de los receptores accesorios del TGF β 1. La endoglina (izquierda) y el betaglicano (derecha) no poseen un dominio enzimático. Sus dominios citoplasmáticos son muy cortos. Se indica el porcentaje de aminoácidos idénticos de las regiones de gran homología (Modificado de Lebrin *et al.*, 2005).

1.4. Efectores intracelulares: Smads

Las Smads (*Small mothers against decapentaplegic*) son proteínas citoplasmáticas de 50-70 kDa que transmiten la señal del TGF β de la membrana plasmática al núcleo (revisado en ten Dijke y Hill, 2004; Massague *et al.*, 2005; Massague y Gomis, 2006)

1.4.1. Estructura de las Smads

Las proteínas Smads presentan dos dominios globulares altamente conservados en las regiones amino y carboxilo terminal (Figura 4) conocidos como MH1 y MH2 respectivamente (el nombre procede de *Mad Homology*, y hace referencia al producto del gen *Mad* en *Drosophila*, que fue el primer miembro de la

familia identificado). En el dominio MH1 de las Smads se encuentran motivos de unión al ADN y de interacción con los factores de transcripción, así como la secuencia de localización nuclear (NLS de *Nuclear Localization Signal*). El dominio MH2 está involucrado en activación transcripcional y media la oligomerización y la interacción con los receptores ya que posee un motivo SXS, el cual es fosforilado por los T β RI activos. Además, este dominio contiene motivos de interacción con varios factores de transcripción, así como una región de interacción entre Smads. En el estado basal, los dominios MH1 y MH2 interactúan mutuamente e inhiben la función del otro; la fosforilación producida por el receptor tipo I libera esta inhibición, permitiendo que las Smads formen complejos y se acumulen en el núcleo, además la heteromerización de las Smads lleva a la exposición de una secuencia de marcaje nuclear.

Entre los dominios MH1 y MH2 se ha identificado un dominio central denominado “zona linker” poco conservado entre las distintas especies (Figura 4). Contiene motivos de unión (PY de prolina y tirosina) para las proteínas Smurf además de secuencias que pueden ser fosforiladas por varias quinasas como las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), PKC (*Protein Kinase C*), CDK (*Cyclin Dependent Kinase*), etc.

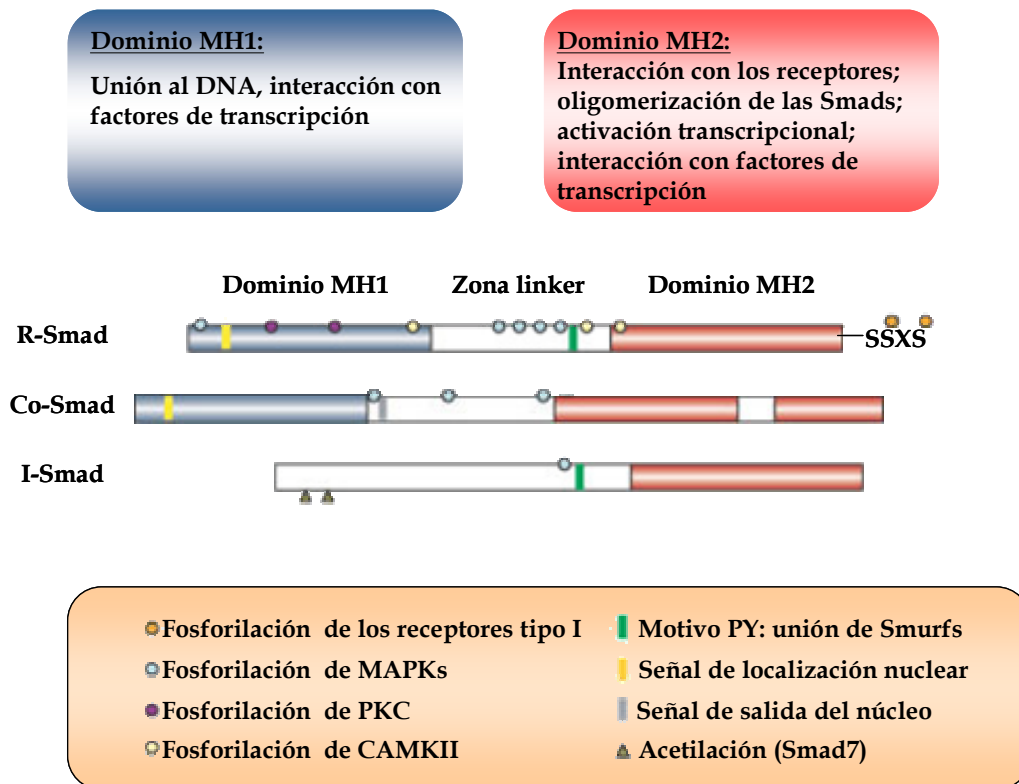


Figura 4. Organización estructural y papel de los dominios de las Smads. (Modificado de Derynck y Zhang, 2003).

1.4.2. Clases de Smads

La familia Smad consta, en mamíferos, de ocho miembros, los cuales se dividen en tres subfamilias según su estructura y función: R-Smads, Co-Smads e I-Smads:

-R-Smad: Se les denomina Smads reguladas por el receptor. A este grupo pertenecen Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8. El receptor tipo I para TGF β , ALK5, fosforila a Smad2 y Smad3. En el caso de células endoteliales el receptor ALK1 fosforila también a Smad1, Smad5 y Smad8 (Tabla 2). El reconocimiento específico del receptor I con su Smad viene determinado por la secuencia conocida como “L45 loop” en el receptor y la secuencia “L3 loop” en el dominio MH2. La región “L3 loop” es una región muy corta y conservada que difiere en tan sólo dos aminoácidos entre el grupo de Smads de Smad1, 5, 8 y el grupo de Smad2, 3.

-Co-Smad: Sólo se conoce un miembro en mamíferos: Smad4 (Lagna y cols., 1996). Smad4 no tiene motivo SXS en su extremo carboxilo, por lo tanto ni se une ni es fosforilada por los receptores del TGF β . Se une a las R-Smads y colabora con éstas en su función reguladora de la transcripción. Contiene, en el dominio linker, una secuencia de salida del núcleo (NES de *Nuclear Extracellular Signal*) y una secuencia necesaria para la activación de la transcripción.

-I-Smads: Smads inhibitoras, representadas por Smad6 y Smad7. Es una subfamilia estructuralmente divergente y su función es inhibir las interacciones Smad-receptor o Smad-Smad, bloqueando la señalización de la vía. Esta subfamilia carece del dominio MH1.

La actividad, distribución subcelular y estabilidad de las tres subclases de Smads presentan una regulación muy compleja y se han identificado un gran número de proteínas que interactúan con las Smads.

1.5. Vía de señalización

Al unirse el ligando al dominio extracelular del T β RII, se induce la formación de complejos hetero-oligoméricos entre los T β RI y T β RII (Yamashita *et al.*, 1994b). El receptor T β RII, constitutivamente activo, fosforila a T β RI en su dominio GS, activando el dominio quinasa. La fosforilación induce un cambio conformacional en

el receptor tipo I que le permite fosforilar a las R-Smads en el dominio SXS cercano al extremo C-terminal (Massague *et al.*, 2005). Las R-Smads son reclutadas por el complejo de receptores gracias a la proteína SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*) (ten Dijke y Hill, 2004) a través del dominio MH2. La unión de SARA con Smad2 y Smad3 requiere a la proteína PLM (*promyelocytic leukaemia*) (Lin *et al.*, 2004). La fosforilación de las R-Smads por el receptor tipo I del TGF β hace que se liberen de su unión con SARA e inmediatamente se unen con Smad4 produciéndose la translocación al núcleo, donde son capaces de regular la transcripción de determinados genes (Massague *et al.*, 2005). La liberación de SARA permite reclutar otras Smads no fosforiladas para presentarlas al receptor (ten Dijke *et al.*, 2000).

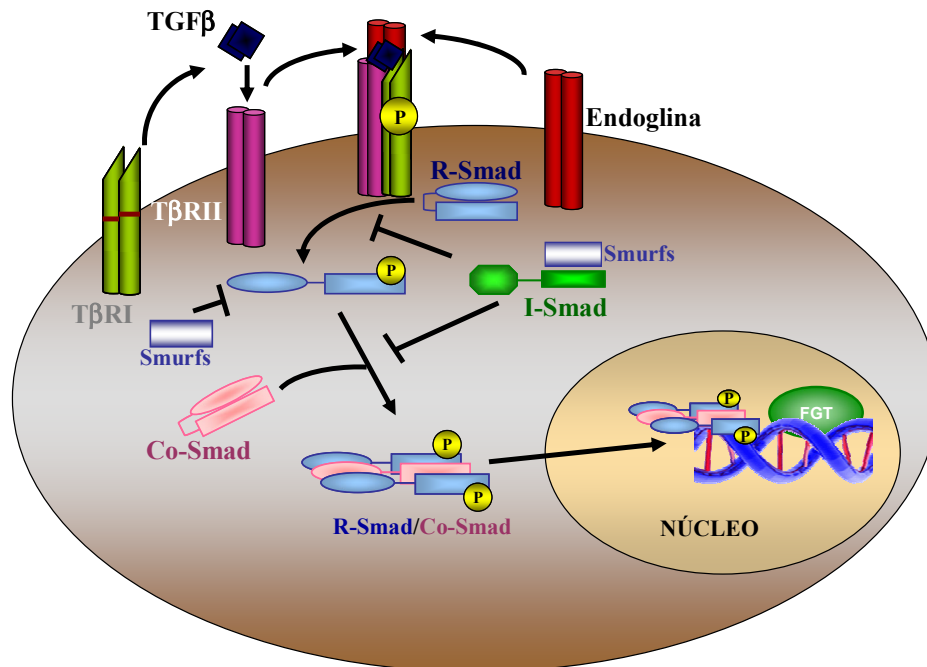


Figura 5. Señalización del TGF β a través de las proteínas Smads. (Modificado de Fernandez-L *et al.*, 2006a).

Existen proteínas que regulan negativamente la señalización de la vía. Las I-Smads, son inducidas por miembros de la propia superfamilia del TGF β , entre otros factores, e interactúan con los receptores o compiten con las R-Smads por su unión con la Co-Smad. Se produce así un mecanismo de retroalimentación negativa de la propia ruta de señalización que sirve como mecanismo autorregulador (Figura 5). Otras proteínas, como las ubiquitín ligasas Smurf1 y 2, se unen a las R-Smads tras su salida del núcleo y las dirigen a la ruta de degradación del proteasoma (Zhu *et al.*, 1999).

El TGF β 1 ejerce una diversidad de acciones, muchas veces contradictorias, que dependen del tipo y estado celular, así como de la presencia de otros factores de crecimiento.

Los mecanismos de regulación de la transcripción utilizados por el complejo de Smads son tres:

-Unión directa a secuencias específicas de ADN: en el núcleo las proteínas Smad3 y 4 reconocen secuencias CAGAC, también conocidos como SBE (elementos de unión a Smads, de *Smad-Binding Element*);, en el ADN de algunos de los genes que responden a TGF β , como es el caso del promotor de PAI-1. Aunque Smad2 posee una estructura similar a Smad3, no es capaz de unirse al ADN debido a la presencia de una secuencia corta de 30 aminoácidos próxima al dominio de unión al ADN (ten Dijke y Hill, 2004). A pesar de la unión directa a los SBE, la afinidad de las Smads por el ADN es muy baja y necesitan la ayuda de otros factores para unirse con eficacia a los promotores de genes específicos (Shi *et al.*, 1998).

-Interacción con otras proteínas de unión al ADN: las Smads pueden interaccionar con algunos factores de transcripción (entre los que se encuentran FAST, AP-1, Sp1 y HIF-1) que permiten la activación o supresión de genes (Attisano y Wrana, 2000; Massague y Wotton, 2000; Sanchez-Elsner *et al.*, 2001).

-Reclutamiento de co-activadores o co-represores transcripcionales: la activación o inhibición de la expresión de los genes diana está modulada por la unión de co-activadores o co-represores al complejo formado por las Smads y los factores de transcripción (Figura 6). Las Smads se unen a co-represores transcripcionales como TGIF (*TGF β -Interacting Factor*) (Wotton *et al.*, 1999), SKI (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*) y SnoN (*Ski-related novel gene N*) (Luo *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999) entre otros. Estas proteínas se unen a histonas deacetilasas (HDACs) cuyos efectos conllevan generalmente una condensación de la cromatina de los promotores de los genes diana (Massague, 2000). Las Smads también puede asociarse a co-activadores como CBP/p300 (Massague y Wotton, 2000) que poseen actividad histona acetilasa; o son capaces de unirse a histonas acetiltransferasas (HAT), cuyo efecto es el opuesto a las anteriores. En ocasiones los co-activadores y co-represores compiten por la unión con las Smads y la respuesta dependerá de los niveles relativos de ambos (Wotton *et al.*, 1999; ten Dijke *et al.*, 2000).

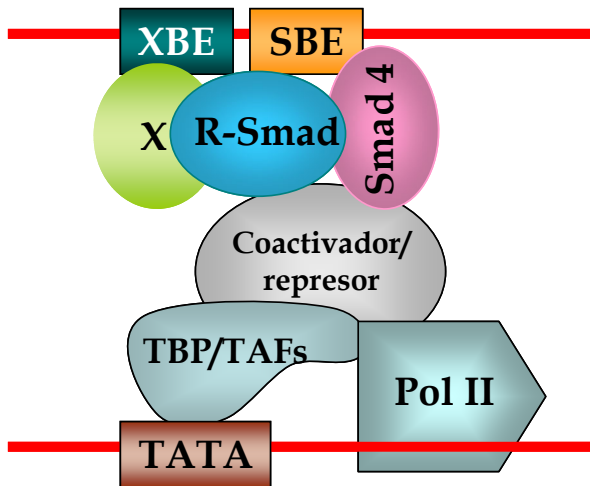


Figura 6. El complejo R-Smad/Co-Smad en el núcleo. El complejo formado por las Smads regula la transcripción mediante la unión directa con el ADN (SBE), interacción con factores de transcripción (X) que se unen al ADN (XBE), y reclutamiento de co-activadores o represores transcripcionales. (Adaptado de Derynck y Zhang, 2003).

1.6. Degradación de las Smads y fin de la vía de señalización

La ubiquitinación de proteínas y consecuentemente su degradación por el proteasoma es un mecanismo común de regulación. En un primer paso de esta cascada enzimática, la ubiquitina es activada y se une a E1 (enzima activadora de ubiquitina); la ubiquitina es después transferida a E2 (enzima conjugada con ubiquitina) que funciona junto con una ligasa E3 para transferir la ubiquitina al sustrato; este sustrato poliubiquitinado será reconocido después por el proteasoma 26S y degradado (Wrana y Attisano, 2000). Se ha designado a las Smurfs, una clase de ubiquitin ligasas E3, como las implicadas en la degradación de las Smads (Moustakas *et al.*, 2001). Se han identificado dos clases de Smurfs: Smurf1 y Smurf2. Estas proteínas poseen dominios WW que poseen la habilidad de unirse a los motivos PY de las R-Smads e I-Smads (Zhang *et al.*, 2001) en las regiones *linker* (Wrana y Attisano, 2000). Smurf1 marca preferencialmente a Smad1 y Smad5 en células no estimuladas (Zhu *et al.*, 1999), esto parece ser importante para el mantenimiento del estado basal en células no estimuladas. Smurf2 se puede unir a Smad2 y Smad3, pero no es capaz de degradar a Smad3 (Izzi y Attisano, 2004), en su lugar induce la degradación de proteínas como SnoN que interacciona con el complejo Smad3-Smurf2 (Bonni *et al.*, 2001). Se ha encontrado también que ambas Smurfs al interactuar fuertemente con las I-Smads, inducen también su ubiquitinación (Ebisawa *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Por el contrario, Smad4 no es sensible a la acción de las proteínas Smurf, aunque parece ser que sí que median

poliubiquitinación y degradación proteasómica de Smad4 utilizando a las I-Smads como adaptadores (Moren *et al.*, 2005). Se han descrito también diversas interacciones de Smad4 con proteínas como Jab1 o SUMO1, implicadas en distintos procesos de degradación (Wan *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003).

Además, las Smurfs pueden también regular la ubiquitinación y degradación de otras proteínas implicadas en esta vía de señalización, incluido el complejo de receptores del TGF β y el correpresor SnoN (Bonni *et al.*, 2001; Ebisawa *et al.*, 2001; Kavsak *et al.*, 2000; Stroschein *et al.*, 2001). Smad7 juega un papel importante en el proceso de degradación de los receptores al formar complejos estables con las Smurfs y así favorecer la unión de estas a los receptores tipo I (Shi y Massague, 2003).

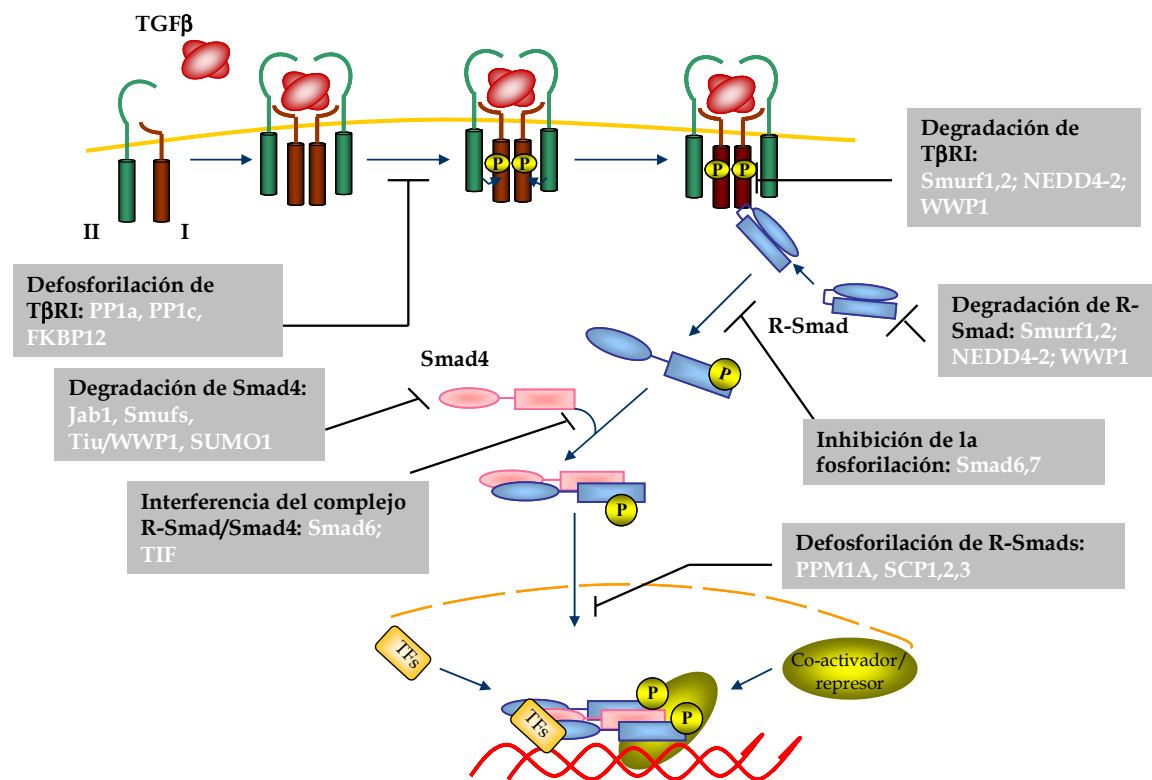


Figura 7. Regulación negativa de la señalización del TGF β . Esquema que resume los mecanismos de finalización de la vía de señalización. TFs- factores de transcripción (de *Transcription Factors*). (Adaptado de Itoh y ten Dijke, 2007).

En los últimos años se han encontrado nuevos miembros de ubiquitinas ligasas E3 que regulan negativamente la señalización de la superfamilia del TGF β como la proteína 1 que contiene un dominio WW (WWP1 de *WW domain-containing protein 1*), la cual induce ubiquitinación y degradación de los receptores tipo I (Komuro *et al.*, 2004); y NEDD4-2 (de *neural precursor cell expressed, developmentally*

downregulated 4-2), encontrado en levaduras y que regula la señalización del TGFβ de un modo similar a las Smurfs (Kuratomi *et al.*, 2005).

La vía de degradación por ubiquitinación es una de las vías que marcan la finalización de la actividad de las Smads, pero existen otros mecanismos. Uno de ellos sería la regulación negativa que las I-Smads ejercen sobre la señalización del TGFβ al competir con las R-Smads por la interacción con el receptor tipo I (Massague, 1998). Es más, dentro del núcleo, Smad7 recluta histonas deacetilasas hacia los genes diana, sugiriendo que Smad7 puede reprimir la transcripción (Bai y Cao, 2002).

El mecanismo de inactivación de las Smads más obvio, es decir su defosforilación por fosfatasas específicas, es algo que se ha descrito muy recientemente. Esta defosforilación que se produce en el motivo SXS del extremo C-terminal es necesaria para que las R-Smads puedan salir del núcleo (Xu *et al.*, 2002; Inman *et al.*, 2002). Se ha identificado a PPM1A, perteneciente a la familia de fosfatasas PPM, como una fosfatasa capaz de defosforilar a Smad1, Smad2 y Smad3 (Figura 8); y aumentar así el desensamblaje del complejo de Smads y la salida del núcleo (Duan *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006).

Además, en células de mamífero se ha visto que Smad7 recluta al complejo de fosfatasas GADD34 y PP1c hacia el complejo de receptores activados, produciéndose así la defosforilación de los mismos (Shi *et al.*, 2004; Valdimarsdottir *et al.*, 2006).

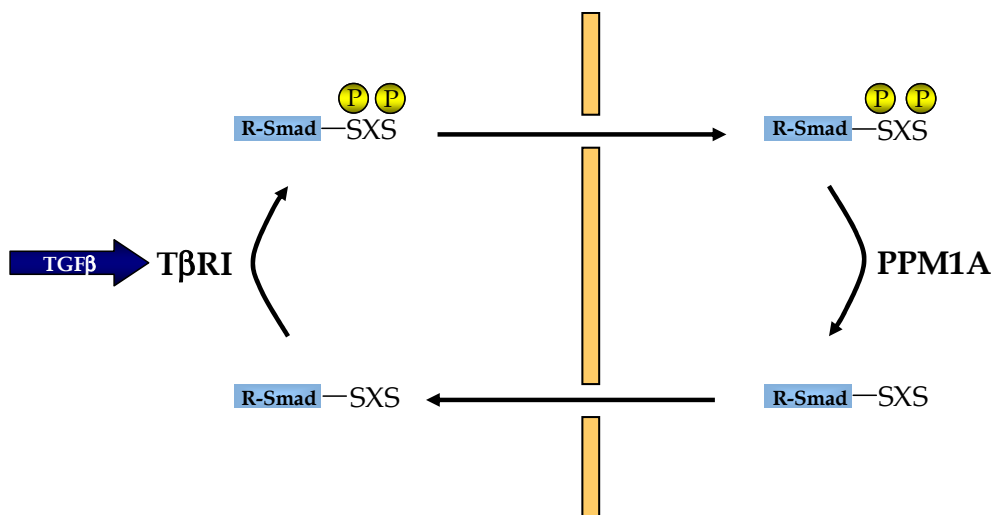


Figura 8. Balance de la fosforilación y defosforilación de las R-Smads. (Modificado de Lin *et al.*, 2007).

1.7. Señalización del TGF β independiente de Smads

Las Smads son los sustratos más conocidos de los receptores del TGF β y representan la vía clásica de señalización. Sin embargo, hoy se sabe que existen otras rutas de señalización implicadas en las respuestas celulares al TGF β (Figura 9). Entre estas vías figuran varias, aunque una de las rutas que más se ha relacionado con la vía de señalización del TGF β es la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK de *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Las MAPK pertenecen a una familia de serina-treonina quinasas altamente conservadas en eucariotas que están implicadas en respuestas celulares tan importantes como la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Estas proteínas conducen estímulos extracelulares hasta las dianas efectoras dentro de la célula a través de receptores y fosforilaciones enzimáticas secuenciales (Schenk y Snaar-Jagalska, 1999; Paul *et al.*, 1997; Robinson y Cobb, 1997; Garrington y Johnson, 1999). El TGF β puede activar las vías de ERK (*Extracellular-signal-regulated Kinase*), JNK (*Jun N-terminal Kinase*) y p38 MAPK, aunque los mecanismos son poco conocidos (Derynck y Zhang, 2003; Moustakas y Heldin, 2005).

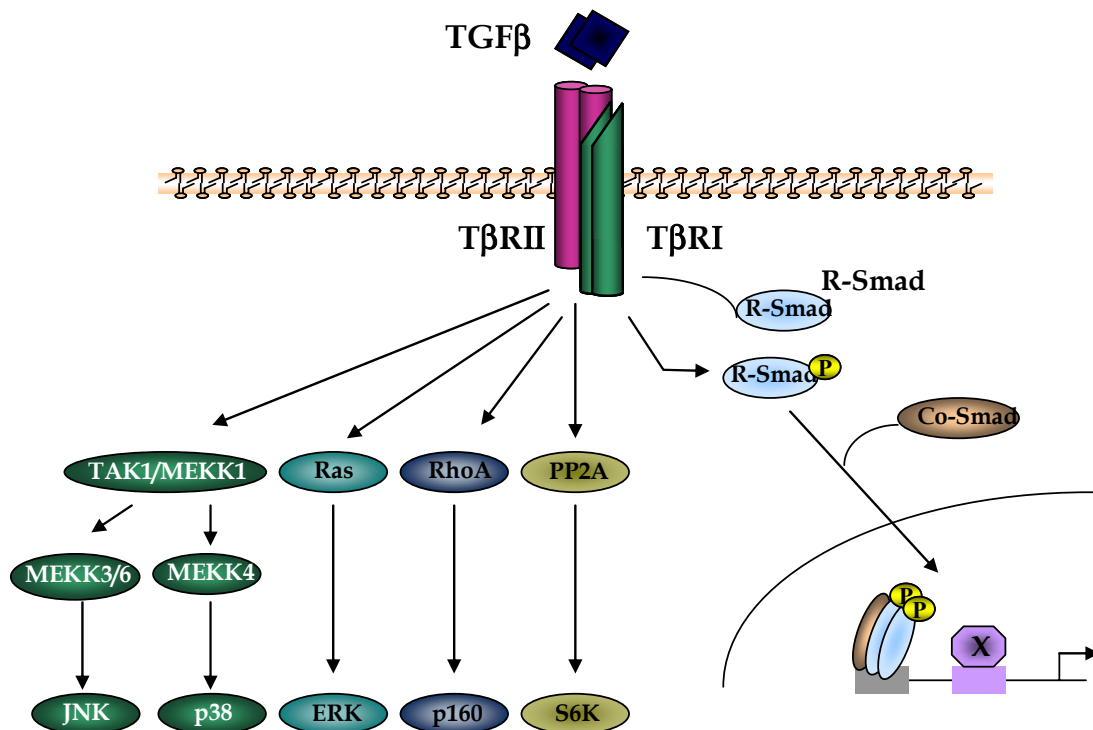


Figura 9. Señalización del TGF β a través de otras vías. El TGF β puede activar otras vías de señalización que no son las Smads, como las MAPK, Rho, etc. (Adaptado de Derynck y Zhang, 2003).

La activación de las vías de ERK y JNK por TGF β , puede conducir a la fosforilación y activación de las proteínas Smads (Engel *et al.*, 1999; Kretzschmar *et al.*, 1999). También, la activación de la vía Ras/ERK mediada por el TGF β puede inducir la expresión del propio TGF β 1, amplificando así la señal (Yue y Mulder, 2000). Por otro lado, nosotros hemos descrito que la fosforilación de p38 es necesaria para la síntesis de colágeno inducida por el TGF β y que en presencia de endoglina debe ir acompañada por un descenso en la fosforilación de ERK1/2 para conseguir un máximo efecto (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2006).

Dependiendo del tipo celular el TGF β es también capaz de inducir la fosforilación de GTP-asas de la familia Rho, regulando así la formación del citoesqueleto (Birukova *et al.*, 2005; Derynck y Zhang, 2003).

1.8. Interacciones entre Smads y otras rutas

Parece existir un nexo de unión entre las vías de señalización del TGF β a diversos niveles (Figura 10). Como ya hemos mencionado anteriormente en la zona *linker* de las R-Smads se han identificado varios sitios de fosforilación para MAPK. Un ejemplo es ERK, que fosforila a las Smads en dicha región inhibiendo la translocación de éstas al núcleo (Kretzschmar *et al.*, 1999; Massague, 2000). También la vía de ERK podría actuar incrementando el nivel del co-represor TGIF (Kretzschmar *et al.*, 1999). La activación de las MAPK puede activar a su vez factores de transcripción que pueden contactar con los complejos transcripcionales formados por las Smads en el núcleo modulando su actividad (Massague, 2000). Varios grupos han demostrado que el TGF β puede activar directamente al factor de transcripción ATF-2 por la vía de p38. ATF-2 fosforilado puede asociarse con el complejo Smad3-Smad4 y regular así la transcripción de los genes sobre los que actúa (Hanafusa *et al.*, 1999).

La protein quinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CamKII) fosforila a Smad2 en su zona *linker* lo que conlleva a una inhibición de la translocación nuclear (Wicks *et al.*, 2000). PKC fosforila a Smad3 lo que bloquea su unión al ADN y por lo tanto la transcripción génica (Yakymovych *et al.*, 2001). Smad3 también sirve de sustrato de varias quinasas dependientes de ciclina de la fase G1. Esta fosforilación

se correlaciona con una disminución en la señalización de Smad3 (Matsuura *et al.*, 2004).

Por otra parte, la expresión de Smad7 aumenta en respuesta a citoquinas proinflamatorias como interferón- γ que actúa a través de la ruta de las JAK quinasas, o TNF- α a través de la vía de NF- κ B. Este aumento interfiere con la fosforilación de los receptores del TGF β inhibiendo la señalización de la vía de las Smads (Bitzer *et al.*, 2000).

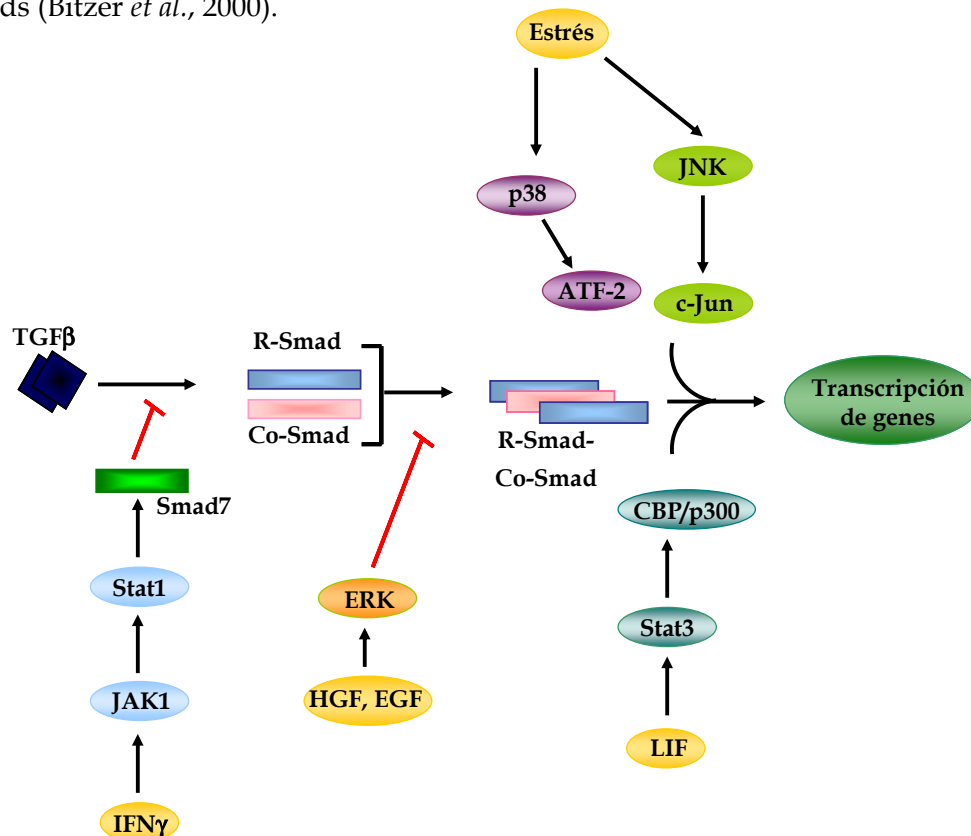


Figura 10. Interacción entre distintas vías de señalización. (Adaptado de ten Dijke *et al.*, 2000).

1.9. Funciones biológicas del TGF β

El TGF β 1 ejerce una gran diversidad de acciones, muchas veces contradictorias, que dependen del tipo y estado celular, así como de la presencia de otros factores de crecimiento.

La importancia de la señalización del TGF β en la morfogénesis vascular se pone de manifiesto por el hecho de que la inactivación de componentes de su ruta de señalización en ratones lleva a la muerte de los embriones hacia la mitad de la

gestación (ten Dijke y Arthur, 2007). El TGF β 1 es un potente inhibidor del crecimiento de células epiteliales, que induce una parada del ciclo celular, en la fase G1, mediante la inducción de la expresión de los inhibidores dependiente de ciclinas p15^{INK4b} y p21^{Cip1}. También se induce, de manera indirecta, la expresión de p27^{Kip1} (Hannon y Beach, 1994; Datto *et al.*, 1995). Por otro lado, el TGF β 1 regula negativamente la expresión de cdc25A, una tirosina fosfatasa que activa algunas CDK (quinasas dependientes de ciclinas) (Iavarone y Massague, 1997). Además el TGF β 1 regula negativamente a c-Myc, un factor de transcripción, implicado en la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Alexandrow *et al.*, 1995). Las células tumorales adquieren la capacidad de escapar a este control antiproliferativo del TGF β 1 (Seoane, 2006).

El TGF β 1 es capaz de inducir la transición epitelio-mesénquima por la cual células de origen epitelial se transforman transitoriamente en células móviles fibroblastoides. Este proceso es fundamental en el desarrollo embrionario. Además el TGF β 1 es un potente inmunosupresor (Gorelik y Flavell, 2001).

Pero el TGF β 1 también está implicado en diversos procesos patológicos.

1.9.1. FIBROSIS

Se piensa que el TGF β juega un papel central en los desórdenes fibróticos caracterizados por una excesiva acumulación de matriz extracelular en el pulmón, riñón, hígado y otros órganos (Massague, 1998). El TGF β puede iniciar una respuesta fibrótica local, pero la persistencia de la fibrosis puede ser en algunos casos independiente de la producción continuada del TGF β (Branton y Kopp, 1999).

En este contexto, las Smads también podrían ser diana para drogas que tuviesen como objetivo reducir específicamente la actividad de las R-Smads, necesarias para inducir genes implicados en la síntesis de matriz extracelular (Hill, 1999). Por ejemplo, la administración de adenovirus que codifican para la proteína Smad7 de ratón, ha demostrado que Smad7 puede bloquear la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, o agentes que induzcan la expresión de Smad7 pueden ser útiles para el tratamiento de daños fibróticos incluyendo la sobreexpresión del TGF β (Miyazono, 2002).

1.9.2. CÁNCER

Parece ser que la desregulación del TGF β está bastante implicada en los procesos tumorales. Los efectos celulares del TGF β incluyen varias formas de regulación negativa de la proliferación celular, produce una parada del ciclo celular en G1, fomenta la diferenciación terminal y activa mecanismos de muerte celular funcionando así como un supresor de tumores. Sin embargo, durante la progresión del tumor, las células adquieren insensibilidad a la inhibición por el TGF β y ya en estadios más tardíos de la génesis del tumor el TGF β parece que funciona como un promotor de dicho tumor por estimulación de la angiogénesis, inmunosupresión y síntesis de matriz extracelular, lo cual provee un microambiente apropiado para el crecimiento rápido de tumores y metástasis (Heldin *et al.*, 1997; Hill, 1999; Bierie y Moses, 2006).

Un mecanismo para la adquisición de la resistencia a los efectos antiproliferativos del TGF β podría deberse a alteraciones en los componentes de la vía de señalización. Parece ser que varios procesos tumorales tienen lugar por la inactivación del receptor II del TGF β debido a mutaciones (Massague, 1998; Miyazono *et al.*, 2003). La interrupción de la vía del TGF β en cáncer está demostrada, además, por la identificación de mutaciones inactivantes en Smad2 y Smad4. Smad4 está mutado o deletado en la mitad de los carcinomas de páncreas humanos, y también se han encontrado mutaciones de Smad4 en carcinomas de colon, mama, ovario, pulmón, cabeza y cuello. Smad2 también es diana de mutaciones en cáncer de colon y pulmón (Heldin *et al.*, 1997; Hill, 1999; Bierie y Moses, 2006; Levy y Hill, 2006). Las Smads podrían ser por tanto posibles dianas para las intervenciones terapéuticas para el tratamiento tardío de la progresión tumoral.

2. Endoglina

2.1. Expresión y distribución celular.

La endoglina (CD105) fue identificada a mediados de los años 80 con el anticuerpo monoclonal 44G4, generado al inmunizar ratones BALB/c con una línea celular linfoblástica humana (Gougos y Letarte, 1988b). El ADNc de la endoglina fue aislado en 1990 y se encontró que la proteína para la que codificaba era una proteína integral de membrana tipo I (Gougos y Letarte, 1990). En 1993, durante el V Taller Internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, se le asignó el grupo de diferenciación CD105, ya que aumenta su expresión en la transición de monocito a macrófago (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992). El gen de endoglina (*ENG*) está localizado, en el hombre, en el cromosoma 9q34 (Fernandez-Ruiz *et al.*, 1993).

La endoglina se identificó originalmente en el endotelio vascular humano donde se encuentra en altos niveles (Gougos y Letarte, 1988b). De hecho se expresa fundamentalmente en células endoteliales, tanto en arterias, como en venas y capilares, y tanto de adulto como embrionarias, por lo que es considerada un marcador endotelial (Gougos y Letarte, 1988b, 1988a; Bourdeau *et al.*, 2000; Cheifetz *et al.*, 1992). Su expresión se ve incrementada en células endoteliales en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa (Bodey *et al.*, 1998; Burrows *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003), en zonas donde hay una lesión vascular (Conley *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000; Botella *et al.*, 2002), en el endotelio de algunas patologías de la piel (Westphal *et al.*, 1993; van de Kerkhof *et al.*, 1998), en enfermedades autoinmunes (Marazuela *et al.*, 1995) y en el endotelio de algunos tumores sólidos (Burrows *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003).

Además de células endoteliales, se ha descrito la expresión de endoglina en células de origen hematopoyético, como precursores de células B (Zhang *et al.*, 1996), proeritroblastos (Buhning *et al.*, 1991), macrófagos (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992) y células estromales de la médula ósea (St-Jacques *et al.*, 1994a; Rokhlin *et al.*, 1995; Robledo *et al.*, 1996). También se expresa en fibroblastos (Gougos y Letarte, 1988a; Robledo *et al.*, 1996), células de músculo liso vascular

(Adam *et al.*, 1998), sincitiotrofoblastos de la placenta (Gougos *et al.*, 1992; St-Jacques *et al.*, 1994b), condrocitos del cartílago (Parker *et al.*, 2003), células mesangiales de riñón (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2001; Diez-Marques *et al.*, 2002), células estrelladas de hígado (Meurer *et al.*, 2005) y también en ciertos tumores como melanoma (Altomonte *et al.*, 1996; Bodey *et al.*, 1998) o cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2002).

La endoglina puede localizarse en caveolas (Toporsian *et al.*, 2005). Recientemente se ha comprobado que caveolina-1, la proteína mayoritaria de las caveolas, interacciona y coopera con la señalización de TGF β /ALK1 en células endoteliales (Santibanez *et al.*, 2008)

2.2. Estructura.

La endoglina es una proteína homodimérica de 180kDa compuesta por dos subunidades de 90kDa unidas por puentes disulfuro (Figura 11). Posee oligosacáridos unidos a las cadenas peptídicas a través de enlaces N-Asn y O-Ser/Thr, que constituyen aproximadamente el 20% en peso sobre el total de la glicoproteína (Gougos y Letarte, 1988a). La glicoproteína tiene un dominio extracelular de 561 aminoácidos; los primeros 25 aminoácidos corresponden al péptido señal, que dirige a la proteína hacia la membrana donde es eliminado. A continuación, contiene un largo dominio extracelular con varios sitios de N-glicosilación y un dominio conservado implicado en interacciones proteína-proteína, denominado zona pelúcida (ZP) (Jovine *et al.*, 2005). Este dominio ZP está compuesto por 260 aminoácidos con, al menos, ocho residuos de cisteína conservados. El dominio ZP está implicado en la oligomerización de la endoglina y en interacciones con los receptores del TGF β , T β RII y ALK5 (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Llorca *et al.*, 2007). En su dominio extracelular, la endoglina, presenta también el tripéptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), el cual se piensa que está implicado en adhesión celular (Gougos y Letarte, 1990; Cheifetz *et al.*, 1992). Este péptido se encuentra fundamentalmente en proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina, factor von Willebrand, colágeno tipo I y fibrinógeno, y es reconocido por integrinas de la superficie celular (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). Sin embargo, la identidad de las proteínas de tipo integrina que potencialmente podrían interactuar con el dominio RGD de endoglina, se

desconoce hasta la fecha. La endoglina de ratón, a pesar de presentar un 72% de homología con la humana, carece de péptido RGD (St-Jacques *et al.*, 1994a).

Después del dominio extracelular, la endoglina posee una única región transmembrana y un corto dominio citoplasmático, que se encuentra constitutivamente fosforilado en células endoteliales y fibroblastos (Lastres *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 1994a). En sus tres últimos residuos carboxi-terminales se encuentra un dominio de unión a motivos PDZ tipo I de otras proteínas que parece ser importante en la regulación de su fosforilación por parte de los receptores tipo I y II (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Lastres *et al.*, 1994; Koleva *et al.*, 2006).

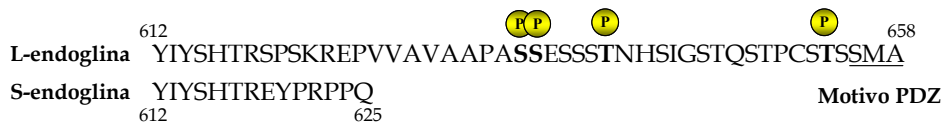
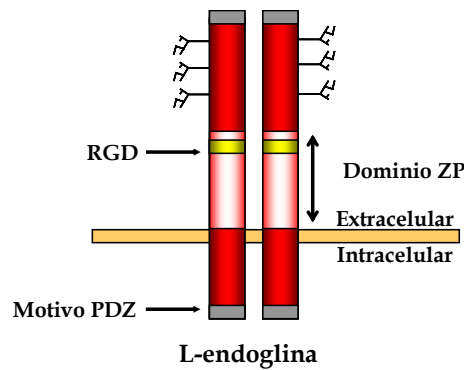


Figura 11. Representación esquemática del dímero de endoglina. (Adaptado de ten Dijke *et al.*, 2008)

Se han descrito dos isoformas distintas de endoglina (L, *large or long*; S, *small or short*) con capacidad de unir TGFβ, y que se originan por *splicing* alternativo (Figura 12). Difieren únicamente en su dominio citoplasmático. La forma predominante es la L-endoglina, formada por 633 aminoácidos de los cuales 47 forman el dominio intracelular, mientras que la S-endoglina está compuesta por 600 aminoácidos, con una cola corta citoplasmática de 14 aminoácidos. Ambas isoformas sólo tienen siete aminoácidos en común en su región intracelular (Bellon *et al.*, 1993). Esta diferencia se debe a que, en la isoforma corta, el último intrón de endoglina no se elimina, por lo que permanece en el ARN mensajero maduro. Este intrón introduce un codón de

parada prematuro que conduce a la traducción de una proteína más corta (Bellon *et al.*, 1993). La principal diferencia entre las dos isoformas es que la S-endoglina carece del motivo PDZ (SMA) presente en la isoforma larga. Además, la isoforma S carece de la Ser-616, un sitio potencial de fosforilación de la proteína quinasa C (PKC) (Lastres *et al.*, 1994). La isoforma L es la forma predominante en células endoteliales mientras que la isoforma S se expresa significativamente en hígado y pulmón (Bellon *et al.*, 1993).

