

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA ANIMAL (II)

**PAPEL DE ENDOGLINA Y ALK-1 EN LA VÍA DE
SEÑALIZACIÓN DE TGF- β**

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO JAVIER BLANCO LÓPEZ

Madrid, 2006

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

Departamento de Fisiología Animal (II)



**PAPEL DE ENDOGLINA Y ALK-1 EN LA VÍA DE
SEÑALIZACIÓN DE TGF- β**

Memoria presentada por

FRANCISCO JAVIER BLANCO LÓPEZ

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)
bajo la dirección del Dr. Carmelo Bernabéu Quirante

VºBº del director de la tesis

VºBº del interesado

Carmelo Bernabéu Quirante

Francisco Javier Blanco López

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los proyectos:

SAF2000-0132 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de I+D: "Endogлина, un receptor endotelial implicado en la remodelación vascular". Período 2000-2003. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

PI020200 del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación tecnológica (I+D+I). Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, "Bases moleculares de la telangiectasia Hemorrágica hereditaria. Detección y relevancia funcional de mutaciones en el gen de endogлина". Período 2002-2005. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

SAF2004-01390 del Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de I+D: "Estudios sobre endogлина, un co-receptor de TGF-beta implicado en la patología humana". Período 2004-2007. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

El más terrible de los sentimientos es el sentimiento de tener la esperanza perdida.

Federico García Lorca.

Te pasas años y años investigando y, de repente, en un suspiro das con un gran descubrimiento y eres consciente, por primera vez en tu vida, de que conoces algo que a esa misma hora y ese mismo día nadie más sabe.

Judah Folkman, 1961.

*Descubridor de la angiogénesis inducida por tumores.
Premio Príncipe de Asturias 2004 junto con T. Hunter,
B. Vogelstein, R. A. Weinberg y Joan Massagué*





MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

D. CARMELO BERNABEU QUIRANTE, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA

Que D. Francisco Javier Blanco Lopez, Licenciado en Bioquímica por la Universidad de Granada, ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis Doctoral titulado **“Papel de endoglina y ALK1 en la vía de señalización de TGF-beta”** y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Fisiología Animal II de la Universidad Complutense de Madrid.

EL DIRECTOR,

Fdo. Dr. Carmelo Bernabeu Quirante

A Gema !

Son casi las ocho de la tarde. Salgo del CIB y voy escuchando Lagartija Nick. Voy pensando en cómo escribir la forma de dar las gracias a las personas que han estado a mi lado apoyándome en mi tesis que está a punto de terminar. Después de casi cinco años es difícil acordarse de todos pero lo voy intentando. Por supuesto recuerdo a Enrique, que con los pocos medios de los que disponía en esa época en Granada me dio las alas para volar por el universo de las moléculas. Merche se encargó, aquí en Madrid gracias a Carmelo, de enseñarme a moverlas como nadie mejor lo podría haber hecho. A lo largo de este tiempo siempre han estado Carmen y Luisa, que han tenido tiempo para escuchar mis disparates. Recuerdo que una vez hablando con Tilman, de cien ideas que me vienen a la cabeza, cinco podrían tener sentido y finalmente sale una (o ninguna). La ciencia es así, aunque Juan Francisco me ha mostrado que “eventualmente” en todos los disparates hay parte de verdad. Realmente ha sido un placer ser vuestro discípulo. La investigación es un mundo duro y difícil, como si de una carrera de fondo se tratase, en la que no gana siempre el mejor sino el que más aguanta. A pesar de esto, Ángel Corbí insiste en que la ciencia debe primar y no debo dejar que nadie me derrote. Y entonces recuerdo tantas palabras de ánimo de Soichi en el RIKEN, allá en Japón. Ojalá algún día nos volvamos a ver. Seguro que a Arturo le gustaría ir y organizaría un viaje con todo el mundo. El reportaje fotográfico correría a cargo de África, Eva y Lu. A la vuelta, Amaya, Diego, Esther, Carlos y Elena no creo que echaran de menos el *sushi*.

Van pasando las canciones y comienzo a escuchar a Los Planetas. Recuerdo entonces aquellas salidas por Huertas que a duras penas intentaban desconectarme del laboratorio. Y es que con Pedro Carmona, desde cuando aún se pagaba en pesetas, la noche siempre tiene un momento para experimentos. Es como un vicio que tiene. Aún así, seguimos pensando que si no triunfamos con la música nos dedicaremos a la ciencia.

He salido ya de Madrid, y la canción “cada vez” me recuerda a todas las personas a las que me gustaría sentir su corazón y que ya no están; aunque seguro que no nos han olvidado allí donde se encuentren, observándonos cada una desde su rinconcito de cielo.

Los Enemigos suenan a continuación, formando parte esencial de la banda sonora de esta tesis. Me vienen recuerdos de Andrés Castillo y todos mis amigos de Úbeda, Luis, Ángel S, Nano, Acapulco, Ángel M, Murillo, Fernando, Paco M, José María, Fran S, Isra. Me suelen preguntar que cuándo voy a inventar algo. A veces les digo entre risas que soy investigador y no inventor. Carmen siempre me pregunta cómo me va y sobre qué investigo. Siempre me dice que qué cosas más raras. La mayoría me dicen que me aplique y a ver si les saco de pobres y pienso, haciendo alegoría a un dicho de mi pueblo, que la venida de los cigarrones será primero. Cuando descubra algo, como me dijo Lucía, siempre habrá sitio para una molécula H. Pienso también que algún día debería disculparme con María V, Dani, Julia, Felipe, María G, Emilia, Pedro, Lourdes, Juanjo, Jacinto, Francis, Antonio, por las veces en las que he sido un poco pesadito cuando salía una conversación sobre moléculas y les ponía la cabeza como un bombo.

Los Piratas hacen su aparición antes de llegar a casa y me gustaría ser también como aquella canción de los años ochenta, *Bloody Maries* en el bar, un *déjà vu*, *Matrix* está cambiando. A cada rato voy pensando en Gema. Alucino con ella desde hace más de nueve años. Me escucha, me soporta, nos reímos y, sobre todo, es mi amiga. Somos enfermos, pero es que nunca tuve una enfermedad más dulce.

Dentro de unos días defendiendo la tesis. Me muero de ganas porque mi familia estará y por fin sabrán en qué he estado trabajando todo este tiempo. Hasta entonces sigo hablando con las nubes, ellas me enseñan lo que tuve.

ALK-1: Kinasa similar al receptor de activina 1

ALK-5: Kinasa similar al receptor de activina 5

BRE: Elemento de respuesta a BMP (proteína morfogenética del hueso)

CAGA: Secuencia consenso para la unión de Smad3

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

Dox: Doxiciclina

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

FBS: Suero bovino fetal

HHT: Telangiectasia hemorrágica hereditaria, síndrome de Rendu-Osler-Weber

kDa: Kilodaltons

MBS: Tampón MES salino

MES: Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNA: Ácido ribonucleico

SA β Gal: Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico

siRNA: Pequeñas moléculas de RNA de interferencia

SP-A/-G: Proteína A/G acoplada covalentemente a sefarosa

T β R: Receptor de TGF- β

TBS: Tampón Tris [Tris(hidroximetil)aminometano, H₂NC(CH₂OH)₃] salino

TGF- β : Factor de crecimiento transformante- β

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

1.1.	Angiogénesis	2
1.2.	La superfamilia del TGF- β	3
1.3.	Receptores de TGF- β	5
1.3.1.	Receptores tipo II	5
1.3.2.	Receptores tipo I	5
1.3.2.1.	ALK-5	7
1.3.2.2.	ALK-1	8
1.3.3.	Las proteínas Smad. Modelo de señalización de TGF- β	9
1.4.	Endogлина	12
1.4.1.	Distribución celular	12
1.4.2.	Características bioquímicas de endogлина	12
1.4.3.	Funciones que desempeña endogлина en la célula	14
1.4.4.	Endogлина y ALK-1 como genes responsables de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria	15
1.5.	Caveolas	17
1.5.1.	Caveolinas	17
1.5.2.	Regulación de la vía de señalización de TGF- β por caveolina-1	19
II.	OBJETIVOS	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1.	Cultivos celulares	24
3.2.	Anticuerpos	25
3.3.	Vectores de expresión y transfección	25
3.4.	Construcción y expresión de la proteína de fusión EndoEC-Fc	26
3.4.1.	Obtención del vector de expresión para EndoEC-Fc	26
3.4.2.	Generación de transfectantes estables productores de la proteína recombinante EndoEC-Fc	27
3.5.	Ensayos de proliferación celular	27

3.6.	Citometría de flujo	28
3.7.	Microscopía de inmunofluorescencia	29
3.8.	Inmunoprecipitación de proteínas	29
3.9.	Ensayos de arrastre <i>in vitro</i> (<i>pull-down</i>)	30
3.10.	Fraccionamiento celular para la obtención de caveolas	30
3.11.	Electroforesis e inmunodetección (<i>western-blot</i>) de proteínas	30
3.12.	Estudio de la señalización de TGF- β	31
3.12.1.	Ensayos de actividad reportera	31
3.12.2.	Ensayos de transactivación con el sistema reportero GAL4	32
3.13.	Inteferencia de la expresión génica por pequeñas moléculas de RNA (<i>knock-down</i>)	32
3.14.	Transcripción reversa mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	33
3.15.	Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia	34
3.16.	Análisis estadístico de los resultados	34
IV.	RESULTADOS	
4.1.	Endoglina se asocia directamente con ALK-1	36
4.1.1.	La interacción endoglina/ALK-1 implica a sus regiones extracelulares	36
4.1.2.	Los dominios citoplásmicos de endoglina y ALK-1 interaccionan entre sí	40
4.2.	Endoglina favorece la señalización de TGF- β vía ALK-1	41
4.2.1.	El dominio extracelular de endoglina promueve la señalización vía ALK-1	43
4.2.2.	Endoglina induce la actividad del promotor de Id1 en respuesta a TGF- β vía ALK-1	45
4.2.3.	La ruta de señalización de TGF- β vía ALK-5 se bloquea en presencia de endoglina	48
4.2.4.	La quimera EndoEC-Fc mimetiza los efectos de la endoglina endógena	50
4.3.	La isoforma corta de endoglina es capaz de interaccionar con los receptores de TGF- β ...	52
4.3.1.	Endoglina-S aparece en células senescentes	52
4.3.2.	La región citoplásmica de endoglina-S interacciona con ALK-5 y ALK-1	56
4.4.	Endoglina-S modula de forma distinta a endoglina-L las vías de señalización de TGF- β /ALK-5 y TGF- β /ALK-1	59
4.4.1.	La expresión de endoglina-S induce la actividad del promotor de PAI-1 mientras que reprime la del promotor de Id1 en respuesta a TGF- β	62

4.5.	Localización subcelular de ALK-1 en caveolas	63
4.5.1.	ALK-1 se detecta en la fracción caveolar de células endoteliales	64
4.6.	ALK-1 interacciona con el dominio de andamiaje (SD) de caveolina-1	65
4.7.	La localización de ALK-1 en caveolas induce su vía de señalización	68
4.7.1.	Caveolina-1 estimula la vía de señalización TGF- β /ALK-1	69
4.7.2.	La cooperación de caveolina-1 sobre la vía TGF- β /ALK-1 depende de su dominio de andamiaje	71
4.7.3.	El bloqueo específico de caveolina-1 por siRNA reduce la señalización de ALK-1 . .	72
V.	DISCUSIÓN	
5.1.	La interacción de endoglina con ALK-1 favorece su vía de señalización	76
5.1.1.	Diseción y consecuencias de la interacción endoglina/ALK-1	76
5.1.2.	¿ALK-5 o ALK-1?	78
5.2.	La isoforma endoglina-S antagoniza el efecto de endoglina-L en la vía de señalización de TGF- β	80
5.2.1.	Papel de endoglina-S en la senescencia endotelial	80
5.3.	Caveolina-1 interacciona con ALK-1 y potencia su vía de señalización	82
5.3.1.	Paralelismo funcional entre ALK-1 y caveolina-1	83
5.4.	Comentario final y perspectivas	84
VI.	CONCLUSIONES	87
VII.	BIBLIOGRAFÍA	89
VIII.	ANEXO	106

I. INTRODUCCIÓN

El endotelio vascular es una monocapa de células que tapiza el interior de los vasos sanguíneos y que se encuentra en contacto directo con el torrente circulatorio. Las células endoteliales que lo componen son las encargadas principales de regular diversas funciones fisiológicas como el tono vascular, el intercambio de nutrientes con los tejidos y el propio crecimiento de los vasos, proceso denominado angiogénesis. El estudio de los mecanismos subyacentes a este proceso ha sido y es una de las principales áreas en investigación biomédica.

1.1. ANGIOGÉNESIS

Durante la embriogénesis, el sistema cardiovascular es el primer órgano en desarrollarse y llegar a ser funcional, permitiendo el crecimiento y el mantenimiento de la integridad de los órganos. Son dos los procesos responsables de la formación de los vasos sanguíneos: (i) vasculogénesis, que implica el principal proceso de diferenciación *in situ* de células endoteliales a partir del mesodermo y su organización en plexos capilares primarios y (ii) angiogénesis, que define la formación de nuevos vasos sanguíneos por un proceso de brotes y ramificación a partir de vasos preexistentes (Pepper, 1997). Además de su papel en el desarrollo, la angiogénesis es requerida para el mantenimiento de la integridad funcional y estructural del organismo en la vida postnatal. En este caso, la angiogénesis es un proceso delicadamente regulado que está generalmente limitado por demandas metabólicas de los tejidos en cuestión.

La angiogénesis puede ser vista como dos fases separadas pero equilibradas. Una primera fase de activación que incluye: un incremento en la permeabilidad vascular, degradación de la membrana basal y proliferación y migración de células endoteliales. Después, una fase de resolución que incluye la inhibición de la proliferación y migración de las células endoteliales, reconstitución de la membrana basal y estabilización del vaso mediante el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso (Hanahan & Folkman, 1996). Por lo tanto, son numerosos los factores implicados en la regulación de ambas fases, algunos de los cuales se resumen en la Tabla 1. Así por ejemplo, el contacto de las células endoteliales con las mesenquimales hace que se libere factor de crecimiento transformante, TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), provocando que éstas se diferencien a pericitos y células de músculo liso (Hirschi *et al.*, 1998). También, los pericitos contribuyen en parte a la supervivencia y estabilidad de la célula endotelial mediante la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). El reclutamiento de células mesenquimales en el nuevo vaso está mediado por factores tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor-BB*) y TGF- β (Li *et al.*, 2001). Igualmente, el factor de crecimiento fibroblástico básico, bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), es un potente inductor de la migración y proliferación de las células endoteliales y la angiopoyetina 1 (Ang1) induce la formación de brotes capilares por su efecto quimioatrayente. Por el contrario, la angiopoyetina 2 (Ang2), la trombospondina-1 (TSP-1) y la endostatina son ejemplos de potentes factores inhibidores de la angiogénesis (Klagsbrun & Moses, 1999). En este sentido, el TGF- β puede actuar también como un inhibidor de la angiogénesis, ya que se ha demostrado que en

determinadas circunstancias es capaz de inhibir la proliferación de las células endoteliales (Li *et al.*, 2000).

ANGIOGÉNESIS			
FASE DE ACTIVACIÓN		FASE DE RESOLUCIÓN	
PROCESO	Aumento	Permeabilidad celular	Disminución
	Degradación	Membrana basal	Síntesis
	Aumento	Migración	Disminución
	Aumento	Proliferación	Disminución
MEDIADORES	bFGF, Ang1, IL-8, PlGF, VEGF, PDGF-BB, TGF- β		Ang2, TSP-1, angiostatina, endostatina, troponina, TGF- β

Tabla 1. Etapas de la angiogénesis. bFGF, factor de crecimiento fibroblástico básico; Ang1, angiopoyetina 1; IL-8, interleuquina-8; PlGF, factor de crecimiento placentario; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; PDGF-BB, factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB; TGF- β , factor de crecimiento transformante- β ; Ang2, angiopoyetina 2; TSP-1, trombospondina-1.

El TGF- β se considera una de las citoquinas más pluripotenciales de organismo y este papel dual en el proceso de angiogénesis contribuye a su versatilidad. Esclarecer los mecanismos moleculares subyacentes responsables de su función pivote en el proceso de angiogénesis es el principal objetivo de este trabajo de investigación.

1.2. LA SUPERFAMILIA DE TGF- β

Descrito originalmente por Anita B. Roberts en 1981 por su capacidad de inducir el crecimiento de fibroblastos de riñón de rata *in vitro*, podríamos decir que el TGF- β es la citoquina más multifuncional presente en los organismos por sus efectos tanto inhibitorios como estimulatorios.

La superfamilia del TGF- β , de la que éste es el miembro modelo, está presente en una gran variedad de organismos, desde insectos hasta humanos, e incluye factores de crecimiento y diferenciación tales como las proteínas morfogenéticas del hueso, BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), activina, proteínas Dpp (*decapentaplegic complex*) relacionadas con Vg, DVR (*Dpp-Vg1-related*), dorsalina, proteína nodal, hormona antimuleriana, MIS (*Müllerian Inhibiting Substance*), inhibinas, factores de crecimiento y diferenciación, GDF (*Growth and Differentiation Factor*), y factor neurotrófico derivado de células gliales, GDNF (*Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*) (Massagué, 1998). Durante el desarrollo estos factores regulan la expresión de un patrón de expresión génico determinado e influyen en varios comportamientos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, producción de matriz extracelular y muerte celular. En adultos, están implicados en la reparación de tejidos y regulación del sistema inmune, así como en muchos otros procesos.

En cuanto al TGF- β , han sido descritas cinco isoformas hasta el momento, todas ellas con un elevado porcentaje de homología (65% aproximadamente). En mamíferos encontramos las isoformas β 1, β 2 y β 3, mientras que la β 4 es exclusiva de aves (Jakowlew *et al.*, 1991) y la β 5 de ranas (Vempati &

Kondaiah, 1998). Como se resume en la Figura 1, cada factor es sintetizado como complejo latente compuesto por un dímero del propéptido TGF- β . Después de la síntesis, pero antes de la secreción, una furin-convertasa escinde el propéptido quedando así la región LAP (*Latency-Associated Peptide*) asociada no covalentemente al TGF- β biológicamente activo (Dubois *et al.*, 1995). En la mayoría de las células, la liberación eficiente de esta forma latente del TGF- β requiere de su asociación a una tercera proteína denominada LTBP (*Latent TGF- β -Binding Protein*), formando así el gran complejo latente del TGF- β . Mientras que el extremo C-terminal de la LTBP se une al TGF- β latente por un puente disulfuro, el N-terminal se ancla a proteínas de la matriz extracelular. Una vez ahí, el TGF- β es liberado en su forma biológicamente activa por la acción de proteasas, como plasmina o elastasa, o por entrecruzamiento mediado por transglutaminasa 2 (TG2) de LTBP y/o LAP. De este modo, el TGF- β activo se unirá a sus receptores de membrana para disparar la compleja vía de señalización (Miyazono *et al.*, 1993; Saharinen *et al.*, 1999).

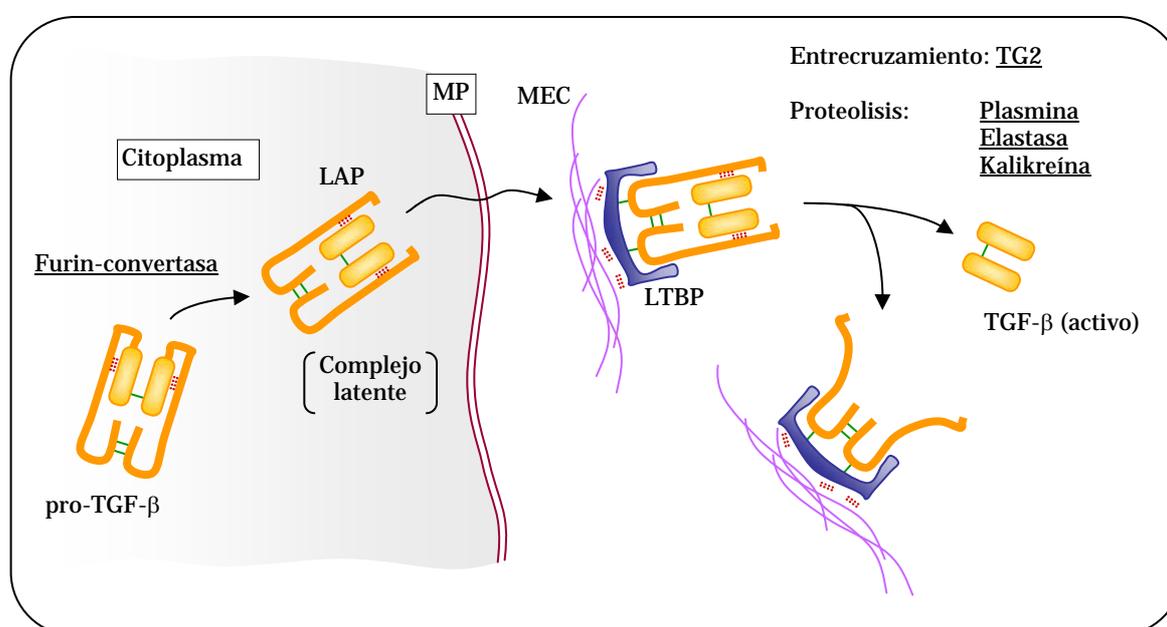


Figura 1: Esquema de la activación del TGF- β . Las líneas verdes representan puentes disulfuro, mientras que los puntos rojos son interacciones no covalentes. MP, membrana plasmática; LAP, péptido asociado a latencia; LTBP, proteína de unión al TGF- β latente; MEC, matriz extracelular; TG2, transglutaminasa 2, también denominada tisular.

En cuanto a su estructura, las isoformas presentan un patrón tridimensional similar debido a su alto grado de homología. Así por ejemplo, el TGF- β 1 se compone de dos cadenas polipeptídicas N-glicosiladas de 12,5 kDa unidas por un puente disulfuro tal y como se demostró por espectroscopía de resonancia magnética multinuclear (Hinck *et al.*, 1996). Existen nueve residuos de cisteína conservados, de los que ocho se encuentran formando cuatro puentes disulfuro intracatenarios mientras que el noveno es el responsable de la homodimerización. En cuanto a las regiones no conservadas (un 40% de la secuencia), son las responsables, en parte, de la especificidad en la unión al receptor y, por tanto, la diversidad de respuestas celulares inducidas por los diferentes miembros de la superfamilia. El estudio de esta diversidad es clave para entender por qué alteraciones en la actividad de estos factores han sido relacionadas con procesos patológicos tales como fibrosis, inmunosupresión y cáncer, entre otros.

1.3. RECEPTORES DE TGF- β

Para ejercer sus funciones biológicas, el TGF- β debe ser captado por sus receptores específicos, siendo de vital importancia tanto la isoforma como la composición del complejo receptor. Éste es expresado por la mayoría de tipos celulares presentes en un organismo y, atendiendo a sus características estructurales y funcionales, contiene dos componentes principales denominados como receptor tipo I y tipo II (Derynck & Feng, 1997; Miyazono *et al.*, 1994). Los receptores tipo I y tipo II transmiten la señal al interior celular por sus actividades serina/treonina quinasa citoplásmicas (ten Dijke *et al.*, 1996). Como sustratos de esta actividad catalítica destacan, además de ellos mismos, los miembros de la familia de las proteínas Smad, que serán descritos más adelante. Los receptores de tipo II son capaces de interactuar con distintas isoformas de receptor tipo I formando complejos heteroméricos y determinando la especificidad de la unión de ligando (Attisano *et al.*, 1993; Ebner *et al.*, 1993; Lebrin *et al.*, 2005), mientras que la especificidad de la respuesta biológica al ligando en un determinado tipo celular está definida por la variante del receptor tipo I implicado en el complejo (Cárcamo *et al.*, 1994; Shi & Massagué, 2003). En la Figura 2 se refleja la especificidad de la respuesta celular en detalle.

1.3.1. Receptor tipo II

En humanos, el receptor tipo II de TGF- β , o T β R-II, fue clonado por Lin *et al.* en 1992. Este receptor es expresado por la mayoría de tipos celulares y lo hace como un homodímero (Chen & Derynck, 1994; Henis *et al.*, 1994). Cada una de sus dos cadenas de unos 70-75 kDa contiene 565 aminoácidos y presenta un alto grado de N-glicosilación en su corta región extracelular. Ya que el T β R-II es capaz de unir TGF- β *per se* (Wrana *et al.*, 1992), este dominio se consiguió cristalizar por primera vez formando un complejo con TGF- β 3 y gracias a los estudios de difracción de rayos X se pudo demostrar que un conjunto característico de cisteínas cercanas a la región transmembrana está implicado en la formación, mediante puentes disulfuro, del receptáculo para el ligando, mientras que la estabilización de éste se produce por puentes de hidrógeno, de los que el formado por el Asp42 (T β R-II) con la Arg92 (TGF- β 3) es clave (Hart *et al.*, 2002). A continuación y tal como se esquematiza en la Figura 3, su extenso dominio citoplásmico se caracteriza por poseer actividad serina/treonina quinasa, responsable del comienzo de la transmisión de señal.

En la célula, este receptor se encuentra constitutivamente fosforilado, incluso en ausencia de ligando, en serinas y treoninas de su dominio citoplásmico (Lin *et al.*, 1992), aunque el estado de activación se define en función de cuáles son dichos residuos. En concreto, mientras que las fosforilaciones en Ser213 y Ser409 son activadoras, la de Ser416 es responsable de su modulación negativa (Heldin *et al.*, 1997; Luo & Lodish, 1997).

1.3.2. Receptores tipo I

Los receptores tipo I, abreviados como T β R-Is, presentan unas características bioquímicas similares a las del T β R-II (ver Figura 3). Son también proteínas homodiméricas transmembrana cuyas cadenas polipeptídicas poseen un peso molecular algo menor (55-65 kDa) con actividad serina/treonina

quinasa citosólica. Presentan también N-glicosilación en su dominio extracelular, además del conjunto de cisteínas característico probablemente responsable de la configuración estructural adecuada para la interacción con el ligando.

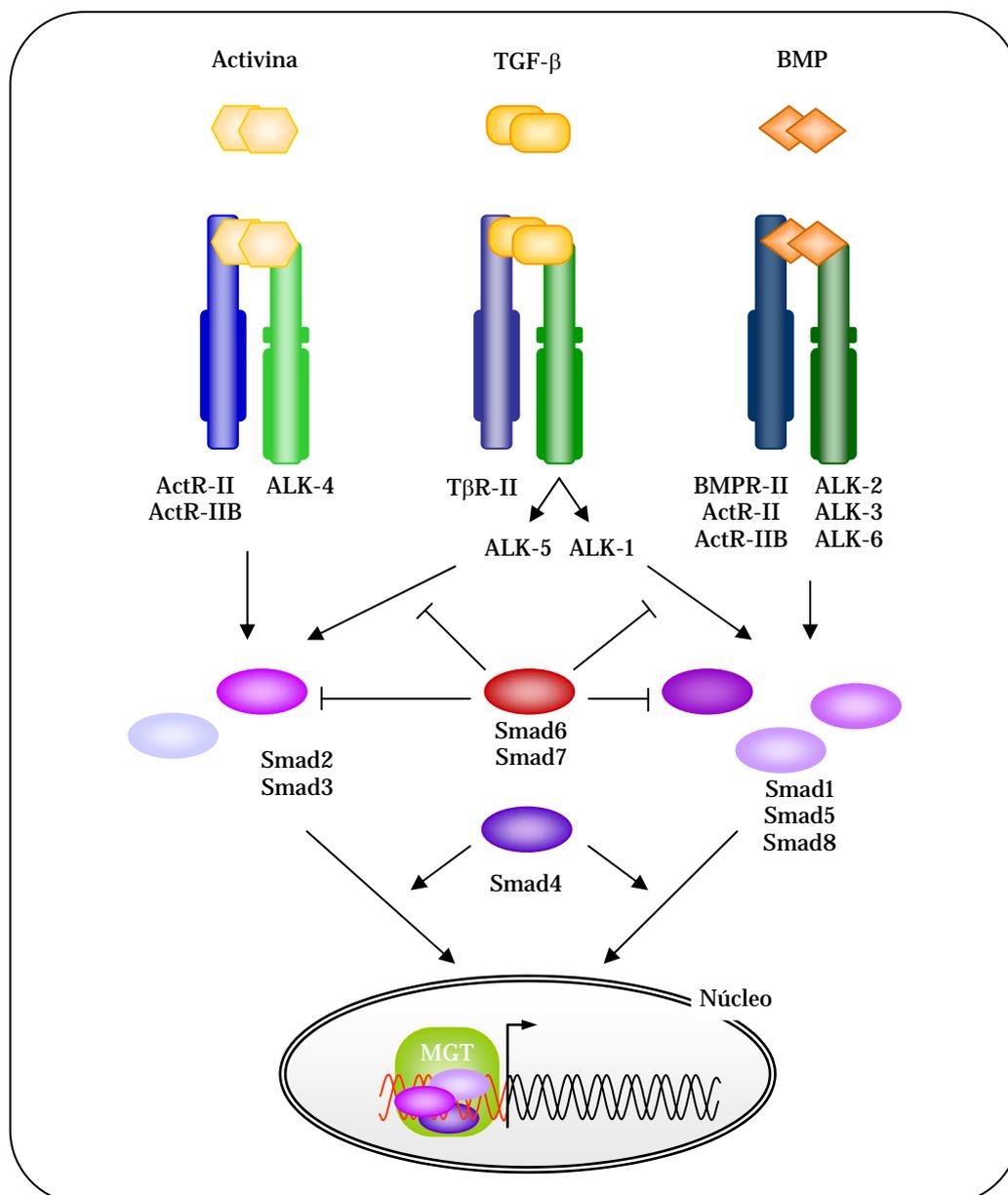


Figura 2: Esquema de la especificidad en la respuesta celular a la superfamilia del TGF-β. MGT, maquinaria general de la transcripción.

A diferencia del TβR-II, los TβR-Is no son capaces de unir ligando por sí solos (Wrana *et al.*, 1992) y necesitan del TβR-II para su activación por fosforilación. Ésta se produce en residuos de serina altamente conservados en una pequeña región, a continuación del transmembrana y previa al dominio catalítico, que abarca unos 30 residuos y contiene la secuencia Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly, por lo que se denomina dominio GS (Massagué, 1998; Wieser *et al.*, 1995). Fosforilaciones fuera de dicho dominio GS, como la Ser165, actúan como moduladoras de la actividad (Heldin *et al.*, 1997; Souchelnytskyi *et al.*, 1996).

En 1994, el grupo de Yamashita *et al.* (1994b) consiguió demostrar, empleando [125 I]TGF- β , que tras la unión del ligando se induce la formación de complejos hetero-oligoméricos entre los receptores. Aunque la estequiometría aún no está bien esclarecida, se sabe que se forma como mínimo un complejo heterotetramérico compuesto por dos T β R-II y dos T β R-I (Gilboa *et al.*, 1998; Luo & Lodish, 1996; Weis-García & Massagué, 1996). Incluso, recientemente se ha descrito que pueden coexistir variantes de T β R-I en dichos complejos (Goumans *et al.*, 2003b). La composición de este complejo se puede complicar aún más si se tiene en cuenta la presencia de co-receptores como endoglina y betaglicano, que actuarían como moduladores de las respuestas celulares a TGF- β (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; López-Casillas *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1991; Yamashita *et al.*, 1994a).

Como se mencionó anteriormente, las acciones del TGF- β son altamente dependientes del contexto celular y del tipo de T β R-I presente en el complejo receptor. Así, éste puede actuar como inhibidor o estimulador de la angiogénesis. De hecho, han sido descritas dos moléculas distintas de receptor tipo I en células endoteliales, entre otras; las cuales serán detalladas en los siguientes apartados.

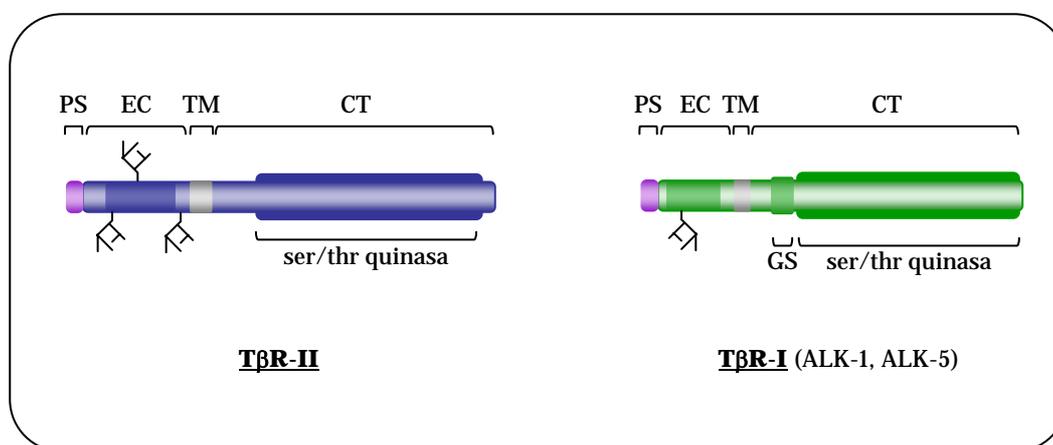


Figura 3: Esquema de los receptores de TGF- β , T β R-II y T β R-I. PS, péptido señal; EC, dominio extracelular; TM, región transmembrana; CT, dominio citoplásmico; GS, dominio GS rico en cisteína y glicina.

1.3.2.1. ALK-5

Fue clonado a partir de células de eritroleucemia humanas (HEL) por Franzén *et al.*, (1993) tras la búsqueda de nuevos receptores con actividad serina/treonina quinasa mediante PCR usando oligonucleótidos cebadores degenerados. Ya que previamente habían sido identificados cuatro miembros con actividad quinasa similar al receptor de activina (Attisano *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1993), se le adjudicó la nomenclatura de ALK-5. A diferencia del T β R-II, sólo se conoce la estructura atómica de la región citoplásmica. Ésta fue cristalizada por primera vez asociada no covalentemente al factor inhibidor FKBP12 (*FK506 Binding Protein*) (Huse *et al.*, 1999), un miembro de la familia de las inmunofilinas que media los efectos inmunosupresores de FK506 y rapamicina (Chen *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996).

Estructuralmente, cada cadena polipeptídica de ALK-5 consta de 503 aminoácidos y se glicosila en un único residuo de arginina dentro de la caja de cisteínas en su región extracelular, por lo que migra a una altura correspondiente a 55 kDa de peso molecular en electroforesis de SDS-PAGE (a veces se

nombra como RI p55). Interacciona con el complejo T β R-II/TGF- β y a continuación es fosforilado por el T β R-II en su dominio GS dando lugar a su activación. ALK-5 no es sustrato de sí mismo, ejerciendo su actividad serina/treonina quinasa principalmente sobre las proteínas Smad, en concreto Smad2 y 3 (Heldin *et al.*, 1997; Shi & Massagué, 2003; Wieser *et al.*, 1995).

En cuanto a su expresión, ALK-5 se distribuye ampliamente en distintos tipos celulares del organismo; como por ejemplo las células endoteliales, donde dirige la señal del TGF- β hacia procesos antiangiogénicos tales como la quiescencia y parada de la proliferación (Goumans *et al.*, 2003a; Pepper, 1997). Y es en este contexto endotelial donde la respuesta celular a TGF- β debe estar finamente regulada, ya que ALK-5 no es el único receptor tipo I expresado. Así, la señalización a través de uno u otro receptor da lugar a un interesante punto de control de la respuesta celular a TGF- β .

1.3.2.2. ALK-1

Denominado en un primer momento como receptor tipo I de la superfamilia del TGF- β (TSR-I, *TGF- β Superfamily Receptor Type I*) fue posteriormente caracterizado como ALK-1 por su similitud con el receptor tipo II de activina, ya que fue obtenido a partir de células endoteliales de cordón umbilical humano por PCR usando oligonucleótidos degenerados de dicho receptor (Attisano *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1993).

La secuencia primaria de ALK-1 consta, al igual que ALK-5, de 503 aminoácidos. Sin embargo, el nivel de homología entre ambos no llega al 60%, por lo que este hecho determinaría probablemente una distinta especificidad en la respuesta celular al ligando. De hecho, como se mostró en la Figura 2, ALK-1 transduce la señal del TGF- β hacia el núcleo a través de miembros de las Smad relacionados con ALK-5 distintos, esto es, ejerciendo su actividad serina/treonina quinasa específicamente sobre Smad1, 5 y 8 (Chen & Massagué, 1999; Lebrin *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2000).

La expresión de ALK-1 está restringida principalmente a células endoteliales, aunque también se ha detectado en sitios específicos de interacción epitelial-mesenquimal, monocitos y células de carcinoma pancreático (Jonson *et al.*, 2001; Mo *et al.*, 2002; Roelen *et al.*, 1997). Además, en el endotelio, ALK-1 es un marcador de arterias que se induce durante la angiogénesis de éstas (Seki *et al.*, 2003). Actualmente, hay crecientes evidencias de que su señalización en la célula es requerida para el establecimiento de las diferencias moleculares, funcionales y anatómicas entre arterias y venas (Sorensen *et al.*, 2003; Urness *et al.*, 2000). Asimismo, se han descrito mutaciones en el gen de ALK-1 como responsables de una haploinsuficiencia vascular denominada telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 2 (HHT2), que será descrita en detalle más adelante.

Durante mucho tiempo, se ha considerado a ALK-1 como un receptor huérfano ya que era incapaz de inducir la activación del inhibidor del activador del plasminógeno-1, PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) (ten Dijke *et al.*, 1994). No obstante, en 1999 se demostró, empleando una construcción quimera en la que se combinaba la región extracelular de ALK-1 con la transmembrana y citoplásmica de ALK-5, que TGF- β 1, β 3 y otro componente aún indeterminado del suero eran capaces de inducir la expresión de PAI-1 en colaboración con el T β R-II (Lux *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000). De estos datos, junto con el trabajo de Pepper *et al.* (1997), surgió la idea de que los genes diana de TGF- β podrían depender del T β R-I empleado para transmitir la señal a la célula. De hecho, varios grupos han demostrado la expresión génica diferencial dependiente de ALK-5 o ALK-1 mediante chips de DNA, aunque no siempre se ha

llegado a las mismas conclusiones (Lamouille *et al.*, 2002; Matsuyama *et al.*, 2003; Ota *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006). Aún así, lo que parece estar claro es que ambos receptores tipo I son la clave del papel dual que ejerce el TGF- β para regular el proceso de angiogénesis (Goumans *et al.*, 2003a; Goumans *et al.*, 2003b; Goumans *et al.*, 2002), aunque los mecanismos subyacentes no están bien esclarecidos aún.

1.3.3. Las proteínas Smad. Modelo de señalización del TGF- β .

Las proteínas Smads son los principales sustratos directos de los receptores del TGF- β y una vez fosforiladas transmiten la señal hasta el núcleo, donde en colaboración con otros factores de transcripción regulan positiva o negativamente la expresión de genes diana. Forman un grupo de factores de transcripción presentes en la mayoría de organismos, desde nematodos hasta mamíferos (Attisano & Wrana, 2000; Massagué, 1998; Massagué *et al.*, 2005; Moustakas *et al.*, 2001; Piek *et al.*, 1999). Han sido identificadas a partir de 1995 y su nomenclatura viene por su homología con los factores Sma, de *Caenorhabditis elegans*, y MAD (*Mothers against dpp*), de *Drosophila melanogaster*. Atendiendo a sus características funcionales, se han dividido en tres subclases: activadas por receptor, R-Smad; mediadoras comunes (Co-Smads); e inhibitorias (I-Smads). Aún así, todas guardan unas características estructurales comunes que se muestran en la Figura 4.

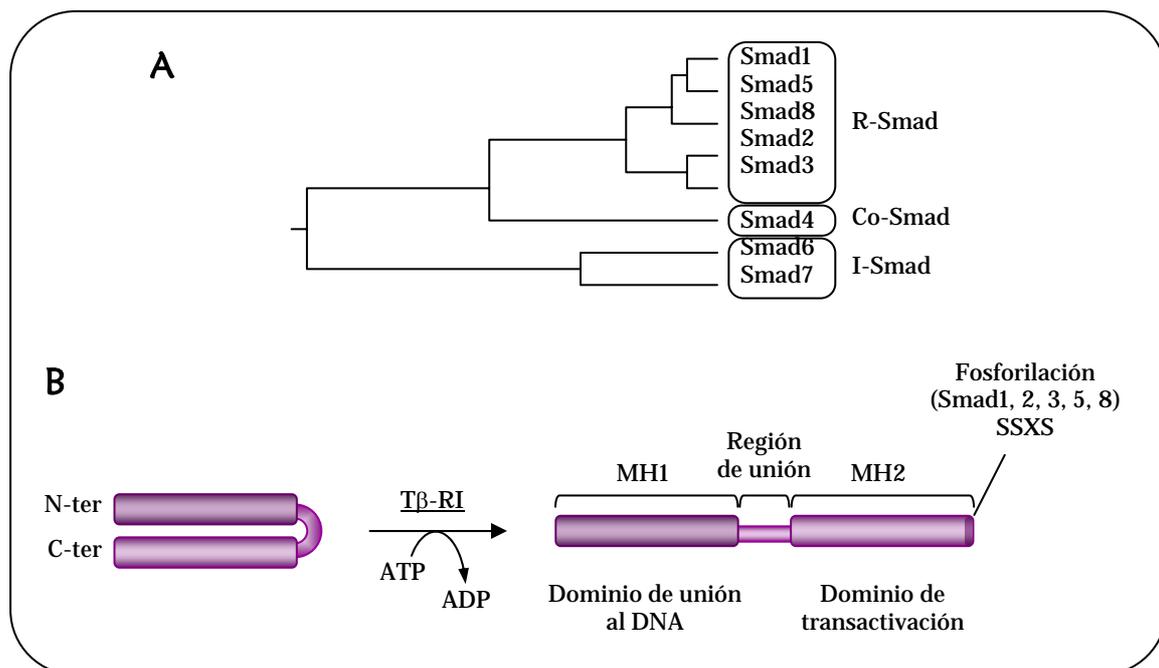


Figura 4: Las proteínas Smad. **(A)** Dendrograma que indica el nivel relativo de identidad en cuanto a sus secuencias aminoacídicas. **(B)** Estructura de las Smads. La fosforilación en la secuencia SSXS en el extremo C-terminal hace que los dominios MH1 y MH2 se disocien, quedando la proteína biológicamente activa.

En resumen, las proteínas Smad constan de unos 500 aminoácidos que se organizan en dos dominios globulares conservados, MH1 y MH2 (*Mad-homology 1 and 2*), conectados por una región variable de unión. En las R-Smads y Smad4 (única Co-Smad en mamíferos) el dominio MH1 contiene una secuencia de localización nuclear, NLS, y una estructura en horquilla- β para su unión al DNA, excepto en

el caso de Smad2 (Dennler *et al.*, 1998). Las I-Smads son las más divergentes y carecen del dominio MH1 (Imamura *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997). La región de unión de las R-Smads contiene múltiples sitios de fosforilación por MAPKs como Erk, quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y otras proteín-quinasa. En las R-Smads e I-Smads, la región de unión contiene un motivo PY, prolina-tirosina, para el reconocimiento de los dominios WW de las ubiquitina ligasas Smurf (*Smad ubiquitination-related factor*), que median su degradación vía proteasoma (Izzi & Attisano, 2004; Wrana, 2000). En el caso de Smad4, la región de unión contiene una secuencia de exportación nuclear, NES, por lo que está en continuo recambio entre el citoplasma y el núcleo. Por otro lado, el dominio MH2 contiene un bolsillo de carácter básico capaz de interactuar con las serinas fosforiladas del dominio GS de los receptores tipo I (caso de las R-Smads) y del motivo SSXS en el extremo C-terminal de las R-Smads para su homo-/heteromerización con Smad4 (Chacko *et al.*, 2001; Chacko *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2001). Además, en este dominio MH2 de las R-Smads se localiza una estructura denominada pasillo hidrofóbico que sirve como sitio de múltiples interacciones con otros factores; como SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*), que regula la disponibilidad de Smad2 y 3 para el T β R-I (Derynck & Zhang, 2003; Lutz & Knaus, 2002; Massagué *et al.*, 2005; Moustakas *et al.*, 2001; Shi & Massagué, 2003; Tsukazaki *et al.*, 1998).

Las R-Smads son dianas directas de la actividad serina/treonina quinasa de los T β R-Is, siendo fosforiladas en la secuencia SSXS cerca del extremo C-terminal (Macías-Silva *et al.*, 1996). Son críticas para la especificidad de la respuesta biológica al TGF- β . Así, Smad2 y 3 son fosforiladas por los receptores de activina y ALK-5, mientras que Smad1, 5 y 8 son activadas por los de BMP y ALK-1 (Figura 2) (Chen & Massagué, 1999; Kretschmer *et al.*, 2003; Kretschmar *et al.*, 1997; Lagna *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1996b).

