

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTOS DEL TGF-BETA EN CÉLULAS MONOCÍTICAS:
REGULACIÓN FUNCIONAL DE LAS GLICOPROTEÍNAS
PECAM-1 (CD31) Y ENDOGLINA (CD105)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pedro Lastres Varo

Bajo la dirección del doctor

Carmelo Bernabeu Quirante

Madrid, 1995

ISBN: 84-669-1342-4

**EFFECTOS DEL TGF- β EN CELULAS MONOCITICAS: REGULACION
FUNCIONAL DE LAS GLICOPROTEINAS PECAM-1 (CD31) Y
ENDOGLINA (CD105)**



* 5 3 0 9 5 3 9 6 6 6 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Memoria presentada por
Pedro Lastres Varo
para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas

Universidad Complutense de Madrid

1995

El Autor:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pedro Lastres Varo', written over a horizontal line.

Fdo: **Pedro Lastres Varo**

El Director:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dr. Carmelo Bernabeu Quirante', written over a horizontal line.

Fdo: **Dr. Carmelo Bernabeu Quirante**
Investigador Científico
Centro de Investigaciones Biológicas
(C.S.I.C.)

*A mis padres y hermanas,
Carmen y Miguel*

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de alguna manera, han hecho posible la realización de esta tesis doctoral:

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio por su ayuda y amistad, en particular Carmen Langa, sin sus manos y paciencia, muchos de los ensayos presentados en esta memoria no tendrían el mismo aspecto.

A todos y cada uno de mis compañeros de los servicios generales del C.I.B., su colaboración en diferentes tareas han permitido “la llegada a puerto”.

Una referencia especial para Carmelo Bernabeu, por su carácter moderado, necesario en muchas ocasiones e invitando a la reflexión, pero al mismo tiempo “dejando hacer”. Serán inolvidables las muchas horas de paciente, creativa y tolerante discusión científica con él.

Gracias a las diferentes direcciones del C.I.B., por permitirme compaginar mis obligaciones en el Servicio de Citometría de Flujo con la realización de esta tesis.

ADNc	Acido Desoxirribonucleico complementario
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ARNr	Acido Ribonucleico ribosómico
A.E.	Actividad Específica
Am(s)	Anticuerpo(s) monoclonal(es)
Aps	Anticuerpos policlonales
D.E.	Desviación Estándar
DSS	disuccinimidil suberato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
EGTA	Acido etilen glicol (aminoetil eter) tetraacético
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
H-7	1-(5-isoquinoleinsulfonil)-2-metil-piperazina
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular 1
IL-3	Interleucina 3
kb	kilobases de Acido Desoxirribonucleico o Acido Ribonucleico
kDa	kilodaltons
LFA-1	Antígeno Leucocitario Asociado a Función 1
M-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos
PECAM-1	Molécula de Adhesión de Plaquetas y Endotelio 1
PMA	Ester de Forbol miristato acetato
TGF- α	Factor Transformante de Crecimiento- α
TGF- β	Factor Transformante de Crecimiento- β
(3 H)-TIM	Timidina tritiada
VLA	Familia de antígenos de la superfamilia de las Integrinas con cadena común β_1

	<u>página</u>
1 Introducción	
1.1 El factor TGF- β	2
1.2 La superfamilia del TGF- β	5
1.3 Efectos biológicos del TGF- β	7
1.3.1 Efectos sobre la proliferación y diferenciación celular.....	7
1.3.2 Efectos sobre la síntesis de componentes de la matriz extracelular y sus receptores.....	9
1.3.3 Efectos sobre precursores hematopoyéticos.....	9
1.3.4 Efectos sobre linfocitos.....	10
1.3.5 Efectos sobre monocitos/macrófagos.....	10
1.3.6 Citoquinas y sus receptores.....	10
1.3.7 Efectos <i>in vivo</i> del TGF- β	11
1.4 Receptores de membrana y otras proteínas que unen TGF- β	12
1.4.1 Receptores tipo I y II.....	14
1.4.2 Receptor tipo III (Betaglicano).....	15
1.5 Mecanismo de señalización y papel de sus tres receptores principales.....	17
1.6 Señales intracelulares inducidas por el TGF- β	22
1.7 Endogлина.....	26
1.8 Caracterización bioquímica y clonaje molecular.....	27
1.9 Endogлина es un receptor del TGF- β	28
1.10 Relevancia fisiológica de la presencia de endogлина en membrana.....	30
1.11 PECAM-1.....	31
1.12 Estructura de PECAM-1.....	31
1.13 Organización genómica y formas alternativas de PECAM-1.....	32
1.14 Distribución celular de PECAM-1.....	34
1.15 Aspectos funcionales de PECAM-1.....	35
1.16 Aspectos fisiológicos que implican la función de PECAM-1.....	37
1.16.1 Inflamación e interacción entre células endoteliales y leucocitos.....	37
1.16.2 Angiogénesis y desarrollo cardiovascular.....	38

2 Objetivos	40
3 Materiales y métodos	
3.1 Soluciones y reactivos.....	42
3.1.1 Soluciones.....	42
3.1.2 Reactivos.....	43
3.2 Material de cultivo celular.....	43
3.3 Células.....	44
3.4 Anticuerpos.....	46
3.5 Inmunohistoquímica.....	48
3.6 Marcaje de superficie.....	48
3.7 Inmunoprecipitación.....	48
3.8 Análisis del ARN.....	49
3.9 Electroforesis de proteínas.....	50
3.10 Electroforesis de ARN.....	50
3.11 Citometría de flujo.....	51
3.12 Generación de transfectantes.....	51
3.13 Ensayos de proliferación celular.....	53
3.14 Ensayos de adhesión célula-célula.....	53
3.15 Ensayos de adhesión célula-sustrato extracelular.....	54
3.16 Síntesis de oligonucleótidos anti-sentido.....	55
3.17 Marcajes metabólicos con (³⁵ S)-Met/Cys.....	55
3.18 Marcajes metabólicos con (³² P)-Ortofosfato.....	56
3.19 Análisis de fosfopéptidos.....	57
3.20 Análisis de fosfoaminoácidos.....	57
3.21 Transferencia de proteínas e inmunodetección.....	57
3.22 Ensayos de asociación de proteínas de membrana al citoesqueleto.....	58
3.23 Determinación de actividad PKC.....	59
3.24 Ensayos de marcaje de afinidad de los receptores del TGF-β.....	60
3.25 Ensayos de degradación de (¹²⁵ I)-TGF-β.....	61
4 Resultados	
4.1 Efecto del TGF-β en proliferación celular, agregación y fenotipo de las células U937.....	64

4.2 Implicación de PECAM-1 en las agregaciones homotípicas inducidas por TGF- β	66
4.3 Vías de señalización implicadas en las adhesiones inducidas por TGF- β	67
4.4 Endoglina está presente en la membrana de los macrófagos.....	74
4.5 La diferenciación de líneas monocíticas conlleva el aumento de expresión de endoglina.....	79
4.6 Caracterización de dos formas de endoglina.....	80
4.7 Endoglina es una fosfoproteína.....	82
4.8 Efecto del TGF- β sobre la fosforilación de endoglina.....	84
4.9 TGF- β regula la expresión de endoglina en células monocíticas.....	87
4.10 Análisis del papel de endoglina en la señalización del TGF- β	94
4.11 La sobreexpresión de endoglina no aumenta la degradación del TGF- β	99
4.12 Endoglina facilita la unión del TGF- β a sus receptores señalizadores.....	100
4.13 Endoglina necesita la presencia del receptor II para unir el TGF- β	102
5 Discusión	
5.1 Regulación funcional de PECAM-1 por el TGF- β	106
5.2 Regulación de la expresión y fosforilación de endoglina.....	111
5.3 Papel de endoglina en las respuestas celulares mediadas por el TGF- β	115
6 Conclusiones	123
7 Referencias	126
8 Anexo	157

1.- Introducción

1.1 El factor TGF- β

El factor TGF- β (Transforming Growth Factor- β) fue originalmente descubierto junto al TGF- α como uno de los componentes activos producidos por células transformadas con retrovirus, debido a su capacidad de promover el crecimiento de fibroblastos de forma independiente de la adhesión celular al sustrato. A pesar de compartir la misma nomenclatura, TGF- β y TGF- α , corresponden a dos moléculas distintas perteneciendo a dos grupos no relacionados de familias polipeptídicas con efectos biológicos muy diferentes. Al contrario que el TGF- α , el cual se relaciona estructuralmente con el EGF (Epidermal Growth Factor), TGF- β constituye junto con otros factores análogos una superfamilia diferente de factores.

El TGF- β fue inicialmente purificado de plaquetas humanas como un homodímero de 25 kDa. de peso molecular, por su capacidad de promover el crecimiento de fibroblastos de rata sobre agar (Assoian *et al.* 1983). Sin embargo, con posterioridad se demostró que este factor tiene la capacidad de ser un potente inhibidor del crecimiento de muchos tipos celulares (Moses *et al.* 1985) y que es un factor multifuncional producido por muchas células entre las que se incluyen endoteliales, musculares lisas, megacariocitos, linfocitos y monocitos activados (datos revisados se encuentran en Roberts y Sporn, 1990; Massagué 1990; Moses *et al.* 1990; Nilsen-Hamilton 1990; Miyazono *et al.* 1994). Entre los efectos biológicos que esta citoquina es capaz de inducir en las células se encuentran la regulación del crecimiento, diferenciación, adhesión y migración, la estimulación de la síntesis y deposición de componentes de la matriz extracelular, así como la regulación de muchas de las respuestas inflamatorias y de los componentes celulares del sistema inmune. Además, al TGF- β se le atribuye un importante papel *in vivo* en procesos tales como la reparación y remodelación tisular, y la morfogénesis durante el desarrollo embrionario (Roberts y Sporn 1990).

En mamíferos han sido identificadas tres isoformas del TGF- β , conocidas como TGF- β 1 (Derynck *et al.* 1985), TGF- β 2 (de Martin *et al.* 1987) y TGF- β 3 (ten Dijke *et al.* 1988; Derynck *et al.* 1988), siendo sus efectos biológicos muy similares pero no idénticos, tanto *in vitro* (Otha *et al.* 1987; Cheifetz *et al.* 1990) como *in vivo* (Joyce *et al.* 1990). La existencia de heterodímeros también ha sido demostrada en cierto tipos celulares, por ejemplo TGF- β 1.2 en plaquetas porcinas (Cheifetz *et al.* 1987) y tanto TGF- β 1.2 como TGF- β 2.3 en hueso bovino (Ogawa *et al.* 1992). Sin embargo, los niveles tan relativamente bajos encontrados de estas isoformas sugieren que en realidad correspondan a errores de procesamiento durante la

maduración de la proteína (Segarini 1993). Otras dos isoformas, denominadas $\beta 4$ y $\beta 5$ han sido también identificadas en pollo y *Xenopus* (Jakowlen *et al.* 1988a,b; Kondaiah *et al.* 1990) respectivamente. Cada una de las isoformas es sintetizada como un precursor proteico glicosilado formado por aproximadamente 400 residuos, el cual es proteolíticamente procesado en el interior de las células dando lugar a un péptido maduro de 112 residuos correspondiente al extremo C-terminal. Las formas maduras de las tres isoformas humanas comparten un 70-80% de homología de secuencia con una conservación muy estricta de nueve residuos de cisteína; a su vez, cada una mantiene un alto grado de conservación a lo largo de la evolución (Derynck *et al.* 1986; Miller *et al.* 1989a,b). Cada isoforma está bajo el control de su propio promotor (Roberts *et al.* 1991) y sus expresiones son estrictamente reguladas en los diferentes tejidos, como por ejemplo en el desarrollo cardíaco o en el desarrollo de los tejidos del paladar (Millan *et al.* 1991; Pelton *et al.* 1991).