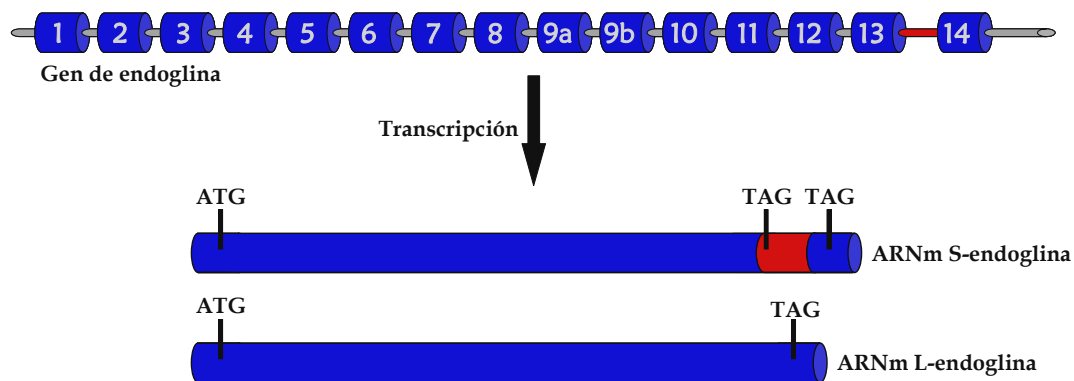


Figura 12. Procesamiento alternativo del ARN mensajero de la endoglina. Cuando el último intrón de la endoglina no se elimina, introduce un codón de parada prematuro que da lugar a la isoforma corta. (Adaptado de Fernandez-L *et al.*, 2006a).

Apenas se conoce el papel que desempeña la S-endoglina *in vivo*. Estudios en ratón sugieren que puede comportarse como una molécula antiangiogénica, contrariamente a la función proangiogénica que desempeña la isoforma mayoritaria (Perez-Gomez *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la endoglina es capaz de formar heterodímeros, cuyas funciones posiblemente serían distintas, por lo tanto la expresión relativa de las isoformas L y S podría ser un nuevo mecanismo para modular la función de la endoglina.

2.3. Funciones celulares de endogлина

La proteína endogлина, al no poseer ningún dominio catalítico, es considerada como un receptor auxiliar del TGF β , ya que une TGF β 1 y TGF β 3 con gran afinidad, pero sólo en presencia de los correspondientes receptores tipo I y tipo II. Sin embargo no es capaz de unir TGF β 2 (Barbara *et al.*, 1999; Cheifetz *et al.*, 1992; Letamendia *et al.*, 1998b; Blanco *et al.*, 2005). En estudios *in vitro*, se ha comprobado que también es capaz de unir otros miembros de la superfamilia del TGF β : activina-A, BMP-2 y BMP-7, siempre en presencia de sus respectivos receptores, aunque recientemente se ha visto que puede unir BMP-9 por sí sola, por lo que podría estar implicada en distintas vías de señalización (Barbara *et al.*, 1999; Scharpfenecker *et al.*, 2007).

El TGF β regula el estado de activación endotelial mediante un equilibrio entre la activación de ALK1 y de ALK5 (Goumans *et al.*, 2002). Mientras que la activación de ALK5 inhibe la proliferación y la migración, ALK1 lo estimula (Goumans *et al.*, 2003b). Algunos autores defienden que la endogлина favorece la señalización a través de ALK1 en células endoteliales por lo que estimula su proliferación y migración (Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). Según estos autores, la endogлина actuaría como un interruptor molecular (figura 13). En ausencia de endogлина, la señalización de TGF β 1 se canalizaría por ALK5 y Smad2 y 3, lo que conduciría a la inhibición de la proliferación y la migración y por tanto a un endotelio quiescente. En presencia de endogлина, la señalización de TGF β 1 se desviaría de ALK5 a ALK1 y Smad1, 5, lo que promovería la proliferación y migración de las células endoteliales y la angiogénesis. En cambio, otros autores han mostrado que es la deficiencia de endogлина en las células endoteliales la que favorece la señalización por Smad1, 5 (ALK1) aumentando la proliferación de estas células (Pece-Barbara *et al.*, 2005). Recientemente ha aparecido un estudio en el que se muestra como la endogлина favorece la señalización a través de Smad1y 5 pero esto produce una inhibición de la migración de las células endoteliales (2008). Además se ha encontrado que la forma soluble de endogлина, al igual que ocurre con la forma soluble del betaglicano, bloquea la unión del TGF β 1 a sus receptores e inhibe la señalización vía ALK5 en células endoteliales (Venkatesha *et al.*, 2006; Levine *et al.*, 2006).

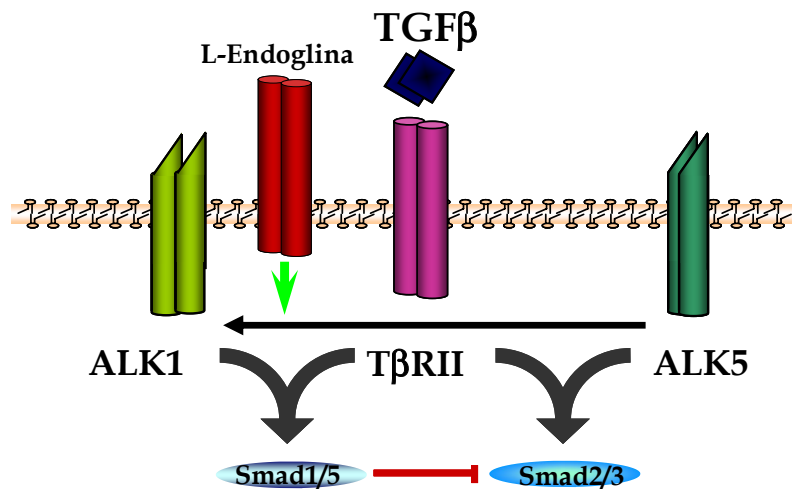


Figura 13. Modelo de regulación de la señalización del TGFβ1 a través de la endogлина en células endoteliales (Adaptado de Lebrin *et al.*, 2004).

Varios trabajos han descrito cómo la endogлина es capaz de bloquear algunas acciones ejercidas por el TGFβ en distintos tipos celulares (Lastres *et al.*, 1996; Letamendia *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000b; Diez-Marques *et al.*, 2002; Obreo *et al.*, 2004). Se ha propuesto un posible mecanismo de acción según el cual la endogлина secuestraría el ligando y evitaría su unión a los receptores, o bien, regularía directamente la actividad quinasa de los receptores, ya que en presencia de endogлина, la fosforilación de ambos receptores se encuentra alterada (Barbara *et al.*, 1999; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). Además el TGFβ aumenta la expresión de endogлина, lo que requiere los factores Sp1 y Smad3 y/ó Smad4 (Botella *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la hipoxia es un potente estimulador de la expresión del gen de endogлина en células endoteliales, y que esta inducción protege a las células de la apoptosis inducida por el TGFβ (Li *et al.*, 2003).

Aparte del papel de la endogлина como correceptor del TGFβ, se ha propuesto que debe desempeñar funciones independientes de esta vía de señalización, basándose en el hecho de que en la superficie de la célula endotelial existen 100 veces más moléculas de endogлина que complejos de receptores (Cheifetz *et al.*, 1992; Qu *et al.*, 1998). Se ha comprobado que la sobreexpresión de endogлина en fibroblastos y células de músculo liso vascular conduce a una alteración en la migración, adhesión y en la morfología celular, lo que sugiere un papel en la

organización del citoesqueleto (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999) (Figura 14). En concreto se ha demostrado que la endoglina interacciona con proteínas de la familia LIM, como zyxina, que controla la composición de las adhesiones focales y la migración (Conley *et al.*, 2004), y con ZRP-1 (*Zyxin-Related protein-1*), que interviene en la organización de las fibras de estrés (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004). También se ha visto que su tallo citoplasmático interacciona con β -arrestina2 alterando la distribución subcelular y la activación de ERK inhibiendo así la migración celular (Lee y Blobel, 2007). Además, la expresión de endoglina reduce la síntesis de colágeno cuando ERK1/2 está activada (Rodriguez-Barbero *et al.*, 2006).

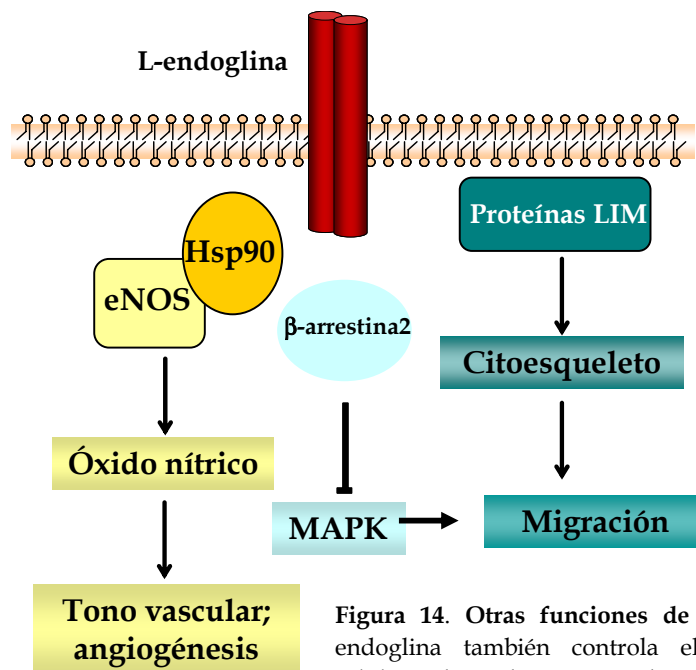


Figura 14. Otras funciones de la endoglina. La endoglina también controla el comportamiento celular independientemente de TGF β 1 al modular la actividad de eNOS, la organización del citoesqueleto y la vía de la MAPK, ERK. Adaptado de Lebrin y Mummery, 2008).

Por otro lado, se ha descrito a la endoglina como un importante regulador de la función de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS de *endotelial Nitric Oxide Synthase*), actuando como una proteína de anclaje entre ésta y la Hsp90 citoplasmática, chaperona fundamental en la actividad de la enzima (Toporsian *et al.*, 2005). A su vez, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado que existe una menor expresión de eNOS en ratones haploinsuficientes para endoglina (Jerkic *et al.*, 2004).

2.4. Importancia fisiológica y fisiopatológica

2.4.1. Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT)

Existen mutaciones en el gen de endoglinina (*ENG*) que son causantes de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I (HHT1) o Síndrome de Rendu-Osler Weber. Es una enfermedad vascular autosómica dominante. Se caracteriza fundamentalmente por la aparición de estructuras vasculares anormales que conducen a frecuentes hemorragias nasales (epistaxias), telangiectasias y malformaciones arterio-venosas (AMV de *Arterio-venous Malformations*). Las telangiectasias son pequeñas dilataciones de los capilares que se observan clínicamente como manchas rosadas y aparecen en piel y mucosas, frecuentemente en labios, cavidad oral, nariz, región cercana a las uñas, palmas de las manos o en el tracto digestivo. Las AMV consisten en conexiones directas entre arteriolas y vénulas sin intervención de capilares, estas estructuras son muy frágiles y pueden romperse dando lugar a hemorragias, se producen fundamentalmente en órganos internos, como pulmones, hígado, cerebro o médula espinal (Shovlin y Letarte, 1999). Los estudios más recientes indican que la prevalencia media de la HHT se halla en torno a 1/5.000-1/8.000 (Fernandez-L *et al.*, 2006a).



Figura 15. Telangiectasias en pacientes con HHT

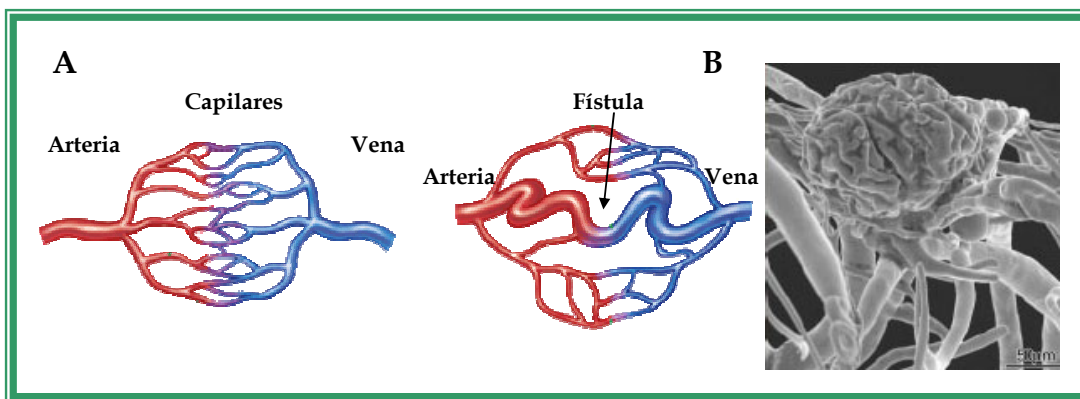


Figura 16. Formación de una fístula arterio-venosa. A. Unión directa entre arteriolas y vénulas debido a una pérdida de la red capilar. B. Estructura de una malformación arteriovenosa vista al microscopio electrónico (imagen tomada de "Pulmonary Hypertension Association website").

Existen otros tipos de HHT, como la HHT2 producida por mutaciones en el gen de ALK1 (*ACVRL1*) (Johnson *et al.*, 1996). Sin embargo, se han encontrado pacientes con características clínicas de HHT sin mutaciones en los genes de endogлина o ALK1, sugiriéndose la existencia de otros genes ligados a la enfermedad. La HHT1 y la HHT2 se consideran clínicamente indistinguibles (Shovlin *et al.*, 2000). El predominio de uno u otro tipo de HHT está relacionado con la localización geográfica, siendo HHT1 más frecuente en Norteamérica, Canadá (Abdalla *et al.*, 2000; Abdalla *et al.*, 2003) o en el norte de Europa (Letteboer *et al.*, 2005), mientras que HHT2 prevalece en países de la cuenca mediterránea como Italia (Lastella *et al.*, 2003), Francia (Lesca *et al.*, 2006) y España (Fernandez-L *et al.*, 2006b; Fontalba *et al.*, 2008). Se han descrito dos locus más de HHT en pacientes que no tienen mutaciones en endogлина ni en ALK1: HHT3 en el cromosoma 5 (Cole y cols., 2005) y HHT4 en el cromosoma 7 (Bayrak-Toydemir *et al.*, 2006). Algunas mutaciones en el gen de Smad4 (*MADH4*, cromosoma 18) pueden causar un síndrome que presenta poliposis juvenil y fenotipo de HHT, este síndrome se conoce como JP-HHT (Gallione *et al.*, 2004).

Hasta la fecha, se han descrito 248 mutaciones distintas en el gen que codifica endogлина, pero este número aumenta de manera continua, estas mutaciones incluyen deleciones, inserciones y mutaciones sin sentido que en un 80% de los casos llevan a la introducción de codones de parada prematuros y con ello a proteínas truncadas (Abdalla y Letarte, 2006). Clásicamente se ha considerado que el mecanismo causante de la enfermedad es la haploinsuficiencia, es decir se produce una mutación que provoca una reducción en los niveles de mensajero y de

la proteína. De esta forma, las células endoteliales de los enfermos cuentan únicamente con la mitad de la proteína, y la proteína producida por una sola copia del gen no es suficiente para garantizar una función normal (Marchuk, 1998; Shovlin *et al.*, 1997). Lux y colaboradores encontraron varias mutaciones en el gen de endogлина que, expresadas *in vitro*, no eran capaces de alcanzar la membrana celular, pero que actuaban como un dominante negativo secuestrando a la proteína silvestre en el interior de la célula (Lux *et al.*, 2000). La causa molecular de la HHT se ha considerado que es la disfunción de la señalización del TGF β en células endoteliales. Se ha visto que en células endoteliales aisladas de sangre periférica de pacientes con HHT la vía de señalización del TGF β se encuentra alterada (Fernandez-L *et al.*, 2005); además los niveles plasmáticos del TGF β se encuentran reducidos en pacientes con HHT1 (Letarte *et al.*, 2005).

La generación de ratones heterocigóticos para endogлина (Eng^{+/-}), que son viables, son un buen modelo animal para el estudio de la HHT1 (Bourdeau *et al.*, 1999). Los cultivos de células endoteliales obtenidas a partir de sangre periférica pueden ser también un modelo adecuado para el estudio de las bases moleculares y celulares de la enfermedad, ya que presentan un gran número de alteraciones en sus funciones biológicas que pueden explicar las manifestaciones clínicas de los pacientes (Fernandez-L *et al.*, 2005; Fernandez-L *et al.*, 2007).

2.4.2. ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es un proceso muy complejo que permite la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Pepper, 1997). Además de su papel en el desarrollo, la angiogénesis es fundamental en la vida adulta para el mantenimiento de la integridad de los vasos. El papel de la endogлина en la angiogénesis se puso de manifiesto con la creación de ratones *knockout* para endogлина. Los ratones deficientes en el gen de endogлина (Eng^{-/-}) tienen defectos vasculares y cardiovasculares que conducen a su muerte embrionaria aproximadamente entre los días 10-11 de gestación. A día 9, los embriones no son capaces de formar estructuras vasculares maduras en el saco vitelino, observándose la dilatación de los vasos sanguíneos, su ruptura y la presencia de hemorragias (Li *et al.*, 1999; Bourdeau *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000). Los ratones heterocigotos Eng^{+/-} tienen un desarrollo vascular normal, pero los ratones adultos poseen deficiencias

en la neoangiogénesis tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Jerkic *et al.*, 2006b; Duwel *et al.*, 2007). Las células endoteliales derivadas de estos ratones muestran una menor proliferación, migración e incremento de la producción de colágeno además de una menor producción de óxido nítrico y secreción de VEGF (Jerkic *et al.*, 2006b).

2.4.3. PROCESOS TUMORALES

La noción de que la angiogénesis es crucial en el crecimiento y progresión de los tumores, así como la demostración de que la endoglina se sobreexpresa cuando el endotelio está proliferando y su función en la formación de los vasos, sugieren que la endoglina puede tener relevancia en el diagnóstico, pronóstico y terapéutica de las enfermedades cancerígenas (Fonsatti *et al.*, 2003; Duff *et al.*, 2003). Además, varios autores han demostrado que la expresión de endoglina se encuentra muy aumentada en la vasculatura de tumores sólidos (Burrows *et al.*, 1995; Thorpe y Burrows, 1995). De hecho, en los vasos de tejidos adultos no malignos, incluyendo lesiones preneoplásicas, la expresión de endoglina es mucho más débil que en los vasos de los tumores y con frecuencia se restringe a los capilares (Fonsatti *et al.*, 2000).

Varios estudios han descrito la endoglina como un potente marcador en la vasculatura de tumores sólidos y hematopoyéticos como mama (Kumar *et al.*, 2006), próstata (Kassouf *et al.*, 2004), cervix (Brewer *et al.*, 2000), colorrectal (Akagi *et al.*, 2002), cáncer de pulmón de células macrocíticas (Tanaka *et al.*, 2001), tumores escamosos de cabeza y cuello (Kyzas *et al.*, 2006), carcinoma renal (Sandlund *et al.*, 2006), adenocarcinoma esofageal (Saad *et al.*, 2005), carcinoma endometrial (Saad *et al.*, 2003), mieloma múltiple (Pruneri *et al.*, 2002) y leucemia de células pilosas (Pruneri *et al.*, 2003). En estudios realizados en células endoteliales procedentes de vasos tumorales se ha encontrado que existe una correlación entre el aumento en la expresión de endoglina y la proliferación, sugiriendo que la supresión de endoglina podría usarse como inhibidor de la angiogénesis tumoral (Miller *et al.*, 1999). Además se ha correlacionado el número de vasos positivos para endoglina con el riesgo de desarrollar metástasis en tumores de colon, cáncer oral, carcinoma hepatocelular y cáncer endometrial (Kumar *et al.*, 1999; Saad *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2006; Erdem *et al.*, 2006; Romani *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Sin embargo, en células de cáncer de próstata, la endoglina suprime la adhesión celular, la motilidad

y la invasión mediante la activación de la vía TGF β 1/ALK2/Smad1 (Liu *et al.*, 2002; Craft *et al.*, 2007); es más, la expresión de endogлина disminuye en la progresión del cáncer de próstata pudiendo tener un papel supresor de tumores en dicho cáncer.

La relación de la endogлина con los tumores no se debe únicamente a los procesos de angiogénesis, puesto que se ha comprobado que ciertos tipos de células tumorales expresan endogлина. Este es el caso de los melanomas (Altomonte *et al.*, 1996), coriocarcinomas (Letamendia *et al.*, 1998a) y tumores de origen hematopoyético, en concreto de linajes monocíticos (Lastres *et al.*, 1996; Haruta y Seon, 1986) y de linfocitos B (Zhang *et al.*, 1996). El papel de la endogлина en estas células se ha relacionado con la modulación de la respuesta antiproliferativa del TGF β . La pérdida del efecto antiproliferativo del TGF β es un punto clave en el desarrollo de muchos procesos tumorales (Serra y Moses, 1996). En este sentido se ha relacionado la sobreexpresión de endogлина en células mieloides tumorales con la pérdida del efecto antiproliferativo del TGF β (Calabro *et al.*, 2003). La endogлина es también importante en la carcinogénesis epidérmica modulando la señalización de TGF β 1 (Perez-Gomez *et al.*, 2007) y que podría tener un papel dual inhibiendo la formación de un tumor benigno, pero acelerando la conversión en un cáncer de piel (Quintanilla *et al.*, 2003).

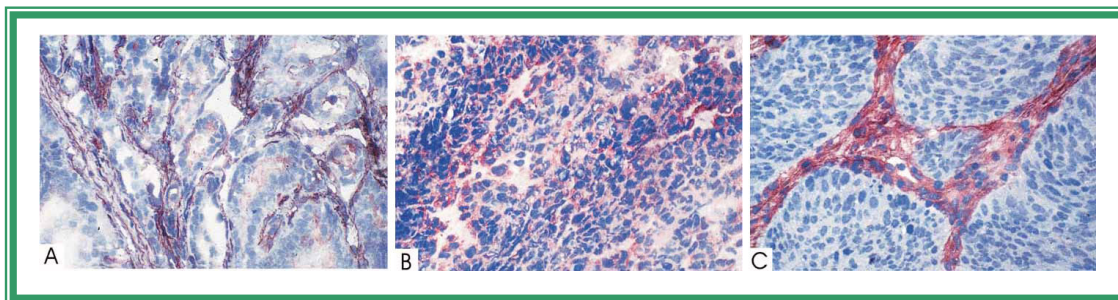


Figura 17. Expresión de endogлина en tumores sólidos. A. Carcinoma de tiroides B. Miosarcoma C. Carcinoma de ovario. (Imágenes tomadas del artículo "Endoglin: An accessory component of the TGF- β -binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies" de Fonsatti *et al.*, 2001).

2.4.4. PROCESOS DE DESARROLLO Y REPARACIÓN

Además de los tumores sólidos, se ha encontrado sobreexpresión de endogлина en células endoteliales de embriones, tejidos en cicatrización, tejidos infartados, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis, nefritis crónica, etc. (Roy-Chaudhury *et al.*, 1997; van de Kerkhof *et al.*, 1998; Conley *et al.*, 2000; Rulo *et al.*,

1995; Szekanecz *et al.*, 1995). Algunas investigaciones recientes de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto el papel de la endogлина en la modulación de la fibrosis que se produce en procesos de enfermedad renal progresiva (Rodríguez-Pena *et al.*, 2001; Rodríguez-Pena *et al.*, 2002). Otros autores han demostrado la implicación de la endogлина en otros procesos fibróticos (Leask *et al.*, 2002; Dharmapatni *et al.*, 2001).

La expresión de endogлина en fibroblastos y células estromales de diversos tejidos abrió diversas líneas de investigación para buscar una posible función de esta proteína en procesos de desarrollo y reparación (St-Jacques *et al.*, 1994a; Robledo *et al.*, 1996; Rokhlin *et al.*, 1995; Qu *et al.*, 1998).

2.4.5. PROCESOS DE INFLAMACIÓN

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) está disminuida en células deficientes en endogлина, mientras que se ve incrementada en células que sobreexpresan endogлина (Jerkic *et al.*, 2004; Toporsian *et al.*, 2005). El incremento de eNOS dependiente de endogлина está mediado, al menos en parte, por un mecanismo post-transcripcional que implica la asociación de la endogлина con proteínas de las caveolas. Allí se asocia con la eNOS y modula su actividad funcionando como una proteína de anclaje con la chaperona Hsp90, como ya hemos mencionado, fundamental para la actividad de eNOS (Toporsian *et al.*, 2005). Puesto que se ha descrito que TGF β aumenta la expresión de eNOS vía Smad2 (Saura *et al.*, 2002) recientemente se ha sugerido que endogлина aumentaría la expresión de eNOS al incrementar los niveles de Smad2 (Santibanez *et al.*, 2007). Además la expresión de endogлина se correlaciona inversamente con la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (Jerkic *et al.*, 2006a), quizá como un mecanismo que trataría de suplir la disminución o falta de óxido nítrico.

2.4.6. ENDOGLINA SOLUBLE

A pesar de que la endogлина es una proteína de membrana, se pueden encontrar bajos niveles de la proteína soluble en plasma (sEng), probablemente debido a un corte proteolítico, como ocurre con el betaglicano, que puede ser cortado por la metaloproteasa 1 (MT1-MMP) (Velasco-Loyden *et al.*, 2004). La sEng puede encontrarse tanto libre como unida al TGF β 1 y estos niveles pueden estar

aumentados en ciertas patologías. La concentración plasmática de complejos endoglina-TGF β se encuentra aumentada en pacientes con cáncer de mama (Li *et al.*, 1998), mientras que altos niveles de endoglina soluble libre parecen correlacionarse con el riesgo de desarrollar metástasis en estos pacientes (Li *et al.*, 2000a). Asimismo, se ha detectado esta correlación en pacientes con cáncer de colon y pulmón (Takahashi *et al.*, 2001); estos estudios indican que la sEng podría servir como marcador pronóstico en la progresión tumoral en varios tipos de cáncer (Fonsatti *et al.*, 2003). Otros estudios muestran una elevada concentración de la proteína soluble en leucemia mieloide aguda, desórdenes mieloproliferativos crónicos (Calabro *et al.*, 2003) y en esclerosis sistémica (Fujimoto *et al.*, 2006).

Recientemente se le ha asignado un papel importante a la sEng en la preeclampsia. Esta enfermedad, exclusiva de la gestación de seres humanos, y que afecta a un 5% de los embarazos, está caracterizada por un aumento de la presión arterial y proteinuria que causa una alta morbilidad perinatal y mortalidad materna (Sibai *et al.*, 2005). Se han encontrado altos niveles de sEng en el suero de mujeres embarazadas con esta enfermedad, que se correlaciona con la severidad de la alteración (Venkatesha *et al.*, 2006; Levine *et al.*, 2006).

Existen otros trabajos en los que se relaciona la sEng con otros procesos fisiopatológicos. Por ejemplo un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio en pacientes que habían sufrido un infarto agudo miocárdico, muestra como una disminución drástica en los niveles de endoglina soluble en plasma después del infarto se correlaciona con un peor pronóstico en la recuperación, es decir con una mayor morbilidad a corto plazo (Cruz-Gonzalez *et al.*, 2008).

La mayoría de las situaciones fisiológicas y fisiopatológicas en las que se ha visto implicada la endoglina, están relacionados con una posible regulación de los efectos del TGF β . La sobreexpresión de endoglina en distintos tipos celulares ha sido una herramienta clave en la investigación del papel de este receptor en las respuestas mediadas por el TGF β indicando que la endoglina podría regular la propagación de la señal del TGF β (Lastres *et al.*, 1996; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2000b), pero todos estos estudios se han centrado en el papel de la isoforma larga, y apenas se sabe nada de la función fisiológica de la S-endoglina.

*El experimentador que no sabe lo que está buscando,
no comprenderá lo que encuentra.”
- Claude Bernard -*

Objetivos

Nuestro interés al iniciar este trabajo se centró en conocer el papel de las isoformas de endogлина en la ruta de señalización del TGF β 1 y en varias propiedades biológicas en las que esta citoquina tiene un papel importante. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar las rutas de señalización del TGF β , ALK1 y ALK5, en células no endoteliales.
2. Analizar el efecto de las isoformas de endogлина en la expresión, y activación de las R-Smads y en las dianas moleculares que se activan en respuesta a TGF β 1.
3. Evaluar el posible papel de las isoformas de endogлина en la expresión de la Co-Smad, Smad4 y de la I-Smad, Smad7.
4. Investigar el efecto de la expresión de las dos isoformas de endogлина en la acumulación de matriz extracelular, la proliferación celular y la expresión de moléculas relacionadas con la inflamación.

*"Son vanas y están plagadas de errores
las ciencias que no han nacido del experimento,
madre de toda certidumbre"
- Leonardo da Vinci -*

Materiales y métodos

1. Materiales

Todos los reactivos, anticuerpos, materiales y aparatos empleados para la realización de este trabajo, están recogidos en los apéndices que se encuentran al final de este apartado de Materiales y métodos.

2. Métodos de cultivo celular

2.1. Cultivos celulares

Para la realización de este trabajo se ha utilizado la línea celular de mioblastos de músculo esquelético de rata L₆E₉. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ /95% aire. Las manipulaciones que requirieron ambiente estéril se realizaron en una campana de flujo laminar vertical. Las micrografías de células en cultivo con contraste de fases se tomaron con una cámara acoplada a un microscopio invertido.

Para mantener estas células se utilizó medio de cultivo DMEM (medio *Eagle* modificado por Dulbecco) con glucosa (4,5 g/l), antibióticos (50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina), 2,5 µg/ml de anfotericina B y enriquecido con 10% de suero bovino fetal (FBS). El medio de cultivo se cambió cada 48 horas y cuando las células estaban confluentes se hicieron pases en dilución 1:10.

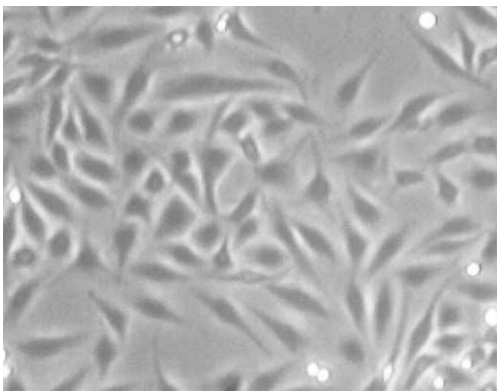


Figura 18. Mioblastos de rata L₆E₉ creciendo en medio de cultivo DMEM. Imagen tomada del microscopio óptico de contraste de fases (x 40 aumentos)

2.2. Técnicas básicas en cultivos celulares

2.2.1 Tripsinización celular

Los mioblastos, son células adherentes, por lo que para el mantenimiento de la estirpe celular como para la realización de los experimentos las células se transfirieron al material de trabajo adecuado (placas petri, cubreobjetos, etc).

Se utilizó la técnica de la tripsinización celular para levantar las células adheridas al plástico y volverlas a sembrar en otro soporte. Después de retirar el medio y lavar con PBS, se añadió tripsina-EDTA (tripsina 0,05%, EDTA 0,02%) para romper los enlaces que unen las células a la superficie de la placa. La acción de la tripsina se detuvo con medio de cultivo y, a continuación, las células se transfirieron a un tubo que se centrifugó a 300 g durante tres minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo dependiendo de su posterior utilización. Si el experimento lo requería, en este punto se procedió al recuento celular.

48

2.2.2. Recuento del número de células

Las células destinadas a la realización de los experimentos se contaron después de la tripsinización utilizando una cámara de Neubauer. Después de resuspender las células en medio de cultivo, se mezclaron en una proporción de 1:1 con el colorante de exclusión azul de trypan 0,4%. De esta forma excluimos del recuento aquellas células no viables, ya que sólo incorporan el colorante las células muertas o dañadas.

2.2.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para el mantenimiento de la línea celular se congelaron células en distintos pases. Para ello se tripsinizaron las células y se procedió de la forma explicada anteriormente. Finalmente se eliminó el medio y las células se resuspendieron en 2 ml de medio frío con 20% FBS y con 10% de DMSO.

La suspensión celular resultante se guardó en un vial de crioconservación dentro de un recipiente en la que la temperatura va disminuyendo lenta y gradualmente siguiendo un gradiente de 1° C por minuto cuando se introduce en un

congelador a -80° C. Después de 24 horas, las células se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

2.3. Tratamiento de los cultivos

Para algunos de los experimentos descritos las células se trataron con diferentes sustancias. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en medio de cultivo sin suero. Los tratamientos con TGF β 1 se realizaron a una concentración final de 500 pM administrados en una sola dosis tanto en tratamientos agudos como crónicos. El inhibidor de la actividad quinasa de ALK5, SB431542, se usó a una concentración final de 5 μ M y se añadió 1 hora antes del tratamiento con TGF β 1.

2.4. Transfecciones

Las técnicas de transfección celular sirven para introducir ácidos nucleicos en el interior de las células. Existen diversas técnicas basadas tanto en métodos químicos como físicos (microinyección, electroporación). Los métodos químicos se basan en la formación de complejos que las células pueden incorporar por endocitosis.

2.4.1. Generación de clones estables de mioblastos L₆E₉

Los mioblastos L₆E₉ se transfectaron de manera estable con las diferentes isoformas de endogлина (L-endogлина y S-endogлина) en el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabéu (CIB, CSIC, Madrid). Puesto que estas células no expresan endogлина, podemos tener un modelo en el cual podemos estudiar el efecto de la expresión de las dos isoformas. Para ello, se utilizó un vector de expresión que contenía la secuencia completa del gen de la L-endogлина humana y de la S-endogлина humana. Los mioblastos fueron cotransfectados con los vectores pcEXVendoL o pcEXVendoS y pxV2neo en una relación 10:1. De acuerdo con las indicaciones del protocolo comercial se mezclaron 10 μ g del ADN del plásmido con 20 μ g de Lipofectamina en medio de cultivo sin suero. La selección de los clones estables se realizó añadiendo al medio 400 μ g/ml del antibiótico G418, y se catalogaron como positivos o negativos mediante un ensayo de citometría de flujo. Además, se hizo una transfección paralela sólo con el vector pxV2neo, generando

transfectantes mock que no contenían el gen de la endoglina y que se utilizaron como control de los transfectados con las isoformas de endoglina. Los clones aislados se caracterizaron mediante estudios bioquímicos y funcionales, sin encontrarse diferencias relevantes entre los mioblastos mock transfectados y la línea parental (Bellon *et al.*, 1993; Letamendia *et al.*, 1998).

2.4.2. Transfecciones transitorias de ADN

Para las transfecciones transitorias de ADN se sembraron las células 24 horas antes de la transfección en placas de 60mm. Las células al 50-60% de confluencia se transfectaron con las construcciones de ADN indicadas en cada experimento usando el reactivo *jetPEI™ Cationic polymer transfection reagent* según las instrucciones del fabricante a una N/P (número de residuos de nitrógeno del reactivo por fosfato del ADN) de 5. El *jetPEI™* es un polímero de polietilenimina que compacta el ADN en partículas cargadas positivamente que entran en la célula por endocitosis debido a la interacción con los proteoglicanos aniónicos de la membrana. Transcurridas 24 horas se realizó la extracción de proteínas.

Los plásmidos utilizados fueron:

-pcADN3-HASL-ALK1 (QD): mutante constitivamente activo de ALK1 (cedido por el Dr. Carmelo Bernabéu; CIB, Madrid).

-pCMV5-TβRI-HA (TD): mutante constitivamente activo de ALK5 (cedido por el Dr. Carmelo Bernabéu; CIB, Madrid)

Placa de cultivo	medio de cultivo	ADN	<i>jetPEI™</i>	NaCl	Volumen final de complejos
24 pocillos	500 µl	Hasta 1 µgr	2 µl	50 µl	100 µl
60 mm	3 ml	5 µgr	10 µl	250 µl	500 µl

Tabla 3. Volumen de reactivos para la transfección celular transitoria con *jetPEI™*

2.4.3. Ensayos de promotor

Para estudiar la señalización inducida por TGF β 1, se analizó la actividad reportera de promotores, que contienen elementos concretos de respuesta al factor, acoplados a ADNc que codifica para la enzima luciferasa. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad que permitiera obtener entre un 40-50% de confluencia en el momento de la transfección. Una vez pegadas, las células se transfectaron con las construcciones de ADN indicadas en cada experimento con *jetPEI*TM durante 5 horas, según las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, las células se trataron o no con TGF β 1 durante 24 horas tras lo cual se midió la actividad luciferasa de las células utilizando el sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay System*. Para normalizar los resultados, en todos los casos se co-transfectó la construcción pRL-TK *Renilla Normalizing Luciferase Vector* (Peinado *et al.*, 2003). Ambas actividades luciferasa (Firefly y Renilla) se monitorizaron en un luminómetro *Glomax 20/20 luminometer*. Cada ensayo se realizó un mínimo de tres veces por cuadruplicado. Los resultados se expresaron como unidades de luz relativas (ULRs).

Reportero	Vector	Descripción	Procedencia
p(Bre) ₂ -Luc	pGL3	Reportero de la vía de ALK1. Obtenido del promotor de Id1	Dr. Peter ten Dijke (LUMC, Leiden, The Netherlands)
pARE-Fast-Luc	pGL2	Reportero de la vía de ALK5. Con secuencias específicas para Smad2	Dr. Miguel Quintanilla (IIB, Madrid, España)
p(CAGA) ₁₂ -Luc	pGL3	Reportero de la vía de ALK5. Obtenido del promotor de PAI-1	Dr. Peter ten Dijke (LUMC, Leiden, The Netherlands)
pCOX2-Luc	pGL2	Reportero que contiene el promotor de ratón de COX-2	Dr. Harding (Henry Ford Hospital, Detroit, EEUU)

Tabla 4. Vectores reporteros empleados

3. Análisis del nivel de expresión de proteínas

3.1. Western Blot

El método del *Western blot* (Winston *et al.*, 1987) permite la identificación de proteínas de un extracto celular o tejido y se basa en la separación de las proteínas de una muestra en función del tamaño las cuales se transfieren posteriormente a una membrana. En dicha membrana son reconocidas mediante la utilización de anticuerpos específicos contra las proteínas que se desean identificar, denominados anticuerpos primarios, y anticuerpos secundarios que reaccionan con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios están conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP de *horse radish peroxidase*) que al reaccionar con el sustrato que se añade posteriormente produce una reacción fácilmente detectable y proporcional a la cantidad de proteína estudiada.

3.1.1. Obtención de extractos de proteínas celulares

Una vez terminado el tratamiento, las placas se colocaron sobre hielo para ralentizar el metabolismo celular. Se lavaron con PBS frío para retirar el medio de cultivo y posibles restos celulares y se lisaron con tampón de lisis frío (Tris base 20 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol 10%, IGEPAL CA-630 1%), al que se añadió inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, pepstatina A 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, PMSF 1 mM) y fosfatasas (ortovanadato sódico 0,2 mM). El lisado celular se centrifugó a 10000 g a 4°C durante 10 minutos. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante (extracto de proteínas) y se guardó a -20°C hasta su uso.

3.1.2. Obtención de los extractos de proteínas nucleares

Una vez finalizado el tratamiento se procedió en su caso a extraer las proteínas del núcleo. Para ello utilizamos el kit comercial *CellLytic™ NuCLEAR™ EXTRACTION KIT (N-XTRACT)* siguiendo las indicaciones del fabricante.

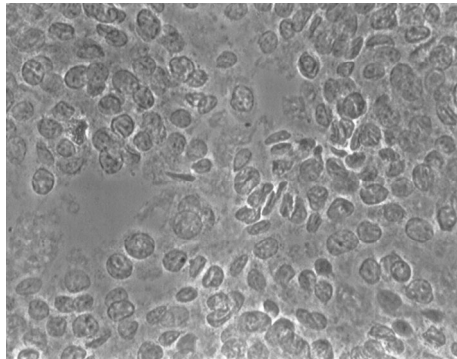


Figura 19. Núcleos aislados de mioblastos de rata L₆E₉. Imagen tomada del microscopio óptico de contraste de fases (x 200 aumentos)

3.1.3. Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de la cantidad de proteínas en los extractos proteicos se siguió el protocolo del Kit comercial colorimétrico *DC Protein Assay*, basado en el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se midió la absorbancia a 720 nm en un lector de placas de ELISA y los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior* (BIO-TEK Instrument).

3.1.4. Preparación de las muestras y electroforesis

Las proteínas se separan mediante una electroforesis vertical en gel SDS-PAGE (dodecil sulfato sódico-gel de poliacrilamida para electroforesis de *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) con distinto porcentaje de poliacrilamida según el tamaño de la proteína a analizar. Se prepararon las muestras en condiciones desnaturizantes añadiendo tampón de carga (Tris base 125 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 1%, azul de bromofenol 0.0005% pH 6,8) e hirviendo a 100° C durante 5 minutos, según Laemmli (1970). El gel se corrió posteriormente en tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 1,7 mM) en cubetas Mini-PROTEAN®III aplicando un voltaje constante de 130 voltios (V).

En situaciones en las que no necesitábamos condiciones desnaturizantes, los lisados celulares se mezclaron con el tampón de carga sin β -mercaptoetanol y sin ebullición.

3.1.5. Transferencia

Las proteínas separadas e incluidas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante transferencia húmeda, a 400 mA durante 1 hora y 30 minutos o transferencia semi-seca, a 20 V durante 30 minutos a temperatura ambiente, en el tampón de transferencia (glicina 192 mM, Tris base 25 mM, pH 8.3).

3.1.6. Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Previamente a la incubación con anticuerpos, se procedió al bloqueo de los lugares de la membrana no ocupados por proteínas. Para ello, una vez finalizada la transferencia se lavó la membrana con tampón de lavado (Tween-20 0.1%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7.5) y se incubó con tampón de bloqueo (BSA en tampón de lavado; la concentración de BSA depende de la proteína estudiada) durante 1 hora a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C) en agitación. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (Tabla 5), durante al menos noventa minutos (las referencias y casas comerciales de los anticuerpos utilizados se encuentran en el *Apéndice 2*). Tras la incubación con el anticuerpo primario se hacen 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado y se incuba la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario, una inmunoglobulina (IgG) conjugada con HRP durante treinta minutos.