El mecanismo establecido para la señalización del TGF- β se resume en la Figura 5. El T β R-II une el ligando y recluta al T β R-I, fosforilándolo en el dominio GS activándose así su dominio catalítico. De este modo, una vez activado el T β R-I, fosforila a las R-Smads, lo que conduce a su heteromerización con Smad4. Este complejo se transloca al núcleo en un mecanismo en el que la intervención de importinas no siempre es necesaria pero sí su interacción con nucleoporinas (proteínas del poro nuclear) (Chen *et al.*, 2005; Reguly & Wrana, 2003; Xiao *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003). Allí se une al DNA por el reconocimiento de secuencias consenso y/o formando complejos con otros componentes de la maquinaria de transcripción como AP-1, ATF-2, AML-2, TFE3, Sp1, CBP/p300, HIF, etc. (Hocevar *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2000; Massagué *et al.*, 2005; Moustakas *et al.*, 2001; Sánchez-Elsner *et al.*, 2004; ten Dijke *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1998), modulando la expresión de genes específicos. Este modelo secuencial fue demostrado gracias a la generación de una forma mutada del T β R-I ALK-5 constitutivamente activada (sustitución Thr \rightarrow Asp en posición 204, T204D), la cual era capaz de ejecutar la señal del TGF- β en ausencia de T β R-II (Wieser *et al.*, 1995). La generación de estos T β R-Is mutantes activados permanentemente de forma independiente del T β R-II, así como los quinasa deficientes, son de gran utilidad a la hora de estudiar la vía de señalización de los receptores de TGF- β .

Por último, Smad6 y 7 (I-Smads) son capaces de inhibir la señal de TGF- β al interactuar tanto con los receptores, impidiendo así la fosforilación de las R-Smads, como con los complejos heteroméricos R-Smad/Smad4, bloqueando así su translocación al núcleo. La expresión de estas Smads inhibitorias está inducida por miembros de la propia superfamilia del TGF- β , lo que da lugar a un mecanismo de retroalimentación negativa (*negative feed-back regulation*) de la propia vía de señalización. Incluso, la existencia de fosfatasa que desfosforilan específicamente los receptores y las R-Smads contribuye a la

terminación de la señal de TGF- β (Chen *et al.*, 2006; Hill, 2006; Maeda *et al.*, 2006; Valdimarsdottir *et al.*, 2006).

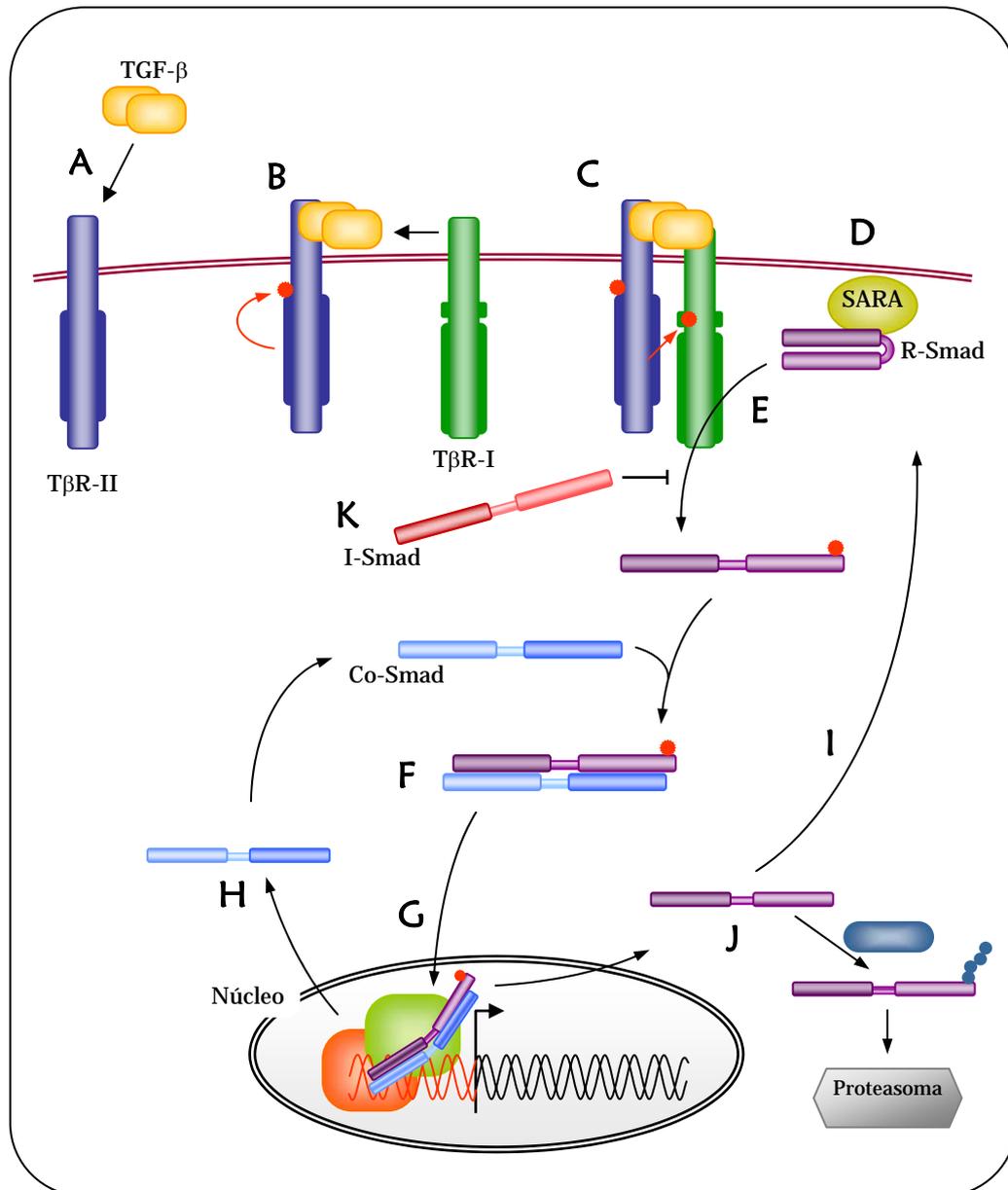


Figura 5: Diagrama esquemático de la señalización del TGF- β desde la membrana hasta el núcleo. El receptor tipo II capta el TGF- β (A), recluta (B) y fosforila al tipo I en su dominio GS (C). Así, éste es capaz de fosforilar las R-Smads (E), presentadas en la membrana plasmática por la proteína SARA (D). Se forma el complejo heteromérico con Co-Smad (F) y se transloca al núcleo mediante un mecanismo mediado por la interacción directa con nucleoporinas y en menor medida con importinas (G). Tanto la Co-Smad (H) como las R-Smads (I) son recicladas, previa defosforilación de éstas últimas. Alternativamente, las R-Smads pueden ser marcadas con ubiquitina por la acción de Smurf1 para su posterior degradación en el proteasoma (J), regulando así la vía de señalización. Por último, las I-Smad (K) actúan como otro punto de control en el apagado de la ruta al inhibir el receptor tipo I.

Existen, además, otras vías de señalización del TGF- β en las que no están implicadas directamente las Smads y que incluyen mediadores tales como JNK, Erk, RhoA, XIAP, Daxx, Ocludina, Par6, o Limk1 entre otros (Derynck & Zhang, 2003; Feng & Derynck, 2005; Moustakas & Heldin, 2005; Shi & Massagué, 2003).

1.4. ENDOGLINA

1.4.1. Distribución celular

Endogлина, también llamada CD105, se expresa principalmente en células endoteliales que integran las venas, arterias y microvasculatura, detectándose ya en la cuarta semana de gestación y manteniéndose en los tejidos adultos (Gougos & Letarte, 1988a; Gougos & Letarte, 1988b; Qu *et al.*, 1998). Por este motivo, endogлина es considerada como un marcador de células endoteliales. Su expresión se ve incrementada en estas células cuando están proliferando en cultivo (Duff *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 1999), en zonas de angiogénesis (Bodey *et al.*, 1998a; Bodey *et al.*, 1998b; Burrows *et al.*, 1995; Jerkic *et al.*, 2006), en regiones donde se ha producido un daño en la pared vascular (Botella *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1995), en el endotelio de algunas patologías de la piel (van de Kerkhof *et al.*, 1998; Westphal *et al.*, 1993), en enfermedades autoinmunes (Marazuela *et al.*, 1995) y en el endotelio capilar angiogénico de carcinomas (Li *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1994) y angiosarcomas (Ohta *et al.*, 1997). En este sentido, la elevada expresión de endogлина en la vasculatura de tumores sólidos (Burrows *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 1996) ha servido como diana de anticuerpos específicos acoplados a toxinas con la finalidad de destruir dicha vasculatura (Matsuno *et al.*, 1999; Thorpe & Burrows, 1995). Sin embargo, la expresión de endogлина en la pared vascular no se limita al endotelio. Así, también podemos encontrarla en los fibroblastos del estroma perivascular (Ma *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000) y en las células de músculo liso que se encuentran rodeando los vasos. En este último tipo celular se ha observado expresión de endogлина después de un daño vascular, en las placas de arteriosclerosis, y en células cultivadas *in vitro* (Adam *et al.*, 1998; Conley *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000). La presencia de endogлина en distintos tipos celulares de las tres capas del vaso (túnicas íntima, media y adventicia), sugiere un importante papel en la fisiología vascular.

Fuera del contexto endotelial, también se ha descrito la expresión de endogлина en: Células de origen hematopoyético, como son los proeritroblastos (Bühring *et al.*, 1991), precursores de células B (Zhang *et al.*, 1996a), macrófagos (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992), y células estromales de la médula (Robledo *et al.*, 1996; Rokhlin *et al.*, 1995; St-Jacques *et al.*, 1994a); en algunas células tumorales, como es el caso de melanomas (Altomonte *et al.*, 1996), cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2002), coriocarcinomas (Letamendía *et al.*, 1998a) y tumores de origen hematopoyético, en concreto de los linajes monocíticos (Lastres *et al.*, 1996) y de linfocitos B (Zhang *et al.*, 1996a); en las células mesangiales de riñón (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2001); en los sincitiotrofoblastos de placenta, componentes fetales de la interfase materno-fetal los cuales forman una capa de células multinucleadas que actúa como barrera protectora e intercambiadora de nutrientes para el feto (Gougos *et al.*, 1992; St-Jacques *et al.*, 1994b); en condrocitos humanos de cartilago (Parker *et al.*, 2003) y queratinocitos epidérmicos de folículos pilosos y glándulas sudoríparas (Quintanilla *et al.*, 2003).

1.4.2. Características bioquímicas de endogлина.

En lo que respecta a su estructura, endogлина es una proteína transmembrana de tipo I cuya estructura primaria consta de 658 aminoácidos y es expresada como un homodímero de 180 kDa de peso molecular unido por puentes disulfuro. En su secuencia, los primeros 25 residuos constituyen el péptido

señal rico en leucinas y que dirige la proteína a través del retículo endoplasmático y aparato de Golgi hasta la membrana plasmática donde finalmente es eliminado. A continuación, en la región extracelular de 561 aminoácidos destaca la presencia de un tripéptido Arg399-Gly400-Asp401 (RGD), posiblemente implicado en adhesión celular (Gougos & Letarte, 1990), y un dominio estructural conservado denominado zona pelúcida (ZP), probablemente implicado en interacciones proteína-proteína (Bork & Sander, 1992; Jovine *et al.*, 2005; Jovine *et al.*, 2002). Los siguientes 25 aminoácidos corresponden a la región transmembrana, rica en residuos hidrofóbicos. Finalmente, un pequeño fragmento citoplásmico de 47 residuos rico en serinas y treoninas susceptibles de ser fosforiladas concluye el extremo C-terminal (Figura 6.A). También, se ha descrito en humanos y ratón una isoforma minoritaria con el tallo citoplásmico más corto (Bellón *et al.*, 1993; Pérez-Gómez *et al.*, 2005). Denominada endogлина-S, ésta se origina por la aparición de un codón de stop prematuro en el marco de lectura como consecuencia de la no eliminación de un pequeño intrón de 135 nucleótidos entre los exones 13 y 14 (Figura 6.B). El papel que desempeñaría esta isoforma corta de endogлина está aún poco estudiado y forma parte de este trabajo de investigación.

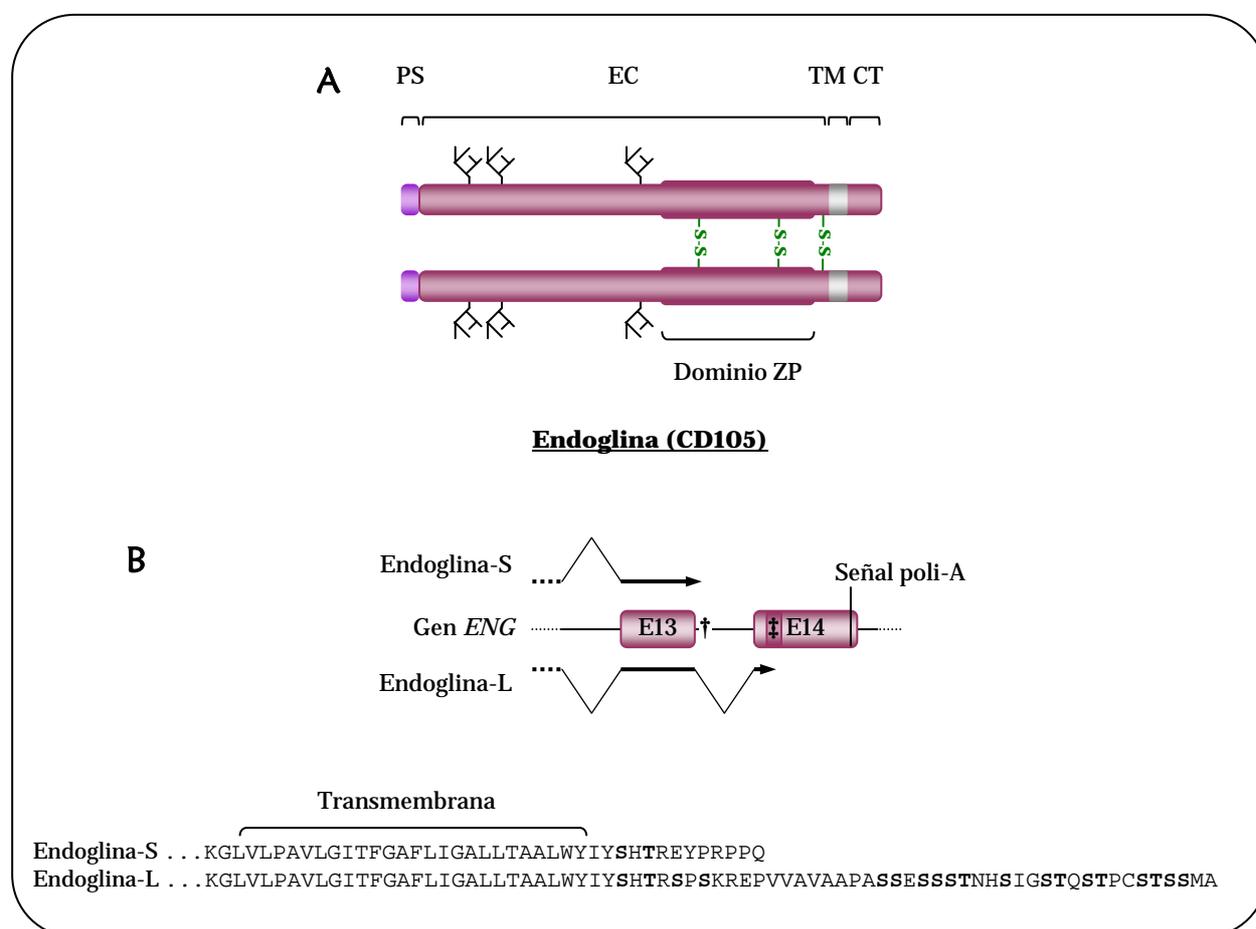


Figura 6: Esquema de endogлина. **(A)** PS, péptido señal; EC, región extracelular; ZP, dominio zona pelúcida con 8 residuos de cisteína conservados; S-S, puente disulfuro; TM, secuencia transmembrana; CT, tallo citoplásmico. Las líneas ramificadas simbolizan sitios de N-glicosilación. **(B)** Ajuste alternativo en el RNA primario de endogлина. Si no se elimina el pequeño intrón de 135 pares de bases entre los exones E13 y E14 la traducción se detiene en el primer codón de parada (†), originándose la isoforma corta endogлина-S. En el caso de que sí se elimine, la traducción continúa hasta el segundo codón de parada en el exón E14 (‡), dando lugar a la isoforma larga endogлина-L. Ambos RNA maduros contienen la misma señal de poliadenilación en el extremo 3' de la secuencia. La secuencia de aminoácidos de ambas isoformas se detalla en la parte inferior, resaltándose los residuos de serina y treonina susceptibles de ser fosforilados.

Respecto a la homología con otras proteínas hay que destacar que endogлина es un caso particular ya que la única secuencia con la que mantiene identidad significativa es betaglicano, también denominado receptor tipo III de TGF- β (T β R-III). La secuencia de aminoácidos correspondiente a las regiones transmembrana y citoplásmica de ambas proteínas son bastante similares, manteniendo un 63% y 71% de similitud, respectivamente (López-Casillas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Sin embargo, las funciones que desempeñan en la célula son distintas (Letamendía *et al.*, 1998b).

En cuanto al dominio extracelular, el único motivo conservado presente en endogлина es el denominado ZP, designado así por estar presente en las proteínas que constituyen la zona pelúcida que envuelve al óvulo de mamíferos. Ejemplos de glicoproteínas con dominio ZP son las propias proteínas ZP1, 2 y 3, uromodulina, α - y β -tectorina, cuticulina-1, betaglicano y GP-2 (*Glycoprotein-2*), entre otras. En todos los casos, estos dominios ZP se localizan próximos al extremo C-terminal de la proteína y se componen de unos 260 aminoácidos con al menos ocho residuos de cisteína conservados. Dentro de los dominios ZP existen dos subdominios que contienen 4 cisteínas cada uno y que están separados entre sí por un sitio de corte proteolítico, que coincide con la unión de dos exones en el RNA mensajero maduro (Jovine *et al.*, 2005).

1.4.3. Funciones que desempeña endogлина en la célula

En cuanto a las funciones atribuidas a endogлина derivadas de su estructura, se demostró mediante ensayos de marcaje de afinidad y entrecruzamiento, en células endoteliales, que podía unir las isoformas β 1 y β 3 del TGF- β con alta afinidad ($K_d = 50$ pM), pero no unía la isoforma β 2 (Cheifetz *et al.*, 1992). Estudios posteriores demostraron que era capaz de interactuar con los receptores tipo I y II unidos a TGF- β (Lastres *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 1994a; Zhang *et al.*, 1996a) e incluso en ausencia de ligando (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). No obstante, era incapaz de, al contrario que betaglicano, unir TGF- β por sí sola, necesitando del receptor tipo II para poder captarlo (Letamendía *et al.*, 1998b). Además, en contextos similares, se vio que endogлина era capaz de unir activina-A, BMP-7 y BMP-2, esto es, en presencia de sus respectivos receptores (Barbara *et al.*, 1999).

Endogлина es capaz de inhibir algunas de las respuestas celulares a TGF- β mejor conocidas, como son la inhibición de la proliferación celular, el aumento en la producción de proteínas de la matriz extracelular y la inhibición de la migración y tubulogénesis de células endoteliales (Díez-Marqués *et al.*, 2002; Lastres *et al.*, 1996; Letamendía *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular subyacente en detalle. Se ha sugerido que endogлина podría modular las respuestas celulares a TGF- β mediante la interacción directa con los receptores señalizadores, si bien no parece afectar a la formación de los complejos T β R-II/T β R-I como sucede en el caso de betaglicano (Barbara *et al.*, 1999; Eickelberg *et al.*, 2002). Así, endogлина actuaría regulando o el acceso del ligando al complejo receptor, a nivel extracelular, o bien la actividad quinasa catalítica de los receptores señalizadores, por su interacción citoplásmica. Apoyando esta hipótesis, Guerrero-Esteo *et al.* (2002) demostraron que endogлина inhibía los niveles de fosforilación del T β R-II mientras que aumentaba los del T β R-I ALK-5 tanto *in vivo* como *in vitro*, probablemente al interferir con la actividad autocatalítica de éste.

Otra de las funciones atribuidas recientemente a endogлина es su implicación en el control del tono vascular. Por un lado, se observó que los ratones heterocigotos para el gen de endogлина tenían una menor capacidad de respuesta al estímulo vasodilatador de acetilcolina o bradikinina. Además, estos ratones,

también denominados *Eng*^(+/-), tenían una menor cantidad de metabolitos del óxido nítrico en plasma y orina, debido a que los niveles de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) estaban también reducidos (Jerkic *et al.*, 2004). Inclusive se ha demostrado que endogлина es capaz de asociarse con eNOS en unos microdominios de la membrana plasmática denominados caveolas, donde estabiliza el complejo con la proteína reguladora Hsp90, potenciadora de su actividad catalítica (Toporsian *et al.*, 2005).

Por otro lado, recientemente se ha estudiado el papel que endogлина juega en la organización del citoesqueleto celular. Como resultado de una búsqueda de ligandos para su región citoplásmica mediante el método del doble híbrido en levaduras, se obtuvo que esos 47 residuos citoplásmico de endogлина eran capaces de interactuar con Zyxin (Conley *et al.*, 2004) y ZRP-1 (*Zyxin-Related Protein-1*; o también TRIP6, *Thyroid Receptor Interacting Protein-6*) (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004), dos miembros de la familia de proteínas con dominios LIM (acrónimo de las iniciales de los genes Lin-11, Isl-1 y Mec-3). Así, endogлина es capaz de controlar la migración y la composición de las adhesiones focales por interactuar con zyxin y de organizar las fibras del citoesqueleto de F-actina, por medio de ZRP-1.

1.4.4. Endogлина y ALK-1 como genes responsables de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

Hace más de 100 años que se describió una patología vascular caracterizada por la presencia de telangiectasias (dilatación anormal de los vasos sanguíneos) y episodios de epistaxis (sangrados nasales) espontáneos y recurrentes denominada síndrome de Rendu-Osler-Webber, debido a que fue descrita por parte de tres diferentes autores, H. J. L. M. Rendu (1896), W. Osler (1901) y F. P. Webber (1907) (Fuchizaki *et al.*, 2003; Hanes, 1909). También denominada como Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT, *Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia*), se caracteriza además por sangrados gástricos y malformaciones arteriovenosas en hígado, cerebro y pulmón que dan lugar a la pérdida localizada de la red capilar, originando una conexión directa entre arterias y venas (Abdalla & Letarte, 2006; Fernández-L *et al.*, 2006; Guttmacher *et al.*, 1995).

Criterios de Curação
1. Epistaxis espontáneas recurrentes
2. Telangiectasias mucocutáneas
3. Implicaciones viscerales tales como AVM pulmonares y cerebroespinales, sangrados gástricos o desvío intrahepático
4. Historial familiar de HHT

Tabla 2. Criterios de Curação (Shovlin *et al.*, 2000). AVM, malformaciones arteriovenosas. Se considera que un individuo tiene HHT si presenta al menos tres de los cuatro criterios. La presencia de dos de los criterios es señal de un posible diagnóstico, mientras que un solo criterio no es indicativo de la enfermedad. Se debe tener en cuenta que algunos síntomas de la enfermedad no son exclusivos de la HHT. Además, muchos signos son dependientes de la edad y se empiezan a manifestar con el envejecimiento. Por lo tanto, estos criterios diagnósticos deben ser considerados con cautela, particularmente en niños.

Actualmente es considerada como una enfermedad rara ya que su prevalencia es de 1:8.000. El dictamen de esta patología se lleva a cabo mediante un diagnóstico clínico basado en los denominados criterios de Curaçao (Tabla 2). Además, existe el diagnóstico genético por secuenciación de DNA pero aún no está considerado entre estos criterios.

En 1994 se reportó por primera vez que pacientes de HHT presentaban mutaciones en un locus localizado en la región 9q33-q34.1, cromosoma 9, mediante estudios de ligación (McDonald *et al.*, 1994; Shovlin *et al.*, 1994). Independientemente, mediante la técnica de hibridación *in situ*, se demostró que el gen que codificaba para endogлина (*ENG*) mapeaba en esa misma región (Fernández-Ruiz *et al.*, 1993), lo que permitió demostrar que *ENG* era de hecho el gen de la HHT (McAllister *et al.*, 1994), estableciendo que mutaciones en el gen de endogлина son las responsables de la HHT tipo 1 (HHT1; OMIM 187300).

No obstante, se vio que la HHT presentaba una heterogeneidad genética y que existían pacientes de HHT sin mutaciones en endogлина (Shovlin *et al.*, 1994). Así, también mediante ensayos de ligación genética, se describió un segundo locus para HHT que mapeaba en la región 12q11-q14, cromosoma 12, donde se localizaba el gen que codifica para ALK-1 (*ACVRL1*). Así, se estableció el tipo 2 de HHT (HHT2; OMIM 600376) (Johnson *et al.*, 1996). Además, existe alrededor de un 20% de pacientes de HHT en los que los estudios genéticos no han revelado mutaciones en ninguno de estos dos genes (Buscarini *et al.*, 1997; Wallace & Shovlin, 2000), por lo que se sugiere la existencia de un tercer locus de la enfermedad (HHT3), posiblemente localizado en el cromosoma 5 (Cole *et al.*, 2005).

En cualquier caso, los pacientes afectados por ambos tipos de HHT son heterocigotos para el gen afectado, proponiéndose un mecanismo de haploinsuficiencia como causa de la enfermedad. Así, estudios en ratones modificados genéticamente para eliminar completamente la expresión (*knock-out*) de endogлина o ALK-1 mueren a mitad de gestación (días 10,5-11,5) debido a defectos angiogénicos evidentes en el saco vitelino y cardiovasculares en la formación de las válvulas del corazón (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

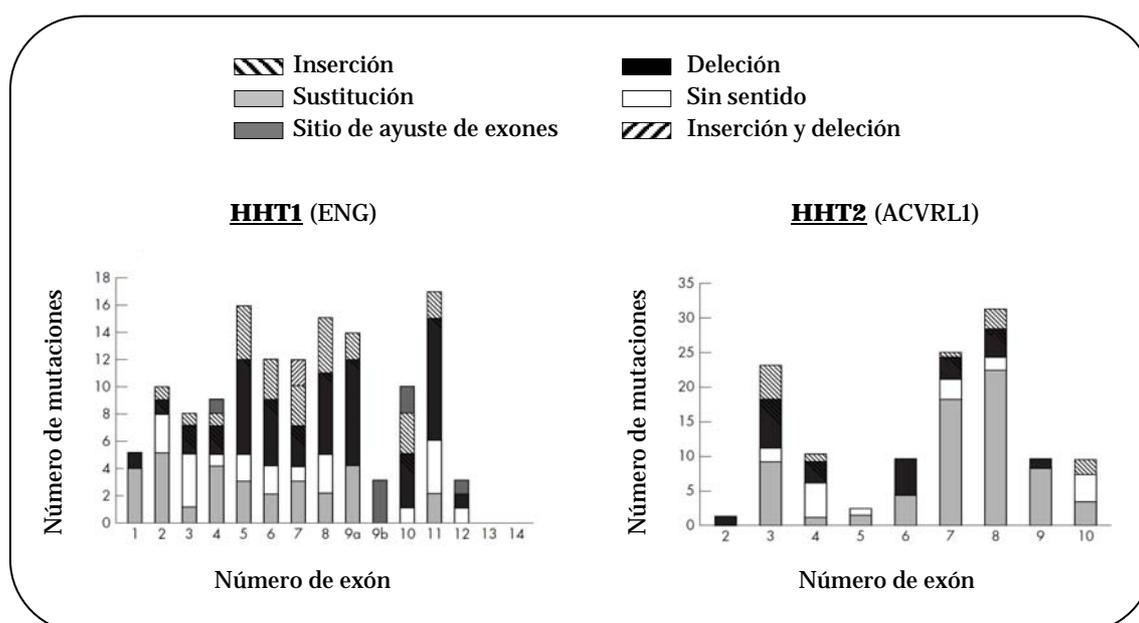


Figura 7: Las gráficas representan el número y tipo de mutaciones identificadas por exón en los genes de endogлина (HHT1) y ALK-1 (HHT2) (Abdalla & Letarte, 2006).

Hasta el momento se han descrito más de 150 mutaciones distintas responsables de HHT1 y más de 120 para HHT2, incluyendo pequeñas inserciones y/o deleciones, sustituciones de un aminoácido por otro, cambios en el marco de lectura o la aparición de codones de stop prematuros o alteración en los sitios de ajuste de exones (Figura 7). Ambos tipos de HHT son difíciles de distinguir clínicamente, ya que la sintomatología es similar y, por otro lado, hay variaciones significativas incluso dentro de una misma familia de afectados. No obstante, en la HHT2 parece existir un desarrollo tardío y una menor penetrancia de la enfermedad, mientras que en la HHT1 las malformaciones arteriovenosas pulmonares y cerebrales son algo más frecuentes (Abdalla *et al.*, 2003; Abdalla & Letarte, 2006; Berg *et al.*, 2003; Cymerman *et al.*, 2000). Lo que aún no está claro es cómo una disminución de los niveles de endogлина o ALK-1 predisponen a la HHT y cual es la causa de las lesiones vasculares en sitios tan concretos del organismo.

1.5. CAVEOLAS

En 1953 se describieron por primera vez unas estructuras subcelulares en el endotelio de tipo continuo del corazón denominadas en aquel momento vesículas plasmalémicas (Palade, 1953) (Figura 8.A). Actualmente, dichas estructuras han sido identificadas en la mayoría de tipos celulares y en referencia a su morfología se las han denominado caveolas, o pequeñas cavernas (Yamada, 1955). En un primer momento, se propuso que estas estructuras actuaban como meras vías de absorción celular similares a las vesículas recubiertas de clatrina, pero ahora parece estar claro que las caveolas son microdominios de la membrana especializados multifuncionales que modulan numerosos procesos, como la adhesión celular (del Pozo *et al.*, 2004), la migración (Navarro *et al.*, 2004), la señalización de receptores (Pike, 2005) e incluso la supresión tumoral (Razani *et al.*, 2001b).

Simultáneamente, se observó que en prácticamente todos los tipos celulares existían unos peculiares microdominios en la membrana plasmática enriquecidos en colesterol y esfingolípidos que fueron denominados balsas lipídicas (del inglés *lipid rafts*). Debido a las interacciones entre sus componentes, así como a la presencia de fosfolípidos portando cadenas de ácidos grasos saturados, esas balsas lipídicas representaban un ambiente más ordenado que el resto de la membrana (Brown & London, 2000; Galbiati *et al.*, 2001). Posteriormente, las caveolas fueron caracterizadas bioquímicamente, quedando demostrado que, en esencia, eran balsas lipídicas enriquecidas en unas proteínas propias que fueron denominadas caveolinas. Éstas eran capaces de interactuar, tanto *in vitro* como *in vivo*, con los principales componentes de las balsas lipídicas (Smart *et al.*, 1999) y que agentes secuestradores de colesterol, como el ciclodextrano o la nistatina, eran capaces de desestabilizarlas (Pelkmans *et al.*, 2004; Rothberg *et al.*, 1992).

1.5.1. Caveolinas

Caveolina-1, también llamada VIP21 (*Vesicular Integral membrane Protein of 21 kDa*), fue el primer miembro caracterizado de esta familia de proteínas (Glenney & Soppet, 1992; Rothberg *et al.*, 1992) y, años después, se identificaron las isoformas 2 (Scherer *et al.*, 1996) y 3 (Tang *et al.*, 1996), todas con un peso molecular pequeño de entre 20-24 kDa. Curiosamente, el patrón de expresión de las caveolinas es bastante diferente. Los mayores niveles de expresión de caveolina-1 y 2 se encuentran en

células endoteliales, neumocitos, fibroblastos y adipocitos (Scherer *et al.*, 1997), mientras que la expresión de caveolina-3 se restringe a células musculares (cardíacas, esqueléticas y lisas) (Tang *et al.*, 1996).

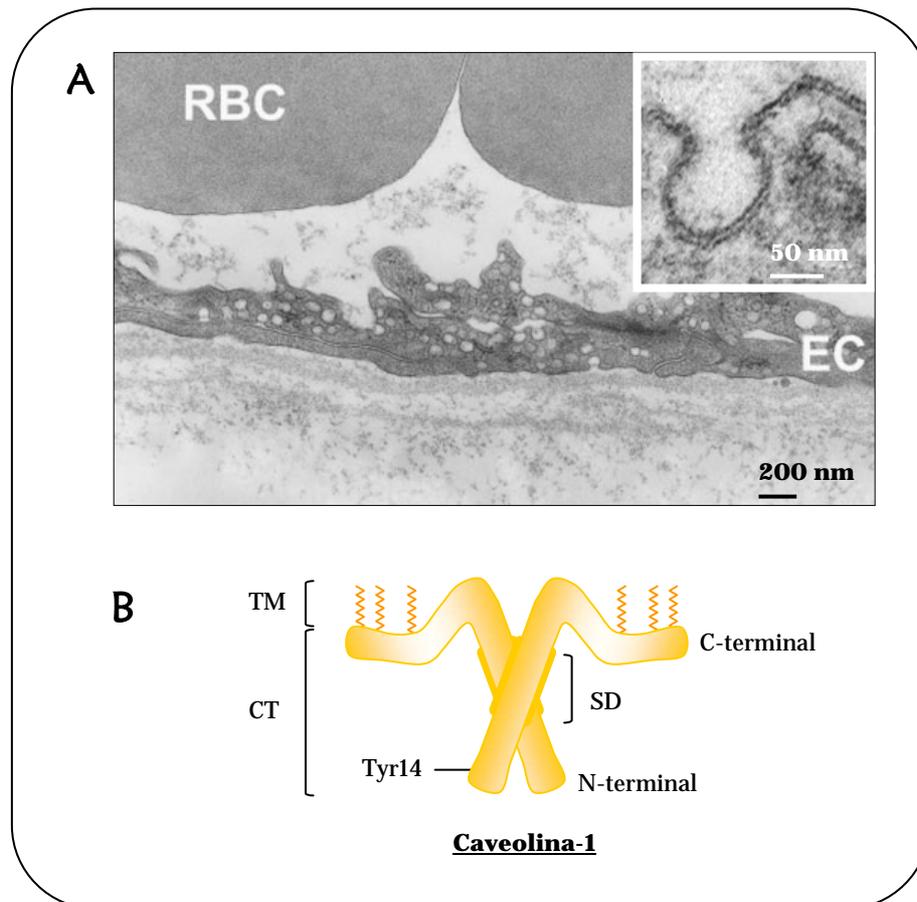


Figura 8: Caracterización de las caveolas. (A) Micrografía de transmisión de electrones. RBC, eritrocito; EC, célula endotelial. Se identifican pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática de unos 70 nm correspondientes a las caveolas (Navarro *et al.*, 2004). Una de ellas es magnificada en la imagen superior derecha (Stan, 2005). (B) Esquema en el que se representan dos monómeros de caveolina-1 asociados. TM, región embebida en la membrana plasmática; CT, regiones citoplásmicas; SD, dominio estructural de andamiaje. Las líneas en zig-zag representan sitios de palmitoilación en residuos de cisteína. También se detalla el residuo de tirosina en posición 14 susceptible de ser fosforilado.

Caveolina-1, como representante de la familia, es una proteína peculiar, ya que sus extremos amino y carboxilo terminal se localizan en el citoplasma celular (Figura 8.B). De sus 178 aminoácidos que integran su estructura primaria, la región comprendida entre Asp61 y Arg101 corresponde al dominio de oligomerización, localizándose en él un subdominio comprendido entre los residuos Asp82 y Arg101 denominado dominio de andamiaje (del inglés *scaffolding domain*). Este dominio es el responsable de la interacción con otras proteínas, en las que se suelen localizar secuencias consensos. Estos motivos de unión a caveolina son pequeñas secuencias hidrofóbicas que siguen uno de los siguientes patrones: $\Phi X\Phi XXXX\Phi$, $\Phi XXXX\Phi XX$ o $\Phi X\Phi XXXX\Phi XX\Phi$, donde X puede ser cualquier aminoácido y Φ representa un residuo aromático como triptófano, fenilalanina o tirosina (Couet *et al.*, 1997a); aunque otros estudios han demostrado que motivos con una mezcla aromática, apropiadamente espaciada, y residuos hidrofóbicos, como leucina, isoleucina y valina, pueden actuar también como unión a caveolina (Carman

et al., 1999). A continuación, existe una región rica en aminoácidos hidrofóbicos comprendida entre la Leu102 y la Arg135 que inusualmente queda embebida en la membrana sin llegar a traspasarla y, particularmente, presenta un residuo de cisteína en posición 133 que se encuentra irreversiblemente palmitoilado. El resto de la secuencia queda localizada, por tanto, hacia el interior celular y contiene otros dos residuos de cisteína, en posiciones 143 y 156, también irreversiblemente palmitoilados post-traduccionalmente, tanto en caveolina-1 como en caveolina-3. Estas palmitoilaciones no son determinantes para la localización en las caveolas (Dietzen *et al.*, 1995) pero son las responsables de la estabilización de los oligómeros de caveolina (Monier *et al.*, 1996). Por otra parte, caveolina-1 es susceptible de ser fosforilada en residuos de serina y treonina por PKC α (*Protein Kinase C- α*) (Mineo *et al.*, 1998), pero la fosforilación en el residuo Tyr14 por c-src (*C-terminal Src Kinase*) es determinante para su modulación y localización subcelular (Aoki *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2002).

1.5.2. Regulación de la vía de señalización de TGF- β por caveolina-1

Actualmente se considera que las caveolas, lejos de ser simples distinciones de la membrana plasmática, son microdominios especializados multifuncionales capaces de modular multitud de respuestas celulares a nivel de la transducción de señal. Así, de los múltiples papeles que caveolina-1 juega en la célula, se destaca a continuación su reciente implicación en el sistema del TGF- β . Esta hipótesis de trabajo surgió al observar por microscopía confocal que el patrón de tinción que seguía el complejo del receptor de TGF- β era un punteado discreto, tanto en la membrana plasmática como en el interior celular (Gilboa *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999). Posteriormente, al estudiar en detalle la secuencia del T β R-I ALK-5 se vio que existían tres posibles secuencias diana, próximas al extremo C-terminal, para la interacción con el dominio de andamiaje de caveolina-1. Justamente, se pudo demostrar que ambas proteínas eran capaces de co-inmunoprecipitar y que dicha interacción resultaba en una disminución en la señalización de TGF- β vía Smad2 (Razani *et al.*, 2001c). Y lo que es más, recientemente se ha puesto de manifiesto que el T β R-II también se localiza en caveolas (Schwartz *et al.*, 2005). Incluso ha sido descrito que caveolina-1 es capaz co-localizar con BMPR-Ia y BMPR-II, modulando así negativamente la vía de señalización de BMP-2 (Nohe *et al.*, 2005).

Finalmente, se ha analizado el papel que caveolina-1 juega en la angiogénesis ya que los ratones *knock-out* para este gen (*CAVI*) son viables pero tienen defectos en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Drab *et al.*, 2001; Razani *et al.*, 2001a; Woodman *et al.*, 2003). De hecho, la expresión de caveolina-1 incrementa la formación de túbulos similares a similares a capilares de células endoteliales *in vitro* (Liu *et al.*, 2002). Estos ratones carecen de caveolas en sus células y presentan un fenotipo hiperproliferativo. Así, se podría establecer una relación entre caveolina-1 y TGF- β en el contexto de la angiogénesis. Ya que el TGF- β puede actuar en células endoteliales a través de dos receptores de TGF- β distintos, ALK-5 y ALK-1, con efectos opuestos, cabría suponer que caveolina-1 podría modular la vía de ALK-1. Este sistema no ha sido estudiado aún y complementaría lo descrito hasta ahora para la vía de ALK-5.

En resumen, la señalización del TGF- β en células endoteliales juega un papel crucial en la angiogénesis y remodelado vascular durante el desarrollo y el estadio adulto. Los mecanismos moleculares subyacentes a estos procesos dependen del T β R-I que dispare la señal, de la presencia de receptores auxiliares como endoglina y de la interacción con otras proteínas presentes en las células endoteliales, como caveolina-1. Determinar qué papel juega cada uno de estos componentes ayudará a comprender mejor cómo una misma citoquina como el TGF- β puede ejercer funciones tan dispares en una misma célula.

II. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral han sido analizar los siguientes puntos:

1. ASOCIACIÓN ENDOGLINA/ALK-1 EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF- β

Se estudiará la posible interacción de endogлина con ALK-1, así como la implicación de los dominios extracelulares y citoplásmicos en dicha asociación. También se analizará si la interacción de endogлина con ALK-1 afecta a la vía de señalización de TGF- β

2. PAPEL DE LA ISOFORMA CORTA DE ENDOGLINA EN EL SISTEMA DE TGF- β

Se analizará si existe interacción del dominio citoplásmico de endogлина-S con los distintos receptores tipo I de TGF- β presentes en las células endoteliales. Se examinará si endogлина-S es capaz de modular tanto la vía de ALK-5 como la de ALK-1.

3. EFECTO DE CAVEOLINA-1 SOBRE LA VÍA DE TGF- β /ALK-1.

Se estudiará la posible asociación de ALK-1 con caveolina-1 así como el efecto modulador sobre la vía de señalización de ALK-1/TGF- β .

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

El medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) fue suplementado con el 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina y estreptomicina. Este complemento calificará de completo a los medios en lo sucesivo. Así, este DMEM completo fue empleado para cultivar la línea epitelial de riñón de mono verde africano COS-7, la epitelial de riñón humano 293T, las líneas de transfectantes estables en mioblastos de rata L6E9 (Letamendía *et al.*, 1998b) y la línea endotelial bovina inducible de endoglina GM7372EL (Conley *et al.*, 2004), a la que se adicionó doxiciclina (Sigma, St. Louis, MO) como agente inductor a las dosis indicadas en cada caso.

Para cultivar las células epiteliales de ovario de hámster chino CHO-K1 se empleó el medio de cultivo Ham's F-12 completo. Para la obtención de transfectantes estables en esta línea (Blanco *et al.*, 2005), el antibiótico de selección geneticina (G418) fue añadido en una concentración final de 1 mg/ml y la proporción de suero bovino fetal se redujo al 2% hasta ser cultivados finalmente en medio libre de suero UltraCHO (Bio-Witthaker, Walkersville, MD).

La línea de células endoteliales humanas HMEC-1 fue mantenida en medio MCDB-131 completo suplementado, a su vez, con 1 ng/ml de EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Promega Corporation, Madison, WI) y 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma).

Las células humanas de vena de cordón umbilical (HUVECs) fueron obtenidas tras lavar dicha vena con solución isotónica Hank's y digestión durante 10 minutos a 37°C con colagenasa tipo I-A (Sigma). Fueron purificadas por adhesión diferencial a la placa, especificidad del medio de cultivo y por su potencial proliferativo sobre el resto de tipos celulares contaminantes. Para mantener estos cultivos primarios, las placas se incubaron previamente con gelatina al 0,2% en PBS durante 1 hora a 37°C. El medio empleado para crecer estas HUVECs fue EBM-2 más el suplemento EGM-2 SingleQuots (Cambrex, Walkersville, MD).

Para los ensayos en los que se desestabilizaron las caveolas de las células endoteliales mediante depleción de colesterol, se trató con 1% metil-β-ciclodextrina (MβCD) (Sigma) o 50 µg/ml nistatina (Sigma) durante 1 hora a 37°C en ausencia de suero bovino fetal. Para recuperar el efecto inducido por la desestabilización de las caveolas, las células fueron incubadas a continuación con 25 µg/ml colesterol (Sigma) durante 24 horas adicionales.

El TGF-β1 recombinante humano utilizado en los experimentos de estimulación fue reconstituido y hecho alícuotas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK).

La solución de lavado empleada fue tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4). Cuando fue necesario, las células se recogieron mediante tratamiento con una solución de tripsina/EDTA (0,05% Tripsina, 0,02% EDTA·4Na) durante 3 minutos a 37°C, tras los cuales se detuvo su actividad por la adición de medio completo. Todos los cultivos celulares se mantuvieron de forma rutinaria en un incubador NAPCO, en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Todo el material de cultivos empleado fue de Gibco/BRL (Life Technologies Ltd., Alemania), excepto cuando se indica.

3.2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios empleados se describen a continuación en la Tabla 3. Para el reconocimiento de los anticuerpos de ratón, se emplearon anticuerpos policlonales de conejo marcados con HRP (peroxidasa de rábano) o con el isómero 1 del fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína) según el caso (DakoCytomation, Dinamarca).

Proteína diana	Nombre	Isotipo y especie	Fuente	Epítipo reconocido	Referencia
Endoglina	P4A4	IgG1, ratón	Hibridoma	Tyr227-Gly331	(Pichuantes <i>et al.</i> , 1997)
	H-300	PoAb, conejo	Purificado	Glu27-His326	sc-20632
ALK-1	T-19	PoAb, conejo	Purificado	Citoplásmico C-terminal	sc-402
	α ALK1	PoAb, conejo	Purificado	Secuencia completa	(Abdalla <i>et al.</i> , 2000)
ALK-5	V-22	PoAb, conejo	Purificado	Citoplásmico	sc-398 K
HA	12CA5	IgG2b, ratón	Purificado	Tyr98-Ala106	R-11 666 606 001
myc	9E10	IgG1, ratón	Purificado	Val408-Arg439	sc-40
caveolina-1	2297	IgG1, ratón	Purificado	Phe68-Pro75	BD 610407
Flag	M2	IgG1, ratón	Purificado	D-Y-K-D-D-D-D-K	Sigma F-3165
β -actina	AC-15	IgG1, ratón	Purificado	Asp2-(V10I)-(M16K)Lys16	Sigma A-1978

Tabla 3. Descripción de los anticuerpos utilizados. IgG, inmunoglobulina monoclonal; PoAb, anticuerpo policlonal; sc, Santa Cruz Biotechnology Inc.; R, Roche; Sigma, Sigma, St. Louis, MO; BD, Becton Dickinson Transduction Laboratorios, San Jose, CA.