Los efectos biológicos del TGF- β se encuentran muy controlados. Las tres isoformas son secretadas por las células en un complejo latente, sin actividad biológica, y que es capaz de activarse mediante digestión con plasmina y catepsina D, mediante tratamiento a pH bajo o alta temperatura (Pircher *et al.* 1984; Wakefield *et al.* 1987; Braun *et al.* 1990). Antes de que se produzca la unión a sus receptores de membrana el TGF- β debe ser activado liberándose de dicho complejo (Fig. 1). En el complejo latente, la forma madura de la citoquina se encuentra no covalentemente asociada con el péptido correspondiente al extremo N-terminal de su forma precursora; como esta asociación corresponde a TGF- β todavía en forma latente, dicho péptido ha sido designado como LAP (Latent Associated Peptide), (Gentry *et al.* 1987). En plaquetas humanas la forma latente del TGF- $\beta 1$ incluye un componente adicional, conocido como LTBP (Latent TGF- β Binding Protein) (Miyazono *et al.* 1988; Wakefield *et al.* 1988; Okada *et al.* 1989; Kanzaki *et al.* 1990; Tsuji *et al.* 1990). Aunque todavía no se conoce el mecanismo exacto de activación del TGF- β *in vivo*, se ha propuesto que ocurra a través de la degradación enzimática del LAP (Miyazono y Heldin 1991). La posible función del LTBP ha sido estudiada en experimentos de cultivos mixtos de células endoteliales y musculares lisas. En este modelo el TGF- β producido por dichas células sólo es activable en presencia de ambos tipos celulares (Sato y Rifkin 1989). En dicho sistema se ha reportado además, que el LTBP interacciona con un receptor de membrana en la célula muscular que parece fundamental para la activación de la forma latente del factor (Flaumenhaft *et al.* 1993).

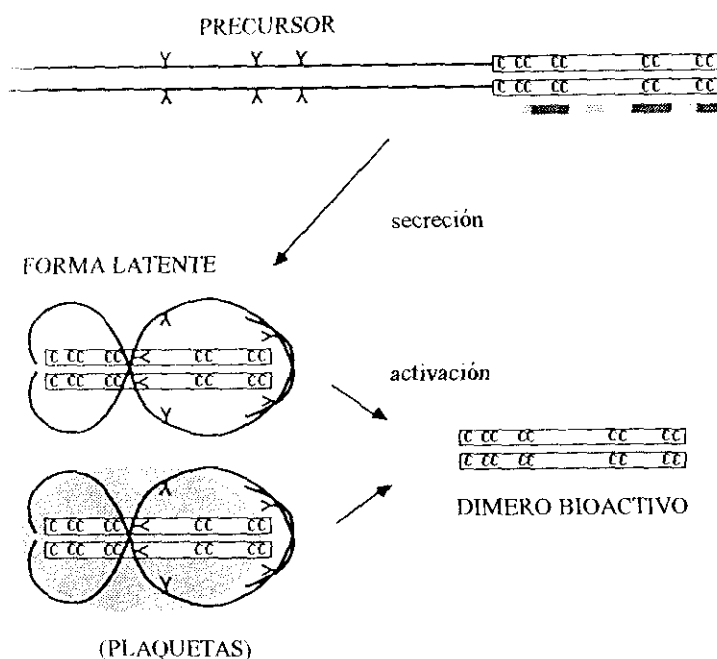


Fig. 1 Precursor, forma latente y forma bioactiva del TGF- β 1. El precursor del TGF- β 1 está formado por una secuencia señal en el extremo N-terminal (línea fina), una pro-región (línea de trazo grueso) y el dominio bioactivo en el extremo C-terminal (representado mediante rectángulos). En este esquema se representa la localización de los tres sitios de N-glicosilación mediante el símbolo (Y) así como los nueve residuos de cisteína (C), en el dominio bioactivo. El grado de intensidad en gris, bajo dicho dominio, representa el grado de homología con otros miembros de la superfamilia del TGF- β . Tras ser secretada, la pro-región previamente liberada, permanece asociada de forma no covalente al dímero que forma la molécula biológicamente activa en el complejo latente. En plaquetas y otros tipos celulares, en el complejo latente se encuentra otra glicoproteína de peso 180 kDa, LTBP, de función no del todo conocida en la actualidad (en la figura se representa en sombreado). La forma bioactiva del TGF- β 1 debe ser liberada de este complejo antes de mediar sus efectos sobre la superficie celular (Massagué J. 1990. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:597-641)

Una vez liberado del complejo latente, el TGF- β 1 activo puede ser unido por varias proteínas del suero y componentes de la matriz extracelular. El aclaramiento del TGF- β activo circulante es muy rápido (Coffey *et al.* 1987), encontrándose la unión a α 2-macroglobulina implicada en dicho proceso (O'Connor-McCourt y Wakefield 1987). Además el TGF- β se acumula en las matrices intersticiales mediante interacciones de baja afinidad con varios componentes, lo que podría suponer tanto un mecanismo de protección frente a la degradación, como una forma de almacenamiento de la citoquina (Thomson *et al.* 1989). Sus efectos sobre las células son mediados por una serie de receptores específicos de membrana que serán descritos con más detalle en la sección 1.4

1.2 La superfamilia del TGF- β

El TGF- β constituye un miembro prototípico de una superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación, que se encuentran presentes en una amplísima variedad de organismos desde los insectos hasta los humanos (Massagué 1990; Roberts y Sporn 1990). Utilizando criterios estructurales y de función biológica los miembros de esta superfamilia pueden ser subdivididos en tres grupos principales: el grupo de los TGF- β s, el grupo de las activinas e inhibinas y el grupo de las proteínas morfogénicas del hueso BMPs (también conocidas como DVRs). Además, existen varios miembros, con una relación más distante tales como la sustancia inhibidora mulleriana (Fig. 2).

Las activinas e inhibinas fueron originalmente identificadas por su capacidad para regular la secreción de la hormona foliculo estimulante (FSH) de la pituitaria. Además, han sido implicadas en procesos de diferenciación eritroide en mamíferos (Vale *et al.* 1990), así como en el desarrollo del mesodermo en *Xenopus* (revisado en Smith 1993). Actualmente se les asigna un papel *in vivo* muy relacionado con el desarrollo embrionario; sin embargo, existen resultados discrepantes respecto al papel que efectivamente puedan desempeñar en diferentes organismos. Así, ratones defectivos tanto en la expresión de activinas o de sus receptores no tienen alterado el desarrollo de los tejidos mesodérmicos (Matzuk *et al.* 1995a,b), al contrario de lo que ocurre en vertebrados inferiores como *Xenopus* (Hemmati-Brivanlou y Melton 1992). Por otra parte, la pérdida de expresión de folistatina, una proteína capaz de unir activina y antagonista de sus efectos *in vitro*, conduce a grandes anomalías durante el desarrollo y la muerte de los ratones transgénicos tras pocas horas del nacimiento (Matzuk *et al.* 1995c).

La familia de péptidos morfogénicos del hueso (BMP/DVR) es el grupo más numeroso y heterogéneo de esta superfamilia. Muchos de sus miembros han sido identificados por su capacidad para actuar sobre la morfogénesis del hueso y durante el desarrollo embrionario temprano (Lyons *et al.* 1991; Rosen y Thies 1991). Junto a su actividad morfogénica sobre el desarrollo esquelético (Wozney *et al.* 1988; Kingsley *et al.* 1992), las BMPs también actúan como factores neurotrópicos (Paralkar *et al.* 1992), como factores de regulación durante el desarrollo del primordio límbico del pollo (Niswander y Martin 1993), promoviendo la diferenciación o migración de las células de la cresta neural (Basler *et al.* 1993), inhibiendo la diferenciación miogénica (Yamaguchi *et al.* 1991) y jugando un papel importante en la formación del mesodermo (Smith 1993). Los homólogos de las BMPs en *Drosophila*, los factores decapentaplégico (ddp) y 60A, están implicados en procesos que regulan la

especificación del linaje celular durante el desarrollo (Padgett *et al.* 1987; Wharton *et al.* 1991; Doctor *et al.* 1992; Ferguson *et al.* 1992). Por último, la sustancia inhibidora mulleriana puede inducir la regresión del primordio genital femenino y el conducto mulleriano en embriones machos de mamíferos (Cate *et al.* 1986).

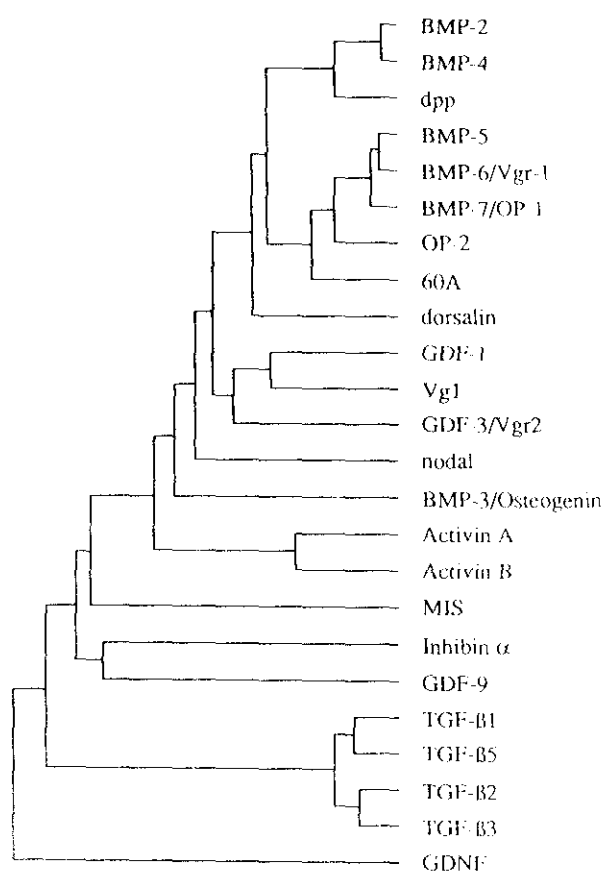


Fig. 2 Arbol de relación entre los miembros de la superfamilia del TGF- β . La relación entre los miembros está realizada según las secuencias de las formas maduras de las proteínas comenzando por el primer residuo de cisteína conservado. Todos los factores representados son humanos excepto dpp y 60A de *Drosophila*, TGF- β 5 y Vg1 que son de *Xenopus*, dorsalina correspondiente a pollo, y nodal, GDF-3/Vgr-2 y GDF-9 correspondientes a ratón (Altisano *et al.* 1994, *Biochim. et. Biophys. Acta* 1222:71-80)

De todos los miembros de esta superfamilia los TGF- β s son los mejor caracterizados tanto desde el punto de vista estructural como funcional. La estructura tridimensional del TGF- β 2 ha sido determinada recientemente mediante cristalografía de rayos-X (Daopin *et al* 1992; Schlunegger y Grutter 1992), así como la estructura en solución del TGF- β 1 mediante Resonancia Magnética Nuclear (Archer *et al.* 1993). En ambos casos se ha confirmado la importancia estructural de nueve residuos de cisteína presentes en cada monómero que además se encuentran conservados en todas las isoformas de la citoquina. En el caso del TGF- β 2 se ha demostrado que cada cadena está formada por dos pares de láminas β antiparalelas y tres hélices α (Fig. 3). De los nueve residuos de cisteína, ocho participan en la formación de puentes intracatenarios y el otro restante (Cys-77) forma un puente intercatenario estabilizando el dímero. La estructura tridimensional que adopta cada monómero no es globular; la forma que mejor la define es la de “una mano abierta”, de tal forma que los puentes de hidrógeno y los enlaces disulfuro intracatenarios formarían la zona correspondiente a la palma de la mano. En la forma dimérica, las dos manos se superponen en posición invertida, de tal manera que los dedos de una estarían en contacto con la palma de la otra, y en la zona central quedarían los residuos hidrofóbicos. Los datos de secuencia del TGF- β 1 encajan con el armazón estructural definido por el TGF- β 2 sin producir grandes “distorsiones”, por ello es asumible una estructura tridimensional muy parecida.

La mayoría de la funciones biológicas son comunes a las tres isoformas, sin embargo existen algunas diferencias: TGF- β 1 y β 3 ejercen sus actividades a concentraciones 100 veces inferiores a la forma β 2 en algunos tipos celulares, como por ejemplo el endotelio (Jennings *et al.* 1988; Cheifetz *et al.* 1990). Los estudios realizados con moléculas quiméricas de las isoformas β 1 y β 2 han demostrado que las diferencias de respuesta de las células endoteliales a ambas isoformas puede ser asignada a la secuencia comprendida entre los residuos 40-82 (Qian *et al.* 1992). En esta región existen 14 aminoácidos diferentes entre la formas β 1 y β 2, la mayoría de los cuales están localizados en la superficie de la molécula según se desprende de la estructura tridimensional del TGF- β 2. Por lo tanto es posible que la zona de interacción con los receptores de membrana y otras proteínas que unen el factor se localice en dicha zona.