Proteína	PM	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Actina	42kDa	AcP de cabra 1:4000	Anti-cabra 1:10000
ALK1	56kDa	AcP de cabra 1:1000	Anti-cabra 1:10000
ALK5	56kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
Ciclina D1	33-43kDa	AcM de ratón 1:1000	Anti-ratón 1.15000
Ciclina E	53kDa	AcM de ratón 1:1000	Anti-ratón 1.15000
Colágeno I	180kDa	AcP de conejo 1:20000	Anti-conejo 1:20000
COX1	70kDa	AcM de ratón 1:1000	Anti-ratón 1.15000
COX2	72kDa	AcP de cabra 1:2000	Anti-cabra 1:10000

Proteína	PM	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
CTGF	38kDa	AcP de cabra 1:1000	Anti-cabra 1:10000
Endoglina	180kDa	AcM de ratón 1:10	Anti-ratón 1:15000
Fosfo-Smad1	52kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
Fosfo-Smad2	52kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
Fosfo-Smad1/3	52-48kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
Histona H1	32-33kDa	AcP de cabra 1:1000	Anti-cabra 1:10000
Id1	15kDa	AcP de conejo 1:500	Anti-conejo 1:20000
NOS2	130kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
PAI-1	45kDa	AcM de ratón 1:1000	Anti-ratón 1:15000
PCNA	36kDa	AcM de ratón 1:1000	Anti-ratón 1:15000
Smad1	52kDa	AcM de ratón 1:1000	Anti-ratón 1:15000
Smad2/3	52-48kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
Smad4	60kDa	AcM de ratón 1:1000	Anti-ratón 1:15000
Smad7	46kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
TβRII	64kDa	AcP de conejo 1:1000	Anti-conejo 1:20000
Tubulina	60kDa	AcM de ratón 1:5000	Anti-ratón 1:15000

Tabla 5. En la tabla se especifica el peso molecular (PM) de cada proteína y se detallan las diluciones de los anticuerpos correspondientes. AcM: anticuerpo monoclonal. AcP: anticuerpo policlonal.

3.1.7. Revelado

Para la detección de las bandas se utilizó un sistema basado en la oxidación del luminol por HRP y potenciado con fosfo-iodofenol. Las membranas se incubaron durante un minuto con los reactivos correspondientes (ECL). Inmediatamente y en la oscuridad se impresionó la membrana en una película y se introdujo en la máquina de revelado. Por último, la película se digitalizó y se

cuantificó la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa *Scion Image* (*Scion Corporation*).

3.1.8. Reutilización de membranas

Algunas de las membranas de *Western blot* se reutilizaron para el análisis de otras proteínas. Antes de reincubar una membrana con otros anticuerpos, se la sometió a un lavado, durante 15 minutos (primera reutilización) o 20 minutos (segunda reutilización), con un kit comercial (*Re-Blot Plus Strong Solution*) y dos lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con tampón de lavado. A continuación se incubó con la solución de bloqueo y se siguió el protocolo normal de *Western blot*.

56

3.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es un método inmunocitoquímico empleado para la localización de proteínas celulares. Se basa en la utilización de un anticuerpo primario que se unirá con la proteína a identificar y de un anticuerpo secundario que se unirá al primario. Este anticuerpo secundario está conjugado a su vez con un fluorocromo que emite fluorescencia al ser excitado con una determinada longitud de onda.

3.2.1. Marcaje de las células

En primer lugar se retiró el medio de cultivo de las placas y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 15 minutos. Después de fijar las células se lavaron con PBS con iones calcio y magnesio (PBS-CM; CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM en PBS 1X) y si la localización de la proteínas a estudiar era intracelular como ocurre con las Smads se permeabilizó con tampón de permeabilización (PBS-CM, Tritón X-100 0,1%, BSA 0,2%, azida sódica 0,05%) durante cinco minutos. Posteriormente se añadió NH₄Cl 50 mM en PBS-CM durante cinco minutos (para “secuestrar” los restos de paraformaldehído) y, a continuación, se lavó con PBS-CM o con tampón de permeabilización. A continuación, se bloqueó con PBS-CM suplementado con BSA, suero de cabra o suero de burro al 10% dependiendo de la proteína analizada (Tabla 6), manteniéndolo en agitación lenta. Se añadieron los anticuerpos primarios y se incubó durante una hora a temperatura

ambiente. Tras la incubación con el anticuerpo primario las células se lavaron con PBS-CM en abundancia y se volvieron a incubar con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (cianina-3 o Alexa Fluor® 488) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Los núcleos se tiñeron incubando los cubres en una solución acuosa 1 μ M del colorante Hoeschst 33258 durante unos segundos. En último lugar se montaron las preparaciones sobre un portaobjetos utilizando la solución *ProLong® Gold antifade reagent*.

Proteína	Bloqueo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Endoglin*	No necesario	AcM de ratón 1:2	Anti-ratón Alexa Fluor®488 1:1000
Smad1	10% suero de cabra	AcM de ratón 1:100	Anti-ratón Alexa Fluor®488 1:1000
Smad2/3	10% suero de burro	AcP de cabra 1:200	Anti-cabra Alexa Fluor®488 1:1000
Smad4	10% suero de cabra	AcM de ratón 1:200	Anti-ratón Cy™3 1:1000

Tabla 6. En la tabla están detalladas las condiciones específicas para el análisis por inmunofluorescencia de cada proteína, el bloqueo (el tampón utilizado para el bloqueo es PBS-CM), anticuerpos primarios y secundarios utilizados y las correspondientes diluciones (los anticuerpos se disuelven en el correspondiente tampón de bloqueo). * La células no se permeabilizan, ya que se trata de una proteína de membrana. AcM: anticuerpo monoclonal. AcP: anticuerpo policlonal. NGS: suero de cabra; NDS suero de burro.

3.2.2. Análisis de las preparaciones

Después de dejarlas secar durante al menos doce horas en la oscuridad y a 4°C, las preparaciones se analizaron con un microscopio óptico de fluorescencia configurado con los filtros de excitación de fluorescencia para Hoechst, Cy™3 o Alexa Fluor® 488. Las fotografías se tomaron con una cámara digital acoplada al microscopio de fluorescencia utilizando el programa *Axiovision Rel 4.5*. (Carl Zeiss).

3.3. ELISA

El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) es un método cuantitativo basado en la detección de un antígeno presente en una muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Voller *et al.*, 1978; Engvall *et al.*, 1971).

En el presente trabajo se utilizó un ELISA de prostaglandina E₂ (PGE₂, *high sensitivity*). El ensayo está basado en la capacidad de unión competitiva de la PGE₂ presente en la muestra a una cantidad fija de PGE₂ conjugada con fosfatasa alcalina por los sitios de unión a un anticuerpo monoclonal de ratón. Este anticuerpo a su vez se une a otro anticuerpo anti-ratón adherido a las paredes de una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se añade una solución con un sustrato para la fosfatasa alcalina y el color desarrollado por la reacción es medido a 405 nm. La intensidad de color es inversamente proporcional a la concentración de PGE₂ presente en la muestra. El protocolo empleado fue el indicado por el fabricante. Se utilizó un lector de placas de ELISA para la determinación de las absorbancias y los resultados se analizaron con el programa *KC-junior* (Bio-Tek, Instrument).

4. Análisis del nivel de expresión génica

4.1. RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), es un método que permite amplificar secuencias de ADN hasta niveles fácilmente detectables mediante una ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Para evaluar la expresión de un determinado gen en unas condiciones experimentales concretas se procede a la extracción de ARN para, a continuación, transformar el ARNm en una cadena de ADNc ("ADN complementario"). Este paso es necesario ya que la Taq polimerasa necesita ADN como molde para sintetizar más ADN. Esto se consigue mediante una ADN polimerasa dependiente de ARN (retrotranscriptasa) y la reacción se denomina retrotranscripción o transcripción

inversa. A éste método de evaluar la expresión génica se le denomina RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción inversa).

4.1.1. Extracción y cuantificación de ARNm

Se sembraron placas de 35 mm, se dejó que las células alcanzaran una confluencia del 70% y se procedió al tratamiento correspondiente. Cuando las células estuvieron listas se extrajo el ARNm mediante el kit *NucleoSpin® RNAII*. El ARN obtenido se cuantificó en un *Nanodrop* y se almacenó a -80°C .

4.1.2. Transcripción inversa.

El ARN se desnaturalizó calentando a 65°C durante 3 minutos (2 μg de ARN en 27.5 μl de agua libre de ARNasas). A continuación se pasaron los tubos a hielo para evitar el reagrupamiento del ARN.

Para la síntesis de la cadena de ADNc a partir de ARN se utilizó la transcriptasa inversa de M-MLV (*Moloney murine leukemia virus*). Para retrotranscribir tan sólo los ARNms, se aprovechó la cola de poli(A) de los mismos y se utilizó como cebador un oligonucleótido sintético con 16 residuos de dT (oligo dT). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen final de 40 μl con 500 μM de dNTPs, 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de oligo dT, 0.5 U/ μl del inhibidor de ARNasas RNasin® y 5 U/ μl de retrotranscriptasa M-MLV. El volumen final se calentó a 42°C durante 90 minutos tiempo necesario para realizar la retrotranscripción. El ADNc se almacenó a -40°C .

4.1.3. PCR semicuantitativa

La amplificación del ADNc se lleva a cabo usando una pareja de oligonucleótidos (denominados cebadores o *primers*) que reconocen secuencias específicas del gen en estudio, y por tanto sólo amplifican un fragmento del ADNc obtenido a partir de su mensajero. La amplificación requiere tres etapas (repetidas un número determinado de veces) que se llevaron a cabo en un termociclador. En la primera se transforma el ADN bicatenario en monocatenario mediante desnaturalización a 94°C . A continuación se unen los cebadores a sus secuencias complementarias mediante una determinada temperatura, denominada temperatura de anillamiento, que depende de la secuencia de nucleótidos del

cebador. Por último, se amplifica el ADN mediante la Taq polimerasa a 72°C. La reacción se llevó a cabo con 0.5 µg de ADNc que se llevaron a 50 µl con una mezcla de 0,4 µM de cada cebador (directo e inverso), 200 µM de dNTPs, 2 U de la ADN polimerasa *Taq FastStart* y tampón 1X (Roche), que ya contiene Mg²⁺. La reacción se realizó en un termociclador *MyCycler*TM.

Las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar cada ADNc, así como las temperaturas de anillamiento y el tamaño del producto obtenido (amplicón) se encuentran detallados en la tabla 7.

ADNc	Cebadores	Ta (°C)	amplicón
ALK1	dir: 5'- CCAGCTCTCCATAATGTCACCTC -3'	60	113 pb
	inv: 5'- GGTCIGAAAAAGTCCCGTTTAC-3'		
ALK5	dir: 5'-TATGCAATGGGCTTAGTGTTCT-3'	52	108 pb
	inv: 5'-CGATGGATCAGAAGGTACAAGA-3'		
COX-2	dir: 5'- GGCAATAGAAATAAATATAAAACAATAATGAC-3'	59	371pb
	inv: 5'-ACGIGTGTAGGTGAGT-3'		
GAPDH	dir: 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTGGC-3'	60	983 bp
	inv: 5'-CATGTAGG CATGAGGTCCACCAC-3'		
L y S-endoglina	dir: 5'-CACTGCTGCACTCTGGTACA-3'	59	L→114pb S→250pb
	inv: 5'-ATGCTGTGGTTGGTGCTG-3'		
PAI-1	dir: 5'- GCTGCACTGGTGACTCACTT-3'	53	103 pb
	inv: 5'-AGGAGCTGGCTGTTCCTTC-3'		
Smad1	dir: 5'-GTCTCCCTGAAGCAGAAGG-3'	62	144 pb
	inv: 5'-GCTCCTCAGACCAGGAAAAG-3'		
Smad2	dir: 5'-CTAGAAATGCCCTCCAGAG-3'	59	134 pb
	inv: 5'-CAATACTGGGTCTGGACACG-3'		

Tabla 7. Lista de cebadores utilizados. *dir* (directo); *inv* (inverso); Ta es la temperatura de anillamiento; pb (pares de bases).

ADNc	Cebadores	Ta (°C)	amplicón
Smad3	dir: 5'-CCTAGCTCAGTCTGTCAACC-3'	59	115pb
	inv: 5'-CACGTCTGTCTCCTGTAACC-3'		
Smad4	dir: 5'-CTGCCTGATGCTTCACIGTT-3'	53	124 pb
	inv: 5'-TGTTACCAACTGCACGGTTT-3'		
Smad7	dir: 5'-CTGGTACAGAAAGTGAGGAGCA-3'	62	105 pb
	inv: 5'-CTTGATGAAGATGGGGTAACTG-3'		
TβRII	dir: 5'-CCTACTCTGTCTGTGGATGAC-3'	53	108 pb
	inv: 5'-GGACTCCATGTTCTCCAAATT-3'		
Tubulina	dir: 5'-AGATGACTCCTTCAACACCT-3'	59	103pb
	inv: 5'-GCGAACTTCATCAATAACTGTG-3'		

Tabla 7 (Cont.). Lista de cebadores utilizados. *dir* (directo); *inv* (inverso); Ta es la temperatura de anillamiento; pb (pares de bases).

4.1.4. Detección de los amplicones

Los productos de PCR amplificados (amplicones) se separaron por tamaños mediante electroforesis un gel de agarosa 1-2%, a un voltaje de 100 V y con un marcador específico de 100 pares de bases. Para la preparación de los geles de PCR se resuspendió la agarosa en tampón TBE 1x (Tris 0,05 M, ácido bórico 0,05 M y EDTA 1mM). Los amplicones en el gel se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta, *GelDOc*.

4.1.5. PCR cuantitativa

En este caso, la PCR se preparó sobre un volumen final de 20 µl. Usamos para estas PCRs la *Supermix iQ™SYBR®Green*. Se emplearon triplicados de las muestras y cada experimento se repitió al menos dos veces. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *iQ™5* y los niveles relativos de expresión se calcularon utilizando el programa *iQ™5 Optical System Software 2.0 (Bio-Rad)*.

5. Ensayos de proliferación celular

5.1. Ensayo de proliferación con MTT

Para cuantificar la proliferación celular se usó el ensayo de MTT (Metil tetrazolio) que es un ensayo de viabilidad celular basado en la actividad metabólica celular (Mosmann, 1983). La actividad metabólica se determina incubando las células con una sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), de color amarillo y soluble en agua, que es reducida por las mitocondrias de las células metabólicamente activas formando un producto de color púrpura (formazán), insoluble en soluciones acuosas, cuya absorbancia puede ser medida en un espectrofotómetro.

Los valores de absorbancia obtenidos son directamente proporcionales al número de células viables. Se añadieron a cada pocillo 50 µl de una solución 2 mg/ml de MTT. Tras cuatro horas a 37°C en oscuridad, se añadieron 500 µl de solución solubilizadora (HCl 0,01 M, SDS 10%) por pocillo. Las placas se dejaron toda la noche en el incubador y al día siguiente se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm en un lector de placas.

5.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que consiste en hacer pasar una suspensión de células alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. La citometría de flujo permite la cuantificación del ADN y la determinación de la actividad proliferativa de la población celular. Para cuantificar el ADN la suspensión celular se marca con un colorante fluorescente que se une estequiométricamente con el ADN. Las células coloreadas se introducen entonces en el citómetro y la luz fluorescente emitida es proporcionarl al contenido de ADN de cada célula. Este análisis nos da información

además sobre la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular (G1, S, G2 o M). Sin embargo, no es posible diferenciar entre G2 y M ya que en las dos fases se encuentra el mismo contenido de ADN.

5.2.1. Recogida de las células

Las células se levantaron con tripsina y a continuación se paró la reacción con PBS-CM. El contenido de las placas se recogió en tubos de plástico y se hizo una centrifugación a 600 g durante cinco minutos. Acabada la centrifugación se desechó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 500 μ L de etanol al 50% y se mantuvieron a -20°C durante al menos una noche.

63

5.2.2. Tinción con yoduro de propidio y pase por el citómetro de flujo

El siguiente día las células ya fijadas se lavaron con PBS, se incubaron con ARNasa y se tiñeron con yoduro de propidio durante 1-3 horas. Después se analizó el perfil del ciclo celular en un citómetro *FACS CALIBUR* y se analizaron los resultados con el programa *Saint-gate* (BD).

6. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media + el error estándar de la media (EEM).

Se utilizó el test estadístico de la *t de Student* para determinar las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Consideramos significativo un valor de $p < 0,05$. Para analizar más de dos grupos de datos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA). En caso de encontrar diferencias significativas, $p < 0,05$, en el estudio del ANOVA, empleamos el *test de Bonferroni* para las comparaciones “*post hoc*” considerando significativas un valor de $p < 0,05$. El programa informático utilizado fue el *SPSS 14.0 (Statistical Package For the Social Sciences)*.

Apéndice 1. Relación de reactivos y productos

REACTIVO/PRODUCTO	CASA COMERCIAL
Ácido bórico	Sigma Aldrich
Agarosa	Cambrex Bio Science
Acrilamida	Bio-Rad Laboratories
Anfotericina B	Sigma Aldrich
Antibiótico G418	Gibco, Invitrogen
Aprotinina	Sigma Aldrich
APS (amonio persulfato)	Sigma Aldrich
Azida sódica	Panreac Química S.A.U.
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich
Bisacrialmida	Bio-Rad Laboratories
β -mercaptoetanol	Sigma Aldrich
Bromuro de etidio	Sigma Aldrich
BSA (albúmina sérica bovina)	Sigma Aldrich
CaCl ₂	Panreac Química S.A.U.
DMSO (dimetil sulfóxido)	Sigma Aldrich
dNTPs	Applied Biosystems
ECL (revelado Western blot)	Amersham Biosciences
EDTA	Sigma Aldrich
ELISA de PGE ₂	R&D Systems
Etanol	Probus
Glicerol	Merck
Glicina	Sigma Aldrich
Glutamina	Merck

REACTIVO/PRODUCTO	CASA COMERCIAL
HCl	Sigma Aldrich
Hoechst 33258	Molecular Probes™, Invitrogen
Igepal CA-630	Sigma Aldrich
jetPEI™	Polyplus-transfection
KCl	Panreac Química S.A.U.
KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich
Kit colorimétrico de determinación de proteínas	Bio-Rad Laboratories
Kit de medida de la actividad luciferasa: Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Kit de extracción de núcleos CellLytic™	Sigma Aldrich
Kit de extracción de RNA NucleoSpin®	Macherey-Nagel
Kit de reciclado de Western blot RE-Blot Plus	Chemicon, Millipore
Leupeptina	Sigma Aldrich
Lipofectamina	Gibco, Invitrogen
Marcador de ADN 100pb	Invitrogen
Marcador pesos moleculares para proteínas	Fermentas Life Sciences
Medio de cultivo DMEM	Gibco, Invitrogen
Metanol	Merck
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Probus S.A.
MTT (metil tetrazolio)	Roche
NaCl	Sigma Aldrich
Na ₃ HPO ₄	Sigma Aldrich
NH ₄ Cl	Panreac Química S.A.U.
Oligo dT	Isogen Life Science
Ortovanadato sódico (Na ₂ VO ₄)	Sigma Aldrich

REACTIVO/PRODUCTO	CASA COMERCIAL
Penicilina-Estreptomina	Biowittaker™, Lonza
Pepstatina A	Sigma Aldrich
PFA (paraformaldehído)	Sigma Aldrich
PMSF	Sigma Aldrich
Primers o cebadores	Isogen Life Science
Prolong®Gold antifade reagent	Molecular Probes™, Invitrogen
RNAasa	Sigma Aldrich
RNAasin® (inhibidor de RNAasas)	Promega
SB431542	Tocris Bioscience
SBF (Suero bovino Fetal)	Gibco, Invitrogen
SDS (Dodecil sulfato sódico)	Sigma Aldrich
Suero de burro	Sigma Aldrich
Suero de cabra	Sigma Aldrich
Tampón de PCR con MgCl ₂	Roche
Taq polimerasa (TaqFastStart)	Roche
TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina)	Sigma Aldrich
TGFβ1	R&D Systems
Transcriptasa inversa (M-MLV RT)	Promega
Tripsina-EDTA	Gibco, Invitrogen
Tris base (Trizma®)	Merck
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypan blue	Sigma Aldrich
Tween-20	Sigma Aldrich
Yoduro de propidio	Sigma Aldrich

Apéndice 2. Relación de anticuerpos utilizados

ANTICUERPO PRIMARIO	ESPECIE	CASA COMERCIAL/ PROCEDENCIA
Anti-actina (sc-1616)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-ALK1 (sc-19456)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc
Anti-ALK5 (TβRI) (sc-399)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology Inc
Anti-ciclina D1 (sc-450)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc
Anti-ciclina E (sc-25303)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc
Anti-colágeno I (AB755)	Conejo	Chemicon, Millipore
Anti-COX1 (sc-19998)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-COX2 (sc-1745)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-CTGF (sc-14939)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-endoglina TEA 1/58.1	Ratón	Cedido por el Dr. Sánchez-Madrid (CIB, CSIC, Madrid, España)
Anti-Id1 (sc-488)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-Histona H1 (sc-8615)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-NOS2 (sc-650)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-PAI-1(612025)	Ratón	BD Pharmigen
Anti-PCNA (610664)	Ratón	BD Pharmigen
Anti-fosfoSmad1	Conejo	Cedido por el Dr. Peter ten Dijke (LUMC, Leiden, The Netherlands)
Anti-fosfoSmad2	Conejo	Cedido por el Dr. Peter ten Dijke (LUMC, Leiden, The Netherlands)
Anti-fosfoSmad3/1 (CS-9514)	Conejo	Cell Signaling Technology™
Anti-Smad1 (sc-7965)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-Smad2/3 (sc-6032)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-Smad2/3 (CS-3102)	Conejo	Cell Signaling
Anti-Smad4 (sc-7966)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-Smad7 (sc-11392)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology Inc.

ANTICUERPO PRIMARIO	ESPECIE	CASA COMERCIAL/ PROCEDENCIA
Anti-T β RII (06-227)	Conejo	Upstate Biotechnology
Anti- α -tubulina (CP06)	Ratón	Calbiochem

ANTICUERPO SECUNDARIO	ESPECIE	CASA COMERCIAL
Anti-cabra Alexa Fluor®488 (A-11055)	Burro	Molecular Probes, Invitrogen
Anti-cabra HRP (sc-2020)	Burro	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-conejo HRP (sc-2004)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-ratón Alexa Fluor®488 (A-11001)	Cabra	Molecular Probes, Invitrogen
Anti-ratón Cy TM 3 (PA43002)	Cabra	Amersham Life Science
Anti-ratón HRP (sc-2005)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Apéndice 3. Relación de material y equipos utilizados

MATERIAL/EQUIPO	CASA COMERCIAL
Cámara de Neubauer	Menzel-Gläser
Campana de flujo laminar vertical Gelaire TC-48	Cultek
Casette de revelado	Amersham Biosciences
Centrífuga 5702	Eppendorf AG
Centrífuga 5417R	Eppendorf AG
Citómetro FACS Calibur	BD Biosciences
Crioviales de congelación	Nalgene, Thermo Scientific
Cubreobjetos	Menzel-Gläser
Equipo de transferencia de semiseco TransBlot®SD	Bio-Rad Laboratories
Equipo de Western blot Mini-Protean®III	Bio-Rad Laboratories
Fuente de alimentación para electroforesis y transferencia Power Pac 3000 y PowerPacBasic	Bio-Rad Laboratories
Incubador celular Forma Scientific 3111	Thermo Scientific
Lector de placas de ELISA ELx800	BIO-TEK Instrument
Luminómetro Glomax 20/20	Promega
Máquina de revelado Medical X Ray Processor	Kodak
Membrana de PVDF	Pall Corporation
Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M	Carl Zeiss
Microscopio invertido de contraste de fases 2 ELWD 0.3	Nikon
Nanodrop (ND-1000)	Thermo Scientific
Películas Fuji Medical X-Ray Film Super RX	Fujifilm
Pipetas de plástico de 5, 10 y 25ml	BD Falcon™
Placas de cultivo	BD Falcon™
Portaobjetos	Menzel-Gläser®

MATERIAL/EQUIPO	CASA COMERCIAL
Rascadores de células	BD Falcon™
Transiluminador GelDoc	Bio-Rad Laboratories
Termociclador iQ™ 5	Bio-Rad Laboratories
Termociclador MyCycler™	Bio-Rad Laboratories
Tubos para citómetro	BD Falcon™
Tubos de plástico de 1,5ml y 2ml	Eppendorf AG
Tubos de plástico de 15 y 50ml	BD Falcon™

*"Fracasar o cometer un error enorme
es mucho mejor que no haberlo intentado"*
- Meredith Grey -

Resultados y discusión

1. TGFβ1 activa las vías de señalización ALK5 y ALK1 en mioblastos de rata L₆E₉

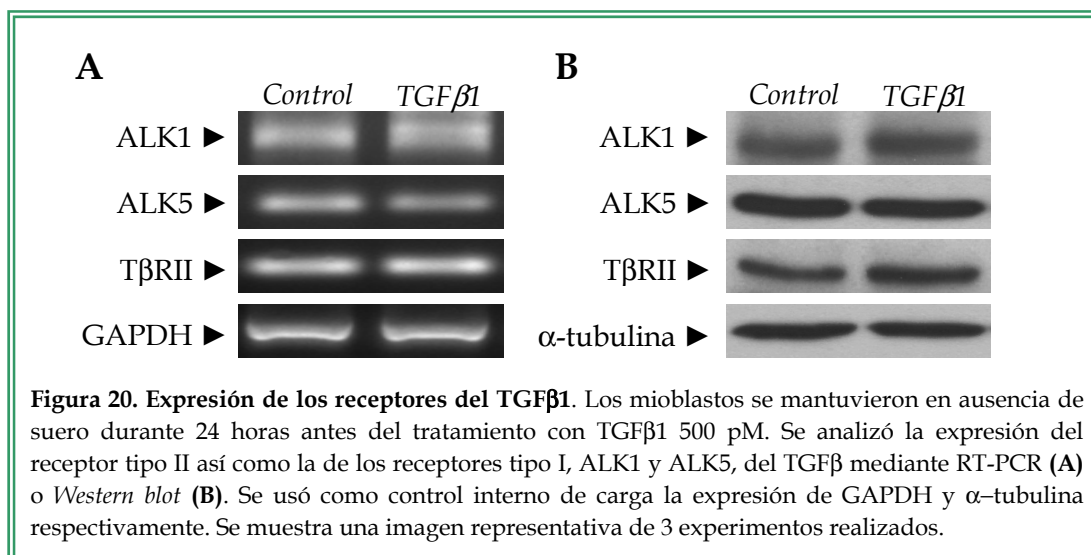
Como ya hemos indicado en la introducción de este trabajo, las acciones biológicas del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGFβ1) están mediadas por dos familias de receptores de membrana específicos: los receptores tipo I y tipo II (Shi y Massague, 2003). El receptor tipo I, también conocido como receptor activina de tipo quinasa (ALK de “*activin receptor like kinase*”), es activado por el receptor tipo II (TβRII). Existen dos receptores tipo I capaces de unir el TGFβ1: ALK5 y ALK1, este último descrito hasta hace poco sólo en células endoteliales (Lebrin *et al.*, 2004; Lebrin *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2005) y, recientemente, a la vez que se realizaba este trabajo, en mioblastos de rata L₆E₉ (Schermer *et al.*, 2007).

Los cultivos de líneas celulares miogénicas de rata son ampliamente utilizados como modelo para el estudio de algunos efectos del TGFβ tales como la diferenciación y la proliferación. Una de estas líneas es la L₆E₉ (Nadal-Ginard, 1978).

1.1. Expresión de receptores del TGFβ1

Mediante RT-PCR y *Western blot* analizamos la expresión de dichos receptores de TGFβ1 y también del receptor tipo II, TβRII en los mioblastos de rata L₆E₉ (Figura 1). Como esperábamos el receptor tipo II, TβRII, y el receptor tipo I para TGFβ1, ALK5, se expresan en los mioblastos L₆E₉. Además, encontramos que el receptor tipo I, ALK1 también se expresa en los mioblastos de rata L₆E₉ de manera constitutiva.

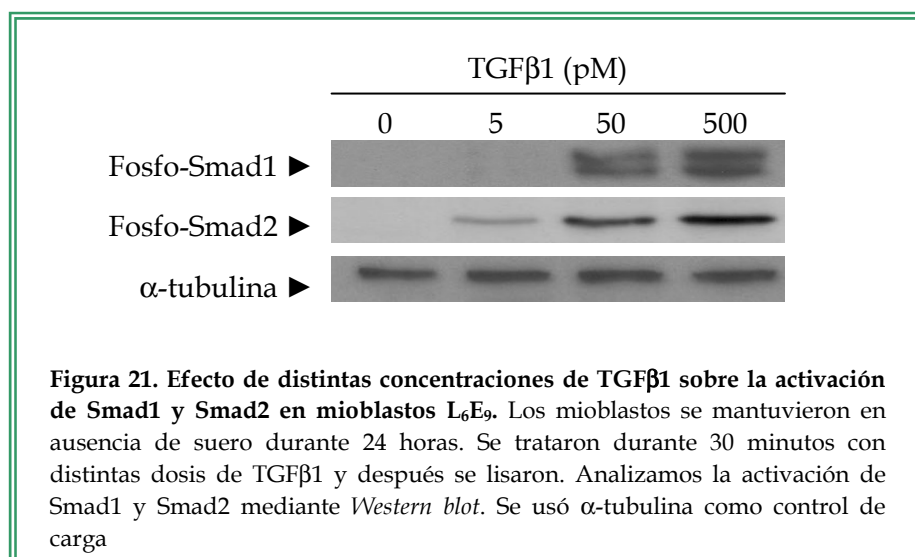
Estudiamos si el tratamiento con TGFβ1 durante 24 horas modificaba la expresión de dichos receptores. Para ello, los mioblastos se mantuvieron en ausencia de suero 24 horas y a continuación tratamos las células con TGFβ1 (500 pM) durante 24 horas más. Pudimos observar como esta citoquina no modificaba la expresión de los receptores tipo I en los mioblastos L₆E₉ (Figura 20).



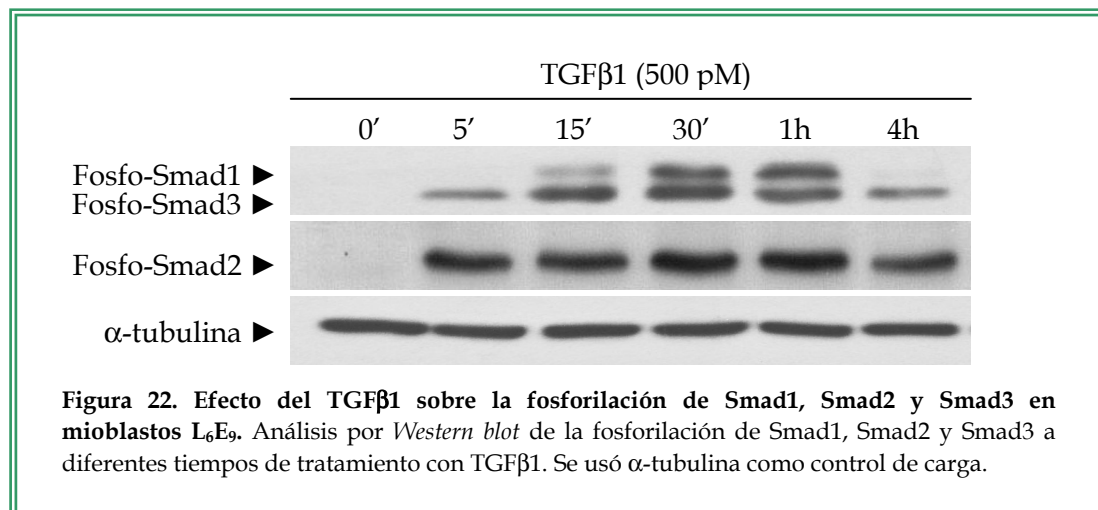
1.2. Activación, expresión y localización de R-Smads

El receptor tipo I, una vez activado, transmite la señal al núcleo fosforilando a miembros específicos de la familia Smads, las R-Smads. En el caso de ALK1, Smad1, Smad5 y Smad8 (Goumans *et al.*, 2002; Lebrin *et al.*, 2004) y en el caso de ALK5, Smad2 y Smad3 (Massague y Gomis, 2006).

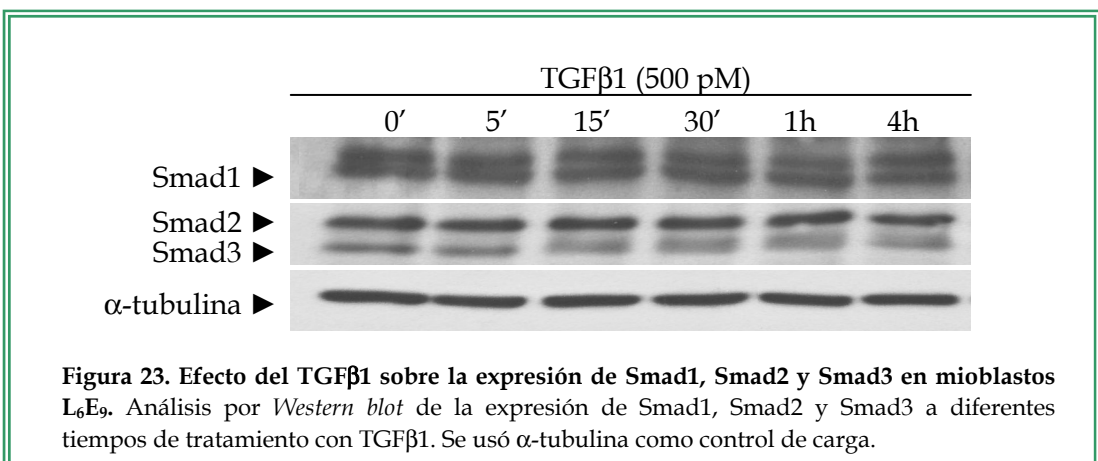
Estudiamos el efecto de distintas concentraciones de TGFβ1 sobre la fosforilación de Smad1 y Smad2 para determinar la dosis más conveniente en estudios posteriores. Los análisis de *Western blot* nos indicaron que la máxima fosforilación se obtenía con la concentración de TGFβ1 de 500 pM. Aunque la dosis de 50 pM produce también una fosforilación significativa (Figura 21), será la dosis de 500 pM la que utilizaremos para casi todos los experimentos realizados en este trabajo.



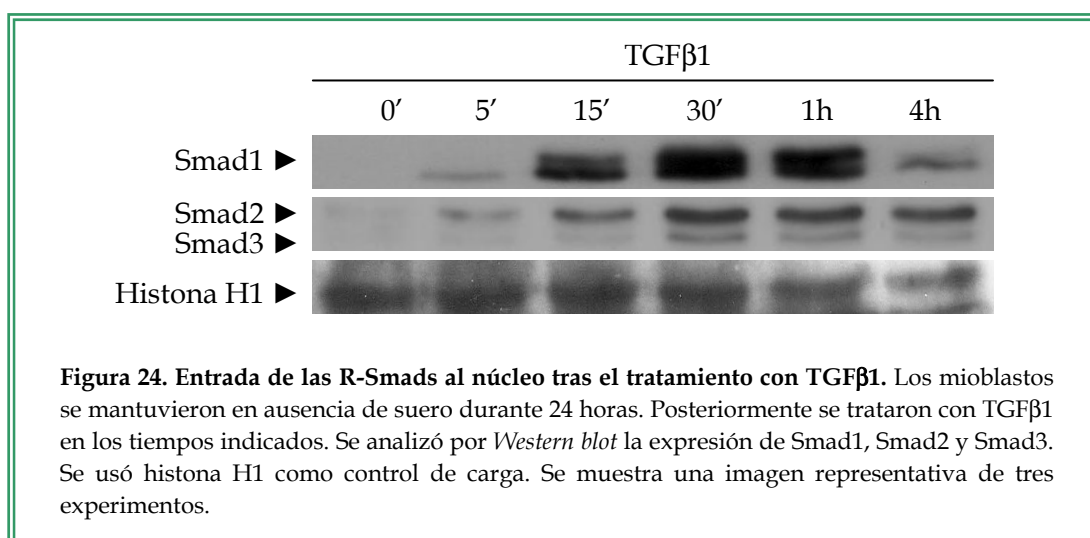
La estimulación de los mioblastos con TGF β 1 induce un aumento en la fosforilación de Smad1 a los quince minutos, alcanzando un máximo a los treinta minutos, que se mantiene hasta la hora del tratamiento con TGF β 1. Sin embargo, a las 4 horas la fosforilación de Smad1 vuelve a niveles basales (Figura 22). En el caso de Smad2, el tratamiento con TGF β 1 induce un fuerte y rápido aumento en la fosforilación de este mediador que se inicia a los 5 minutos y permanece 4 horas después del estímulo. Para estudiar la activación de Smad3 hemos utilizado un anticuerpo que reconoce tanto Smad1 como Smad3. El tratamiento con TGF β 1 produce una cinética en la activación de Smad3 similar a la de Smad2, un aumento rápido en la fosforilación desde los cinco minutos del tratamiento, hasta 4 horas después (Figura 22). Al contrario que Smad2 y Smad3, la cinética de Smad1 es mucho más corta, puesto que la activación se detecta mucho más tarde pero también termina antes.



El tratamiento con TGF β 1 no produce cambios en la expresión de Smad2 ni de Smad3 ni de Smad1 (Figura 23).



El análisis por *Western blot* de la activación de las R-Smads en lisados celulares totales nos indica el nivel de dichas Smads fosforiladas en el citoplasma celular. Sin embargo, las R-Smads se comportan como factores de transcripción y tienen que pasar al núcleo para activar, junto con otros intermediarios, la transcripción de los genes diana. Por este motivo, aislamos los núcleos de los mioblastos y realizamos experimentos de extracción de proteínas nucleares para estudiar la entrada de Smad1, Smad2 y Smad3 al núcleo. El TGF β 1 produce un aumento de la presencia en el núcleo de la Smad1 fosforilada a los quince minutos del tratamiento, que se mantiene hasta una hora después. A las 4 horas se detecta muy poco de esta proteína en el núcleo de los mioblastos. Observamos también como se produce un aumento de Smad2/3 en el núcleo después del tratamiento con TGF β 1 y como esta entrada es máxima treinta minutos después de la de estimulación manteniéndose hasta al menos 4 horas después del tratamiento (Figura 24).



También, determinamos mediante inmunofluorescencia la localización de estas Smads en los mioblastos. Observamos que la Smad1 se localiza en el citoplasma y en la zona perinuclear en condiciones basales, y que el tratamiento con TGF β 1 durante treinta minutos induce su translocación al núcleo. Del mismo modo, las Smads 2 y 3, en condiciones basales, se localizan homogéneamente en el citoplasma y el tratamiento con TGF β 1 durante treinta minutos induce su translocación al núcleo (Figura 25).

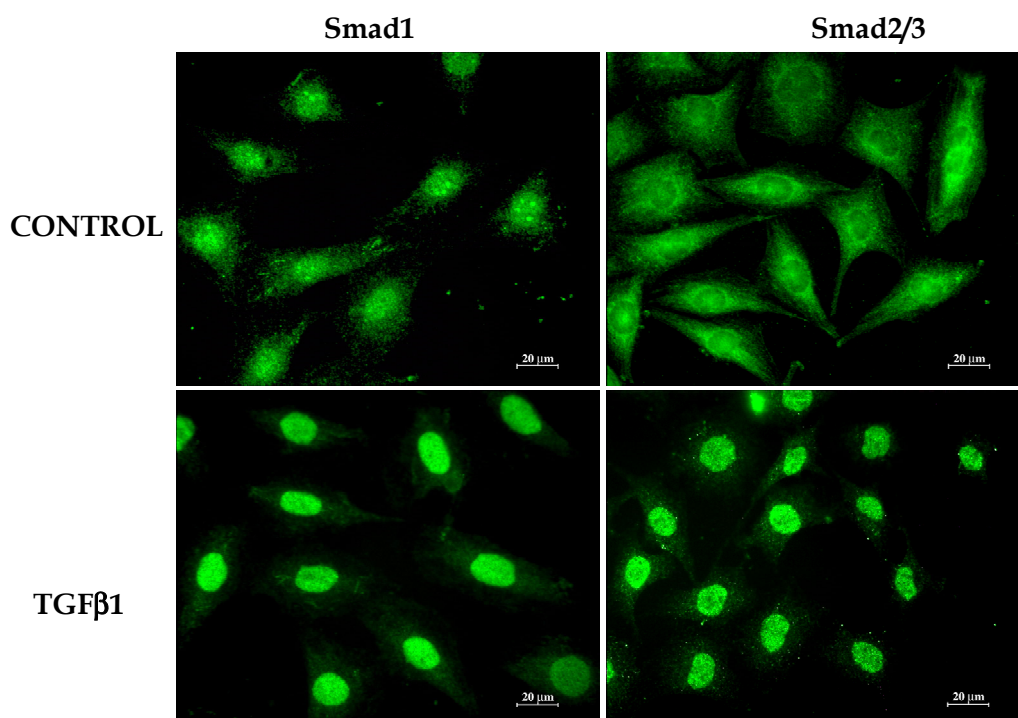


Figura 25. Localización de las R-Smads en mioblastos L₆E₉. Realizamos una inmunofluorescencia indirecta, con un anticuerpo anti-Smad1 y con otro anti-Smad2/3 y el correspondiente secundario combinado con Alexa 488, en mioblastos tratados y no tratados con TGFβ₁ durante 30 minutos. Las microfotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia (x400 aumentos).

1.3. Elementos de respuesta al TGFβ₁

Para completar el estudio de las vías de señalización del TGFβ, realizamos ensayos de promotor. Para ello, transfectamos a los mioblastos con tres promotores distintos: (Bre)₂-Luc, ARE-Luc-FAST y (CAGA)₁₂-Luc. El vector (Bre)₂-Luc es un reportero específico de la vía de ALK1 que contiene elementos de respuesta del promotor de Id1 (Korchynskyi y ten Dijke, 2002). Los vectores ARE-Luc-FAST y el vector (CAGA)₁₂-Luc son reporteros específicos de la vía de ALK5 que contienen elementos de respuesta específicos para Smad2 y Smad3 respectivamente (Dennler *et al.*, 1998; Labbe *et al.*, 1998; Watanabe y Whitman, 1999). Después de la transfección, cultivamos las células en medio sin suero durante 18 horas y las tratamos con TGFβ₁ (500 pM) durante 24 horas más. Evaluamos la actividad de los promotores midiendo la actividad luciferasa utilizando el kit comercial descrito en la sección de *Material y métodos*. Además, evaluamos la actividad Renilla (cotransfectada con el vector pRL-TK) para corregir la eficacia de la transfección.

El tratamiento con TGF β 1 en los mioblastos produce un aumento no significativo en la actividad del reportero (Bre)₂-Luc. Sin embargo, se produce un fuerte aumento en la actividad de los reporteros ARE-Luc-FAST y (CAGA)₁₂-Luc después del tratamiento con TGF β 1 (Figura 26).