3.3. VECTORES DE EXPRESIÓN Y TRANSFECCIÓN

Los cDNA marcados con el epítipo HA que codifican para el T β R-I ALK-5, su mutante constitutivamente activo ALK-5 (T204D), su mutante deficiente en actividad quinasa ALK-5 (K232R), y el de T β R-II estaban insertados en el vector de expresión pCMV5 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) y fueron amablemente cedidos por la Dra. Liliana Attisano (*University of Toronto*, Canadá).

El Dr. Kohei Miyazono (Universidad de Tokio, Japón) cedió amablemente los vectores de expresión que contenían el cDNA de ALK-1, así como su mutante constitutivamente activo ALK-1 (Q201D) y el quinasa deficiente ALK-1 (K229R). A partir de la forma salvaje se obtuvieron dos versiones de ALK-1 mediante mutagénesis dirigida sobre el motivo consenso para la unión al dominio de andamiaje de caveolina-1. Empleando el oligonucleótido cebador 5'-GGCCTGGTGCTAGCGGAGATTGCCCGC-3' y su complementario se consiguió la forma ALK-1 (001), que contiene la sustitución W406→A. Sobre éste, se llevó a cabo mutagénesis dirigida empleando el cebador 5'-GACATCTGGGCCGCGGCCTGGTGCTG-3' y su complementario, lográndose el mutante ALK-1 (011), que contiene por tanto la sustitución anterior

más la F401→G. Todas las versiones de ALK-1 estaban marcadas con el epítipo HA en sus extremos C-terminal e insertados en pcDNA3.1 (Invitrogen).

La secuencia completa de endoglina, excepto su péptido señal, así como las distintas construcciones truncadas de la proteína (Figura 15) portando el epítipo HA en su extremo N-terminal están clonadas en el vector de expresión para mamíferos pDisplay (Invitrogen) y han sido previamente publicadas (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). También, se utilizó un vector de expresión de endoglina marcado con el epítipo myc e insertado en el vector pCMV5, cedido por el Dr. Douglas A. Marchuk (*Duke University Medical Center*, NC). El cDNA de la isoforma corta de endoglina insertado en pcDNA3.1 fue amablemente proporcionado por el Dr. Miguel Quintanilla y estaba marcado con un epítipo Flag en su extremo C-terminal (Pérez-Gómez *et al.*, 2005).

Los vectores de expresión que contienen las secuencias completas de cDNA de caveolina-1 salvaje y la versión obtenida por mutagénesis dirigida sobre el dominio de andamiaje con las sustituciones F92→A y V94→A, cav-1 (SDmut) (Nystrom *et al.*, 1999), fueron amablemente donados por el Dr. Michael J. Quon (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD). Ambas formas de caveolina portaban el epítipo myc. El vector de expresión de caveolina-1 con el dominio de andamiaje delecionado (Δ 82-101) (Li *et al.*, 2003) fue amablemente cedido por el Dr. Timothy C. Thompson (*Baylor College of Medicine*, Houston, TX).

La transfección de células de mamífero se llevó a cabo siguiendo dos estrategias diferentes indistintamente. Por un lado, se empleó el reactivo comercial Superfect (Qiagen, GMBH, Alemania) siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. Alternativamente, se usó un reactivo basado en liposomas preparado en el laboratorio. Así, se mezclaron 10 mg de DC-colesterol (colesterol 3 β -N-(dimetil aminoetil) carbamato) (Sigma) y 10 mg DOPE (dioleil L- α -fosfatidil-etanolamina) (Sigma) en 1 ml de etanol a 37°C y mediante una aguja del calibre 25G se consiguió una suspensión patrón concentrada 20x. La solución de trabajo se preparó justo antes de su utilización en agua destilada estéril y se hizo pasar por un filtro de 0,45 μ m de diámetro para esterilizar y homogeneizar el tamaño de los liposomas. El protocolo de transfección seguido fue el mismo recomendado por el fabricante de Superfect (Qiagen).

3.4. CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN EndoEC-Fc

3.4.1. Obtención del vector de expresión para EndoEC-Fc

El dominio Fc de la inmunoglobulina IgG1 humana (hFc γ) fue amablemente cedido por el Dr. Joaquin Teixidó (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) en una construcción del vector pCMD8 que contenía la proteína de fusión VCAM-Fc. La secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio hFc γ contiene los tres exones que codifican para las regiones bisagra, CH2 y CH3, separados por dos intrones, y un codón de terminación de la traducción. Dicho dominio se aisló mediante amplificación por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Roche) empleando los oligonucleótidos cebadores que aportaban en ambos extremos la secuencia diana para la enzima de restricción *Sa*II (subrayada) y cuyas secuencias son las siguientes: directo 5'-CCGTCGACGAGCCCAAATCTTGT-3' y reverso 5'-CCGTCGACTCATTACCCGGGA-3'. El producto de 914 pb resultante de la amplificación se

separó por electroforesis en gel de agarosa y se purificó con un kit comercial de extracción de DNA (Millipore Corporation, Bedford, MA) siguiendo sus propias instrucciones. Posteriormente, se subclonó en el vector comercial pCR-II TOPO (Invitrogen) y se digirió con *SaI* (Roche Diagnostics SL, Sant Cugat del Vallès, España). En paralelo, la construcción pDisplay/586-Endo, que contiene el dominio extracelular de endoglina (Glu26-Gly586) (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002), fue digerida con *SaI* y defosforilada en sus extremos 5' con fosfatasa alcalina (Roche) para evitar el reanillamiento. Así, el fragmento hFc γ se incubó con este vector abierto en presencia de la ligasa de T4 y su correspondiente tampón (Promega, Madison, WI) toda una noche a 16°C. El vector de expresión resultante fue denominado pDisplay/EndoEC-Fc, estando marcado con un epítipo HA en su extremo N-terminal y portando el gen que confiere resistencia a geneticina (G418).

3.4.2. Generación de transfectantes estables productores de la proteína recombinante EndoEC-Fc

Células CHO fueron transfectadas con la construcción pDisplay/EndoEC-Fc. Tras 48 horas, los transfectantes se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). Paulatinamente, la concentración de suero bovino fetal del medio de cultivo F12 completo fue reduciéndose hasta el 2% hasta ser definitivamente sustituido por el medio sin suero UltraCHO (Bio-Witthaker), siempre en presencia del antibiótico de selección.

Para obtener grandes cantidades de la proteína quimera, se generaron clones por dilución límite en placas de 96 pocillos con fondo en U (Nalge Nunc, Alemania). El sobrenadante de cultivo fue analizado mediante un ensayo de inmunoabsorbancia con enzima ligada (ELISA) indirecto tipo sándwich. Las placas de microtitulación empleadas fueron BIOCOAT (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) y tenían inmovilizado un suero policlonal de cabra frente a las cadenas pesada (H) y ligera (L) de la IgG humana. Para detectar la presencia de la proteína de fusión en los medios de cultivo condicionados de 24 horas de los clones aislados, se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-endoglina humana P4A4. La presencia de la proteína recombinante EndoEC-Fc fue puesta de manifiesto mediante el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa y posterior incubación con el sustrato TMB (PharMingen, San Diego, CA). Los controles negativos empleados fueron medio condicionado de células CHO-K1, transfectadas con un vector de expresión irrelevante, y el fragmento hFc γ purificado (Chemicon International Inc., Temecula, CA). Éste también se empleó para comprobar la especificidad del método por competencia frente a un sobrenadante condicionado con EndoEC-Fc. La reacción fue detenida al añadir 2N H₂SO₄ (Panreac, Barcelona, España) y cuantificada en un colorímetro para placas de ELISA MPR A4 (Eurogenetics, Bruselas, Bélgica) a una longitud de onda de 450 nm.

3.5. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para comprobar la funcionalidad de la proteína quimera EndoEC-Fc sobre células endoteliales se estudió si el efecto antiproliferativo dependiente de TGF- β era revertido por esta proteína recombinante, tal y como sucede con la endoglina endógena (Lastres *et al.*, 1996; Letamendía *et al.*, 1998b). Células HMEC-1 fueron sembradas en placas de 24 pocillos en una relación de 5 x 10⁴ células/pocillo y

transfectadas con pDisplay/EndoEC-Fc, utilizando el vector vacío, pDisplay (Invitrogen), como control negativo. Para comprobar que la región extracelular de endogлина presente en EndoEC-Fc era la responsable del efecto observado, pocillos paralelos conteniendo el mismo número de células HMEC-1 se incubaron con la región extracelular de endogлина purificada libre de transportador (R&D Systems, Minneapolis, MN) o bien con PBS como control negativo.

Tras 24 horas en presencia o no de 10 ng/ml TGF- β las células fueron lavadas con PBS y fijadas posteriormente con una solución de formaldehído al 3,5% en PBS durante 10 minutos seguido de metanol al 2% en PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después, los pocillos se incubaron con una solución del colorante cristal violeta al 0,5% en metanol al 20% en PBS durante 15 minutos. Tras lavar con abundante agua, los pocillos se dejaron secar al aire completamente durante toda una noche a temperatura ambiente. Los núcleos celulares así teñidos fueron disueltos en ácido acético al 5% y la absorbancia de alícuotas leída en un colorímetro a una longitud de onda de 595 nm. Estas medidas son directamente proporcionales al número de células presentes en los pocillos y, por lo tanto, a la proliferación. Para estimar el número de células en cada caso, se realizó una curva de calibrado en paralelo. Se definió como índice de proliferación (IP) el resultado de aplicar la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{X_i - X_0}{\bar{X} - X_0} ; \text{ para cada triplicado.}$$

Donde X_i corresponde al número final de células en cada pocillo dentro de un triplicado, \bar{X} es la media de cada triplicado, y X_0 es el número inicial de células, que fue de 50.000 células/pocillo.

3.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de endogлина inducible por doxiciclina en células GM7372EL (Conley *et al.*, 2004) se monitorizó de forma indirecta por citometría de flujo. El sistema de expresión inducible se basa en el plásmido pBI-EGFP (Clontech, Worcester, MA) que permite expresar simultáneamente el gen de interés y EGFP (proteína verde fluorescente mejorada) a partir de un promotor de respuesta a tetraciclina bidireccional. Así en este caso, la cantidad de EGFP presente en las células es directamente proporcional a la de endogлина. Por tanto, las células creciendo en monocapa se trataron con cantidades crecientes de doxiciclina (20-500 ng/ml). Transcurridas 24 horas, las células se lavaron con PBS y se recogieron mediante tratamiento con tripsina. Después de 2 lavados más con PBS, las células se resuspendieron en una solución de 10 μ g/ml yoduro de propidio en PBS para comprobar la viabilidad celular y la fluorescencia se valoró en un citómetro de flujo EPICS-XL (Coulter, Hialeah, FL), empleando un láser de argón sintonizado a una longitud de onda de emisión de 488 nm y colección de fluorescencia a 525 nm, 620 nm para el yoduro de propidio, mediante amplificadores logarítmicos.

3.7. MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se crecieron durante 24 horas sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro previamente tapizados con 0,5 % de gelatina bovina (Sigma), en placas de cultivo de 24 pocillos.

Para detectar la síntesis de la proteína soluble EndoEC-Fc las muestras se fijaron y permeabilizaron en un mismo paso con una solución del 3,5% de formaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania) y 100 µg/ml L- α -lisofosfatidilcolina (Sigma) durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se bloqueó con 1% de BSA en PBS durante 1 hora, tras la cual se procedió a la incubación con el anticuerpo primario indicado en cada caso. Después de tres lavados con PBS frío, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa 488 (emisión en el espectro verde) o Alexa 546 (emisión en el espectro rojo) (Molecular Probes, Eugene, OR), según el caso.

Los filamentos de actina se visualizaron incubando las células una vez fijadas y permeabilizadas, mediante el mismo método anteriormente descrito, con 5 U/ml de faloidina acoplada al fluorocromo rodamina (Molecular Probes), que emite en rojo, durante 30 minutos a 4°C.

Finalmente, las muestras fueron montadas sobre portas con Mowiol 44-88 (Sigma) y analizadas en un microscopio de epifluorescencia Axioplan Universal (Zeiss, Alemania) con CCD Photometrics CH 250/A acoplada. Alternativamente, las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 (Leica Microsystems GmbH, Alemania).

3.8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células fueron lisadas a 4°C durante 30 minutos con tampón de lisis celular, compuesto de 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 500 µM EDTA, 100 µM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10% glicerol, 1% digitonina y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete 1x, Roche). Este tampón fue utilizado también para lisar células en los ensayos de arrastre *in vitro*. Para los ensayos con caveolina-1, el tampón de lisis fue sustituido por 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 60 mM octil- β -glucósido y Complete 1x (Roche).

Las placas de cultivo fueron raspadas y los extractos celulares así obtenidos se centrifugaron a 13.400 rpm durante 5 minutos a 4°C, para sedimentar restos celulares. La concentración de proteínas totales en los sobrenadantes fue determinada mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) respecto a una recta de calibrado con BSA (albúmina sérica bovina) (Roche).

Todas las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo a 4°C con proteína G, según el anticuerpo utilizado en cada caso, unida covalentemente a sefarosa (SP-G) (Amersham Biosciences, Alemania). Debido a las posibles interacciones inespecíficas con esta matriz, se tomaron alícuotas de los lisados con cantidades equivalentes de proteína y se preaclaaron con SP-G durante 1 hora a 4°C. Tras este proceso, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante fue sometido a inmunoprecipitación. Para ello, el anticuerpo adecuado se acopló a SP-G durante 1 hora a 4°C. A continuación, los extractos celulares preaclaados se incubaron con los complejos SP-G/anticuerpo durante toda la noche a 4°C. Finalmente, estos inmunoprecipitados fueron lavados con tampón TNE-T, compuesto por 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0,05% Tween-20.

3.9. ENSAYOS DE ARRASTRE *IN VITRO* (*PULL-DOWN*)

Las células CHO-K1 transfectadas de forma estable con pDisplay/EndoEC-Fc se cultivaron en medio libre de suero UltraCHO (Bio-Witthaker) con 1 mg/ml de G418. Los sobrenadantes condicionados de los cultivos que contenían la proteína soluble EndoEC-Fc se recogieron a las 48 horas de cultivo y se sometieron a centrifugación a 2.000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente con concentradores Vivaspin (Vivascience, Sartorius Group, Alemania) de membrana de polietersulfona que sólo permiten el paso de partículas menores de 50 kDa de peso molecular. La proteína de fusión EndoEC-Fc presente en el medio así enriquecido se acopló a proteína A unida covalentemente a sefarosa (SP-A) (Amersham) durante 1 hora a 4°C en un agitador orbital.

Las células COS-7 transfectadas transitoriamente durante 48 horas con los vectores de expresión de T β R-II, ALK-5 y ALK-1 se lavaron con PBS y se lisaron en frío y agitación durante 30 minutos con el tampón de lisis anteriormente descrito. Alícuotas de estos lisados totales que contenían igual cantidad de proteína se incubaron con la proteína EndoEC-Fc inmovilizada a SP-A durante toda la noche en agitación orbital a 4°C. A continuación, las muestras se lavaron tres veces con TNE-T y finalmente se resuspendieron en tampón Laemli 1X en presencia de 100 mM DTT, para someterla posteriormente a separación por SDS-PAGE y posterior inmunodetección con el anticuerpo correspondiente.

3.10. FRACCIONAMIENTO CELULAR PARA LA OBTENCIÓN DE CAVEOLAS

Células endoteliales humanas HMEC-1 fueron crecidas en placas de 10 cm de diámetro y lisadas durante 30 minutos a 4°C con 2 ml de tampón de lisis compuesto de MBS (25 mM MES pH 6,5, 150 mM NaCl), 1% Triton X-100 y Complete 1x. La superficie de la placa se raspó y los extractos fueron homogenizados con la ayuda de una aguja del calibre 30G. Se almacenó una pequeña alícuota del lisado total y el resto se mezcló con 2 ml de sacarosa al 80% en MBS. Sobre esta suspensión se añadieron 4 ml de sacarosa al 30% en MBS y, sobre esta, 4 ml de sacarosa al 5% en MBS, creando así 12 ml de gradiente de sacarosa discontinuo. La muestra se sometió a ultracentrifugación a 200.000 g a 4°C durante 20 horas en un rotor SW41-4160. Se recogieron 12 fracciones de 1 ml cada una y las proteínas presentes en ellas se precipitaron añadiendo 1 volumen de tricloroacético (TCA) al 40%. Se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C a máxima velocidad en una microcentrífuga y se realizaron 3 lavados con una solución etanol:éter (1:1). Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 100 μ l de tampón de muestra Laemli 1x con 1 mM DTT y alícuotas se sometieron a SDS-PAGE y electrotransferencia a membrana de PVDF y posterior inmunodetección.

3.11. ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN (*WESTERN BLOT*) DE PROTEÍNAS

Las proteínas se separaron y analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Muestras de extractos celulares totales, o bien inmunoprecipitados, se diluyeron en tampón Laemmli, se hirvieron durante 5 minutos y se analizaron en condiciones reductoras, con 100 mM DTT

(Sigma), o no reductoras en minigeles adaptados a los sistemas de electroforesis Mini Protean 3 (Bio-Rad Laboratories) y Hoefer (Amersham), según los casos.

Las proteínas separadas en función de sus tamaños presentes en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P (Amersham). Las uniones inespecíficas se bloquearon incubando la membrana en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl y 0,05% Tween-20). Una vez bloqueada, la membrana se incubó con los anticuerpos correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 minutos, se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (DakoCytomation). La reacción de reconocimiento de las bandas específicas se llevó a cabo, tras 3 lavados con TBS-T, mediante un ensayo de quimioluminiscencia utilizando el kit comercial SuperSignal (Pierce, Rockford, IL). La densitometría de las bandas reveladas en películas Curix RP2 Plus (AGFA, Mortsel, Bélgica) se realizó con el programa informático Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA).

3.12. ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF- β

Todos los ensayos se llevaron a cabo mediante la transfección transitoria de las células indicadas en cada caso en placas de 24 pocillos. Las unidades relativas de luciferasa se determinaron en un luminómetro TD20/20 (Promega). En todos los casos, la transfección incluyó un vector de expresión de β -galactosidasa insensible a TGF- β (pSV40/ β -Gal) que se utilizó como control interno para corregir la eficiencia de transfección. La medida de esta actividad se llevó a cabo mediante el reactivo Galacto-Light (Tropix, Bedford, MA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se definen como unidades relativas de luciferasa (U.R.L.) el cociente de la actividad luciferasa entre la de β -galactosidasa. Cuando fue necesario, se añadió TGF- β a la concentración y tiempo indicados. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado y los resultados fueron analizados mediante el test estadístico t-student.

3.12.1. Ensayos de actividad reportera

Para estudiar señalización activada por TGF- β , se analizó la actividad reportera de promotores de genes diana de TGF- β y la de elementos concretos de respuesta dentro de estos promotores, en ambos casos acoplados al cDNA que codifica para la enzima luciferasa. Estos vectores se describen a continuación en la Tabla 4.

Nombre	Gen de origen	Secuencia	Referencia
pId1-Luc	Id1	-1585/+88	(Tournay & Benezra, 1996)
p800-Luc	PAI-1	-800/+71	(van Zonneveld <i>et al.</i> , 1988)
p(BRE) ₂ -Luc	Id1	2x[(-1052/-1032)/(-1105/-1080)]	(Korchynski & ten Dijke, 2002)
p(CAGA) ₁₂ -Luc	PAI-1	12x[(-791/-546)/(-328/-187)]	(Denkler <i>et al.</i> , 1998)

Tabla 4. Vectores reporteros de la vía de señalización de TGF- β . Id1, Inhibidor de la unión al DNA-1; PAI-1, Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1; BRE, Elemento de Respuesta a BMPs; CAGA, Consenso denominado caja CAGA para la unión a Smad3 (AG(C/A)CAGACA).

3.12.2. Ensayos de transactivación con el sistema GAL4

Para los ensayos de transactivación se utilizaron vectores de expresión que codificaban para las proteínas Smad1 y Smad3 fusionadas al dominio de transactivación GAL4, cedidas amablemente por el Dr. Konosuke Nakayama (Universidad de Tokio, Japón) (Nakayama *et al.*, 2003) y el Dr. Rik Derynck (Georgetown University, Washington, DC) (Feng *et al.*, 1998), respectivamente. Fueron co-transfectadas con el vector reportero pFr5-Luc (Stratagene, La Jolla, CA). Así, la capacidad de transactivación por parte de las Smads del promotor heterólogo GAL4 fue cuantificada por la medida de la actividad luciferasa expresada por las células transfectadas.

3.13. INTERFERENCIA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PEQUEÑAS MOLÉCULAS DE RNA (*KNOCK-DOWN*)

El vector pSUPER (OligoEngine, Seattle, WA) fue utilizado para los ensayos de interferencia con pequeñas moléculas de RNA. Así, el vector pSUPER/Endo-Ex4 se generó insertando un oligonucleótido de doble hebra, según las reglas de Elbashir (Elbashir *et al.*, 2001; Harborth *et al.*, 2001), correspondiente a una pequeña secuencia homóloga del exón 4 del gen de endoglina humana, tal y como fue descrito previamente (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). El vector pRNA-U6/cav-1 para la interferencia de caveolina-1 (Bhatnagar *et al.*, 2004) fue amablemente aportado por el Dr. Bryan L. Roth (*Case Western Reserve University School of Medicine*, Cleveland, OH).

Una vez que el vector es transfectado, se transcribe una pequeña molécula de RNA que al adoptar una estructura secundaria bicatenaria interfiere post-transcripcionalmente con la expresión del gen diana. Como control de la interferencia se utilizaron secuencias irrelevantes para el gen estudiado en cada caso.

3.14. TRANSCRIPCIÓN REVERSA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

El RNA total de células HUVECs para su análisis a lo largo de los pases del cultivo primario fue obtenido mediante el método de un solo paso con el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA aislado se resuspendió en el tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). A continuación, la síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA total mediante un kit comercial para RT-PCR (*First Strand cDNA Synthesis*, Roche) usando como oligonucleótido cebador oligo(dT)₁₅ en un volumen final de reacción de 20 µl siguiendo las indicaciones comerciales. Después, alícuotas de 5 µl de cDNA así obtenido se sometieron a amplificación por PCR empleando el kit comercial *HotMaster Taq DNA Polimerase* (Eppendorf, Alemania) y los productos derivados se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa. La secuencia de los oligonucleótidos cebadores específicos para PCR empleados se resume en la Tabla 5. Como control interno, y para normalizar, se amplificó una secuencia de 417 pb correspondiente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Diana	Secuencia (5' → 3')	
	Directo	Reverso
CT-Endo	GAATTCTGGTACATCTACTCGC	GGCTATGCCATGCTGCTGGTGG
EC-Endo	GGGGCCCAGCCGGCCGAAACAGTCCATTGT	TCCCCGCGTTTCCGCTGTGG
ALK-1	GCAGATCTGACCCTGTGAAGCCG	TACCGCGGCTGGCCATCTGTTCC
ALK-5	GGCCATGGATCTGCCACAACC	GACCCGGGTACATTTTGATGCC
TβR-II	ATGGCCATGGAGGCCCGCGTTAACCGGCAG	GAGGATCCTATTTGGTAGTGTTTAG
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTC	CGGCCATCACGCCACACAGT

Tabla 5: Secuencia de los oligonucleótidos específicos empleados en la amplificación por PCR. La pareja de oligonucleótidos CT-Endo detectan la región citoplásmica tanto de endogлина-L (150 pb) como de endogлина-S (285 pb) (Bellón *et al.*, 1993). El par EC-Endo amplifica una secuencia del dominio extracelular de endogлина, por lo que pone de manifiesto la endogлина total.

Las condiciones de la reacción de transcripción reversa fueron 30 minutos a 50°C seguidos de 6 minutos a 85°C y posterior enfriamiento a 4°C. Las condiciones de tiempo y temperatura de las amplificaciones por PCR fueron las siguientes: 5 minutos a 96 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 96 °C, 1 min at 52 °C (según la pareja de cebadores) y 1 min a 68 °C, con un paso final de elongación de 8 min at 68 °C y posterior enfriamiento a 4°C.

3.15. ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA

Células HUVECs se cultivaron en placas de 60 mm de diámetro pretratadas con 0,2% gelatina en PBS. La tinción de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA β -gal) se desarrolló de acuerdo con el protocolo establecido en la literatura (Dimri *et al.*, 1995). En resumen, en el pase indicado las células se lavaron con PBS dos veces y se fijaron con una solución de 3,5% formaldehído (Merck, Alemania) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados las células fijadas fueron incubadas a 37°C en ausencia de CO₂ durante 16 horas la solución de tinción compuesta por 1 mg/ml de X-gal, 40 mM tampón ácido cítrico/Na₂HPO₄ pH 6,0, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂ y 150 mM NaCl. Las células teñidas fueron observadas en un microscopio invertido de contraste de fase Axiovert 25 (Zeiss). El marcaje SA β -gal fue puesto de manifiesto como células con el citoplasma teñido de azul y el porcentaje de senescencia se estableció como la media del conteo de células marcadas de cuatro campos tomados de forma aleatoria.

3.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados que se muestran son representativos de al menos tres repeticiones. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la aplicación del test t-Student. Las representaciones gráficas muestran la media \pm SEM (error estándar de la media). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1. ENDOGLINA SE ASOCIA DIRECTAMENTE CON ALK-1

De acuerdo con el primer objetivo planteado, se quiso estudiar la posible interacción de endoglina con ALK-1, ya que ambos intervienen en el complejo del receptor de TGF- β y son co-expresados en células endoteliales. Para dicho fin, se transfectaron células COS-7 con los vectores de expresión para endoglina y ALK-1. Al mismo tiempo, se quiso comprobar si de producirse la interacción, ésta dependía del estado de activación del T β R-I por lo que dos mutantes correspondientes a la forma quinasa deficiente, ALK-1 (K229R), y constitutivamente activada, ALK-1 (Q201D), se incluyeron en el ensayo de inmunoprecipitación. La Figura 9.A muestra que las tres versiones de ALK-1 son inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal frente a endoglina (panel superior). Como control, tanto endoglina como las tres formas de ALK-1 se inmunodetectan en los lisados totales gracias a los epítomos HA que portan (panel inferior).

Por otro lado, el experimento reverso (Figura 9.B) confirmó estos resultados, es decir, el anticuerpo monoclonal frente al epítomo HA presente en las variantes de ALK-1 es capaz de inmunoprecipitar endoglina, marcada en este caso con un epítomo myc.

Estos resultados demuestran que endoglina interacciona con ALK-1 y que esta asociación no depende del estado de activación de la quinasa de este receptor tipo I de TGF- β .

4.1.1. La interacción endoglina/ALK-1 implica a sus regiones extracelulares

Para diseccionar esta interacción, se quiso comprobar si la región extracelular de endoglina era capaz de asociarse con ALK-1. Para conseguir este objetivo, se construyó el vector de expresión pDisplay/EndoEC-Fc que codifica para la proteína quimera compuesta por el dominio extracelular completo de endoglina (Glu26-Gly586) fusionado al fragmento Fc de la IgG1 humana. Esta proteína recombinante se obtuvo a partir de transfectantes estables de células CHO-K1. Se comprobó que era sintetizada por éstos (Figura 10.A) y que era secretada al sobrenadante principalmente en forma de homodímero (Figura 10.B).

Esta proteína quimera EndoEC-Fc se acopló a sefarosa-proteína A y se incubó con lisados totales de células COS-7 transfectadas independientemente con los receptores T β R-II, ALK-5 y ALK-1. Como muestra la Figura 11, todos estos receptores fueron arrastrados por la región extracelular de endoglina fusionada al fragmento Fc, demostrando que la interacción se puede llevar a cabo por este ectodominio de endoglina. Sin embargo, hay que destacar que la interacción de T β R-II y ALK-5 con EndoEC-Fc es similar pero mucho menor que con ALK-1, tal y como pone de manifiesto la densitometría de las bandas reveladas en la inmunodetección (Figura 11, panel inferior).

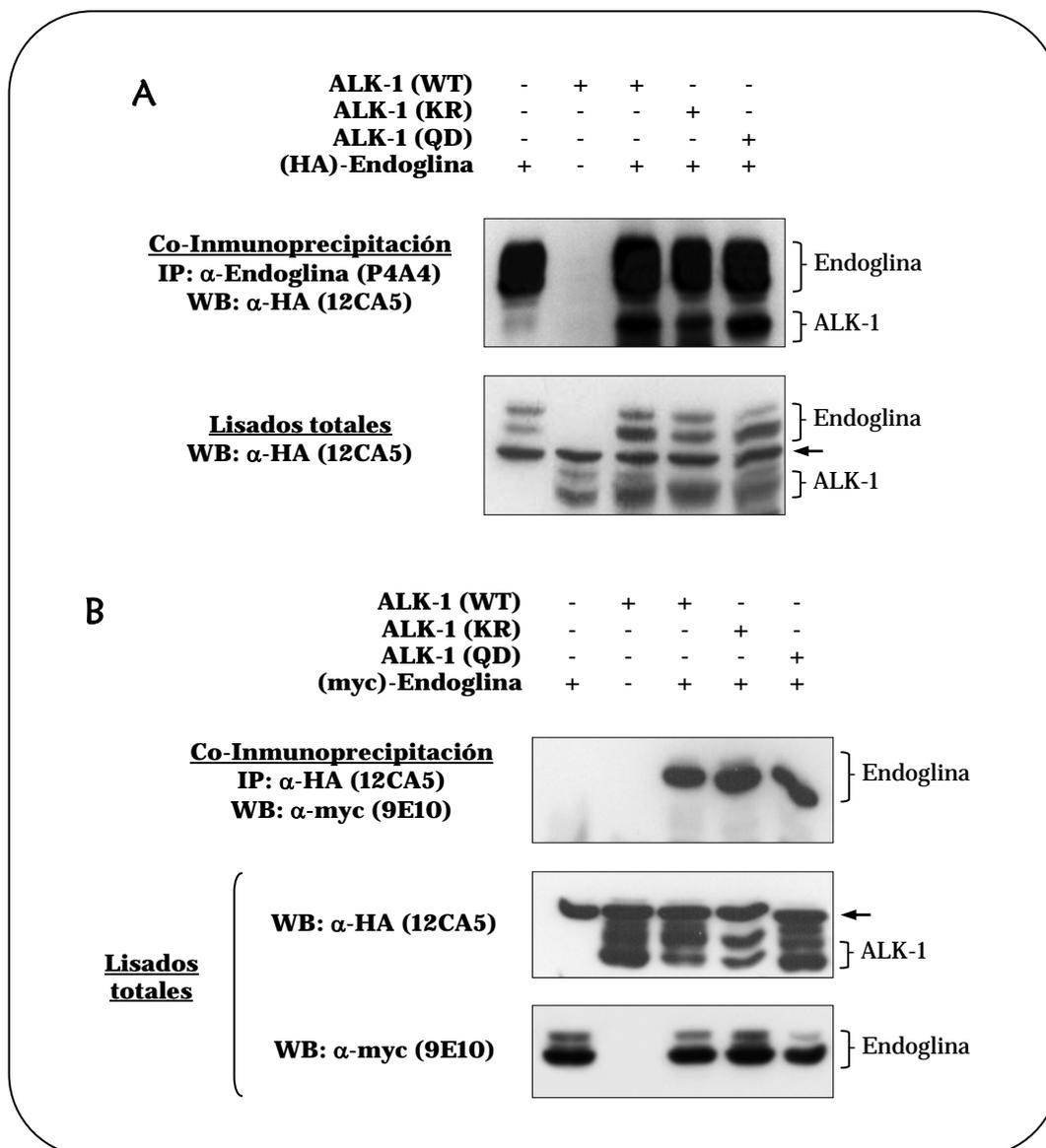


Figura 9: Endoglina se asocia con ALK-1. Células COS-7 se transfectaron con los vectores de expresión indicados. Tras 48 horas, las células fueron lisadas. Los lisados totales y las inmunoprecipitaciones fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de electrotransferencia e inmunodetección (*western-blot*). **(A)** Anticuerpos frente a endoglina son capaces de inmunoprecipitar la forma salvaje de ALK-1 así como los mutantes kinasa deficiente y constitutivamente activo. **(B)** Experimento inverso en el que se demuestra que anticuerpos contra el epítipo HA presente en ALK-1 salvaje y sus variantes inactivas y activas inmunoprecipitan endoglina, confirmándose la interacción entre ambas proteínas.

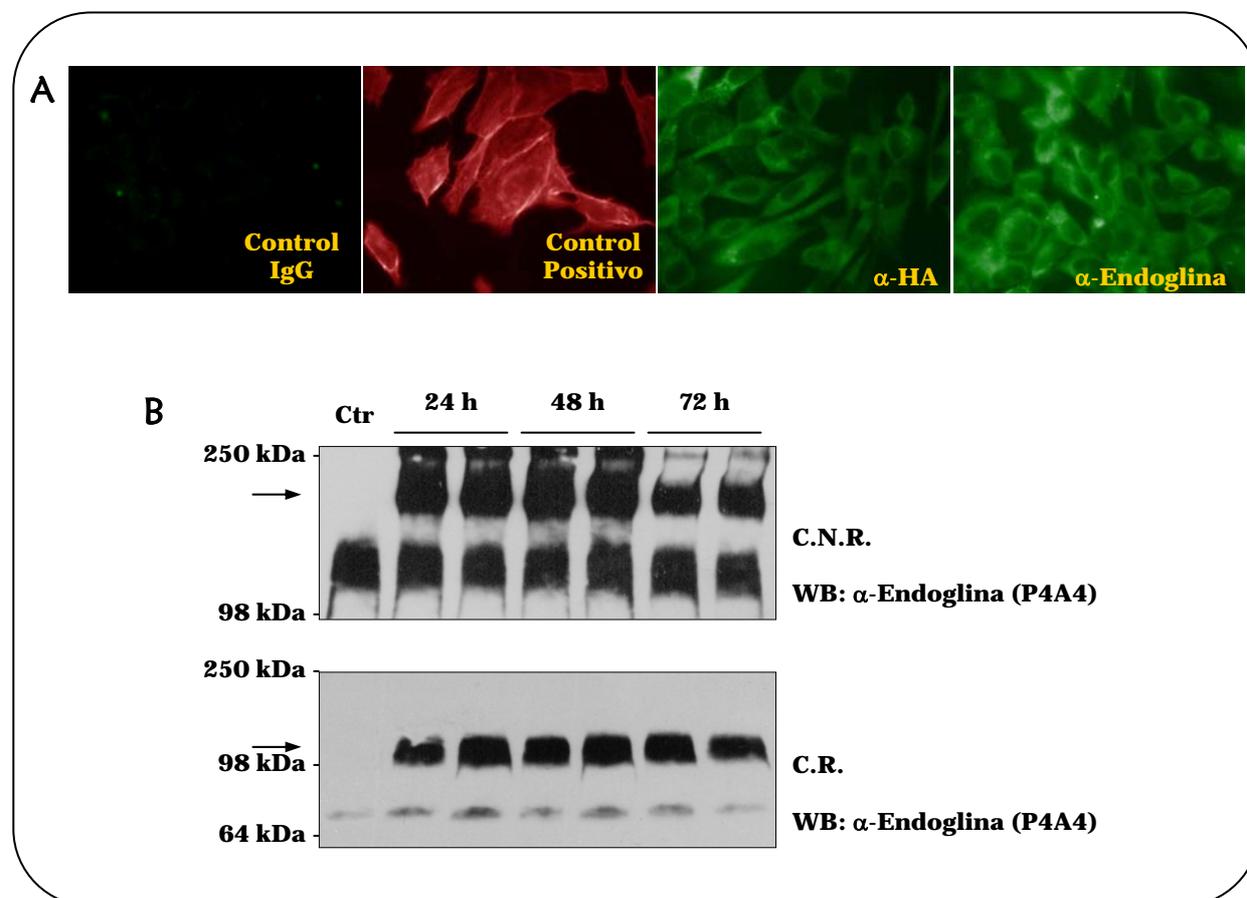


Figura 10: Producción de la proteína quimera EndoEC-Fc. Células CHO-K1 fueron transfectadas de forma estable con pDsplay/EndoEC-Fc o con el vector vacío. Se seleccionaron clones que sobreexpresaban la proteína recombinante y se analizaron. **(A)** La tinción citoplásmica indica que EndoEC-Fc es activamente sintetizada por los transfectantes estables de CHO-K1, puesta de manifiesto mediante los anticuerpos anti-HA (12CA5) y anti-endogлина (P4A4). En el control negativo se incubó sólo con el anticuerpo secundario, mientras que la tinción con faloidina marcada con rodamina se utilizó como control positivo. **(B)** El sobrenadante UltraCHO condicionado de los transfectantes control y de EndoEC-Fc fue recogido por duplicado a los tiempos indicados y sometidos a separación por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (C.N.R.) o reductoras (C.R.) y electrotransferencia e inmunodetección. Los resultados obtenidos demuestran que (i) EndoEC-Fc se libera al medio de cultivo, (ii) se libera al medio de forma soluble como un dímero, y (iii) con mayor rendimiento entre las 24 y las 48 horas.

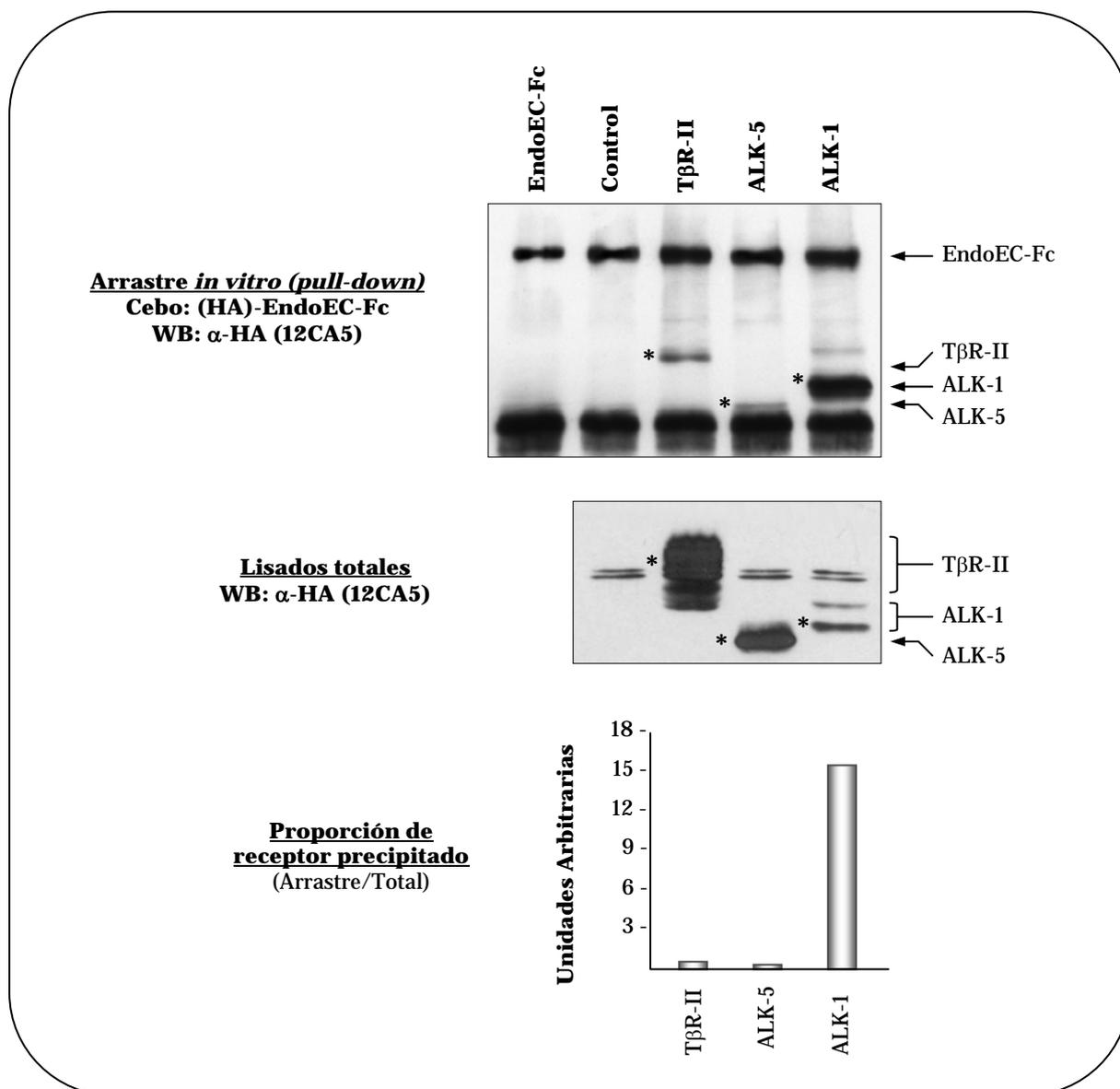


Figura 11: Interacción de las regiones extracelulares de endogлина y los receptores de TGF- β . Células COS-7 fueron transfectadas con los vectores de expresión de los receptores de TGF- β indicados y lisadas tras 48 horas. La expresión de los distintos receptores fue analizada mediante separación por SDS-PAGE en condiciones reductoras y electrotransferencia e inmunodetección por el epítipo HA con el que estaban marcados en los lisados totales (panel medio). El sobrenadante de cultivo UltraCHO condicionado de 24 horas de transfectantes estables de EndoEC-Fc fue incubado con sefaroza/proteína A para retener la proteína quimera por su fragmento Fc humano. Este cebo fue incubado con los distintos lisados totales y los receptores arrastrados se separaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y electrotransferencia e inmunodetección con el anticuerpo anti-HA (12CA5). El panel superior muestra que EndoEC-Fc es capaz de arrastrar el TβR-II, ALK-5 y ALK-1 (señalados con asteriscos). La densitometría de las bandas (panel inferior) muestra que la interacción de EndoEC-Fc con ALK-1 es mucho mayor que con el resto de receptores.

4.1.2. Los dominios citoplásmicos de endogлина y ALK-1 interactúan entre sí.

Para estudiar si la asociación endogлина/ALK-1 tenía lugar también por sus regiones citoplásmicas, se transfectaron la forma salvaje de ALK-1, la forma quinasa deficiente y la constitutivamente activa junto con una construcción truncada de endogлина que contenía la secuencia transmembrana y el tallo citoplásmico. Como se aprecia en la Figura 12, anticuerpos frente a ALK-1 son capaces de inmunoprecipitar el tallo citoplásmico de endogлина. No obstante, hay que puntualizar que en este caso el estado de activación de ALK-1 sí influye en la asociación con la construcción truncada de endogлина TMCT-Endo (Figura 12). Este hecho se podría explicar por la pérdida de afinidad del dominio serina/treonina quinasa por su producto, tras actuar sobre el sustrato.

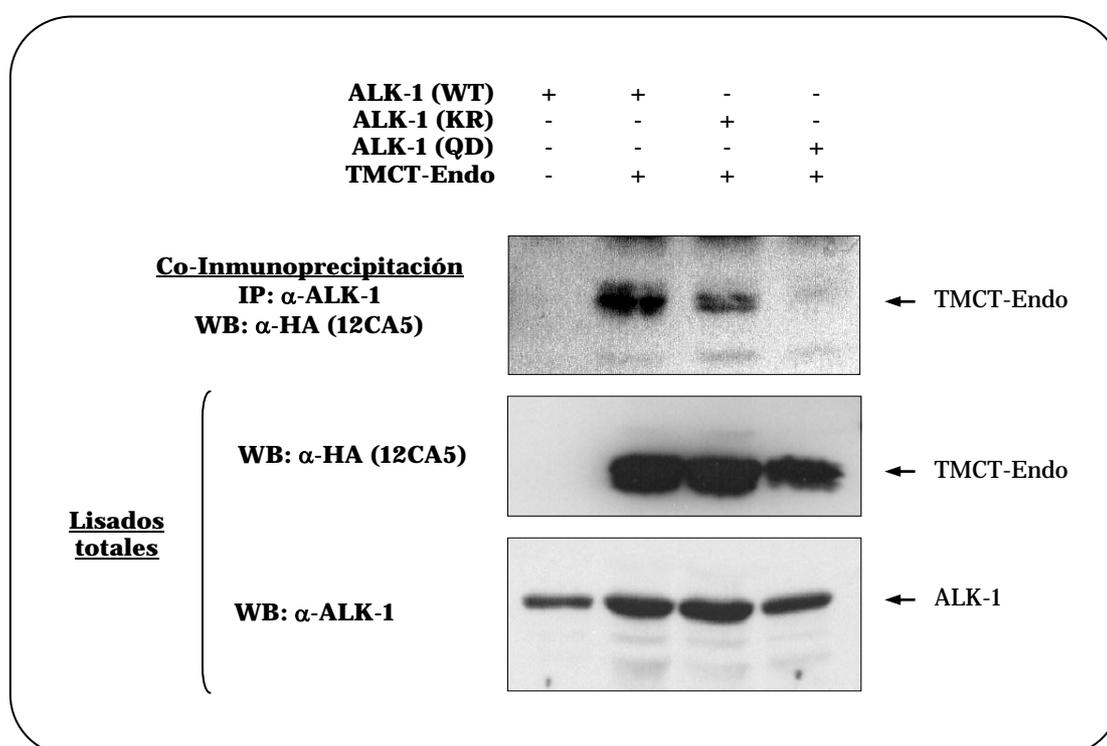


Figura 12: Interacción del dominio citoplásmico de endogлина con ALK-1. Células COS-7 fueron transfectadas con los vectores de expresión de ALK-1 salvaje (WT), quinasa deficiente (KR) y constitutivamente activo (QD) junto con el dominio citoplásmico de endogлина (TMCT-Endo) y lisadas tras 48 horas. Los lisados totales y los inmunoprecipitados fueron separados por SDS-PAGE en condiciones reductoras y electrotransferidos e inmunodetectados con anticuerpos específicos. En los lisados totales se inmunodetectó la expresión de las proteínas recombinantes mediante los anticuerpos indicados (paneles medio e inferior). El panel superior muestra que la construcción truncada de endogлина TMCT-Endo fue co-inmunoprecipitada con anticuerpos policlonales frente a ALK-1, excepto en el caso del mutante constitutivamente activo ALK-1 (QD).