1.3 Efectos biológicos del TGF- β

1.3.1 Efectos sobre la proliferación y diferenciación celular

Las actividades biológicas mediadas por el TGF- β son frecuentemente de tipo bidireccional (Roberts and Sporn 1990). El TGF- β estimula el crecimiento de ciertas células

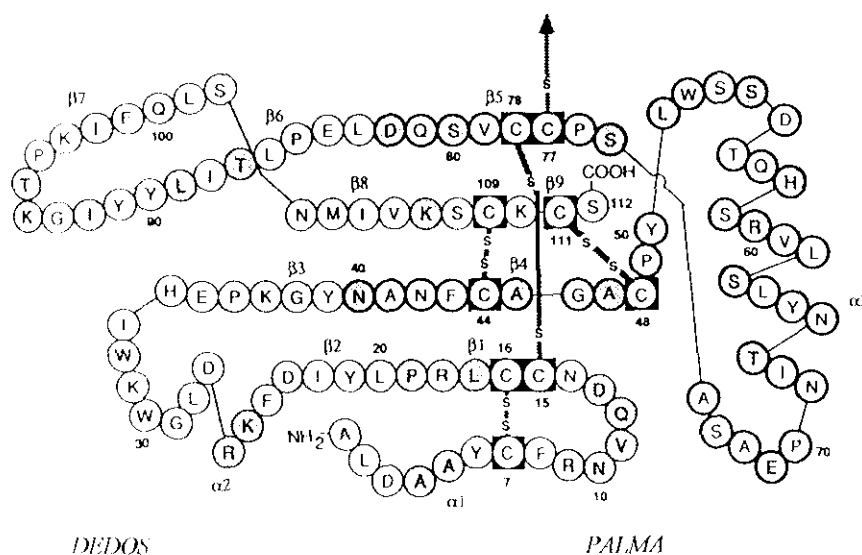


Fig. 3 Representación esquemática de la estructura tridimensional del TGF- β 2. Los residuos que componen la cadena polipeptídica están indicados mediante el código de una letra y numerados desde el extremo N-terminal. Los residuos de cisteína están remarcados mediante cajas (C), y los residuos que son diferentes a los del TGF- β 1 aparecen sombreados. Los puentes disulfuro se representan mediante líneas gruesas con (S-S). La Cys correspondiente a la posición 77 forma un puente intercatenario y estabiliza el dímero. Los residuos comprendidos entre las posiciones 40-82 los cuales son importantes para las diferencias de actividad entre la forma β 1 y β 2 están indicados mediante líneas gruesas. Las tres hélices α y las nueve láminas β se representan como α 1- α 3 y β 1- β 9 respectivamente (Miyazono *et al.* 1994. *Adv. Immunol.* 55: 181-220)

mesenquimales como fibroblastos y células musculares lisas humanas (Roberts *et al.* 1985) y sin embargo actúa como un potente inhibidor de la proliferación de la mayoría de las células, entre otras, endoteliales (Baird and Durkin 1986; Frater-Schroder *et al.* 1986), epiteliales (Moses *et al.* 1985) precursores hematopoyéticos (Otha *et al.* 1987) y linfocitos (Kehrl *et al.* 1986 a,b). El TGF- β es quimiotáctico para fibroblastos (Postlethwaite *et al.* 1987), monocitos (Walh *et al.* 1987) y neutrófilos (Brandes *et al.* 1991a), pero inhibe la migración de las células endoteliales (Heimark *et al.* 1986). Sus efectos sobre la diferenciación también dependen del tipo celular: Induce la diferenciación de células epiteliales del bronquio (Masui *et al.* 1986), y modula positiva o negativamente la diferenciación de mioblastos dependiendo de las condiciones experimentales (Massagué *et al.* 1986; Zentella *et al.* 1992; Olson *et al.* 1986; Florini *et al.* 1986).

1.3.2 Efectos sobre la síntesis de componentes de la matriz extracelular y sus receptores

Uno de los efectos biológicos más importantes mediados por el TGF- β es la formación de la matriz extracelular. El TGF- β es un potente estimulador de la síntesis de proteínas de la matriz entre las que figuran la fibronectina y varios tipos de colágeno (Ignotz y Massagué 1986) y recíprocamente, la matriz extracelular regula la expresión génica del TGF- β (Streuli *et al.* 1993). El mecanismo por el que actúa sobre la formación de dichos componentes es doble: Por una parte, disminuye la actividad de las proteasas extracelulares que actúan sobre la degradación de dichos componentes; este primer mecanismo incluye la inhibición de la síntesis de los activadores del plasminógeno (Laiho *et al.* 1986), de la colagenasa tipo I y de las metaloproteasas (Edwards *et al.* 1987). Por otra parte, estimula la producción de inhibidores de proteasas, como por ejemplo el inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), (Laiho *et al.* 1987) y los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP), (Edward *et al.* 1987). Sin embargo, existen algunas excepciones a dichos mecanismos como por ejemplo, la inducción de la colagenasa tipo IV (Overall *et al.* 1991; Salo *et al.* 1991; Wahl *et al.* 1993). En conjunto, el efecto neto que induce es la acumulación de componentes de la matriz extracelular.

El TGF- β también regula la expresión de los receptores en la membrana celular de proteínas de la matriz como por ejemplo las integrinas (Ignotz y Massagué 1987; Ignotz *et al.* 1988; Heino y Massagué 1989; Bauvois *et al.* 1992; Zambruno *et al.* 1995; Wang *et al.* 1995), promoviendo la interacción entre las células y los componentes de la matriz.

Otras actividades en relación con este apartado son la estimulación de la angiogénesis *in vivo* (Roberts *et al.* 1986; Yang y Moses 1990), y la aceleración de los procesos de reparación tisular (Mustoe *et al.* 1987).

1.3.3 Efectos sobre precursores hematopoyéticos

El TGF- β inhibe el crecimiento de precursores hematopoyéticos primitivos; por ejemplo han sido descritas inhibiciones de la formación de colonias pluripotentes inducidas por la IL-3 (Otha *et al.* 1987; Keller *et al.* 1988; Hampson *et al.* 1988), la formación de colonias eritroides (Hino *et al.* 1988; Ottmann y Pelus 1988) y la estimulación de dichas colonias en presencia de oligonucleótidos antisentido del TGF- β (Hatzfeld *et al.* 1991). Sin embargo, también ha sido descrito que pese a la inhibición de la formación de dichas colonias, el TGF- β es un potente inductor de la diferenciación eritroide (Krystal *et al.* 1994); otros resultados inhibitorios se han obtenido sobre la formación de colonias megacariocíticas (Ishibashi *et al.*

1987). La granulopoyesis, sin embargo es estimulada por el TGF- β en presencia del GM-CSF (Ottmann y Pelus 1988; Keller *et al.* 1991). El TGF- β también induce la inhibición del crecimiento de células leucémicas de linaje mielóide y su muerte mediante apoptosis (Lotem y Sachs 1992; Taetle *et al.* 1993).

1.3.4 Efectos sobre linfocitos

El TGF- β es un potente regulador del sistema inmune (revisado en Kehrl 1991; Ruscetti y Paladino 1991; Wallick *et al.* 1992), demostrando la inhibición de la proliferación de timocitos (Ristow 1986), células T y B (Kehrl *et al.* 1986 a,b), células citotóxicas naturales (NK), T citotóxicas y células citotóxicas activadas con linfoquinas (LAK) (Rook *et al.* 1986; Ranges *et al.* 1987; Espevik *et al.* 1988, respectivamente). Además de inhibir la proliferación de dichas células, también inhibe la actividad citolítica de las células T citotóxicas y las NK (Ranges *et al.* 1987; Rook *et al.* 1986), y la adhesión de linfocitos T y neutrófilos al endotelio (Gamble y Vadas, 1988). La producción y secreción de inmunoglobulinas (IgG e IgM) por parte de las células B también es disminuida (Kehrl *et al.* 1986a). Sin embargo, TGF- β induce el cambio de isotipo a IgA en linfocitos B murinos estimulados con lipopolisacárido (LPS), (Coffinan *et al.* 1989) y la exposición continua de dichas células al factor provoca la inhibición de la secreción de dicha inmunoglobulina.

1.3.5 Efectos sobre monocitos/macrófagos

El TGF- β induce quimiotaxis en monocitos (Wahl *et al.* 1987), pero actúa como un inhibidor negativo de la mayoría de las respuestas funcionales de los macrófagos. Se han descrito efectos negativos sobre la producción de peróxido de hidrógeno (Tsumakawi *et al.* 1988) y la expresión en membrana de antígenos de histocompatibilidad de clase II, inducida por el IFN- γ (γ -interferón), (Czarniecki *et al.* 1988). Otros efectos descritos sobre monocitos/macrófagos o líneas monocíticas incluyen la regulación de integrinas (Bauvois *et al.* 1992; Wahl *et al.* 1993), su acción como un inductor de la expresión de productos génicos que median las respuestas inflamatorias (Noble *et al.* 1993), presentar sinergismo junto a otros factores en la diferenciación terminal de líneas monocíticas (De Benedetti *et al.* 1990; Testa *et al.* 1993) y el ser un regulador selectivo de la proliferación de macrófagos derivados de progenitores medulares, en presencia de GM-CSF o M-CSF (Celada *et al.* 1992).

1.3.6 Citoquinas y sus receptores

El TGF- β también regula la producción de citoquinas por parte de las células. Por ejemplo, induce la expresión de los mensajeros de IL-1 y TNF- α en monocitos pero tiene la

capacidad de inhibirla cuando la activación se produce vía LPS (Chantry *et al.* 1989; Espevik *et al.* 1987); la producción de IFN- γ también es inhibida en células mononucleares (Espevik *et al.* 1987). Una característica importante del TGF- β es su capacidad autoinductiva; cada isoforma induce tanto su propia síntesis como la de otras isoformas (Van Obberghen-Schilling *et al.* 1988; Bascom *et al.* 1989).

Los receptores de otras citoquinas también pueden ser modulados por el TGF- β , entre ellos se han descrito disminuciones en los receptores de GM-CSF, IL-3 y G-CSF en líneas mieloides murinas (Jacobsen *et al.* 1991), el receptor de IL-1 en los linfocitos T y B (Dubois *et al.* 1990), el de IL-2 en células LGL (Large Granular Lymphocytes), (Ortaldo *et al.* 1991) y el receptor del IFN- γ en macrófagos (Pinson *et al.* 1992).

1.3.7 Efectos *in vivo* del TGF- β

La administración sistémica de TGF- β da como resultado la supresión de la respuesta inmune. Así, se han demostrado efectos beneficiosos del TGF- β en modelos experimentales de trasplantes cardíacos ectópicos (Wallick *et al.* 1990; Walterberger *et al.* 1993), en la encefalomiелitis alérgica inducida experimentalmente (Kuruvilla *et al.* 1991; Johns *et al.* 1991; Miller *et al.* 1992), y en un modelo autoinmune de ratón (Lowrance *et al.* 1994). En este último caso el TGF- β se ha propuesto como causante de la pérdida de respuesta frente a infecciones bacterianas. Por otra parte, existen resultados contradictorios respecto a la respuesta inflamatoria generada en modelos murinos de artritis reumatoide, dado que la administración sistémica o local de la citoquina parecen ejercer efectos contrapuestos (Wahl *et al.* 1994). Recientemente se han obtenido ratones mediante recombinación homóloga con deficiencia congénita del gen del TGF- β 1 (Shull *et al.* 1992; Kulkarni *et al.* 1993). Los animales carentes del factor no presentan graves deficiencias en lo que al desarrollo se refiere, aunque algún caso de muerte intrauterina ha sido observado (Kulkarni *et al.* 1993). Sin embargo, tras 20 días de vida los animales mueren debido a un síndrome agudo, caracterizado por una infiltración celular de tipo inflamatorio y multifocal, que conduce a la aparición de necrosis tisular en varios órganos entre los que se incluyen el corazón, estómago, hígado, pulmón, páncreas, glándulas salivares y músculo estriado. Los infiltrados están constituidos fundamentalmente por linfocitos y neutrófilos, siendo la histopatología de dichos órganos muy similar a la encontrada en la miocarditis, polimiositis, y en el síndrome de Sjögren (Shull *et al.* 1992). Estos resultados sugieren que la isoforma β 1 ejerzca un efecto de tipo

inmunosupresor *in vivo* y que dicha función no pueda ser compensada por la presencia de las otras isoformas.