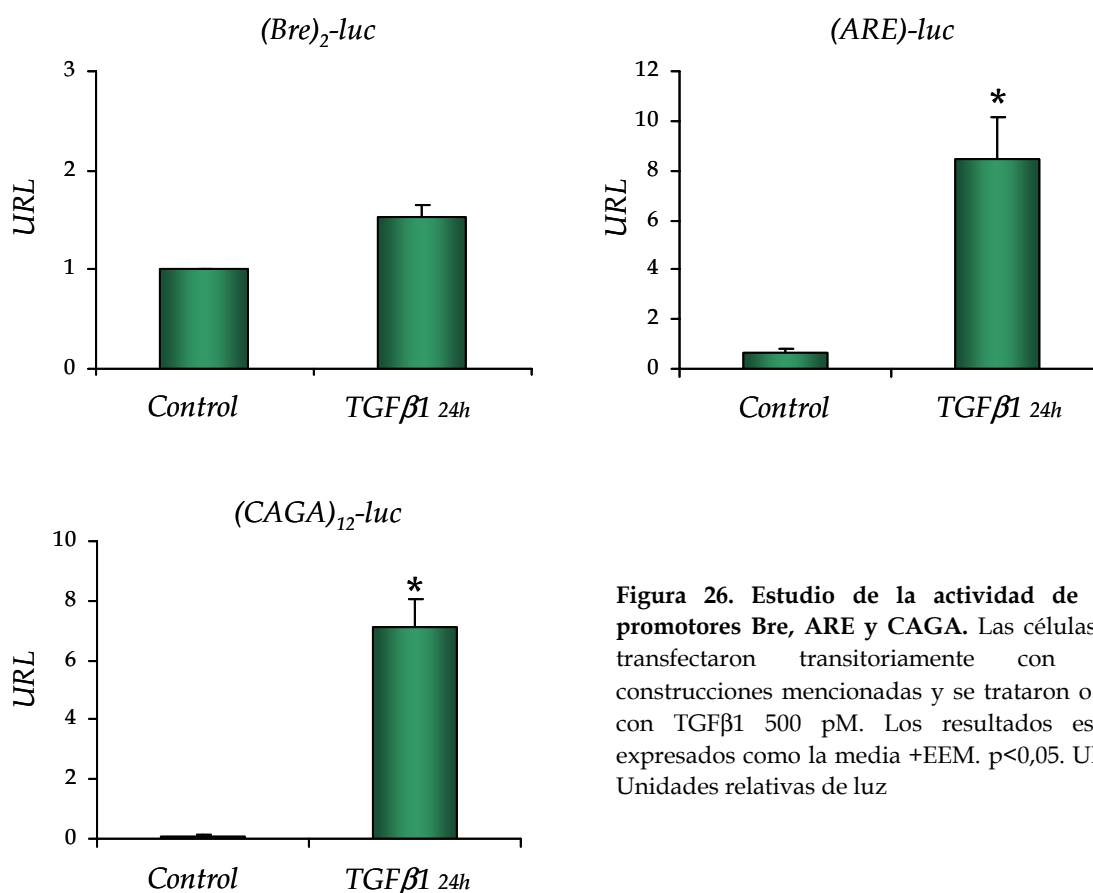
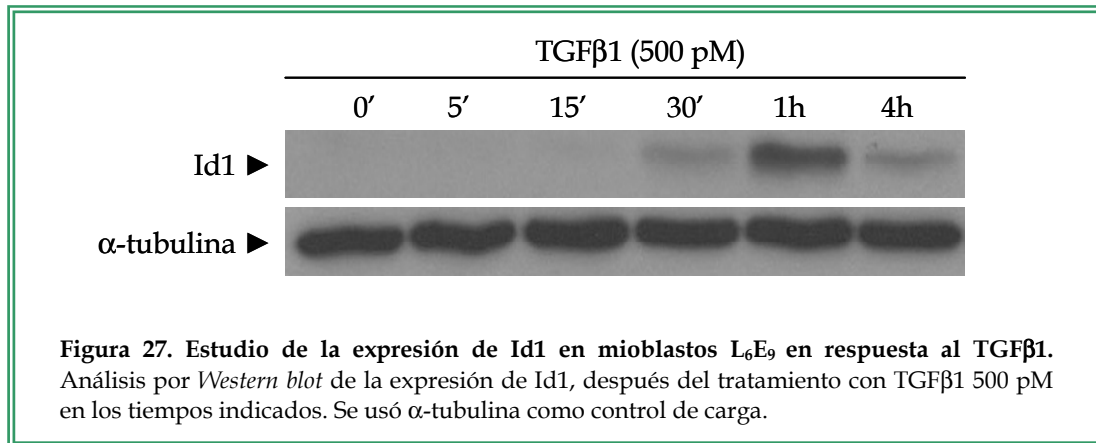
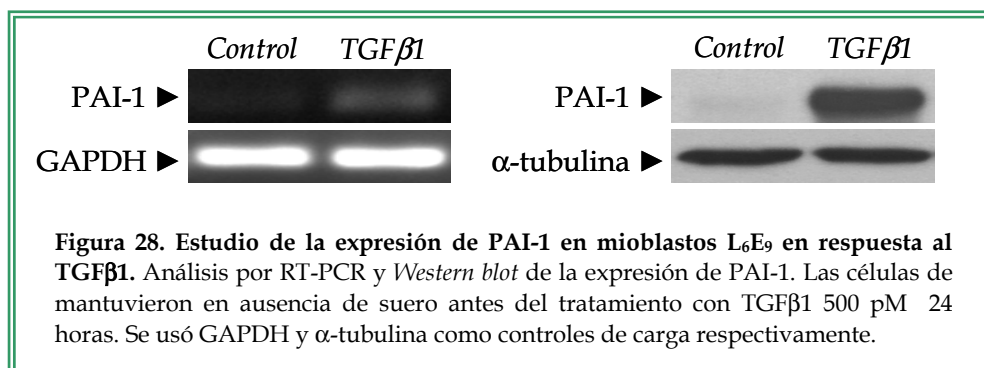


Figura 26. Estudio de la actividad de los promotores Bre, ARE y CAGA. Las células se transfectaron transitoriamente con las construcciones mencionadas y se trataron o no con TGF β 1 500 pM. Los resultados están expresados como la media +EEM. $p < 0,05$. URL: Unidades relativas de luz

Id1 se identificó como un gen de respuesta a la activación de la vía de TGF β /ALK1 en células endoteliales (Goumans *et al.*, 2002; Lebrin *et al.*, 2004). Los miembros de la familia Id están implicados en proliferación celular y diferenciación (Hollnagel *et al.*, 1999). Al estudiar la expresión de la proteína Id1 en mioblastos demostramos que se produce un aumento en la expresión de la proteína, siendo máxima a la hora del tratamiento con TGF β 1 (Figura 27).



Además, estudiamos por RT-PCR y por *Western blot* si el tratamiento con TGFβ1 durante 24 horas producía un aumento en PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1, de *plasminogen activator inhibitor 1*), gen de respuesta específico de Smad3 (Goumans *et al.*, 2002) y regulador de la matriz extracelular (Leask y Abraham, 2004). El tratamiento con TGFβ1 durante 24 horas produce un fuerte incremento en la expresión del mensajero y de la proteína de PAI-1 (Figura 28).

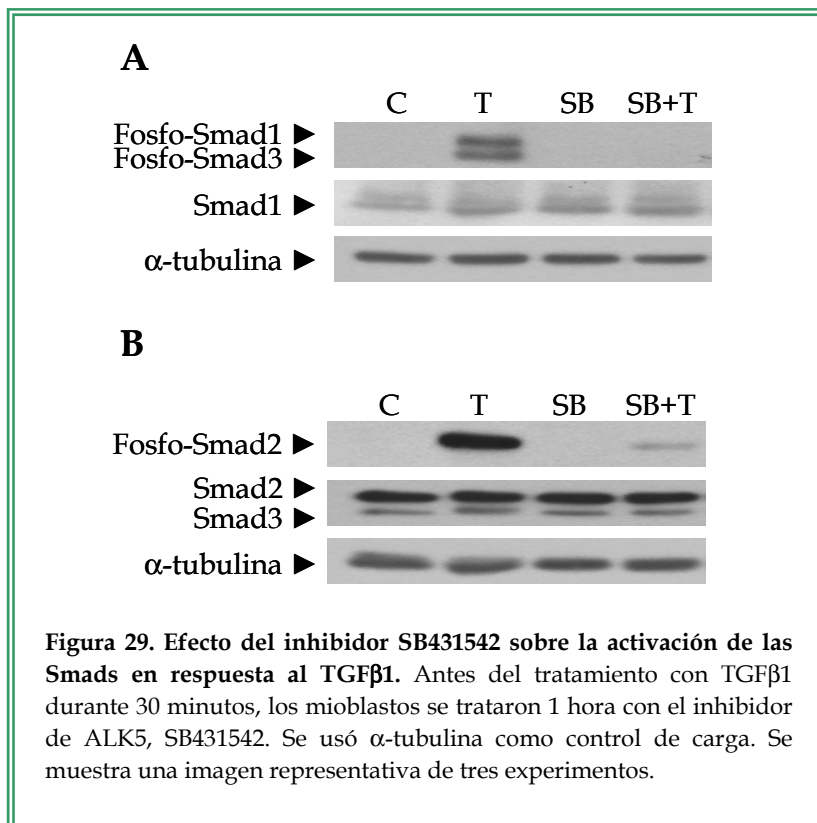


1.4. Interacción entre la ruta de ALK1 y ALK5

Algunos autores han observado en células endoteliales que el receptor tipo I, ALK5, es necesario para la señalización del TGFβ a través de ALK1 (Goumans *et al.*, 2003).

Quisimos estudiar si en los mioblastos podría ocurrir un fenómeno similar, y para ello mantuvimos a los mioblastos 24 horas en medio de cultivo sin suero. A continuación, tratamos las células con el inhibidor de ALK5 SB431542 (5 μM) durante una hora y después con TGFβ1 durante 30 minutos. El análisis por *Western blot* demostró que se produce una inhibición de la fosforilación de Smad1, Smad2 y

Smad3 en las células cotratadas con el inhibidor y TGF β 1 comparadas con las células tratadas sólo con TGF β 1. El tratamiento con el inhibidor no afecta a la expresión de Smad1 y Smad2/3 (Figura 29).

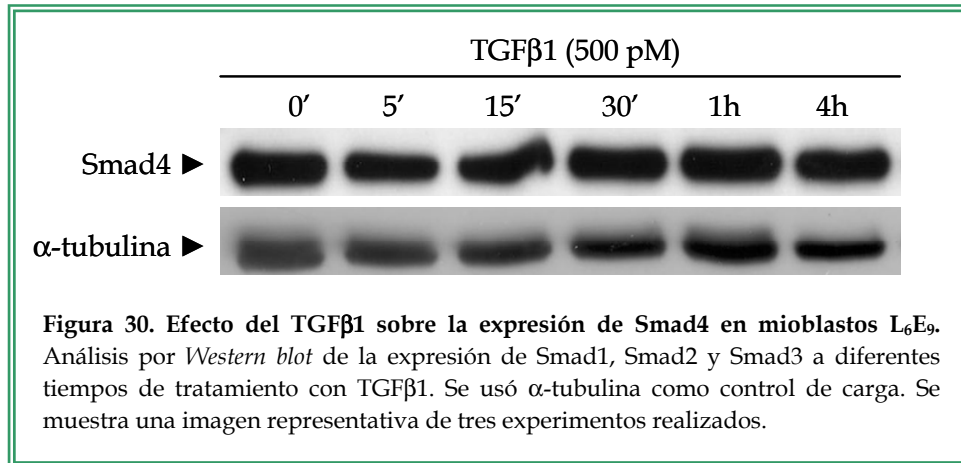


El SB431542 es un inhibidor específico de ALK5 (Inman *et al.*, 2002) y se ha demostrado que los receptores ALK1 son insensibles al mismo (Laping *et al.*, 2002), por lo tanto podríamos decir que en los mioblastos L₆E₉, ALK1 necesita de la actividad del receptor ALK5 para que el TGF β 1 pueda señalizar a través de él.

1.5. Activación, expresión y localización de Smad4

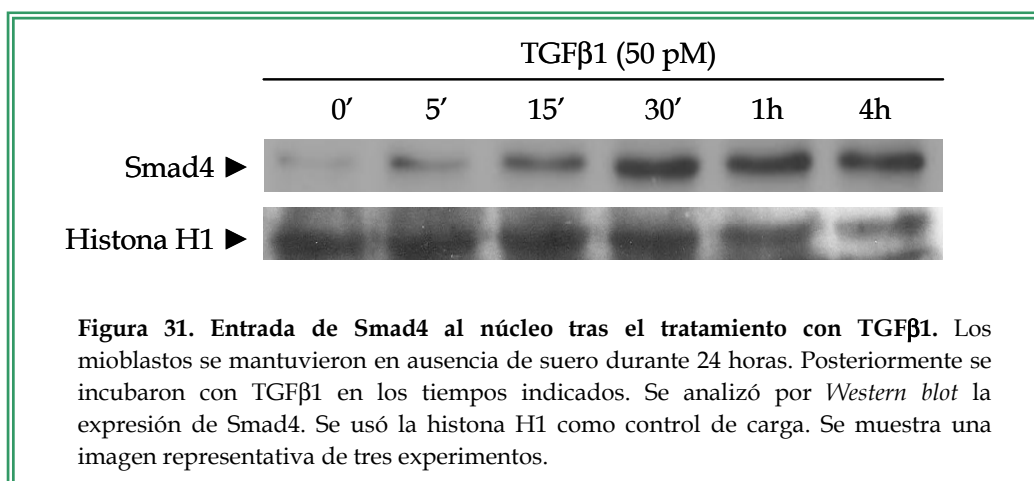
Smad4 es necesaria para la translocación al núcleo de las R-Smads y colabora junto con estas últimas en la activación de la transcripción de los genes diana. Es la Smad colaboradora en ambas rutas del TGF β 1, tanto de la ruta mediada por ALK1 como de la que va a través de ALK5.

La determinación de Smad4 por *Western blot* demostró que la expresión de este mediador no se modifica tras el tratamiento con TGF β 1, como se puede ver en la figura 30.



Smad4 se transloca al núcleo unida a las R-Smads. Estudiamos la entrada al núcleo de esta proteína en los mismos tiempos que habíamos empleado para el estudio de la translocación de las R-Smads. Para ello, mantuvimos las células en medio sin suero durante 24 horas. A continuación las tratamos con TGFβ1 50 pM en los tiempos indicados y después, mediante el uso del kit indicado en la sección *Material y Métodos*, obtuvimos las proteínas de los núcleos de las células. Al igual que con Smad2/3, observamos la entrada progresiva de Smad4 al núcleo después del tratamiento con TGFβ1, y que a los treinta minutos la cantidad de Smad4 en el núcleo es máxima (Figura 31).

81



Los estudios por inmunofluorescencia pusieron de manifiesto que Smad4 se encuentra distribuida por el citoplasma en condiciones basales, y que el tratamiento

con TGF β 1 durante treinta minutos induce la translocación al núcleo de este mediador (Figura 32).

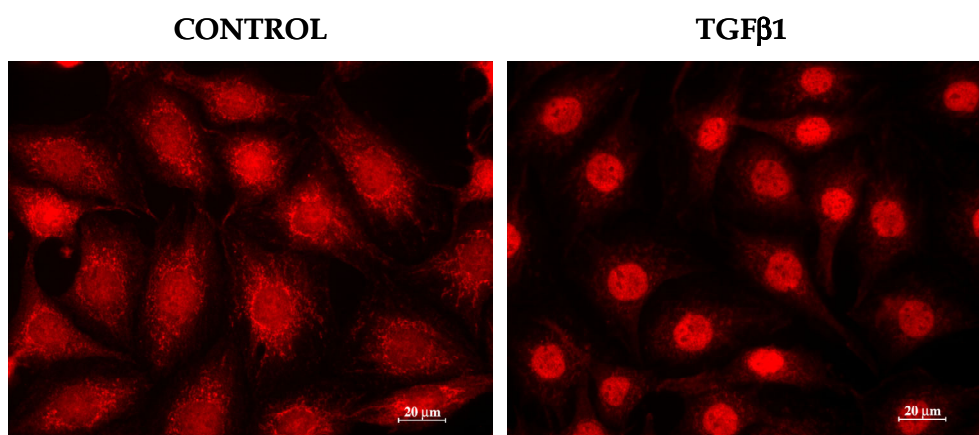
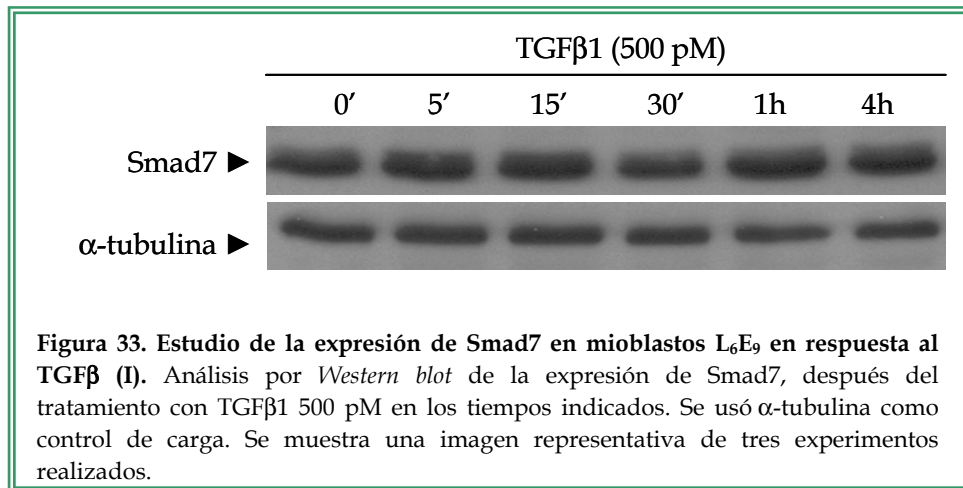


Figura 32. Localización de Smad4 en mioblastos L₆E₉. Realizamos una inmunofluorescencia indirecta, con un anticuerpo anti-Smad4 y el correspondiente secundario conjugado con cianina 3 en mioblastos tratados y no tratados con TGF β 1 durante 30 minutos. Las microfotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia (x400 aumentos).

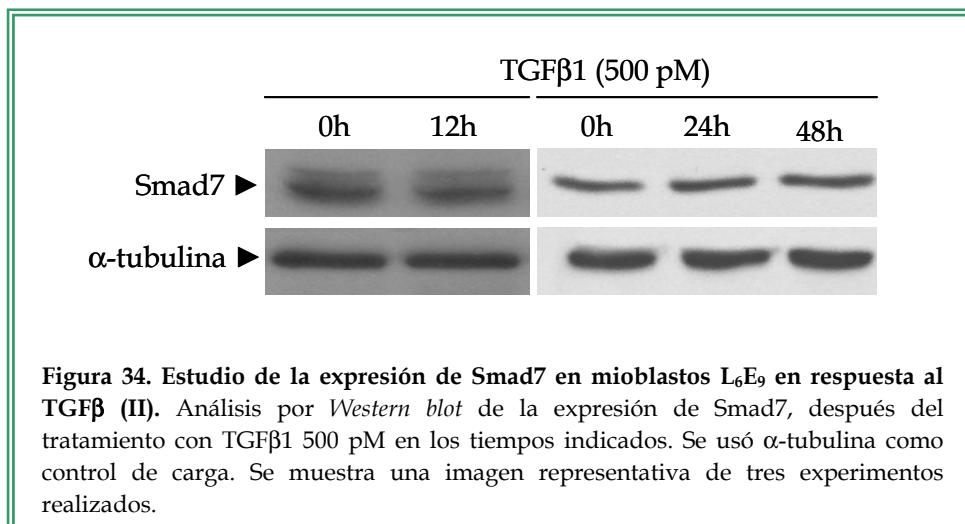
1.6. Expresión de Smad7

Las Smad inhibitoras (I-Smad) pueden regular negativamente la ruta del TGF β 1 impidiendo que las R-Smads sean fosforiladas por los receptores señalizantes o impidiendo la interacción con Smad4 (Massague, 1998). Dado que las I-Smad están inducidas por los miembros de la familia del TGF β , constituyen un importante mecanismo de retroalimentación negativa para el cambio de la respuesta biológica (Nakao *et al.*, 1997). La proteína Smad7 es la representante más conocida de la familia de las I-Smad y tiene una gran importancia en diversos procesos biológicos. Al igual que Smad4 también actúa sobre las dos rutas del TGF β 1.

Se ha descrito que el TGF β 1 induce la expresión de Smad7 (Nakao *et al.*, 1997). Nosotros estudiamos si en los mismos tiempos que se produce la activación de las R-Smads se produce algún cambio en la expresión de Smad7 y, no observamos ningún cambio en la expresión de esta proteína (Figura 33).



Ya que no encontramos un aumento en la expresión de Smad7 después de tratar las células con TGFβ1 durante tiempos cortos, quisimos comprobar si quizá el aumento de la expresión de la proteína se producía tras tiempos más largos de tratamiento. Para ello, mantuvimos las células en medio sin suero durante 24 horas y las tratamos con TGFβ1 durante 12, 24 y 48 horas. A continuación evaluamos la expresión de la proteína por *Western blot*. El tratamiento con TGFβ1, después de 12, 24 o 48 horas, no modifica la expresión de Smad7 en mioblastos L₆E₉ (Figura 34).



La cascada de señalización del TGF β comienza cuando éste se une al receptor T β RII, que recluta y fosforila al receptor tipo I, T β RI. En la mayoría de las células el TGF β 1 se une al receptor tipo I, ALK5, induciendo la fosforilación de Smad2 y Smad3. En otras células se ha demostrado que el TGF β 1 se asocia al receptor ALK1 e induce la fosforilación de Smad1 y Smad5 (Goumans *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2000; König *et al.*, 2005). En el caso de los mioblastos L₆E₉, las células que hemos utilizado para nuestro estudio, encontramos que ambas rutas están presentes y son activas. Ambos receptores se expresan, tanto a nivel de mensajero como a nivel proteico, y el tratamiento con TGF β 1 induce la fosforilación de Smad1 y de Smad2/3, sin cambios en la expresión de las mismas. Estos resultados coinciden con los trabajos realizados en células endoteliales (Goumans *et al.*, 2002), en neuronas (König *et al.*, 2005), en células hepáticas estrelladas (Wiercinska *et al.*, 2006) y, recientemente, en condrocitos (Finsson *et al.*, 2008). Además, coincidiendo con la realización de este trabajo, apareció publicado un estudio donde se demostraba la existencia de ambas rutas en mioblastos L₆E₉ (Schermer *et al.*, 2007). El grupo del profesor ten Dijke describió que la fosforilación de Smad1/5 inducida por ALK1 es máxima a dosis bajas de TGF β 1 y con tiempos cortos de tratamiento. Sin embargo, la fosforilación de Smad2 inducida por ALK5 se mantiene estable a dosis altas y con tratamientos más prolongados de TGF β 1 (Goumans *et al.*, 2002). En los mioblastos L₆E₉ los resultados de la cinética en la fosforilación de Smad1 (una fosforilación transitoria) y de Smad2/3 (una fosforilación rápida y mantenida en el tiempo) son similares, pero la fosforilación de Smad1 aumenta con dosis más altas del TGF β 1, algo que también se describe en el trabajo de Scherner y colaboradores (Schermer *et al.*, 2007).

La identificación de las dos vías de señalización en los mioblastos nos llevó a estudiar la activación de elementos de respuesta al TGF β 1. Analizamos la actividad de los reporteros ARE-Luc y (CAGA)₁₂-Luc, dos reporteros específicos de la ruta de ALK5. Hemos observado que la actividad de ambos reporteros aumenta tras el tratamiento con TGF β 1. Estos resultados corroboran los mostrados anteriormente por otros autores (Goumans *et al.*, 2002; Goumans *et al.*, 2003; Scherner *et al.*, 2007). No encontramos un aumento significativo en la activación del promotor (Bre)₂-luc, el cual utilizamos para monitorizar la ruta de ALK1, algo ya observado en otros trabajos (Schermer *et al.*, 2007; Craft *et al.*, 2007; David *et al.*, 2007). No obstante, este

resultado no coincide con el obtenido en el trabajo de Goumans y colaboradores (Goumans *et al.*, 2003). Esto se puede deber a las diferencias en el tiempo de incubación y la isoforma del TGF β utilizada en ese trabajo (8 horas de tratamiento con TGF β 3 frente a las 24 horas de tratamiento con TGF β 1 que empleamos en este trabajo). Dado que en los mioblastos el TGF β 1 induce la fosforilación de Smad1 sin aumentar de manera significativa la actividad del promotor, podrían estar produciéndose otros mecanismos adicionales que regulen la vía de ALK1.

Id1 y PAI-1 son proteínas que se han descrito específicamente como dianas de la ruta de ALK1 y ALK5 respectivamente. Coincidiendo con los resultados de otros trabajos (Goumans *et al.*, 2002; Wiercinska *et al.*, 2006; Scherner *et al.*, 2007; Finnson *et al.*, 2008), el TGF β 1 aumenta la expresión de ambas proteínas en los mioblastos L₆E₉.

Se ha demostrado en células endoteliales que ALK5 es un componente importante para la activación de ALK1 por el TGF β 1 (Goumans *et al.*, 2003). Cuando tratamos los mioblastos con el inhibidor SB431542, específico para ALK5 (Inman *et al.*, 2002), encontramos que la fosforilación de Smad1 prácticamente desaparece, lo que nos indica que la actividad quinasa de ALK5 es necesaria para las respuestas inducidas por TGF β 1 a través de ALK1 en los mioblastos L₆E₉. Esta hipótesis ya ha sido propuesta en diversos trabajos (Scherner *et al.*, 2007; Finnson *et al.*, 2008); y se ha sugerido que ALK1 quizá sea un sustrato de ALK5, promoviendo la actividad quinasa de ALK1 y activando Smad1/5 (Goumans *et al.*, 2003).

La existencia de dos vías de señalización del TGF β 1 se ha postulado como un mecanismo de regulación del estado de activación del endotelio (Goumans *et al.*, 2002). Mientras que la activación de ALK5 produciría una inhibición de la migración y proliferación, la activación de ALK1 llevaría a un aumento en la migración y proliferación de estas células. Sin embargo, la capacidad del TGF β de inducir funciones opuestas en una misma célula, según el contexto fisiológico, no parece exclusivo de células endoteliales. Por ejemplo, se ha observado que en células estrelladas de hígado en estado quiescente el TGF β induce una inhibición de crecimiento mediada por Smad2. En estas células también se ha descrito la presencia de ALK1, la fosforilación de Smad1 por este receptor, y la inducción de la expresión de proteínas como Id1 (Wiercinska *et al.*, 2006). Y algo similar se produce en

condrocitos humanos donde mientras que ALK1 inhibe, ALK5 potencia la actividad transcripcional de Smad3 y PAI-1 (Finnson *et al.*, 2008).

En resumen, nuestros resultados demuestran la existencia y funcionalidad de las vías de ALK5 y ALK1 del TGF β en un tipo celular distinto de las células endoteliales, los mioblastos de rata L₆E₉. Dado que los mioblastos son altamente sensibles al TGF β 1 (Igotz *et al.*, 1987) y expresan los receptores tipo I y tipo II son un buen modelo para investigar más a fondo las vías de señalización del TGF β 1.

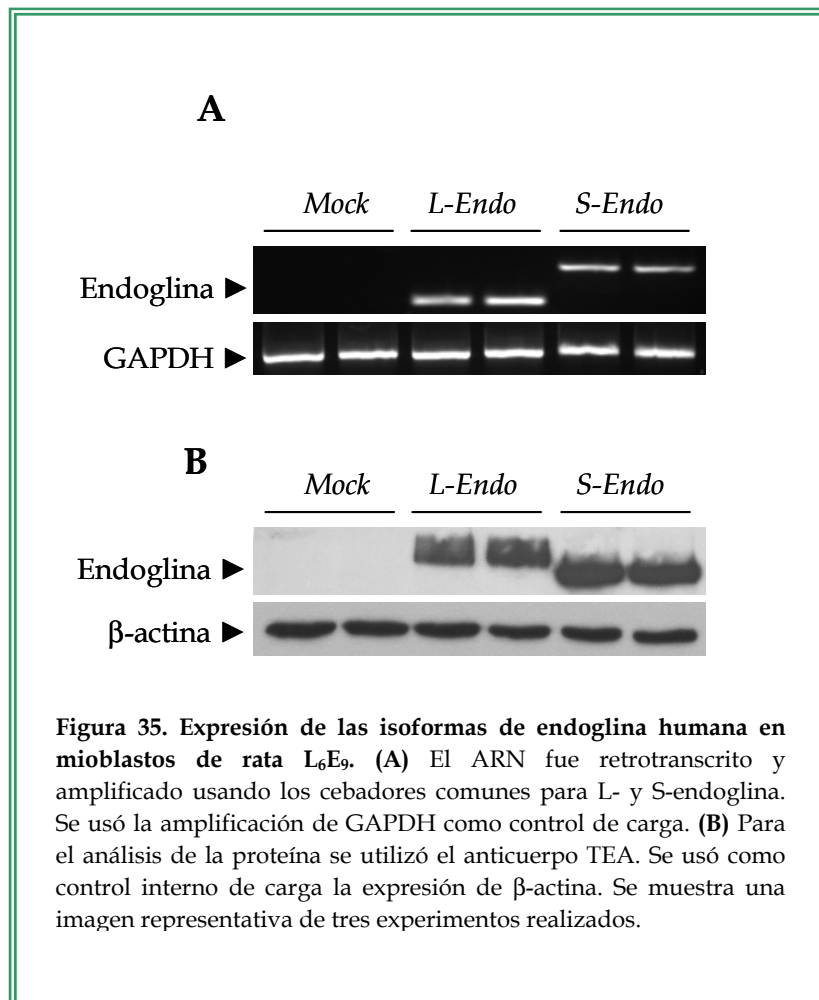
2. Efecto de las isoformas de la endoglina en la señalización del TGF β 1.

2.1. Expresión de endoglina en mioblastos de rata L₆E₉

Para la realización de esta parte del trabajo hemos utilizado mioblastos de rata L₆E₉ transfectados de forma estable con el gen de la isoforma larga de la endoglina humana, L-endoglina humana, a los que llamaremos mioblastos L-endoglina o L-Endo, y mioblastos transfectados de forma estable con el gen de la isoforma corta de la S-endoglina humana, a los que llamaremos mioblastos S-endoglina o S-Endo (Bellon *et al.*, 1993; Lastres *et al.*, 1996). También, contamos con mioblastos transfectados con el vector vacío que utilizamos como control, a los que llamaremos mioblastos Mock. Los mioblastos son un buen modelo para estudiar el efecto de la endoglina sobre diversas funciones biológicas, ya que no la expresan de manera natural (Letamendia *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2004; Obreo *et al.*, 2004; Scherner *et al.*, 2007).

Analizamos la expresión de endoglina mediante las técnicas de PCR, *Western blot* e inmunofluorescencia.

Los cebadores que diseñamos para PCR amplifican simultáneamente ambas isoformas en la misma reacción. Podemos diferenciar ambas isoformas ya que el fragmento amplificado de la isoforma corta es 136 pares de bases mayor que el de la isoforma larga (Figura 35A). En el caso del *Western blot*, los anticuerpos que existen en la actualidad no diferencian entre ambas isoformas, pero observamos como difieren levemente en la altura a la que migran en el gel debido a que la isoforma S tiene un peso molecular algo menor (Figura 35B).



La figura 36 muestra una inmunofluorescencia de endoglina donde se puede apreciar la localización de la endoglina transfectada en los mioblastos. La endoglina (color verde) se localiza por toda la membrana plasmática, aunque se concentra formando grandes acúmulos en los puntos de adhesión a la superficie.

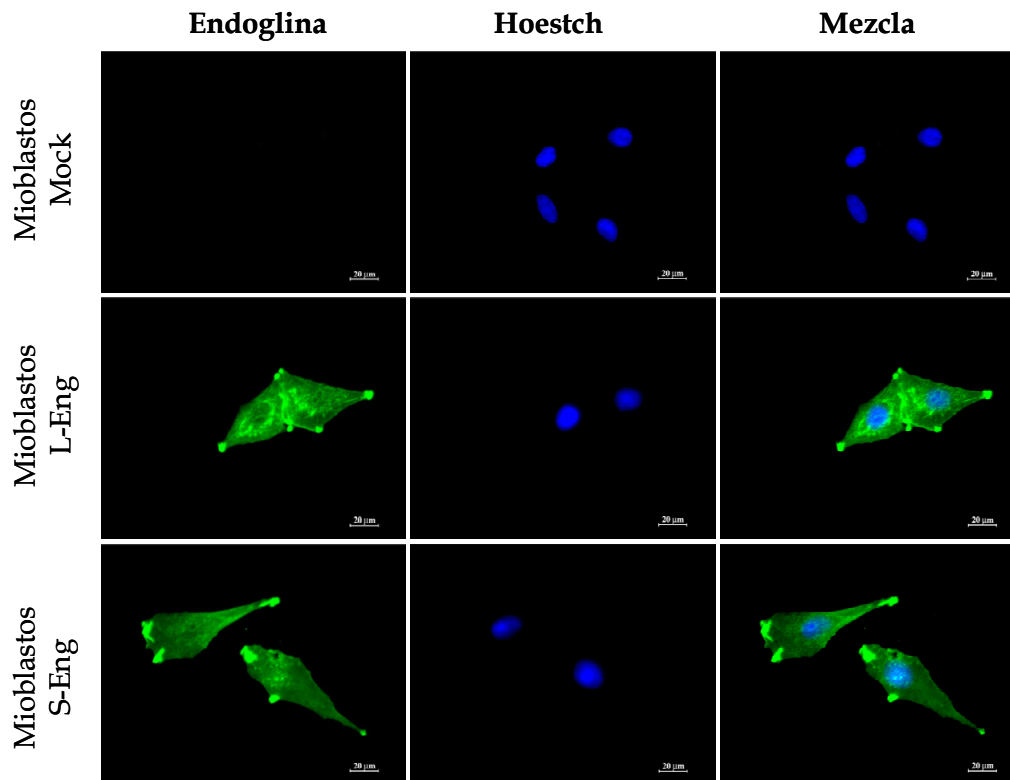


Figura 36. Inmunofluorescencia de endoglina humana en mioblastos de rata L₆E₉. Las fotografías muestran una tinción para endoglina humana. Los mioblastos se incubaron con el anticuerpo TEA y posteriormente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 488. El color azul corresponde a la tinción de los núcleos con el reactivo Hoestch.

La localización de acúmulos de endoglina en los puntos de adhesión, nos hace pensar que sería interesante estudiar si las distintas isoformas de la endoglina modifican los puntos de adhesión al sustrato de alguna manera, puesto que en estos puntos se inician importantes vías de señalización. Asimismo, se ha demostrado que la endoglina es capaz de interactuar por su dominio citoplasmático con componentes de membrana, que actúan como ensamblajes de complejos proteicos, implicados en la regulación del citoesqueleto de actina (Conley *et al.*, 2004; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). Como ambas isoformas difieren en dicho dominio podrían tener funciones distintas en la organización del citoesqueleto.

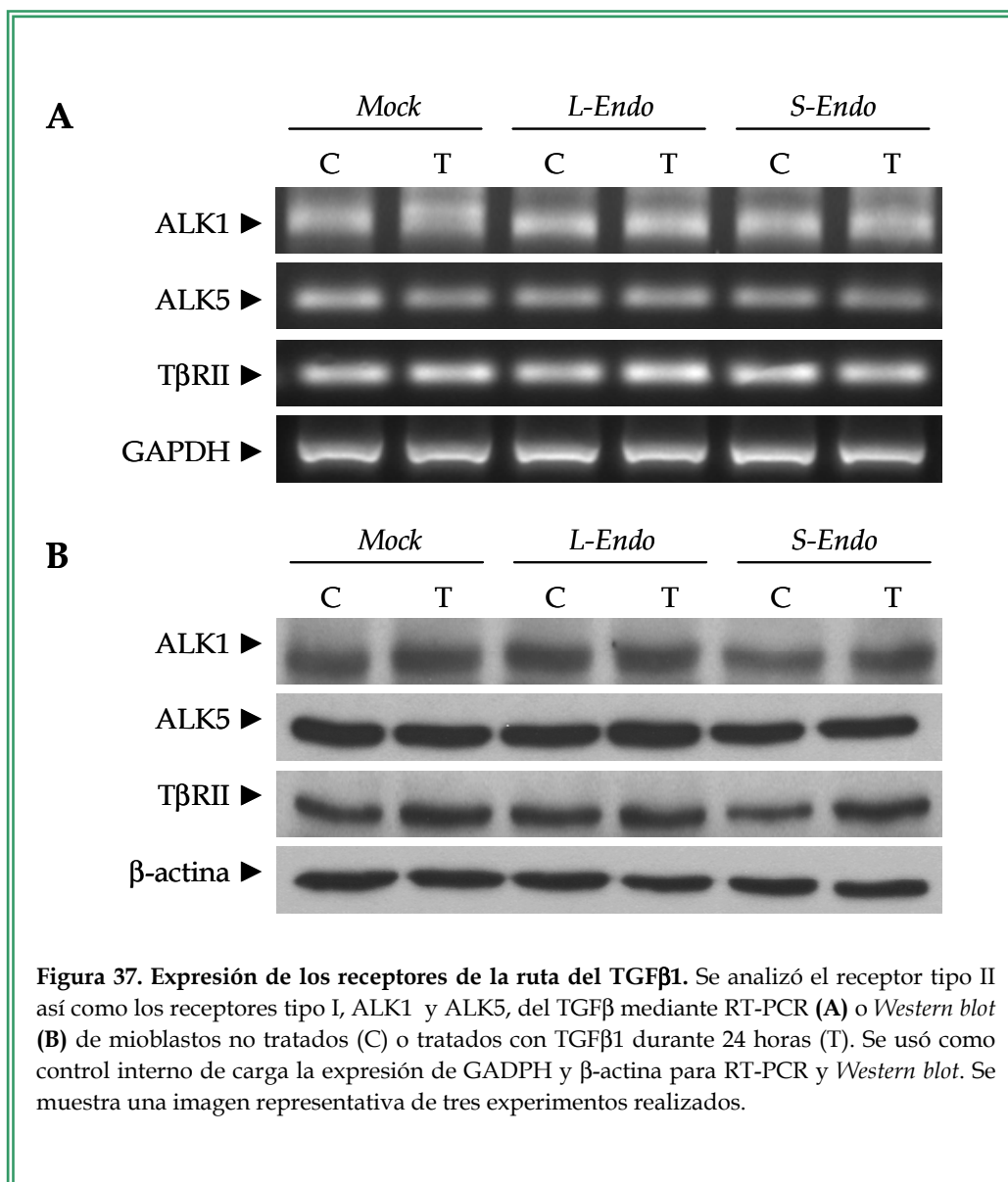
2.2. Expresión de receptores del TGFβ1.

Hasta hace poco tiempo se ha considerado a la endogлина como una proteína accesoria del complejo de receptores del TGFβ1 que regula el acceso del ligando a los receptores señalizantes. El descubrimiento de la fosforilación de la endogлина en su dominio intracelular hizo que varios autores apuntaran la posibilidad de que endogлина también actúe sobre la maquinaria de señalización intracelular de ligandos como el TGFβ1 y otras moléculas de su superfamilia (Lastres *et al.*, 1994; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Koleva *et al.*, 2006). Nuestra hipótesis es que las isoformas de endogлина, podrían modificar la expresión o activación de mediadores intracelulares de la cascada del TGFβ1. Por ello, analizamos si la expresión de las distintas isoformas de endogлина en los mioblastos modula las vías de señalización del TGFβ1: ALK5 y ALK1.

Para que la endogлина pueda unirse al TGFβ1, es necesaria la presencia de los receptores señalizantes. Se ha demostrado que la endogлина interactúa con los dos tipos de receptores señalizantes independientemente de su estado de activación y de la presencia de ligando endógeno (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2005).

Por lo tanto, el primer paso fue estudiar si la presencia de las distintas isoformas de endogлина podía modificar la expresión de los receptores del TGFβ. Analizamos los niveles de expresión de ARN mensajero de ALK1, ALK5 y TβRII en los mioblastos Mock, L-Endo y S-Endo (Figura 37A). La expresión del ARNm de los distintos receptores no varía ni en los mioblastos transfectados con la isoforma larga (L-Endo) ni en los transfectados con la isoforma corta (S-Endo). El tratamiento con TGFβ1 durante 24 horas no modifica los niveles de mensajero.

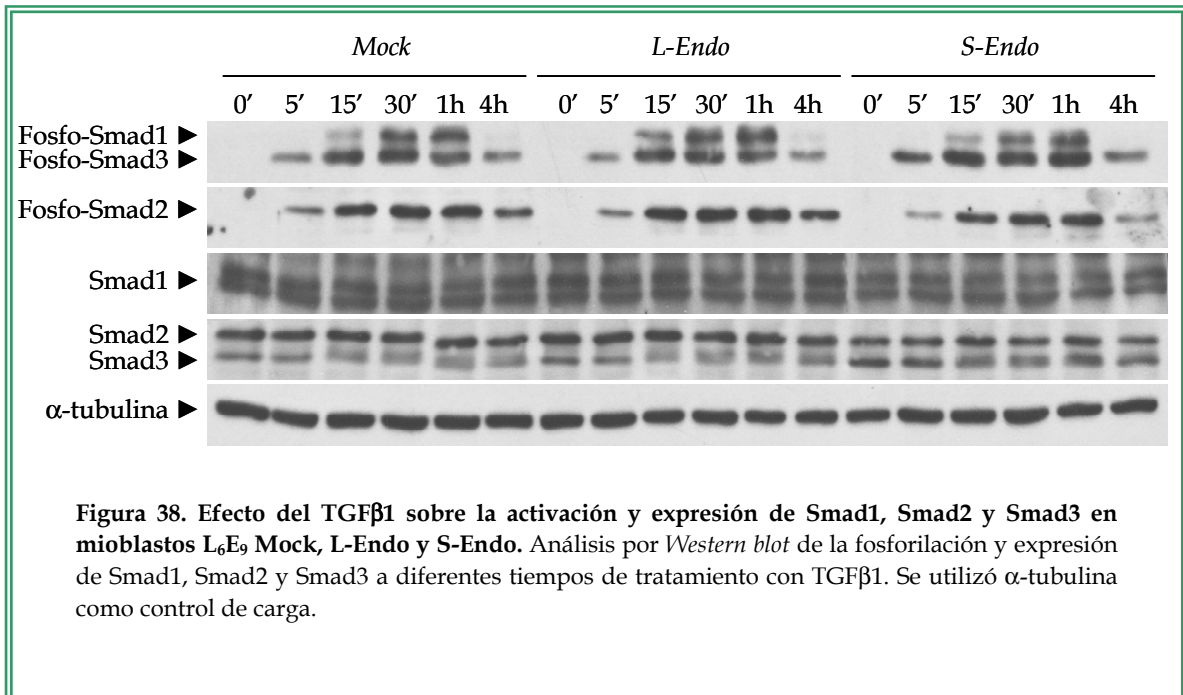
Al analizar por *Western blot* los mioblastos transfectados con las isoformas de endogлина, tampoco encontramos cambios en los niveles de expresión de los receptores (Figura 37B). Estos resultados indican que la expresión de las isoformas de endogлина no modifica la expresión de los receptores del TGFβ.



2.3. Expresión y activación de las R-Smads

Las proteínas R-Smads son el sustrato directo del receptor tipo I del TGFβ1 y por ello investigamos el efecto de la expresión de las isoformas de endogлина sobre la expresión y activación de estos mediadores.

Realizamos un tiempo respuesta de TGFβ1 en los tres tipos de mioblastos y analizamos la activación de las R-Smads.



El tratamiento con TGFβ1 induce un fuerte aumento en la fosforilación de Smad2 que se inicia a los 5 minutos y permanece 4 horas después del estímulo en los tres tipos celulares. Esta respuesta es prácticamente igual en el caso de la fosforilación de Smad3. Sin embargo, como ya vimos en el apartado 1.2 (Figura 22), la fosforilación de Smad1 se produce más tarde en el tiempo y también termina mucho antes, volviendo a las 4 horas a niveles similares al basal (Figura 38).

El tratamiento con TGFβ1 no modifica los niveles de expresión de las R-Smads estudiadas (Figura 38).

Para analizar en detalle las posibles diferencias en la activación de estas Smads entre los tres tipos de mioblastos, elegimos el tiempo de 30 minutos puesto que en dicho tiempo tenemos una activación significativa. Mantuvimos las células en medio sin suero durante 24 horas y posteriormente las tratamos con TGFβ1 durante 30 minutos (Figura 39).