4.2. ENDOGLINA FAVORECE LA SEÑALIZACIÓN DE TGF- β VÍA ALK-1

Para analizar el papel que juega endoglina en la vía de señalización dependiente de ALK-1 en células endoteliales, se utilizó el sistema inducible por doxiciclina GM7372-EL (Conley *et al.*, 2004). Como se comentó en el apartado de Materiales y Métodos, esta línea celular endotelial bovina expresa endoglina humana en respuesta a doxiciclina. La Figura 13 muestra la monitorización de este sistema mediante inmunodetección y por citometría de flujo a distintas dosis de doxiciclina.

Ya que ALK-1 desencadena la señalización de TGF- β vía Smad1, se utilizó el sistema reportero, denominado también como híbrido simple, GAL4-Smad1 (Nakayama *et al.*, 2003) para comprobar si la asociación endoglina/ALK-1 tenía alguna implicación funcional. En este sistema se genera una proteína de fusión del factor de transcripción Smad1 al dominio de unión al DNA de GAL4, la cual es transfectada simultáneamente con el vector reportero para GAL4 acoplado a luciferasa, pFr5-Luc (Stratagene).

La inducción de endoglina a dosis crecientes de doxiciclina resultó en una clara inducción de la actividad reportera vía GAL4-Smad1 (Figura 14.A). En este sentido cabe destacar que curiosamente esta inducción tuvo lugar incluso sobre la actividad basal, esto es, en ausencia de estímulo por TGF- β . Esta inducción de GAL4-Smad1 fue corroborada mediante la forma quinasa deficiente de ALK-1 independientemente de la presencia de endoglina en el sistema. El efecto negativo de este ALK-1 (KR) sobre la respuesta transcripcional basal de Smad1 indica la existencia de actividad de ALK-1 endógeno.

El papel de endoglina en la señalización TGF- β /ALK-1 fue analizado además mediante ensayos con RNA de interferencia (siRNA). Así, células endoteliales humanas HMEC-1 fueron transfectadas con el vector pSUPER/EndoEx4, que codifica para un pequeño siRNA que interfiere específicamente con la expresión de endoglina (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). El resultado del experimento demostró que el bloqueo específico de la expresión de endoglina inhibe la transactivación de GAL4-Smad1 inducida por TGF- β (Figura 14.B).

Estos resultados demuestran que endoglina está implicada en la vía de señalización TGF- β /ALK-1 en células endoteliales.

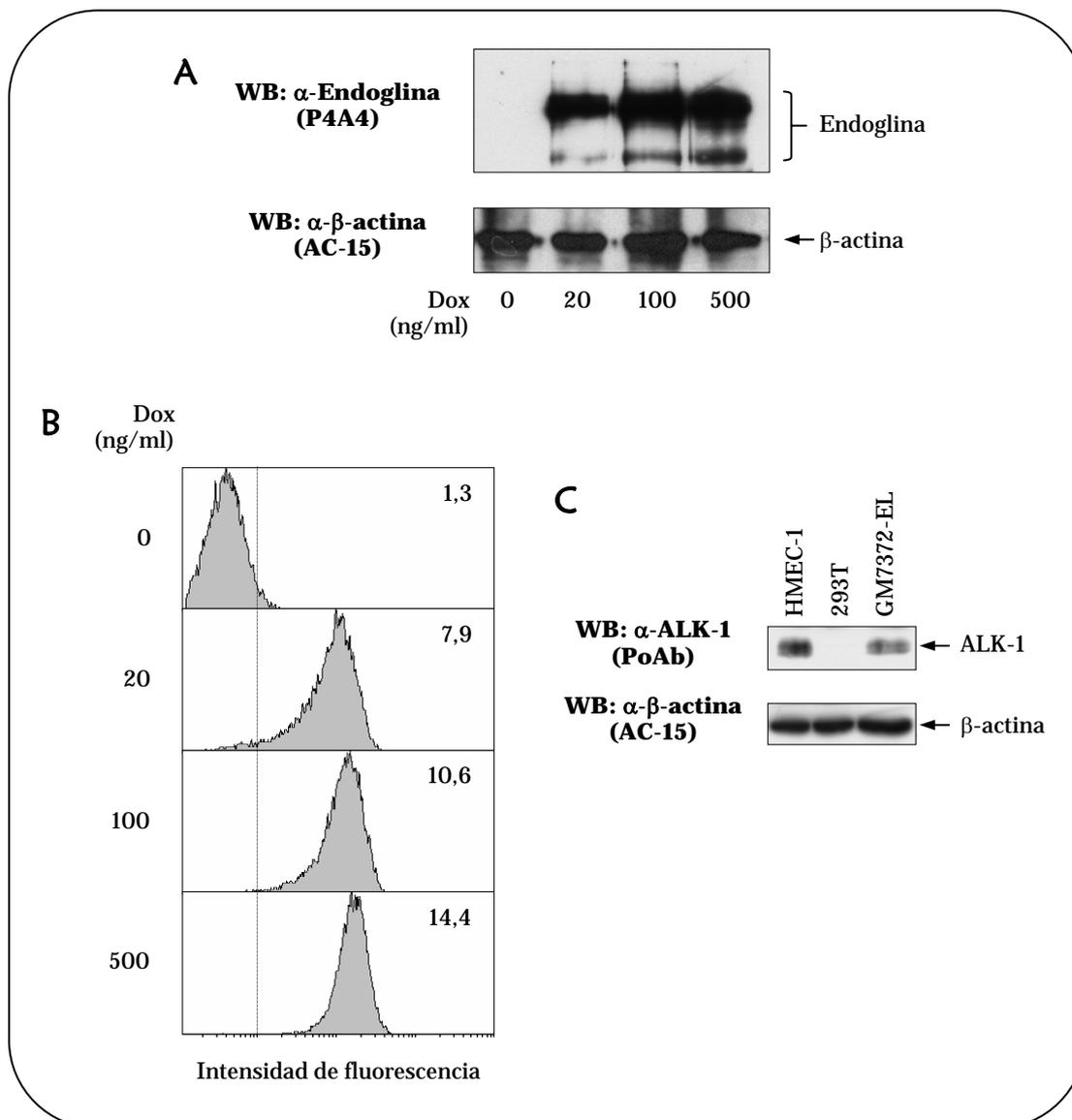


Figura 13: Monitorización del sistema GM7372-EL, línea endotelial bovina inducible de endogлина humana por doxiciclina. Se establece una relación directa entre la dosis de doxiciclina y la expresión de endogлина durante 24 horas mediante **(A)** lisados totales sometidos a SDS-PAGE en condiciones no reductoras y electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos anti-Endogлина (P4A4) y **(B)** citometría de flujo, donde la detección de la proteína verde fluorescente, EGFP, es directamente proporcional a la expresión de endogлина por estar acopladas transcripcionalmente (ver apartado Materiales y Métodos). **(C)** Detección de ALK-1 endógeno bovino en un extracto total. Como control positivo se analizó un lisado de células endoteliales humanas HMEC-1. Como control negativo, un lisado de células 293T. Estos tres lisados se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras y electrotransferencia e inmunodetección. Debido al alto nivel de homología entre la secuencia humana y la bovina de ALK-1 (aproximadamente 90%), ambas proteínas pueden ser reconocidas por los mismos anticuerpos policlonales frente a ALK-1 humano por reacción cruzada. El lisado total de células HMEC-1 se utilizó como control positivo y el de células 293T como negativo.

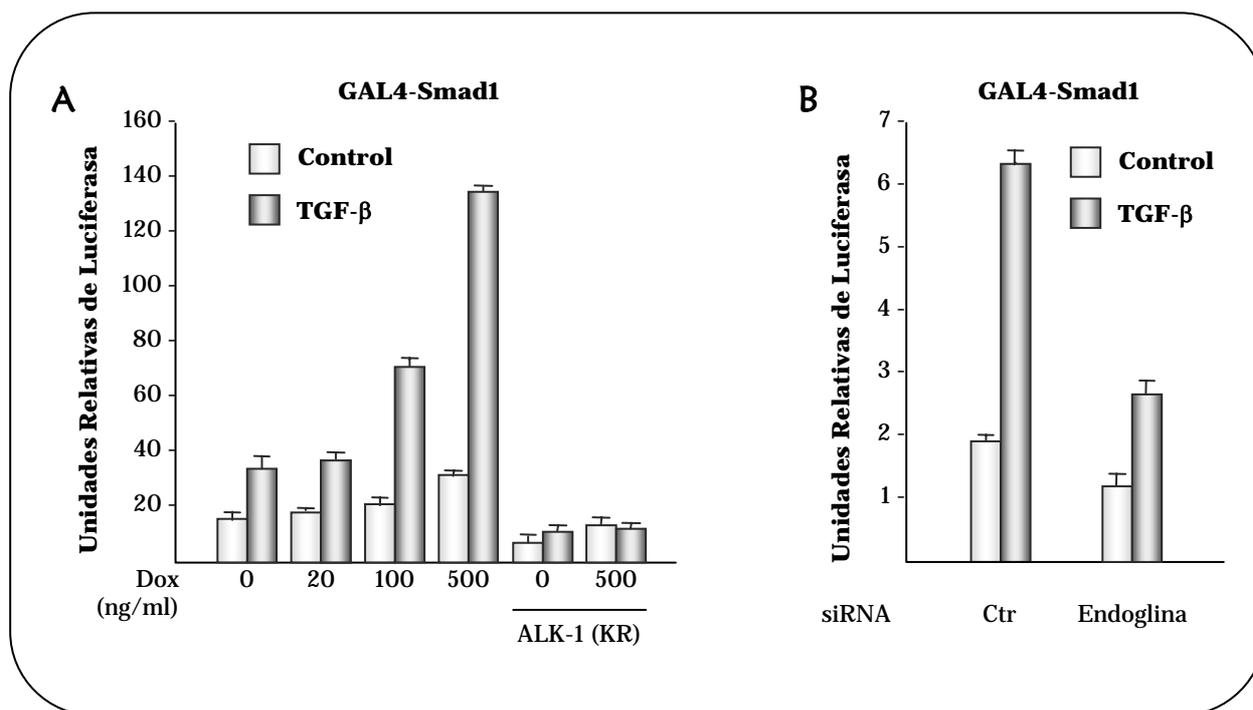


Figura 14: Efecto de la expresión de endoglina sobre la señalización dependiente de Smad1. **(A)** La expresión de endoglina inducida por dosis crecientes de doxiciclina durante 16 horas en células GM7372EL resultó en un aumento de la transactivación GAL4-Smad1 tanto basal como inducida por 10 ng/ml TGF- β durante 24 horas adicionales, mientras que la forma quinasa deficiente ALK-1 (KR) anuló toda actividad reportera. **(B)** La expresión de endoglina endógena en células HMEC-1 fue eliminada mediante la transfección de un siRNA específico durante 40 horas. Mientras que un siRNA irrelevante no causó efecto alguno sobre la actividad de transactivación de GAL4-Smad1, el siRNA de endoglina redujo significativamente esta actividad, tanto en ausencia como en presencia de 10 ng/ml TGF- β , demostrando que endoglina es capaz de potenciar considerablemente la vía de señalización ALK-1/Smad1. En todos los casos, $p < 0,01$.

4.2.1 El dominio extracelular de endoglina promueve la señalización vía ALK-1

Para mapear las regiones de endoglina implicadas en la señalización de ALK-1 inducida por TGF- β , varias construcciones truncadas fueron transfectadas en células CHO-K1. Este sistema celular se empleó por su alta eficiencia de transfección y por ser un modelo que responde a la señalización de TGF- β vía receptores ALK (Liu *et al.*, 2002). Así, la Figura 15 esquematiza las construcciones empleadas para analizar la contribución específica de cada dominio de endoglina, donde se empleó el sistema reportero GAL4-Smad1/pFr5-Luc.

Como era de esperar, la secuencia completa de endoglina aumentó la transactivación, tanto basal como inducida por TGF- β , de GAL4-Smad1 con respecto a células transfectadas con vector vacío (control). Sin embargo, la transfección de la construcción que carecía del dominio citoplásmico (ECTM-Endo) resultó en una marcada estimulación de la transactivación GAL4-Smad1 respecto la forma completa, mientras que la que carecía del dominio extracelular (TMCT-Endo) condujo a una inhibición de esta actividad que, incluso, no pudo ser inducida por el tratamiento con TGF- β (Figura 15.A).

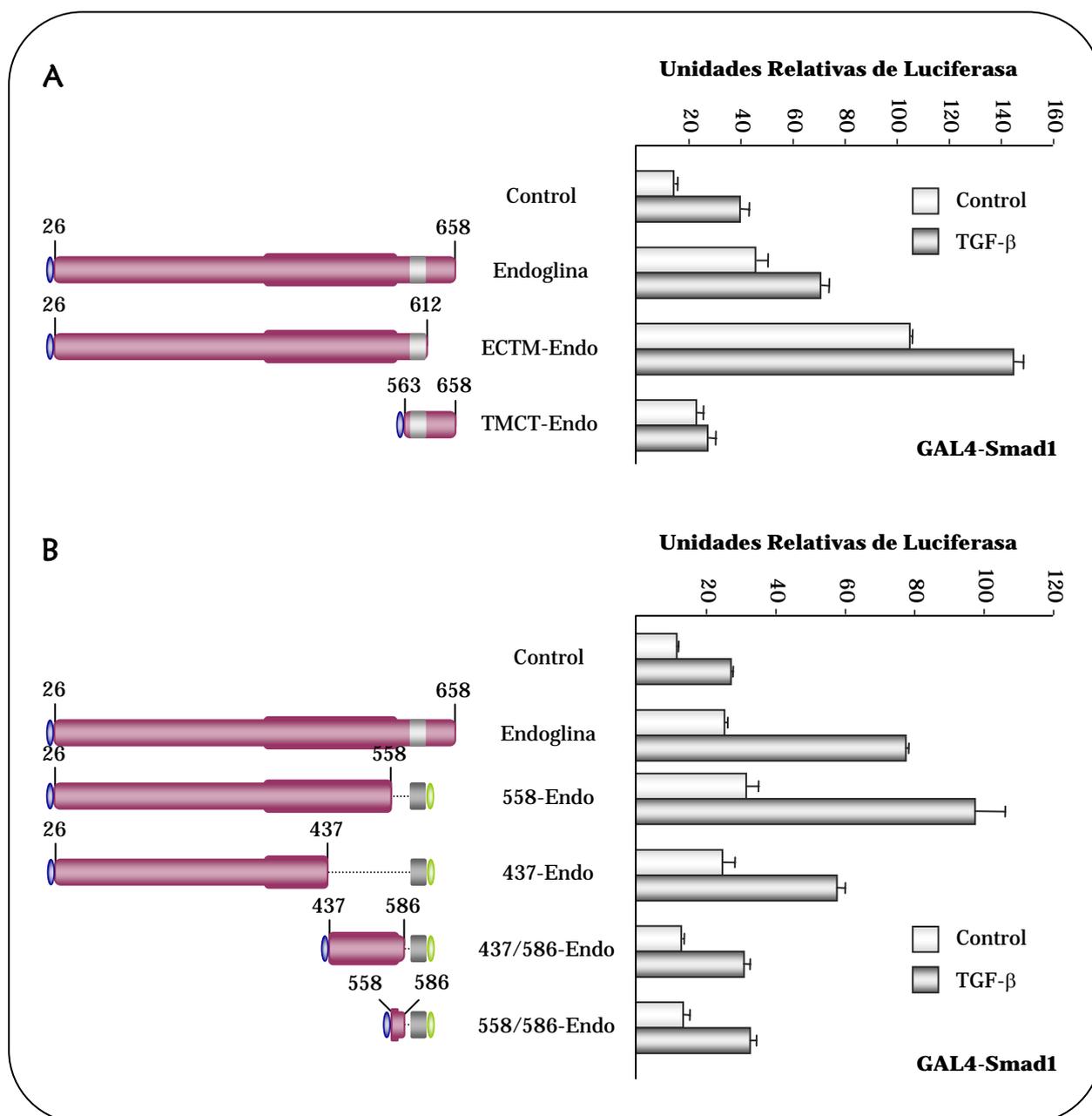


Figura 15: Contribución de cada región de endoglina a la inducción de la vía ALK-1/Smad1. Células CHO-K1 fueron transfectadas con los vectores de expresión de la forma de endoglina indicada junto con el sistema reportero GAL4-Smad1/pFr5-Luc y el control interno pSV40/ β -Gal. En los esquemas de endoglina representados se indican los dominios extracelular (EC), transmembrana (TM) y citoplásmico (CT), así como la posición del residuo que delimita la versión truncada de endoglina. También se indican el epítipo HA (azul), la región transmembrana de endoglina (gris claro), la aportada por el vector pDisplay del receptor de PDGF (gris oscuro) y el epítipo myc (verde). El TGF- β fue añadido a 10 ng/ml durante 24 horas posteriores a 24 horas de transfección. En todos los casos, $p < 0,01$. **(A)** La estimulación de la transactivación de GAL4-Smad1 depende del dominio extracelular de endoglina. **(B)** La expresión de la construcción 558-Endo mostró el mayor efecto inductor de la señalización de Smad1.

En un intento por definir qué región dentro del dominio extracelular era la responsable de la inducción de la vía de Smad1, se emplearon distintas construcciones truncadas de endogлина (Figura 15.B). Aquella que contenía la región Glu26-Gly558 fue la que mayor efecto inductor tuvo sobre el sistema reportero de la vía de Smad1. Por otro lado, aunque algo menor que la actividad de la forma completa de endogлина, la construcción 437-Endo también fue capaz de inducir la vía de Smad1. Por el contrario, el resto de variantes truncadas no fueron capaces de alterar este sistema reportero. Estos resultados sugieren que la inducción de la vía ALK-1/Smad1 mediada por endogлина depende de su dominio extracelular, siendo la región comprendida hasta la Gly558 la que potencia esta señalización.

4.2.2. Endogлина induce la actividad del promotor de Id1 en respuesta a TGF- β vía ALK-1

La familia de proteínas Id (*Inhibition of DNA binding*) se compone de cuatro miembros, Id1, 2, 3 y 4, pertenecientes al grupo de factores de transcripción hélice-giro-hélice básicos, bHLH (*basic helix-loop-helix*), que actúan como reguladores dominantes negativos y que están implicados en proliferación celular y procesos de diferenciación que afectan a la angiogénesis (Ruzinova & Benezra, 2003). Ya que el miembro Id1 se identificó como un gen diana inducido por la señalización TGF- β /ALK-1 en células endoteliales (Goumans *et al.*, 2002; Ota *et al.*, 2002; Valdimarsdottir *et al.*, 2002), se empleó una construcción reportera con su promotor, pId1-Luc, (Tournay & Benezra, 1996) para analizar la implicación de endogлина. Así, la actividad de este vector fue analizada en presencia de concentraciones crecientes de doxiciclina en células GM7372EL, que indujeron la expresión de endogлина. En la Figura 16.A se muestra que si bien el tratamiento con TGF- β reprime el promotor de Id1, la expresión de endogлина aumenta su actividad reportera y compensa dicha inhibición.

Además, los niveles basales de la actividad promotora de Id1 en el sistema GM7372EL aumentaron notoriamente por la transfección del mutante constitutivamente activo ALK-1 (QD) o el quinasa deficiente ALK-5 (KR), mientras que fueron inhibidos por la forma dominante negativa ALK-1 (KR) o la constitutivamente activa ALK-5 (TD). La actividad del promotor de Id1 se vio reducida en todos los casos por el tratamiento con TGF- β . Esta observación concuerda con la estimulación mediada por ALK-1 de la expresión de Id1 en condiciones basales o a bajas dosis de TGF- β (Goumans *et al.*, 2002), mientras que la transcripción de Id1 es reprimida por elevadas dosis de ligando a través de la vía TGF- β /ALK-5 (Goumans *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003) (Figura 16.B).

Para confirmar estos resultados, se llevaron a cabo experimentos en células GM7372EL con el vector reportero p(BRE)₂-Luc. Como se describió en el apartado Materiales y Métodos, esta construcción contiene dos elementos críticos de respuesta específicos para ALK-1 dispuestos en tándem del promotor de Id1 (Korchynskyi & ten Dijke, 2002). Así, la inducción de endogлина por doxiciclina resultó en un aumento de la actividad basal del vector reportero de forma dependiente de la dosis, si bien su actividad fue inhibida en presencia de TGF- β . Como control, la especificidad de ALK-1 sobre la actividad de p(BRE)₂-Luc fue demostrada por la transfección del mutante dominante negativo ALK-1 (KR), que anuló prácticamente la respuesta de esta construcción en cualquier condición (Figura 16.C).

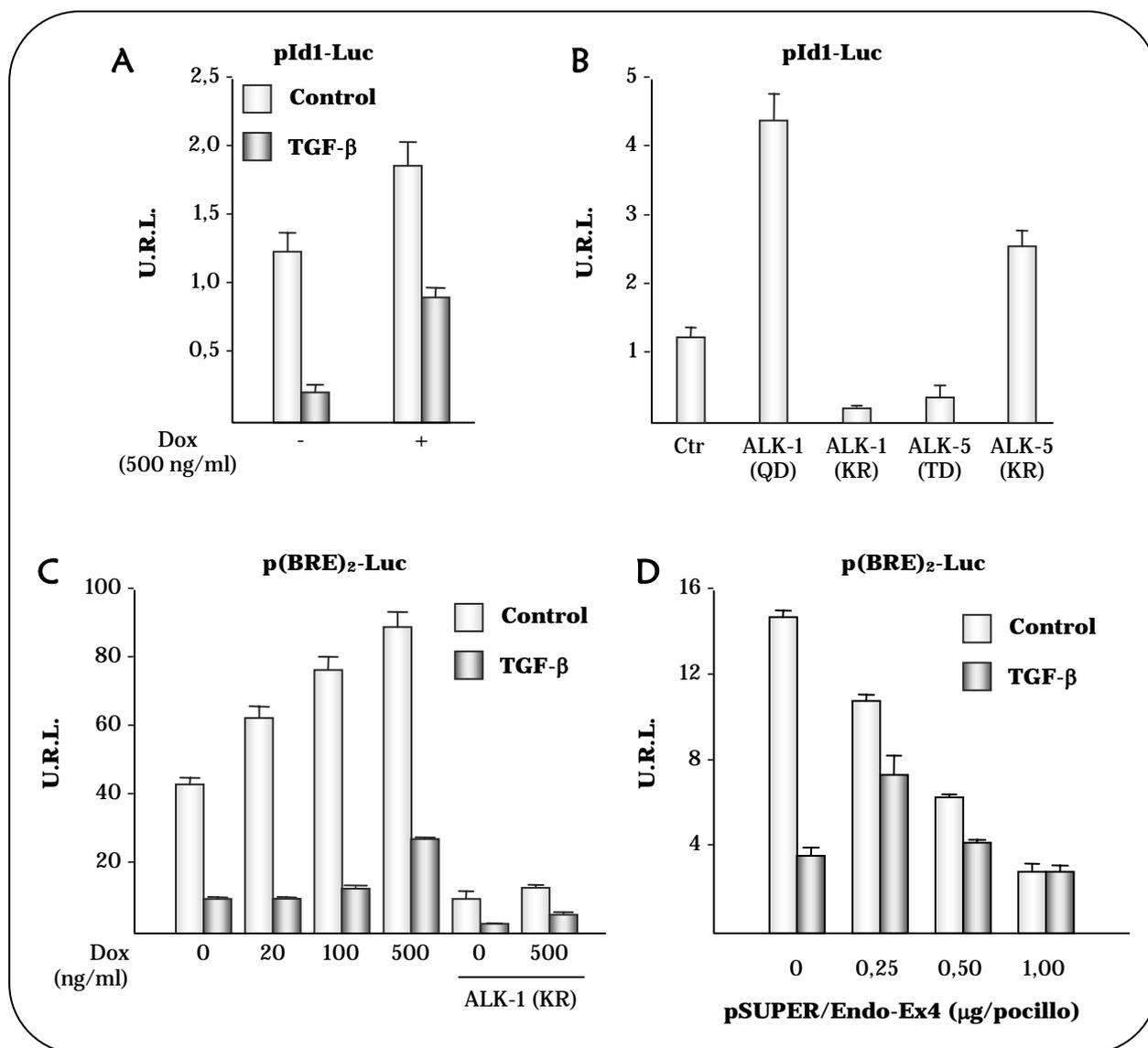


Figura 16: Efecto de la expresión de endoglina sobre la actividad del promotor de Id1 y del elemento de respuesta p(BRE)₂-Luc. El tratamiento con TGF- β fue de 10 ng/ml durante 24 horas en todos los casos indicados. Para inducir la expresión de endoglina en células endoteliales bovinas GM7372EL, el tratamiento con las dosis indicadas de doxiciclina se realizó durante 16 horas. U.R.L., unidades relativas de luciferasa. En todos los casos, $p < 0,01$. **(A)** Se observa que la presencia de endoglina disminuye la inhibición de la actividad del reportero pId1-Luc inducida por TGF- β . **(B)** Control de la actividad del reportero pId1-Luc en el que se ve aumentada por las formas mutadas ALK-1 (QD) y ALK-5 (KR), constitutivamente activado y quinasa deficiente respectivamente, mientras que es reprimida por las versiones reversas ALK-1 (KR) y ALK-5 (TD), dominante negativo y positivo respectivamente. **(C)** La actividad basal de la construcción p(BRE)₂-Luc aumenta marcadamente de manera dosis dependiente de la expresión de endoglina en células GM7372EL, mientras que el dominante negativo ALK-1 (KR) anula dicha inducción. Igualmente, la inhibición de la actividad reportera se ve reducida con la inducción de endoglina. **(D)** Al transfectar en células HMEC-1 cantidades crecientes de pSUPER/EndoEx4 se bloquea gradualmente la expresión de endoglina endógena, lo cual se traduce en un descenso en la actividad del reportero p(BRE)₂-Luc, tanto basal como en presencia de TGF- β .

Finalmente, para demostrar el papel específico de endogлина en la inducción mediada por ALK-1 de la actividad del promotor de Id1, se llevaron a cabo experimentos con RNA de interferencia. Así, la supresión de la expresión de endogлина por dosis crecientes de siRNA específicos en células endoteliales humanas HMEC-1 reflejó una inhibición dosis dependiente de la actividad inducida por ALK-1 del vector p(BRE)₂-Luc. Además, como muestra la Figura 16.D, la actividad de esta construcción reportera fue inhibida por TGF- β excepto con la dosis mayor de supresión de endogлина, en donde no se observó ningún efecto.

Estos resultados sugieren la cooperación funcional de endogлина con ALK-1 en la transcripción de Id1 y que la inhibición inducida por TGF- β de la actividad del promotor de Id1 está mediada por la vía TGF- β /ALK-5.

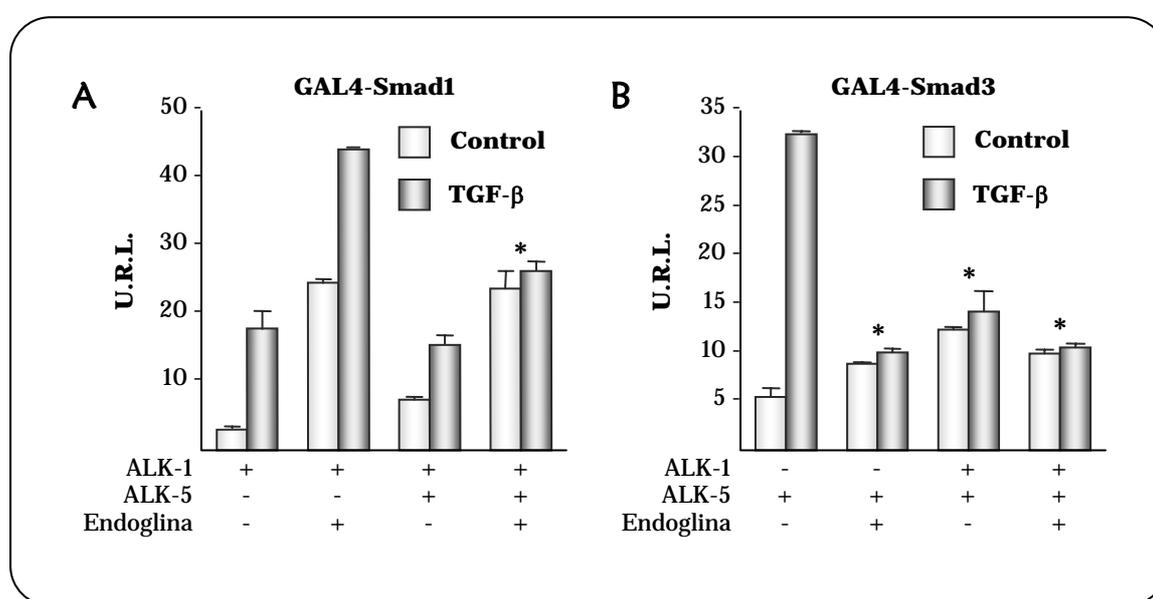


Figura 17: Efecto de la expresión combinada de endogлина, ALK-1 y ALK-5 sobre las vías de señalización ALK-1/Smad1 y ALK-5/Smad3. Células CHO-K1 se transfectaron con las construcciones y sistemas reporteros indicados y, tras 24 horas, se incubaron en presencia o no de 10 ng/ml de TGF- β durante 24 horas adicionales. En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas con un valor $p < 0,01$, excepto en (*) que no fueron significativas. **(A)** La transactivación de GAL4-Smad1 es dependiente de ALK-1 y se ve incrementada por la presencia de endogлина, mientras que la incorporación de ALK-5 al sistema anula dicha actividad. La transfección de las mismas combinaciones salvo ALK-1 rindió lecturas despreciables (U.R.L. < 1), por lo que se excluyeron de la gráfica. **(B)** El análisis de la actividad GAL4-Smad3 mostró un aumento en la transactivación dependiente de ALK-5 que fue revertido por la presencia de endogлина, ALK-1, o ambos. Análogo al caso anterior, la transfección de las mismas combinaciones salvo ALK-5 no rindió lecturas significativas (U.R.L. < 1), por lo que no se incluyeron en la gráfica.

4.2.3. La ruta de señalización de TGF- β vía ALK5 se bloquea en presencia de endoglina.

En células endoteliales, TGF- β puede activar dos vías de señalización distintas en función del T β R-I utilizado, ALK-1 (Smad1 y 5) o ALK-5 (Smad2 y 3), aunque ambas rutas pueden ser reguladas de forma recíproca (Goumans *et al.*, 2003b; Goumans *et al.*, 2002). Así, para determinar el papel de endoglina en el balance ALK-1/ALK-5 se emplearon los sistemas reporteros GAL4-Smad1 y GAL4-Smad3 para ALK-1 y ALK-5, respectivamente (Figura 17).

Como era de esperar, la transfección en células CHO-K1 de endoglina junto con ALK-1 resultó en un claro aumento de la transactivación mediada por GAL4-Smad1, tanto en condiciones basales como en presencia de TGF- β , con respecto a las células transfectadas sólo con ALK-1. Sin embargo, el aumento de la transactivación de GAL4-Smad1 mediado por endoglina en presencia de TGF- β fue anulado al incluir ALK-5 en la transfección. Este hecho sugiere que ALK-5 interfiere con la vía de señalización de ALK-1 (Figura 17.A). Igualmente, el tratamiento con TGF- β tras la transfección de ALK-5 resultó en un marcado aumento de la señal GAL4-Smad3, la cual fue inhibida al incluir endoglina, ALK-1 o ambos en la transfección (Figura 17.B).

Para corroborar estos resultados, el mismo sistema GAL4-Smad3 fue empleado en células GM7372EL, mediante la inducción de endoglina por doxiciclina, y en células HMEC-1, mediante ensayos con RNA de interferencia. En el primer caso, la inducción de endoglina con 500 ng/ml de doxiciclina inhibió la transactivación de GAL4-Smad3 dependiente de la vía TGF- β /ALK-5 (Figura 18.A). Por el contrario, como se aprecia en la Figura 18.B, el bloqueo de la expresión endógena de endoglina en células HMEC-1 mediante siRNA provocó un marcado aumento de la señalización GAL4-Smad3 en respuesta a TGF- β .

Por último, la actividad de la construcción artificial reportera p(CAGA)₁₂-Luc (Dennler *et al.*, 1998) que contiene el elemento de respuesta a Smad3 se analizó en células HMEC-1 y GM7372EL y los resultados obtenidos confirmaron los anteriores. Así, mientras que el aumento de la supresión de endoglina endógena por siRNA en células HMEC-1 provocó una inducción dosis dependiente de la actividad reportera p(CAGA)₁₂-Luc (Figura 18.C), la expresión de endoglina dependiente de doxiciclina en células GM7372EL resultó en una marcada inhibición de su actividad (Figura 18.D).

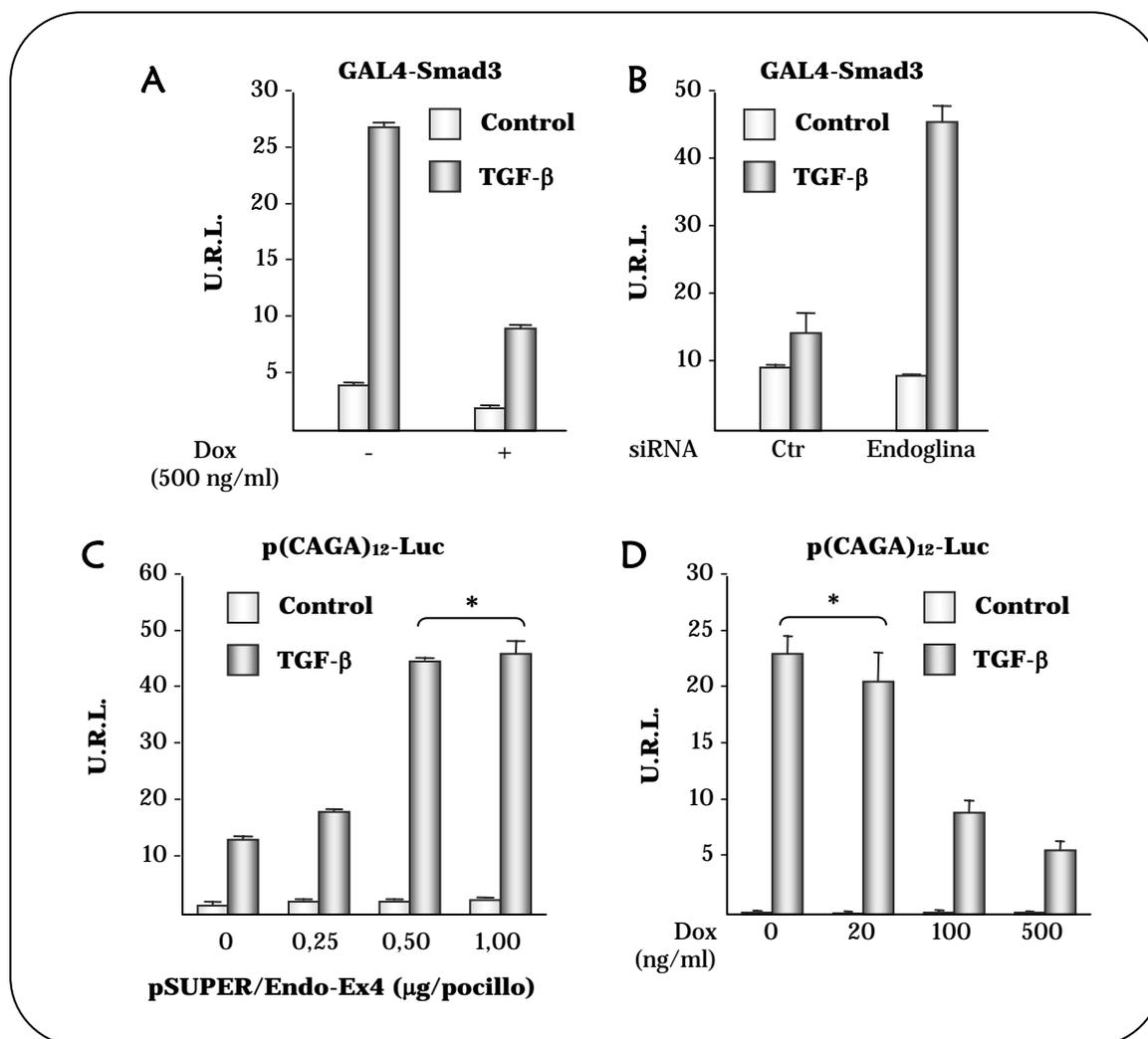


Figura 18: Efecto de endoglina sobre la señalización de Smad3. Cuando se indica, las células se trataron con TGF- β 10 ng/ml durante 24 horas. **(A)** Las células GM7372EL fueron transfectadas con el sistema reportero GAL4-Smad3/pFr5-Luc y la expresión de endoglina se indujo con doxiciclina 500 ng/ml durante 16 horas. La presencia de endoglina provocó un claro efecto inhibitorio de la actividad transactivadora de GAL4-Smad3 tanto basal como dependiente de TGF- β . **(B)** La expresión endógena de endoglina en células endoteliales humanas HMEC-1 fue específicamente bloqueada durante 40 horas mediante la transfección pSUPER/EndoEx4. Como control negativo se transfectó un vector que produce un siRNA irrelevante. La presencia de TGF- β resultó en un marcado aumento de la transactivación de GAL4-Smad3. **(C)** El vector reportero p(CAGA)₁₂-Luc, que contiene el elemento de respuesta a Smad3, fue transfectado en células HMEC-1 junto con cantidades crecientes de pSUPER/EndoEx4 durante 40 horas para reducir gradualmente la expresión de la endoglina endógena. El tratamiento con TGF- β dio lugar al aumento de la actividad reportera directamente proporcional a la reducción de endoglina. **(D)** La expresión de endoglina se indujo a las dosis indicadas de doxiciclina en células GM7372EL durante 16 horas, previamente transfectadas con el vector reportero p(CAGA)₁₂-Luc. En respuesta a TGF- β la actividad de este reportero fue notoriamente inhibida por la expresión creciente de endoglina. En todos los casos, $p < 0,01$; excepto en (*) donde las diferencias no fueron significativas.

4.2.4. La quimera EndoEC-Fc mimetiza los efectos de la endoglina endógena

Ya que endoglina es capaz de modular la señalización de TGF- β induciendo la vía de ALK-1 en detrimento de la de ALK-5, se quiso analizar si la forma soluble EndoEC-Fc (Figura 19.A) era capaz de reproducir estos resultados. Como se mostró en la Figura 15, la construcción transmembrana que contiene la región de endoglina comprendida entre Glu26 y Gly558, que representa casi la totalidad del dominio extracelular, fue capaz de inducir en un mayor nivel la transactivación de GAL4-Smad1. En primer lugar se analizó si EndoEC-Fc era capaz de unirse a la superficie de células endoteliales humanas. Para ello, células endoteliales humanas HMEC-1 fueron incubadas con el medio de cultivo condicionado de células CHO-K1 control y transfectantes estables de EndoEC-Fc. La Figura 19.B muestra en detalle la tinción de superficie de la unión de EndoEC-Fc, puesta de manifiesto mediante el anticuerpo monoclonal anti-HA.

Para comprobar si la unión de EndoEC-Fc a la célula endotelial tenía un efecto funcional sobre el sistema reportero GAL4-Smad1 se analizó en células CHO-K1 transfectadas con el vector de expresión para ALK-1. La Figura 19.C muestra que EndoEC-Fc es capaz de aumentar la transactivación de GAL4-Smad1 en presencia de TGF- β y que dicho aumento es comparable al inducido por la transfección de la forma salvaje de endoglina. Además, para corroborar esta potenciación de la vía de Smad1, se analizó la actividad reportera del vector p(BRE)₂-Luc en células endoteliales HMEC-1. Como refleja la Figura 19.D el aumento de la cantidad del vector de expresión para EndoEC-Fc transfectado se traduce en un incremento de la actividad reportera basal de p(BRE)₂-Luc, indicando que esta proteína quimera es capaz de mimetizar los efectos de la endoglina endógena sobre la vía de ALK-1.

El efecto de EndoEC-Fc sobre la vía de Smad3 se analizó con el reportero GAL4-Smad3. Al contrario que con la vía de Smad1, la proteína quimera fue capaz de bloquear la transactivación de GAL4-Smad3 de modo similar al ejercido por la proteína completa (Figura 19.E). Estos resultados demuestran que el dominio extracelular presente en la forma soluble EndoEC-Fc es capaz de actuar de modo similar al propio de endoglina en la membrana plasmática.

A continuación se analizó si el dominio extracelular de endoglina reproducía alguno de los efectos fisiológicos que se le atribuyen a la endoglina completa como es la inhibición del efecto antiproliferativo inducido por TGF- β (Lastres *et al.*, 1996; Letamendía *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000). Así, células endoteliales HMEC-1 se transfectaron con el vector de expresión de EndoEC-Fc y se estimularon con TGF- β . La proliferación celular fue determinada mediante tinción con cristal violeta. Como se muestra en la Figura 20.A, la expresión de EndoEC-Fc contrarresta la parada de la proliferación inducida por TGF- β respecto a las células control transfectadas con el vector vacío. Resultados similares se obtuvieron cuando células HMEC-1 se incubaron con el dominio extracelular (Glu26-Gly586) de endoglina recombinante purificado (Figura 20.B).

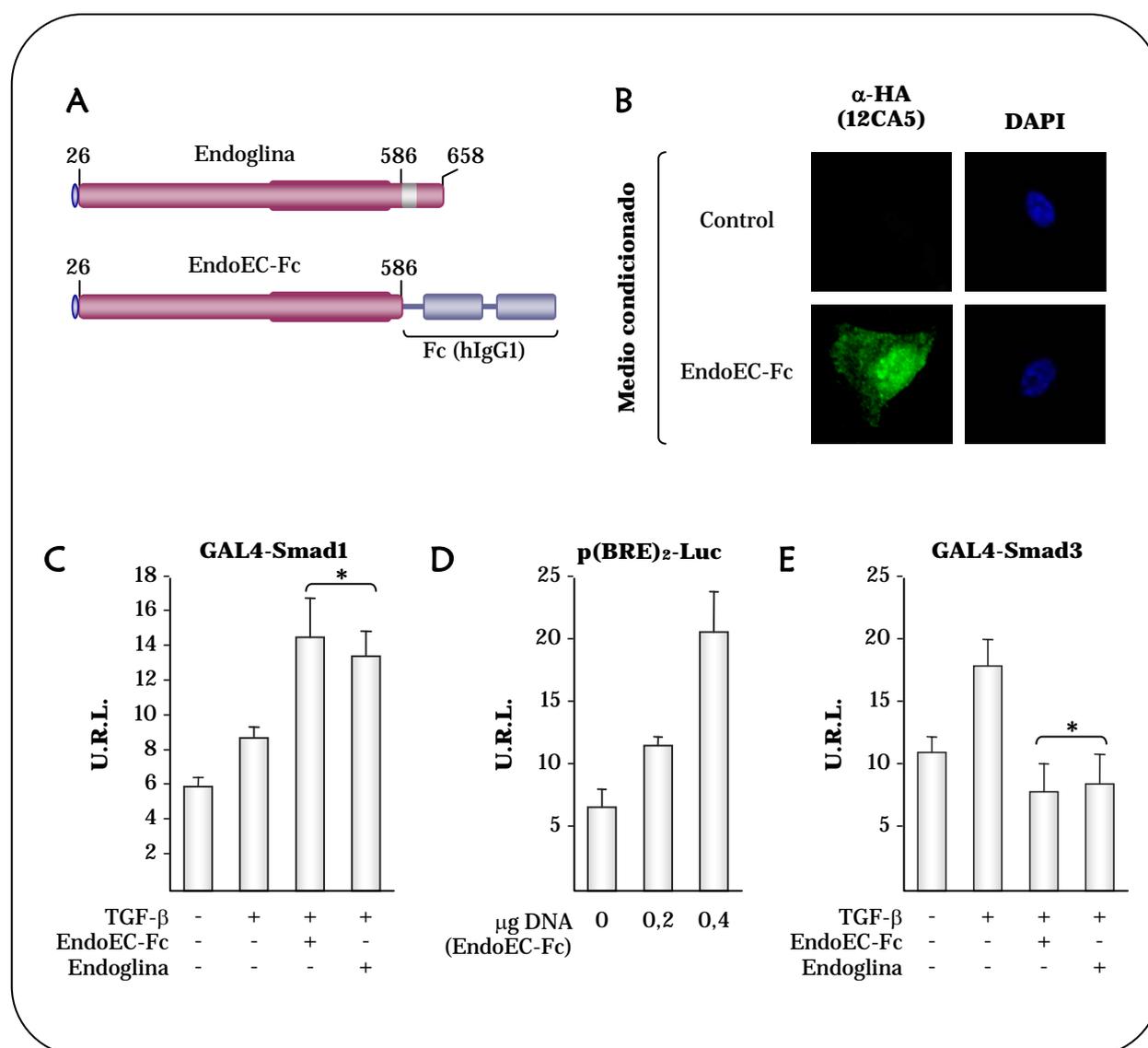


Figura 19: EndoEC-Fc mimetiza el efecto de endoglyna endógena. **(A)** Esquema comparativo entre los monómeros de endoglyna salvaje y de EndoEC-Fc. **(B)** Células endoteliales HMEC-1 fueron sembradas en cubreobjetos cubiertos con gelatina e incubadas con el medio de cultivo condicionado de transfectantes estables de EndoEC-Fc durante 3 horas a 4°C es capaz de unirse a la superficie de células HMEC-1. La tinción con el colorante DAPI pone de manifiesto los núcleos celulares. **(C)** EndoEC-Fc es capaz de transactivar GAL4-Smad1 de forma similar a la endoglyna completa en respuesta a TGF-β en células CHO-K1 transfectadas con ALK-1. **(D)** Las células endoteliales HMEC-1 fueron transfectadas con el vector reportero de ALK-1 p(BRE)₂-Luc junto con cantidades crecientes del vector de expresión de EndoEC-Fc. La actividad basal de este reportero fue significativamente inducida en relación directa la cantidad de vector pDisplay/EndoEC-Fc transfectado. **(E)** La transactivación de GAL4-Smad3 en células CHO-K1 transfectadas con ALK-5 se ve drásticamente inhibida tanto por la transfección de EndoEC-Fc como por la de la forma transmembrana de endoglyna en respuesta a TGF-β. En los casos indicados, el TGF-β fue añadido 24 horas después de la transfección a 10 ng/ml durante 24 horas adicionales. Las diferencias fueron estadísticamente significativas con un valor $p < 0,01$, excepto en los casos señalados (*).