Muy recientemente también han sido generados ratones transgénicos que sobreexpresan el TGF- β 1 (Sanderson *et al.* 1995). En dicho modelo, la expresión del factor se encuentra bajo el control de un promotor de expresión hepática. En dicho órgano se producen daños tisulares caracterizados por fibrosis y muerte por apoptosis de los hepatocitos, encontrándose además altos niveles de la citoquina en plasma. El desarrollo de la fibrosis, caracterizada por un aumento de la deposición de colágeno, aparece además en el riñón dando lugar a glomerulonefritis asociada a fallo renal y en otros tejidos donde existen cuadros de arteritis y miocarditis; también son detectadas alteraciones histológicas en páncreas y testículos. Estos resultados corroboran una de las funciones del TGF- β más importantes: La regulación positiva que ejerce sobre la formación de los componentes de la matriz extracelular. Aunque por el momento todavía quedan por dilucidar aspectos sobre el papel que el TGF- β pueda desempeñar *in vivo*, se acepta la existencia de una relación directa entre la expresión aberrante de este factor y el desarrollo de enfermedades crónicas que cursan con inflamación y daño tisular generante de los procesos de fibrosis. En este sentido, el TGF- β ha sido implicado en una amplia lista de patologías tanto en modelos animales como en humanos (Border y Ruoslahti 1992; Border y Nobel 1994).

1.4 Receptores de Membrana y otras proteínas que unen el TGF- β

Las respuestas celulares inducidas por el TGF- β están mediadas por la presencia en membrana de receptores específicos que unen el factor. En realidad y al igual que los factores que componen la superfamilia del TGF- β , los receptores también constituyen una compleja familia de proteínas relacionadas. Por simplicidad, en esta introducción nos vamos a referir fundamentalmente a los receptores específicos de los TGF- β s, pero datos revisados referentes a todos ellos se pueden encontrar en la literatura (Massagué 1992; Lin y Lodish 1993; Segarini 1993; Miyazono *et al.* 1994; Attisano *et al.* 1994).

Mediante ensayos de unión por afinidad utilizando la citoquina marcada con (125 I) y posterior unión covalente, se han podido detectar tres tipos principales de receptores en la membrana de la mayoría de las células. Estos receptores son nombrados como tipo I, tipo II y tipo III (conocido también como betaglicano). Los receptores tipo I y II son glicoproteínas de peso molecular aproximado 55 y 75 kDa respectivamente (Cheifetz *et al.* 1986); sus correspondientes análogos para activinas y BMPs muestran movibilidades similares (Attisano *et*

al. 1992). Hasta el momento varios receptores tipo I y II para diferentes miembros de la superfamilia del TGF- β han sido clonados. El receptor tipo III es un proteoglicano de peso aproximado 300 kDa específico sólo para los TGF- β s, y aunque su distribución es muy amplia, se encuentra ausente en algunos tipos celulares entre los que se incluyen células musculares esqueléticas, mioblastos, precursores hematopoyéticos y células endoteliales (Massagué 1990).

Además de estos tres tipos principales existen otros receptores en membrana que presentan un patrón de expresión más restringido. El llamado receptor IV es una proteína de 60-64 kDa presente en la membrana de células GH3 de pituitaria y es el único que presenta reactividad cruzada entre TGF- β , activina e inhibina (Cheifetz *et al.* 1989). El receptor V ha sido purificado a partir de membranas celulares de hígado bovino; es una proteína de 400 kDa y se ha demostrado que posee actividad Ser/Thr quinasa (O'Grady *et al.* 1992). Además de éstos, otros tres receptores con estructura de anclaje a la membrana a través de fosfatidilinositol, específicos para la forma β 1 (180 kDa) o β 2 (60 y 140 kDa) también han sido descritos en algunos tipos celulares (Cheifetz *et al.* 1991). También se ha reportado una glicoproteína de peso 38 kDa, con una afinidad 5-10 veces superior por β 2 que por el β 1, que ha sido caracterizada en la membrana de la línea de coriocarcinoma humano BeWo (Mitchell *et al.* 1992a). Por último, se encuentra la endoglina, caracterizada en células endoteliales (Cheifetz *et al.* 1992) y que será descrita con más detalle en la sección 1.7. Sin embargo, la distribución celular tan restringida de estas proteínas que unen el factor, sugiere que cumplan alguna función de tipo celular-específica, que por el momento no se conoce con exactitud.

Además de su interacción con receptores de membrana, el TGF- β también se une a un amplio número de proteínas solubles y asociadas a la matriz extracelular (Segarini 1993). Entre estas proteínas se incluyen la α 2-macroglobulina (O'Connor-McCourt y Wakefield 1987; Huang *et al.* 1988), una forma soluble de betaglicano (Andres *et al.* 1989), decorina y biglicano (Yamaguchi *et al.* 1990), α -fetoproteína (Altman *et al.* 1990), trombospondina (Murphy-Ullrich *et al.* 1992), el precursor de la proteína β -amiloide (Bodmer *et al.* 1990), colágeno tipo IV (Paralkar *et al.* 1991) y fibronectina (Fava y McClure 1987). Además, se han aislado tres proteínas que unen TGF- β de 40, 80 y 160 kDa a partir de membranas de útero de cerdo (Ichijo *et al.* 1991), y a partir del clonaje del ADNc de la forma de 40 kDa, se ha demostrado que es una proteína secretada con una estructura conteniendo dominios del tipo fibrinógeno y colágeno por lo que ha sido denominada ficolina. Las formas de 80 y 160 kDa corresponden a multímeros de la de 40 kDa (Ichijo *et al.* 1993). Sin embargo, la forma

recombinante de ficolina no ha demostrado capacidad de unión del TGF- β , por lo que es posible que existan diferencias entre la forma natural y la recombinante que puedan afectar a la capacidad de unión de la citoquina. La función que todas estas proteínas puedan desempeñar no se conoce con exactitud; en el caso de la α 2-macroglobulina, se sabe que participa en el aclaramiento de la citoquina libre en el suero; el resto puede actuar almacenándola o modulando la accesibilidad del factor a los receptores señalizadores en las células. Por ejemplo, en el caso de la decorina, se ha demostrado que su administración ejerce un efecto beneficioso en el desarrollo de glomerulonefritis de un modelo experimental de rata (Border *et al.* 1992).

1.4.1 Receptores tipo I y II

El receptor tipo II, es una glicoproteína de membrana de 567 residuos, con un dominio extracelular corto, en el que abundan los residuos de cisteína y dos sitios potenciales de N-glicosilación, una sola región transmembrana, un dominio intracelular con actividad Ser/Thr quinasa y una pequeña cola con repetición de residuos Ser/Thr (Lin *et al.* 1992) (Fig. 4). El receptor II está relacionado estructuralmente con otros receptores tipo II específicos de otros miembros de la superfamilia del TGF- β , compartiendo un 30-40% de identidad de secuencia en el dominio quinasa. Dos receptores tipo II de activina han sido identificados en ratón, ActR-II y ActR-IIB, existiendo formas alternativas de éste último, que alteran la afinidad por el ligando y modifican la diferenciación celular en respuesta a concentraciones variables de activina (Mathews y Vale 1991; Attisano *et al.* 1992; Green y Smith 1990). Tanto el ActR-II como el ActR-IIB han sido también identificados en otras especies de mamíferos (Donaldson *et al.* 1992; Legerski *et al.* 1992; Matzuk *et al.* 1992; Shinozaki *et al.* 1992). Recientemente ha sido caracterizado un receptor tipo II de activina en *Drosophila*, Atr-II, el cual es equidistante entre ActR-II y ActR-IIB desde el punto de vista de la homología de secuencia (Childs *et al.* 1993). El receptor II de los TGF- β s también está relacionado con dos receptores implicados en el control del desarrollo de la larva de *C.elegans*, daf-1, cuyo ligando no es conocido (Georgi *et al.* 1990) y daf-4, un receptor con actividad Ser/Thr quinasa que une en mamíferos el péptido morfogénico de hueso tipo 2 (BMP-2), con alta afinidad (Estevez *et al.* 1993).

El receptor tipo I del TGF- β , también ha sido identificado como una Ser/Thr quinasa no relacionada con la familia de receptores II (Franzen *et al.* 1993). El tamaño del receptor I es un poco más pequeño que el del receptor II. Se caracteriza por poseer un dominio extracelular más corto que el de dicho receptor, y no poseer en su secuencia citoplásmica la cola de residuos de Ser/Thr en el extremo C-terminal (Fig. 4). El receptor I es un miembro de

una familia de Ser/Thr quinasas altamente relacionadas, que presentan homologías de secuencia del 60-70% dentro de los dominios quinasa (Attisano *et al.* 1993; Ebner *et al.* 1993; He *et al.* 1993; Matsuzaki *et al.* 1993; ten Dijke *et al.* 1993; Wrana *et al.* 1994a). Al igual que los receptores tipo II, presentan en el dominio extracelular un zona rica en residuos de cisteína con una secuencia consenso de dichos residuos cerca de la región transmembrana. Al contrario que los receptores tipo II, las seis primeras cisteínas en el dominio extracelular de esta subfamilia se encuentran conservadas. Además, los receptores tipo I tienen conservado un dominio en la zona intracelular muy cercano al dominio transmembrana, el cual se caracteriza por la secuencia SGSGSG en dicha región (región GS). Existen varios receptores de esta subfamilia cuyos ligandos ya han sido identificados, entre ellos el del TGF- β (Franzen *et al.* 1993), el de activina humana, (ActR-I) (Attisano *et al.* 1993), y de *Drosophila*, (Atr-I) (Wrana *et al.* 1994a), y un cuarto miembro de esta subfamilia, también en humanos (TSR-I), que es un receptor tipo I que tiene la capacidad de unir tanto TGF- β como activina (Attisano *et al.* 1993). Cuando se sobreexpresa en células COS el homólogo murino de Act R-I, Tsk7L, también es capaz de unir tanto activina como TGF- β (Ebner *et al.* 1993); pero en esas mismas condiciones, la unión del TGF- β al ActR-I es muy débil (Attisano *et al.* 1993; Ebner *et al.* 1993), por lo que no se conoce muy bien la relevancia fisiológica que esta reactividad cruzada pueda tener. Actualmente se acepta la existencia de otros miembros de la subfamilia tipo I, cuyos ligandos no han sido identificados y cuya función sería la de actuar como receptores para otros miembros de la superfamilia del TGF- β .

1.4.2 Receptor tipo III (Betaglicano)

El betaglicano es un proteoglicano de membrana formado por una secuencia de 853 residuos, en rata, la mayoría de los cuales se organizan en un gran dominio extracelular donde se unen cadenas de glicosaminoglicanos tanto del tipo heparán como condroitín sulfatos (López-Casillas *et al.* 1991; Wang *et al.* 1991; Morén *et al.* 1992). El betaglicano tiene la capacidad de unir las tres isoformas del TGF- β con alta afinidad ($K_d=10^{-10}$ M), no siendo los glicosaminoglicanos necesarios para dicha interacción (Segarini y Seyedin 1988; Cheifetz *et al.* 1988a; López-Casillas *et al.* 1994). El sitio de unión del TGF- β parece estar situado en la mitad N-terminal de la porción extracelular tal y como se deduce de los ensayos realizados con un panel de formas truncadas de betaglicano expresadas en células de mamífero (López-Casillas *et al.* 1994). No obstante, existen resultados contradictorios, basados en ensayos de unión al TGF- β de fragmentos de la proteína expresada en bacterias, que sugieren que el sitio

de interacción radica en el extremo C-terminal de la región extracelular (Fukushima *et al.* 1993). El betaglicano contiene además un único dominio transmembrana y un corto segmento citoplásmico formado por 43 residuos, rico en residuos de Ser y Thr, que no presenta correspondencia con ninguna secuencia señalizadora.