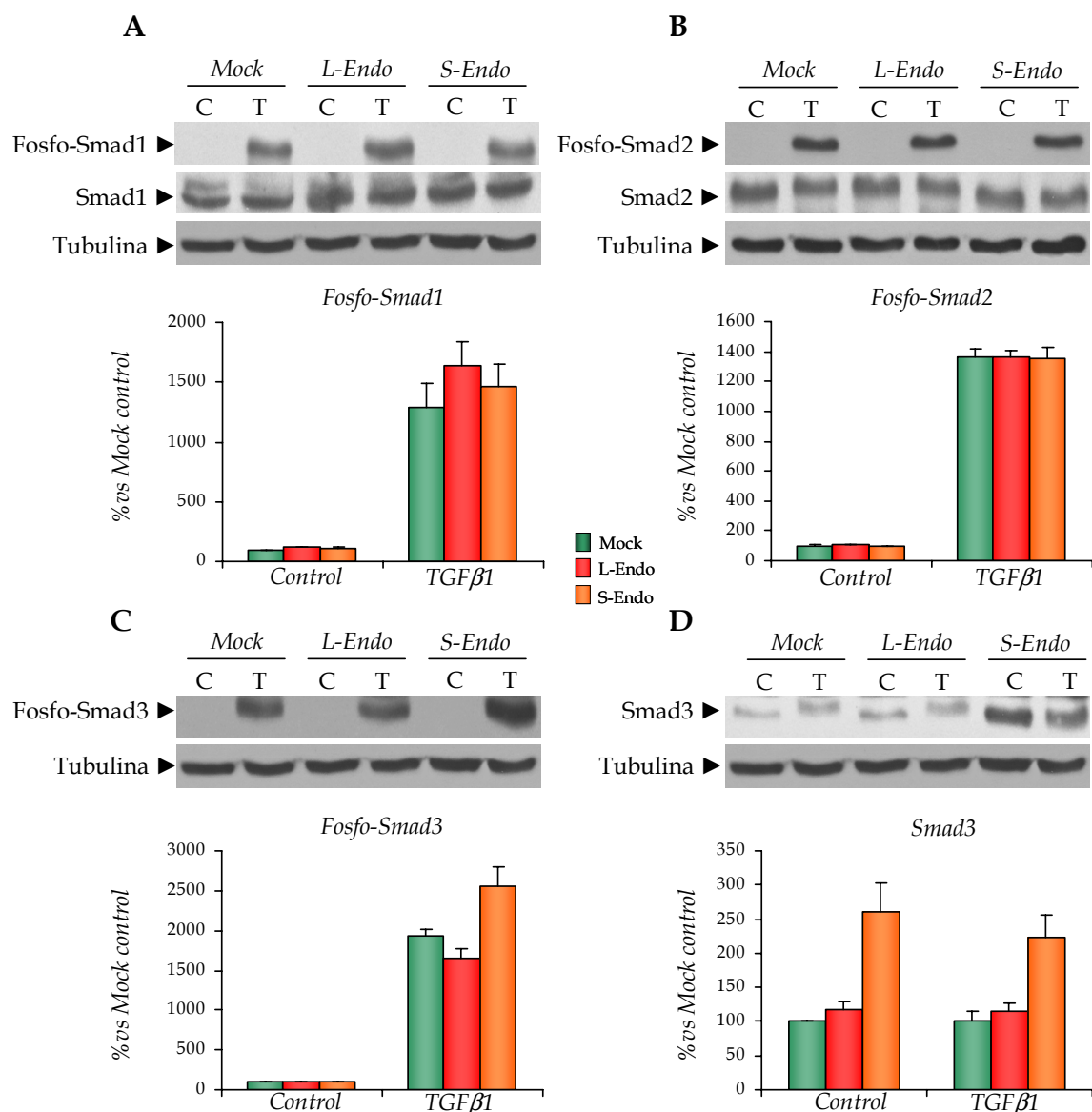
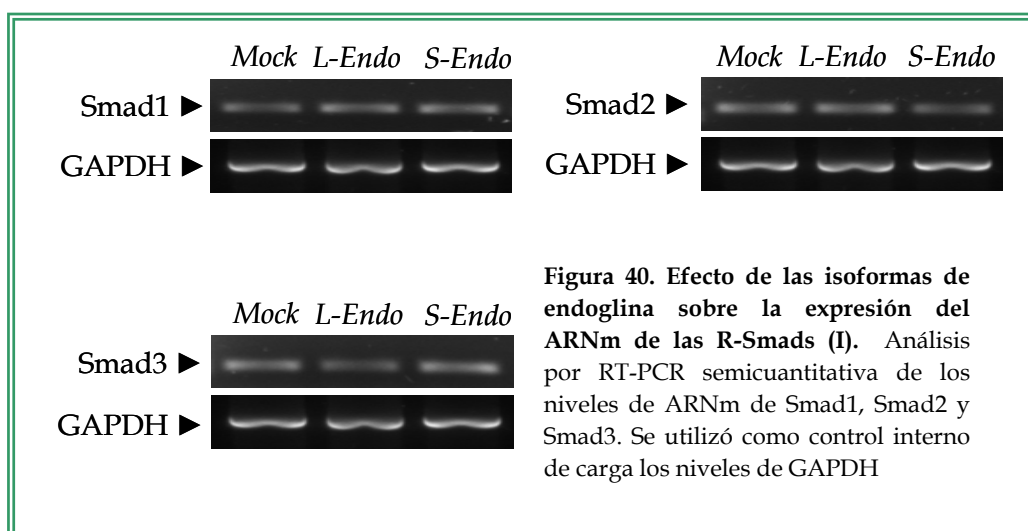


Figura 39. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la activación y expresión de los R-Smads. Análisis por *Western blot* de la fosforilación y expresión de Smad1 (A), Smad2 (B) y Smad3 (C,D) de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGFβ1 durante 30 minutos (T). Las imágenes son representativas de cuatro experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos mock. Los datos, obtenidos en cuatro experimentos diferentes, se expresan como la media +EEM.

Como se puede observar en la figura 39A, hay un ligero aumento en la fosforilación de Smad1 en los mioblastos L-Endo tras el tratamiento con TGFβ1. No encontramos diferencias en la expresión de Smad1 entre los mioblastos Mock y los transfectados con cualquiera de las isoformas de endoglina. En Smad2 no encontramos diferencias ni en activación ni en expresión entre los tres tipos

celulares (Figura 39B). Sin embargo, en las células tratadas con TGF β 1 existe una mayor activación de Smad3 en los mioblastos S-Endo (Figura 39C). Al estudiar por *Western blot* la expresión de Smad3 también encontramos una mayor expresión de esta R-Smad en estas células, que podría ser la razón por la que detectamos en los S-Endo una mayor activación de Smad3 (Figura 39D).

Partiendo de ARN mensajero de los distintos tipos de mioblastos, hicimos una RT-PCR semicuantitativa para Smad1, Smad2 y Smad3 (Figura 40). Apenas observamos diferencias en la expresión de las R-Smads estudiadas con esta técnica aunque es apreciable una menor expresión de Smad2 en los S-endogлина y de Smad3 en los L-endogлина.



Como apenas observamos diferencias en la expresión de ARNm de las Smads mediante RT-PCR semicuantitativa, decidimos medir los niveles de expresión de los ARNm de las R-Smads mediante RT-PCR cuantitativa. Para normalizar los niveles de expresión de los genes, empleamos tubulina. Se realizaron siempre triplicados en cada análisis, efectuándose un total de tres experimentos. Observamos como los mioblastos L-endogлина tienen una mayor expresión de Smad1 y una menor expresión de Smad3 comparado con los otros dos tipos de mioblastos. Además los mioblastos S-endogлина presentan una menor expresión de Smad2 que los Mock y los L-Endo (Figura 41).

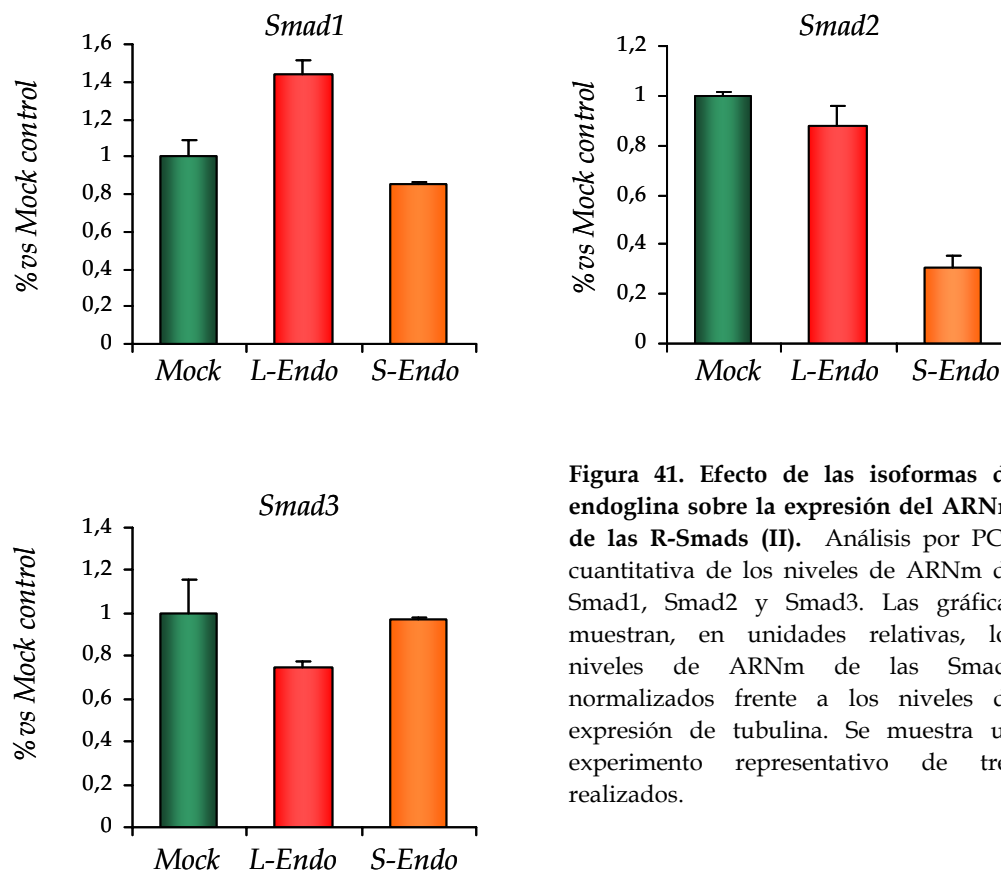


Figura 41. Efecto de las isoformas de endogлина sobre la expresión del ARNm de las R-Smads (II). Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de Smad1, Smad2 y Smad3. Las gráficas muestran, en unidades relativas, los niveles de ARNm de las Smads normalizados frente a los niveles de expresión de tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

Tratamos a los tres tipos de mioblastos Mock, L-Endo, S-Endo con el inhibidor específico de ALK5, SB431542 para estudiar si la presencia de las isoformas de endogлина podría producir una inhibición diferencial de la activación de las Smads.

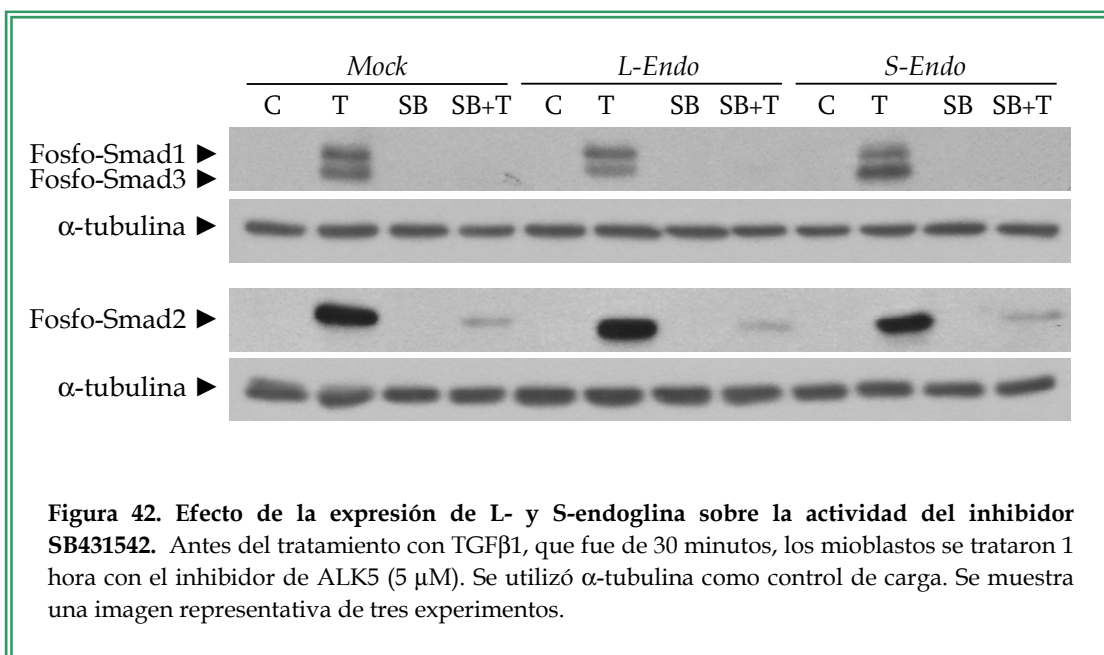


Figura 42. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la actividad del inhibidor SB431542. Antes del tratamiento con TGFβ1, que fue de 30 minutos, los mioblastos se trataron 1 hora con el inhibidor de ALK5 (5 μM). Se utilizó α-tubulina como control de carga. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos.

Como podemos observar en la figura 42, la inhibición de la activación de Smad1, Smad2 y Smad3 se produce del mismo modo en los tres tipos celulares. Como ya vimos en los mioblastos control, debe existir una dependencia entre ALK5 y ALK1 ya que cuando usamos este inhibidor, que no afecta al receptor tipo I ALK1, también encontramos una inhibición de la activación de Smad1.

2.4. Elementos de respuesta al TGFβ1

Para profundizar en el papel de las isoformas de endoglina continuamos con el estudio de las vías de señalización de TGFβ1, ALK1 y ALK5, en los mioblastos transfectados, realizando ensayos de promotor en los que utilizamos los reporteros (Bre)₂-Luc, (CAGA)₁₂-Luc y (ARE)-Luc-FAST.

Estudiamos el efecto de la presencia de las isoformas de endoglina en la vía de ALK1 a través de la actividad del reportero (Bre)₂-Luc. La actividad de este reportero es significativamente mayor en los mioblastos L-endoglina (Figura 43A). El TGFβ1 no produce un aumento en la actividad del mismo.

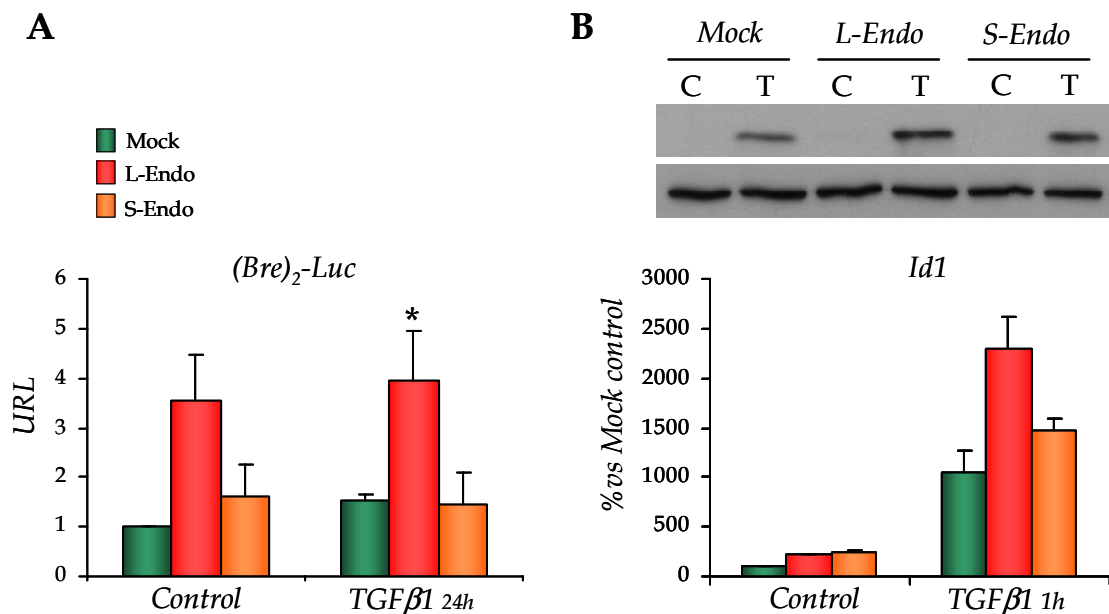


Figura 43. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la ruta de señalización de ALK1. (A) Estudio de la actividad del promotor (Bre)₂-Luc. Las células se transfectaron transitoriamente con la construcción mencionada y se trataron o no con TGFβ1 durante 24 horas. Los datos obtenidos de al menos tres experimentos, realizando ensayos por triplicado, se expresan como la media +EEM.*p<0,05 respecto a los mioblastos Mock y S-Endo. **(B)** Análisis por *Western blot* de Id1, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGFβ1 durante 1 hora (T). Las imágenes son representativas de tres experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos Mock.

Además, estudiamos los niveles de expresión de la proteína Id1 en respuesta al tratamiento con TGF β 1. El TGF β 1 induce un aumento en la expresión de esta proteína, siendo este aumento significativamente mayor en los mioblastos L-Endo que en los transfectados con la isoforma corta (Figura 43B). Estos resultados muestran que la L-endogлина promueve la señalización a través de la vía de ALK1.

Para estudiar el efecto de las isoformas de la endogлина sobre la ruta de ALK5 utilizamos los promotores: (ARE)-Luc, contranfectado con el factor FAST-1, (específico para Smad2) y (CAGA)₁₂-luc (específico para Smad3). La actividad del reportero (ARE)-Luc-FAST aumenta significativamente después del tratamiento con TGF β 1 del mismo modo en los tres tipos celulares, algo similar a lo observado con la fosforilación de Smad2 (Figura 44A). Sin embargo, la actividad del reportero (CAGA)₁₂-luc disminuye significativamente en los mioblastos transfectados con L-endogлина mientras que aumenta en los mioblastos S-endogлина, lo cual podría corresponderse con la mayor expresión y activación de Smad3 en estos mioblastos (Figura 44B).

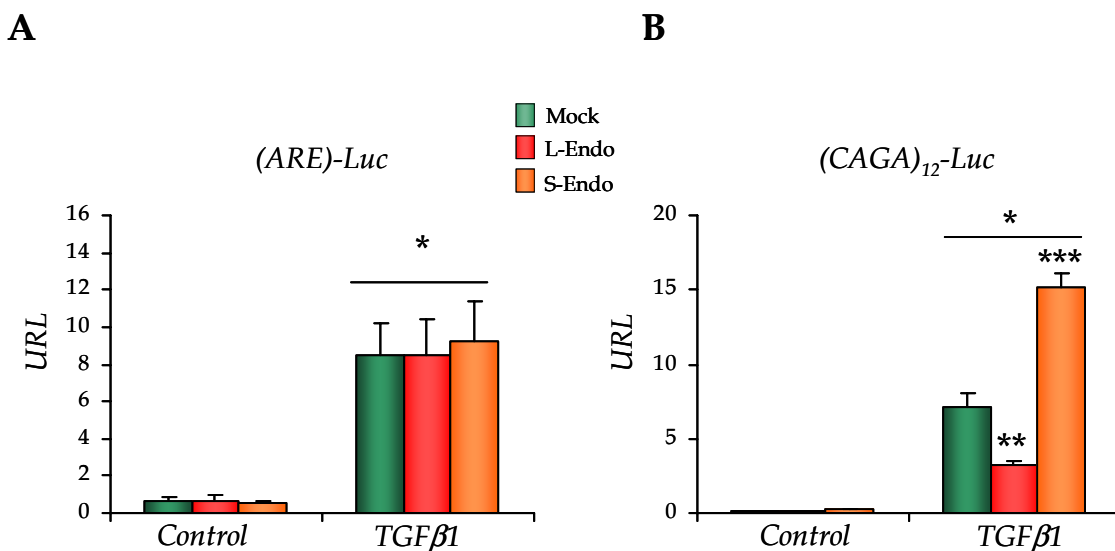


Figura 44. Efecto de la expresión de L-y S-endogлина sobre la ruta de señalización de ALK5. **(A)** Estudio de la actividad del promotor (ARE)-Luc-Fast1 y **(B)** del promotor (CAGA)₁₂-Luc. Las células se transfectaron transitoriamente con las construcciones mencionadas y se trataron o no con TGF β 1 durante 24 horas. Los datos, de al menos tres experimentos realizando ensayos por triplicado, se expresan como la media + EEM. *p<0,05 respecto a los no tratados; **p<0,05 respecto mioblastos Mock y S-Endo; ***p<0,05 respecto mioblastos Mock y L-Endo. URL: unidades relativas de luz.

Para corroborar este efecto analizamos la expresión de PAI-1. Se ha descrito que TGF β 1 induce a la proteína PAI-1 (Dennler *et al.*, 1998) y que L-endogлина y PAI-1 están inversamente correlacionados, es decir células que tienen una mayor expresión de endogлина, presentan una menor expresión de PAI-1 (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). En los mioblastos L₆E₉, el TGF β 1 induce la expresión de PAI-1 y esta expresión se ve modificada por la presencia de las isoformas de endogлина. Mientras que la L-endogлина disminuye significativamente su expresión, la S-endogлина aumenta fuertemente esta respuesta (Figura 45). Estos resultados que se relacionan con los obtenidos a nivel de las Smads, Smad3 y a nivel del promotor (CAGA)₁₂-luc, nos indican que la S-endogлина en mioblastos L₆E₉ promueve la señalización de la vía del TGF β 1 a través del receptor ALK5 y de la R-Smad, Smad3.

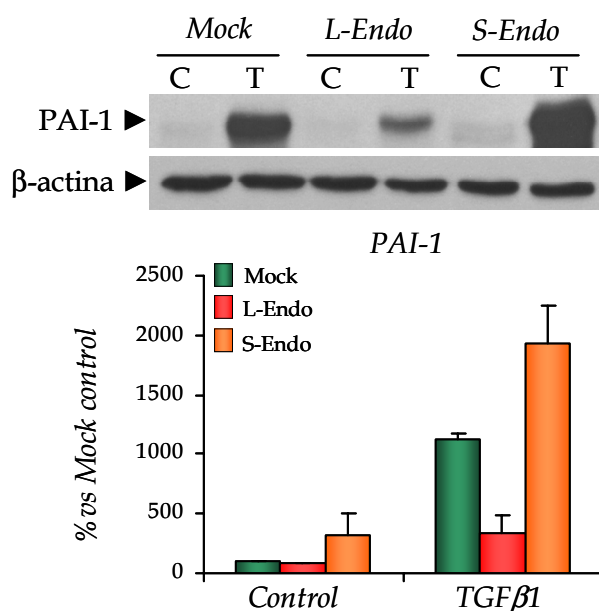


Figura 45. Efecto de la expresión de L-y S-endogлина sobre la expresión de PAI-1. Análisis por *Western blot* de PAI-1, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGF β 1 durante 24 horas (T). Las imágenes son representativas de tres experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos mock.

2.5. Expresión de Smad4

Smad4 juega también un papel esencial en la regulación transcripcional mediada por Smads (Shi y Massague, 2003). Por ello analizamos el efecto de la expresión de las isoformas de endogлина sobre la expresión de Smad4.

Como mostramos en la figura 46 analizamos por *Western blot* el efecto del TGF β 1 en la expresión de Smad4. La expresión de Smad4 está disminuida significativamente en los mioblastos S-Endo. Sin embargo, su expresión no se

modifica con el tratamiento con TGFβ1 en ninguno de los tres tipos de mioblastos tanto con tratamientos cortos de TGFβ1 como con tiempos más largos (Figura 46).

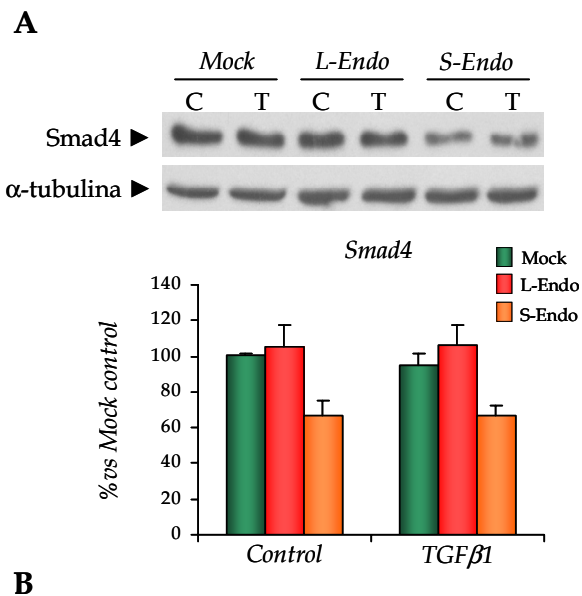
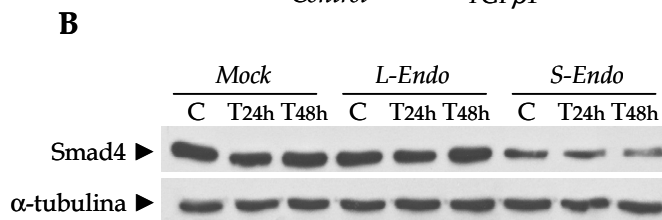


Figura 46. Efecto de la expresión de L-y S-endogлина sobre la expresión de Smad4. Análisis por *Western blot* de Smad4, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGFβ1 durante 30 minutos (T), panel A; o de mioblastos tratados 24 y 48 horas (T_{24h}, T_{48h}), panel B. Las imágenes son representativas de tres experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos Mock.



Analizamos por PCR semi-cuantitativa y cuantitativa los niveles de expresión de Smad4. Podemos observar que la expresión de S-endogлина disminuye significativamente los niveles de ARNm de Smad4 (Figura 47).

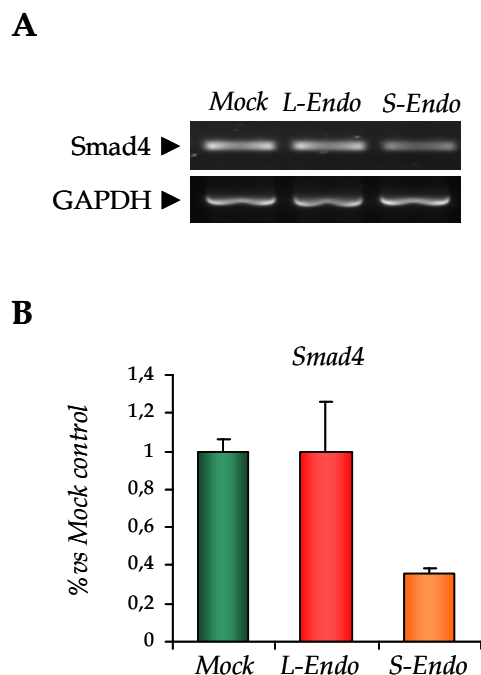


Figura 47. Efecto de las isoformas de endogлина sobre la expresión del ARNm de Smad4. Análisis por RT-PCR semicuantitativa (A) y por PCR cuantitativa (B) de los niveles de ARNm de Smad4. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos. La gráfica muestra en unidades relativas los niveles de ARNm de Smad4 normalizados frente a los niveles de expresión de tubulina, de un experimento representativo.

2.6. Expresión de Smad7

También quisimos estudiar si la expresión de la Smad inhibidora, Smad7, podría verse afectada por la expresión de las isoformas de endogлина.

Los resultados del análisis de expresión de la proteína, por *Western blot*, demuestran que los mioblastos transfectados con la isoforma corta tienen una elevada expresión de Smad7, sin embargo dicha expresión se ve claramente disminuida en los mioblastos L-Endo (Figura 48). El tratamiento con TGF β 1 no modifica la expresión de Smad7 (Figura 48).

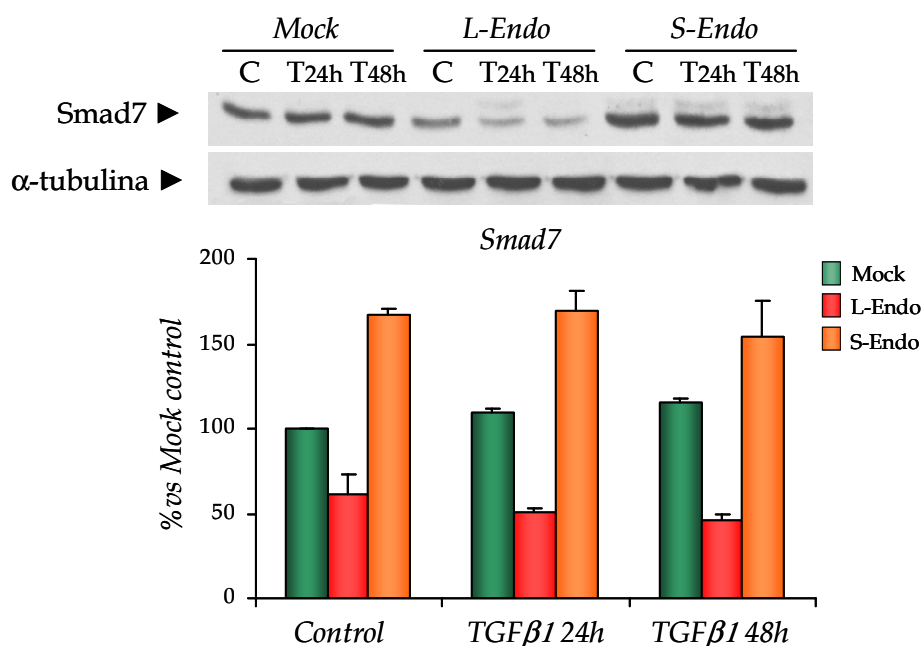


Figura 48. Efecto de la expresión de L-y S-endogлина sobre la expresión de Smad7. Análisis por *Western blot* de Smad7, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGF β 1 durante 24 y 48 horas (T24h, T48h respectivamente). Las imágenes son representativas de tres experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos mock.

Los resultados hasta aquí mostrados parecen apoyar los modelos propuestos en lo cuales la endogлина es un modulador del balance entre las vías TGF β 1-ALK1 y TGF β 1-ALK5 (Lebrin *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2005), ya que ambas isoformas son capaces de modular ambas vías. Existe un gran número de estudios en los cuales se describe a L-endogлина como un antagonista de la señalización del TGF β 1 vía ALK5 (Letamendia *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). Nuestros resultados

parecen apoyar estos trabajos ya que en los mioblastos que expresan L-endogлина observamos una menor activación de Smad3 y del promotor (CAGA)₁₂-Luc, el cual contiene elementos de unión específicos para Smad3/Smad4 (Dennler *et al.*, 1998). Además PAI-1 también se encuentra disminuida. Sin embargo al transfectar la isoforma corta (S-endogлина), detectamos un incremento en la fosforilación de Smad3, probablemente debido a una mayor expresión de la misma; una fuerte activación del promotor (CAGA)₁₂-luc y un incremento significativo de PAI-1 inducido por TGFβ1, lo que coincide con resultados obtenidos en células endoteliales senescentes, que poseen una mayor expresión de S-endogлина (Blanco *et al.*, 2008), y en células de carcinoma de ratón (Perez-Gomez *et al.*, 2007).

Por otro lado, las distintas isoformas de endogлина no producen un efecto diferente en la expresión y activación de Smad2 inducida por TGFβ1. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lebrin y colaboradores que, al silenciar endogлина en células endoteliales embrionarias, no observan cambios en la fosforilación de Smad2 (Lebrin *et al.*, 2004); y también con los obtenidos en otros trabajos realizados en células endoteliales y en células humanas de carcinoma de próstata (Pece-Barbara *et al.*, 2005; Craft *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por el grupo del Dr. Carmelo Bernabéu en esta misma línea celular (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Santibanez *et al.*, 2007) en la que observan una mayor expresión de Smad2 y actividad del promotor ARE en células transfectadas con L-endogлина. No somos capaces de explicar estas diferencias, puede ser que los anticuerpos utilizados, que son distintos, reconozcan diferentes epítomos de dicha proteína y/o que las condiciones de cultivo y mantenimiento celular sean diferentes.

Respecto a la vía de ALK1, aunque encontramos un ligero aumento en la fosforilación de Smad1 en los mioblastos transfectados con L-endogлина, éste no es significativo. En cambio, sí encontramos un aumento en la actividad del promotor Bre y en la expresión de Id1, debida al tratamiento con TGFβ1, en los mioblastos L-Endo. En definitiva, estos resultados vendrían a apoyar los que afirman que L-endogлина promueve la señalización de TGFβ1 vía ALK1 (Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005).

Podemos decir por tanto que ambas isoformas de endoglina modulan de forma diferente la vía de señalización de TGF β 1, puesto que mientras que L-endoglina inhibe la señalización a través de ALK5 y promueve la señalización vía ALK1, S-endoglina potencia la vía de señalización a través de ALK5.

Hemos observado en los mioblastos L₆E₉ otras modificaciones en los mediadores de la ruta del TGF β 1 debidas a la expresión de las isoformas de endoglina. Así, podemos observar que la presencia de S-endoglina reduce significativamente la expresión de Smad4. Dado que las respuestas transcripcionales estudiadas no están disminuidas en los mioblastos S-Endo, la reducción de la expresión de Smad4 podría no tener consecuencias respecto a la formación de los complejos R-Smad/Smad4, o en la actividad transcripcional de los genes estudiados. Algunos autores apuntan la idea de que las R-Smads pueden ser capaces de funcionar con otra Co-Smad o sin ella. Teniendo en cuenta que el papel de Smad4 es ayudar a las R-Smads a unirse al ADN y reclutar coactivadores, otras proteínas podrían sustituir a Smad4 en estas funciones (Massague y Wotton, 2000; Kretschmer *et al.*, 2003). De hecho, existe un trabajo (Sirard *et al.*, 2000) en el cual se observa que fibroblastos embrionarios procedentes de ratones *Smad4*^{-/-} responden de manera normal al TGF β 1 en cuanto a la inhibición del crecimiento y síntesis de moléculas de matriz como PAI-1 (Sirard *et al.*, 2000). Por lo tanto, Smad4 en los mioblastos podría ser necesario para otros genes de respuesta al TGF β 1 que nosotros no hemos estudiado o puede tener influencia en genes de respuesta a otros miembros de la superfamilia del TGF β 1 como activinas o BMPs.

Además, la Smad inhibidora, Smad7, también ve modificada su expresión frente a la presencia de las isoformas de endoglina. Nuestros resultados demuestran que la presencia de la S-endoglina aumenta la expresión de este mediador, mientras que la L-endoglina la disminuye significativamente. En otros experimentos que hemos realizado en nuestro laboratorio, y cuyos resultados no se muestran en esta tesis, observamos que células endoteliales de aorta procedentes de ratones haploinsuficientes para endoglina (*Eng*^{+/-}) también presentan una mayor expresión de Smad7 que sus hermanos de camada *Eng*^{+/+}. Pece-Barbara y colaboradores también muestran que células endoteliales embrionarias procedentes de ratones *Eng*^{-/-} presentan una mayor expresión de Smad7 que los *Eng*^{+/+} (Pecce-Barbara *et al.*, 2005).

Dado que Smad7 impide la fosforilación de las R-Smads y la unión de complejos de Smads a los receptores, cabría pensar que las respuestas al TGF β 1 en los S-endoglina serían menores, ya que, como se ha observado en otros trabajos, células que sobreexpresan Smad7 presentan una señalización del TGF β 1 disminuída (Hou *et al.*, 2005). En los mioblastos L-endoglina, es cierto que tenemos una menor respuesta en la ruta de ALK5, sin embargo la respuesta vía ALK1 está potenciada; mientras que en las células S-endoglina, con una mayor expresión de Smad7 existe una mayor activación de la ruta de ALK5. Se ha demostrado que Smad7 se induce a través de ALK1, presente en nuestros tres tipos de mioblastos, y que esta Smad7 inhibe de forma específica esta vía, a través del reclutamiento de la fosfatasa PP1 α (Proteína fosfatasa 1 α) que defosforila e inactiva a ALK1 (Valdimarsdottir *et al.*, 2006). Así, se establece un mecanismo de retroalimentación negativo, que permite la inactivación de esta vía y la prevalencia de la vía de ALK5. Puede ser que en los mioblastos, que como ya hemos dicho presentan ALK1, ocurra algo parecido. Así, es posible que en los mioblastos S-endoglina que presentan una mayor expresión de Smad7 unida quizá a PP1 α , defosforile más receptores de ALK1 y potencie la ruta a través de ALK5. Por el contrario, en los mioblastos L-endoglina, al tener una menor expresión de Smad7, este mecanismo se produciría en menor medida y por eso esta vía está más activada en estas células. Para comprobar todo esto sería interesante estudiar, por ejemplo, el estado de activación de estos receptores. Además, pueden existir otras explicaciones, dado que Smad7 también recluta proteínas ubiquitinas ligasas, como las Smurfs, que marcan para la degradación a los receptores (Itoh y ten Dijke, 2007), e incluso que esta diferencia de expresión sea por una mayor o menor estabilización del RNA, o inclusive que no afecte a las respuestas de TGF β 1 que nosotros hemos estudiado. Se necesitarían otros experimentos para poder determinar la importancia de estas diferencias de la expresión de Smad7 en los mioblastos.

3. Efecto de las isoformas de endogлина sobre diferentes propiedades biológicas de los mioblastos

La L-endogлина es un antagonista de las respuestas biológicas al TGF β 1 mediadas a través del receptor ALK5. Entre estas respuestas se encuentran algunas como la inducción de matriz extracelular, proliferación, apoptosis (Diez-Marques *et al.*, 2002; Obreo *et al.*, 2004; Letamendia *et al.*, 1998). Sin embargo, también se ha demostrado que es un activador de las respuestas mediadas a través de ALK1 como proliferación y migración (Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). Así, nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto de las dos isoformas de endogлина en diversas propiedades biológicas como la síntesis de matriz extracelular, la proliferación celular y la expresión de moléculas relacionadas con la inflamación.

3.1. Acumulación de matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es capaz de regular diversos procesos celulares como la adhesión celular, la migración, la proliferación celular y la diferenciación (Roberts *et al.*, 1992). Algunos estudios han demostrado que la expresión de endogлина regula la acumulación de algunos componentes de la matriz extracelular en varios tipos celulares (Letamendia *et al.*, 1998; Guerrero-Esteo *et al.*, 1999; Diez-Marques *et al.*, 2002; Obreo *et al.*, 2004). Todos estos estudios se han realizado en líneas celulares transfectadas con L-endogлина, pero no se conoce el efecto de la expresión de la S-endogлина sobre la MEC.

Para comprobar si las isoformas de endogлина regulaban de manera diferencial dicha acumulación estudiamos la expresión de colágeno I y del CTGF (Factor de crecimiento de tejido conectivo de *Connective Tissue Growth Factor*) en mioblastos L₆E₉ transfectados con ambas isoformas.

Los niveles de colágeno I determinados por *Western blot*, son mayores en los mioblastos S-endogлина que en los Mock en condiciones basales, mientras que en los mioblastos L-Endo la expresión de colágeno I es menor. El tratamiento con TGF β 1 durante 24 horas aumenta la expresión de colágeno I en los tres tipos de mioblastos,

y aunque el incremento es mucho mayor en los mioblastos Mock que en los mioblastos S-Endo y que en los mioblastos L-endoglina, las diferencias en colágeno I se mantienen entre los tres tipos de mioblastos (Figura 49).

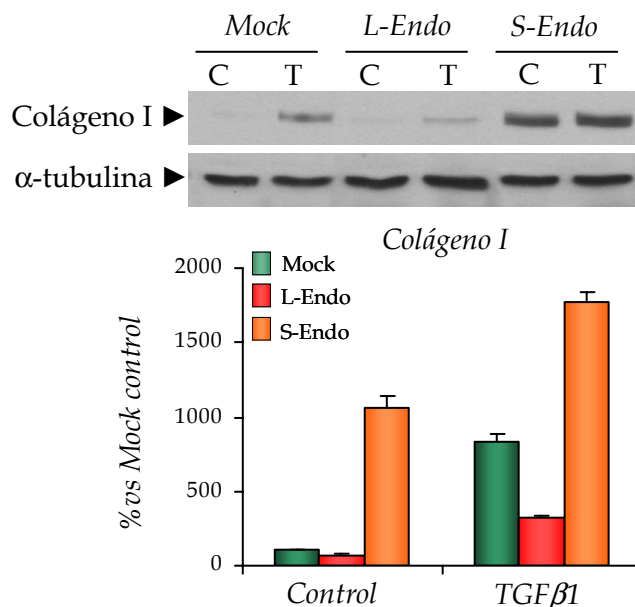
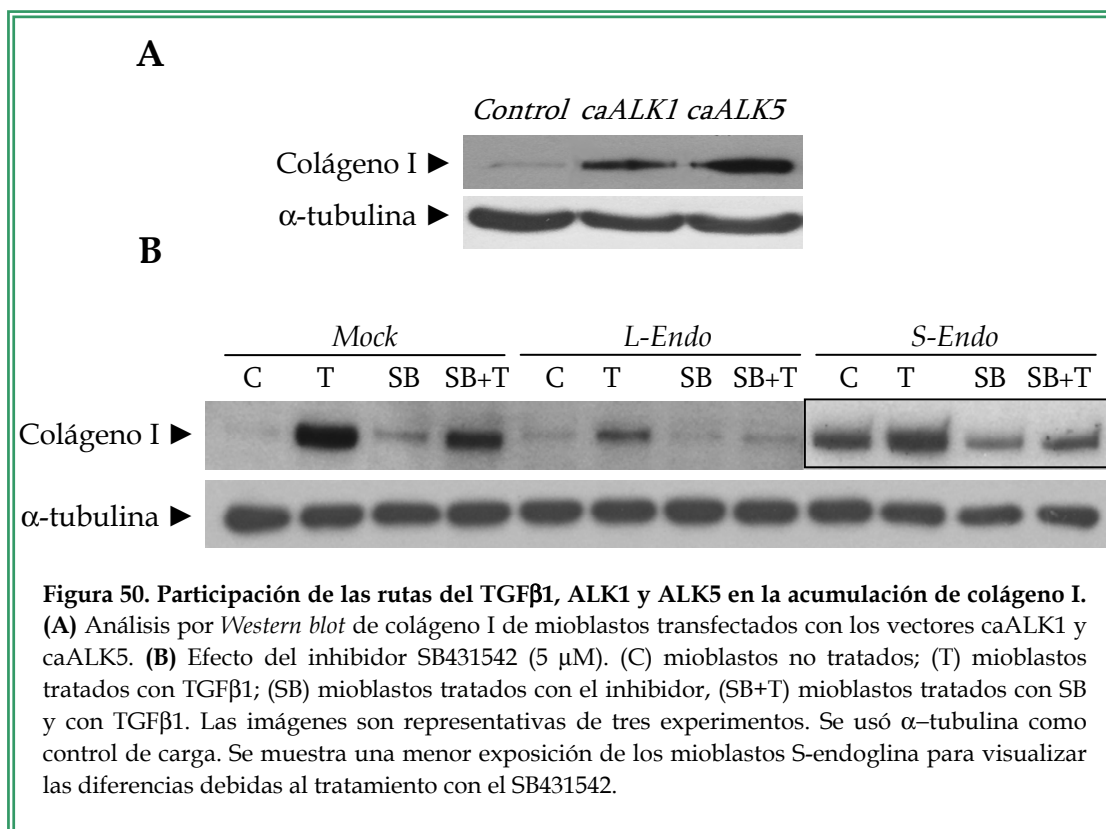


Figura 49. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la expresión de colágeno I. Análisis por *Western blot* de colágeno I, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGFβ1 durante 24 horas (T). Las imágenes son representativas de tres experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos Mock.

Como hemos observado que la isoforma S-endoglina promueve la vía de ALK5 y con ello la síntesis de colágeno I; investigamos también el papel de las vías de ALK1 y ALK5 en la expresión de esta proteína. Transfectamos los mioblastos L₆E₉ con vectores constitutivamente activos (ca) para ALK1 y ALK5 y analizamos el efecto en la expresión de colágeno I. Como muestra la figura 50A, ambos vectores inducen un aumento en la expresión de esta proteína, y este aumento es mayor en las células transfectadas con el caALK5.