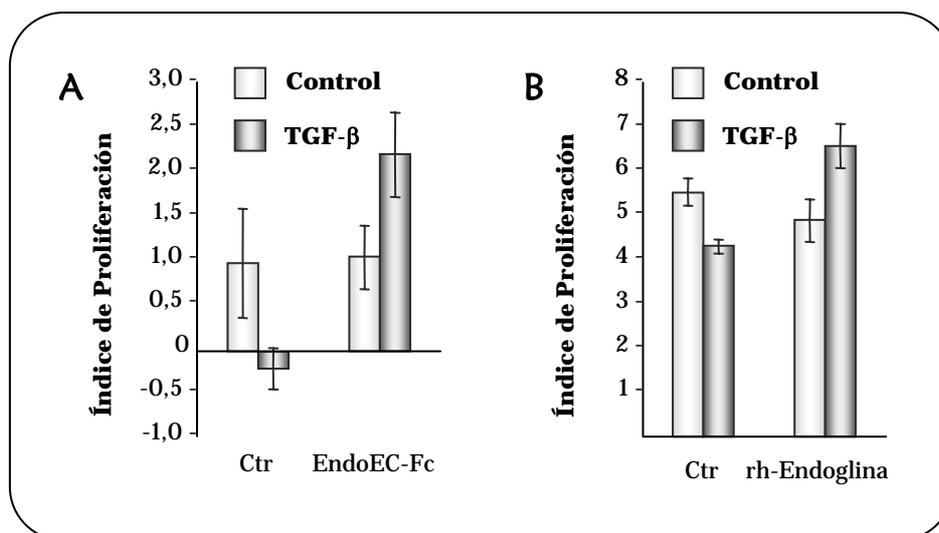


Figura 20: El dominio extracelular de endogлина revierte el efecto antiproliferativo inducido por TGF- β en células HMEC-1. **(A)** El tratamiento con TGF- β redujo el nivel de proliferación de células HMEC-1 transfectadas control. Sin embargo, a pesar de no tener efecto alguno sobre el nivel basal, la transfección de EndoEC-Fc potenció la proliferación en presencia de TGF- β . **(B)** Ensayo paralelo en el que células HMEC-1 fueron incubadas con el dominio extracelular recombinante de endogлина (rh-Endogлина) empleando la solución vehículo (0,1% BSA en PBS) como control. El tratamiento con TGF- β en presencia de rh-Endogлина provocó un ligero aumento en el nivel de proliferación celular. Todos los experimentos se realizaron por triplicado partiendo de 50.000 células/pocillo. El tratamiento con TGF- β fue de 5 ng/ml durante 24 horas. Las diferencias entre control y tratamiento fueron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,04$.

4.3. LA ISOFORMA CORTA DE ENDOGLINA ES CAPAZ DE INTERACCIONAR CON LOS RECEPTORES DE TGF- β

La secuencia de endogлина que generalmente se expresa en las células endoteliales corresponde a la isoforma mayoritaria con una región citoplásmica de 47 aminoácidos. No obstante, existe una isoforma alternativa cuya región citoplásmica contiene solamente 14 residuos. Denominada endogлина-S, se origina debido a que el último intrón presente en el gen de endogлина no se elimina y permanece en el RNA mensajero maduro (Bellón *et al.*, 1993). Este intrón introduce un codón de parada en el marco de lectura por lo que la proteína traducida es más corta (Figura 6.B). La expresión y función de esta forma corta de endogлина están poco estudiadas.

4.3.1. Endogлина-S aparece en células senescentes.

Datos previos del laboratorio mostraban que la morfología de las células endoteliales que habían sido cultivadas durante un número considerable de pases era muy similar a la de los mioblastos L6E9 transfectados de forma estable con endogлина-S. Además, aquellos cultivos endoteliales envejecidos perdían su capacidad de proliferación y expresaban esta isoforma corta de endogлина. Así, para monitorizar este proceso de senescencia, células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVECs) se mantuvieron en cultivo a lo largo del tiempo. Estos cultivos primarios se obtuvieron

directamente de cordones umbilicales de mujeres donantes voluntarias sanas y se analizó la senescencia y la expresión de las isoformas de endogлина, así como los receptores de TGF- β mediante RT-PCR.

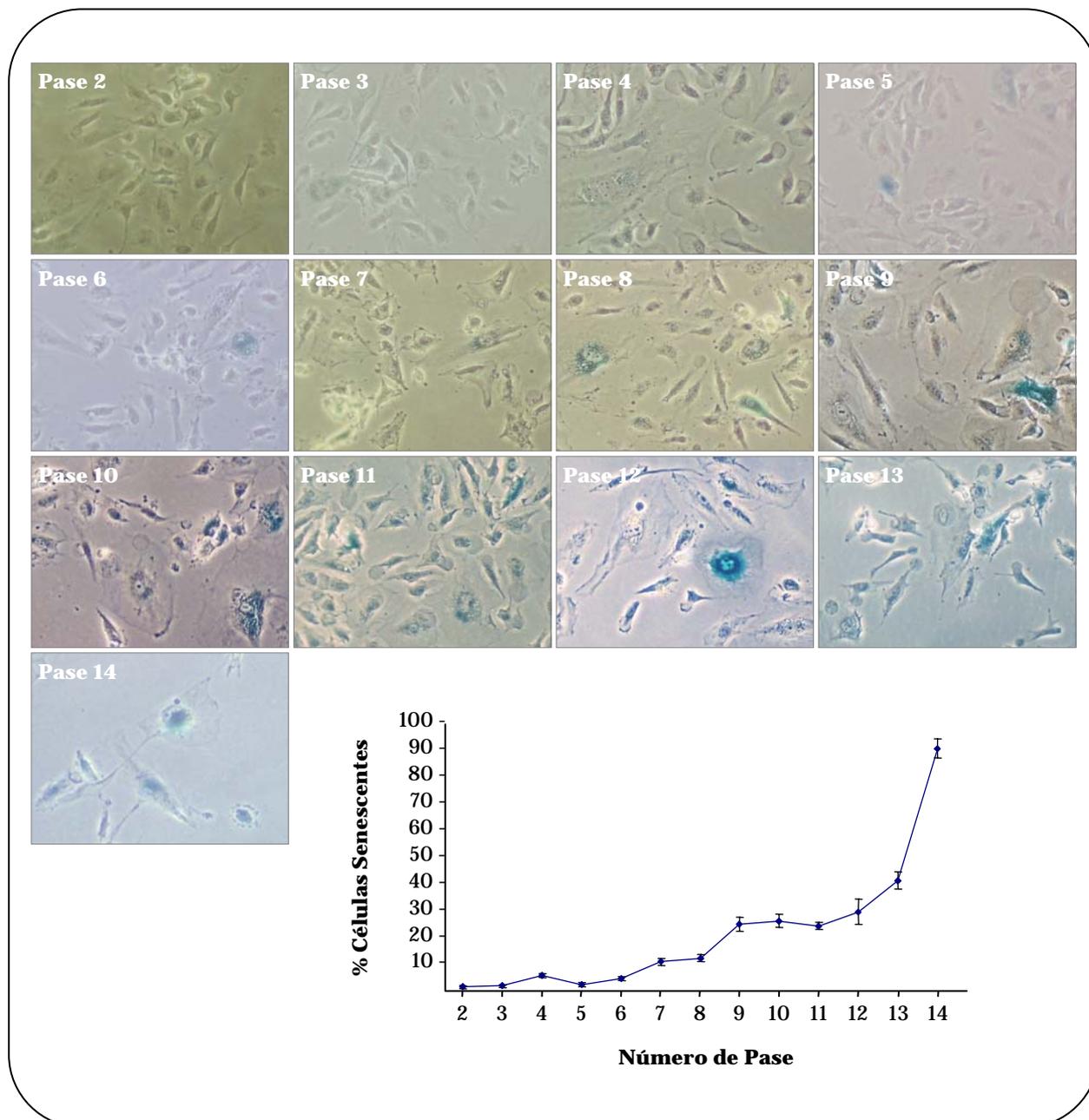


Figura 21: Análisis de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia en células HUVECs. En los cultivos primarios de HUVECs las células fueron sembradas en placas pretratadas con 0,2% gelatina. Los pases se realizaron cuando los cultivos alcanzaron un nivel de confluencia cercano al 90%. En cada etapa, las células fueron fijadas e incubadas durante 16 horas a 37°C en ausencia de CO₂ con una preparación del sustrato X-gal. El depósito en el citoplasma de un producto azulado es indicativo de la actividad β -galactosidasa asociada al proceso de envejecimiento celular o senescencia. El recuento de células senescentes mostró que a partir del noveno pase los cultivos de células HUVECs comienzan a envejecer significativamente, llegando a alcanzar un nivel del 90% de senescencia en el pase 14.

El aumento de la actividad β -galactosidasa es un fenómeno asociado a la senescencia celular ampliamente aceptado (Brandes *et al.*, 2005; Dimri *et al.*, 1995). Así, este incremento es utilizado como un marcador de envejecimiento celular, el cual se pone de manifiesto por la tinción descrita en el apartado Materiales y Métodos en la que se utiliza X-gal como sustrato de la reacción enzimática. El resultado es el depósito de un producto azulado en el citoplasma celular fácilmente detectable mediante un microscopio de contraste de fase. De acuerdo con lo esperado, el cultivo primario de células HUVECs envejeció a lo largo del tiempo. Si bien los primeros pases se realizaban cada tres días, a partir del noveno los pases se efectuaban una vez a la semana hasta que finalmente, las células del pase 15 perdieron su capacidad de proliferación sin llegar a alcanzar la confluencia tras dos semanas. Así, como se muestra en la Figura 21, hay un claro aumento en la actividad β -galactosidasa que se asoció claramente a la senescencia celular llegando a ser del 90% aproximadamente.

En paralelo, se fueron obteniendo muestras de RNA total a cada pase para analizar la expresión de T β R-II, ALK-5, ALK-1 y endogлина. Además, la pareja de cebadores CT-Endo hibridan en los exones flanqueantes del intrón no eliminado en endogлина-S, por lo que tienen la peculiaridad de detectar ambas isoformas en la misma reacción de amplificación, permitiendo establecer una relación entre las dos variantes de endogлина a lo largo del tiempo de cultivo. Así, la Figura 22.A muestra la separación por electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR. Se observa que la isoforma larga se expresa en todos los pases del cultivo mientras que la forma corta es co-expresada en los últimos pases, asociándose de esta manera endogлина-S con el proceso de envejecimiento celular o senescencia (Figura 22.A). Esta relación endogлина-S/endogлина-L se cuantifica en la Figura 22.B. Al amplificar un fragmento del dominio extracelular de endogлина, por lo tanto común a ambas isoformas, se observa una ligera disminución de la expresión con respecto al envejecimiento (Figura 22.A, endogлина total). En cuanto a los receptores de TGF- β , la expresión de ALK-1 aumenta durante los primeros días del cultivo aunque sigue una tendencia a disminuir hasta que finalmente el nivel decae en las células más senescentes (Figura 22.A y 22.C). Por el contrario, ALK-5 sigue una evolución más o menos constante a lo largo del tiempo incluso se observa una cierta tendencia a aumentar en los pases finales antes de decaer drásticamente en el pase 14 (Figura 22.A y 22.C). La expresión del T β R-II sigue un leve aumento hasta el pase 6, a partir del cual comienza a descender ligeramente (Figura 22.A y 22.C). La expresión de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, EC 1.2.1.12) es constante a lo largo del tiempo (Figura 22.A y 22.C) y se usó como control interno para normalizar los niveles de expresión del resto de fragmentos amplificados (Figura 22.C).

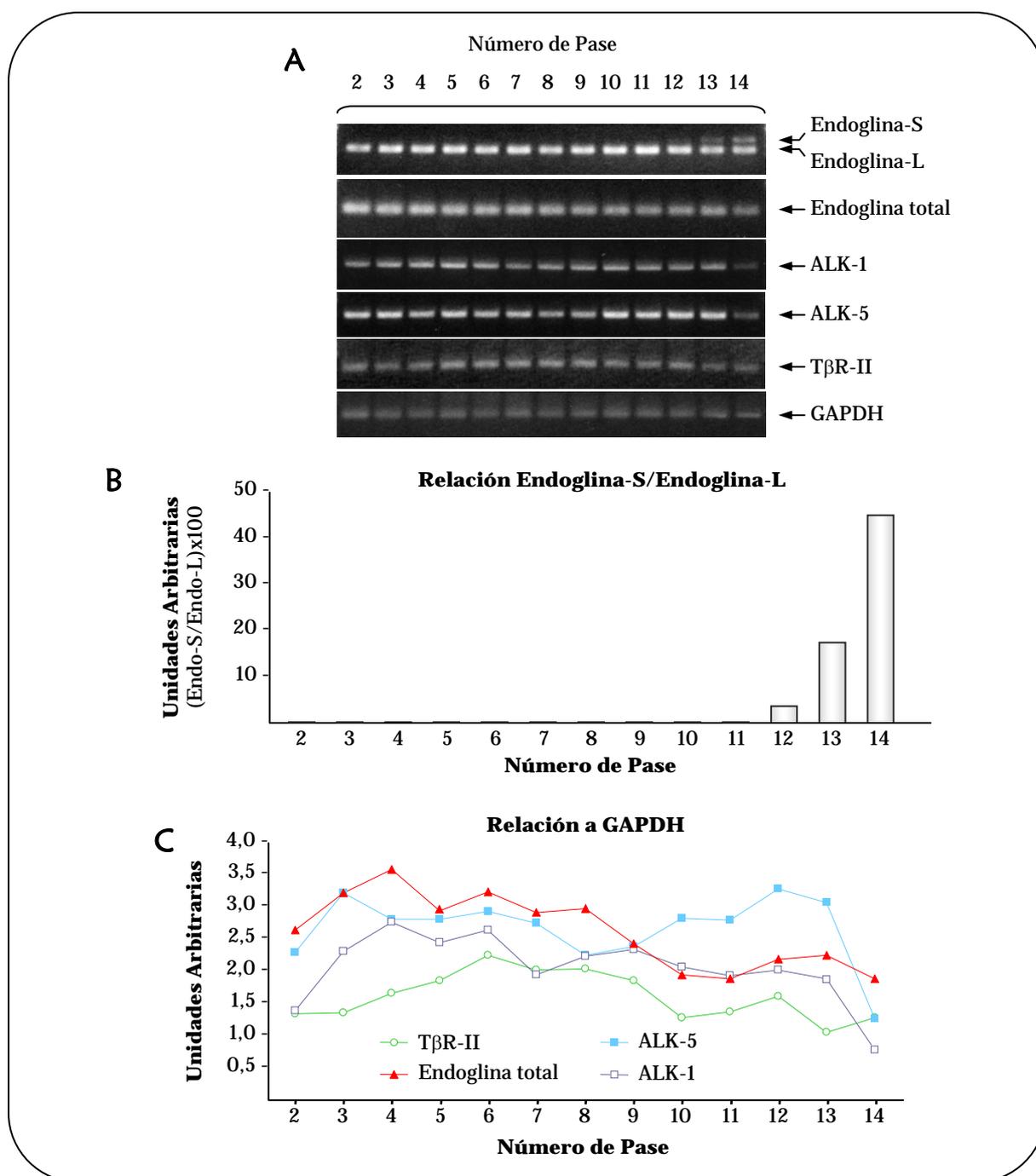


Figura 22: Expresión de los distintos componentes del complejo del receptor de TGF- β . **(A)** El RNA total fue aislado de cada pase de células HUVECs y convertido en cDNA mediante transcripción reversa con el cebador oligo-(d)T. Los paneles muestran la separación por electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR de los distintos componentes del complejo receptor de TGF- β . Todas las parejas de cebadores se detallan en el apartado Materiales y Métodos. Como control interno se amplificó un fragmento de la enzima GAPDH, lo cual nos permite realizar cálculos semicuantitativos de la expresión de los distintos receptores. **(B)** Densitometría de las bandas correspondientes a las isoformas endogлина-S y endogлина-L. Se observa que la isoforma larga es la mayoritaria y está presente en todos los pases, mientras que la isoforma corta aparece en el pase 12 y alcanza su máximo nivel de expresión en el pase 14, asociándose así al proceso de senescencia. **(C)** Densitometría y normalización de los distintos receptores respecto a la expresión de GAPDH. Las variaciones en la expresión de los receptores analizados se consideran circunstanciales, sin observarse una tendencia significativa. Sin embargo, cabe destacar que en el pase 14, donde se alcanza el 90% de células senescentes, el nivel de expresión de ALK-5 y ALK-1 disminuye.

4.3.2. La región citoplásmica de endogлина-S interacciona con ALK-5 y ALK-1.

Una vez comprobado que endogлина-S aparece en células endoteliales senescentes se quiso estudiar si ésta era capaz de interactuar con los T β R-I ALK-5 y ALK-1, como sucede con la isoforma mayoritaria endogлина-L. Ya que la extensa región extracelular de ambas isoformas es común y es capaz de interactuar con ambos T β R-Is, se pensó que de existir alguna diferencia debería tener lugar a nivel citoplásmico. Así, células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión de ALK-5 o ALK-1 junto con los dominios citoplásmicos de endogлина-L (TMCT-EndoL) o endogлина-S (TMCT-EndoS). Para comprobar la especificidad de la interacción se incluyó un vector de expresión que codificaba para una proteína irrelevante. Todas las proteínas expresadas estaban marcadas con el epítipo HA, por lo que en los lisados totales se pueden inmunodetectar con el mismo anticuerpo anti-HA (Figura 23.B). Como control de carga se inmunodetectó β -actina. El panel izquierdo de la Figura 23.A demuestra que tanto la isoforma corta como la larga del dominio citoplásmico de endogлина son capaces de interactuar con ALK-1, ya que son co-inmunoprecipitadas por anticuerpos contra ALK-1. En el caso de ALK-5 el resultado fue similar y ambos dominios citoplásmicos de endogлина fueron co-inmunoprecipitados por anticuerpos anti-ALK-5. No obstante, se encontró que en el caso de ALK-1 el rendimiento de la co-inmunoprecipitación de TMCT-EndoS fue mucho menor que con TMCT-EndoL, puesto de manifiesto por la densitometría de las bandas.

Así, se analizó si esta diferencia encontrada con ALK-1 tenía lugar con la proteína completa de endogлина-S. De esta forma, células COS-7 se transfectaron con los vectores de expresión de endogлина-S junto con ALK-1 o ALK-5. Como se muestra en la Figura 24, tanto ALK-5 como ALK-1 son co-inmunoprecipitados mediante anticuerpos frente al epítipo Flag presente en endogлина-S, ya que la interacción por sus dominios extracelulares y citoplásmicos ha sido demostrada (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002 y este trabajo). Sin embargo, el rendimiento del ensayo fue muchísimo menor en el caso de ALK-1. De hecho, al cuantificar el resultado mediante la densitometría de las bandas se observó una enorme diferencia de la cantidad de ALK-5 co-inmunoprecipitado con endogлина-S respecto a la de ALK-1. Este hecho induce a pensar que endogлина-S podría modular la respuesta celular a TGF- β de forma diferente a la isoforma larga mayoritaria.

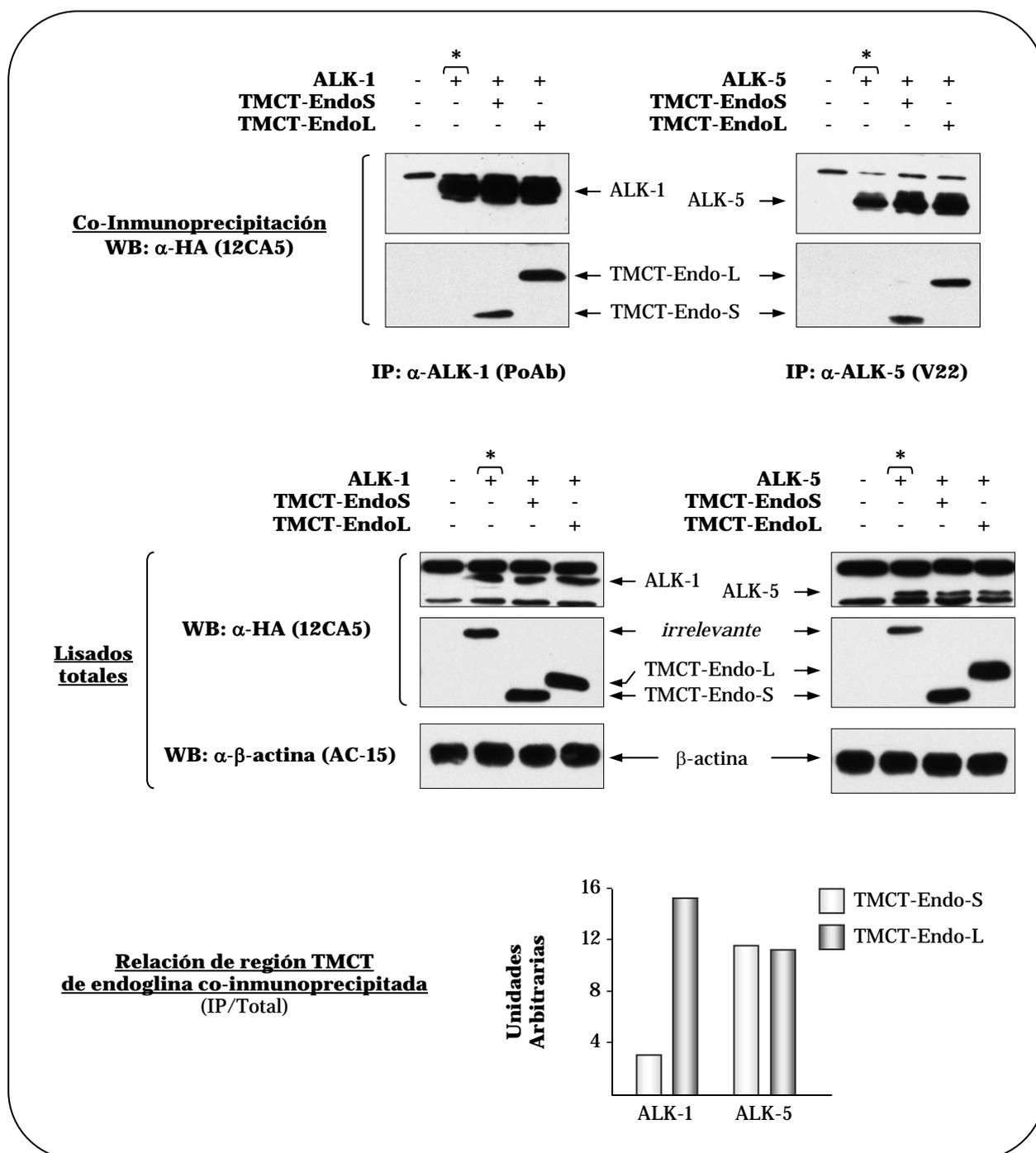


Figura 23: La región citoplásmica de endoglina-S se asocia con ALK-1 y ALK-5. Células COS-7 fueron transfectadas con los vectores de expresión de las proteínas indicadas en cada caso y lisadas a las 48 horas. Se incluyó la expresión de una proteína irrelevante marcada también con el epítipo HA para analizar la especificidad de las interacciones (*). **(A)** Los inmunoprecipitados fueron sometidos a SDS-PAGE en condiciones reductoras y electrotransferidos e inmunodetectados con el anticuerpo 12CA5 que reconoce el epítipo HA presente en ALK-1, ALK-5 así como en las regiones citoplásmicas de endoglina TMCT-EndoS y TMCT-EndoL. Tanto anticuerpos frente a ALK-1 (paneles de la izquierda) como a ALK-5 (paneles de la derecha) son capaces de co-immunoprecipitar las regiones citoplásmicas de endoglina-S (TMCT-EndoS) y de endoglina-L (TMCT-EndoL) con la misma afinidad, mientras que la proteína (HA)-irrelevante no se inmunodetecta en ninguna co-immunoprecipitación. **(B)** Las proteínas presentes en los extractos totales fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y electrotransferidas e inmunodetectadas. Control de carga se analizó la expresión de β -actina.

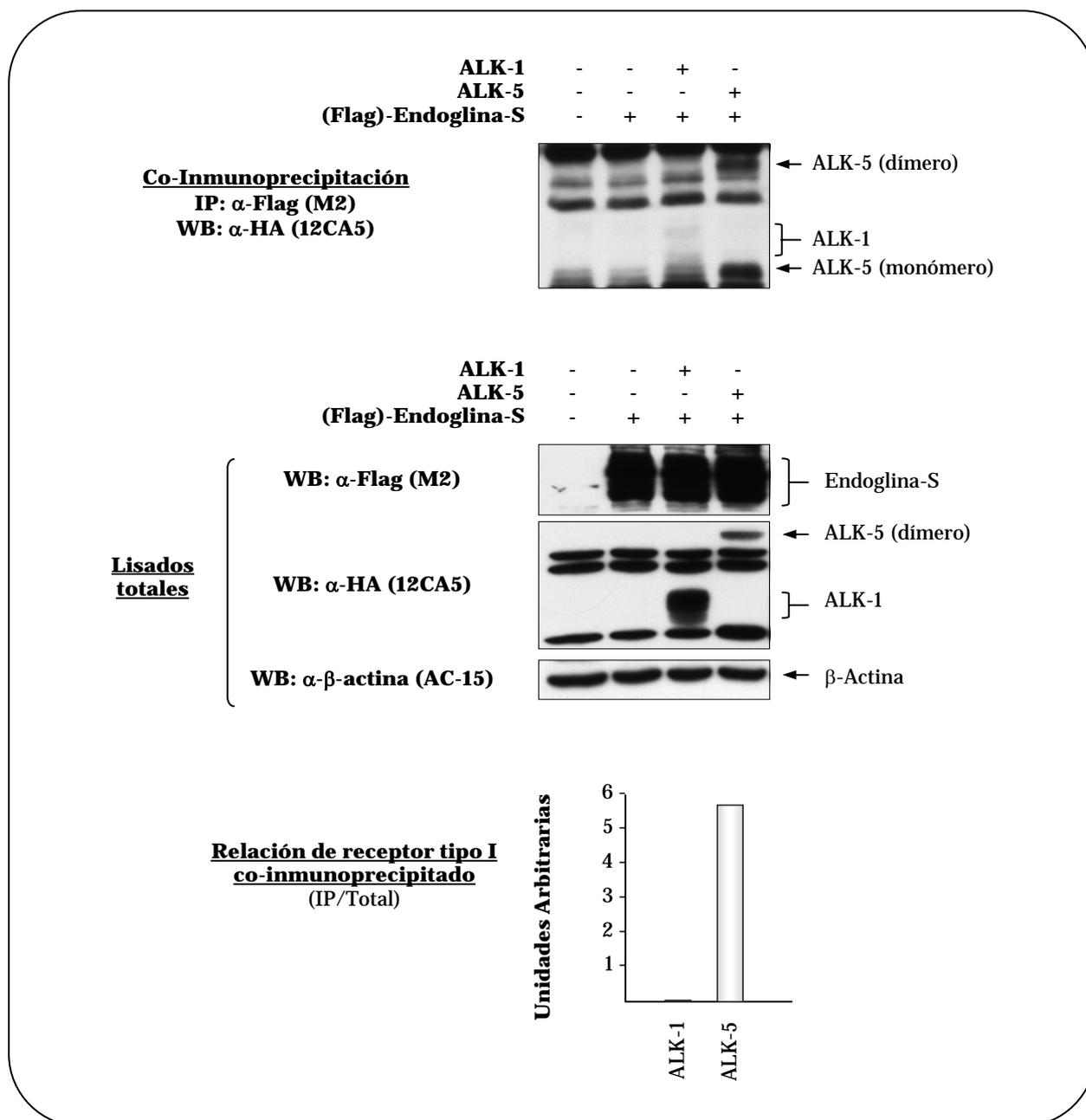


Figura 24: Interacción de endoglina-S con ALK-5 y ALK-1. Células COS-7 fueron transfectadas con el vector de expresión de endoglina-S marcada con el epítipo Flag junto con el de ALK-5 o ALK-1, ambos portando el epítipo HA. Tras 48 horas las células fueron lisadas y los extractos sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Flag (M2). Aliquotas con igual cantidad de proteínas y los inmunoprecipitados fueron sometidos a SDS-PAGE en condiciones no reductoras y electrotransferidos e inmunodetectados con anticuerpos anti-HA. Como control de carga se inmunodetectó β -actina. Se observó que la cantidad de ALK-1 que interacciona con endoglina-S es muy inferior a la de ALK-5, como mostró la relación obtenida por densitometría de las bandas señaladas (*).

4.4. ENDOGLINA-S MODULA DE FORMA DISTINTA A ENDOGLINA-L LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN TGF- β /ALK-5 Y TGF- β /ALK-1.

Para conseguir un modelo más cercano al que ocurre en una célula endotelial senescente, se estudiaron las vías de señalización de ALK-1 y ALK-5 en presencia de ambas isoformas de endogлина. En este contexto, se quiso analizar la hipótesis de que la aparición de endogлина-S podría ejercer un papel distinto al hasta ahora descrito para la isoforma larga sobre la vía de señalización de TGF- β . De este modo, se analizó la actividad de los vectores reporteros p(CAGA)₁₂-Luc y p(BRE)₂-Luc, específicos para las rutas de señalización de ALK-5 y ALK-1 respectivamente. Así, células endoteliales humanas HMEC-1, que expresan constitutivamente endogлина-L, se transfectaron con el vector de expresión de endogлина-S y se estudió la actividad de estos vectores reporteros de la señalización de TGF- β .

En respuesta a TGF- β , la actividad reportera de p(CAGA)₁₂-Luc fue claramente inducida por la transfección de endogлина-S en células HMEC-1 (Figura 25), sugiriendo la existencia de una colaboración de endogлина-S en la vía de señalización TGF- β /ALK-5. Por el contrario, endogлина-L mostró un efecto inhibitorio sobre este vector reportero, tal como se demostró en la Figura 18.D utilizando el sistema celular endotelial inducible de endogлина por doxiciclina GM7372EL (Figura 25). En cuanto a la construcción p(BRE)₂-Luc, la introducción de endogлина-S en el sistema no tuvo efecto significativo sobre su actividad reportera basal, mientras que endogлина-L sí que aumentó considerablemente su actividad, como previamente había sido demostrado (Figura 16.C).

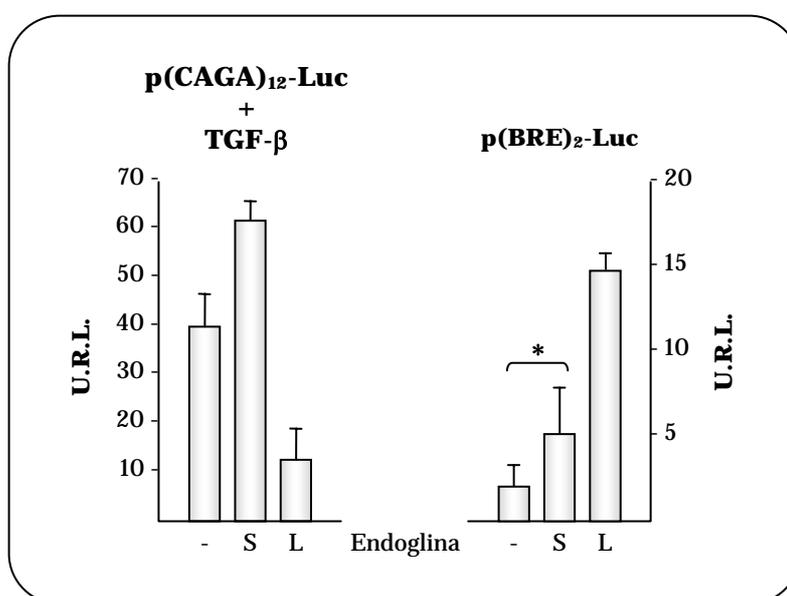


Figura 25: Efecto de la co-expresión de endogлина-S sobre la señalización de ALK-5 y ALK-1. El vector de expresión de endogлина-S se transfectó en células endoteliales humanas HMEC-1 para simular un estado de senescencia celular. Como control interno, se transfectó el vector de expresión de endogлина-L. La actividad del vector reportero p(CAGA)₁₂-Luc en respuesta a 10 ng/ml TGF- β durante 24 horas se utilizó como indicador de la vía de señalización de ALK-5 (panel izquierdo), ya que su actividad basal en ausencia de estímulo es prácticamente nula. Por otro lado, la actividad basal de la construcción p(BRE)₂-Luc representó la vía de señalización de ALK-1 (panel derecho), ya que el tratamiento con TGF- β resulta en la inhibición de su actividad. La presencia de endogлина-S favorece la vía de señalización de ALK-5. Sin embargo, sobre la vía de ALK-1 endogлина-S no fue capaz de estimular significativamente la actividad de p(BRE)₂-Luc tal como lo hace endogлина-L. Excepto en el caso (*), todas las diferencias fueron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,01$.

A continuación se trataron de confirmar los resultados obtenidos respecto a la vía de señalización TGF- β /ALK-5 en el modelo endotelial GM7372EL inducible de endogлина por doxíciclina. La Figura 26.A muestra cómo el tratamiento con TGF- β promueve la actividad reportera de p(CAGA)₁₂-Luc y más aún cuando endogлина-S es incorporada al sistema mediante la transfección de su vector de expresión. Por el contrario, la inducción de endogлина-L por el estímulo con doxíciclina hace que la actividad reportera en respuesta a TGF- β disminuya, como era de esperar. Sin embargo, la coexistencia de ambas isoformas por transfección de la corta e inducción de la larga por doxíciclina hace que la actividad reportera de p(CAGA)₁₂-Luc aumente ligeramente en respuesta a TGF- β , indicando que endogлина-S contrarresta en cierta medida el efecto de la isoforma larga sobre la señalización de ALK-5.

Para esclarecer el efecto de la expresión de endogлина-S sobre la vía de señalización TGF- β /ALK-1, se utilizaron células CHO-K1, donde la expresión de endogлина endógena es nula. Así, estas células se transfectaron con la forma constitutivamente activa de ALK-1 y se analizó la actividad reportera de la construcción p(BRE)₂-Luc. Como muestra la Figura 26.B, la actividad de este reportero aumenta con la transfección de ALK-1 (QD) y más aún cuando se introduce la expresión de endogлина-L, como cabía esperar. Al transfectar endogлина-S, la actividad de p(BRE)₂-Luc es similar a la obtenida sólo con ALK-1, sugiriendo un papel neutro para la isoforma corta de endogлина. Sin embargo, cuando ambas isoformas son co-transfectadas, la actividad del reportero se ve significativamente disminuida, indicando que endogлина-S podría estar bloqueando la cooperación de endogлина-L en la vía de señalización de ALK-1.

Ya que el dominio extracelular de endogлина es común para ambas isoformas, se quiso estudiar si las diferentes regiones citoplásmicas eran las responsables de estos efectos observados sobre la señalización de ALK-5. Para tal fin se emplearon los transfectantes estables de endogлина corta, L6E9-EndoS, y larga, L6E9-EndoL, previamente obtenidos en el laboratorio (Letamendía *et al.*, 1998b). En los transfectantes L6E9-EndoS se transfectó el dominio citoplásmico de endogлина larga (TMCT-EndoL) y viceversa, esto es, el dominio citoplásmico de endogлина corta (TMCT-EndoS) en los transfectantes L6E9-EndoL, donde se analizó la actividad reportera del vector p(CAGA)₁₂-Luc en respuesta a TGF- β (Figura 26.C). El estudio comparativo entre ambos sistemas celulares mostró que la región citoplásmica de endogлина larga fue capaz de bloquear drásticamente la actividad reportera en los transfectantes de endogлина-S. Por el contrario, la actividad p(CAGA)₁₂-Luc en respuesta a TGF- β que estaba inhibida en los transfectantes estables de endogлина-L fue considerablemente inducida por la construcción citoplásmica de endogлина-S. Estos resultados atribuyen a los distintos dominios citoplásmicos de endogлина el efecto modulador sobre la respuesta celular a TGF- β .

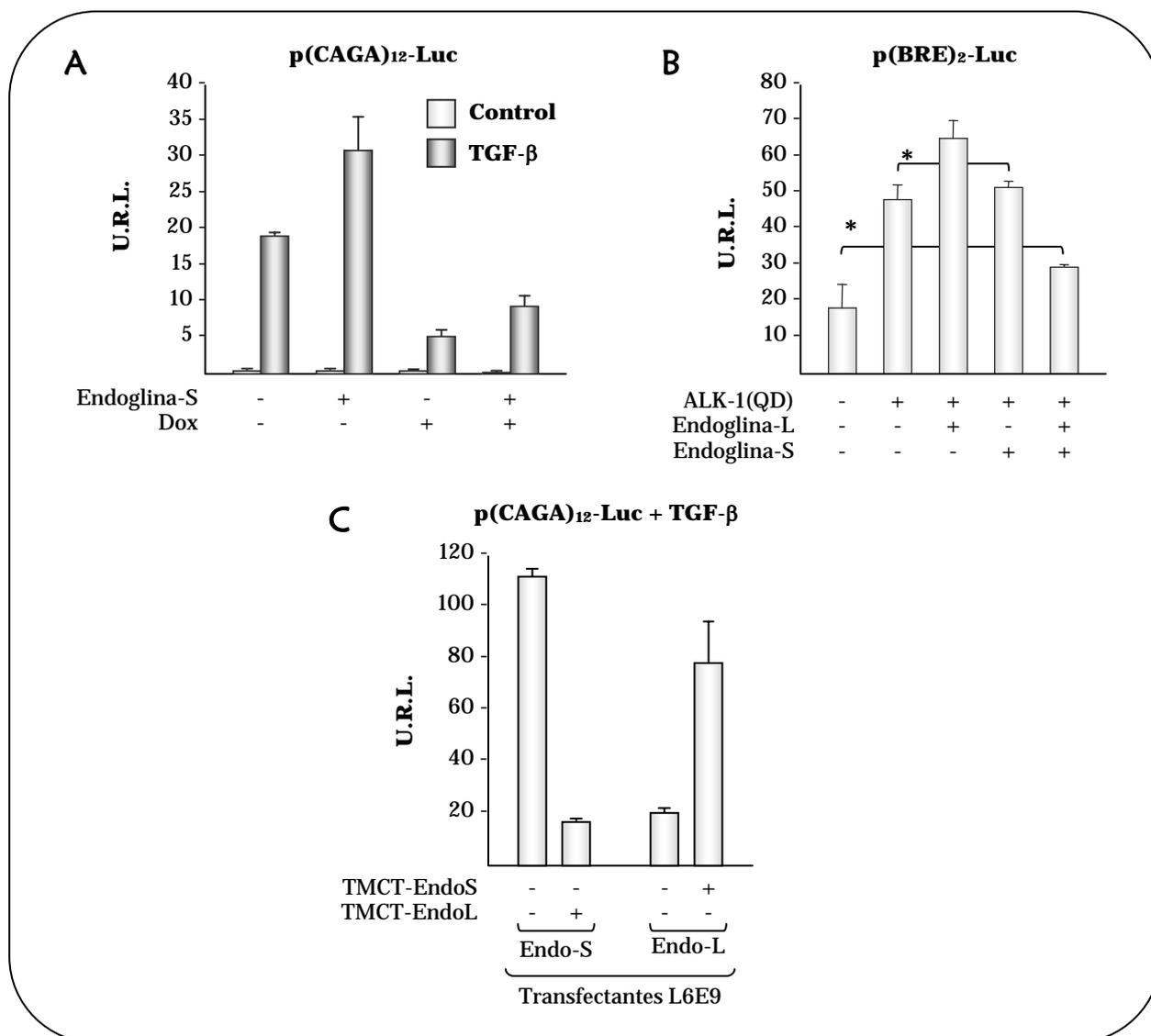


Figura 26: Efecto dual de endoglina-S sobre los T β R-Is. **(A)** Células GM7372EL tratadas o no con 500 ng/ml doxiciclina fueron transfectadas con el vector de expresión de endoglina-S o un vector vacío. Cuando se indica, se estimuló con 10 ng/ml TGF- β durante 24 horas adicionales a la transfección. La actividad reportera p(CAGA)₁₂-Luc fue claramente inducida por el tratamiento con TGF- β e incrementada por la expresión de endoglina-S. Al coexistir ambas isoformas de endoglina, la inhibición de la actividad reportera provocada por la inducción de la forma larga dependiente de doxiciclina fue débil pero significativamente revertida. **(B)** La actividad reportera de p(BRE)₂-Luc fue analizada en células CHO-K1 transfectadas con los vectores de expresión de las proteínas indicadas. Endoglina-L incrementó la actividad reportera inducida por la forma constitutivamente activa ALK-1 (QD). Sin embargo, la expresión de endoglina-S fue inocua, per se, sobre la inducción por ALK-1 (QD). No obstante, al ser co-transfectadas ambas isoformas de endoglina, la actividad transcripcional de p(BRE)₂-Luc experimentó un marcado descenso, atribuyendo un papel inhibitorio de la isoforma corta sobre la cooperación de endoglina larga y ALK-1. **(C)** Mioblastos L6E9 transfectados establemente con la isoforma corta de endoglina (L6E9-Endo-S) o con la isoforma larga (L6E9-Endo-L) fueron transfectados con el dominio citoplásmico de endoglina larga (TMCT-EndoL) o de endoglina corta (TMCT-EndoS), respectivamente. La actividad reportera de p(CAGA)₁₂-Luc en respuesta a 10 ng/ml TGF- β durante 24 horas fue drásticamente bloqueada por TMCT-EndoL en los transfectantes de endoglina corta y marcadamente inducida en los transfectantes de endoglina larga por TMCT-EndoS, indicando que los dominios citoplásmicos son los responsables del distinto efecto modulador sobre la señalización de TGF- β . Excepto para las parejas de datos señaladas con (*), los resultados fueron estadísticamente significativos (p<0,01).

4.4.1. La expresión de endoglina-S induce la actividad del promotor de PAI-1 mientras que reprime la del promotor de Id1 en respuesta a TGF- β

Para estudiar la relevancia fisiológica de la aparición de endoglina-S en células senescentes, dos construcciones reporteras fueron analizadas: por un lado, el promotor de Id1, pId1-Luc, como diana de ALK-1, y por otro el promotor de PAI-1, p800-Luc, como diana de ALK-5. Estos vectores reporteros fueron transfectados en el modelo celular endotelial HMEC-1, junto con cantidades crecientes del vector de expresión de endoglina-S. Como control interno se incluyó el vector de expresión de endoglina-L.

Según muestra la Figura 27.A, al aumentar la cantidad de endoglina-S transfectada se produce un débil descenso en la actividad reportera de pId1-Luc, tanto en condiciones basales como en respuesta a TGF- β , siendo estadísticamente significativa la diferencia entre la dosis más elevada de endoglina-S con respecto a los valores iniciales. El control interno de endoglina-L mostró el esperado aumento de esta actividad reportera.

En cambio, se observó un aumento de la actividad reportera de p800-Luc directamente proporcional a la cantidad de vector de expresión de endoglina-S transfectado, siendo más marcado en la actividad basal que en respuesta a TGF- β (Figura 27.B). El control interno de endoglina-L mostró una esperada inhibición de la actividad transcripcional del promotor de PAI-1 respecto tanto a los valores iniciales como en respuesta a TGF- β (Letamendía *et al.*, 1998b).