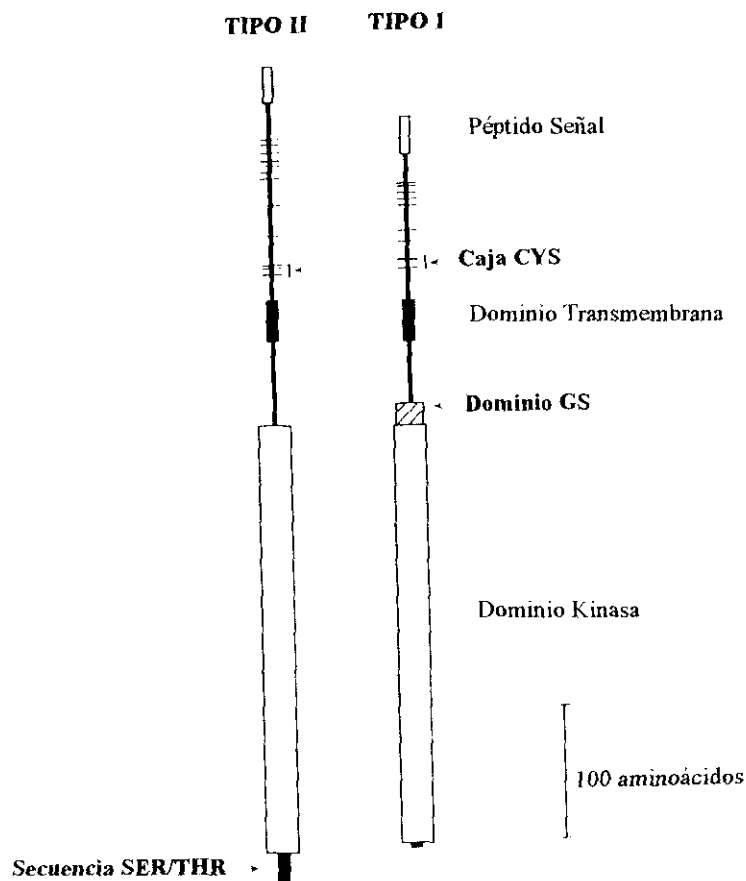


Fig. 4 Receptores tipo I y II del TGF- β . Representación esquemática de ambos receptores y algunos de los aspectos que comparten con otros receptores tipo I y II de la superfamilia de factores del TGF- β . Los péptidos señal están representados mediante los rectángulos superiores, las cisteínas en el dominio extracelular se representan mediante líneas horizontales y la "caja" de cisteínas conservadas en las familias de receptores aparecen delimitadas por la línea vertical y la flecha. Los dominios transmembrana aparecen representados por el rectángulo en negro, el dominio GS presente en el receptor I mediante las líneas oblicuas y los dominios quinaso por los rectángulos inferiores. En el receptor II se destaca la zona rica en Ser/Thr en el extremo C-terminal, ausente en el receptor I (Attisano *et al.* 1994. *Biochim et Biophys. Acta* 1222:71-80)

Betaglicano presenta niveles de homología significativos con endogлина, especialmente en la zona transmembrana e intracitoplásmica. Una descripción más exhaustiva de este otro receptor del TGF- β , así como la relación de homología entre ambos se expone en la sección 1.7 de esta memoria.

1.5 Mecanismo de señalización del TGF- β y papel de sus tres receptores principales

Tanto el receptor I como el II poseen un dominio extracelular de unión al ligando y un dominio intracelular con actividad quínasa y por tanto potencialmente implicados en la transducción de señal del TGF- β . Por similitud con el mecanismo por el cual operan las tirosín-quinasas (revisado en Heldin 1995), la formación de homo- y hetero-oligómeros de los receptores ha sido demostrada (Geiser *et al.* 1992; Ebner *et al.* 1993; Henis *et al.* 1994; Moustakas *et al.* 1993; Vivien *et al.* 1995). Actualmente se sabe que el mecanismo de transducción de señal que el TGF- β utiliza implica la formación de complejos heteroméricos entre los receptores I y II en presencia del factor (Massagué 1992; Wrana *et al.* 1992; Inagaki *et al.* 1993; Wrana *et al.* 1994b).

Las evidencias más claras de la necesidad de los dos receptores en el complejo señalizador, derivan de los estudios realizados con mutantes de las células epiteliales de visión Mv1Lu, obtenidos por mutagénesis química y seleccionados por su resistencia a la inhibición de la proliferación inducida por el TGF- β (fig.5). Dos tipos de células fueron seleccionadas según sus características fenotípicas: Mutantes que mediante ensayos de marcaje por afinidad no mostraban TGF- β unido al receptor I pero si al receptor II (clase R), y mutantes que mostraban una unión anómala del factor tanto al receptor I como al II (clase DR), (Boyd y Massagué 1989; Laiho *et al.* 1990a). La obtención de células somáticas híbridas entre estas dos clases permitía el rescate del receptor I (Laiho *et al.* 1991a), lo que demostraba la presencia "física" de dicho receptor en los mutantes DR, a pesar de no unir la citoquina. Por otra parte, ambos mutantes recuperaban la sensibilidad al TGF- β al ser transfectados con el receptor II, y el receptor I recuperaba la capacidad de unir la citoquina, lo que ponía de manifiesto que el receptor I necesita la presencia del II para unir el ligando (Wrana *et al.* 1992). Además, en los mutantes R, donde la unión al receptor II era normal pero no al receptor I, no existía respuesta al TGF- β , aún después de transfectar establemente el receptor II, lo que demostraba la ausencia de mutaciones en el receptor II endógeno como causantes de la falta de señalización, y al mismo tiempo ponían de manifiesto, la necesaria presencia del receptor I en el complejo señalizador (Wrana *et al.* 1992). En conjunto, todos estos resultados indican que el receptor I requiere la presencia del II para unir el ligando y que el receptor II necesita la presencia del I para que se produzca la señalización (Fig.5). Resultados similares se han obtenido en la línea humana derivada de un hepatoma Hep 3B, línea celular resistente a los efectos biológicos del TGF- β , y que tras la transfección del receptor tipo II recupera la

sensibilidad al factor (Inagaki *et al.* 1993). La unión heteromérica de ambos receptores en presencia del TGF- β ha sido demostrada mediante estudios de inmunoprecipitación en células Mv1Lu, en el hepatoma 3B (Wrana *et al.* 1992, Franzen *et al.* 1993, Inagaki *et al.* 1993) y en modelos de expresión viral en células de insecto (Ventura *et al.* 1994).

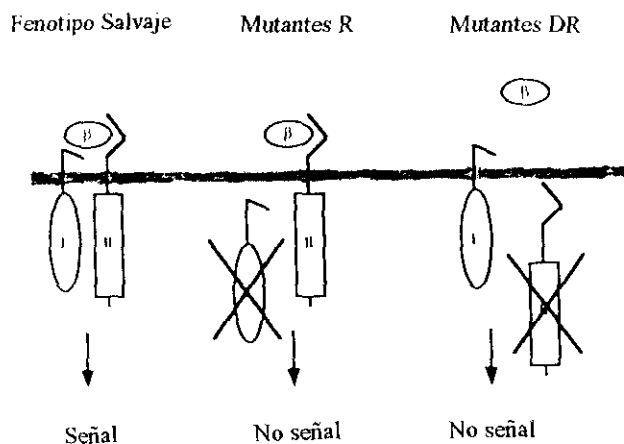


Fig. 5 Representación esquemática de los receptores del TGF- β presentes en las células Mv1Lu de fenotipo salvaje y los mutantes R y DR. En la célula parental los receptores I y II forman complejos en presencia del factor y consecuentemente generan señales intracelulares. En los mutantes R, el receptor II normalmente expresado interactúa con el ligando pero en ausencia del receptor I no transmite señal. Por el contrario el mutante DR posee un receptor I normal pero la ausencia del II impide la unión del ligando (Attisano *et al.* 1994. *Biochim. et Biophys. Acta* 1222:71-80)

Aunque establecida la asociación de los dos receptores en el complejo señalizador, el esquema de la figura 5 no explica cual es el responsable de la transmisión de señal. A partir de los trabajos de Wrana *et al.* (1994b), se conoce con exactitud la participación de cada receptor en la unión del ligando y posterior propagación de la señal en membrana (Fig. 6): El TGF- β se une directamente al receptor II, el cual se encuentra constitutivamente fosforilado y además la presencia de la citoquina no altera dicha fosforilación. Una vez el TGF- β se une a dicho receptor, se produce la asociación heteromérica al receptor I, que a su vez es fosforilado en el dominio GS por parte de la actividad Ser/Thr quinasa del receptor II. Una vez producida esta fosforilación, se propaga la señalización sobre otros sustratos susceptibles de ser fosforilados por parte del receptor I. El hecho de que este receptor sea el elemento clave y necesite ser fosforilado por el receptor II en la propagación de la señal, queda demostrado por una serie de evidencias experimentales:

a) La expresión mediante transfección del receptor I en los mutantes R de las células Mv1Lu, defectivos en dicho receptor y resistentes a la inhibición de la proliferación inducida por el TGF- β , rescata dicho efecto biológico en las células (Franzen *et al.* 1993).

b) La expresión de una forma truncada del receptor II, conservando la capacidad de unión a la citoquina pero sin dominio quinasa intracelular, junto a un receptor I normal, permite la formación del complejo heteromérico pero no transduce señal en las células parentales Mv1Lu (Wieser *et al.* 1993).

c) La expresión de una forma mutante del receptor II, sin actividad exo-quinasa, no es capaz de inducir la fosforilación del receptor I. De forma recíproca, la coexpresión en mutantes R de una forma defectiva en el dominio quinasa del receptor I junto al receptor II, demuestra la fosforilación del receptor II, lo que excluye la autofosforilación del receptor I (Wrana *et al.* 1994b).

d) La expresión de un receptor II normal junto a un receptor I carente de la región GS, no es capaz de inducir la fosforilación del receptor I ni restaurar la pérdida de respuesta al TGF- β en células R. Por el contrario, la expresión del receptor I normal en las mismas células da lugar a la respuesta esperada (Wrana *et al.* 1994b).

e) Por último, la expresión de un receptor I en mutantes DR con una mutación puntual en el dominio GS (cambio de Thr-204 por Asp), confiere a dicho receptor la capacidad de ser constitutivamente activo, propagando las señales atribuibles al TGF- β en ausencia del receptor II y del ligando (Wieser *et al.* 1995).

El mecanismo de transducción de señal vía asociación heteromérica también ha sido demostrado para otros miembros de la superfamilia del TGF- β (Attisano *et al.* 1993; Ebner *et al.* 1993; Mathews y Vale 1993; Wrana *et al.* 1994a). En estudios de inducción de tejidos mesodérmicos en *Xenopus* se ha demostrado que la expresión de un receptor truncado de activina bloquea sus efectos (Hemmati-Brivanlou y Melton 1992). Por otra parte, asociaciones heteroméricas entre el receptor II del TGF- β y el TSR-I, un receptor tipo I humano con capacidad para unir activina y TGF- β , han podido ser demostradas mediante ensayos de marcaje por afinidad (Attisano *et al.* 1993). Resultados similares se han obtenido con los receptores de activina en *Drosophila* (Attisano *et al.* 1993; Wrana *et al.* 1994a), por lo que todo parece indicar que existe un mecanismo general de funcionamiento dentro de esta familia de receptores.

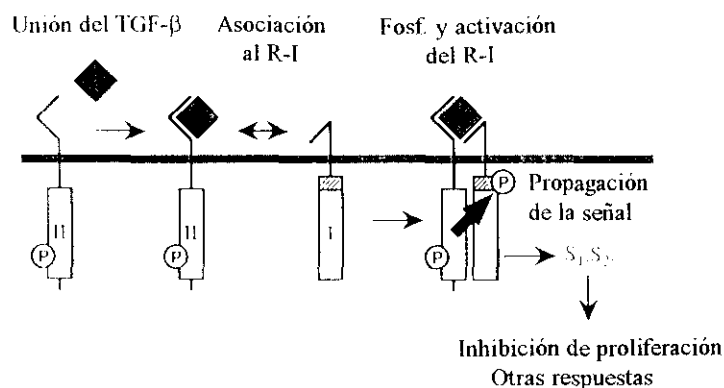


Fig. 6 Modelo general de la iniciación en membrana de las señales inducidas por el TGF- β a través de sus receptores. El receptor II es el primero en unir el ligando y se encuentra constitutivamente fosforilado, su actividad exo-Ser/Thr quinasa fosforila al receptor I, tras formar un complejo heteromérico en presencia del TGF- β . La fosforilación del receptor I se produce en el dominio GS, provocando su activación, lo que permite que el receptor I actúe ahora como propagador de la señal mediante su actividad Ser/Thr quinasa (Wrana *et al.* 1994. *Nature* 370:341-347)

Aunque por el momento se han identificado múltiples formas del receptor tipo II de activina, sólo se conoce una forma del receptor II del TGF- β y dos receptores tipo I. La identificación de estas dos formas del receptor I concluye tras la caracterización de un grupo de Ser/Thr quinazas relacionadas conocidas como ALKs (Activin-receptor Like Kinases), a las que hoy se les asignan las siguientes funciones: ALK-1 (identica a TSR-I), (Attisano *et al.* 1993), con capacidad para unir tanto TGF- β como activina y transducir la señalización de ambos; ALK-2 que es el receptor I humano de activina (Attisano *et al.* 1993) y su homólogo murino Tsk 7L (Ebner *et al.* 1993), tienen capacidad para unir TGF- β , aunque sólo transducen señales correspondientes a activina; y por último, ALK-5, que sólo une y transduce señales correspondientes a TGF- β (Franzen *et al.* 1993). Un hecho importante es que la asociación entre el receptor II del TGF- β y TSR-I no induce las mismas respuestas en presencia de TGF- β o activina (Attisano *et al.* 1993). Otro ejemplo de reacción cruzada entre miembros de la superfamilia de factores del TGF- β y sus receptores, ha sido recientemente reportado con la OP-1 (Osteogenic Protein-1 ó BMP-7) y los receptores tipo II de activina (Yamashita *et al.* 1995), lo que amplía las posibilidades de respuestas celulares dependiendo del ligando inductor

de la señal. La Tabla I resume los receptores y sus ligandos que se conocen en la actualidad y diferentes nomenclaturas que se pueden encontrar en la literatura.