Además, tratamos a los mioblastos con el inhibidor específico de ALK5, SB431542, una hora antes del tratamiento con TGFβ1. El aumento de expresión de colágeno I inducido por TGFβ1 disminuye en presencia de dicho inhibidor en los tres tipos celulares, sin embargo, las diferencias que presentan en la expresión de colágeno I no varían (Figura 50B).

Estos resultados nos indican que la S-endogлина favorece la acumulación de colágeno I, mientras que la L-endogлина la inhibe. Los resultados con los constitutivamente activos nos muestran que ambas rutas ALK1 y ALK5 están participando en la expresión de dicha proteína, con un posible papel preponderante de ALK5. Sin embargo, estas rutas no son las únicas que median en la expresión de colágeno I, ya que cuando utilizamos el inhibidor SB431542 seguimos teniendo expresión de colágeno I.



El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) es una citoquina que está involucrada en la deposición de matriz extracelular mediada por TGFβ (Chen *et al.*, 2002). La expresión de CTGF, en condiciones basales, es menor en los mioblastos L-endogлина y está aumentada en los mioblastos S-endogлина comparada con la expresión de CTGF en los mioblastos Mock (Figura 51). El tratamiento con TGFβ1 induce un incremento similar de este factor en los tres tipos de mioblastos (Figura 51). Al tratar las células con el inhibidor SB431542 se produce una disminución en la expresión de CTGF similar en los tres tipos de mioblastos (datos no mostrados).

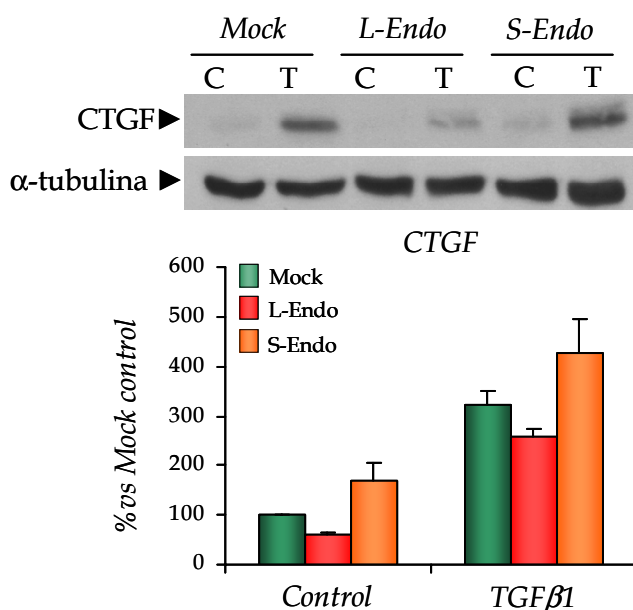


Figura 51. Efecto de la expresión de L- y S-endogлина sobre la expresión de CTGF. Análisis por *Western blot* de CTGF, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGFβ1 durante 24 horas (T). Las imágenes son representativas de tres experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos Mock. Se usó como control interno de carga la expresión de α-tubulina.

Está ampliamente aceptado que el TGFβ1 juega un papel importante en la regulación de la MEC. Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que el TGFβ1 induce la síntesis de colágeno I (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2002) y de CTGF (Obreo *et al.*, 2004) en mioblastos L₆E₉. Además en diversas publicaciones se muestra como la expresión de endogлина disminuye la síntesis de componentes de la matriz extracelular (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999; Diez-Marques *et al.*, 2002; Obreo *et al.*, 2004). Los presentes datos demuestran que la presencia de la isoforma larga disminuye la expresión de colágeno I y CTGF, en concordancia con los trabajos mencionados; mientras que la isoforma corta aumenta la expresión de dichos componentes de la MEC. Estudios llevados a cabo en la línea premonocítica humana U-937 muestran que células transfectadas con S-endogлина presentan una mayor síntesis de fibronectina que células transfectadas con L-endogлина (Lastres *et al.*, 1996). Se ha demostrado que los promotores de colágeno I y de CTGF contienen elementos de respuesta a Smads, donde se une especialmente Smad3, y que ratones deficientes en Smad3 presentan una fibrosis reducida en diferentes órganos (Holmes *et al.*, 2001; Flanders, 2004; Verrecchia y Mauviel, 2007). Aquí demostramos que los mioblastos S-endogлина tienen una mayor expresión de Smad3 lo que podría relacionarse con una mayor expresión de estas moléculas de matriz, lo que volvería a apoyar la idea de que el TGFβ1 vía ALK5 potencia la síntesis de matriz extracelular (Blanco *et al.*, 2005).

Además los mioblastos trasfectados con el vector caALK5 presentan una mayor expresión de colágeno I. Sin embargo, el hecho de que el inhibidor SB431542, el cual hemos confirmado que inhibe las rutas de ALK1 y ALK5, no elimine la expresión ni de colágeno ni de de CTGF en los mioblastos, nos hace plantearnos la posible participación de otras rutas de señalización en la activación de la síntesis de colágeno I. De hecho en nuestro laboratorio se ha demostrado la dependencia de la MAPK p38 en la síntesis de colágeno I inducida por TGF β 1 en mioblastos L₆E₉ (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2002). También, otros trabajos muestran que la activación de ERK1/2 contribuye a la regulación de colágeno I y de CTGF en diversos órganos y tipos celulares (Chen *et al.*, 2002; Svegliati-Baroni *et al.*, 2005; Tourkina *et al.*, 2005; Pannu *et al.*, 2007). Además, se ha visto como la expresión de L-endoglina en mioblastos de rata L₆E₉ modifica las vías de ERK1/2 y de JNK (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2004). Por lo tanto, es bastante probable que se estén produciendo interacciones entre la ruta de las Smads y la ruta de las MAPK que estén regulando entre otras cosas la producción de MEC. Sería muy interesante estudiar el efecto de las dos isoformas de endoglina en las distintas rutas de MAPK y su contribución en este efecto biológico.

3.2. Proliferación

Aunque numerosos estudios han descrito el efecto de la expresión de endoglina en la proliferación celular en presencia o ausencia del TGF β 1, dichos estudios se refieren principalmente a L-endoglina (Letamendia *et al.*, 1998; Lebrin *et al.*, 2004; Jerkic *et al.*, 2006b). Nosotros estudiamos el efecto de la expresión de las isoformas de endoglina en los mioblastos L₆E₉ analizando la viabilidad celular durante tres días, el ciclo celular, y el nivel de expresión del antígeno celular de proliferación celular (PCNA) y de ciclinas D1 y E.

La viabilidad celular la medimos mediante ensayos con MTT, el ciclo celular por citometría de flujo y la expresión de PCNA y ciclinas mediante *Western blot*.

Los ensayos por MTT nos mostraron una mayor proliferación en los mioblastos L-endoglina que en los Mock, mientras que los mioblastos S-endoglina presentaban una proliferación marcadamente disminuida frente a los mioblastos

Mock y a los L-Endo. El TGFβ1 inhibe la proliferación celular y su efecto es similar en los tres tipos de mioblastos (Figura 52).

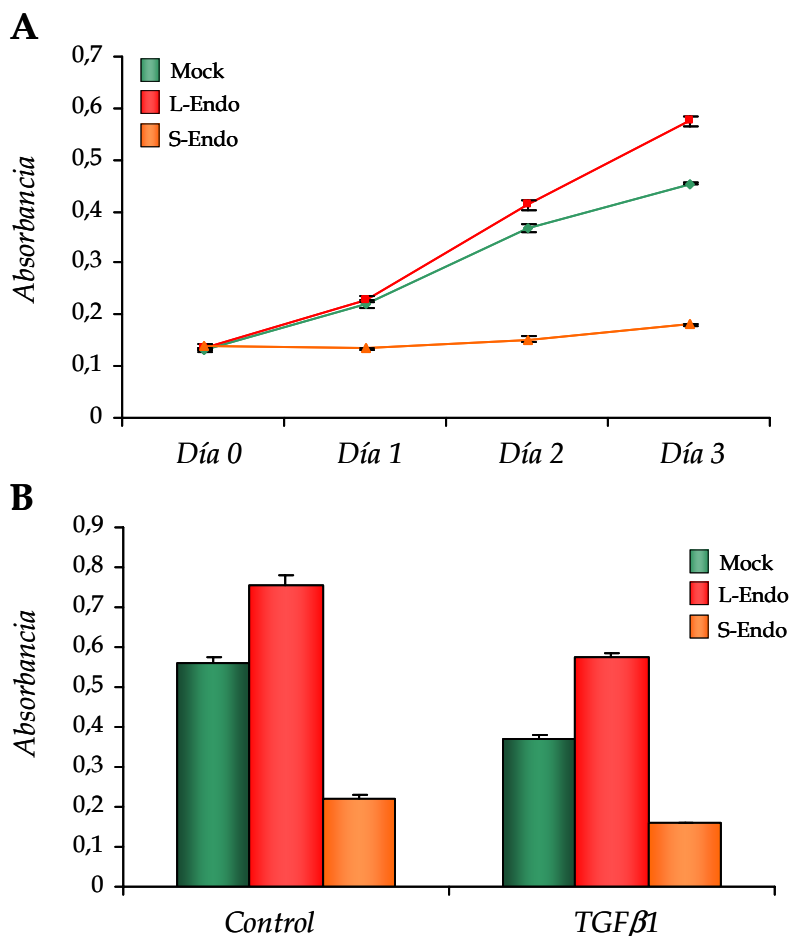


Figura 52. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la proliferación celular. (A) Curva de proliferación de los mioblastos. Cada valor es la media \pm EEM de tres experimentos independientes. (B) Análisis por MTT de la proliferación celular de mioblastos no tratados y tratados con TGFβ1. La medida de la absorbancia es indicativa de la tasa de proliferación de las células. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos realizados.

Al analizar el ciclo celular observamos como la expresión de S-endoglina retiene a las células en la fase G0-G1, mientras que el número de células en fase G2+M es mayor en los mioblastos L-endoglina (47%) que en los S-endoglina (38%) (Figura 53).

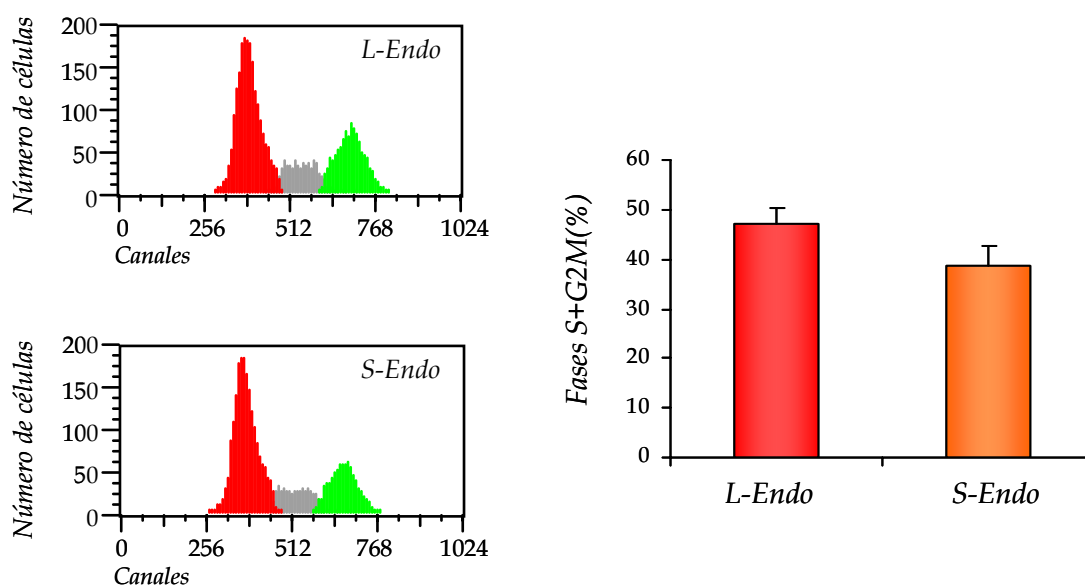


Figura 53. Efecto de la expresión de L-y S-endoqlina sobre el ciclo celular. Izquierda: histogramas resultantes de la adquisición de las células en el citómetro. ■ : células en fase G0/G1. ■ : células en fase S. ■ : células en fase G2/M. **Derecha:** Representación gráfica de los datos obtenidos en el análisis por citometría de flujo.

El análisis de la expresión de ciclinas nos mostró que los mioblastos transfectados con la S-endoqlina tienen una menor expresión de ciclina D1 que los mioblastos Mock y que los L-endoqlina. En los tres tipos de mioblastos el tratamiento con TGF β 1 disminuye la expresión de esta proteína, siendo la disminución menor en los transfectados con L-endoqlina y llegando prácticamente a desaparecer en los S-endoqlina (Figura 54). En el caso de ciclina E no se observan diferencias entre los tres tipos celulares y el TGF- β 1 no parece afectar la expresión de esta ciclina ni a las 24 horas del tratamiento ni a las 48 horas (datos no mostrados). El estudio de la expresión de PCNA por *Western blot* nos mostró que en condiciones basales no se aprecian diferencias entre los mioblastos. El tratamiento con TGF β 1 durante 24 horas produce una disminución de la expresión de PCNA en los mioblastos S-endoqlina que no ocurre en los transfectados con la isoforma larga, aunque a las 48 horas de tratamiento sí podemos apreciar una disminución de PCNA también en los mioblastos L-Endo (Figura 54).

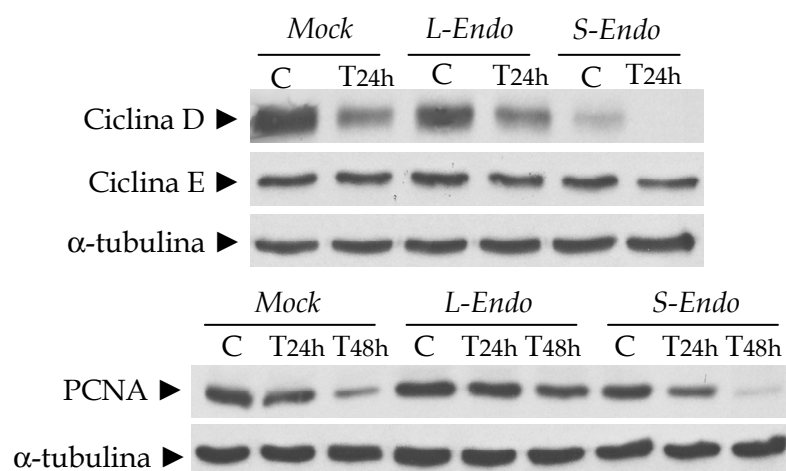


Figura 54. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la expresión de ciclinas y PCNA. Análisis por *Western blot* de ciclinas y PCNA, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGF β 1 durante 24 horas (T24h) y 48 horas (T48h). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina.

Estos datos, junto con los obtenidos tras el análisis de los ensayos de proliferación y ciclo celular, confirman que los mioblastos S-endoglina presentan una menor proliferación que aquellos mioblastos transfectados con la isoforma larga de endoglina.

Se conoce, desde hace mucho tiempo, que el TGF β es un potente inhibidor de la proliferación celular (Lopez-Casillas *et al.*, 1993; Massague *et al.*, 2000). La expresión de endoglina disminuye o elimina este efecto del TGF β en varios tipos celulares (Letamendia *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000). Es más, el estudio con células endoteliales embrionarias procedentes de ratones *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}* indican que la endoglina promueve la proliferación celular vía ALK1 (Lebrin *et al.*, 2004). Nuestros resultados demuestran que ambas isoformas participan en la regulación de la proliferación celular, ya que, mientras que L-endoglina promueve la proliferación, S-endoglina la disminuye. Estos datos coinciden con unos resultados recientemente publicados en células endoteliales de pulmón procedentes de ratones que

sobreexpresan S-endoglina (*S-eng*⁺) y sus controles (*S-eng*⁻); en los que se observa que las células de los ratones *S-eng*⁺ presentan una menor proliferación que las células *S-eng*⁻ (Blanco *et al.*, 2008). En este mismo trabajo se demuestra como células endoteliales senescentes, que tienen una proliferación disminuida, presentan una mayor expresión de la isoforma corta de endoglina.

Como ya hemos mencionado, varios estudios demuestran como la endoglina disminuye el efecto antiproliferativo del TGFβ1 (Letamendia *et al.*, 1998) y nuestros resultados parecen indicar que, en parte, esto es así; ya que observamos que la disminución en la expresión de las ciclinas estudiadas y de PCNA tras el tratamiento con TGFβ1, es menor en los mioblastos L-endoglina y es mayor en los mioblastos S-endoglina que en los mioblastos Mock. No obstante, los estudios de MTT muestran como después de tres días de tratamiento con TGFβ1 se produce un descenso en el número de células viables que es proporcional en los tres tipos celulares.

Se ha observado que Smad7, mediante un mecanismo independiente de TGFβ1, induce apoptosis en diversos tipos celulares y que dicho mecanismo podría ser a través de la vía de JNK o de la vía de p38 (Mazars *et al.*, 2001; Edlund *et al.*, 2003). Los mioblastos S-endoglina presentan una mayor expresión de Smad7 que no se corresponde con una disminución en la respuesta clásica del TGFβ1 en estas células. Esto podría estar relacionado, como ya comentamos anteriormente, con un mecanismo independiente de la vía de señalización del TGFβ1. Esta hipótesis podría venir apoyada por otro estudio en el que demuestran que la sobreexpresión de Smad7 induce la parada de células mesenquimales de ratón en la fase G1 del ciclo celular, lo que produce además una disminución en la expresión de ciclinas propias de esta fase, como ciclina D1 (Kitamura *et al.*, 2005). Nuestros resultados encajan con esto, puesto que los mioblastos S-endoglina, que son los que expresan más Smad7, poseen una menor expresión de ciclina D1 y a su vez una menor proliferación.

Se sabe que el TGFβ1 inhibe la proliferación por la regulación de diversos genes, entre ellos c-Myc y los inhibidores de CDK, p15 y p21 (Matsuura *et al.*, 2004). Además, Smad3 junto con Smad2 y Smad4 activa la expresión de p15 inhibiendo proliferación (Feng *et al.*, 2000), y en células de carcinoma gástrico Smad3 induce la expresión y activación de Fas lo que lleva a la activación de rutas de apoptosis (Kim *et al.*, 2004). Los mioblastos S-endoglina presentan una menor proliferación que

podría ser consecuencia de la mayor expresión de Smad3. Además, este aumento de expresión en Smad3 podría estar dando lugar a mayor apoptosis por lo explicado anteriormente. Consideramos que sería importante estudiar el efecto de las isoformas de endoglina en la apoptosis.

En resumen, nuestros resultados indican que la L-endoglina promueve la proliferación celular mientras que la S-endoglina la disminuye por diversos procesos que implican a la ruta del TGF β , pero que también podrían implicar a otras rutas de señalización celular.

3.3. Moléculas de inflamación

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es una enzima capaz de producir prostaglandinas y prostaciclina vasodilatadora. Se ha demostrado que en células deficientes en la endoglina, la expresión de COX-2 aumenta, posiblemente debido a un mecanismo de compensación que permita la producción de factores vasodilatadores que compensen la falta de NO presente en estas células (Jerkic *et al.*, 2006a). Así, decidimos estudiar los niveles de COX-2 en los mioblastos.

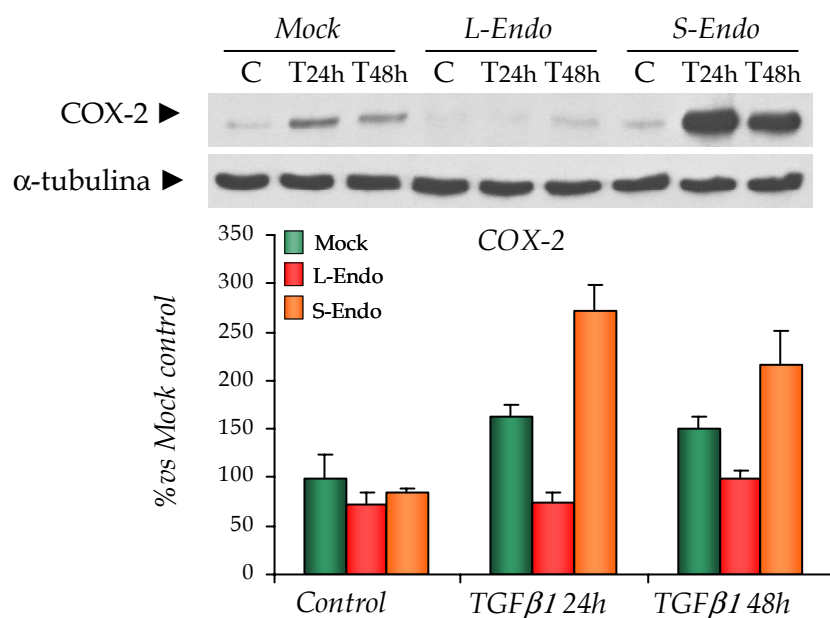


Figura 55. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la expresión de COX2. Análisis por *Western blot* de COX-2, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGF β 1 durante 24 y 48 horas (T24h, T48h respectivamente). Las imágenes son representativas de seis experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos Mock.

La expresión de COX-2 es menor en los mioblastos L-endoglina que en los mioblastos Mock. Cuando tratamos a los mioblastos con TGF β 1 se produce un aumento en la expresión de COX-2 que es significativamente mayor en los mioblastos S-endoglina (Figura 56).

Estudiamos, mediante PCR a tiempo real, si también había diferencias en la expresión del ARNm de COX-2. Como ocurría con la expresión proteica de COX-2, los mioblastos transfectados con la S-endoglina presentan una mayor expresión de mensajero cuando las células son tratadas con TGF β 1 (Figura 56).

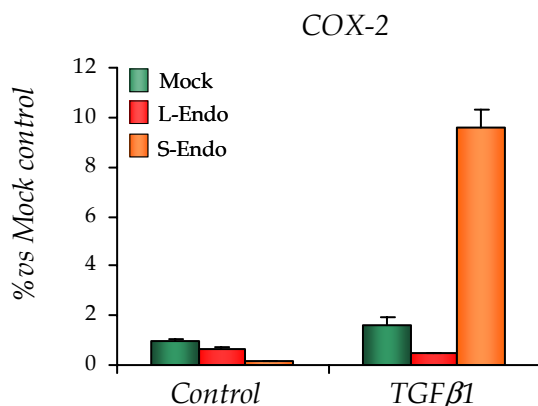


Figura 56. Efecto de las isoformas de endoglina sobre la expresión del ARNm de COX-2. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de COX-2. La gráfica muestra en unidades relativas los niveles de ARNm de COX-2 normalizados frente a los niveles de expresión de tubulina, de un experimento representativo.

Asimismo, quisimos profundizar en estos estudios realizando ensayos de promotor. Transfectamos los mioblastos con un reportero que contiene el promotor de COX-2 murino. El tratamiento con TGF β 1 durante 24 horas aumentó la actividad del promotor de COX-2 de manera significativa en los mioblastos S-Endo comparado con los L-Endo y con los Mock. (Figura 57). Esto nos indica que el aumento de COX-2 inducido por TGF β 1 ocurre, al menos en parte, a nivel transcripcional.

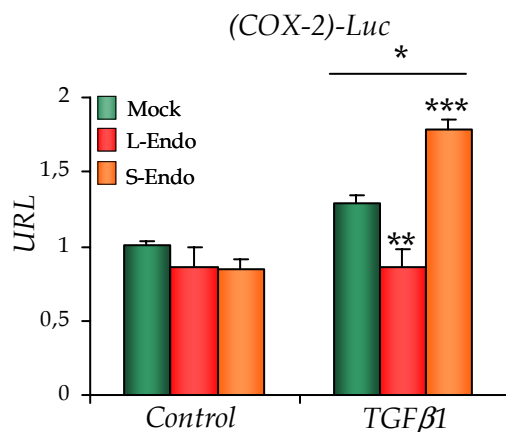


Figura 57. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la actividad del promotor de COX-2. Las células se transfectaron transitoriamente y se trataron o no con TGF β 1 durante 24 horas. Los datos de tres experimentos, realizando ensayos por triplicado, se expresan como la media +EEM. *p<0,05 respecto a los no tratados; **p<0,05 respecto mioblastos Mock y S-Endo; ***p<0,05 respecto mioblastos Mock y L-Endo. URL: unidades relativas de luz.

Además, estudiamos si las diferencias en COX-2 se traducían en diferencias en la síntesis de prostaglandinas E₂ (PGE₂), su producto enzimático más característico (Brock *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000), que nos indicaría la correcta actividad enzimática de la proteína sintetizada.

La cantidad de PGE₂ liberada al medio aumentó tras el tratamiento con TGFβ1, especialmente después de 48 horas. Este aumento se corresponde con el aumento de expresión de COX-2, tras el tratamiento con TGFβ1, observado en los mioblastos. Esta liberación es mayor a las 48 horas del tratamiento en los tres tipos de mioblastos. Los mioblastos S-Endo presentan una mayor liberación de prostaglandinas que los mioblastos L-Endo (Figura 58).

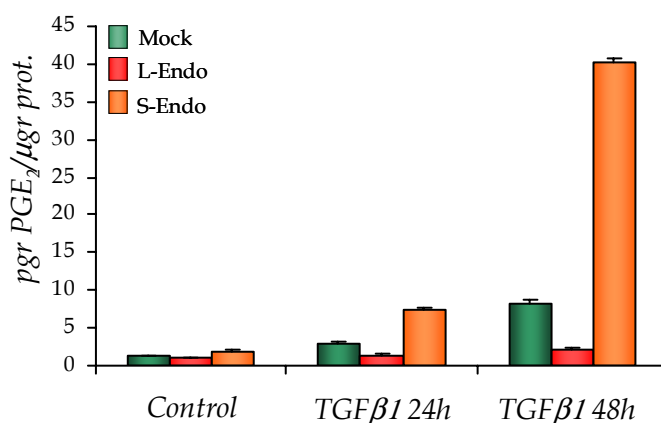


Figura 58. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la síntesis de PGE₂. Las células se mantuvieron en ausencia de suero durante 24 horas y a continuación se trataron con TGFβ1 en los tiempos indicados. La cantidad de PGE₂ presente en el medio de cultivo se evaluó mediante ELISA, y dichos valores se corrigieron según la cantidad de proteína presente en cada placa. Se muestra un experimento de tres, utilizando ensayos por duplicado

Existen varios trabajos que muestran una relación entre la expresión de endoglina y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en células endoteliales (Jerkic *et al.*, 2004; Toporsian *et al.*, 2005) y también en mioblastos (Santibanez *et al.*, 2007). De todos ellos se concluye que la endoglina estabiliza eNOS e induce la producción de óxido nítrico (NO). Todos estos trabajos se refieren a la endoglina de manera genérica y no diferencian entre las dos isoformas. Por lo tanto, estudiamos si las isoformas de endoglina influyen de manera diferencial en la producción de óxido nítrico y para ello estudiamos la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Al contrario que eNOS, que es constitutiva y produce NO en pocos minutos, iNOS se induce después de estimular a las células con determinadas citoquinas, por ejemplo TGF β 1 (Forstermann *et al.*, 1995).

La expresión basal de iNOS está disminuida en los mioblastos transfectados con S-endoglina. El tratamiento con TGF β 1 produce un aumento en la síntesis de esta proteína en los mioblastos Mock y en los L-Endo, lo que no ocurre en los mioblastos S-Endo. El aumento de iNOS que se produce a las 24 horas en los mioblastos L-Endo se mantiene también a las 48 horas (Figura 55).

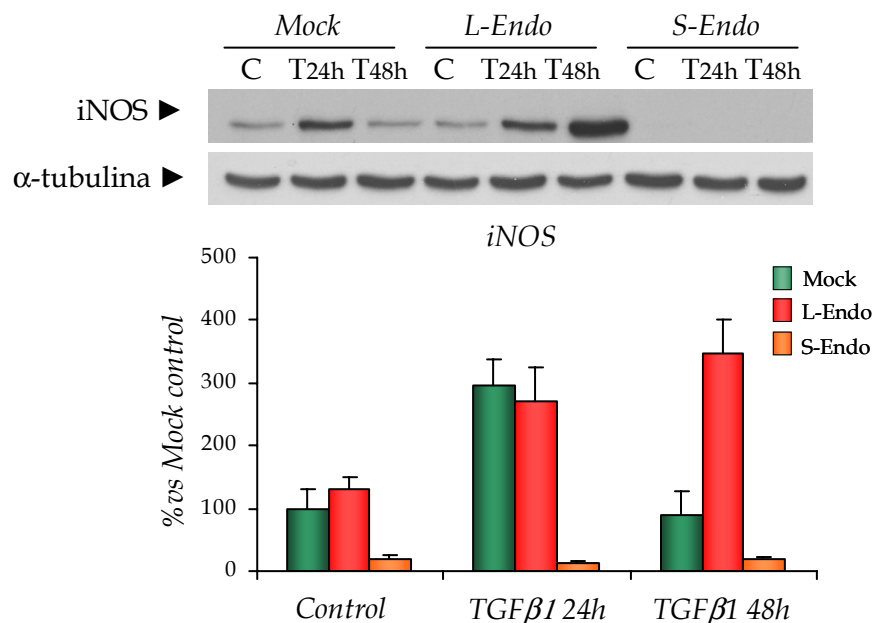


Figura 59. Efecto de la expresión de L-y S-endoglina sobre la expresión de iNOS. Análisis por *Western blot* de iNOS, de mioblastos no tratados (C) y tratados con TGF β 1 durante 24 y 48 horas (T24h, T48h respectivamente). Las imágenes son representativas de seis experimentos. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al basal de los mioblastos Mock.

El NO realiza múltiples funciones dependiendo del órgano y de la célula donde se sintetiza, así como de la célula diana sobre la que actúa. Se han publicado varios trabajos que prueban la existencia de alteraciones en la fisiología vascular de ratones deficientes en endoglina. Además, las células que sobreexpresan endoglina tienen una mayor expresión de eNOS (Jerkic *et al.*, 2004; Toporsian *et al.*, 2005; Jerkic *et al.*, 2006b). Sin embargo, poco se sabe del efecto de la isoforma corta en la síntesis de NO. Estudios recientes muestran como ratones que sobreexpresan S-endoglina tienen una menor expresión de eNOS (Blanco *et al.*, 2008). La isoenzima inducible

(iNOS) se expresa en una gran variedad de tipos celulares bajo condiciones normales y patológicas. En células no inducidas su expresión es normalmente muy baja (ver revisión (Kleinert *et al.*, 2004). Se han encontrado en el promotor de iNOS sitios de unión para diversos factores de transcripción como AP-1, CREB, NF- κ B entre otros. Además algunos estímulos, dependiendo del tipo celular, inducen o inhiben la expresión de esta enzima. Así, TGF β inhibe la inducción de iNOS en células de músculo liso vascular (Perrella *et al.*, 1994) mientras que la estimula en fibroblastos 3T3 o en células epiteliales de retina (Gilbert y Herschman, 1993; Goureau *et al.*, 1993). Existen diversos estudios donde se muestra la relación de la expresión de iNOS con diversas vías de quinasas como MAPK y Akt/PKB (Chen *et al.*, 2001; Lahti *et al.*, 2002; Guix *et al.*, 2005). En los mioblastos, en condiciones basales no existen diferencias en la expresión de iNOS entre los Mock y los L-endoglina algo que coincide con los resultados de Jerkic y colaboradores (Jerkic *et al.*, 2004), mientras que los S-endoglina tienen una expresión muy reducida de esta enzima. En estas mismas células el TGF β 1 induce la expresión de iNOS en mioblastos Mock y L-endoglina, pero esto no ocurre en los S-endoglina. El tratamiento con TGF β 1 mantiene el aumento de iNOS hasta al menos las 48 horas en los mioblastos L-endoglina, aunque en los Mock cae hasta niveles basales. Con los datos que tenemos en esta tesis es difícil encontrar una explicación de por qué los niveles de iNOS están tan reducidos en los S-endoglina. Quizá puedan existir mecanismos postranscripcionales o quizá esté implicada alguna vía de MAPK; en cualquier caso, harían falta otros experimentos que nos dieran una posible explicación de este resultado. Lo que parece claro es que la endoglina está implicada en el metabolismo del NO, que L-endoglina favorece la síntesis de NO por diversos mecanismos que aumentan la expresión de eNOS mientras que S-endoglina hace todo lo contrario, ya que disminuye la expresión de eNOS e iNOS.

Se han descrito mecanismos moleculares de interacción entre las vías de NOS y COX en varios tipos celulares (Vassalle *et al.*, 2003) y aunque dichas interacciones están bien documentadas existen datos contradictorios. Nuestro laboratorio ha demostrado que células endoteliales deficientes en endoglina, que tienen una menor expresión de eNOS, y por tanto una menor síntesis de NO, la expresión de COX-2 aumenta, posiblemente debido a un mecanismo compensatorio. En los mioblastos S-endoglina se produce un aumento en la expresión de COX-2 y en la liberación de

PGE₂. Recientemente hemos observado que en pulmón y riñón de ratones que sobreexpresan S-endoglina también existe una mayor expresión de COX-2 (Blanco *et al.*, 2008). Los mioblastos S-endoglina no muestran activación de iNOS y con toda probabilidad una menor expresión de eNOS. Tal como otros autores han propuesto (Jerkic *et al.*, 2006a), podrían existir mecanismos de compensación en los mioblastos que conduzcan a un aumento de los niveles de COX-2 con el fin de producir factores vasodilatadores que suplan la falta de NO. En cualquier caso, este punto en particular requiere más estudios para se completamente clarificado.

4. Resumen de los efectos de las isoformas de endogлина.

A continuación, se muestran unas tablas-resumen de los efectos de las isoformas de endogлина sobre los parámetros estudiados en los mioblastos L₆E₉.

4.1. Sobre la ruta de señalización del TGFβ1

		L-endogлина vs. Mock	S-endogлина vs. Mock
Expresión de receptores		=	=
Expresión y activación de Smads			
Smad1	Activación	=	=
	Expresión ARNm/proteína	↑/=	=/=
Smad2	Activación	=	=
	Expresión ARNm/proteína	=	↓/=
Smad3	Activación	=	↑/=
	Expresión ARNm/proteína	↓/=	=/↓
Smad4		=	↑
Smad7		↓	↑
Elementos de respuesta al TGFβ1			
(BRE)2-Luc		↑	=
(ARE)-Luc		=	=
(CAGA)12-Luc		↓	↑

	L-endoglina vs. Mock	S-endoglina vs. Mock
Expresión de proteínas en respuesta al TGFβ1		
Id1	↑	↑
PAI-1	↓	↑

4.2. Sobre diferentes propiedades biológicas

	L-endoglina vs. Mock	S-endoglina vs. Mock
Matriz extracelular	↓	↑
Proliferación	↑	↓
Moléculas de inflamación		
COX-2	↓	↑
iNOS	↑	↓

*"Hermoso es lo que vemos.
Más hermoso es lo que sabemos.
Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos"*
- Niels Steensen -

Discusión general

La mayoría de los estudios sobre endoglina se han centrado en el estudio de sus efectos sobre la angiogénesis, el remodelado vascular y en sus efectos sobre las respuestas inducidas por TGF β 1. En todos estos trabajos se ha investigado el efecto que produce la isoforma larga de esta proteína. En este trabajo hemos descrito por primera vez el efecto de las dos isoformas de endoglina (S y L) en la ruta de señalización del TGF β 1 y en diversas propiedades biológicas como son la proliferación, la acumulación de matriz extracelular y la síntesis de moléculas relacionadas con los procesos inflamatorios. La isoforma larga parece ser la isoforma predominante en la mayoría de tejidos y líneas celulares, se han observado cantidades significativas de S-endoglina co-expresada con L-endoglina en varios tejidos, como hígado y pulmón, y también en cultivos primarios de células endoteliales (Bellon *et al.*, 1993; Perez-Gomez *et al.*, 2005). Recientemente se ha descrito la existencia de esta isoforma también en ratón (Perez-Gomez *et al.*, 2005), pero el papel de S-endoglina en la señalización del TGF β 1 apenas ha sido estudiada. Sin embargo, las herramientas que tenemos en la actualidad para detectar endoglina en los tejidos y cultivos primarios no distinguen entre las dos isoformas y por tanto los efectos debidos a una u otra. El modelo que hemos utilizado, la línea celular de mioblastos de rata L₆E₉, es un buen modelo para llevar a cabo este estudio ya que responde a TGF β 1 y no expresa endoglina (Letamendia *et al.*, 1998b; Guo *et al.*, 2004; Obreo *et al.*, 2004; Scherner *et al.*, 2007).

En la mayoría de las células, el TGF β 1 ejerce sus funciones a través del receptor tipo I ALK5 que lleva a la fosforilación de Smad2 y Smad3. En células endoteliales, TGF β 1 también puede señalizar a través del receptor I ALK1 produciéndose la activación de Smad1/5 (Goumans *et al.*, 2002; Goumans *et al.*, 2003b; Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). Recientemente, se han descrito ambos receptores en otros tipos celulares y cada vez surgen más trabajos que muestran que ambas rutas y receptores del TGF β 1 no son exclusivos de células endoteliales (Konig *et al.*, 2005; Wiercinska *et al.*, 2006; Scherner *et al.*, 2007). En ese trabajo nosotros demostramos que los mioblastos L₆E₉ expresan los dos receptores tipo I del TGF β , ALK1 y ALK5, y ambas rutas son funcionales puesto que el tratamiento con TGF β 1 activa Smad1 y Smad2/3. Nuestros resultados coinciden por tanto con los estudios de Scherner y colaboradores, también realizados en esta misma línea celular

(Schnerer *et al.*, 2007). Además, encontramos un aumento en la expresión de Id1 y PAI-1 inducida por TGF β 1.

Una característica en la ruta de señalización de ALK1 parece ser su dependencia de ALK5 (Goumans *et al.*, 2003b). Nosotros hemos demostrado que en mioblastos L₆E₉ ocurre algo parecido, ya que el tratamiento con un inhibidor específico de ALK5 (Inman *et al.*, 2002a), SB431542, bloquea la fosforilación de Smad1/5 y de Smad2/3. Estos resultados coinciden con los observados por Schnerer y colaboradores (Schnerer *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos sobre la endogлина se han centrado en la isoforma predominante, la L-endogлина, aunque se han encontrado niveles significativos de la isoforma S-endogлина que se coexpresa con la isoforma larga en varios tejidos (Bellon *et al.*, 1993; Perez-Gomez *et al.*, 2005). Ambas isoformas se generan por *splicing* alternativo. En el caso de la S-endogлина, un intrón entre los exones 12 y 13 no es eliminado, dando lugar a un codón de parada. Las dos isoformas de endogлина únicamente varían en su dominio citoplasmático, ya que la L-endogлина en humanos tiene 47 aminoácidos en su cola citoplasmática, mientras que la S-endogлина tan sólo tiene 14 aminoácidos. Esta diferencia estructural explica la falta de herramientas apropiadas para distinguir claramente entre ambas isoformas en tejidos y cultivos celulares. Así el empleo de células transfectadas con los ADNc de las dos isoformas representa en la actualidad un excelente modelo para estudiar el efecto de las isoformas de endogлина, no sólo en la ruta de señalización del TGF β 1 sino también sobre otras respuestas celulares.

Diversos estudios proponen que la endogлина tiene un papel modulador en la ruta de señalización del TGF β 1 favoreciendo la vía de ALK1 (Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). Nuestros resultados confirman el papel modulador de la endogлина en la ruta del TGF β 1 en mioblastos L₆E₉; es más, hemos comprobado como las células transfectadas con S-endogлина tienen un comportamiento distinto frente a los L-endogлина en relación a las respuestas del TGF β 1. Así, la expresión de S-endogлина incrementa la señalización a través de ALK5 vía Smad3, mientras que la L-endogлина inhibe esta misma vía y parece promover la vía de ALK1. Nuestros resultados coinciden con otros estudios donde se demuestra que la L-endogлина

promueve la proliferación a través de la vía de ALK1, mientras que interfiere con la de ALK5 (Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005), y parecen sugerir que la S-endogлина actúa como un antagonista de la isoforma larga. De hecho la S-endogлина parece tener un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular en los mioblastos L₆E₉, algo que coincide con los resultados que hemos obtenido recientemente en células endoteliales (Blanco *et al.*, 2008). Se ha descrito un papel anti-angiogénico de la S-endogлина frente a un papel pro-angiogénico de la L-endogлина (Perez-Gomez *et al.*, 2005). Este trabajo plantea la posibilidad de que la S-endogлина podría interferir en la formación de los homodímeros L-L, compitiendo en la interacción y secuestrando moléculas de L-endogлина para formar heterodímeros L-S, cambiando la señalización de ALK1 (angiogénica) por ALK5 (endotelio quiescente). Por lo tanto el ratio S-endogлина/L-endogлина parece contribuir en la modulación de la vía del TGFβ1 en células endoteliales contribuyendo a la fisiopatología vascular (ten Dijke y Arthur, 2007).

En este sentido, el incremento de la síntesis de matriz extracelular es un proceso patológico relacionado con la activación de la vía ALK5/Smad3 (Leask *et al.*, 2004; Gauldie *et al.*, 2007). Así, en los mioblastos, mientras que la S-endogлина incrementa la síntesis de matriz extracelular, la L-endogлина la inhibe; algo que coincide con el gran número de estudios en los cuales se describe el papel de la L-endogлина como un antagonista de la inducción de la síntesis de matriz extracelular (Letamendia *et al.*, 1998b; Diez-Marques *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2004; Obreo *et al.*, 2004). Por tanto la S-endogлина podría ser una molécula profibrótica frente a la isoforma larga que sería antifibrótica.

Dado que ambas isoformas parecen tener en muchos casos efectos opuestos sería interesante estudiar el mecanismo molecular por el cual esto ocurre. Ya hemos comentado que la formación de heterodímeros entre S-endogлина y L-endogлина podría variar las respuestas de la célula; y, dado que sus dominios extracelulares son idénticos la clave tiene que estar en la región citoplasmática. Recientemente se ha descrito que tanto ALK1 como ALK5 fosforilan a L-endogлина en residuos de serina y treonina de su dominio citoplasmático (Koleva *et al.*, 2006). La fosforilación de las treoninas de L-endogлина es esencial para el crecimiento de las células endoteliales (Koleva *et al.*, 2006); sin embargo la S-endogлина carece de estas treoninas. Además, mientras que ALK5 parece interactuar con L-endogлина y S-

endoglina con la misma afinidad, la interacción entre ALK1 y el tallo citoplasmático de la S-endoglina es mucho menor que la de ALK1 con el de la L-endoglina (Blanco *et al.*, 2008).

La síntesis de NO en células endoteliales está también regulada por el TGF β (Saura *et al.*, 2002) al igual que la expresión de COX-2 (Harding *et al.*, 2006). L-endoglina y S-endoglina parecen producir efectos opuestos en dichas vías. Hasta el momento se ha observado que células con una menor expresión de L-endoglina tienen una menor expresión de eNOS, pero una mayor expresión de COX-2 sugiriéndose así un mecanismo de compensación por el cual, en las células con una menor producción de NO, habría un aumento de los niveles de COX-2 con el fin de producir otros factores vasodilatadores que suplan la falta de NO (Jerkic *et al.*, 2006a). Nosotros hemos demostrado por primera vez que la presencia de S-endoglina afecta a la expresión de iNOS, inhibiendo la síntesis de esta enzima cuando se trata las células con TGF β 1, algo que si ocurre con L-endoglina. Además la S-endoglina promueve una mayor expresión de COX-2 y una mayor producción de PGE₂. Con estos resultados y apoyándonos en los anteriores coincidimos con Pérez y colaboradores (Perez-Gomez *et al.*, 2005) en señalar que la S-endoglina podría actuar como un dominante negativo de la L-endoglina.