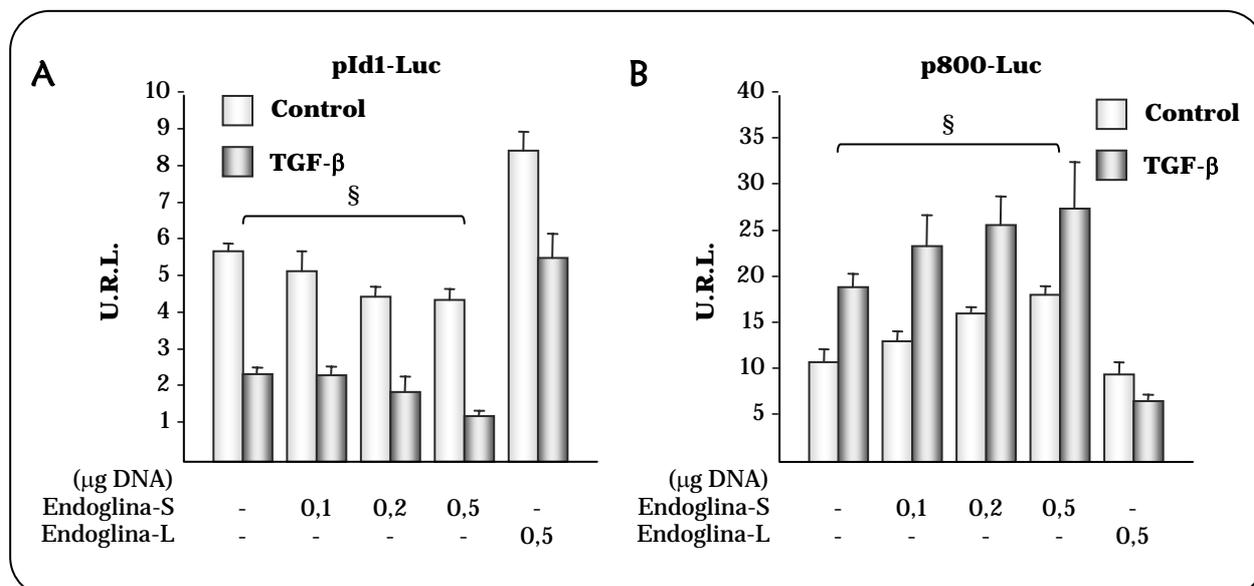


Figura 27: Efecto antagónico entre endoglina-S y endoglina-L sobre promotores diana de ALK-1 y ALK-5. Células HMEC-1 fueron transfectadas con las cantidades crecientes indicadas del vector de expresión de endoglina-S o con endoglina-L como control y, tras 24 horas, sometidas o no al tratamiento con 10 ng/ml TGF- β durante 24 horas adicionales. Todas las diferencias encontradas entre control y tratamiento fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$). También se alcanzó el mismo nivel de significación estadística entre las parejas de datos señalados con (§). **(A)** La actividad transcripcional de la construcción reportera pId1-Luc, diana de ALK-1, fue significativamente reducida por la transfección de la mayor cantidad de endoglina-S respecto al control con vector vacío tanto en ausencia como en presencia de TGF- β . El control con endoglina-L indujo la actividad reportera y redujo la inhibición provocada por el ligando. **(B)** La secuencia del promotor de PAI-1 presente en el vector reportero p800-Luc se empleó como diana de la vía de ALK-5. El tratamiento con TGF- β estimuló este vector reportero, cuya respuesta se vio directamente incrementada con respecto a la cantidad de endoglina-S transfectada. El control con endoglina-L resultó en la esperada inhibición de la actividad reportera en respuesta a TGF- β .

4.5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ALK-1 EN CAVEOLAS

Estudios previos han demostrado que la vía de señalización de TGF- β puede ser modulada por la interacción directa de caveolina-1 con el receptor tipo II y con ALK-5 (Razani *et al.*, 2001c; Schwartz *et al.*, 2005). Sin embargo, no ha sido estudiado aún el efecto que caveolina-1 podría ejercer sobre el otro receptor tipo I ALK-1. De este modo, lo primero que se quiso estudiar fue si ALK-1 se localizaba en caveolas. Así, células HMEC-1 fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas simultáneamente con anticuerpos frente ALK-1 y caveolina-1. Como muestra la Figura 28, el análisis por microscopía confocal reveló que ambas proteínas co-localizaban, siguiendo un patrón de punteado discreto en la membrana plasmática. Además, para corroborar que esta co-localización tenía lugar en caveolas las células HMEC-1 fueron tratadas con el agente secuestrador de colesterol metil- β -ciclodextrina (M β CD) para desestabilizarlas. En estas condiciones, el patrón de tinción obtenido por microscopía confocal fue totalmente difuso, indicando que ambas proteínas se localizaban en las mismas estructuras subcelulares.

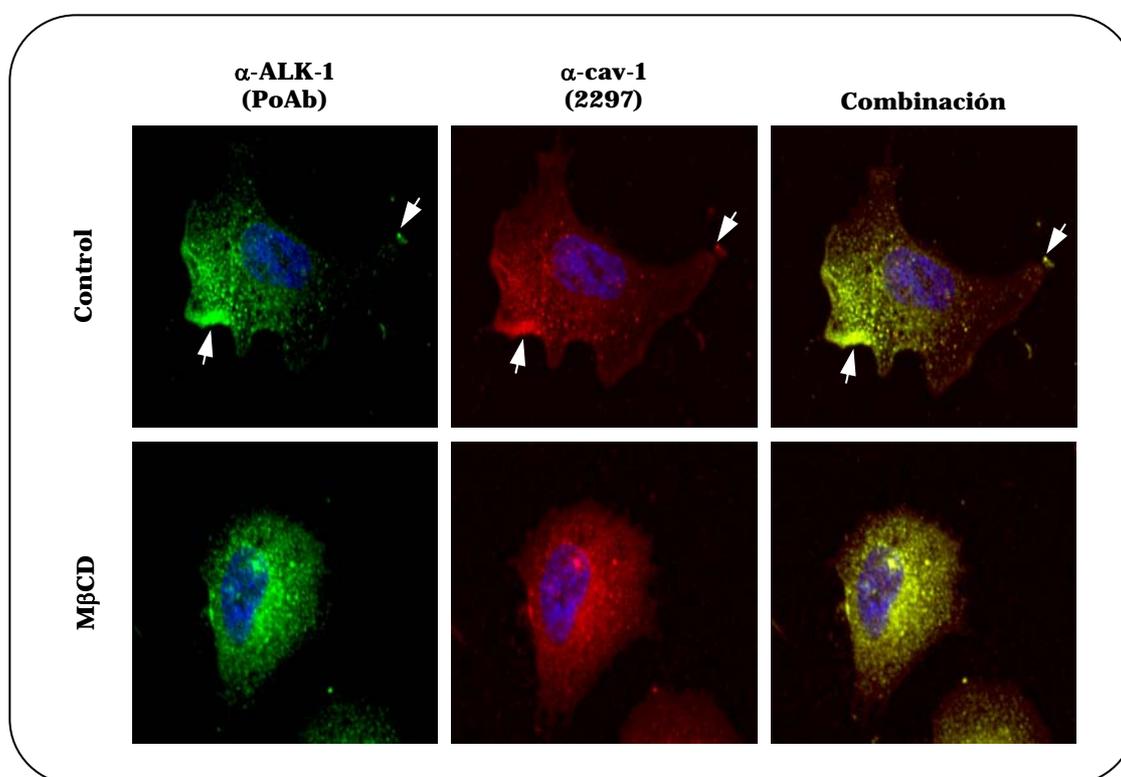


Figura 28: Localización subcelular de ALK-1 y caveolina-1. Células HMEC-1 fueron sembradas sobre cubreobjetos pretratados con 0,2% gelatina. Tras ser fijadas y permeabilizadas, las células fueron inmunoteñidas con anticuerpos frente a ALK-1 o caveolina-1 y anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos Alexa⁴⁸⁸ o Alexa⁵⁴⁶, respectivamente. Las preparaciones fueron montadas sobre portaobjetos con Mowiol y analizadas en un microscopio confocal. Los núcleos son puestos de manifiesto por la tinción directa con DAPI. En condiciones normales (control) ambas proteínas siguen un patrón punteado definido en la membrana plasmática (flechas blancas). Al desestabilizar las caveolas con 1% metil- β -ciclodextrina (M β CD) a 37°C durante 1 hora previa a la fijación, esta distribución punteada de la membrana plasmática se convierte en un patrón difuso por toda la célula, esto es, persiste la co-localización pero ya no es en la membrana plasmática.

4.5.1. ALK-1 se detecta en la fracción caveolar de células endoteliales

Después de observar que ALK-1 y caveolina-1 seguían una distribución similar y que el tratamiento con metil- β -ciclodextrina alteraba dicho patrón, se quiso estudiar si ambas proteínas estaban presentes en la misma fracción subcelular y si esta era la fracción caveolar. Así, se obtuvieron lisados totales de células HMEC-1 y se sometieron a un fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. La Figura 29.A muestra cómo ALK-1 es inmunodetectado en las subfracciones 4 y 5 correspondientes a la fracción caveolar (panel superior), puesta de manifiesto por la presencia de caveolina-1 (panel inferior). Sin embargo hay que destacar que la presencia de ALK-1 no está restringida a esta fracción caveolar. Incluso, caveolina-1 también se inmunodetecta en otras fracciones caracterizadas como *no-rafts*, es decir, fracciones que no corresponden a las denominadas balsas lipídicas. Así, para analizar la especificidad de este co-fraccionamiento, el ensayo se repitió tratando la células con 1% metil- β -ciclodextrina durante 1 hora. Este agente hizo que las caveolas se desestabilizaran dando lugar, como muestra la Figura 29.B, a un cambio en la distribución de ambas proteínas. Estos resultados nos indican que ALK-1 se localiza en caveolas, ya que se inmunodetecta en la misma fracción que caveolina-1 y, cuando las caveolas son disgregadas, la distribución de ambas proteínas cambia drásticamente.

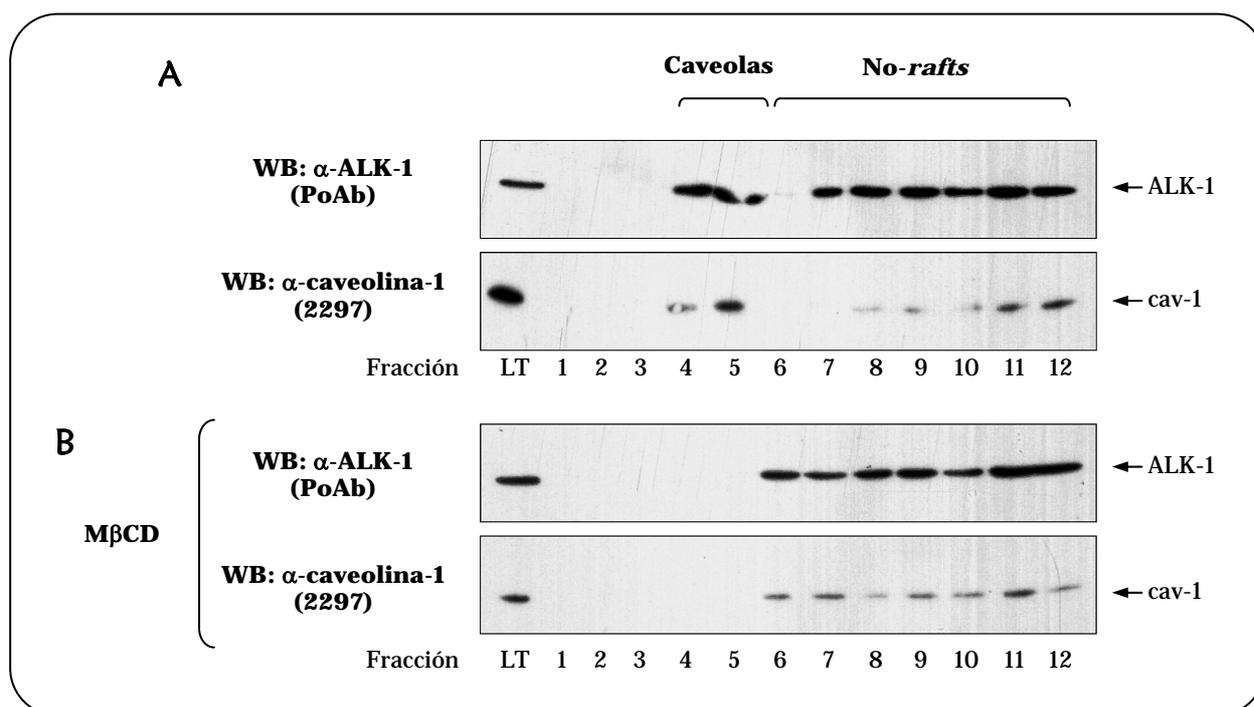


Figura 29: ALK-1 y caveolina-1 se inmunodetectan en la fracción caveolar. Células HMEC-1 fueron lisadas y los extractos totales sometidos a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa discontinuo. Las proteínas presentes en cada fracción fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y electrotransferidas e inmunodetectadas por los anticuerpos indicados. La presencia de ALK-1 y caveolina-1 fue inmunodetectada en los lisados totales (LT) como control. La distribución de ambas proteínas en las 12 fracciones recogidas fue analizada mediante inmunodetección. **(A)** La presencia de caveolina-1 en las fracciones 4 y 5 las define como fracciones caveolares (panel inferior), en las que ALK-1 es también detectado (panel superior). No obstante, la distribución de ALK-1 no está restringida a estas fracciones caveolares pudiéndose detectar en las fracciones no asociadas a las denominadas balsas lipídicas (fracciones *no-rafts*). **(B)** Al romper las caveolas con el tratamiento con 1% metil- β -ciclodextrina (M β CD) durante 1 hora a 37°C antes de la lisis se observa que no aparece caveolina-1 en las fracciones caveolares, 4 y 5, ni tampoco ALK-1, quedando establecida la distribución de ambas proteínas en el resto de fracciones denominadas *no-rafts*.

4.6. ALK-1 INTERACCIONA CON EL DOMINIO DE ANDAMIAJE (SD) DE CAVEOLINA-1

Tras analizar en detalle la secuencia de aminoácidos de ALK-1 se observó que la región comprendida entre Trp399-Trp406 (**WAFGLVLW**) se adecuaba a la secuencia consenso establecida $\Phi X \Phi X X X X \Phi$ (Φ , residuo aromático) para la unión al dominio de andamiaje (SD, del inglés *scaffolding domain*) de caveolina-1 (Couet *et al.*, 1997a). Así, para comprobar si ALK-1 y caveolina-1 además de localizarse en el mismo compartimento subcelular estaban interaccionando, se siguieron dos diferentes aproximaciones: analizar la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas mutando el dominio SD de caveolina-1 o bien la secuencia consenso presente en ALK-1.

La Figura 30 muestra la primera de las aproximaciones. El modelo celular utilizado fue la línea epitelial humana 293T por carecer de caveolas de forma natural. Así, el vector de expresión de ALK-1 fue transfectado junto con la forma salvaje de caveolina-1 o con su forma mutada en dominio de andamiaje. Tras comprobar la expresión de estas proteínas en los lisados totales, se llevó a cabo la inmunoprecipitación con anticuerpos frente al epítipo HA presente en ALK-1. Ambas formas de caveolina-1 fueron co-precipitadas aunque la cantidad de la forma mutada de caveolina-1 fue mucho menor que la salvaje. Este resultado sugiere que ALK-1 interacciona con caveolina-1 a través de su dominio SD.

Para confirmar esta interacción, se llevó a cabo mutagénesis dirigida sobre el consenso de unión al dominio SD de caveolina-1. Así, se generaron los mutantes ALK-1 (001) y ALK-1 (011), según se mutase el tercer residuo aromático o los dos últimos, respectivamente. Por lo tanto, los residuos mutados fueron Phe401→Gly y Trp406→Ala. En los lisados totales de la Figura 31 se pone de manifiesto que las mutaciones introducidas en la secuencia de ALK-1 no afectan su nivel de expresión al ser transfectadas en células 293T. Así, se transfectaron los tres vectores de expresión de ALK-1, salvaje (WT), (001) y (011), junto con el de caveolina-1. Anticuerpos frente al epítipo myc presente en caveolina-1 fueron capaces de co-inmunoprecipitar las tres variantes de ALK-1. Sin embargo, las formas mutadas de ALK-1 fueron arrastradas con menor afinidad, tal y como pone de manifiesto la densitometría de las bandas.

De esta manera queda demostrado que ALK-1 interacciona directamente con caveolina-1 y que esta asociación tiene lugar, aunque no de forma exclusiva, por el dominio de andamiaje (SD) de caveolina-1.

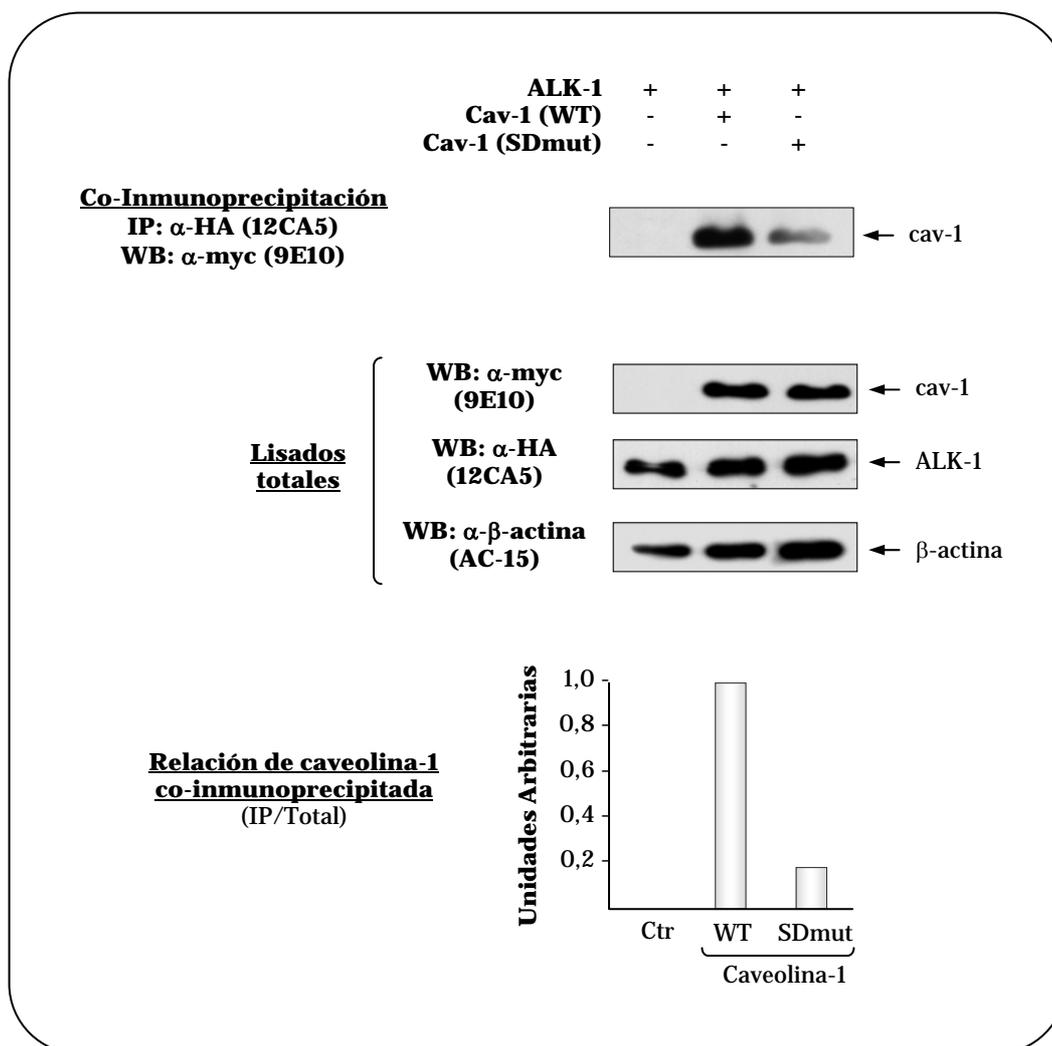


Figura 30: Implicación del dominio de andamiaje (SD) de caveolina-1 en la interacción con ALK-1. Las células de la línea epitelial humana 293T no presenta caveolas en su membrana plasmática y, por lo tanto, no expresan ninguna isoforma de caveolina. Así, el vector de expresión de ALK-1 fue transfectado junto con la forma salvaje de caveolina-1 (WT) o el mutante en su dominio de andamiaje (SDmut). Se analizó la expresión de estas proteínas en los lisados totales separándolas por SDS-PAGE seguido de electrotransferencia e inmunodetección, observándose similares niveles de expresión. Como control de carga se inmunodetectó la presencia de β -actina. El panel superior muestra que anticuerpos frente al epítipo HA presente en ALK-1 co-immunoprecipitan la forma salvaje de caveolina-1 por su epítipo myc. En el caso del mutante del dominio SD de caveolina-1 (SDmut), el rendimiento de la co-immunoprecipitación fue considerablemente menor, poniendo de manifiesto una pérdida de afinidad por ALK-1. La gráfica inferior representa la proporción de caveolina-1 inmunoprecipitada (IP) respecto a la total presente en los lisados celulares.

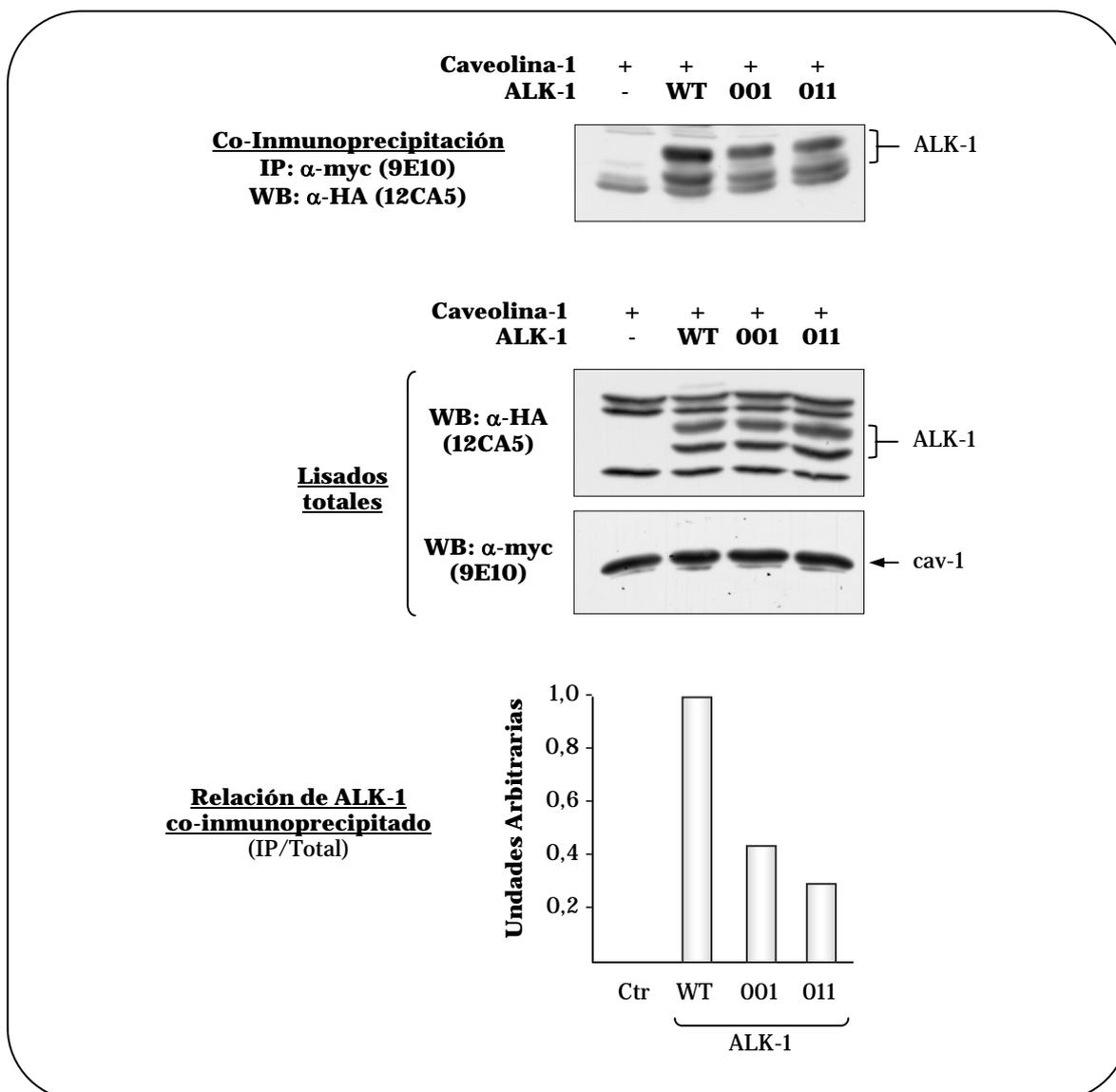


Figura 31: Identificación del consenso de unión al dominio SD de caveolina-1 en ALK-1. Mediante mutagénesis dirigida se generaron dos mutantes de ALK-1. En la forma mutada (001) contiene la sustitución Phe401→Gly, mientras que la (011) contiene ésta misma y Trp406→Ala. Estas mutaciones eliminan el consenso potencial de ALK-1 para la interacción con el dominio de andamiaje de caveolina-1. Estas sustituciones no afectan al nivel de expresión de los mutantes de ALK-1, como se muestra en los paneles correspondientes a los lisados totales. En los paneles superiores se demuestra la co-inmunoprecipitación de la forma salvaje de ALK-1 así como de las formas mutadas mediada por anticuerpos frente al epítipo myc presente en caveolina-1. Sin embargo, se observa una marcada pérdida de afinidad de los mutantes de ALK-1 (001) y (011) por caveolina-1 demostrándose la implicación de la región Trp399-Trp406 en la interacción con el dominio SD de caveolina-1, que se cuantifica en la gráfica inferior. Ya que la eliminación del consenso $\Phi X \Phi X X X X \Phi$ en ALK-1 no anula totalmente la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas, se deduce que otras regiones deben estar implicadas en la interacción.

4.7. LA LOCALIZACIÓN DE ALK-1 EN CAVEOLAS INDUCE SU VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Una vez demostrada la presencia de ALK-1 en caveolas se quiso analizar si la desestabilización de éstas por agentes secuestradores de colesterol afectaba a su vía de señalización. Así, el modelo celular elegido fue la línea endotelial humana HMEC-1, en la que se analizó la actividad reportera del vector p(BRE)₂-Luc. Ya que el colesterol es un componente esencial de las caveolas, se observó que cuando fue añadido al medio se produjo una inducción en la actividad basal de p(BRE)₂-Luc con respecto al control. Por el contrario, la depleción de colesterol producida por la incubación con los agentes metil- β -ciclodextrina o nistatina tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad de p(BRE)₂-Luc. Este efecto negativo fue netamente revertido tras la restauración del colesterol al ser añadido al medio (Figura 32).

Así, estos resultados demostraron que la vía de señalización de ALK-1 depende de su localización en caveolas por lo que a continuación se estudió el significado funcional de la interacción ALK-1/caveolina-1.

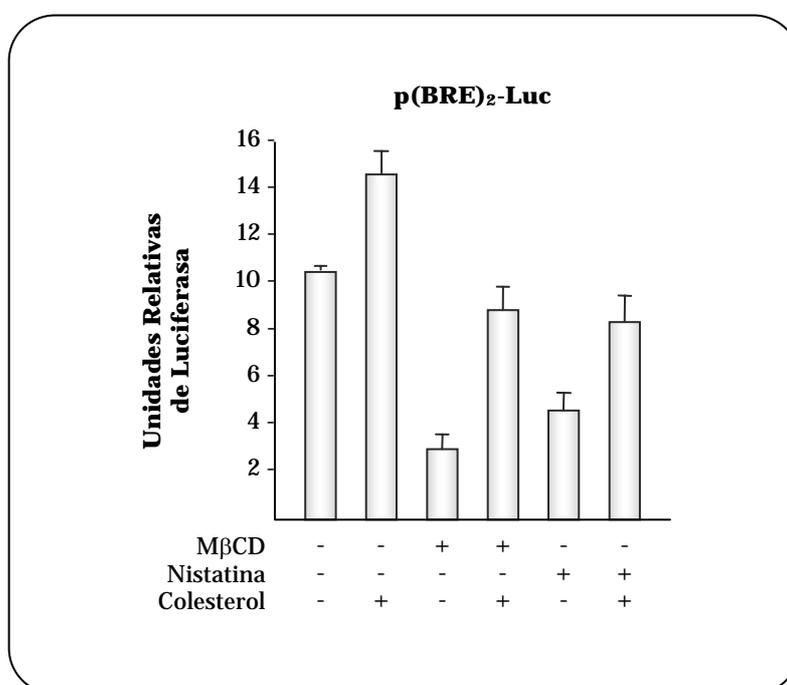


Figura 32: La presencia de ALK-1 en caveolas induce su vía de señalización. El vector reportero de la vía de señalización de ALK-1 p(BRE)₂-Luc fue transfectado en células endoteliales HMEC-1. Treinta y seis horas post-transfección, las células fueron tratadas, cuando se indica, con 1% metil- β -ciclodextrina (M β CD) o 50 μ g/ml nistatina en ausencia de suero para deplecionarlas de colesterol. Tras 1 hora, este tratamiento se reemplazó por medio completo y, en los casos señalados, se complementó con 25 μ g/ml colesterol durante 12 horas más para restaurar su presencia en las células. Se observó que la depleción de colesterol por cualquiera de los dos métodos reduce significativamente la vía de señalización de ALK-1 (actividad). La adición de colesterol al cultivo indujo la actividad p(BRE)₂-Luc y fue capaz de restaurarla tras los tratamientos con M β CD o nistatina. En todos los casos $p < 0,01$.

4.7.1. Caveolina-1 estimula la vía de señalización TGF- β /ALK-1

Según datos previos, la interacción de caveolina-1 con ALK-5 resulta en un efecto inhibitorio sobre la señal de transducción (Razani *et al.*, 2001c). Para estudiar el efecto que caveolina-1 podría ejercer sobre la vía de señalización de ALK-1, se sobreexpresó caveolina-1 mediante transfección en células HMEC-1 donde se analizó la actividad del vector reportero de ALK-1 p(BRE)₂-Luc, en respuesta o no al tratamiento con TGF- β . Así, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33.A. La transfección del vector vacío (control) confirmó que TGF- β inhibe la actividad reportera de p(BRE)₂-Luc, a dosis altas (10 ng/ml) y tiempos largos (24 horas). Sin embargo, cuando caveolina-1 es sobreexpresada su actividad reportera transcripcional experimenta un sorprendente aumento tanto en condiciones basales como en respuesta a TGF- β , sugiriendo una colaboración funcional de caveolina-1 sobre la vía de TGF- β /ALK-1. Para comprobar la especificidad de estos resultados se llevó a cabo un experimento similar en el que se transfectaron cantidades crecientes del vector de expresión de caveolina-1 y se analizó su actividad en respuesta o no a tratamiento a dosis pequeñas (1ng/ml) durante un corto intervalo de tiempo (4 horas). Está descrito que este tratamiento de TGF- β no provoca una represión de la actividad reportera de p(BRE)₂-Luc sino que resulta en una inducción (Lebrin *et al.*, 2004). Así, en estas condiciones se observó una respuesta positiva directamente dependiente de la cantidad de vector de expresión de caveolina-1 transfectado, confirmándose así su efecto cooperativo sobre la vía TGF- β /ALK-1 (Figura 33.B).

No obstante, también ha sido descrita la localización en caveolas de los receptores de BMP, donde son regulados por caveolina-1 (Nohe *et al.*, 2005). Por este motivo se pensó que estos receptores podrían estar interfiriendo en la señal de ALK-1 analizada hasta el momento, ya que comparten éste las mismas R-Smads en sus vías de señalización (Figura 2). Así, para despejar esta duda se analizó la actividad reportera del sistema GAL4-Smad1 en células HMEC-1 pero en este caso transfectando el vector de expresión de la forma quinasa deficiente de ALK-1 junto con caveolina-1 o vector vacío. Así, la Figura 33.C muestra que el dominante negativo ALK-1 (KR) anula considerablemente la inducción de la transactivación de GAL4-Smad1 provocada por la sobreexpresión de caveolina-1. Estos resultados indican que el estímulo de caveolina-1 sobre la transducción de señal vía Smad1 es dependiente de ALK-1 y no de los receptores de BMP.

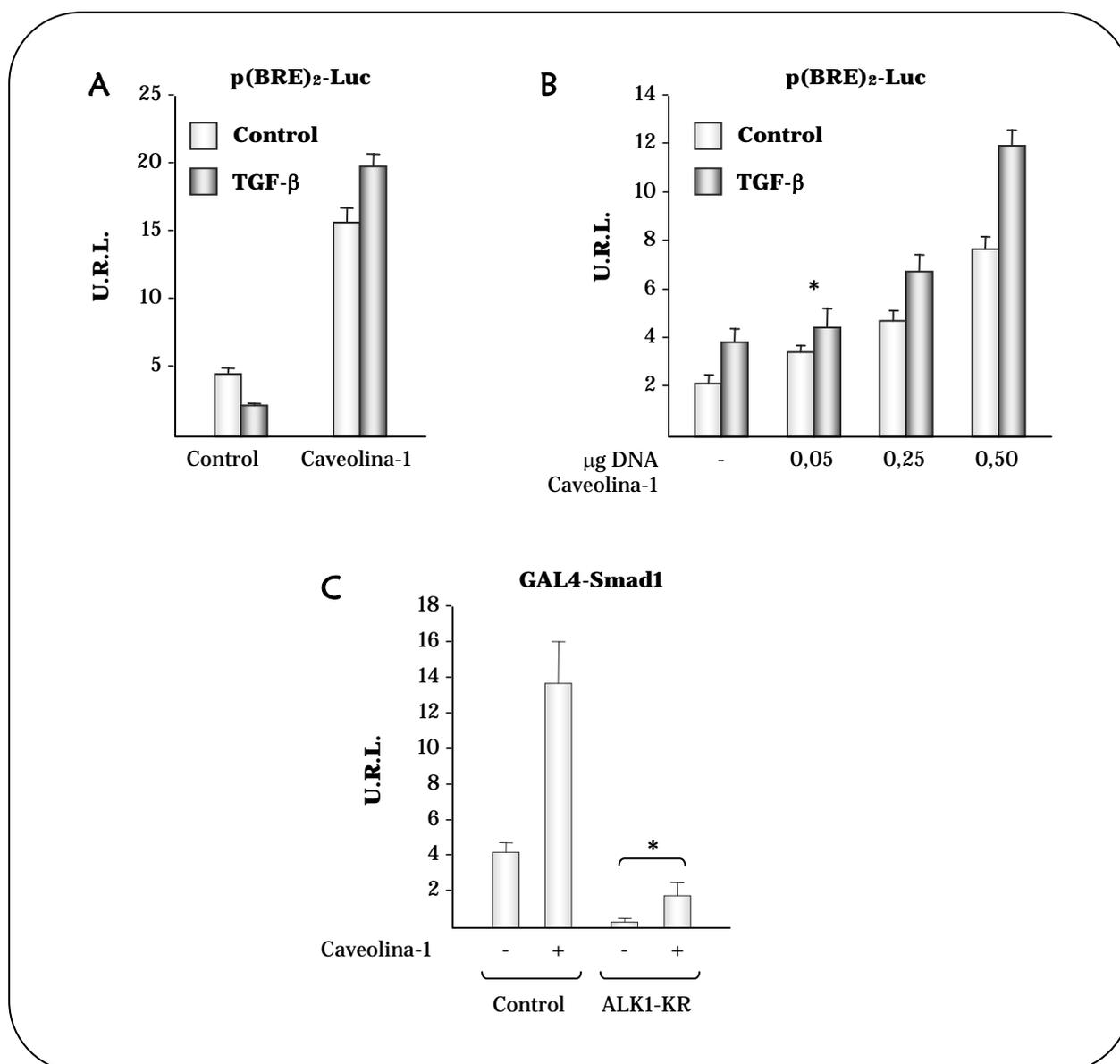


Figura 33: Caveolina-1 promueve la vía de señalización de ALK-1. La vía de señalización de ALK-1 fue analizada en células endoteliales HMEC-1. U.R.L., unidades relativas de luciferasa. **(A)** La transfección del vector de expresión de caveolina-1 induce la actividad reportera de la construcción p(BRE)₂-Luc tanto en condiciones basales como en respuesta a 10 ng/ml TGF-β durante 24 horas. **(B)** El vector de expresión de caveolina-1 fue transfectado en cantidades crecientes, observándose una inducción de la actividad reportera p(BRE)₂-Luc dependiente de la dosis tanto en ausencia como en presencia de 1 ng/ml TGF-β durante 4 horas. A diferencia del tratamiento con altas concentraciones de TGF-β durante tiempos prolongados, este tratamiento más corto con dosis pequeñas induce la actividad del vector reportero p(BRE)₂-Luc (Lebrin *et al.*, 2004). **(C)** La inducción de la transactivación GAL4-Smad1 por caveolina-1 es dependiente de ALK-1. Al transfectar la forma quinasa deficiente ALK-1 (KR) actúa como un dominante negativo sobre el aumento de la vía de señalización ALK-1/Smad1 provocado por caveolina-1. Excepto en los casos señalados con (*), las diferencias fueron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,01$.

4.7.2. La cooperación de caveolina-1 sobre la vía TGF- β /ALK-1 depende de su dominio de andamiaje.

Según se mostró en las Figuras 30 y 31, la interacción entre ALK-1 y caveolina-1 está mediada por el reconocimiento de la secuencia Trp399-Trp406 de ALK-1 por parte del dominio SD de caveolina-1. Por lo tanto, se analizó la implicación de estas regiones en la cooperación funcional sobre la respuesta a TGF- β vía ALK-1. Así, las estrategias seguidas para este fin fueron las mismas que cuando se mapeó esta interacción; esto es, se analizó el efecto de la transfección del vector de expresión de caveolina-1 mutada en el dominio SD (SDmut) y de los de ALK-1 mutado en el motivo de unión a caveolina-1, ALK-1 (001) y (011), sobre la actividad de la construcción reportera p(BRE)₂-Luc.

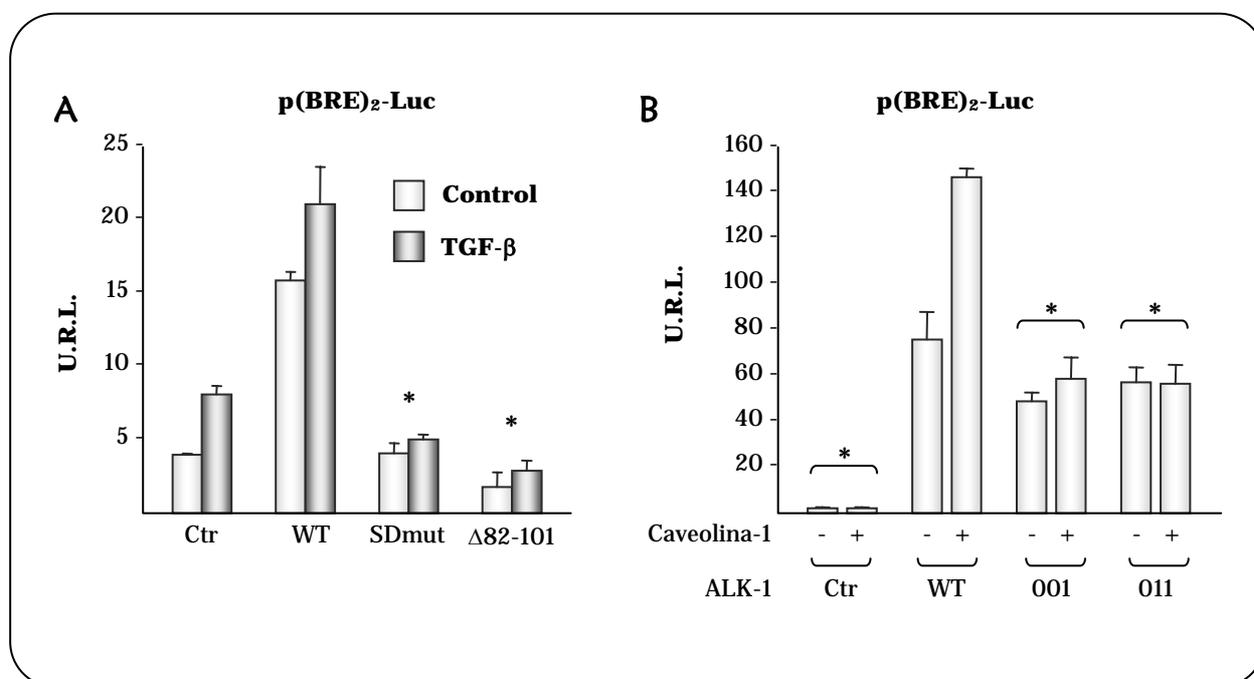


Figura 34: Implicación del dominio de andamiaje (SD) de caveolina-1 sobre la vía de señalización de ALK-1. U.R.L., unidades relativas de luciferasa. **(A)** En respuesta a 1 ng/ml TGF- β durante 4 horas, la actividad del vector reportero p(BRE)₂-Luc en células endoteliales HMEC-1 aumenta al sobreexpresar ALK-1 y la forma salvaje de caveolina-1 (WT) sobre los niveles basales. Sin embargo, cuando el dominio de andamiaje de caveolina-1 es mutado (SDmut) o bien deletado (Δ 82-101) se inhibe drásticamente la actividad transcripcional de p(BRE)₂-Luc. **(B)** La actividad reportera de p(BRE)₂-Luc fue analizada en células 293T en presencia o no de caveolina-1 junto con la forma salvaje de ALK-1 o con sus versiones mutadas (001) y (011). La cooperación observada entre ALK-1 y caveolina-1 sobre la actividad reportera de p(BRE)₂-Luc fue abolida totalmente por las sustituciones puntuales introducidas en el motivo consenso de unión al dominio SD de caveolina-1. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los casos señalados con (*). Para los demás, $p < 0,01$.

El resultado del primero de los abordajes se muestra en la Figura 34.A. Entonces, se transfectaron células HMEC-1 con la forma salvaje de caveolina-1, el mutante en el dominio de andamiaje (SDmut), una construcción de caveolina-1 en el que dicho dominio SD fue totalmente eliminado ($\Delta 82-101$) o con el vector vacío (control). Como era de esperar, la expresión de caveolina-1 potenció la actividad reportera p(BRE)₂-Luc tanto en respuesta a dosis bajas de TGF- β durante tiempos cortos como sin tratamiento. Sin embargo, esta inducción fue totalmente anulada por la transfección tanto de la forma mutada cav-1 (SDmut) como de la carente del dominio SD ($\Delta 82-101$). Además, estas formas mutadas de caveolina-1 hacen a su vez al reportero p(BRE)₂-Luc insensible al tratamiento por TGF- β .

Respecto a la otra estrategia, el efecto de los mutantes de ALK-1 en el motivo de unión a caveolina-1 sobre la actividad reportera p(BRE)₂-Luc se muestra en la Figura 34.B. En este caso, células 293T, carentes de caveolina-1 endógena, se transfectaron con estas formas de ALK-1 junto con la forma salvaje de caveolina-1. Esta línea epitelial humana no expresa ALK-1 ni presentan caveolas en su membrana plasmática, por lo que si ALK-1 no es transfectado caveolina-1 no ejerce ningún efecto sobre la actividad reportera (control). Sin embargo, cuando se introduce ALK-1 en el sistema se observa el correspondiente aumento de la actividad de p(BRE)₂-Luc que es claramente incrementado por la co-transfección de la forma salvaje de caveolina-1. Por otro lado, este efecto positivo sobre la vía de señalización de ALK-1 fue considerablemente inhibido en presencia de los mutantes (001) y (011), alcanzándose un nivel de actividad reportera similar al obtenido en ausencia de caveolina-1.

Tomando estos resultados en conjunto se concluye que la cooperación funcional de caveolina-1 sobre la vía de señalización de ALK-1 depende en gran medida del dominio de andamiaje (SD) de caveolina-1 así como del reconocimiento de su motivo de unión presente en la región Trp399-Trp406 de ALK-1.

4.7.3. El bloqueo específico de caveolina-1 por siRNA reduce la señalización de ALK-1

Finalmente, se llevó a cabo el bloqueo específico de la expresión endógena de caveolina-1 mediante pequeñas moléculas de RNA de interferencia (siRNA). Esta metodología se empleó para confirmar el papel específico que caveolina-1 ejerce sobre ALK-1. Así, células HMEC-1 se transfectaron con el vector para siRNA de caveolina-1 resultando en una reducción parcial, pero considerable, de los niveles de expresión endógenos de caveolina-1 (Figura 35.A). Esto es debido al elevado nivel de expresión de caveolina-1 endógena en estas células y a que el porcentaje de transfección del vector que origina el siRNA específico no es total, por lo que la cantidad de caveolina-1 que se observa corresponde a la de las células que no han sido transfectadas. La especificidad de este bloqueo se puso de manifiesto tanto por la constancia en los niveles de β -actina como cuando se analizó que otros tres siRNA irrelevantes (C1, C2 y C3) no tenían efecto alguno sobre sus niveles de expresión.