Nombre	Ligando	Otras nomenclaturas
Receptores tipo II		
ActR-II	Activinas, OP-1	
ActR-IIB	Activinas, OP-1	
TGF- β R-II	TGF- β 1,2,3	
Receptores tipo I		
ActR-I	Activinas, OP-1	ALK-2; SKR-1; Tsk-7L; R1
ActR-IB	Activinas	ALK-4; SKR-2; R2
TGF- β R-I	TGF- β 1,2,3	ALK-5; R4
ALK-1	TGF- β 1, Activina A	TSR-I; R3
BMPR-IA	OP-1; BMP-4; BMP-2	ALK-3; BRK-1
BMPR-IB	OP-1; BMP-4	ALK-6

Tabla I. Receptores de la superfamilia del TGF- β con actividad Ser/Thr quinasa y sus respectivos ligandos en mamíferos (Yamashita *et al.* 1995. *J. Cell. Biol.* 130:217-226)

El papel que el receptor tipo III o betaglicano desempeña en las respuestas celulares inducidas por el TGF- β se conoce parcialmente. La falta de motivos con actividad quinasa potencialmente implicados en transducción de señal ha sido demostrada tras el clonaje del ADNc de la proteína de rata, humana y porcina (López-Casillas *et al.* 1991; Wang *et al.* 1991; Moren *et al.* 1992). La ausencia de participación directa del betaglicano en la señalización fue inferida dada la existencia de algunos tipos celulares que presentaban respuestas al TGF- β , y sin embargo, no expresaban niveles detectables de betaglicano (Massagué *et al.* 1990). Además, ninguno de los mutantes de células Mv1Lu resistentes a los efectos de la citoquina, presentan niveles alterados de unión del factor a dicho proteoglicano (Laiho *et al.* 1990a). La función que se le asignó inicialmente fue la de actuar como un receptor con capacidad de presentación o almacenamiento del TGF- β en la membrana. López-Casillas *et al.* (1993) han demostrado que una vez expresado mediante transfección en la línea de mioblastos de rata L₆E₉, betaglicano se asocia con el complejo señalizador en presencia del ligando. Esta asociación se produce a través del receptor tipo II y funcionalmente se traduce en una mayor capacidad de unión de la citoquina por parte de dicho receptor, así como una amplificación de las respuestas de inhibición de proliferación inducidas por el TGF- β (Fig. 7). Estos efectos son especialmente evidentes cuando los ensayos se realizan en presencia de la isoforma TGF- β 2.

Betaglicano es capaz de unir las tres isoformas de la citoquina con la misma afinidad pero con una K_d del orden de 10 veces mayor para las isoformas $\beta 1$ y $\beta 3$ que la de los receptores I y II (Massagué 1990). La isoforma $\beta 2$ es la que se une con menor afinidad al receptor tipo II por lo que la presencia de betaglicano podría facilitar el acceso de dicha isoforma al complejo señalizador (López-Casillas *et al.* 1993). Se conocen algunos subtipos del receptor tipo III que muestran diferentes afinidades por las isoformas del TGF- β en ciertos tipos de células (Segarini *et al.* 1987; Mitchell y O'Connor-McCourt 1991; Mitchell *et al.* 1992b), aunque la relación que existe entre dichas formas y el receptor clonado no están totalmente determinadas.

Además de la forma de membrana, el dominio extracelular de betaglicano puede ser liberado en forma soluble al medio (fig. 7), posiblemente como consecuencia del efecto proteolítico de alguna actividad enzimática en uno o dos sitios potenciales de corte presentes en su secuencia (Andrés *et al.* 1989; López-Casillas *et al.* 1991). En este sentido, se ha descrito recientemente que la plasmina es capaz de liberar dicha forma soluble (Lamarre *et al.* 1994). Los efectos que ejerce la forma soluble recombinante, secretada como proteína truncada en células de insecto o en la línea Mv1Lu, son antagónicos a los inducidos por el TGF- β en las células (López-Casillas *et al.* 1994), lo que sugiere que podría actuar como un "secuestrador" de la citoquina, impidiendo así los efectos que pudiera desencadenar en las células (fig. 7). La cantidad de betaglicano soluble presente en los fluidos biológicos puede desempeñar así un importante papel regulador del TGF- β *in vivo*.

Además de unir TGF- β con su núcleo proteico, se ha demostrado que betaglicano une la forma básica del factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) mediante las cadenas de azúcares (Andrés *et al.* 1992). El bFGF necesita unir heparina o heparán sulfatos para ejercer sus efectos biológicos a través de su receptor de alta afinidad, una tirosín-quinasa; es posible por tanto que el betaglicano tenga la capacidad de modular las respuestas celulares tanto del TGF- β como del bFGF. Betaglicano presenta homología de secuencia, además de la ya citada con endoglin, con otros componentes de membrana tales como los receptores presentes en espermatozoides, Zp2 y Zp3, el componente proteico de la orina uromodulina y el zimógeno glicoproteico de la membrana de gránulos GP-2 (Bork y Sander 1992).

1.6 Señales intracelulares inducidas por el TGF- β

Las señales intracelulares inducidas por el TGF- β no son bien conocidas. Los sustratos fosforilables tras la activación de los receptores en membrana son virtualmente desconocidos,

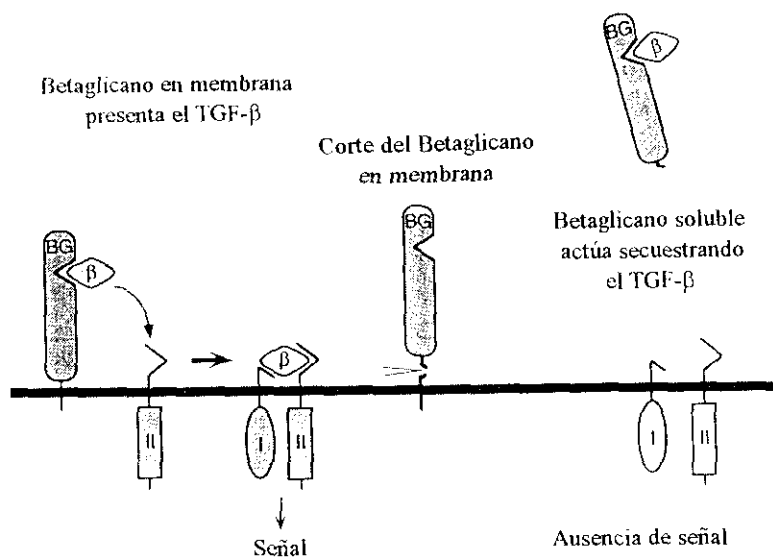


Fig. 7 Betaglicano es una molécula accesoria. Como proteoglicano de membrana, actúa como un presentador del TGF- β al complejo señalizador formado por los receptores I y II, aumentando las respuestas inducidas por el ligando (izquierda). Como proteína soluble, betaglicano puede secuestrar el TGF- β y disminuir su acceso a los receptores señalizadores, bloqueando parte de sus efectos (derecha) (Attisano *et al.* 1994. *Biochim et Biophys Acta* 1222:71-80)

sin embargo, hoy se conocen algunos de los componentes que pueden intervenir o ser dianas de las señales inducidas por el factor. El TGF- β es un regulador negativo del ciclo celular que actúa deteniendo la progresión a través de las últimas etapas de la fase G1 (Pietenpol *et al.* 1990a; Howe *et al.* 1991; Laiho *et al.* 1990b). En la línea Mv1Lu tras la inhibición del ciclo por el TGF- β , la fosforilación de la proteína del retinoblastoma pRB es bloqueada (Laiho *et al.* 1990b; Furukawa *et al.* 1992) manteniéndola en su estado hipofosforilado. Este efecto es bloqueado por la presencia en las células de componentes virales tales como el antígeno T del virus SV40 (Laiho *et al.* 1990b). La forma hipofosforilada de la pRB está considerada como la supresora de la progresión en el ciclo y por tanto la que actuaría bloqueando la entrada en la fase S. Varias ciclinas (D1, D2, D3 y E) y sus quinasas asociadas (cdk2, cdk4 y cdk5) parecen regular eventos durante G1, que al menos *in vitro* son capaces de conducir a la fosforilación de la pRB (Ewen *et al.* 1993a), requisito para la progresión hacia la fase S. Dichos resultados junto a las observaciones obtenidas de que el TGF- β pueda actuar como un inhibidor de las cdk durante G1 (Howe *et al.* 1991; Geng y Weinberger 1993; Ewen *et al.* 1993b), han hecho que se considere a dichas quinasas, como moléculas diana de la señalización del TGF- β . Dos mecanismos alternativos de actuación se han propuesto para este factor como inhibidor del ciclo celular; bien actuando sobre los niveles de expresión de ambos componentes del complejo

ciclina-cdk o bien actuando sobre un pequeño grupo de moléculas inhibitoras de las cdk's conocidas como CDKIs (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors), (revisado en Sherr 1993; Hunter y Pines 1994). Geng y Weinberg (1993) han reportado que el TGF- β bloquea la expresión de la ciclina E en queratinocitos humanos, al igual que es inhibida la expresión de cdk4 en células Mv1Lu, aunque la expresión constitutiva de dicha cdk es suficiente para superar el efecto inhibitor del TGF- β (Ewen *et al.* 1993b). Además, en células inhibidas en la fase G1 del ciclo, existen tanto ciclina E como cdk2, pero no se encuentran complejos catalíticamente activos de ambas (Koff *et al.* 1993). Esta inhibición del complejo ciclina E-cdk2, se correlaciona con la presencia de una proteína, p27, que actuaría como un elemento inhibitor de dicho complejo (Polyak *et al.* 1994a). Esta proteína, sin embargo, no es regulada desde el punto de vista de los niveles de expresión por el TGF- β (Polyak *et al.* 1994b), sino que estaría sometida a una regulación postraducciona. Otro componente similar a la p27 lo constituye la p21, molécula cuya expresión es aumentada por el producto génico supresor de tumores p53, y que al igual que la anterior inhibe la actividad de los complejos ciclina-cdk (Harper *et al.* 1993; El-Deiry *et al.* 1993). Otros dos componentes de este grupo de inhibidores han sido recientemente clonados y caracterizados: p16 (Serrano *et al.* 1993), inhibitor de la progresión del ciclo a través de cdk4 y cdk6; y p15, otro miembro muy relacionado con el anterior y que es inducible hasta 15 veces en queratinocitos tras el tratamiento con TGF- β (Hannon y Beach 1994). Actualmente se acepta que el TGF- β actuaría sobre el ciclo celular implicando al menos a dos de los inhibidores antes mencionados, p27 y p15: En la célula proliferante, p27 se encontraría asociada con múltiples complejos ciclinas-cdk's, como ciclinas D-cdk4,6 y ciclina E-cdk2. Los niveles de p27 no serían entonces suficientes como para inhibir el total de complejos presentes en las células, de otro modo la progresión en el ciclo quedaría inhibida. Tras el tratamiento con TGF- β la distribución de p27 se alteraría, de tal modo que los complejos ciclina E-cdk2 serían completamente inhibidos y las células quedarían detenidas en G1/S. El TGF- β también actúa sobre la expresión de p15, la cual se uniría directamente a cdk4 y cdk6 desestabilizando las ciclinas D. Según este modelo la unión de p15 a cdk4 y cdk6 sería la responsable de la redistribución de p27, asociándose con el complejo ciclina E-cdk2 (Peters 1994).