No hay que olvidar que los efectos de las isoformas de endoglina podrían ser independientes del TGF β 1. Así, los mioblastos S-endoglina presentan una menor expresión de Smad4 y una mayor expresión de Smad7 que los mioblastos L-endoglina y, sin embargo, esto no parece tener un efecto directo sobre las otras Smads o los genes de respuesta al TGF β 1. Pudiera ser que estas diferencias estén más relacionadas con otros miembros de la superfamilia del TGF β 1 puesto que comparten estos mismos mediadores, o bien que, estén relacionadas con otras rutas, también activadas por TGF β 1, y con las cuales se han demostrado interacciones a distintos niveles, como las vías de MAPK. Es más, una parte del efecto en la proliferación celular de la endoglina parece ser independiente del TGF β 1. También en la síntesis de matriz extracelular parecen estar colaborando otras vías, ya que al inhibir la ruta del TGF β 1 a través de los receptores tipo I, seguimos observando síntesis de colágeno I y CTGF. Estudios previos han demostrado la dependencia de

la MAPK p38 en la síntesis de colágeno I inducida por TGFβ1 en mioblastos L₆E₉ (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2002). También, hemos demostrado que el TGFβ1 induce la expresión de COX-2 y la síntesis de PGE2 a través de las vías de MAPK y PI3K en células mesangiales humanas (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2006a). Por todo ello se necesitan más estudios que ahonden no sólo en el papel de las isoformas de endogлина en la vía de señalización clásica del TGFβ1, sino en otras vías tan importantes como las rutas de MAPK, PI3K, etc; además de estudiar los mecanismos que controlan el *splicing* alternativo de endogлина .

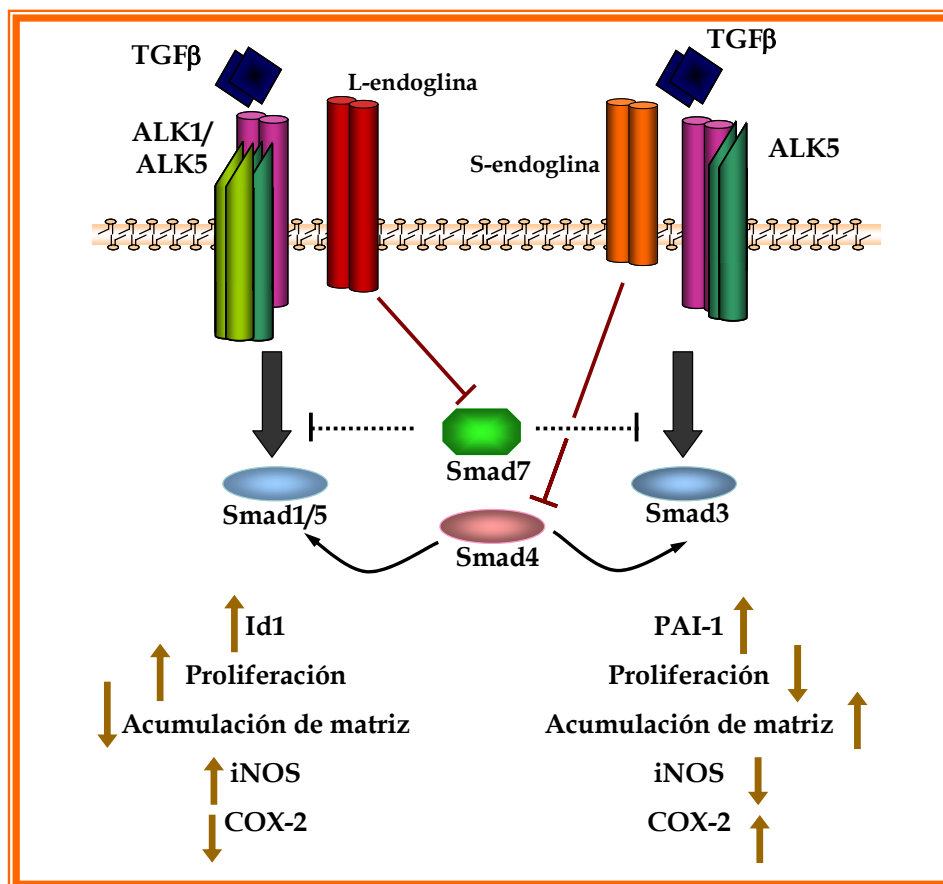


Figura 60. Modelo hipotético del papel de las isoformas de endogлина en la ruta de señalización del TGFβ1.

Con el fin de englobar los datos obtenidos en este trabajo, proponemos el siguiente modelo (Figura 60):

Se ha descrito que la endogлина modula la ruta de señalización del TGFβ1 en células endoteliales y en diversos tipos celulares. La presencia de S-endogлина promovería la ruta a través de ALK5, que produce un aumento en la expresión de

Smad3 y con ello un incremento en la expresión de PA1-1. La S-endoglina estaría promoviendo una mayor síntesis de matriz extracelular y una menor proliferación. Sin embargo, cuando está presente L-endoglina se produce una inhibición de la ruta de ALK5, probablemente a nivel de las Smads (Goumans *et al.*, 2003b), y una inducción de la síntesis de Id1, llevando todo ello a una menor síntesis de matriz extracelular y a una mayor proliferación. Además, la presencia de S-endoglina produce una menor expresión de iNOS y una mayor expresión de COX-2 y síntesis de PGE₂ en respuesta al TGFβ1 mientras que con L-endoglina ocurre lo contrario. Así, podríamos decir que la S-endoglina es una molécula pro-fibrótica y anti-angiogénica, mientras que la L-endoglina sería anti-fibrótica y pro-angiogénica. Por otro lado, el balance entre ambas isoformas podría ser muy importante para procesos cardiovasculares como la hipertensión, puesto que ambas isoformas parecen modular de manera distinta la síntesis de NO y la vía de COX.

"Cerca del final, donde todo empieza"
- Adolfo Cabrales -

Conclusiones

Basándonos en los resultados expuestos en este trabajo, hemos obtenido las siguientes conclusiones

1. Los receptores tipo I, ALK1 y ALK5, se expresan en mioblastos de rata L₆E₉. El TGFβ1 es capaz de activar las R-Smads, Smad1 y Smad2/3, y producir un aumento de expresión de genes característicos de ambas vías por lo que ambas rutas del TGFβ están presentes y son funcionales en los mioblastos.
2. Las isoformas de endogлина regulan de manera diferencial la señalización de TGFβ1. La isoforma corta de endogлина potencia la vía de señalización del TGFβ1 a través de ALK5. La presencia de L-endogлина promueve la vía de señalización del TGFβ1 a través de ALK1 e inhibe la señalización a través de ALK5.
3. La S-endogлина modula la expresión de Smad4 y Smad7, produciendo una disminución en la expresión de Smad4 y un aumento en la expresión de Smad7.
4. las isoformas de endogлина regulan de forma diferente diversas propiedades biológicas de los mioblastos L₆E₉. La expresión de la S-endogлина promueve la acumulación de matriz extracelular e inhibe la proliferación celular, mientras que la L-endogлина inhibe la acumulación de MEC y aumenta la proliferación celular.
5. La expresión de la S-endogлина aumenta la síntesis de COX-2 y de PGE₂ en los mioblastos L₆E₉ e inhibe la expresión de iNOS, mientras que la L-endogлина produce el efecto contrario.

*"Cree a aquellos que buscan la verdad.
Duda de los que la encuentran"*
- André Gide -

Bibliografía

- Abdalla SA, Geisthoff UW, Bonneau D, Plauchu H, McDonald J, Kennedy S, Faughnan ME and Letarte M. (2003). Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* **40**: 494-502.
- Abdalla SA and Letarte M. (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* **43**: 97-110.
- Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C and Letarte M. (2000). Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* **9**: 1227-1237.
- Adam PJ, Clesham GJ and Weissberg PL. (1998). Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 33-37.
- Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M and Abe T. (2002). Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* **131**: S109-113.
- Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M and Moses HL. (1995). Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3239-3243.
- Altomonte M, Montagner R, Fonsatti E, Colizzi F, Cattarossi I, Brasoveanu LI, Nicotra MR, Cattelan A, Natali PG and Maio M. (1996). Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer* **74**: 1586-1591.
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA et al. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* **217**: 42-53.
- Attisano L and Wrana JL. (2000). Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 235-243.
- Bai S and Cao X. (2002). A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **277**: 4176-4182.
- Barbara NP, Wrana JL and Letarte M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* **274**: 584-594.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T, Tang W, Miller F and Mao R. (2006). A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A* **140**: 2155-2162.
- Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M and Bernabeu C. (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* **23**: 2340-2345.

- Bertolino P, Deckers M, Lebrin F and ten Dijke P. (2005). Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* **128**: 585S-590S.
- Bierie B and Moses HL. (2006). TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**: 29-40.
- Birukova AA, Birukov KG, Adyshev D, Usatyuk P, Natarajan V, Garcia JG and Verin AD. (2005). Involvement of microtubules and Rho pathway in TGF-beta1-induced lung vascular barrier dysfunction. *J Cell Physiol* **204**: 934-947.
- Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M and Bottinger EP. (2000). A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* **14**: 187-197.
- Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, Lopez-Novoa JM and Bernabeu C. (2008). S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology. *Circ Res*
- Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP and Bernabeu C. (2005). Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* **204**: 574-584.
- Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE and Kaiser HE. (1998). Upregulation of endoglin (CD105) expression during childhood brain tumor-related angiogenesis. Anti-angiogenic therapy. *Anticancer Res* **18**: 1485-1500.
- Bonni S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K and Wrana JL. (2001). TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol* **3**: 587-595.
- Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A and Bernabeu C. (2001). Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* **276**: 34486-34494.
- Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratziu V, Langa C, Vary CP et al. (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* **100**: 4001-4010.
- Bourdeau A, Dumont DJ and Letarte M. (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **104**: 1343-1351.
- Bourdeau A, Faughnan ME and Letarte M. (2000). Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 279-285.
- Branton MH and Kopp JB. (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* **1**: 1349-1365.
- Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, Johnston JM, Mann JL and McAsey ME. (2000). Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol* **96**: 224-228.

- Brock TG, McNish RW and Peters-Golden M. (1999). Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem* **274**: 11660-11666.
- Buhring HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmuller A, van Agthoven AJ and Busch FW. (1991). Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* **5**: 841-847.
- Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES and Thorpe PE. (1995). Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* **1**: 1623-1634.
- Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L, Altomonte M, Musolino C and Maio M. (2003). Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* **194**: 171-175.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C and Vary CP. (2004). Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem* **279**: 27440-27449.
- Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C and Vary CP. (2000). Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **153**: 323-335.
- Craft CS, Romero D, Vary CP and Bergan RC. (2007). Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway. *Oncogene* **26**: 7240-7250.
- Cruz-Gonzalez I, Pabon P, Rodriguez-Barbero A, Martin-Moreiras J, Pericacho M, Sanchez PL, Ramirez V, Sanchez-Ledesma M, Martin-Herrero F, Jimenez-Candil J et al. (2008). Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med* **12**: 955-961.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J and Letarte M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**: 19027-19030.
- Chen H, Li D, Saldeen T and Mehta JL. (2001). TGF-beta(1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H1035-1039.
- Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ and Leask A. (2002). CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* **62**: 1149-1159.
- Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Chen CM and Huang CC. (2006). High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. *J Surg Oncol* **94**: 413-417.
- Datto MB, Yu Y and Wang XF. (1995). Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* **270**: 28623-28628.

- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ and Bailly S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**: 1953-1961.
- Denmler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S and Gauthier JM. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* **17**: 3091-3100.
- Derynck R and Feng XH. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* **1333**: F105-150.
- Derynck R and Zhang YE. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577-584.
- Dharmapatni AA, Smith MD, Ahern MJ, Simpson A, Li C, Kumar S and Roberts-Thomson PJ. (2001). The TGF beta receptor endoglin in systemic sclerosis. *Asian Pac J Allergy Immunol* **19**: 275-282.
- Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Langa C, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM, Lamas S and Bernabeu C. (2002). Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1587**: 36-44.
- Duan X, Liang YY, Feng XH and Lin X. (2006). Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* **281**: 36526-36532.
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE and Leduc R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270**: 10618-10624.
- Duff SE, Li C, Garland JM and Kumar S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* **17**: 984-992.
- Duwel A, Eleno N, Jerkic M, Arevalo M, Bolanos JP, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM. (2007). Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumour Biol* **28**: 1-8.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T and Miyazono K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* **276**: 12477-12480.
- Edlund S, Bu S, Schuster N, Aspenstrom P, Heuchel R, Heldin NE, ten Dijke P, Heldin CH and Landstrom M. (2003). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Biol Cell* **14**: 529-544.
- Engel ME, McDonnell MA, Law BK and Moses HL. (1999). Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* **274**: 37413-37420.

- Engvall E, Jonsson K and Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* **251**: 427-434.
- Erdem O, Taskiran C, Onan MA, Erdem M, Guner H and Ataoglu O. (2006). CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* **103**: 1007-1011.
- Feng XH, Lin X and Derynck R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* **19**: 5178-5193.
- Fernandez-L A, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, Pericacho M, Rodriguez-Barbero A, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Duwell A, Vega MA, Bernabeu C et al. (2007). Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mol Genet* **16**: 1515-1533.
- Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabeu C and Botella LM. (2006a). Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* **4**: 66-78.
- Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabeu C and Botella LM. (2005). Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* **68**: 235-248.
- Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Morales C, Restrepo CM, Ramirez JR, Coto E, Lenato GM, Bernabeu C et al. (2006b). Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* **27**: 295.
- Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M and Bernabeu C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* **64**: 204-207.
- Finnson KW, Parker WL, ten Dijke P, Thorikay M and Philip A. (2008). ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* **23**: 896-906.
- Flanders KC. (2004). Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* **85**: 47-64.
- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG and Maio M. (2003). Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene* **22**: 6557-6563.
- Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG and Maio M. (2001). Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* **188**: 1-7.

- Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, Natali PG, Altomonte M and Maio M. (2000). Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res* **6**: 2037-2043.
- Fontalba A, Fernandez LA, Garcia-Alegria E, Albinana V, Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Bernabeu-Herrero ME, Ojeda ML et al. (2008). Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *BMC Med Genet* **9**: 75.
- Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI and Kleinert H. (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* **50**: 1321-1332.
- Fujimoto M, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Komura K, Matsushita T, Yanaba K, Kodera M, Takehara K and Sato S. (2006). A clue for telangiectasis in systemic sclerosis: elevated serum soluble endoglin levels in patients with the limited cutaneous form of the disease. *Dermatology* **213**: 88-92.
- Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, Mitchell G, Drouin E, Westermann CJ and Marchuk DA. (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* **363**: 852-859.
- Garrington TP and Johnson GL. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 211-218.
- Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K and Kolb M. (2007). TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* **35**: 661-664.
- Gilbert RS and Herschman HR. (1993). Transforming growth factor beta differentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 380-384.
- Gorelik L and Flavell RA. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* **7**: 1118-1122.
- Gougos A and Letarte M. (1988a). Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**: 1934-1940.
- Gougos A and Letarte M. (1988b). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**: 1925-1933.
- Gougos A and Letarte M. (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* **265**: 8361-8364.
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhning HJ, Bernabeu C, van Mourik JA and Letarte M. (1992). Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol* **4**: 83-92.
- Goumans MJ, Lebrin F and Valdimarsdottir G. (2003a). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* **13**: 301-307.

- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S and ten Dijke P. (2003b). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**: 817-828.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P and ten Dijke P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J* **21**: 1743-1753.
- Goureau O, Lepoivre M, Becquet F and Courtois Y. (1993). Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor beta in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4276-4280.
- Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA, Fabra A, Garcia-Pardo A, Vera S, Letarte M et al. (1999). Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **78**: 614-623.
- Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A and Bernabeu C. (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* **277**: 29197-29209.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M and Munoz FJ. (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* **76**: 126-152.
- Guo B, Slevin M, Li C, Parameshwar S, Liu D, Kumar P, Bernabeu C and Kumar S. (2004). CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res* **24**: 1337-1345.
- Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K and Nishida E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* **274**: 27161-27167.
- Hannon GJ and Beach D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**: 257-261.
- Harding P, Balasubramanian L, Swegan J, Stevens A and Glass WF, 2nd. (2006). Transforming growth factor beta regulates cyclooxygenase-2 in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* **69**: 1578-1585.
- Haruta Y and Seon BK. (1986). Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 7898-7902.
- Heldin CH, Miyazono K and ten Dijke P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**: 465-471.
- Hill CS. (1999). The Smads. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1249-1254.
- Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM and Leask A. (2001). CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* **276**: 10594-10601.

- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U and Nordheim A. (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **274**: 19838-19845.
- Hou CC, Wang W, Huang XR, Fu P, Chen TH, Sheikh-Hamad D and Lan HY. (2005). Ultrasound-microbubble-mediated gene transfer of inducible Smad7 blocks transforming growth factor-beta signaling and fibrosis in rat remnant kidney. *Am J Pathol* **166**: 761-771.
- Iavarone A and Massague J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* **387**: 417-422.
- Ignatz RA, Endo T and Massague J. (1987). Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **262**: 6443-6446.
- Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ and Hill CS. (2002a). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **62**: 65-74.
- Inman GJ, Nicolas FJ and Hill CS. (2002b). Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* **10**: 283-294.
- Itoh S and ten Dijke P. (2007). Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 176-184.
- Izzi L and Attisano L. (2004). Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* **23**: 2071-2078.
- Jakowlew SB, Dillard PJ, Winokur TS, Flanders KC, Sporn MB and Roberts AB. (1991). Expression of transforming growth factor-beta s 1-4 in chicken embryo chondrocytes and myocytes. *Dev Biol* **143**: 135-148.
- Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM. (2004). Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* **18**: 609-611.
- Jerkic M, Rivas-Elena JV, Santibanez JF, Prieto M, Rodriguez-Barbero A, Perez-Barriocanal F, Pericacho M, Arevalo M, Vary CP, Letarte M et al. (2006a). Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res* **99**: 248-256.
- Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, Obreo J, Wang A, Perez-Barriocanal F, Arevalo M et al. (2006b). Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* **69**: 845-854.
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A et al. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* **13**: 189-195.

- Jovine L, Darie CC, Litscher ES and Wassarman PM. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* **74**: 83-114.
- Kassouf W, Ismail HR, Aprikian AG and Chevalier S. (2004). Whole-mount prostate sections reveal differential endoglin expression in stromal, epithelial, and endothelial cells with the development of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **7**: 105-110.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH and Wrana JL. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* **6**: 1365-1375.
- Kim SG, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Kim NK, Hong SH and Bang YJ. (2004). Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol Biol Cell* **15**: 420-434.
- Kitamura K, Aota S, Sakamoto R, Emori T and Okazaki K. (2005). Smad7 induces G0/G1 cell cycle arrest in mesenchymal cells by inhibiting the expression of G1 cyclins. *Dev Growth Differ* **47**: 537-552.
- Kleinert H, Pautz A, Linker K and Schwarz PM. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* **500**: 255-266.
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A and Vary CP. (2006). Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* **281**: 25110-25123.
- Komuro A, Imamura T, Saitoh M, Yoshida Y, Yamori T, Miyazono K and Miyazawa K. (2004). Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* **23**: 6914-6923.
- Konig HG, Kogel D, Rami A and Prehn JH. (2005). TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- κ B signaling. *J Cell Biol* **168**: 1077-1086.
- Korchynskyi O and ten Dijke P. (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* **277**: 4883-4891.
- Kretschmer A, Moepert K, Dames S, Sternberger M, Kaufmann J and Klippel A. (2003). Differential regulation of TGF-beta signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene* **22**: 6748-6763.
- Kretschmar M, Doody J, Timokhina I and Massague J. (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **13**: 804-816.
- Kumar R, Langer JC and Snoeck HW. (2006). Transforming growth factor-beta2 is involved in quantitative genetic variation in thymic involution. *Blood* **107**: 1974-1979.

- Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM and Bundred N. (1999). Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* **59**: 856-861.
- Kuratomi G, Komuro A, Goto K, Shinozaki M, Miyazawa K, Miyazono K and Imamura T. (2005). NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *Biochem J* **386**: 461-470.
- Kyzas PA, Agnantis NJ and Stefanou D. (2006). Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* **448**: 768-775.
- Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL and Attisano L. (1998). Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* **2**: 109-120.
- Lahti A, Kankaanranta H and Moilanen E. (2002). P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production. *Eur J Pharmacol* **454**: 115-123.
- Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J et al. (2002). Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* **62**: 58-64.
- Lastella P, Sabba C, Lenato GM, Resta N, Lattanzi W, Gallitelli M, Cirulli A and Guanti G. (2003). Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* **63**: 536-540.
- Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M and Bernabeu C. (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* **22**: 393-397.
- Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, Lopez LA, Langa C, Fabra A, Letarte M et al. (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* **133**: 1109-1121.
- Lastres P, Martin-Perez J, Langa C and Bernabeu C. (1994). Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* **301 (Pt 3)**: 765-768.
- Leask A and Abraham DJ. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J* **18**: 816-827.
- Leask A, Abraham DJ, Finlay DR, Holmes A, Pennington D, Shi-Wen X, Chen Y, Venstrom K, Dou X, Ponticos M et al. (2002). Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **46**: 1857-1865.

- Leask A, Denton CP and Abraham DJ. (2004). Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol* **122**: 1-6.
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P and Ten Dijke P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* **65**: 599-608.
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM and ten Dijke P. (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J* **23**: 4018-4028.
- Lebrin F and Mummery CL. (2008). Endoglin-mediated vascular remodeling: mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med* **18**: 25-32.
- Lee NY and Blobel GC. (2007). The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells. *J Biol Chem* **282**: 21507-21517.
- Lee PS, Chang C, Liu D and Derynck R. (2003). Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem* **278**: 27853-27863.
- Lesca G, Burnichon N, Raux G, Tosi M, Pinson S, Marion MJ, Babin E, Gilbert-Dussardier B, Riviere S, Goizet C et al. (2006). Distribution of ENG and ACVRL1 (ALK1) mutations in French HHT patients. *Hum Mutat* **27**: 598.
- Letamendia A, Lastres P, Almendro N, Raab U, Buhning HJ, Kumar S and Bernabeu C. (1998a). Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. *Int J Cancer* **76**: 541-546.
- Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L and Bernabeu C. (1998b). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* **273**: 33011-33019.
- Letarte M, McDonald ML, Li C, Kathirkamathamby K, Vera S, Pece-Barbara N and Kumar S. (2005). Reduced endothelial secretion and plasma levels of transforming growth factor-beta1 in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Cardiovasc Res* **68**: 155-164.
- Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, Lindhout D, Hennekam FA, Westermann CJ and Ploos van Amstel JK. (2005). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet* **116**: 8-16.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R et al. (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* **355**: 992-1005.
- Levy L and Hill CS. (2006). Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**: 41-58.

- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N and Kumar S. (2000a). Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* **89**: 122-126.
- Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C and Kumar S. (2000b). CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J* **14**: 55-64.
- Li C, Issa R, Kumar P, Hampson IN, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C and Kumar S. (2003). CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* **116**: 2677-2685.
- Li C, Wang J, Wilson PB, Kumar P, Levine E, Hunter RD and Kumar S. (1998). Role of transforming growth factor beta3 in lymphatic metastasis in breast cancer. *Int J Cancer* **79**: 455-459.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB and Wendel DP. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**: 1534-1537.
- Lin HK, Bergmann S and Pandolfi PP. (2004). Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature* **431**: 205-211.
- Lin X, Chen Y, Meng A and Feng X. (2007). Termination of TGF-beta superfamily signaling through SMAD dephosphorylation--a functional genomic view. *J Genet Genomics* **34**: 1-9.
- Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, Wang J, Brunnicardi FC et al. (2006). PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* **125**: 915-928.
- Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C and Bergan RC. (2002). Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* **21**: 8272-8281.
- Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL and Massague J. (1994). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* **124**: 557-568.
- Lopez-Casillas F, Wrana JL and Massague J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* **73**: 1435-1444.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S and Zhou Q. (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev* **13**: 2196-2206.
- Lux A, Gallione CJ and Marchuk DA. (2000). Expression analysis of endoglin missense and truncation mutations: insights into protein structure and disease mechanisms. *Hum Mol Genet* **9**: 745-755.
- Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ and Bernabeu C. (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* **365**: 694-705.

- Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M and O'Brien E. (2000). Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 2546-2552.
- Marazuela M, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Larranaga E and de Landazuri MO. (1995). Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol* **102**: 328-334.
- Marchuk DA. (1998). Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol* **5**: 332-338.
- Massague J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 597-641.
- Massague J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.
- Massague J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 169-178.
- Massague J, Blain SW and Lo RS. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**: 295-309.
- Massague J and Gomis RR. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* **580**: 2811-2820.
- Massague J, Seoane J and Wotton D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**: 2783-2810.
- Massague J and Wotton D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* **19**: 1745-1754.
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J and Liu F. (2004). Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* **430**: 226-231.
- Mazars A, Lallemand F, Prunier C, Marais J, Ferrand N, Pessah M, Cherqui G and Atfi A. (2001). Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 36797-36803.
- Mazerbourg S and Hsueh AJ. (2006). Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update* **12**: 373-383.
- Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM and Weiskirchen R. (2005). Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem* **280**: 3078-3087.
- Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R and Adamkiewicz J. (1999). Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* **81**: 568-572.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T and Miyazono K. (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* **7**: 1191-1204.

- Miyazono K. (2002). A new partner for inhibitory Smads. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**: 7-9.
- Miyazono K, Ichijo H and Heldin CH. (1993). Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* **8**: 11-22.
- Miyazono K, Suzuki H and Imamura T. (2003). Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* **94**: 230-234.
- Moren A, Imamura T, Miyazono K, Heldin CH and Moustakas A. (2005). Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem* **280**: 22115-22123.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Moustakas A and Heldin CH. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**: 3573-3584.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S and Heldin CH. (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* **114**: 4359-4369.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S et al. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275**: 32783-32792.
- Nadal-Ginard B. (1978). Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* **15**: 855-864.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH et al. (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**: 631-635.
- O'Connell PJ, McKenzie A, Fasicaro N, Rockman SP, Pearse MJ and d'Apice AJ. (1992). Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* **90**: 154-159.
- Obreo J, Diez-Marques L, Lamas S, Duwell A, Eleno N, Bernabeu C, Pandiella A, Lopez-Novoa JM and Rodriguez-Barbero A. (2004). Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* **14**: 301-310.
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S et al. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2626-2631.
- Olivey HE, Mundell NA, Austin AF and Barnett JV. (2006). Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn* **235**: 50-59.

- Pannu J, Nakerakanti S, Smith E, ten Dijke P and Trojanowska M. (2007). Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways. *J Biol Chem* **282**: 10405-10413.
- Parker WL, Goldring MB and Philip A. (2003). Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner. *J Bone Miner Res* **18**: 289-302.
- Paul A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW and Plevin R. (1997). Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal* **9**: 403-410.
- Pece-Barbara N, Vera S, Kathirkamathamby K, Liebner S, Di Guglielmo GM, Dejana E, Wrana JL and Letarte M. (2005). Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem* **280**: 27800-27808.
- Peinado H, Quintanilla M and Cano A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **278**: 21113-21123.
- Pepper MS. (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**: 21-43.
- Perez-Gomez E, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabeu C and Quintanilla M. (2005). Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* **24**: 4450-4461.
- Perez-Gomez E, Villa-Morales M, Santos J, Fernandez-Piqueras J, Gamallo C, Dotor J, Bernabeu C and Quintanilla M. (2007). A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **67**: 10268-10277.
- Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai JC, Hsieh CM, Kourembanas S and Lee ME. (1994). Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells. *J Biol Chem* **269**: 14595-14600.
- Pruneri G, Bertolini F, Baldini L, Valentini S, Goldaniga M, Soligo D, Carboni N, Viale G and Lambertenghi-Delilieri G. (2003). Angiogenesis occurs in hairy cell leukaemia (HCL) and in NOD/SCID mice transplanted with the HCL line Bonna-12. *Br J Haematol* **120**: 695-698.
- Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, Decarli N, Tresoldi M, Raggi F, Baldessari C, Freschi M, Baldini L, Goldaniga M et al. (2002). Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* **118**: 817-820.
- Qu R, Silver MM and Letarte M. (1998). Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* **292**: 333-343.

- Quintanilla M, Ramirez JR, Perez-Gomez E, Romero D, Velasco B, Letarte M, Lopez-Novoa JM and Bernabeu C. (2003). Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* **22**: 5976-5985.
- Roberts AB, McCune BK and Sporn MB. (1992). TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* **41**: 557-559.
- Robinson MJ and Cobb MH. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 180-186.
- Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo AG, Bernabeu C, Sanchez-Madrid F and Teixido J. (1996). Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol* **93**: 507-514.
- Rodriguez-Barbero A, Dorado F, Velasco S, Pandiella A, Banas B and Lopez-Novoa JM. (2006a). TGF-beta1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney Int* **70**: 901-909.
- Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Alvarez-Munoz P, Pandiella A, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM. (2006b). Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem* **18**: 135-142.
- Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Eleno N, Rodriguez-Pena A, Duwel A, Jerkic M, Sanchez-Rodriguez A, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM. (2001). Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 142-147.
- Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Yuste L, Montero JC, Rodriguez-Pena A, Pandiella A, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM. (2002). Transforming growth factor-beta1 induces collagen synthesis and accumulation via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in cultured L(6)E(9) myoblasts. *FEBS Lett* **513**: 282-288.
- Rodriguez-Pena A, Eleno N, Duwell A, Arevalo M, Perez-Barriocanal F, Flores O, Docherty N, Bernabeu C, Letarte M and Lopez-Novoa JM. (2002). Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension* **40**: 713-720.
- Rodriguez-Pena A, Prieto M, Duwel A, Rivas JV, Eleno N, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Smith JD, Vary CP, Bernabeu C et al. (2001). Up-regulation of endoglin, a TGF-beta-binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant* **16 Suppl 1**: 34-39.
- Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, Letarte M and Cooper MD. (1995). Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* **154**: 4456-4465.
- Romani AA, Borghetti AF, Del Rio P, Sianesi M and Soliani P. (2006). The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-positive vessel count. *J Surg Oncol* **93**: 446-455.

- Roy-Chaudhury P, Simpson JG and Power DA. (1997). Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp Nephrol* **5**: 55-60.
- Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G and Egido J. (2007). TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* **74**: 196-206.
- Rulo HF, Westphal JR, van de Kerkhof PC, de Waal RM, van Vlijmen IM and Ruiten DJ. (1995). Expression of endoglin in psoriatic involved and uninvolved skin. *J Dermatol Sci* **10**: 103-109.
- Ruoslahti E and Pierschbacher MD. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491-497.
- Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL and Silverman JF. (2005). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol* **36**: 955-961.
- Saad RS, Jasnosh KM, Tung MY and Silverman JF. (2003). Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* **22**: 248-253.
- Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D and Silverman JF. (2004). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* **17**: 197-203.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L and Bernabeu C. (2001). Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* **276**: 38527-38535.
- Sandlund J, Hedberg Y, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B and Rasmuson T. (2006). Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* **97**: 706-710.
- Santibanez JF, Blanco FJ, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, del Pozo MA and Bernabeu C. (2008). Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor-beta type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. *Cardiovasc Res* **77**: 791-799.
- Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L and Bernabeu C. (2007). Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* **210**: 456-468.
- Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP and Bernabeu C. (2004). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* **279**: 32858-32868.

- Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D and Lowenstein CJ. (2002). Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ Res* **91**: 806-813.
- Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Lowik CW and ten Dijke P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* **120**: 964-972.
- Schenk PW and Snaar-Jagalska BE. (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta* **1449**: 1-24.
- Schnerer O, Meurer SK, Tihaa L, Gressner AM and Weiskirchen R. (2007). Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem* **282**: 13934-13943.
- Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC and Poncelet AC. (2003). TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F243-252.
- Seoane J. (2006). Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* **27**: 2148-2156.
- Serra R and Moses HL. (1996). Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway? *Nat Med* **2**: 390-391.
- Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D and Cao X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol* **164**: 291-300.
- Shi Y and Massague J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685-700.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J and Pavletich NP. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**: 585-594.
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD and Plauchu H. (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* **91**: 66-67.
- Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE and Seidman JG. (1997). Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* **61**: 68-79.
- Shovlin CL and Letarte M. (1999). Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* **54**: 714-729.
- Sibai B, Dekker G and Kupferminc M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* **365**: 785-799.
- Sirard C, Kim S, Mirtsos C, Tadich P, Hoodless PA, Itie A, Maxson R, Wrana JL and Mak TW. (2000). Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor beta-related signaling. *J Biol Chem* **275**: 2063-2070.

- Sporn MB and Roberts AB. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* **119**: 1017-1021.
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N and Letarte M. (1994a). Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* **134**: 2645-2657.
- St-Jacques S, Forte M, Lye SJ and Letarte M. (1994b). Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* **51**: 405-413.
- Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL and Luo K. (2001). Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* **15**: 2822-2836.
- Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF and Weinberg RA. (1999). SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12442-12447.
- Svegliati-Baroni G, Inagaki Y, Rincon-Sanchez AR, Else C, Saccomanno S, Benedetti A, Ramirez F and Rojkind M. (2005). Early response of alpha2(I) collagen to acetaldehyde in human hepatic stellate cells is TGF-beta independent. *Hepatology* **42**: 343-352.
- Szekanecz Z, Haines GK, Harlow LA, Shah MR, Fong TW, Fu R, Lin SJ, Rayan G and Koch AE. (1995). Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin Immunol Immunopathol* **76**: 187-194.
- Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H and Seon BK. (2001). Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* **7**: 524-532.
- Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yamada T, Hanaoka N, Inui K and Wada H. (2001). Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* **7**: 3410-3415.
- ten Dijke P and Arthur HM. (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 857-869.
- ten Dijke P, Goumans MJ and Pardali E. (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* **11**: 79-89.
- ten Dijke P and Hill CS. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**: 265-273.
- ten Dijke P, Miyazono K and Heldin CH. (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* **25**: 64-70.
- Thorpe PE and Burrows FJ. (1995). Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* **36**: 237-251.

- Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M and Letarte M. (2005). A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* **96**: 684-692.
- Tourkina E, Gooz P, Pannu J, Bonner M, Scholz D, Hacker S, Silver RM, Trojanowska M and Hoffman S. (2005). Opposing effects of protein kinase Calpha and protein kinase Cepsilon on collagen expression by human lung fibroblasts are mediated via MEK/ERK and caveolin-1 signaling. *J Biol Chem* **280**: 13879-13887.
- Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH and ten Dijke P. (2006). Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol* **7**: 16.
- van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM and De Jong EM. (1998). Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* **78**: 19-21.
- Vassalle C, Domenici C, Lubrano V and L'Abbate A. (2003). Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways in endothelial cells. *J Vasc Res* **40**: 491-499.
- Velasco-Loyden G, Arribas J and Lopez-Casillas F. (2004). The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem* **279**: 7721-7733.
- Vempati UD and Kondaiah P. (1998). Molecular organization of the gene encoding Xenopus laevis transforming growth factor-beta 5. *Biochem Mol Biol Int* **45**: 997-1003.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA et al. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* **12**: 642-649.
- Verrecchia F and Mauviel A. (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* **13**: 3056-3062.
- Voller A, Bartlett A and Bidwell DE. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* **31**: 507-520.
- Wan M, Cao X, Wu Y, Bai S, Wu L, Shi X, Wang N and Cao X. (2002). Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep* **3**: 171-176.
- Watanabe M and Whitman M. (1999). The role of transcription factors involved in TGFbeta superfamily signaling during development. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**: 537-543.
- Westphal JR, Willems HW, Schalkwijk CJ, Ruiter DJ and de Waal RM. (1993). A new 180-kDa dermal endothelial cell activation antigen: in vitro and in situ characteristics. *J Invest Dermatol* **100**: 27-34.
- Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM and Chantry A. (2000). Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol* **20**: 8103-8111.

- Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, Said HM, Hamzavi J, Gressner AM, Thorikay M, ten Dijke P, Mertens PR, Breitkopf K et al. (2006). Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **43**: 1032-1041.
- Wieser R, Wrana JL and Massague J. (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *Embo J* **14**: 2199-2208.
- Winston E, Fuller SA and Hurrell JGR. (1987). Western blotting. *Current Protocols in Molecular Biology*: (New York: John Wiley&Sons).
- Wotton D, Lo RS, Lee S and Massague J. (1999). A Smad transcriptional corepressor. *Cell* **97**: 29-39.
- Wrana JL and Attisano L. (2000). The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**: 5-13.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F and Massague J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**: 341-347.
- Xu L, Kang Y, Col S and Massague J. (2002). Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell* **10**: 271-282.
- Yakymovych I, Ten Dijke P, Heldin CH and Souchelnytskyi S. (2001). Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *Faseb J* **15**: 553-555.
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Moren A, ten Dijke P and Miyazono K. (1994a). Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**: 1995-2001.
- Yamashita H, ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K and Heldin CH. (1994b). Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**: 20172-20178.
- Yang LY, Lu WQ, Huang GW and Wang W. (2006). Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **6**: 110.
- Yue J and Mulder KM. (2000). Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**: 35656.
- Zhang H, Shaw AR, Mak A and Letarte M. (1996). Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol* **156**: 564-573.
- Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A and Derynck R. (2001). Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 974-979.
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL and Thomsen GH. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**: 687-693.

*“La paciencia es amarga,
pero sus frutos son dulces”.*
- Jean Jacques Rousseau -

Anexo



L- and S-endoglin differentially modulate TGF β 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L₆E₉ myoblasts

Soraya Velasco¹, Patricia Alvarez-Muñoz¹, Miguel Pericacho¹, Peter ten Dijke², Carmelo Bernabéu³, José M. López-Novoa¹ and Alicia Rodríguez-Barbero^{1,*}

¹Instituto 'Reina Sofía' de Investigación Nefrológica, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, and Red de Investigación en Enfermedades Renales (RedinRen), Salamanca, Spain

²Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

³Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), and Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

*Author for correspondence (e-mail: barberoa@usal.es)

Accepted 14 January 2008

Journal of Cell Science 121, 913-919 Published by The Company of Biologists 2008

doi:10.1242/jcs.023283

Summary

TGF β regulates cellular processes by binding to type I and type II TGF β receptors (T β RI and T β RII, respectively). In addition to these signaling receptors, endoglin is an accessory TGF β receptor that regulates TGF β signaling. Although there are two different alternatively spliced isoforms of endoglin, L-endoglin (L, long) and S-endoglin (S, short), little is known about the effects of S-endoglin isoform on TGF β signaling. Here, we have analyzed the TGF β 1 signaling pathways and the effects of L- and S-endoglin in endoglin-deficient L₆E₉ cells. We found that TGF β activates two distinct T β RI-Smad signaling pathways: ALK1-Smad1-Id1 and ALK5-Smad2-PAI1, in these cells. Interestingly, L-endoglin enhanced the ALK1-Id1 pathway,

while S-endoglin promoted the ALK5-PAI1 route. These effects on signaling are supported by biological effects on TGF β 1-induced collagen I expression and inhibition of cell proliferation. Thus, while L-endoglin decreased TGF β 1-induced collagen I and CTGF expression and increased TGF β 1-induced proliferation, S-endoglin strongly increased TGF β 1-induced collagen I and CTGF expression, and reduced TGF β 1-induced cell proliferation.

Key words: TGF β , L-endoglin, S-endoglin ALK1, ALK5, Id1, PAI1, Smads, Collagen I, Proliferation

Introduction

Transforming growth factor β (TGF β) is a family of multifunctional growth factor that regulates biological processes controlling the physiology of organs and tissues. TGF β proteins regulate cell proliferation, migration, extracellular matrix (ECM) production and the differentiation of a wide variety of cell types (Piek et al., 1999), and play a pivotal role during embryonic development and adult homeostasis (Massague, 2000). TGF β family members elicit cellular responses by binding to a heteromeric complex of specific type I and II serine/threonine kinase receptors and their downstream nuclear effectors, termed Smads (Shi and Massague, 2003). TGF β type I receptor (T β RI), also known as activin receptor-like kinase (CAVRL1, hereafter referred to as ALK), acts downstream of TGF β type II (T β RII) receptor and propagates the signal to the nucleus by phosphorylating specific members of the Smad family, receptor-regulated (R)-Smads, at their C-terminal serine residues. Phosphorylated R-Smads form complexes with the common partner (Co)-Smad, i.e. Smad4, which accumulate in the nucleus where they participate in transcriptional regulation of target genes (Massague and Gomis, 2006). In most cells cell types, TGF β 1 binds to the ubiquitously expressed ALK5 receptor that activates Smad2 and Smad3 (Massague and Gomis, 2006). In a few other cell types, TGF β activates ALK1 in the presence of functional ALK5, resulting in phosphorylation of Smad1 and Smad5 (Goumans et al., 2002; Lebrin et al., 2005; Scherner et al., 2007). It has been proposed that ALK1 activation triggers proliferation and migration, whereas ALK5 activation has the opposite effects in endothelial cells

(Goumans et al., 2002; Lebrin et al., 2005). However, other authors have reported rather different results (David et al., 2007). Besides these classical signaling receptors, two accessory receptors, i.e. betaglycan (T β RIII) and endoglin (CD105), have been described (Piek et al., 1999; Shi and Massague, 2003; Gougos and Letarte, 1990; Duff et al., 2003). Endoglin binds different members of the TGF β superfamily in the presence of the signaling receptors types I and II (Cheifetz et al., 1992; Yamashita et al., 1994; Letamendia et al., 1998). The functional interaction between endoglin and TGF β receptors has been thoroughly analyzed in endothelial cells (Lebrin et al., 2004; Lebrin et al., 2005; Blanco et al., 2005) and only recently in L₆E₉ myoblasts (Scherner et al., 2007). Molecular cloning of the human endoglin cDNA has demonstrated the existence of two protein variants, arising by alternative splicing. L-endoglin, the predominant isoform, has a cytoplasmic domain of 47 residues, whereas the minor isoform, S-endoglin, contains a cytoplasmic tail of only 14 amino acids (Bellon et al., 1993; Perez-Gomez et al., 2005). Both endoglin forms are able to bind ligand (Bellon et al., 1993), but differ in their level of phosphorylation (Lastres et al., 1994), and in their capacity to regulate certain TGF β -dependent responses (Lastres et al., 1996). As L-endoglin is the predominant isoform, its role in the TGF β system has been analyzed by several laboratories. However, little is known about the function of S-endoglin (Perez-Gomez et al., 2005; Lastres et al., 1994; Lastres et al., 1996). Here, we analyze the effect of L- and S-endoglin on TGF β 1 signaling and on collagen I synthesis and cell proliferation in L₆E₉ myoblasts.

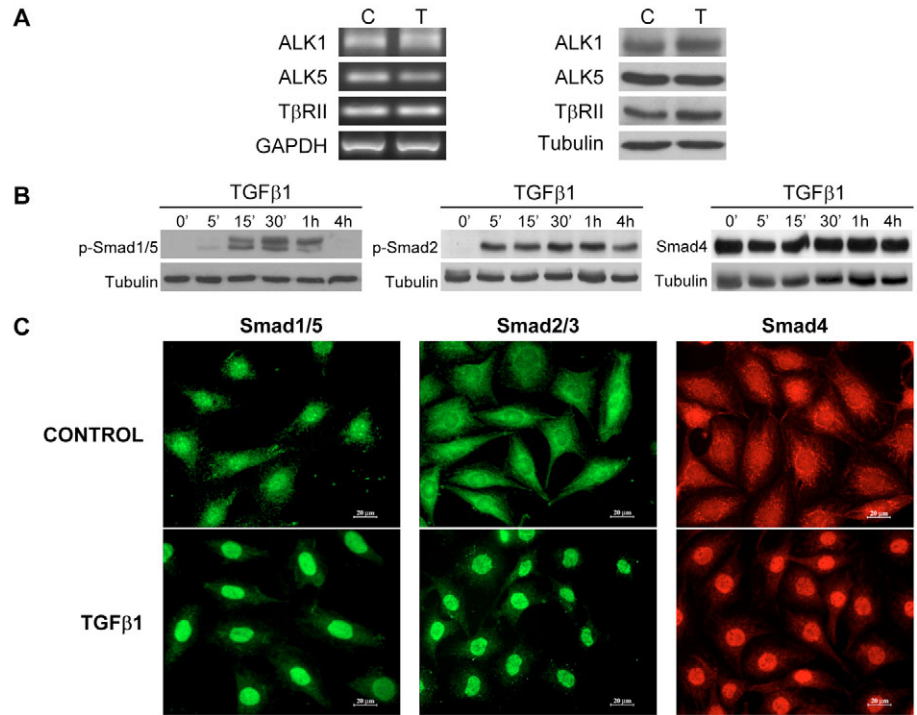


Fig. 1. Expression of TGF β receptors and Smads in L₆E₉ cells. L₆E₉ cells were serum starved for 24 hours before TGF β 1 treatment. (A) The expression of ALK1, ALK5 and T β RII from control (C) or 500 pM TGF β 1-treated (T) cells (24 hours) was analyzed by RT-PCR and western blot. (B) Myoblasts were stimulated with TGF β 1 for the indicated time periods. Total proteins extracts were analyzed by western blot with anti-phospho-Smad1, anti-phospho-Smad2, anti-Smad2/3 and anti-Smad4 antibodies. Loading controls included GAPDH, β -actin and tubulin. A representative blot from three independent experiments is shown. (C) Immunofluorescence of Smad1/5, Smad2/3 and Smad4 in L₆E₉ cells untreated or treated with TGF β 1 for 24 hours.