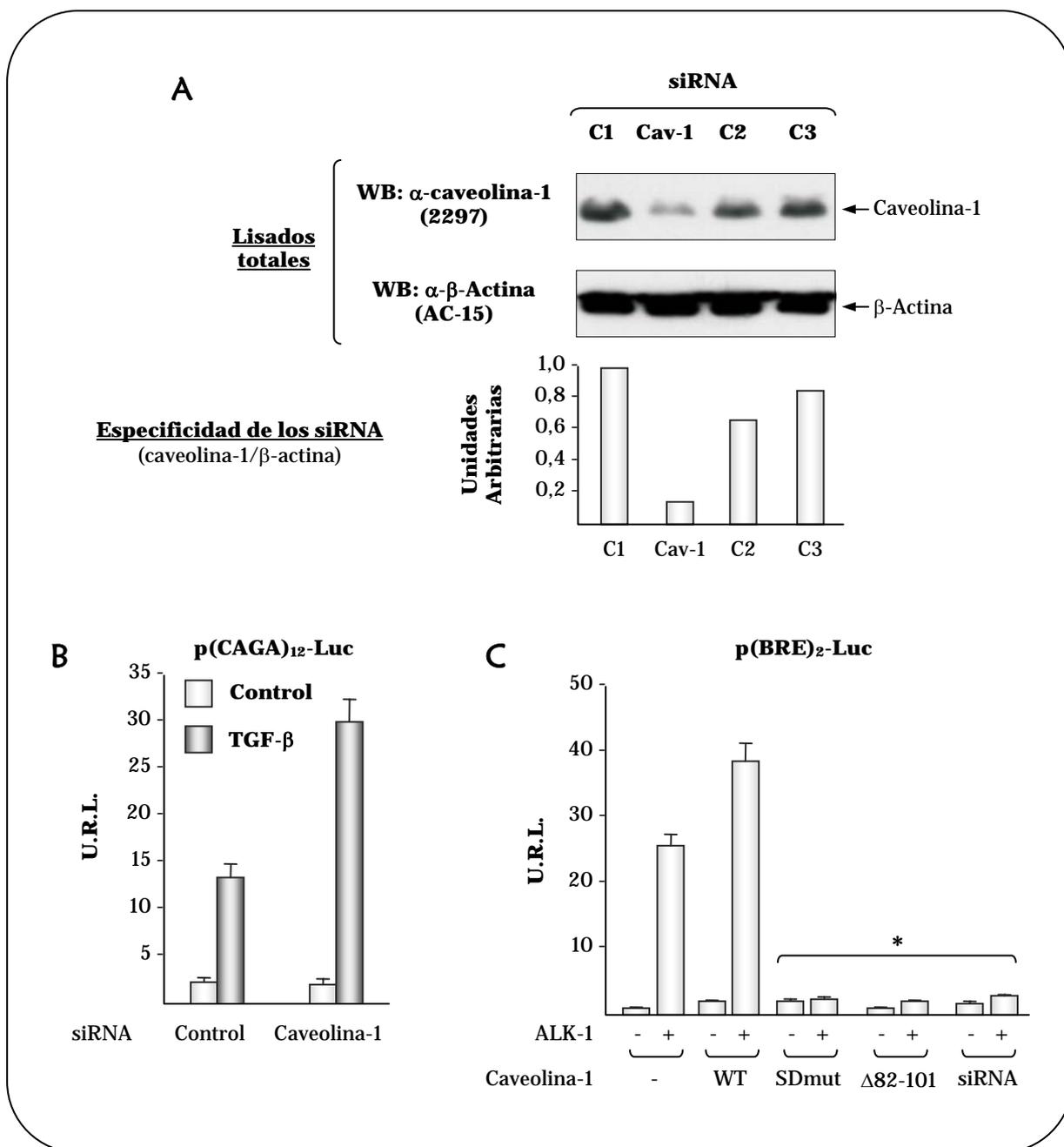


Figura 35: La reducción de caveolina-1 anula la vía de señalización de ALK-1. **(A)** La expresión de caveolina-1 fue considerablemente reducida en células L6E9 mediante un siRNA específico, que no tuvo efecto alguno sobre la expresión de β -actina. Además, el efecto nulo de tres siRNA irrelevantes (C1, C2 y C3) sobre el nivel de expresión de caveolina-1 confirmó la especificidad al ensayo. **(B)** La actividad reportera de p(CAGA)₁₂-Luc se analizó en células L6E9 transfectadas con la construcción del siRNA para caveolina-1. Puesto que se ha descrito el efecto inhibitorio de caveolina-1 sobre la vía de señalización de ALK-5, al reducir los niveles de caveolina-1 endógena aumentó la actividad de la construcción reportera de la vía de ALK-5 tanto basal como en respuesta a TGF- β . **(C)** El análisis de la actividad p(BRE)₂-Luc en células L6E9 demostró que es inducida por la transfección de ALK-1 e incrementada por la sobreexpresión de caveolina-1. Sin embargo, tanto la mutación del dominio SD como su eliminación de la secuencia de caveolina-1 se comportaron como formas dominantes negativas sobre la cooperación con ALK-1. El mismo resultado inhibitorio sobre la capacidad de ALK-1 para inducir la actividad reportera de p(BRE)₂-Luc fue obtenido al reducir los niveles endógenos de caveolina-1 por su siRNA específico. En todos los casos, $p < 0,01$ excepto en (*).

Antes de pasar directamente a estudiar el efecto de la reducción de caveolina-1 sobre la vía de señalización de ALK-1, se analizó como control la modulación de la vía de ALK-5. De este modo, el bloqueo de la expresión de caveolina-1 endógena por el siRNA específico resultó en un marcado aumento de la actividad reportera del vector p(CAGA)₁₂-Luc en células L6E9, debido a la eliminación del efecto inhibitorio de caveolina-1 sobre ALK-5 (Razani *et al.*, 2001c). Hay que destacar que en estas células la expresión endógena de caveolina-1 es muy elevada, lo que explica que el tratamiento con TGF- β no indujera la actividad del vector reportero en condiciones control (Figura 35.B). Del mismo modo, este hecho se observó posteriormente al estudiar el efecto sobre la vía de señalización de ALK-1. Ya que las células L6E9 expresan bastante caveolina-1 se obtuvo una elevada actividad del vector reportero p(BRE)₂-Luc en presencia de ALK-1. Cuando caveolina-1 fue sobreexpresada se obtuvo un aumento significativo en la vía de señalización de ALK-1 (Figura 35.C). Por el contrario, la transfección de los mutantes caveolina-1 (SDmut) y caveolina-1 (Δ 82-101) redujo drásticamente la actividad reportera de p(BRE)₂-Luc, actuando así como dominantes negativos de la caveolina-1 endógena. La expresión de siRNA de caveolina-1 tuvo el mismo efecto sobre la actividad del reportero que los mutantes anteriores, confirmándose así la cooperación funcional de caveolina-1 sobre la vía de señalización de ALK-1.

V. DISCUSIÓN

5.1. LA INTERACCIÓN DE ENDOGLINA CON ALK-1 FAVORECE SU VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Numerosos estudios han demostrado que endogлина forma complejos heteroméricos con los receptores señalizadores T β R-II y ALK-5 tanto en ausencia como en presencia de TGF- β (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Lastres *et al.*, 1996; Letamendía *et al.*, 1998b; Wong *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 1994a), incluso con otros receptores de la superfamilia como ActR-II, ActR-IIB, ALK-3 y ALK-6, en presencia de sus respectivos ligandos (Barbara *et al.*, 1999). Sin embargo, la interacción con el otro receptor tipo I de TGF- β presente en las células endoteliales, ALK-1, ha sido caracterizada en este trabajo por primera vez. Este hallazgo está de acuerdo con que ALK-1 esté presente en el complejo del receptor de TGF- β y que anticuerpos frente a T β R-II sean capaces de co-inmunoprecipitar todo el complejo receptor incluyendo ALK-5, ALK-1 y endogлина (Abdalla *et al.*, 2000; Attisano *et al.*, 1993; Barbara *et al.*, 1999). Por otro lado, se sabe que en respuesta a TGF- β , ALK-1 es capaz de transmitir la señal al núcleo por medio de proteínas R-Smad específicas. De hecho, esta vía de señalización implica a Smad1, 5 y 8, sobre las que ALK-1 ejerce su actividad serina/treonina quinasa (Chen & Massagué, 1999; Macías-Silva *et al.*, 1998). De esta manera, se establece la hipótesis de que si la interacción de endogлина con ALK-1 tenía algún significado funcional debería ser sobre esta vía de transducción de señal.

Al mismo tiempo, existían evidencias fisiológicas de este paralelismo entre endogлина y ALK-1. Así, mutaciones en los genes de endogлина (*ENG*) o ALK-1 (*ACVRL1*) dan lugar a una displasia vascular con un fenotipo similar denominada Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1 y 2, respectivamente (Marchuk & Lux, 2001), lo que apoyaba la existencia de una vía de señalización común. Por otro lado, los ratones a los que artificialmente se les había eliminado los genes de endogлина o ALK-1 morían a los 10 u 11 días de gestación debido a anomalías cardiovasculares (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000). Asimismo, cuando en el modelo murino sólo es uno de los dos alelos de estos genes el que se elimina aparecen telangiectasias y malformaciones arteriovenosas, síntomas característicos de la HHT (Satomi *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2003; Torsney *et al.*, 2003).

Todas estas premisas sugerían que endogлина y ALK-1 estaban íntimamente relacionados por lo que se comenzó a estudiar la interacción entre ambos y cómo endogлина era capaz de modular la respuesta celular a TGF- β vía ALK-1.

5.1.1. Disección y consecuencias de la interacción endogлина/ALK-1

Se ha demostrado, mediante un análisis detallado, la asociación física entre endogлина y ALK-1. Dado que ambos receptores son proteínas transmembrana con regiones extracelular y citoplásmica, es muy probable que esta interacción implique y sea estabilizada por múltiples sitios de contacto. De hecho, algo similar ocurre con los complejos formados por endogлина, ALK-5 y T β R-II (Chen *et al.*, 1995; Derynck & Feng, 1997; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). Se ha demostrado que cuando ambas proteínas, endogлина y ALK-1, son expresadas de forma ectópica pueden ser co-inmunoprecipitadas de forma recíproca con anticuerpos específicos contra cada una de ellas sin necesidad de añadir TGF- β al sistema (Figura 9). Este hecho concuerda con estudios previos de co-inmunoprecipitación en células endoteliales HUVECs (Abdalla *et al.*, 2000).

En el contexto intracelular, se ha observado la interacción entre ALK-1 y el dominio citoplásmico de endoglina, aunque si bien el estado de activación de ALK-1 determinó la cantidad de proteína co-inmunoprecipitada (Figura 12). Este hecho se explica desde el punto de vista de la actividad enzimática presente en el dominio citoplásmico de ALK-1, el cual perdería afinidad por su producto una vez fosforilado. Por esta razón la región citoplásmica de endoglina no resultó co-inmunoprecipitada con la forma constitutivamente activa de ALK-1. Esta situación sustrato-enzima-producto sería similar a la que ocurre cuando los receptores tipo I actúan sobre las R-Smads fosforilando los residuos de serina del motivo SSXS presente en sus extremos C-terminal, ya que se disocian rápidamente (Shi & Massagué, 2003). Sin embargo, un hecho llamativo es que el estado de activación de ALK-1 no afecta a la interacción con la endoglina completa. Esto sugiere que la interacción entre sus regiones extracelulares permanece y que dicha asociación presenta un alto grado de afinidad. De hecho, al comparar el total de ALK-1 arrastrado por el dominio extracelular de endoglina, presente en la quimera EndoEC-Fc, se pudo observar una diferencia de más de 15 veces con respecto al obtenido de ALK-5 o de T β R-II (Figura 11). Así, endoglina y ALK-1 permanecerían unidos por sus regiones extracelulares independientemente de que el patrón de serinas/treoninas citoplásmicas fosforiladas de endoglina se vea modificado. Algo similar ocurre en la interacción entre T β R-I/T β R-II: el receptor tipo II fosforila al tipo I pero su disociación no es inmediata ya que permanecen unidos formando complejos con el ligando (Chen *et al.*, 1995).

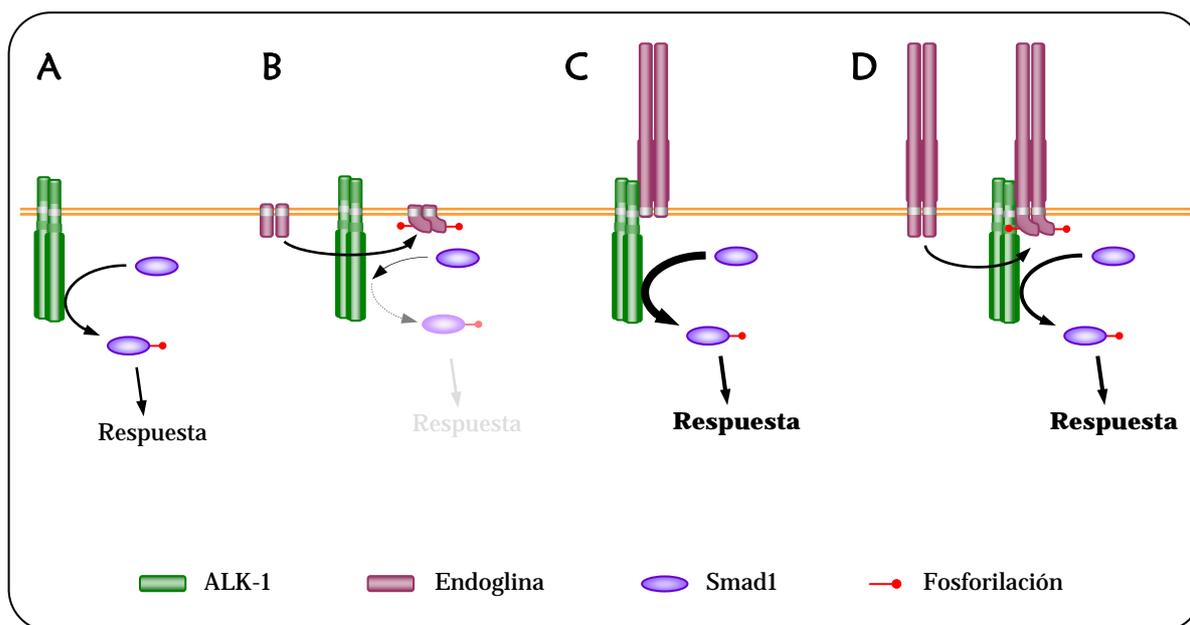


Figura 36: Implicación de las regiones extracelular y citoplásmica de endoglina sobre la señalización de ALK-1. Para simplificar el modelo se ha omitido el T β R-II así como el propio TGF- β . **(A)** Situación basal en la que TGF- β promueve la señalización de ALK-1 vía Smad1. **(B)** La región citoplásmica de endoglina competiría con Smad1 al ser ambos sustratos de la actividad serina/treonina quinasa de ALK-1, provocando una inhibición de la respuesta celular. **(C)** La región extracelular de endoglina estabilizaría la unión del ligando a ALK-1, que actuaría sobre Smad1 con más eficiencia al no estar presente el otro sustrato, esto es, la región citoplásmica de endoglina. Esto explica por qué la respuesta celular vía Smad1 se ve amplificada. **(D)** Así, en presencia de endoglina completa la región citoplásmica queda en contacto con ALK-1, estabilizada por las regiones extracelulares. Esta es la situación natural en la que endoglina promueve la señalización de TGF- β vía ALK-1.

El estudio de la cooperación funcional entre endogлина y ALK-1 corrobora la hipótesis de la importancia de la interacción extracelular de ambas proteínas. Se ha demostrado mediante el sistema celular inducible de endogлина por doxiciлина, GM7372EL, que cuando son co-expresadas, la señalización de ALK-1 vía Smad1 se ve favorecida (Figura 14). Este efecto se reprodujo al transfectar construcciones truncadas de endogлина que contenían, al menos, la región extracelular comprendida entre Glu26-Arg437 (Figura 15). Además, formas solubles del dominio extracelular de endogлина fueron capaces de unirse a las células endoteliales e inducir la señalización vía Smad1 así como revertir el efecto antiproliferativo de TGF- β (Figuras 19 y 20). No obstante, esta cooperación no se observó con la transfección de la región citoplásmica de endogлина. Estos hechos sugieren que la modulación de la vía de señalización de ALK-1 por endogлина depende principalmente de su región extracelular. Así, la región citoplásmica de endogлина sería sustrato de ALK-1 pero el efecto que ésta ejercería sobre el receptor dependería de la estabilización por sus regiones extracelulares (Figura 36).

5.1.2. ¿ALK-5 o ALK-1?

La coexistencia de dos receptores tipo I de TGF- β en células endoteliales capaces de unir el mismo ligando debe ser finamente regulada. Más aún cuando las respuestas celulares vía ALK-5 o ALK-1 han sido relacionadas con efectos opuestos sobre la angiogénesis. Así, mientras la señalización de TGF- β vía ALK-1 se ha relacionado con la fase de activación, la de ALK-5 está implicada en la fase de resolución (Goumans *et al.*, 2003a; Goumans *et al.*, 2003b; Goumans *et al.*, 2002). A partir de estos artículos citados de Goumans y colaboradores y junto con los resultados obtenidos en el presente trabajo se ha propuesto el modelo recogido en la Figura 37, en el que se establece que endogлина es capaz de modular el balance entre las vías de señalización de ALK-5 y ALK-1. Desde hace tiempo se había observado que el TGF- β ejercía este papel dual sobre la migración y proliferación de las células endoteliales. Analizando el perfil de expresión génica, mediante chips de DNA, dependiente de formas constitutivamente activadas de uno u otro receptor tipo I se observaron marcadas diferencias (Ota *et al.*, 2002). Así, ALK-1 inducía específicamente la expresión de Id1, un miembro de la familia de factores de transcripción hélice-giro-hélice básicos (bHLH) que promueve la migración y proliferación de células endoteliales. Por su parte, ALK-5 era capaz de estimular de forma específica la expresión de PAI-1, un regulador negativo de la migración endotelial *in vitro* y de la angiogénesis *in vivo* (Stefansson & Lawrence, 1996; Stefansson *et al.*, 2001). En el presente trabajo se ha demostrado mediante construcciones reporteras de ambas vías de señalización que endogлина es capaz de inclinar la balanza hacia la vía de señalización ALK-1/Smad1 en detrimento de la de ALK-5/Smad3 (Figuras 16, 17 y 18). Estos resultados están de acuerdo con numerosos trabajos publicados en los que se describía el papel antagonista de endogлина sobre algunas de las respuestas a TGF- β mediadas por ALK-5, como la inhibición de la proliferación celular, activación de la apoptosis, o inducción de la síntesis de matriz extracelular (Díez-Marqués *et al.*, 2002; Lastres *et al.*, 1996; Letamendía *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2003; Obreo *et al.*, 2004), y con la propia inhibición de la vía TGF- β /Smad3 (Guo *et al.*, 2004). Por la otra parte, un trabajo reciente apoya la cooperación funcional de endogлина sobre la vía de señalización de ALK-1 demostrando el aumento de la proliferación de células endoteliales embrionarias y la promoción de la vía TGF- β /ALK-1 (Lebrin *et al.*, 2004). No obstante, a pesar de que la interacción directa entre endogлина con ALK-1 y ALK-5 podría explicar la regulación de la actividad del correspondiente T β R-I, no puede ser descartado el papel de una interferencia cruzada (en

inglés *cross-talk*) entre ambos receptores. Así, se ha propuesto que endoglina podría interferir indirectamente vía ALK-1 con la señalización de ALK-5 modulando la composición de los complejos R-Smads y, por lo tanto, su actividad (Lebrin *et al.*, 2004). Ninguno de los mecanismos puede ser excluido, incluso puede que ambos tengan lugar simultáneamente en células endoteliales, donde coexisten los tres miembros. No obstante, existen evidencias que apoyan la idea basada en una interacción directa por el hecho de que la expresión ectópica de endoglina/ALK-5 o endoglina/ALK-1 reproduce los resultados obtenidos en células endoteliales.

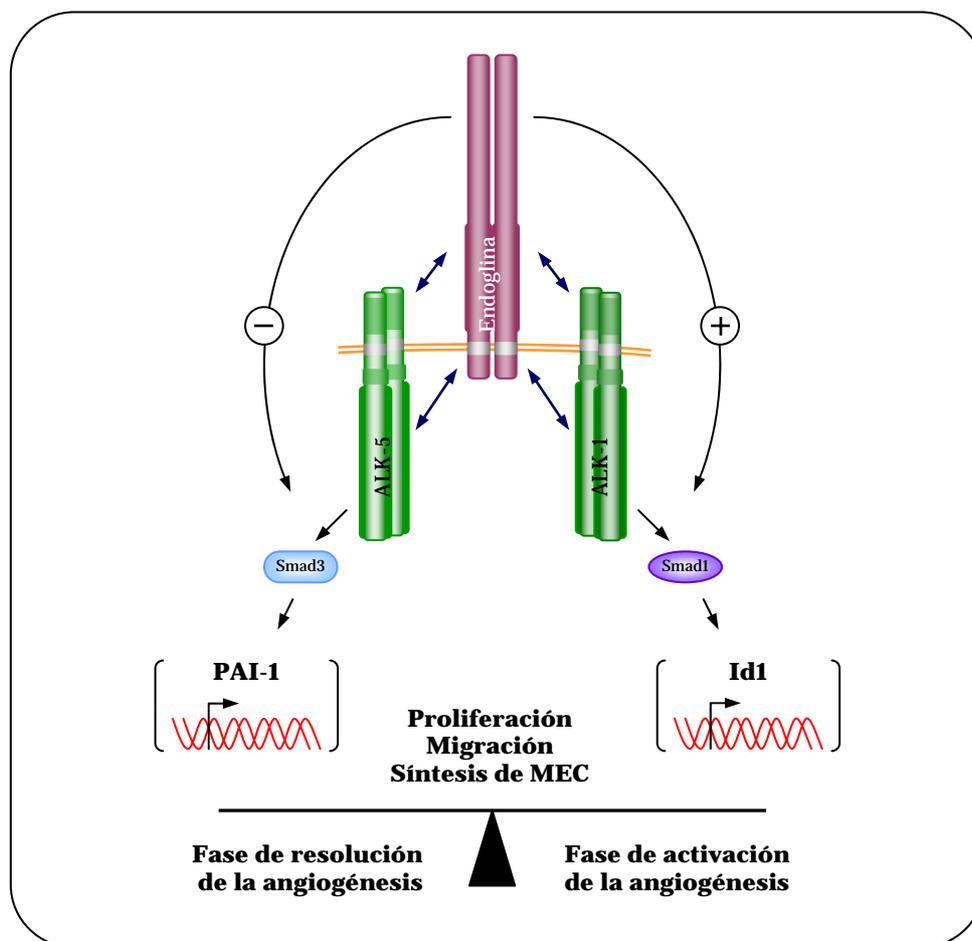


Figura 37: Modelo funcional de la regulación de endoglina sobre el balance ALK-5/ALK-1. Endoglina favorece la fase de activación de la angiogénesis, en la que las células endoteliales degradan la matriz extracelular (MEC), invaden y migran a través del espacio extracelular, proliferan y forman el lumen del vaso. Por el contrario, endoglina es capaz de inhibir la fase de resolución, la cual implica que las células endoteliales dejan de migrar y proliferar, y reconstituyen la barrera endotelial.

Es sabido que la presencia de endoglina en el complejo receptor, en el modelo de mioblastos de rata L6E9, no aumenta espectacularmente la cantidad de TGF- β unido pero sí que favorece la unión del ligando a ALK-5 (Letamendía *et al.*, 1998b). Por otro lado, la afinidad de ALK-1 por TGF- β es mucho menor (Oh *et al.*, 2000), por lo que endoglina favorecería esta estabilización fomentando así la transducción de señal. Así, el papel de endoglina en el complejo receptor de TGF- β sería la modulación del acceso del ligando a los receptores. Apoyando esta hipótesis se observó que el dominio extracelular purificado de endoglina así como la construcción quimera EndoEC-Fc eran capaces de mimetizar la forma

completa endógena, respecto a las variaciones de la actividad de los reporteros específicos y en cuanto a la reversión de la inhibición de la proliferación inducida por TGF- β (Figura 19). Sin embargo, no todas las funciones que endogлина ejerce en las células serían mimetizadas por la región extracelular soluble, ya que se ha descrito el importante papel que su región citoplásmica juega en la organización del citoesqueleto de actina por su interacción con miembros de la familia Lim, como zyxin y ZRP-1 (Conley *et al.*, 2004; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). Por lo tanto, la aplicación de endogлина soluble como un posible tratamiento paliativo a enfermos de HHT1, donde los niveles de expresión de endogлина son la mitad debido a la mutación de uno de los alelos del gen que la codifica, sería de una eficacia limitada. No obstante, estudios en modelos animales de HHT ayudarían a analizar esta hipótesis.

5.2. LA ISOFORMA ENDOGLINA-S ANTAGONIZA EL EFECTO DE ENDOGLINA-L EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF- β

Por lo general, cuando se menciona a endogлина se hace referencia a su isoforma larga, denominada endogлина-L, que es la que se expresa de forma mayoritaria en las células. Sin embargo, hace tiempo que se describió la expresión de una isoforma algo más pequeña (Bellón *et al.*, 1993). Su expresión era minoritaria en relación a la isoforma larga y se originaba por la permanencia en el RNA maduro de un pequeño intrón de 135 pares de bases entre los exones 13 y 14, el cual contenía un codón de parada prematura de la traducción en fase de lectura. En cuanto a la estructura primaria, la diferencia entre ambas reside en su región citoplásmica que en el caso de endogлина-L contiene 47 residuos y en endogлина-S contiene 14, siendo comunes los 7 primeros (Figura 6). Más recientemente se ha descrito la existencia de esta isoforma corta en ratón (Pérez-Gómez *et al.*, 2005), pero el papel fisiológico que estas formas más cortas de endogлина juegan en la célula no ha sido estudiado aún en detalle.

Los primeros estudios fueron realizados en células promonocíticas humanas U-937. Se observaba que endogлина-S no era capaz de inhibir totalmente el efecto antiproliferativo inducido por TGF- β , al contrario que su isoforma endogлина-L, debido a que la expresión de c-myc no llegaba a anularse en respuesta a TGF- β . Además, estos transfectantes de endogлина-S eran capaces de producir una mayor cantidad de fibronectina tras el tratamiento con TGF- β a tiempos cortos (Lastres *et al.*, 1996). Estos datos indicaban que ambas formas de endogлина podrían influenciar de manera distinta la respuesta celular a TGF- β . Por otra parte, se había observado que esta isoforma corta de endogлина aparecía en los cultivos endoteliales envejecidos, que perdían su capacidad de proliferación y presentaban una morfología muy similar a la de los mioblastos L6E9 transfectados de forma estable con endogлина-S.

5.2.1. Papel de endogлина-S en la senescencia endotelial.

Los resultados presentados en este trabajo han demostrado por primera vez que hay una relación directa entre endogлина-S y senescencia endotelial (Figura 22). Cuando el organismo envejece, aparecen alteraciones en la capacidad de remodelación de la pared vascular, ensanchamiento del lumen de los vasos, aumento del espesor de las tunicas íntima y media y un incremento de la rigidez vascular, que conducen al empeoramiento de la función endotelial aumentando el riesgo del desarrollo de una enfermedad cardiovascular. Al mismo tiempo, las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio

están atenuadas debido a un descenso en la actividad o la expresión de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa, eNOS, lo cual obliga al aumento de la expresión de su isoforma inducible, iNOS, con la consecuencia final del incremento de la formación de especies reactivas del oxígeno, que pueden ser la causa del aumento de la proporción de células endoteliales apoptóticas en la senescencia.

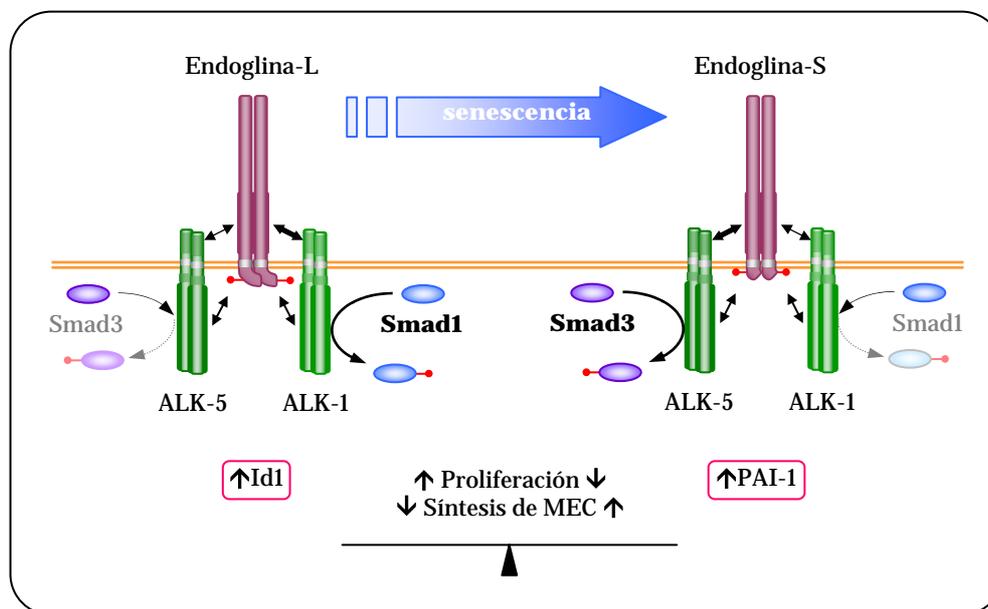


Figura 38: Modelo de acción comparativo de las isoformas de endogлина. En un estado de senescencia celular la respuesta a TGF-β se ve modulada por la aparición de endogлина-S en el complejo receptor, que favorece la señalización a través de ALK-5. No se descarta la posible formación de heterodímeros de las formas S y L de endogлина.

Endogлина parece tener un papel protector en estos fenómenos que acontecen en el envejecimiento endotelial. Así, su expresión aumenta en el remodelado vascular tras un daño endotelial (Botella *et al.*, 2002), es capaz de estabilizar la interacción eNOS/Hsp90 para alcanzar su óptima actividad enzimática (Jerkic *et al.*, 2004; Toporsian *et al.*, 2005), y previene la apoptosis endotelial inducida por estados de baja concentración de oxígeno, hipoxia (Guo *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2003). Sin embargo, todas estas funciones se atribuyen a endogлина-L. En este trabajo se ha demostrado por primera vez que en las células senescentes hay un cambio hacia la expresión de la isoforma corta y se ha visto que endogлина-S ejerce efectos opuestos a su isoforma mayoritaria sobre la respuesta a TGF-β, como la promoción de la vía de señalización a través de ALK-5 y el bloqueo de la de ALK-1 (Figuras 25, 26 y 27). Sin embargo, en este estadio senescente no hay una situación de todo o nada sino que coexisten ambas isoformas. Incluso, se ha descrito que cuando son co-expresadas de forma ectópica pueden formar heterodímeros S/L (Pérez-Gómez *et al.*, 2005). Por lo tanto, la inclinación de la balanza hacia ALK-5 o ALK-1 dependería de la relación S/L presente en cada momento en la célula endotelial (Figura 38). Es interesante resaltar que se ha observado, en líneas generales, que los niveles de expresión de ALK-5 y ALK-1 a lo largo del envejecimiento celular permanecen constantes dentro de un determinado intervalo, por lo que sería el aumento de la proporción S/L la que potenciaría la vía de ALK-5.

Ya que ambas isoformas de endogлина comparten la extensa región extracelular, las regiones citoplásmicas son los principales candidatos de ejercer los efectos antagonistas observados. Así, se

encontró que ALK-5 es capaz de interactuar con el dominio citoplásmico de ambas isoformas de endoglina en igual medida, mientras que la interacción de ALK-1 con el dominio citoplásmico de endoglina-L es mucho mayor que con el de endoglina-S (Figura 23). En concordancia con estos resultados, cuando fue la proteína completa la que se expresó en la célula, estas diferencias para ALK-1 se acentuaron aún más, obteniéndose un rendimiento mucho mayor en la interacción ALK-1/endoglina-L (Figura 24). En este sentido, si bien el tallo citoplásmico largo de endoglina inhibiría la actividad de ALK-5 sobre Smad3, su versión corta sería incapaz de tener dicho efecto resultando en una potenciación “indirecta” de la señalización ya que por su región extracelular estaría promoviendo la captación de ligando (Letamendía *et al.*, 1998b). Por el otro lado, endoglina-S sería incapaz de promover la señalización vía ALK-1, favoreciéndose así la anterior cascada de señalización. De acuerdo con esta hipótesis, se ha sugerido el efecto antiangiogénico de endoglina-S frente al establecido proangiogénico de endoglina-L. Se ha observado que los ratones transgénicos que expresan la isoforma corta humana, denominados *S-Eng⁺* (Velasco *et al.*, 2001), exhiben un fenotipo angiogénico deficiente que conduce a un retardo del crecimiento tumoral, usando el modelo de carcinoma 3LL (Pérez-Gómez *et al.*, 2005).

El mecanismo por el cual se generan las dos isoformas no ha sido aún determinado. Es muy probable que se produzca por un mecanismo de ajuste de exones alternativo. De hecho, ese pequeño intrón que queda retenido en la endoglina-S contiene sitios donador (GT) y aceptor (AG) del ajuste en los extremos 5' y 3', respectivamente, así como un sitio de ramificación (CTGAC). A modo de ejemplo, esta misma situación es la responsable de la expresión de varias isoformas del receptor de activina (Attisano *et al.*, 1992). Ese pequeño intrón de endoglina contiene, además, sitios consenso teóricos para el reconocimiento por determinados miembros de la familia de proteínas con dominios ricos en serina y arginina (SR). Estos factores forman parte y modulan la actividad del complejo macromolecular denominado espliceosoma, compuesto principalmente por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP)s (Matlin *et al.*, 2005; Singh & Valcárcel, 2005). Estas proteínas SR son requeridas en los primeros estadios del ensamblaje del espliceosoma, tienen especificidades distintas pero solapantes y pueden alterar la elección del sitio de ajuste, sugiriendo que podrían estar implicados en la regulación del ajuste alternativo *in vivo*. Este mecanismo de generación de ajuste alternativo propuesto para endoglina-S ha sido descrito en otras proteínas como CD45 (Wang *et al.*, 2001), la β -tropomiosina (Expert-Bezançon *et al.*, 2004), la acetilcolinesterasa neuronal (AChE) (Meshorer *et al.*, 2005), o la proteína proteolípida 1 (PLP1) (Wang *et al.*, 2006). Conocer el mecanismo y el estímulo que determina uno u otro ajuste de exones nos ayudará a comprender en detalle el papel de endoglina en la biología vascular.

5.3. CAVEOLINA-1 INTERACCIONA CON ALK-1 Y POTENCIA SU VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Las proteínas de la familia de las caveolinas se asocian típicamente con microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos denominados balsas lipídicas (en inglés, *lipid rafts*) formando estructuras llamadas caveolas. Sin embargo, lejos de formar simples estructuras subcelulares las caveolinas, y más en concreto caveolina-1, tiene la capacidad de interactuar y modular la actividad de numerosas proteínas generalmente implicadas en transducción de señal. Si se recopila bibliografía publicada sobre caveolina-1 se observa que la mayoría de las interacciones en las que está implicada resultan en un efecto inhibitorio (revisado en Krajewska & Maslowska, 2004). Así por ejemplo,

caveolina-1 es capaz de interactuar y reprimir la actividad de eNOS (García-Cardena *et al.*, 1997), del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (Couet *et al.*, 1997b), de las isoformas α y ζ de la proteína quinasa C (PKC) (Oka *et al.*, 1997), o del propio ALK-5 (Razani *et al.*, 2001c).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran por vez primera una cooperación positiva entre caveolina-1 y ALK-1 (Figura 33). Se ha identificado en la región Trp399-Trp406 de la secuencia de ALK-1 un motivo de interacción con el dominio de andamiaje (SD) de caveolina-1. Tanto las mutaciones específicamente introducidas en este consenso como la mutación del dominio SD de caveolina-1 (SDmut) reducen a la mitad la cantidad de proteína co-inmunoprecipitada (Figuras 30 y 31) así como la cooperación funcional (Figuras 34 y 35). También se ha observado que la depleción de colesterol, con la consecuente desestabilización de las caveolas, cambia el patrón de distribución de ambas proteínas (Figuras 28 y 29) y bloquea la vía de señalización de ALK-1 (Figura 32). Apoyando la idea de la cooperación positiva de caveolina-1 sobre ALK-1 están los análisis de la actividad de sistemas reporteros, donde se obtuvo un aumento de la vía de señalización de ALK-1. Este no es el único caso de activación de un receptor por caveolina-1 ya que se ha descrito que la interacción con el receptor de insulina resulta también en una activación de su actividad tirosina-quinasa (Nystrom *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1998).

5.3.1. Paralelismo funcional entre ALK-1 y caveolina-1

Desde hace relativamente poco, se ha descrito la implicación de caveolina-1 en el proceso de angiogénesis. Se ha observado que la eliminación de la expresión del gen que codifica para caveolina-1 en modelos de ratón (*knock-out*) conduce a anomalías vasculares puestas de manifiesto por alteraciones, entre otras, de la morfología de las uniones estrechas que resultan en un aumento de la permeabilidad de la microvasculatura, un incremento de la vasorrelajación de la aorta inducida por acetilcolina debido a una activación constitutiva de eNOS, y un ensanchamiento de los septos alveolares de los pulmones por una hiperproliferación de células endoteliales acompañada de fibrosis (Drab *et al.*, 2001; Razani *et al.*, 2001a; Woodman *et al.*, 2003). Además, en modelos *in vitro*, el bloqueo específico de la expresión de caveolina-1 por oligonucleótidos antisentido da lugar a una incapacidad de formación de estructuras tubulares similares a capilares (Liu *et al.*, 2002).

De este modo, tomando todos los datos en conjunto aparece un paralelismo funcional entre caveolina-1 y ALK-1 (Figura 39). Así, en las células endoteliales de los ratones *cav-1^{-/-}* la vía de señalización de TGF- β a través de ALK-1 estaría reducida o al menos desfavorecida, mientras que la de ALK-5 quedaría libre de la inhibición por caveolina-1. Esta hipótesis sería apoyada por la fibrosis observada en los septos alveolares, que estaría mediada por la vía de ALK-5 al desaparecer el obstáculo que representa su interacción con caveolina-1. De hecho, el exceso de producción de matriz extracelular es un proceso patológico asociado a altos niveles de TGF- β en sangre, por lo que el resultado de ambas situaciones sería análogo. Por otro lado, el fenotipo hiperproliferativo de células endoteliales de estos ratones no estaría relacionado con la vía de ALK-1, sino por el marcado aumento de la expresión de receptores de factores de crecimiento como Flk-1, receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Sin embargo, la formación de estructuras tubulares, tubulogénesis, sí que estaría influenciada por un descenso en la vía de ALK-1. Se ha observado que la expresión de caveolina-1 aumenta significativamente momentos antes del comienzo de la tubulogénesis (Liu *et al.*, 2002). En paralelo,

también se ha observado que las células endoteliales de pacientes afectados por HHT2 (*ACVRL1*^{+/-}) son incapaces de formar estas estructuras similares a capilares (Fernández-L *et al.*, 2005). Aquí aparece de nuevo la similitud funcional entre caveolina-1 y ALK-1, ya que la tubulogénesis endotelial dependería de la cooperación del aumento de caveolina-1 sobre la vía de señalización TGF- β /ALK-1.

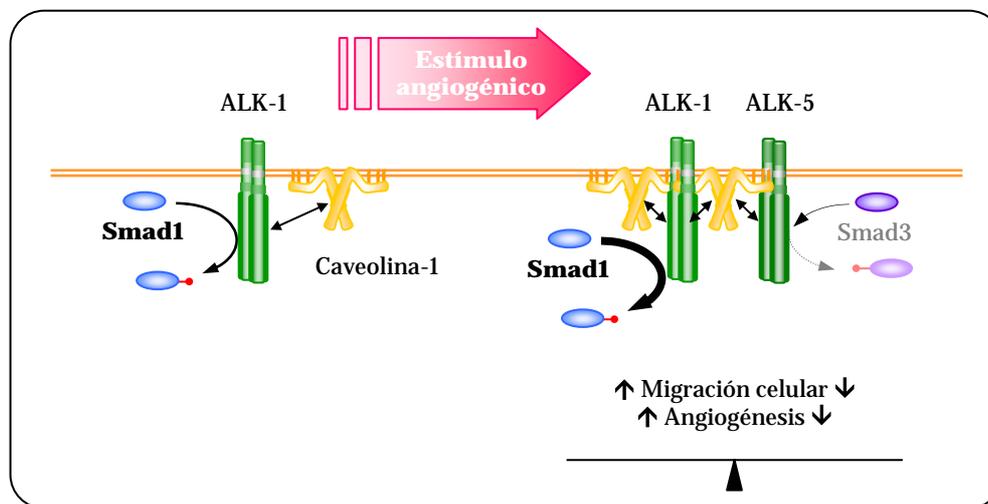


Figura 39: Cooperación funcional de caveolina-1 sobre la vía de señalización de ALK-1. En condiciones normales ALK-1 se localiza tanto en caveolas como fuera, pudiendo existir interacción entre ambos y una señalización basal. A consecuencia de un estímulo angiogénico la expresión de caveolina-1 aumenta, luego es capaz de retener a ALK-1 durante más tiempo en las caveolas. Esta situación potenciaría la señalización de TGF- β mediante ALK-1, ya que caveolina ejerce un papel inhibitorio sobre la vía de ALK-5, dando lugar a procesos tales como migración celular, tubulogénesis y, en definitiva, la fase de activación de la angiogénesis.

5.4. COMENTARIO FINAL Y PERSPECTIVAS

El TGF- β es un citoquina multifuncional que juega un papel dual sobre el endotelio vascular. En las células endoteliales, TGF- β puede ejercer sus diversas funciones a través de dos receptores tipo I diferentes, ALK-5 y ALK-1. Por lo tanto, la decisión de inclinar la balanza hacia uno u otro receptor es un proceso que debe estar finamente regulado. En la fase de activación de la angiogénesis, la expresión de endoglina aumenta, siendo capaz de modular la respuesta a TGF- β . En este contexto, es la isoforma mayoritaria endoglina-L la que es capaz de promover la señalización ALK-1/Smad1 en detrimento de ALK-5/Smad3. Así, esta cooperación funcional entre endoglina-L y ALK-1 es fundamental para el desarrollo y el mantenimiento de la vasculatura. De hecho, mutaciones en un alelo de uno de estos genes son la causa de una alteración vascular denominada Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) tipo 1 y 2, respectivamente. Por el contrario, cuando las células endoteliales envejecen, el aumento de la expresión de la isoforma corta endoglina-S invierte la inclinación de la balanza hacia la vía de señalización ALK-5/Smad3. Conocer los mecanismos implicados en la expresión de endoglina-S así como el estímulo que los desencadena ayudará a elucidar las funciones que desempeña en la célula endotelial.

Se había descrito que el complejo T β R-II/ALK-5 se localizaba en los microdominios especializados de la membrana plasmática denominados caveolas, donde la actividad de ALK-5 se veía reprimida. En el presente trabajo se ha demostrado que ALK-1 también se localiza en caveolas e

interacciona con caveolina-1, su principal componente. Sin embargo el resultado es distinto ya que potencia la señalización ALK-1/Smad1. Este hecho hace de caveolina-1 una nueva diana para el control de la fisiología vascular. Péptidos del dominio de andamiaje de caveolina-1 podrían desencadenar la respuesta angiogénica en patologías donde su correcto desarrollo estuviera comprometido.

Es muy probable que todas estas respuestas a TGF- β tengan lugar en caveolas. Recientemente se detectado la presencia de endoglina en estos microdominios, donde estabiliza la interacción y cooperación de Hsp90 con la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Toporsian *et al.*, 2005), función que estaría alterada en las células senescentes por el aumento de endoglina-S. Así, el análisis del papel que tendría endoglina en un modelo integrado por T β R-II, ALK-5, ALK-1 y caveolina-1 es un atractivo proyecto que ayudará a comprender mejor la regulación de la respuesta a TGF- β en células endoteliales.

VI. CONCLUSIONES

1. Se ha caracterizado la interacción de endogлина con el receptor tipo I de TGF- β ALK-1. Esta interacción tiene lugar en ausencia de ligando tanto por las regiones extracelulares como citoplásmicas de ambos.
2. El estado de activación de ALK-1 no influye en la asociación con endogлина completa, aunque si bien al no asociarse la región citoplásmica de ésta con la forma constitutivamente activada ALK-1 (QD) se sugiere que podría ser sustrato de su actividad serina/treonina-quinasa.
3. Endogлина coopera funcionalmente en la vía de señalización de ALK-1 en células endoteliales, siendo responsable su región comprendida entre Glu26-Arg437. La actividad transcripcional del promotor de Id1, específico de la vía de señalización de ALK-1, así como la de sistemas reporteros dependientes de Smad1 aumentan con la sobreexpresión de endogлина.
4. Endogлина interfiere en la respuesta celular TGF- β /ALK-5. La sobreexpresión de endogлина es capaz de inhibir la actividad transcripcional de sistemas reporteros de la vía de Smad3, mientras que el bloqueo específico de su expresión por siRNA resulta en un significativo aumento de la vía de señalización ALK-5/Smad3.
5. La isoforma corta de endogлина aumenta en células endoteliales senescentes, caracterizadas por un aumento de la actividad β -galactosidasa.
6. Tanto ALK-1 como ALK-5 son capaces de interactuar con ambas isoformas de endogлина. Sin embargo, endogлина-S muestra una afinidad mucho mayor por ALK-5 que por ALK-1.
7. Endogлина-S es capaz de inclinar la balanza hacia la señalización de ALK-5 en detrimento de la de ALK-1. Este hecho se ve representado por la inducción transcripcional del promotor de PAI-1 y la represión de Id1, respectivamente. Este efecto opuesto al ejercido por la isoforma mayoritaria, endogлина-L, depende de la región citoplásmica.
8. ALK-1 se localiza en caveolas, donde interactúa con caveolina-1. El motivo **WAFGLVLW** (Trp399-Trp406) presente en el dominio serina/treonina-quinasa de ALK-1 es reconocido por el dominio de andamiaje (*scaffolding domain*) de caveolina-1.
9. Caveolina-1 promueve la vía de señalización de ALK-1. Esta cooperación funcional depende de la interacción entre las regiones Trp399-Trp406 de ALK-1 y el dominio SD de caveolina-1.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ABDALLA, S. A.,** GEISTHOFF, U. W., BONNEAU, D., PLAUCHU, H., McDONALD, J., KENNEDY, S., FAUGHNAN, M. E. & LETARTE, M. (2003). Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* 40, 494-502.
- ABDALLA, S. A. & LETARTE, M.** (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 43, 97-110.
- ABDALLA, S. A.,** PECE-BARBARA, N., VERA, S., TAPIA, E., PÁEZ, E., BERNABÉU, C. & LETARTE, M. (2000). Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 9, 1227-37.
- ADAM, P. J.,** CLESHAM, G. J. & WEISSBERG, P. L. (1998). Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 33-7.
- ADES, E. W.,** CANDAL, F. J., SWERLICK, R. A., GEORGE, V. G., SUMMERS, S., BOSSE, D. C. & LAWLEY, T. J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99, 683-90.
- AKHURST, R. J. & BALMAIN, A.** (1999). Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. *J Pathol* 187, 82-90.
- ALTOMONTE, M.,** MONTAGNER, R., FONSATTI, E., COLIZZI, F., CATTAROSI, I., BRASOVEANU, L. I., NICOTRA, M. R., CATTELAN, A., NATALI, P. G. & 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, 1586-91.
- AOKI, T.,** NOMURA, R. & FUJIMOTO, T. (1999). Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp Cell Res* 253, 629-36.
- ARTHUR, H. M.,** URE, J., SMITH, A. J., RENFORTH, G., WILSON, D. I., TORSNEY, E., CHARLTON, R., PARUMS, D. V., JOWETT, T., MARCHUK, D. A., BURN, J. & DIAMOND, A. G. (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.,** CÁRCAMO, J., VENTURA, F., WEIS, F. M., MASSAGUÉ, J. & WRANA, J. L. (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75, 671-80.
- ATTISANO, L. & WRANA, J. L.** (2000). Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12, 235-43.
- BARBARA, N. P.,** WRANA, J. L. & 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, 584-94.
- BELLÓN, T.,** CORBÍ, A., LASTRES, P., CALES, C., CEBRIÁN, M., VERA, S., CHEIFETZ, S., MASSAGUÉ, J., LETARTE, M. & BERNABÉU, 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, 2340-5.
- BERG, J.,** PORTEOUS, M., REINHARDT, D., GALLIONE, C., HOLLOWAY, S., UMASUNTHAR, T., LUX, A., MCKINNON, W., MARCHUK, D. & GUTTMACHER, A. (2003). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet* 40, 585-90.