La represión de la expresión de *c-myc* también constituye una importante señal para la inhibición de la proliferación inducida por el TGF- β . En ensayos realizados mediante tratamiento de queratinocitos con la citoquina se ha comprobado la inhibición de expresión de

c-myc (Coffey *et al.* 1988; Pietenpol *et al.* 1990a); la vía de señalización que conduce a dicha represión ha implicado tanto a la pRB como a otros componentes celulares (Pietenpol *et al.* 1990b,1991). La disminución de *c-myc* no parece sin embargo restringida a la fase G1 del ciclo, lo que ha sugerido una vía alternativa de regulación independiente del ciclo celular (Zentella *et al.* 1991; Munger *et al.* 1992). Recientemente, se ha reportado que la sobreexpresión de *c-myc* bloquea el efecto inhibitorio sobre la proliferación del TGF- β , aunque su expresión es necesaria cuando TGF- β induce señales mitogénicas sobre las células (Alexandrow *et al.* 1995).

La estimulación del crecimiento celular por parte del TGF- β también ha sido observada en algunas células mesenquimales. Sin embargo se ha propuesto un mecanismo indirecto a través del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o sus receptores (Leof *et al.* 1986; Yamakage *et al.* 1992 respectivamente). La estimulación del crecimiento de las células AKR-2B ocurre tras un período suficientemente largo como para que se produzca la inducción de la cadena B del PDGF (Shipley *et al.* 1985) y mediante un mecanismo autocrino induce una vía estimuladora del crecimiento celular (Leof *et al.* 1986). La producción de la cadena A del PDGF también es inducida en células musculares lisas humanas así como en fibroblastos, tras la exposición a bajas concentraciones de TGF- β (Battegay *et al.* 1990; Soma y Grotendorst 1989). Además, en esos ensayos la estimulación del crecimiento es inhibido en presencia de anticuerpos anti-PDGF (Battegay *et al.* 1990). Sin embargo, a altas concentraciones de TGF- β la expresión de la cadena α del receptor del PDGF es inhibida, que junto con otras señales inhibitoras pueden tener como efecto neto la inhibición de la proliferación. (Battegay *et al.* 1990).

Los efectos del TGF- β sobre los componentes de la matriz extracelular están mediados directamente por la regulación transcripcional de los genes implicados en el recambio de dichos componentes. La activación transcripcional de los genes que codifican colágeno tipo I y PAI-1 se debe a la existencia de elementos de respuesta al TGF- β en los correspondientes promotores (Rossi *et al.* 1988; Ritzenthaler *et al.* 1991; Westerhausen *et al.* 1991; Riccio *et al.* 1992). La represión del gen de la metaloproteasa transilina/ estromelina se encuentra controlada por un elemento regulador negativo de TGF- β (TIE) en su promotor, y está mediada por la unión de un complejo proteico donde se encuentra *fos* (Kerr *et al.* 1990). La producción de citoquinas también está regulada transcripcionalmente. Así por ejemplo, la autoinducción del propio TGF- β está mediada por el complejo AP-1 (Kim *et al.* 1990), y la inhibición del gen de la IL-2 en

linfocitos T ocurre a través de un sitio de unión tipo octámero en el promotor del gen (Brablezt et al 1993).

Otras señales intracelulares inducidas por el TGF- β han sido descritas, aunque en la actualidad no se conocen con certeza los mecanismos moleculares que las desencadenan. Entre ellas, se encuentran la activación de 21 ras (Mulder y Morris 1992), la inhibición de la hidrólisis de fosfatidilcolina inducida a través de la fosfolipasa C (Díaz-Meco et al. 1992), la inhibición de la actividad del producto génico supresor de tumores p53 (Suzuki et al. 1992; Landesman et al. 1992), la activación de proteínas-fosfatasas (Gruppuso et al. 1991), y la activación de la PKC y la fosfatidilcolina-fosfolipasa C (Halstead 1995 et al. 1995). Además el TGF- β induce una rápida fosforilación de muchas proteínas nucleares entre las que se encuentra el factor transcripcional formado por la proteína ligadora del elemento respondedor a AMPc (CREB) (Kramer et al. 1991), y también induce el ARNm de algunos genes de respuesta temprana tales como *c-jun*, *jun-B* y *c-fos* en diferentes tipos celulares. (Pertovaara et al. 1989, Laiho et al. 1991b; Hanazawa et al. 1991; Lafon et al. 1995). El TGF- β y el producto de *c-fos* parecen mantener una regulación recíproca ya que la sobreexpresión de *c-fos* disminuye la síntesis del factor, aunque aumenta la expresión de sus receptores (Mercier et al. 1995). La expresión de *junB* se ha utilizado como un marcador de respuesta celular al TGF- β en algunos tipos celulares; en la actualidad se conoce, que dentro de las vías de señalización inducidas tras la unión sus receptores, el control de la expresión de *junB* y de las proteínas de matriz extracelular, es independiente de la inhibición de proliferación mediada por la fosforilación de la pRB en células Mv1Lu (Laiho et al. 1991).

1.7 Endoglina

Endoglina es una glicoproteína de membrana, identificada a mediados de los años 80 mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra células linfoblásticas humanas (Quackenbush et al. 1985, 1986). Con posterioridad se demostró que uno de los anticuerpos obtenidos, 44G4, era altamente reactivo con un componente de la membrana endotelial (Gougos y Letarte 1988a). Estructuralmente, el antígeno reconocido por dicho Am corresponde a una glicoproteína de peso molecular 180 kDa, compuesta de dos monómeros de 95 kDa tras ser sometida a tratamientos reductores. Con posterioridad, también se ha identificado en proeritroblastos de la médula ósea del adulto (Burhing et al. 1991), sincitiotrofoblastos de la placenta (Gougos et al. 1992; St-Jacques et al. 1994a), así como en

precursores tempranos de células B, proeritroblastos y células estromales de la médula fetal (Rokhlin *et al.* 1995). En ratón, endoglina también ha sido identificada en las células estromales del tejido conectivo del intestino, estómago, corazón, músculo, útero, ovarios y testículos (St-Jacques *et al.* 1994b). En 1993, durante el V Taller Internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos se le asignó el “Cluster de Diferenciación” CD105 (Schlossman *et al.* 1995a).

1.8 Caracterización bioquímica y clonaje molecular

Endoglina es una glicoproteína, tal y como lo demuestra su capacidad de unión a diferentes lectinas (Gougos y Letarte 1988b). De su caracterización bioquímica mediante digestión enzimática con exo- y endoglicosidasas, se deduce que posee oligosacáridos unidos a las cadenas peptídicas a través de enlaces N-Asn y O-Ser/Thr (Gougos y Letarte 1988b) constituyendo aproximadamente el 35% en peso sobre el total de la glicoproteína.

En la actualidad se conocen las secuencias que codifican la proteína humana, murina y porcina tras el clonaje de los correspondientes ADNc. La primera en ser clonada fue la humana a partir de una librería de expresión de células endoteliales (Gougos y Letarte 1990). El ADNc aislado por este grupo no incluía la secuencia completa correspondiente al péptido señal y de su estructura primaria se deduce que es una proteína integral de membrana tipo I, compuesta por una porción extracelular formada por 561 residuos, un dominio transmembrana hidrofóbico formado por 25 , y un dominio intracelular formado por 47 residuos. El ARNm correspondiente es detectable como una sola banda de 3.7 kb. En la secuencia de la proteína existen cuatro sitios potenciales de glicosilación del tipo N-Asn y uno del tipo O-Ser/Thr en la porción extracelular. Una secuencia particular encontrada en la estructura primaria es el tripéptido RGD dentro de un entorno hidrofílico; esta secuencia RGD constituye un sitio de reconocimiento por algunas integrinas (Ruoslahti y Pierschbacher 1987; Hynes 1992). El hecho de que en la estructura primaria apareciera dicho motivo, el primero descrito en la superficie de células endoteliales, hizo pensar que la función de endoglina estuviera relacionada con fenómenos de adhesión celular. Sin embargo, la ausencia de dicho tripéptido en la proteína de cerdo y ratón, además de la ausencia de datos experimentales firmes en dicho sentido hasta hoy, parecen descartar la participación de endoglina en dichos procesos. Otro dato deducido de su secuencia fue la falta de homología con otras proteínas de secuencia previamente conocida, lo que le daba la particularidad de ser una proteína nueva.

Yamashita *et al* (1994) reportaron el clonaje de un ADNc correspondiente a la endoglina de cerdo a partir de una librería de expresión de útero porcino. Lo más característico de su secuencia era la ausencia del tripéptido RGD en la porción extracelular y un grado de homología variable con la endoglina humana; mientras que los dominios transmembrana y citoplásmico de ambas tienen un 96% de identidad, la porción extracelular sólo guarda un 66%. Mediante experimentos de inmunoprecipitación a partir de células endoteliales de la aorta de cerdo este grupo demostró que endoglina tiene un peso en condiciones no reductoras de 130 kDa, formada por dos monómeros de 85 kDa en condiciones reductoras. Similares resultados fueron obtenidos tras el clonaje de la endoglina murina (St-Jacques *et al.* 1994b; Ge *et al.* 1994) a partir de librerías de placenta y de células endoteliales de cerebro, respectivamente. El grado de homología, en conjunto, de las tres especies es del 70%, sin embargo, el dominio transmembrana y el citoplásmico, considerados por separado presentan un 95% de identidad. Como ya se ha comentado la secuencia RGD, también está ausente en la proteína murina.

1.9 Endoglina es un receptor del TGF- β

A partir del clonaje y secuenciación del betaglicano de rata, se pudo deducir la existencia de cierta homología de secuencia en la zona extracelular y una homología del 70 % en los dominios transmembrana y citoplásmico de ambas moléculas (López-Casillas *et al.* 1991; Wang *et al.* 1991), (fig.9).

Estos resultados sugirieron que endoglina podría ser un componente del sistema de receptores de TGF- β . Cheifetz *et. al.* (1992) demostraron que endoglina podía unir las isoformas $\beta 1$ y $\beta 3$ del TGF- β , pero no la isoforma $\beta 2$ tanto en células endoteliales como en COS transfectadas con un ADNc completo de la proteína. Además, mediante experimentos de competición se demostró que la afinidad de la unión de la forma $\beta 1$ era alta, calculándose una $K_d=50$ pM. Tres datos adicionales añaden relevancia a este resultado: Por una parte endoglina se encuentra altamente expresada en el endotelio, tejido donde no se expresa betaglicano, o la expresión es muy débil (Segarini *et al.* 1989; Fafeur *et al.* 1990; Cheifetz y Massagué 1991; Merwin *et al.* 1991); por otra parte existe una diferencia de especificidad respecto a las isoformas del TGF- β , mientras que betaglicano une las tres formas con alta afinidad, endoglina sólo une las formas $\beta 1$ y $\beta 3$ (López-Casillas *et al.* 1991; Cheifetz *et. al.* 1990); por último “el patrón” de respuesta de las células endoteliales a las isoformas del TGF- β se adapta a la especificidad de las isoformas que se unen a endoglina: Las isoformas del TGF- β , $\beta 1$ y $\beta 3$