Results

TGF β 1 activates ALK1 and ALK5 signaling pathways

The presence of ALK1, ALK5 and T β RII mRNA and protein expression in L₆E₉ cells was clearly detected by RT-PCR and western blot (Fig. 1A). Furthermore, they were unchanged after 24 hours of TGF β 1 treatment. As evidenced by western blot analysis of total cellular extracts (Fig. 1B) or isolated nuclei (data not shown), stimulation of L₆E₉ with TGF β 1 resulted in phosphorylation and nuclear accumulation of Smad1/5 (Fig. 1B) and Smad2/3 (Fig. 1B). Smad4 expression in total cellular extracts was unchanged after TGF β 1 treatment (Fig. 1B), but was increased in nuclear extracts (data not shown). Immunofluorescence studies revealed that under basal conditions Smad1/5, as well as Smad2/3 and Smad4 are homogeneously distributed in the cytoplasm with perinuclear and nuclear accumulation. However, after 30 minutes of stimulation with TGF β 1, Smad1/5, Smad2/3 and Smad4 accumulated mainly in the nucleus (Fig. 1C). TGF β -induced Smad phosphorylation was abrogated in the presence of the synthetic ALK5 inhibitor SB431542 (Fig. 2A). We found an increased expression of the specific downstream target of TGF β -ALK1 pathway Id1 (Goumans et al., 2002) in L₆E₉ cells (Fig. 2B). Id1 expression induced by 500 pM

TGF β 1 was maximal at 1 hour and decreased after 4 hours (data not shown). We also found a small activation of the (BRE)₂-Luc reporter upon 24 hours of TGF β 1 treatment (Fig. 2C). Expression of the specific downstream target of TGF β -ALK5 pathway, plasminogen activator inhibitor 1 (Serpine1, hereafter referred to as PAI1) (Goumans et al., 2002), was strongly induced by 500 pM TGF β 1 (Fig. 2D). As shown in Fig. 2E, the reporter activity (CAGA)₁₂-Luc was powerfully stimulated by TGF β 1 treatment for

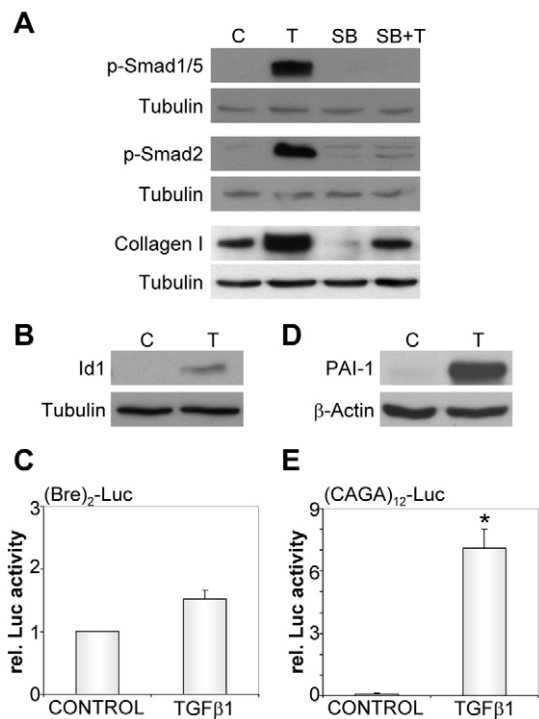


Fig. 2. TGF β 1-ALK1 and TGF β 1-ALK5 signaling pathways in L₆E₉ cells. Cells were serum starved for 24 hours before TGF β 1 treatments (30 minutes for p-Smads, 1 hour for Id1 and 24 hours for PAI1). (A) Cells were treated with the ALK5 inhibitor SB431542 (SB, 5 μ M) 1 hour before treatment with TGF β 1. Whole-cell extracts were analyzed by western blot with anti-pSmad1, anti-pSmad2 and collagen I. Total protein extracts from control (C) or TGF β 1-treated (T) myoblasts (1 hour) were analyzed by western blot with anti-Id1 (B) and anti-PAI1 (D). L₆E₉ were transiently transfected with (Bre)₂-Luc (C), and (CAGA)₁₂-Luc (E) reporters; cells were incubated or not with TGF β 1 for 24 hours, before measuring the luciferase activity. Results are represented as fold induction of the TGF β 1 treated over the untreated counterparts. The histogram represents the mean of three independent experiments. * P <0.05, Student's t -test.

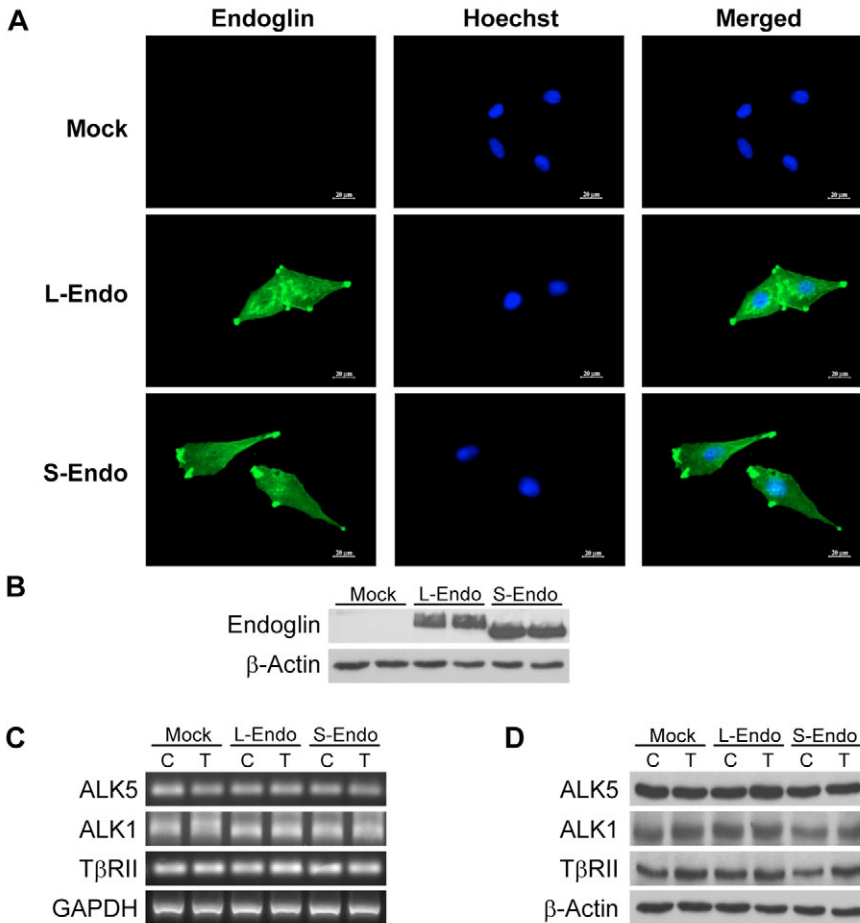


Fig. 3. L- and S-endoglin expression and their effects on TGF β receptors. (A) Immunofluorescence and (B) western blot of endoglin in L₆E₉ mock, L-endoglin (L-Endo) and S-endoglin (S-Endo). (C,D) Mock-, L-Endo- and S-Endo-transfected cells were serum starved for 24 hours before TGF β 1 treatment. The expression of ALK1, ALK5 and T β RII in control (C), or TGF β 1-treated (T) cells was analyzed by RT-PCR (C) and western blot (D). A representative blot from three independent experiments is shown.

24 hours. These experiments revealed that TGF β 1 was sufficient to activate Smad2 and Smad1/5. Interestingly, both phosphorylation of Smad2 and Smad1/5 were blocked in the presence of SB431542 (Fig. 2A). Because ALK1 is insensitive to this inhibitor (Laping et al., 2002), this finding indicated that ALK1 signaling itself is ALK5 dependent in L₆E₉ cells. In addition, TGF β -induced collagen I expression was reduced in the presence of SB431542 (Fig. 2A).

L- and S-endoglin expression in L₆E₉ cells, and their effect on TGF β receptors and Smad activation

Ectopic expression of L- and S-endoglin in L₆E₉ transfectants was assessed by immunofluorescence and western blot analysis. Both L- and S-endoglin were found to be homogeneously distributed on the cell membrane and accumulated at the adhesion points to the substratum (Fig. 3A). L- and S-endoglin were detected also by western blot (Fig. 3B). As we already reported (Obreo et al., 2004), no endoglin expression was found in mock L₆E₉ cells. RT-PCR and western blot analysis revealed that L- or S-endoglin expression in L₆E₉ cells did not modify ALK1, ALK5 or T β RII mRNA (Fig. 3C) and protein expression (Fig. 3D). Stimulation of mock, L- or S-endoglin L₆E₉ myoblasts with TGF β 1 resulted in Smad1, Smad2 and Smad3 phosphorylation (Fig. 4A). No significant differences were found in phosphorylated Smad1, Smad2 and Smad3 between mock, L- or S-endoglin in untreated cells (data not shown). TGF β 1-induced Smad3 phosphorylation was higher in S-endoglin cells than in L-endoglin and mock, whereas no significant differences were found in phospho-Smad2 (Fig. 4A). TGF β 1-induced Smad1, Smad2

and Smad3 phosphorylation was abrogated in the presence of the synthetic ALK5 inhibitor SB431542 in mock, L- and S-endoglin-transfected cells (Fig. 4B).

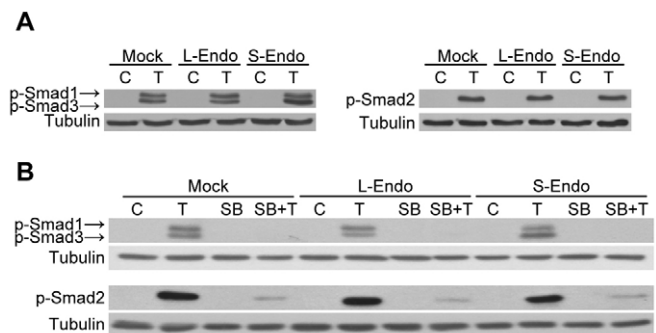


Fig. 4. Effects of L- and S-endoglin on Smad phosphorylation. Mock-, L-Endo- and S-Endo-transfected cells were serum starved for 24 hours before 30 minutes of TGF β 1 treatment. (A) Total protein extracts from control (C) or TGF β 1-treated (T) myoblasts were analyzed by western blot with anti-phospho-Smad1/3 or anti-phospho-Smad2 antibodies; anti-tubulin was used as a loading control. (B) Mock-, L-Endo- and S-Endo-transfected cells were treated with the ALK5 inhibitor SB431542 (SB, 5 μ M) 1 hour before treatment with TGF β 1. Total protein extracts from control (C) or TGF β 1-treated (T) myoblasts were analyzed by western blot with anti-phospho-Smad1/3, anti-phospho-Smad2 and anti-tubulin antibodies. A representative blot from three independent experiments is shown.

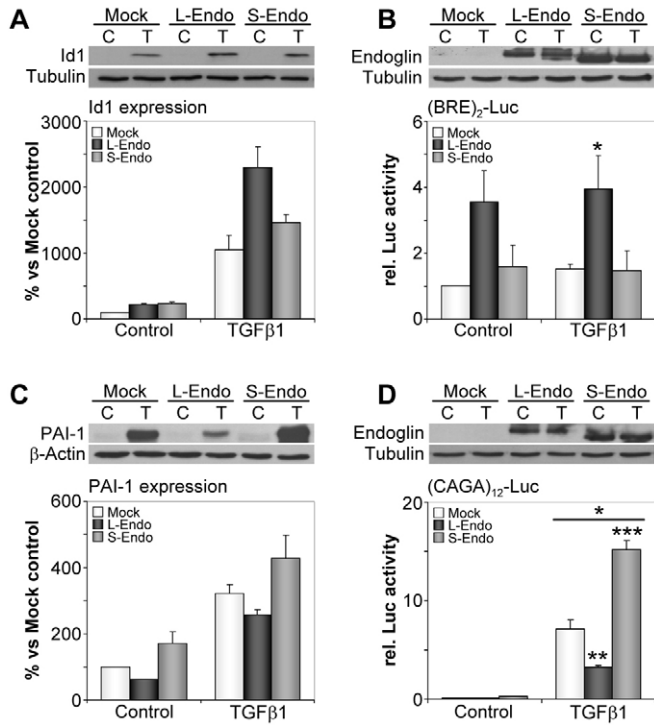


Fig. 5. Effects of L- and S-endoglin on TGF β 1-ALK1 and TGF β 1-ALK5 signaling pathways. Cells were serum starved for 24 hours before TGF β 1 treatment. Total protein extracts from control (C) or TGF β 1-treated (T) myoblasts analyzed by western blot with anti-Id1 (A) and anti-PAI1 (C). Measures of densitometry of each band were performed and relative values are represented. Id1 and PAI1 histogram represents the mean of three different extracts. (B,D) Western blots of endoglin in L₆E₉ mock, L-endoglin (L-Endo) and S-endoglin (S-Endo). L₆E₉ cells were transiently transfected with (BRE)₂-Luc reporter (**P*<0.05 compared with mock and S-Endo) (B), and (CAGA)₁₂-Luc reporter (**P*<0.05 TGF β 1 compared with control; ***P*<0.05 compared with mock and S-Endo; ****P*<0.05 compared with mock and L-Endo). (D) Cells were incubated or not with TGF β 1 for 24 hours before measuring the luciferase activity.

Differential effects of L- and S-endoglin on ALK1 and ALK5 signaling pathways

TGF β 1-induced Id1 expression in L-endoglin-transfected L₆E₉ was significantly higher than in mock cells (Fig. 5A). In addition, Id1 expression in L-endoglin was higher than in S-endoglin cells (Fig. 5A). Accordingly, the trans-activation activity of the (BRE)₂-Luc reporter was 3.5 times higher in L-endoglin than in mock cells, whereas S-endoglin (BRE)₂-Luc reporter activity was 1.5 times higher than in mock cells (Fig. 5B). However, the (BRE)₂-Luc reporter was barely increased by TGF β 1 (Fig. 5B). Fig. 5B also shows a representative western blot of both L- and S-endoglin expression in L₆E₉ myoblasts. Altogether, these results show that L-endoglin expression promotes signaling through the ALK1 receptor.

TGF β -induced PAI1 expression was also modified by endoglin expression. Whereas L-endoglin significantly decreased PAI1 expression, S-endoglin strongly augmented this response (Fig. 5C). As shown in Fig. 5D, the reporter activity of (CAGA)₁₂-Luc was stimulated upon TGF β treatment in mock cells, whereas the TGF β -mediated response of this ALK5-dependent reporter was diminished by L-endoglin and strongly enhanced by S-endoglin. Fig. 5D also shows a representative western blot of both L- and S-endoglin expression in L₆E₉ myoblasts. Thus, S-endoglin expression in L₆E₉ promotes signaling through the ALK5 receptor.

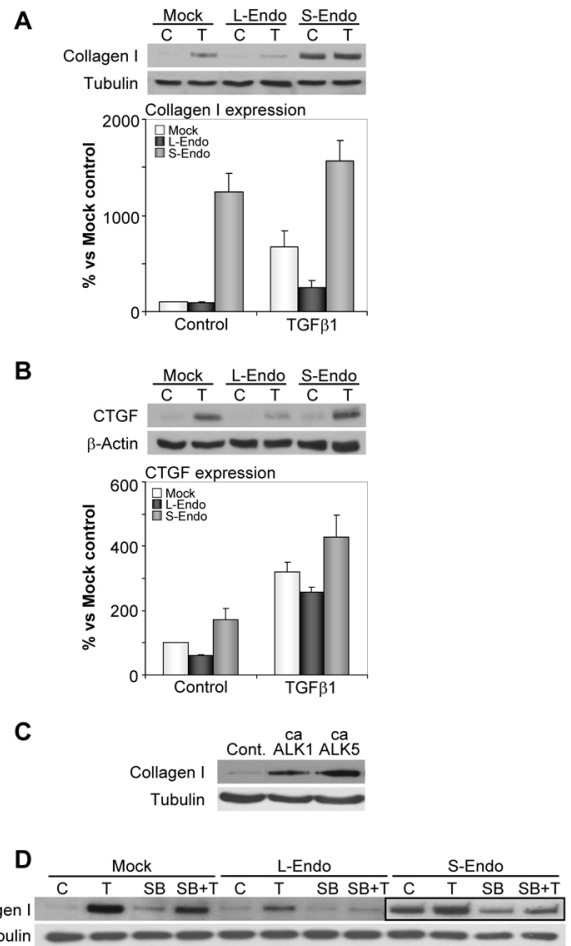


Fig. 6. Effect of L- and S-endoglin on collagen I and CTGF expression. (A,B) Mock, L- and S-endoglin cells were treated (T) or not (C) with TGF β 1 for 24 hours in serum-free medium. Total protein extracts were analyzed by western blot using a specific antibody for collagen I (A) or CTGF (B). Measures of densitometry of each band were performed and relative values are represented. Collagen I and CTGF histogram represents the mean of three different extracts. (C) L₆E₉ cells were transfected with a vector expressing either caALK1 or caALK5, and collagen expression analyzed by western blot. (D) Mock, L-Endo and S-Endo-transfected cells were treated with the ALK5 inhibitor SB431542 (SB, 5 μ M) 1 hour before treatment with TGF β 1. Total protein extracts from control (C) or TGF β 1-treated (T) myoblasts were analyzed by western blot with anti-collagen I and anti-tubulin antibodies. A representative blot from three independent experiments is shown. The blot of the S-endoglin samples is under-exposed in order to visualize the differences caused by the SB431542 treatment.

Differential effects of L- and S-endoglin on collagen I accumulation

The effect of L- and S-endoglin on collagen I expression was analyzed in L₆E₉ cells. In basal conditions, collagen I was markedly augmented in S-endoglin but not in L-endoglin cells (Fig. 6A). Collagen I levels increased after TGF β 1 treatment in both mock, L- and S-endoglin L₆E₉ cells (Fig. 6A), although the increase was much higher in S-endoglin and lower in L-endoglin cells than in mock L₆E₉ cells.

To investigate the role of ALK1 and ALK5 signaling pathways on collagen I accumulation, we transfected L₆E₉ cells with a vector expressing either constitutively active (ca) ALK1 or ALK5, and analyzed the effect on collagen I expression. caALK1 and caALK5

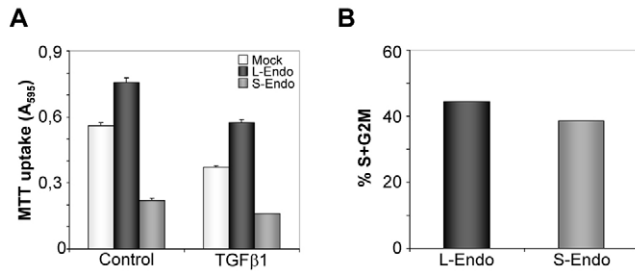


Fig. 7. L- and S-endoglin modify cell proliferation. (A) Proliferation was assessed by the number of cells determined by MTT assay. Cell proliferation was analyzed at day 0 (day of treatment, data not shown) and 3 days after treatment. A representative experiment of three independent experiments using quadruplicate samples is shown. (B) Representative flow cytometry graph showing a higher proportion of L-endoglin cells in S and G2-M phases of the cell cycle.

induced an increase in the collagen I expression that was higher in cells expressing ALK5 than in cells expressing ALK1 (Fig. 6C). These results indicate that ALK1 and ALK5 mediate collagen expression in L₆E₉ cells. In addition, TGF β 1-induced collagen I expression was reduced in the presence of SB431542 in mock, L- and S-endoglin-transfected myoblasts (Fig. 6D); however, the differences in collagen expression between the three groups are preserved.

As connective tissue growth factor (CTGF) seems to be a key mediator of the profibrotic effects of TGF β 1 (Chen et al., 2002; Gupta et al., 2000; Riser et al., 2000), we assessed whether L- or S-endoglin could modify CTGF expression. We observed that under basal conditions, L-endoglin had lower and S-endoglin higher CTGF expression than mock cells (Fig. 6B). TGF β 1 treatment induced a similar percentage of increase in CTGF expression in both types of cells (Fig. 6B). However, the amount of CTGF detected in L-endoglin after TGF β 1 treatment was lesser than in mock, while S-endoglin showed a higher TGF β 1-induced increase in CTGF than did mock L₆E₉ cells (Fig. 6B).

Differential effects of L- and S-endoglin on cell proliferation

We and others have reported the effects of endoglin expression on cell proliferation in the presence or absence of TGF β 1 (Letamendia et al., 1998; Obreo et al., 2004). Here, cells were subcultured in 24-well plates, allowed to attach for 12 hours and then treated or not with 500 pM TGF β 1. Under these conditions, the number of cells in both mock, L- or S-endoglin after 1 day of culture was the same (data not shown). In the absence of TGF β 1 treatment, the number of cells after 4 days of plating was higher in L-endoglin and lower in S-endoglin than in mock cells (Fig. 7A). Incubation with TGF β 1 decreased in a similar way the number of cells in both mock, L- and S-endoglin cells (Fig. 7A). Flow cytometry analysis revealed a greater percentage of L-endoglin cells in S and G2-M phase (44.5%) than in S-endoglin (38.6%) cells (Fig. 7B). These results suggest that L-endoglin promotes, whereas S-endoglin reduces, L₆E₉ proliferation.

Discussion

In the present studies, we investigated the function of L- and S-forms of endoglin on TGF β 1 signaling pathways using the rat myoblast cell line L₆E₉. This is a well-established cellular model reported to be highly responsive to TGF β 1 that, interestingly, lacks endoglin expression (Letamendia et al., 1998; Guo et al., 2004;

Obreo et al., 2004; Scherner et al., 2007). As the actual tools used to detect endoglin on tissues and primary cultured cells barely distinguish between L- and S-endoglin, this is an excellent model system with which to analyze the role of endoglin isoforms in modulating TGF β signaling pathways by transfecting cDNA encoding L- and S-endoglin into the L₆E₉ cells.

The effects of TGF β 1 on target gene expression are well described and attributed to the ubiquitous signaling pathway encompassing the type I receptor ALK5, Smad2 and Smad3. The ALK1-Smad1/5 pathway has been analyzed almost exclusively in endothelial cells (Goumans et al., 2002; Lebrin et al., 2004; Lebrin et al., 2005; Blanco et al., 2005) and only recently its involvement in myoblasts has been suggested (Scherner et al., 2007). In our study, it was noted that L₆E₉ cells express both TGF β type I and II receptors, and show responsiveness towards TGF β 1, as Smad1/5 and Smad2/3 (respectively) were activated. Moreover, the reporters (CAGA)₁₂-Luc and (BRE)₂-Luc were activated by TGF β 1. In addition, we showed that TGF β 1 induces Id1 and PAI1 expression in these cells. Our data are consistent with those from Scherner et al. (Scherner et al., 2007) showing that both ALK1- and ALK5-TGF β 1-dependent signaling pathways are present and functional in L₆E₉ myoblasts. One feature in ALK1 signaling is the dependence on ALK5 activity that was previously observed in ALK5-deficient endothelial cells (Goumans et al., 2003) and in L₆E₉ cells (Scherner et al., 2007). We confirmed this characteristic in L₆E₉ cells because TGF β -dependent Smad2/3 and Smad1/5 phosphorylation was completely blocked in the presence of the ALK5 inhibitor SB431542, which does not interfere with ALK1 group receptors (Laping et al., 2002).

Generally, the studies regarding endoglin are referred to its predominantly expressed long isoform L-endoglin. Although L-endoglin isoform appears to be the predominant endoglin transcript expressed in mouse tissues and cell lines, significant levels of S-endoglin mRNA are co-expressed with L-endoglin in several tissues, such as liver and lung, as well as in endothelial cultured cells (Bellon et al., 1993; Perez-Gomez et al., 2005). S-endoglin rises from an alternative splicing mechanism by which a 136 bp intron between exon 12 and 13 is not eliminated. Consequently, a premature stop codon appears in the reading frame; thus, both endoglin isoforms differ by their cytoplasmic tails. Whereas the cytoplasmic region of L-endoglin contains 47 amino acids, that of S-endoglin has only 14 residues, with the seven juxtamembrane amino acids in common. Recently, it has been reported the existence of the mouse endoglin short isoform (Perez-Gomez et al., 2005), but the role of S-endoglin on TGF β signaling pathway has not been analyzed in detail.

Our data support the view that endoglin is a modulator of the balance between TGF β 1-ALK1 and TGF β 1-ALK5 signaling pathways. We show that L- and S-endoglin expression increased the ALK1 signaling pathway by increasing Id1 expression in response to TGF β 1, but the effect of L-endoglin was much higher than that of S-endoglin. This view is in agreement with reports showing that L-endoglin promotes endothelial cell proliferation via TGF β 1-ALK1 signaling, while it interferes with the TGF β 1/ALK5 pathway (Lebrin et al., 2004; Blanco et al., 2005). Id1 has been reported to enhance proliferation (Lin et al., 2000) and to serve as an effector for the TGF β 1-ALK1 pathway in mediating the stimulatory effect on proliferation. Consistent with this notion, we found that TGF β -induced decrease in proliferation is abolished in cells expressing L-endoglin and increased in cells expressing S-endoglin. Lastres et al. (Lastres et al., 1996) found similar response

on TGF β 1-induced [3 H]-thymidine uptake in U-937 L- and S-endoglin-transfected monocytes. Besides, S-endoglin highly increased ALK5 signaling pathway that, by contrast, was reduced in L-endoglin cells. This last observation is in agreement with a large number of reports describing the role of L-endoglin as an antagonist of specific ALK5-mediated TGF β 1 responses, including inhibition of cellular proliferation, apoptosis triggering or induction of extracellular matrix synthesis (Letamendia et al., 1998; Obreo et al., 2004; Diez-Marques et al., 2002; Li et al., 2003). It is important to note that after 3 days of serum depletion, L-endoglin increased, whereas S-endoglin decreased cell proliferation, suggesting that a TGF β -independent pathway is implicated in this biological effect of endoglin. Because the extracellular domain of endoglin is common in both L- and S-isoforms, the cytoplasmic tails would be responsible for the antagonist effects observed.

However, in the presence of S-endoglin, L₆E₉ cells accumulate much more collagen I and express more CTGF, while L-endoglin cells accumulate less collagen I and express less CTGF than mock-transfected cells. Furthermore, caALK5-transfected cells accumulate more collagen than do caALK1-transfected cells. These data suggest that S-endoglin expression could favor ALK5-mediated TGF β 1 responses such as induction of extracellular matrix synthesis. Ectopic expression of L-endoglin in cell lines has been reported to modulate their responses to TGF β 1, possibly by favoring signaling via the ALK1 pathway (Letamendia et al., 1998). Our results show that S-endoglin plays an important role in TGF β 1 signaling in L₆E₉ cells by increasing ALK5-PAI1 pathway while L-endoglin enhances ALK1-Id1 pathway. Studies in the human promonocytic line U-937 showed that S-endoglin transfectants produced a higher amount of extracellular matrix components such as fibronectin in response to TGF β 1 than L-endoglin, but less than mock cells (Lastres et al., 1996). These data indicate a different pattern of cellular response modulation by TGF β , depending on the endoglin isoform. We show that the TGF β 1-induced collagen I synthesis occurs, in part, via upregulation of ALK1, as caALK1 increases collagen expression in L₆E₉ cells. The short endoglin isoform is able to exert opposite effects to that of the largely expressed L-endoglin on the TGF β signaling (Bellon et al., 1993; Perez-Gomez et al., 2005), including the positive and negative cooperation with ALK5 and ALK1, respectively. Interestingly, we have found that ALK5 and ALK1, as well as T β RII, levels remain unchanged in L- or S-endoglin-transfected L₆E₉ cells. Therefore, balancing the TGF β signal through ALK5 or ALK1 would depend on the S-endoglin : L-endoglin ratio present on the cells. However, S-endoglin could not cooperate with the ALK1 signaling pathway owing to the low affinity of the interaction, thus leading the signal through ALK5. Supporting this hypothesis, an anti-angiogenic effect of S-endoglin has been recently suggested, in contrast to the pro-angiogenic role attributed to L-endoglin (Perez-Gomez et al., 2005). In S-endoglin-transfected cells without treatment, collagen I expression is higher than in mock-transfected myoblasts, thus suggesting that a TGF β -independent pathway is involved in this biological effect of endoglin. In this regard, we show here that ALK1 inhibition reduces only the collagen synthesis induced by TGF β 1, and we have already demonstrated the dependence of collagen I synthesis on p38 MAPK in L₆E₉ myoblasts (Rodríguez-Barbero et al., 2002).

Taken together, our data demonstrate a different and sometimes opposed effect of L and S isoforms of endoglin on the regulation of TGF β -induced responses and signaling in L₆E₉ cells. Furthermore, some of the effects of the endoglin isoforms could be independent of TGF β .

Materials and Methods

Cell culture

The rat myoblast cell line L₆E₉ and their stable transfectants expressing human L-endoglin and S-endoglin were obtained and maintained as described (Letamendia et al., 1998). In brief, clone 3.3 in pUC13 was digested with *Bbr*PI and *Bam*HI. The endoglin fragment was made blunt and inserted into the mammalian expression vector pcEXV, yielding pcEXV-EndoS. The lack of leader sequence in the L-endoglin cDNA was overcome by the construction of pcEXV-EndoL. pcEXV-EndoS was digested with *Mlu*I and *Bam*HI and ligated to the 563 bp *Mlu*I-*Bam*HI fragment specific of L-endoglin cDNA, resulting in pcEXV-EndoL as previously described (Bellon et al., 1993). Myoblast transfectants were generated by co-transfecting pcEXV-EndoL or pcEXV-EndoS vectors and pSV2neo plasmid (Clontech) that contains a neomycin resistance gene at a 10:1 ratio. 10 mg of plasmid DNA were mixed with 20 mg of Lipofectin (Life Technologies) in serum-free medium according to the protocol provided by the manufacturer. Positive clones were selected in the presence of 400 mg/ml of the antibiotic G418. Parallel transfections with pSV2neo alone yielded endoglin-negative mock transfectants. Parental and transfectant cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Cambrex Bio Science) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 100 U/ml of penicillin-streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. 24 hours after plating, cells were serum starved for 24 hours and treated with the active human recombinant TGF β 1 at 500 pM.

Antibodies and reagents

Purified TGF β 1 was purchased from R&D Systems. ALK5 inhibitor SB431542 was from Tocris. Antibodies against ALK5 (sc-399), ALK1 (sc-19546), β -actin (sc-1616), Smad1/5 (sc-7965), Smad2/3 (sc-6032), Smad4 (sc-7966), Id1 (sc-488) and CTGF (sc-14939) were from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies against phosphorylated Smad1/5, and phosphorylated Smad2 were generated as described (Persson et al., 1998). Antibody against phosphorylated Smad1/3 (CS-9514) was from Cell Signaling. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG and anti-goat IgG antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti- α -tubulin antibody was from Calbiochem, anti-T β RII was from Upstate Biotechnology. Anti-collagen I antibody was from Chemicon. Anti-endoglin antibody was P3D1, which has been previously described (Pichuantes et al., 1997).

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated using NucleoSpin RNAiI (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was generated from 2 μ g of total RNA using poly-dT as primers with the M-MLV reverse transcriptase (Promega), 0.5 mg of cDNA were used in a standard 50 ml PCR mixture with 2 ng/ μ l of each primer and 2 U of FastStart Taq DNA polymerase (Roche). The PCR products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The primers were designed for specific sequences and checked by BLAST algorithm (Altschul et al., 1997).

Western blot analysis

Western blot analysis was performed basically as described (Rodríguez-Barbero et al., 2001). Cells were lysed on ice-cold lysis buffer and protein concentrations were determined (Bradford, BioRad). Protein samples were separated by SDS-PAGE, blotted onto PVDF membranes, and incubated with the primary antibodies. After incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, bands were visualized by a luminol-based detection system with p-iodophenol enhancement. Anti-tubulin and β -actin antibodies were used to confirm equal loading of protein in each lane. Protein expression was quantified by densitometry using Scion Image software (Scion). Some membranes were re-probed with several antibodies using a stripping solution (Chemicon) following the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence staining

Immunofluorescence staining was performed as described (Rodríguez-Barbero et al., 2001). Cells were plated onto glass coverslips, fixed, permeabilized and incubated with primary antibodies for 1 hour. After washing, cells were incubated with the appropriate Cy3 or Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) for 30 minutes. Slides incubated only with the secondary antibody were used to control for non-specific binding. Cells were washed in 0.2% BSA-PBS, rinsed briefly in 2 mM Hoechst (Sigma) to stain the nuclei, and mounted with mowiol (Hoechst). Stained cells were photographed using a Zeiss fluorescence microscope (Carl Zeiss) equipped with a digital camera.

Plasmids, transfection and luciferase reporter assay

The TGF β -responsive vectors used as reporters were the ALK5 specific (CAGA)₁₂-Luc (Denkler et al., 1998) and p(BRE)₂-Luc that contains the crucial ALK1-specific response elements of the Id1 promoter (Korchynskiy and ten Dijke, 2002). Expression plasmids for mutant ALK5 and ALK1 have been described (Goumans et al., 2002). In luciferase assays, the expression plasmid pRL-TK vector containing the Renilla luciferase gene (Promega) and the pGLE2 and pGLE3-basic vectors served as internal controls to correct for transfection efficiency. Cells were transfected for 5 hours using jetPEI transfection reagent (Polyplus transfection) according to the manufacturer's instructions. Cells were grown in FBS-free medium for 18 hours and treated with

TGF β 1 (500 pM) for 24 hours. Then cells were lysed for western blot or reporter assays. Luciferase and renilla activities were measured using a dual-reporter assay kit (Promega).

Cell proliferation assay

Subconfluent monolayer cultures were plated in 24-well plates to a density of 12,000 cells per well. 12 hours after plating, cells were serum starved and treated with TGF β 1. Cell proliferation was analyzed after TGF β 1 treatment by an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)-based assay (Roche). Cell proliferation was measured based on absorbance at 595 nm using a Sunrise plate reader (Bio-Tek Instruments). Each experiment was performed in quadruplicate and repeated three times. The amount of color produced is directly proportional to the number of viable cells and is represented as the MTT uptake. For cell cycle studies, cells were plated in 100 mm plates, cultured for 24 hours and serum starved for an additional period of 24 hours. Then, cell cycle analysis was evaluated by flow cytometry.

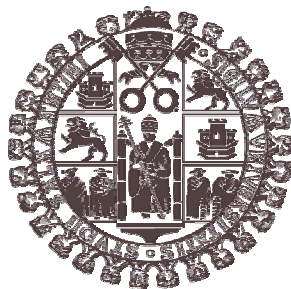
Data analyses

All numerical data are presented as mean \pm s.e.m. and were analyzed by one way ANOVA and the Student's *t*-test. The entire statistical tests were performed using SPSS 14.0 software.

S.V. and P.Á.-M. are recipients of a predoctoral fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia. M.P. is a recipient of a predoctoral fellowship from Junta de Castilla y León. These studies have been supported by grants from Junta de Castilla y León (SA089/02), Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-00285/BFI to J.M.L.-N. and SAF2004-01390 to C.B.), Instituto de Salud Carlos III (Red de Investigación en Enfermedades Renales, RD06/0016 to J.M.L.-N.), Centre for Biomedical Research on Rare Diseases, CIBERER (CB06/07/0038 CB) and Dutch Cancer Society (UL 2005-3371 to P.t.D.).

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Bellon, T., Corbi, A., Lastres, P., Cales, C., Cebrian, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massague, J., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2340-2345.
- Blanco, F. J., Santibanez, J. F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C. P. and Bernabeu, C. (2005). Interaction and functional interplay between endoglin and ALK1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J. Cell. Physiol.* **204**, 574-584.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J. and Letarte, M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 19027-19030.
- Chen, Y., Blom, I. E., Sa, S., Goldschmeding, R., Abraham, D. J. and Leask, A. (2002). CTGF expression in mesangial cells: Involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int.* **62**, 1149-1159.
- David, L., Mallet, C., Vailhe, B., Lamouille, S., Feige, J. J. and Bailly, S. (2007). Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J. Cell. Physiol.* **213**, 484-489.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J. M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* **17**, 3091-3100.
- Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez, R., Langa, C., Rodriguez-Barbero, A., Lopez-Novoa, J. M., Lamas, S. and Bernabeu, C. (2002). Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**, 36-44.
- Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M. and Kumar, S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* **17**, 984-992.
- Gougos, A. and Letarte, M. (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 8361-8364.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. and ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* **21**, 1743-1753.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S. and ten Dijke, P. (2003). Activin receptor-like kinase (ALK1) is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* **12**, 817-828.
- Guo, B., Rooney, P., Slevin, M., Li, C., Parameshwar, S., Liu, D., Kumar, P., Bernabeu, C. and Kumar, S. (2004). Overexpression of CD105 in rat myoblasts: role of CD105 in cell attachment, spreading and survival. *Int. J. Oncol.* **25**, 285-291.
- Gupta, S., Clarkson, M. R., Duggan, J. and Brady, H. R. (2000). Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.* **58**, 1389-1399.
- Korchynski, O. and ten Dijke, P. (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J. Biol. Chem.* **277**, 4883-4891.
- Laping, N. J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J. et al. (2002). Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol. Pharmacol.* **62**, 58-64.
- Lastres, P., Martin-Perez, J., Langa, C. and Bernabeu, C. (1994). Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem. J.* **301**, 765-768.
- Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., Lopez, L. A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M. et al. (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J. Cell Biol.* **133**, 1109-1121.
- Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H. M. and ten Dijke, P. (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* **23**, 4018-4028.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and ten Dijke, P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* **65**, 599-608.
- Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L. M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L. and Bernabeu, C. (1998). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J. Biol. Chem.* **273**, 33011-33019.
- Li, C., Issa, R., Kumar, P., Hampson, I. N., Lopez-Novoa, J. M., Bernabeu, C. and Kumar, S. (2003). CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 2677-2685.
- Lin, C. Q., Singh, J., Murata, K., Itahana, Y., Parrinello, S., Liang, S. H., Gillett, C. E., Campisi, J. and Desprez, P. Y. (2000). A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res.* **60**, 1332-1340.
- Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 169-178.
- Massague, J. and Gomis, R. R. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* **580**, 2811-2820.
- Obreo, J., Diez-Marques, L., Lamas, S., Duwell, A., Eleno, N., Bernabeu, C., Pandiella, A., Lopez-Novoa, J. M. and Rodriguez-Barbero, A. (2004). Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell. Physiol. Biochem.* **14**, 301-310.
- Perez-Gomez, E., Eleno, N., Lopez-Novoa, J. M., Ramirez, J. R., Velasco, B., Letarte, M., Bernabeu, C. and Quintanilla, M. (2005). Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* **24**, 4450-4461.
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engström, U., Heldin, C. H., Funah, K. and ten Dijke, P. (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett.* **434**, 83-87.
- Pichuanes, S., Vera, S., Bourdeau, A., Pece, N., Kumar, S., Wayner, E. A. and Letarte, M. (1997). Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens* **50**, 265-276.
- Piek, E., Heldin, C. H. and ten Dijke, P. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* **13**, 2105-2124.
- Riser, B. L., Denichilo, M., Cortes, P., Baker, C., Grondin, J. M., Yee, J. and Narins, R. G. (2000). Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 25-38.
- Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Eleno, N., Rodriguez-Pena, A., Duwell, A., Jerkic, M., Sanchez-Rodriguez, A., Bernabeu, C. and Lopez-Novoa, J. M. (2001). Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 142-147.
- Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Yuste, L., Montero, J. C., Rodriguez-Pena, A., Pandiella, A., Bernabeu, C. and Lopez-Novoa, J. M. (2002). Transforming growth factor-beta1 induces collagen synthesis and accumulation via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in cultured L6E9 myoblasts. *FEBS Lett.* **513**, 282-288.
- Schnerer, O., Meurer, S. K., Tihaa, L., Gressner, A. M. and Weiskirchen, R. (2007). Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 13934-13943.
- Shi, Y. and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
- Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Moren, A., ten Dijke, P. and Miyazono, K. (1994). Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **269**, 1995-2001.



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

LAS ISOFORMAS DE ENDOGLINA EN LA SEÑALIZACIÓN DEL TGF β 1

Tesis Doctoral

SORAYA VELASCO GONZÁLEZ

Salamanca, 7 de Febrero de 2009

Fe de erratas



Fe de erratas

Los errores tipográficos no aparecen si no presentan peligro de confusión de conceptos o pérdida del significado.

Sección *Introducción*, página 28, línea 13:

Donde dice: “la L-endoglina, formada por 633 aminoácidos”

Debe decir: ““la L-endoglina, formada por 658 aminoácidos””

Sección *Introducción*, página 28, línea 14:

Donde dice: “la S-endoglina está compuesta por 600 aminoácidos”

Debe decir: “la S-endoglina está compuesta por 625 aminoácidos””

Sección *Materiales y métodos*, página 63, línea 14:

Donde dice: “resultados con el programa *Saint-a-gate* (BD)”

Debe decir: “resultados con el programa *Paint-a-gate* (BD)”

Sección *Resultados y Discusión*, página 80, línea 8:

Donde dice: “1.5 Activación, expresión y localización de Smad4”

Debe decir: “Expresión y localización de Smad4”

Sección *Resultados y Discusión*, página 118, tabla resumen:

Existen tres erratas en la columna S-endoglina *vs.* Mock en las siguientes filas: activación de Smad3 (sobra el igual), Expresión ARNm/proteína de Smad3 (la flecha que indica hacia abajo, debe indicar hacia arriba) y expresión de Smad4 (la flecha que indica hacia arriba debe indicar hacia abajo). Por lo tanto el cuadro debe quedar de la siguiente manera:

4.1. Sobre la ruta de señalización del TGFβ1

		L-endogлина vs. Mock	S-endogлина vs. Mock
Expresión de receptores		=	=
Expresión y activación de Smads			
Smad1	Activación	=	=
	Expresión ARNm/proteína	↑/=	=/=
Smad2	Activación	=	=
	Expresión ARNm/proteína	=	↓/=
Smad3	Activación	=	↑
	Expresión ARNm/proteína	↓/=	=/↑
Smad4		=	↓
Smad7		↓	↑
Elementos de respuesta al TGFβ1			
(BRE)2-Luc		↑	=
(ARE)-Luc		=	=
(CAGA)12-Luc		↓	↑

Sección *Discusión general*, página 124, línea 12:

Donde dice: “exones 12 y 13 no es eliminado”

Debe decir: “exones 13 y 14 no es eliminado”

Sección *Discusión general*, página 126, línea 13:

Donde dice: “algo que si ocurre con L-endoglina”

Debe decir: “algo que no ocurre con L-endoglina”