- BHATNAGAR, A., SHEFFLER, D. J., KROEZE, W. K., COMPTON-TOTH, B. & ROTH, B. L. (2004).** Caveolin-1 interacts with 5-HT_{2A} serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected Galphaq-coupled protein receptors. *J Biol Chem* 279, 34614-23.
- BLANCO, F. J., SANTIBÁÑEZ, J. F., GUERRERO-ESTEO, M., LANGA, C., VARY, C. P. & BERNABÉU, 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, 574-84.
- BODEY, B., BODEY, B., JR., SIEGEL, S. E. & KAISER, H. E. (1998a).** Upregulation of endoglin (CD105) expression during childhood brain tumor-related angiogenesis. Anti-angiogenic therapy. *Anticancer Res* 18, 1485-500.
- BODEY, B., BODEY, B., JR., SIEGEL, S. E. & KAISER, H. E. (1998b).** Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res* 18, 2701-10.
- BORK, P. & SANDER, C. (1992).** A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett* 300, 237-40.
- BOTELLA, L. M., SÁNCHEZ-ELSNER, T., SANZ-RODRÍGUEZ, F., KOJIMA, S., SHIMADA, J., GUERRERO-ESTEO, M., COOREMAN, M. P., RATZIU, V., LANGA, C., VARY, C. P., RAMÍREZ, J. R., FRIEDMAN, S. & BERNABÉU, C. (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, 4001-10.
- BOURDEAU, A., DUMONT, D. J. & LETARTE, M. (1999).** A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104, 1343-51.
- BRANDES, R. P., FLEMING, I. & BUSSE, R. (2005).** Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 66, 286-94.
- BROWN, D. A. & LONDON, E. (2000).** Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275, 17221-4.
- BÜHRING, H. J., MÜLLER, C. A., LETARTE, M., GOUGOS, A., SAALMULLER, A., VAN AGTHOVEN, A. J. & BUSCH, F. W. (1991).** Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* 5, 841-7.
- BURROWS, F. J., DERBYSHIRE, E. J., TAZZARI, P. L., AMLOT, P., GAZDAR, A. F., KING, S. W., LETARTE, M., VITETTA, E. S. & THORPE, P. E. (1995).** Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1, 1623-34.
- BUSCARINI, E., BUSCARINI, L., DANESINO, C., PIANTANIDA, M., CIVARDI, G., QUARETTI, P., ROSSI, S., DI STASI, M. & SILVA, M. (1997).** Hepatic vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Doppler sonographic screening in a large family. *J Hepatol* 26, 111-8.
- CAO, H., COURCHESNE, W. E. & MASTICK, C. C. (2002).** A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 277, 8771-4.
- CÁRCAMO, J., WEIS, F. M., VENTURA, F., WIESER, R., WRANA, J. L., ATTISANO, L. & MASSAGUÉ, J. (1994).** Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 14, 3810-21.
- CARMAN, C. V., LISANTI, M. P. & BENOVIC, J. L. (1999).** Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin. *J Biol Chem* 274, 8858-64.
- CARMELIET, P. (2005).** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-6.
- COLE, S. G., BEGBIE, M. E., WALLACE, G. M. & SHOVLIN, C. L. (2005).** A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 42, 577-82.

- CONLEY, B. A., KOLEVA, R., SMITH, J. D., KACER, D., ZHANG, D., BERNABÉU, C. & VARY, C. P. (2004). Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem* 279, 27440-9.
- CONLEY, B. A., SMITH, J. D., GUERRERO-ESTEO, M., BERNABÉU, C. & VARY, C. P. (2000). Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153, 323-35.
- COUET, J., LI, S., OKAMOTO, T., IKEZU, T. & LISANTI, M. P. (1997a). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 272, 6525-33.
- COUET, J., SARGIACOMO, M. & LISANTI, M. P. (1997b). Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 272, 30429-38.
- CYMERMAN, U., VERA, S., PECE-BARBARA, N., BOURDEAU, A., WHITE, R. I., JR., DUNN, J. & LETARTE, M. (2000). Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* 47, 24-35.
- CHACKO, B. M., QIN, B., CORREIA, J. J., LAM, S. S., DE CAESTECKER, M. P. & LIN, K. (2001). The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat Struct Biol* 8, 248-53.
- CHACKO, B. M., QIN, B. Y., TIWARI, A., SHI, G., LAM, S., HAYWARD, L. J., DE CAESTECKER, M. & LIN, K. (2004). Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 15, 813-23.
- CHEIFETZ, S., BELLÓN, T., CALES, C., VERA, S., BERNABÉU, C., MASSAGUÉ, J. & LETARTE, M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267, 19027-30.
- CHEN, H. B., RUD, J. G., LIN, K. & XU, L. (2005). Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *J Biol Chem* 280, 21329-36.
- CHEN, H. B., SHEN, J., IP, Y. T. & XU, L. (2006). Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev* 20, 648-53.
- CHEN, R. H. & DERYNCK, R. (1994). Homomeric interactions between type II transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 269, 22868-74.
- CHEN, R. H., MOSES, H. L., MARUOKA, E. M., DERYNCK, R. & KAWABATA, M. (1995). Phosphorylation-dependent interaction of the cytoplasmic domains of the type I and type II transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 270, 12235-41.
- CHEN, Y. G., LIU, F. & MASSAGUÉ, J. (1997). Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *Embo J* 16, 3866-76.
- CHEN, Y. G. & MASSAGUÉ, J. (1999). Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem* 274, 3672-7.
- DAVIS, G. E. & SENGER, D. R. (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97, 1093-107.
- DEL POZO, M. A., ALDERSON, N. B., KIOSSES, W. B., CHIANG, H. H., ANDERSON, R. G. & SCHWARTZ, M. A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 303, 839-42.
- DENNLER, S., ITOH, S., VIVIEN, D., TEN DIJKE, P., HUET, S. & 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, 3091-100.

- DERYNCK, R.,** AKHURST, R. J. & BALMAIN, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-29.
- DERYNCK, R.** & FENG, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1333, F105-50.
- DERYNCK, R.** & ZHANG, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-84.
- DIETZEN, D. J.,** HASTINGS, W. R. & LUBLIN, D. M. (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270, 6838-42.
- DÍEZ-MARQUÉS, L.,** ORTEGA-VELÁZQUEZ, R., LANGA, C., RODRÍGUEZ-BARBERO, A., LÓPEZ-NOVOA, J. M., LAMAS, S. & BERNABÉU, C. (2002). Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1587, 36-44.
- DIMRI, G. P.,** LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9363-7.
- DRAB, M.,** VERKADE, P., ELGER, M., KASPER, M., LOHN, M., LAUTERBACH, B., MENNE, J., LINDSCHAU, C., MENDE, F., LUFT, F. C., SCHEDL, A., HALLER, H. & KURZCHALIA, T. V. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-52.
- DUBOIS, C. M.,** LAPRISE, M. H., BLANCHETTE, F., GENTRY, L. E. & LEDUC, R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270, 10618-24.
- DUFF, S. E.,** LI, C., GARLAND, J. M. & KUMAR, S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 17, 984-92.
- EBNER, R.,** CHEN, R. H., LAWLER, S., ZIONCHECK, T. & DERYNCK, R. (1993). Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. *Science* 262, 900-2.
- EICKELBERG, O.,** CENTRELLA, M., REISS, M., KASHGARIAN, M. & WELLS, R. G. (2002). Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 277, 823-9.
- ELBASHIR, S. M.,** HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- EXPERT-BEZANÇON, A.,** SUREAU, A., DUROSAY, P., SALESSE, R., GROENEVELD, H., LECAER, J. P. & MARIE, J. (2004). hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta-tropomyosin exon 6B. *J Biol Chem* 279, 38249-59.
- FENG, X. H.** & DERYNCK, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 659-93.
- FENG, X. H.,** ZHANG, Y., WU, R. Y. & DERYNCK, R. (1998). The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev* 12, 2153-63.
- FERNÁNDEZ-L, A.,** SANZ-RODRÍGUEZ, F., BLANCO, F. J., BERNABÉU, C. & BOTELLA, L. M. (2006). Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, a Vascular Dysplasia Affecting the TGF- β Signaling Pathway. *Clin Med Res* 4, 66-78.
- FERNÁNDEZ-L, A.,** SANZ-RODRÍGUEZ, F., ZARRABEITIA, R., PÉREZ-MOLINO, A., HEBBEL, R. P., NGUYEN, J., BERNABÉU, C. & BOTELLA, L. M. (2005). Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* 68, 235-48.

- FERNÁNDEZ-RUIZ, E.,** ST-JACQUES, S., BELLÓN, T., LETARTE, M. & BERNABÉU, C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* 64, 204-7.
- FERRARA, N. & KERBEL, R. S.** (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-74.
- FOLKMAN, J., MERLER, E., ABERNATHY, C. & WILLIAMS, G.** (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133, 275-88.
- FRANZÉN, P., TEN DIJKE, P., ICHIJO, H., YAMASHITA, H., SCHULZ, P., HELDIN, C. H. & MIYAZONO, K.** (1993). Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 75, 681-92.
- FUCHIZAKI, U., MIYAMORI, H., KITAGAWA, S., KANEKO, S. & KOBAYASHI, K.** (2003). Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). *Lancet* 362, 1490-4.
- GALBIATI, F., RAZANI, B. & LISANTI, M. P.** (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106, 403-11.
- GARCÍA-CARDEÑA, G., MARTASEK, P., MASTERS, B. S., SKIDD, P. M., COUET, J., LI, S., LISANTI, M. P. & SESSA, W. C.** (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272, 25437-40.
- GILBOA, L., WELLS, R. G., LODISH, H. F. & HENIS, Y. I.** (1998). Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* 140, 767-77.
- GLENNEY, J. R., JR. & SOPPET, D.** (1992). Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10517-21.
- GOUGOS, A. & LETARTE, M.** (1988a). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141, 1925-33.
- GOUGOS, A. & LETARTE, M.** (1988b). Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141, 1934-40.
- GOUGOS, A. & LETARTE, M.** (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265, 8361-4.
- GOUGOS, A., ST JACQUES, S., GREAVES, A., O'CONNELL, P. J., D'APICE, A. J., BUHRING, H. J., BERNABÉU, C., VAN MOURIK, J. A. & 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, M. J., LEBRIN, F. & VALDIMARSDOTTIR, G.** (2003a). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 13, 301-7.
- GOUMANS, M. J., VALDIMARSDOTTIR, G., ITOH, S., LEBRIN, F., LARSSON, J., MUMMERY, C., KARLSSON, S. & TEN DIJKE, P.** (2003b). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell* 12, 817-28.
- GOUMANS, M. J., VALDIMARSDOTTIR, G., ITOH, S., ROSENDAHL, A., SIDERAS, P. & TEN DIJKE, P.** (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *Embo J* 21, 1743-53.
- GUERRERO-ESTEO, M., LASTRES, P., LETAMENDIA, A., PEREZ-ALVAREZ, M. J., LANGA, C., LOPEZ, L. A., FABRA, A., GARCIA-PARDO, A., VERA, S., LETARTE, M. & BERNABEU, C.** (1999). Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 78, 614-23.

- GUERRERO-ESTEO, M.**, SÁNCHEZ-ELSNER, T., LETAMENDÍA, A. & BERNABÉU, C. (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277, 29197-209.
- GUO, B.**, SLEVIN, M., LI, C., PARAMESHWAR, S., LIU, D., KUMAR, P., BERNABÉU, C. & KUMAR, S. (2004). CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res* 24, 1337-45.
- GUTTMACHER, A. E.**, MARCHUK, D. A. & WHITE, R. I., JR. (1995). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 333, 918-24.
- HANAHAH, D.** & FOLKMAN, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-64.
- HANES, F. M.** (1909). Multiple hereditary telangiectases causes hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 20, 63-73.
- HARBORTH, J.**, ELBASHIR, S. M., BECHERT, K., TUSCHL, T. & WEBER, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114, 4557-65.
- HART, P. J.**, DEEP, S., TAYLOR, A. B., SHU, Z., HINCK, C. S. & HINCK, A. P. (2002). Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain--TGF-beta3 complex. *Nat Struct Biol* 9, 203-8.
- HELDIN, C. H.**, MIYAZONO, K. & TEN DIJKE, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-71.
- HENIS, Y. I.**, MOUSTAKAS, A., LIN, H. Y. & LODISH, H. F. (1994). The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers. *J Cell Biol* 126, 139-54.
- HILL, C. S.** (2006). Turning off Smads: Identification of a Smad Phosphatase. *Dev Cell* 10, 412-3.
- HINCK, A. P.**, ARCHER, S. J., QIAN, S. W., ROBERTS, A. B., SPORN, M. B., WEATHERBEE, J. A., TSANG, M. L., LUCAS, R., ZHANG, B. L., WENKER, J. & TORCHIA, D. A. (1996). Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* 35, 8517-34.
- HIRSCHL, K. K.**, ROHOVSKY, S. A. & D'AMORE, P. A. (1998). PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 141, 805-14.
- HOCEVAR, B. A.**, BROWN, T. L. & HOWE, P. H. (1999). TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* 18, 1345-56.
- HUA, X.**, MILLER, Z. A., BENCHABANE, H., WRANA, J. L. & LODISH, H. F. (2000). Synergism between transcription factors TFE3 and Smad3 in transforming growth factor-beta-induced transcription of the Smad7 gene. *J Biol Chem* 275, 33205-8.
- HUSE, M.**, CHEN, Y. G., MASSAGUÉ, J. & KURIYAN, J. (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425-36.
- IMAMURA, T.**, TAKASE, M., NISHIHARA, A., OEDA, E., HANAI, J., KAWABATA, M. & MIYAZONO, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622-6.
- IZZI, L.** & ATTISANO, L. (2004). Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* 23, 2071-8.
- JAKOWLEW, S. B.**, DILLARD, P. J., WINOKUR, T. S., FLANDERS, K. C., SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. (1991). Expression of transforming growth factor-beta s 1-4 in chicken embryo chondrocytes and myocytes. *Dev Biol* 143, 135-48.

- JERKIC, M.**, RIVAS-ELENA, J. V., PRIETO, M., CARRON, R., SANZ-RODRIGUEZ, F., PEREZ-BARRIOCANAL, F., RODRIGUEZ-BARBERO, A., BERNABEU, C. & LOPEZ-NOVOA, J. M. (2004). Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* 18, 609-11.
- JERKIC, M.**, RODRÍGUEZ-BARBERO, A., PRIETO, M., TOPORSIAN, M., PERICACHO, M., RIVAS-ELENA, J. V., OBREO, J., WANG, A., PÉREZ-BARRIOCANAL, F., ARÉVALO, M., BERNABÉU, C., LETARTE, M. & LÓPEZ-NOVOA, J. M. (2006). Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 69, 845-54.
- JOHNSON, D. W.**, BERG, J. N., BALDWIN, M. A., GALLIONE, C. J., MARONDEL, I., YOON, S. J., STENZEL, T. T., SPEER, M., PERICAK-VANCE, M. A., DIAMOND, A., GUTTMACHER, A. E., JACKSON, C. E., ATTISANO, L., KUCHERLAPATI, R., PORTEOUS, M. E. & MARCHUK, D. A. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13, 189-95.
- JONSON, T.**, ALBRECHTSSON, E., AXELSON, J., HEIDENBLAD, M., GORUNOVA, L., JOHANSSON, B. & HOGLUND, M. (2001). Altered expression of TGFβ receptors and mitogenic effects of TGFβ in pancreatic carcinomas. *Int J Oncol* 19, 71-81.
- JOVINE, L.**, DARIE, C. C., LITSCHER, E. S. & WASSARMAN, P. M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* 74, 83-114.
- JOVINE, L.**, QI, H., WILLIAMS, Z., LITSCHER, E. & WASSARMAN, P. M. (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol* 4, 457-61.
- JU, H.**, ZOU, R., VENEMA, V. J. & VENEMA, R. C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272, 18522-5.
- KANG, Y.**, CHEN, C. R. & MASSAGUÉ, J. (2003). A self-enabling TGFβ response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11, 915-26.
- KLAGSBRUN, M.** & MOSES, M. A. (1999). Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 6, R217-24.
- KORCHYNSKYI, O.** & 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, 4883-91.
- KRAJEWSKA, W. M.** & MASLOWSKA, I. (2004). Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 9, 195-220.
- KRETSCHMER, A.**, MOEPERT, K., DAMES, S., STERNBERGER, M., KAUFMANN, J. & KLIPPEL, A. (2003). Differential regulation of TGF-β signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene* 22, 6748-63.
- KRETZSCHMAR, M.**, LIU, F., HATA, A., DOODY, J. & MASSAGUE, J. (1997). The TGF-β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11, 984-95.
- KUMAR, P.**, WANG, J. M. & BERNABÉU, C. (1996). CD 105 and angiogenesis. *J Pathol* 178, 363-6.
- LAGNA, G.**, HATA, A., HEMMATI-BRIVANLOU, A. & MASSAGUÉ, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-β signalling pathways. *Nature* 383, 832-6.
- LAMOUILLE, S.**, MALLET, C., FEIGE, J. J. & BAILLY, S. (2002). Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100, 4495-501.
- LASTRES, P.**, BELLÓN, T., CABAÑAS, C., SÁNCHEZ-MADRID, F., ACEVEDO, A., GOUGOS, A., LETARTE, M. & BERNABÉU, C. (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22, 393-7.

- LASTRES, P., LETAMENDÍA, A., ZHANG, H., RIUS, C., ALMENDRO, N., RAAB, U., LÓPEZ, L. A., LANGA, C., FABRA, A., LETARTE, M. & BERNABÉU, C. (1996).** Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 133, 1109-21.
- LEBRIN, F., DECKERS, M., BERTOLINO, P. & TEN DIJKE, P. (2005).** TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65, 599-608.
- LEBRIN, F., GOUMANS, M. J., JONKER, L., CARVALHO, R. L., VALDIMARSDOTTIR, G., THORIKAY, M., MUMMERY, C., ARTHUR, H. M. & TEN DIJKE, P. (2004).** Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J* 23, 4018-28.
- LETAMENDÍA, A., LASTRES, P., ALMENDRO, N., RAAB, U., BUHRING, H. J., KUMAR, S. & BERNABÉU, C. (1998a).** Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. *Int J Cancer* 76, 541-6.
- LETAMENDÍA, A., LASTRES, P., BOTELLA, L. M., RAAB, U., LANGA, C., VELASCO, B., ATTISANO, L. & BERNABÉU, C. (1998b).** Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 273, 33011-9.
- LI, C., GUO, B., BERNABÉU, C. & KUMAR, S. (2001).** Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech* 52, 437-49.
- LI, C., HAMPSON, I. N., HAMPSON, L., KUMAR, P., BERNABÉU, C. & KUMAR, S. (2000).** CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta on human vascular endothelial cells. *Faseb J* 14, 55-64.
- LI, C., ISSA, R., KUMAR, P., HAMPSON, I. N., LÓPEZ-NOVOA, J. M., BERNABÉU, C. & KUMAR, S. (2003).** CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* 116, 2677-85.
- LI, D. Y., SORENSEN, L. K., BROOKE, B. S., URNESS, L. D., DAVIS, E. C., TAYLOR, D. G., BOAK, B. B. & WENDEL, D. P. (1999).** Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-7.
- LI, L., REN, C. H., TAHIR, S. A., REN, C. & THOMPSON, T. C. (2003).** Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol* 23, 9389-404.
- LIN, H. Y., WANG, X. F., NG-EATON, E., WEINBERG, R. A. & LODISH, H. F. (1992).** Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68, 775-85.
- LIU, J., WANG, X. B., PARK, D. S. & LISANTI, M. P. (2002).** Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 277, 10661-8.
- LIU, X., NAGARAJAN, R. P., VALE, W. & CHEN, Y. (2002).** Phosphorylation regulation of the interaction between Smad7 and activin type I receptor. *FEBS Lett* 519, 93-8.
- LIU, Y., JOVANOVIC, B., PINS, M., LEE, C. & BERGAN, R. C. (2002).** Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* 21, 8272-81.
- LÓPEZ-CASILLAS, F., CHEIFETZ, S., DOODY, J., ANDRES, J. L., LANE, W. S. & MASSAGUÉ, J. (1991).** Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67, 785-95.
- LÓPEZ-CASILLAS, F., WRANA, J. L. & MASSAGUÉ, J. (1993).** Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73, 1435-44.
- LUO, K. & LODISH, H. F. (1996).** Signaling by chimeric erythropoietin-TGF-beta receptors: homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF-beta receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *Embo J* 15, 4485-96.

- LUO, K.** & **LODISH, H. F.** (1997). Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *Embo J* 16, 1970-81.
- LUTZ, M.** & **KNAUS, P.** (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* 14, 977-88.
- LUX, A.,** **ATTISANO, L.** & **MARCHUK, D. A.** (1999). Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem* 274, 9984-92.
- MA, X.,** **LABINAZ, M.,** **GOLDSTEIN, J.,** **MILLER, H.,** **KEON, W. J.,** **LETARTE, M.** & **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, 2546-52.
- MACÍAS-SILVA, M.,** **ABDOLLAH, S.,** **HOODLESS, P. A.,** **PIRONE, R.,** **ATTISANO, L.** & **WRANA, J. L.** (1996). MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87, 1215-24.
- MACÍAS-SILVA, M.,** **HOODLESS, P. A.,** **TANG, S. J.,** **BUCHWALD, M.** & **WRANA, J. L.** (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* 273, 25628-36.
- MAEDA, M.,** **SHINTANI, Y.,** **WHEELLOCK, M. J.** & **JOHNSON, K. R.** (2006). Src activation is not necessary for transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial to mesenchymal transitions (EMT) in mammary epithelial cells. PP1 directly inhibits TGF-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 281, 59-68.
- MARAZUELA, M.,** **SÁNCHEZ-MADRID, F.,** **ACEVEDO, A.,** **LARRAÑAGA, E.** & **DE LANDÁZURI, M. O.** (1995). Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol* 102, 328-34.
- MARCHUK, D. A.** & **LUX, A.** (2001). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. En *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, vol. IV (ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, B. Childs, K. W. Kinzler and B. Vogelstein), pp. 5419-5431. McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- MASSAGUÉ, J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-91.
- MASSAGUÉ, J.,** **SEOANE, J.** & **WOTTON, D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-810.
- MATLIN, A. J.,** **CLARK, F.** & **SMITH, C. W.** (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 386-98.
- MATSUBARA, S.,** **BOURDEAU, A.,** **TERBRUGGE, K. G.,** **WALLACE, C.** & **LETARTE, M.** (2000). Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke* 31, 2653-60.
- MATSUNO, F.,** **HARUTA, Y.,** **KONDO, M.,** **TSAL, H.,** **BARCOS, M.** & **SEON, B. K.** (1999). Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 5, 371-82.
- MATSUYAMA, S.,** **IWADATE, M.,** **KONDO, M.,** **SAITOH, M.,** **HANYU, A.,** **SHIMIZU, K.,** **ABURATANI, H.,** **MISHIMA, H. K.,** **IMAMURA, T.,** **MIYAZONO, K.** & **MIYAZAWA, K.** (2003). SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res* 63, 7791-8.
- MCALLISTER, K. A.,** **GROGG, K. M.,** **JOHNSON, D. W.,** **GALLIONE, C. J.,** **BALDWIN, M. A.,** **JACKSON, C. E.,** **HELMBOLD, E. A.,** **MARKEL, D. S.,** **MCKINNON, W. C.,** **MURRELL, J.** & **ET AL.** (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8, 345-51.

- McDONALD, M. T.,** PAPPENBERG, K. A., GHOSH, S., GLATFELTER, A. A., BIESECKER, B. B., HELMBOLD, E. A., MARKEL, D. S., ZOLOTOR, A., MCKINNON, W. C., VANDERSTOEP, J. L. & ET AL. (1994). A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet* 6, 197-204.
- MESHORER, E.,** BRYK, B., TOIBER, D., COHEN, J., PODOLY, E., DORI, A. & SOREQ, H. (2005). SC35 promotes sustainable stress-induced alternative splicing of neuronal acetylcholinesterase mRNA. *Mol Psychiatry* 10, 985-97.
- MILLER, D. W.,** GRAULICH, W., KARGES, B., STAHL, S., ERNST, M., RAMASWAMY, A., SEDLACEK, H. H., MULLER, R. & 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, 568-72.
- MINEO, C.,** YING, Y. S., CHAPLINE, C., JAKEN, S. & ANDERSON, R. G. (1998). Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J Cell Biol* 141, 601-10.
- MİYAZONO, K.,** ICHIJO, H. & HELDIN, C. H. (1993). Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* 8, 11-22.
- MİYAZONO, K.,** TEN DIJKE, P., ICHIJO, H. & HELDIN, C. H. (1994). Receptors for transforming growth factor-beta. *Adv Immunol* 55, 181-220.
- MO, J.,** FANG, S. J., CHEN, W. & BLOBE, G. C. (2002). Regulation of ALK-1 signaling by the nuclear receptor LXRbeta. *J Biol Chem* 277, 50788-94.
- MONIER, S.,** DIETZEN, D. J., HASTINGS, W. R., LUBLIN, D. M. & KURZCHALIA, T. V. (1996). Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett* 388, 143-9.
- MOUSTAKAS, A. & HELDIN, C. H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573-84.**
- MOUSTAKAS, A.,** SOUCHELNYTSKYI, S. & HELDIN, C. H. (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114, 4359-69.
- NAKAO, A.,** AFRAKHTE, M., MOREN, A., NAKAYAMA, T., CHRISTIAN, J. L., HEUCHEL, R., ITOH, S., KAWABATA, M., HELDIN, N. E., HELDIN, C. H. & TEN DIJKE, P. (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389, 631-5.
- NAKAYAMA, K.,** TAMURA, Y., SUZAWA, M., HARADA, S., FUKUMOTO, S., KATO, M., MIYAZONO, K., RODAN, G. A., TAKEUCHI, Y. & FUJITA, T. (2003). Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-Smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 18, 827-35.
- NAVARRO, A.,** ANAND-APTE, B. & PARAT, M. O. (2004). A role for caveolae in cell migration. *Faseb J* 18, 1801-11.
- NOHE, A.,** KEATING, E., UNDERHILL, T. M., KNAUS, P. & PETERSEN, N. O. (2005). Dynamics and interaction of caveolin-1 isoforms with BMP-receptors. *J Cell Sci* 118, 643-50.
- NYSTROM, F. H.,** CHEN, H., CONG, L. N., LI, Y. & QUON, M. J. (1999). Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 13, 2013-24.
- OBREO, J.,** DÍEZ-MARQUÉS, L., LAMAS, S., DUWELL, A., ELENO, N., BERNABÉU, C., PANDIELLA, A., LÓPEZ-NOVOA, J. M. & RODRÍGUEZ-BARBERO, A. (2004). Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* 14, 301-10.
- O'CONNELL, P. J.,** MCKENZIE, A., FISICARO, N., ROCKMAN, S. P., PEARSE, M. J. & D'APICE, A. J. (1992). Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 90, 154-9.

- OH, S. P., SEKI, T., GOSS, K. A., IMAMURA, T., YI, Y., DONAHOE, P. K., LI, L., MIYAZONO, K., TEN DIJKE, P., KIM, S. & LI, E. (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, 2626-31.
- OHTA, M., TOKUDA, Y., KUGE, S., OKUMURA, A., TANAKA, M., KUBOTA, M., TAJIMA, T., AKATSUKA, A., OSAMURA, R. Y., TAMAOKI, N. & MITOMI, T. (1997).** A case of angiosarcoma of the breast. *Jpn J Clin Oncol* 27, 91-4.
- OKA, N., YAMAMOTO, M., SCHWENCKE, C., KAWABE, J., EBINA, T., OHNO, S., COUET, J., LISANTI, M. P. & ISHIKAWA, Y. (1997).** Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem* 272, 33416-21.
- OTA, T., FUJII, M., SUGIZAKI, T., ISHII, M., MIYAZAWA, K., ABURATANI, H. & MIYAZONO, K. (2002).** Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 193, 299-318.
- PALADE, G. E. (1953).** Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.* 24, 1424.
- PARKER, W. L., GOLDRING, M. B. & 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.
- PELKMANS, L., BURLI, T., ZERIAL, M. & HELENIUS, A. (2004).** Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118, 767-80.
- PEPPER, M. S. (1997).** Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 21-43.
- PÉREZ-GÓMEZ, E., ELENO, N., LÓPEZ-NOVOA, J. M., RAMÍREZ, J. R., VELASCO, B., LETARTE, M., BERNABÉU, C. & QUINTANILLA, M. (2005).** Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 24, 4450-61.
- PICHUANES, S., VERA, S., BOURDEAU, A., PECE, N., KUMAR, S., WAYNER, E. A. & LETARTE, M. (1997).** Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens* 50, 265-76.
- PIEK, E., HELDIN, C. H. & TEN DIJKE, P. (1999).** Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13, 2105-24.
- PIKE, L. J. (2005).** Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* 1746, 260-73.
- QU, R., SILVER, M. M. & 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, 333-43.
- QUINTANILLA, M., RAMÍREZ, J. R., PÉREZ-GÓMEZ, E., ROMERO, D., VELASCO, B., LETARTE, M., LÓPEZ-NOVOA, J. M. & BERNABÉU, C. (2003).** Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 22, 5976-85.
- RAZANI, B., ENGELMAN, J. A., WANG, X. B., SCHUBERT, W., ZHANG, X. L., MARKS, C. B., MACALUSO, F., RUSSELL, R. G., LI, M., PESTELL, R. G., DI VIZIO, D., HOU, H., JR., KNEITZ, B., LAGAUD, G., CHRIST, G. J., EDELMANN, W. & LISANTI, M. P. (2001a).** Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276, 38121-38.
- RAZANI, B., SCHLEGEL, A., LIU, J. & LISANTI, M. P. (2001b).** Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* 29, 494-9.

- RAZANI, B.**, ZHANG, X. L., BITZER, M., VON GERSDORFF, G., BOTTINGER, E. P. & LISANTI, M. P. (2001c). Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem* 276, 6727-38.
- REGULY, T.** & WRANA, J. L. (2003). In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling. *Trends Cell Biol* 13, 216-20.
- ROBERTS, A. B.**, ANZANO, M. A., LAMB, L. C., SMITH, J. M. & SPORN, M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5339-43.
- ROBLEDO, M. M.**, HIDALGO, A., LASTRES, P., ARROYO, A. G., BERNABÉU, C., SÁNCHEZ-MADRID, F. & TEIXIDÓ, J. (1996). Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol* 93, 507-14.
- RODRÍGUEZ-BARBERO, A.**, OBREO, J., ELENO, N., RODRÍGUEZ-PEÑA, A., DUWEL, A., JERKIC, M., SANCHEZ-RODRÍGUEZ, A., BERNABÉU, C. & LÓPEZ-NOVOA, J. M. (2001). Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 142-7.
- ROELEN, B. A.**, VAN ROOIJEN, M. A. & MUMMERY, C. L. (1997). Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn* 209, 418-30.
- ROKHLIN, O. W.**, COHEN, M. B., KUBAGAWA, H., LETARTE, M. & COOPER, M. D. (1995). Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* 154, 4456-65.
- ROTHBERG, K. G.**, HEUSER, J. E., DONZELL, W. C., YING, Y. S., GLENNEY, J. R. & ANDERSON, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-82.
- RUZINOVA, M. B.** & BENEZRA, R. (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13, 410-8.
- SAHARINEN, J.**, HYYTIAINEN, M., TAIPALE, J. & KESKI-OJA, J. (1999). Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Rev* 10, 99-117.
- SÁNCHEZ-ELSNER, T.**, RAMÍREZ, J. R., SANZ-RODRÍGUEZ, F., VARELA, E., BERNABÉU, C. & BOTELLA, L. M. (2004). A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol* 336, 9-24.
- SANZ-RODRÍGUEZ, F.**, GUERRERO-ESTEO, M., BOTELLA, L. M., BANVILLE, D., VARY, C. P. & BERNABÉU, C. (2004). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 279, 32858-68.
- SATOMI, J.**, MOUNT, R. J., TOPORSIAN, M., PATERSON, A. D., WALLACE, M. C., HARRISON, R. V. & LETARTE, M. (2003). Cerebral vascular abnormalities in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke* 34, 783-9.
- SCHERER, P. E.**, LEWIS, R. Y., VOLONTE, D., ENGELMAN, J. A., GALBIATI, F., COUET, J., KOHTZ, D. S., VAN DONSELAAR, E., PETERS, P. & LISANTI, M. P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272, 29337-46.
- SCHERER, P. E.**, OKAMOTO, T., CHUN, M., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. & LISANTI, M. P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 131-5.

- SCHWARTZ, E. A., REAVEN, E., TOPPER, J. N. & TSAO, P. S. (2005).** Transforming growth factor-beta receptors localize to caveolae and regulate endothelial nitric oxide synthase in normal human endothelial cells. *Biochem J* 390, 199-206.
- SEKI, T., YUN, J. & OH, S. P. (2003).** Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res* 93, 682-9.
- SHI, Y. & MASSAGUÉ, J. (2003).** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- SHOVLIN, C. L., GUTTMACHER, A. E., BUSCARINI, E., FAUGHNAN, M. E., HYLAND, R. H., WESTERMANN, C. J., KJELSDEN, A. D. & PLAUCHU, H. (2000).** Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 91, 66-7.
- SHOVLIN, C. L., HUGHES, J. M., TUDDENHAM, E. G., TEMPERLEY, I., PEREMBELON, Y. F., SCOTT, J., SEIDMAN, C. E. & SEIDMAN, J. G. (1994).** A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nat Genet* 6, 205-9.
- SINGH, R. & VALCÁRCEL, J. (2005).** Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 645-53.
- SMART, E. J., GRAF, G. A., MCNIVEN, M. A., SESSA, W. C., ENGELMAN, J. A., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T. & LISANTI, M. P. (1999).** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19, 7289-304.
- SORENSEN, L. K., BROOKE, B. S., LI, D. Y. & URNESS, L. D. (2003).** Loss of distinct arterial and venous boundaries in mice lacking endoglin, a vascular-specific TGFbeta coreceptor. *Dev Biol* 261, 235-50.
- SOUCHELNITSKYI, S., TEN DIJKE, P., MIYAZONO, K. & HELDIN, C. H. (1996).** Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *Embo J* 15, 6231-40.
- SRINIVASAN, S., HANES, M. A., DICKENS, T., PORTEOUS, M. E., OH, S. P., HALE, L. P. & MARCHUK, D. A. (2003).** A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet* 12, 473-82.
- STAN, R. V. (2005).** Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1746, 334-48.
- STEFANSSON, S. & LAWRENCE, D. A. (1996).** The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383, 441-3.
- STEFANSSON, S., PETITCLERC, E., WONG, M. K. K., MCMAHON, G. A., BROOKS, P. C. & LAWRENCE, D. A. (2001).** Inhibition of Angiogenesis in Vivo by Plasminogen Activator Inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* 276, 8135-8141.
- ST-JACQUES, S., CYMERMAN, U., PECE, N. & 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, 2645-57.
- ST-JACQUES, S., FORTE, M., LYE, S. J. & 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, 405-13.
- TANG, Z., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., SONG, K., CHU, C., KOHTZ, D. S., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. & LISANTI, M. P. (1996).** Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271, 2255-61.
- TEN DIJKE, P., GOUMANS, M. J., ITOH, F. & ITOH, S. (2002).** Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191, 1-16.

- TEN DIJKE, P., ICHIJO, H., FRANZEN, P., SCHULZ, P., SARAS, J., TOYOSHIMA, H., HELDIN, C. H. & MIYAZONO, K. (1993). Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8, 2879-87.
- TEN DIJKE, P., MIYAZONO, K. & HELDIN, C. H. (1996). Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 8, 139-45.
- TEN DIJKE, P., YAMASHITA, H., ICHIJO, H., FRANZÉN, P., LAIHO, M., MIYAZONO, K. & HELDIN, C. H. (1994). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* 264, 101-4.
- THORPE, P. E. & BURROWS, F. J. (1995). Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 36, 237-51.
- TOPORSIAN, M., GROS, R., KABIR, M. G., VERA, S., GOVINDARAJU, K., EIDELMAN, D. H., HUSAIN, M. & LETARTE, M. (2005). A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96, 684-92.
- TORSNEY, E., CHARLTON, R., DIAMOND, A. G., BURN, J., SOAMES, J. V. & ARTHUR, H. M. (2003). Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation* 107, 1653-7.
- TOURNAY, O. & BENEZRA, R. (1996). Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol* 16, 2418-30.
- TSUKAZAKI, T., CHIANG, T. A., DAVISON, A. F., ATTISANO, L. & WRANA, J. L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779-91.
- URNESS, L. D., SORENSEN, L. K. & LI, D. Y. (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* 26, 328-31.
- VALDIMARSDOTTIR, G., GOUMANS, M. J., ITOH, F., ITOH, S., HELDIN, C. H. & 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.
- VALDIMARSDOTTIR, G., GOUMANS, M. J., ROSENDAHL, A., BRUGMAN, M., ITOH, S., LEBRIN, F., SIDERAS, P. & TEN DIJKE, P. (2002). Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106, 2263-70.
- VAN DE KERKHOF, P. C., RULO, H. F., VAN PELT, J. P., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I. M. & DE JONG, E. M. (1998). Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* 78, 19-21.
- VAN ZONNEVELD, A. J., CURRIDEN, S. A. & LOSKUTOFF, D. J. (1988). Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5525-9.
- VELASCO, B., RAMÍREZ, J. R., RELLOSO, M., LI, C., KUMAR, S., LÓPEZ-BOTE, J. P., PÉREZ-BARRIOCANAL, F., LÓPEZ-NOVOA, J. M., COWAN, P. J., D'APICE, A. J. & BERNABÉU, C. (2001). Vascular gene transfer driven by endoglin and ICAM-2 endothelial-specific promoters. *Gene Ther* 8, 897-904.
- VEMPATI, U. D. & KONDAIAH, P. (1998). Molecular organization of the gene encoding *Xenopus laevis* transforming growth factor-beta 5. *Biochem Mol Biol Int* 45, 997-1003.
- WALLACE, G. M. & SHOVLIN, C. L. (2000). A hereditary haemorrhagic telangiectasia family with pulmonary involvement is unlinked to the known HHT genes, endoglin and ALK-1. *Thorax* 55, 685-90.

- WANG, E., HUANG, Z., HOBSON, G. M., DIMOVA, N., SPERLE, K., McCULLOUGH, A. & CAMBI, F. (2006). PLP1 alternative splicing in differentiating oligodendrocytes: characterization of an exonic splicing enhancer. *J Cell Biochem* 97, 999-1016.
- WANG, H. Y., XU, X., DING, J. H., BERMINGHAM, J. R., JR. & FU, X. D. (2001). SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45. *Mol Cell* 7, 331-42.
- WANG, J. M., KUMAR, S., PYE, D., HABOUBI, N. & AL-NAKIB, L. (1994). Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86, 386-8.
- WANG, J. M., KUMAR, S., VAN AGTHOVEN, A., KUMAR, P., PYE, D. & HUNTER, R. D. (1995). Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells. *Int J Cancer* 62, 791-6.
- WANG, T., LI, B. Y., DANIELSON, P. D., SHAH, P. C., ROCKWELL, S., LECHLEIDER, R. J., MARTIN, J., MANGANARO, T. & DONAHOE, P. K. (1996). The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86, 435-44.
- WANG, X. F., LIN, H. Y., NG-EATON, E., DOWNWARD, J., LODISH, H. F. & WEINBERG, R. A. (1991). Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 67, 797-805.
- WEIS-GARCÍA, F. & MASSAGUÉ, J. (1996). Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF-beta receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling. *Embo J* 15, 276-89.
- WELLS, R. G., GILBOA, L., SUN, Y., LIU, X., HENIS, Y. I. & LODISH, H. F. (1999). Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/Type II receptor complex in live cells. *J Biol Chem* 274, 5716-22.
- WESTPHAL, J. R., WILLEMS, H. W., SCHALKWIJK, C. J., RUITER, D. J. & DE WAAL, R. M. (1993). A new 180-kDa dermal endothelial cell activation antigen: in vitro and in situ characteristics. *J Invest Dermatol* 100, 27-34.
- WIESER, R., WRANA, J. L. & MASSAGUÉ, 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, 2199-208.
- WILSON, I. A., NIMAN, H. L., HOUGHTEN, R. A., CHERENSON, A. R., CONNOLLY, M. L. & LERNER, R. A. (1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37, 767-78.
- WONG, S. H., HAMEL, L., CHEVALIER, S. & PHILIP, A. (2000). Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur J Biochem* 267, 5550-60.
- WOODMAN, S. E., ASHTON, A. W., SCHUBERT, W., LEE, H., WILLIAMS, T. M., MEDINA, F. A., WYCKOFF, J. B., COMBS, T. P. & LISANTI, M. P. (2003). Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *Am J Pathol* 162, 2059-68.
- WRANA, J. L. (2000). Regulation of Smad activity. *Cell* 100, 189-92.
- WRANA, J. L., ATTISANO, L., CARCAMO, J., ZENTELLA, A., DOODY, J., LAIHO, M., WANG, X. F. & MASSAGUÉ, J. (1992). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003-14.
- WU, J. W., HU, M., CHAI, J., SEOANE, J., HUSE, M., LI, C., RIGOTTI, D. J., KYIN, S., MUIR, T. W., FAIRMAN, R., MASSAGUÉ, J. & SHI, Y. (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 8, 1277-89.
- WU, X., MA, J., HAN, J. D., WANG, N. & CHEN, Y. G. (2006). Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc Res*.

- XIAO, Z., LIU, X. & LODISH, H. F. (2000).** Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* 275, 23425-8.
- XU, L., ALARCÓN, C., COL, S. & MASSAGUÉ, J. (2003).** Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J Biol Chem* 278, 42569-77.
- YAMADA, E. (1955).** The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 445-58.
- YAMAMOTO, M., TOYA, Y., SCHWENCKE, C., LISANTI, M. P., MYERS, M. G., JR. & ISHIKAWA, Y. (1998).** Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 273, 26962-8.
- YAMASHITA, H., ICHIJO, H., GRIMSBY, S., MOREN, A., TEN DIJKE, P. & 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. & HELDIN, C. H. (1994b).** Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269, 20172-8.
- ZHANG, H., SHAW, A. R., MAK, A. & LETARTE, M. (1996a).** Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol* 156, 564-73.
- ZHANG, Y., FENG, X., WE, R. & DERYNCK, R. (1996b).** Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 383, 168-72.
- ZHANG, Y., FENG, X. H. & DERYNCK, R. (1998).** Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394, 909-13.
- ZWIJSEN, A., VAN GRUNSVEN, L. A., BOSMAN, E. A., COLLART, C., NELLES, L., UMANS, L., VAN DE PUTTE, T., WUYTENS, G., HUYLEBROECK, D. & VERSCHUEREN, K. (2001).** Transforming growth factor beta signalling in vitro and in vivo: activin ligand-receptor interaction, Smad5 in vasculogenesis, and repression of target genes by the deltaEF1/ZEB-related SIP1 in the vertebrate embryo. *Mol Cell Endocrinol* 180, 13-24.

Las investigaciones de esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. BLANCO, F. J., SANTIBÁÑEZ, J. F., GUERRERO-ESTEO, M., LANGA, C., VARY, C. P. & BERNABÉU, 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, 574-84.
2. FERNÁNDEZ-L, A., SANZ-RODRÍGUEZ, F., BLANCO, F. J., BERNABÉU, C. & BOTELLA, L. M. (2006). Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, a Vascular Dysplasia Affecting the TGF-beta Signaling Pathway. *Clin Med Res* 4, 66-78.
3. LLORCA, O., TRUJILLO, A., BLANCO, F.J. & BERNABÉU, C. 3D structure of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. En preparación.
4. BLANCO, F.J., LANGA, C., LÓPEZ-NOVOA, J.M., QUINTANILLA, M. & BERNABÉU, C. S-endoglin antagonizes L-endoglin regulation of the ALK-5/ALK-1 TGF-beta signalling pathway. En preparación.
5. SANTIBÁÑEZ, J. F., BLANCO, F. J. & BERNABÉU, C. Caveolin-1 interacts and cooperates with the TGF-beta type I receptor ALK-1 in endothelial cell caveolae. En preparación.