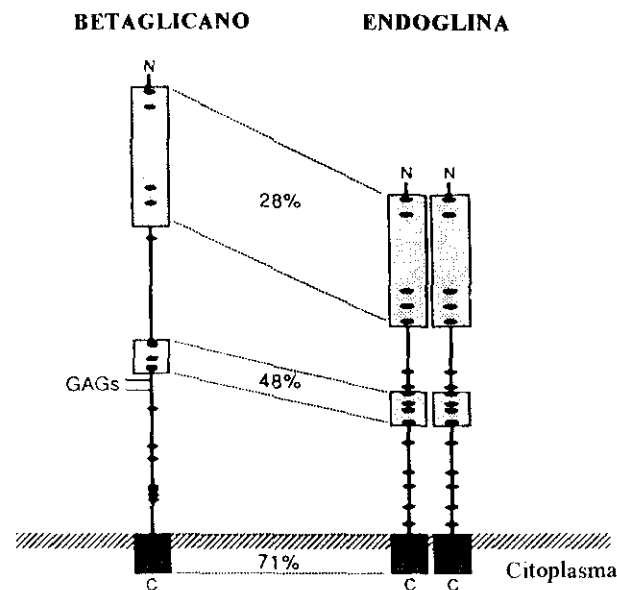


Fig. 8 Dominios estructurales de betaglicano y endoglina. Representación esquemática, resaltando las zonas de homología de secuencia de betaglicano y endoglina. Las regiones transmembrana y citoplásmica de ambas proteínas comparten un alto nivel de homología; dos regiones con débil similitud están presentes en los ectodominios de ambas proteínas (rectángulos sombreados). Los números representan el porcentaje de similitud en la secuencia entre los dominios de betaglicano y endoglina. Los ovalos horizontales representan las posiciones de los residuos de cisteína y los sitios potenciales de unión de los glicosaminoglicanos en el betaglicano también se indican (GAGs) (Cheifetz *et al.* 1992, *J. Biol. Chem.* 267:19027-19030)

son fuertes inhibidores de la proliferación de endotelio en varios sistemas experimentales, mientras que $\beta 2$ no lo es (Merwin *et al.* 1991; Cheifetz *et al.* 1990; Frater-Schroder *et al.* 1986). En apoyo de estos resultados ha sido recientemente descrito que la transfección de betaglicano en células endoteliales de aorta bovina incrementa las respuestas a la isoforma $\beta 2$ de dichas células (Sankar *et al.* 1995). En conjunto, es razonable suponer que endoglina y betaglicano pudieran actuar de modo similar sustituyendo uno a otro según el tipo celular. Un hecho también destacable que se puede deducir de los resultados de Cheifetz *et al.* (1992), es que el análisis de Scatchard realizado en células endoteliales demostró que el número de sitios de unión son aproximadamente 20.000 sitios/cel., y que al menos tres componentes contribuyen al total de los sitios (receptores I y II más endoglina); sin embargo se han calculado aproximadamente 1×10^6 moléculas de endoglina en la membrana del endotelio (Gougos *et al.* 1992), lo que implica una participación minoritaria de endoglina en la unión total de la citoquina y plantea la posibilidad de que ésta necesite algún componente adicional para unir el TGF- β . Funcionalmente betaglicano actúa en membrana como un presentador de la citoquina a los receptores señalizadores (López-Casillas *et al.* 1993), formando complejo en

presencia del TGF- β con el receptor II y aumentando los efectos que éste induce en las células. Esta potenciación de los efectos se hace especialmente evidente en el caso de la forma β_2 , que es unida por el receptor II con menor afinidad. De forma similar al betaglicano, se ha reportado la asociación de la endogлина porcina en presencia del TGF- β con los receptores señalizadores en células endoteliales (Yamashita *et al.* 1994). Sin embargo, cual pueda ser su papel en el contexto de las respuestas celulares mediadas por el TGF- β es desconocido.

1.10 Relevancia fisiológica de la presencia de endogлина en membrana

Es poco sabido hasta hoy, el posible papel que endogлина pueda jugar en las respuestas celulares mediadas por el TGF- β . Recientemente el gen de endogлина ha sido identificado como responsable de la telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (enfermedad de Osler-Weber-Rendu) (McAllister *et al.* 1994). Esta enfermedad, de baja incidencia, se transmite de forma autosómica dominante y se caracteriza por la presencia de alteraciones vasculares y hemorragias recurrentes, especialmente en la mucosa nasal, tracto gastrointestinal y la formación de telangiectasias viscerales. En algunos pacientes (20%) se producen malformaciones arterio-venosas en los pulmones y se asocian con complicaciones más graves como el infarto y accesos cerebrales. Endogлина ha sido localizada en el brazo largo del cromosoma 9 en humanos (Fernández-Ruiz *et al.* 1993), y en la zona proximal del cromosoma 2 murino (Qureshi *et al.* 1995). En concreto, la localización del gen humano corresponde a la zona 9q33-q34, la misma que ha sido identificada por McAllister *et al.* (1994) como la portadora de tres tipos de mutaciones en individuos afectados con dicha enfermedad: a) Un cambio de C por G que convierte una tirosina en un codón de terminación; b) Una delección de 39 pares de bases, y c) Una delección de 2 pares de bases la cual crea un codón prematuro de terminación. Aunque por el momento no se ha caracterizado cómo es la endogлина expresada por las células de dichos individuos, cómo afectan dichas mutaciones al nivel de expresión de la proteína en membrana, ni tampoco se conoce con certeza el mecanismo fisiopatológico de este síndrome, los síntomas de esta enfermedad indican que la función de la proteína pudiera estar muy relacionada con los procesos de angiogénesis, remodelación tisular, etc., de los que el TGF- β es un potente regulador. Sin embargo, la existencia de individuos con dicha enfermedad y que son portadores de mutaciones en el locus correspondiente al receptor II del TGF- β y no a endogлина (McAllister *et al.* 1994), así como la localización reciente del receptor I del factor en la misma zona que endogлина (9q33-q34), (Johnson *et al.* 1995) permite suponer que esta anomalía se encuentre asociada con alteraciones más generales de las

respuestas al TGF- β . En apoyo de la implicación de endogлина en los procesos de angiogénesis se encuentra el hecho de que su expresión se encuentra aumentada en el endotelio de algunas patologías de la piel (Westphal *et al.* 1993), y en el endotelio capilar angiogénico de tumores (Wang *et al.* 1993), respecto al endotelio normal adyacente.

1.11 PECAM-1

El antígeno CD31/PECAM-1 fue identificado a mediados de los años ochenta mediante el empleo de anticuerpos que reconocían moléculas presentes en la membrana de las células endoteliales y leucocitos, (Ohto *et al.* 1985; van Mourik *et al.* 1985; Goyert *et al.* 1986; Knapp *et al.* 1989). Los anticuerpos dirigidos contra esta proteína presentaban reactividad frente a neutrófilos y monocitos, y tenían la capacidad de inhibir la quimiotaxis de dichas células en ensayos donde se utilizaban sueros activados con endotoxina (Ohto *et al.* 1985). La especie molecular reconocida por dichos anticuerpos correspondía a una proteína de membrana con un peso molecular aproximado de 130 kDa, presente también en la membrana de plaquetas y endotelio (van Mourik *et al.* 1985), y en células del linaje mielóide (Goyert *et al.* 1986). Estudios posteriores identificaron a esta proteína como un componente del sistema de contacto célula-célula en el endotelio (Muller *et al.* 1989; Albelda *et al.* 1990). Newman *et al.* (1990) reportaron su clonaje molecular, denominándola PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1).

1.12 Estructura de PECAM-1

PECAM-1 es un glicoproteína transmembranal con un peso molecular ligeramente distinto dependiendo del tipo celular, posiblemente como consecuencia del diferente patrón de glicosilación que puede presentar (Ashman y Aylett 1991). El clonaje del ADNc humano que codifica esta proteína demostró una alta homología con otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Newman *et al.* 1990; Simmons *et al.* 1990; Ashman y Aylett 1991). El equivalente murino de PECAM-1 presenta una homología de secuencia con el humano de un 70-80% (Xie y Muller 1993).

La forma madura de la proteína expresada en membrana se estructura en un gran dominio extracelular, compuesto de 574 aminoácidos, un solo dominio transmembrana formado por 19 residuos hidrofóbicos y un dominio citoplásmico con 118 residuos (fig. 8). La región extracelular está organizada en seis dominios del tipo C2 característico de las inmunoglobulinas, y que a su vez se encuentran presentes en la familia de receptores de

adhesión celular (CAM) englobados dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Una característica de la porción extracelular es que posee nueve sitios potenciales de N-glicosilación, lo que explica el hallazgo de que los azúcares constituyen el 40% aproximadamente del peso de la proteína madura. El segundo dominio C2 en el extremo N-terminal, contiene una secuencia consenso para la unión a glicosaminoglicanos (Cardin y Weintraub 1989); con posterioridad se comentará la importancia funcional de dicha secuencia. El dominio citoplásmico contiene en su secuencia varias serinas, treoninas y tirosinas que representan sitios potencialmente fosforilables tras la activación celular (Newman *et al.* 1990). Experimentos de “pulso y caza” realizados con células endoteliales y la línea promonocítica U937 han demostrado que PECAM-1 es sintetizado por las células en forma de precursor con un peso de 110 kDa en un período entre 1-3 horas, el cual es posteriormente procesado hasta la forma madura de 130 kDa antes de aparecer en membrana. Los sitios de glicosilación y las estructuras glicosídicas asociadas al esqueleto proteico no se conocen con exactitud por el momento. En ambos tipos celulares el tiempo de recambio de la proteína se ha estimado en 48 horas (Goldberger *et al.* 1994a).

1.13 Organización genómica y formas alternativas de PECAM-1

El gen de PECAM-1 humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (DeLisser *et al.* 1994b). En esta misma zona del cromosoma también se encuentran los genes de otras moléculas de adhesión presentes en plaquetas y endotelio, como ICAM-2 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-2) y las glicoproteínas IIb y IIIa, lo que sugiere que esta zona podría corresponder a un sitio de localización común de moléculas de adhesión del endotelio. El gen que codifica para PECAM-1 ha sido caracterizado recientemente (DeLisser *et al.* 1994b). Está formado por una secuencia de más de 65 kb de ADN, lo que constituye el gen más grande de una molécula de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas conocido hasta hoy, y se encuentra organizado en 16 exones separados por intrones de longitud variable comprendidos entre 86 y 12000 pb (Fig. 8). La región 5' no traducida y el péptido señal están codificados por los dos primeros exones. Cada uno de los seis dominios extracelulares del tipo C2 está codificado por su propio exón (exones 3-8), el dominio transmembrana está codificado por el exón 9, y una serie de seis exones pequeños (del 10 al 16), con longitud comprendida entre 23 y 74 pb codifican el dominio citoplásmico. Esta

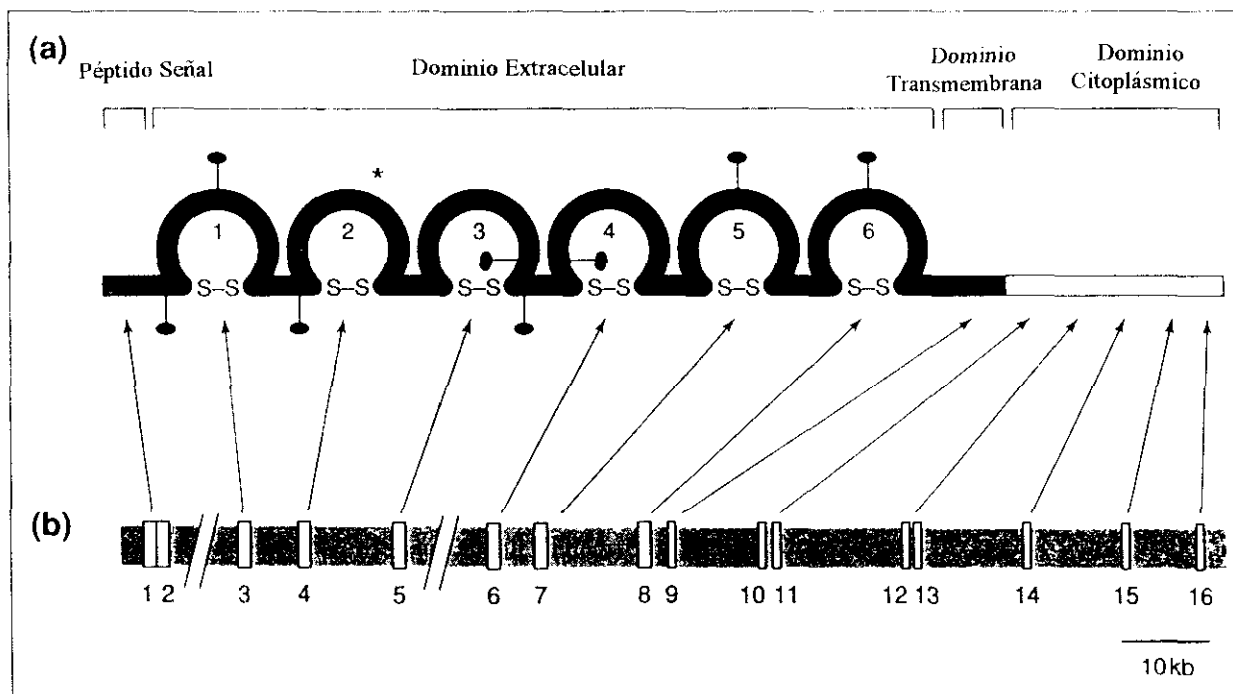


Fig. 9 Estructura de la proteína y organización genómica de PECAM-1. (a) La proteína está compuesta de seis dominios con homología a los del tipo C2 presentes en las Ig, formados por la unión intracatenaria de puentes disulfuro (S-S). Los círculos en negro representan sitios potenciales de N-glicosilación y el asterisco indica la posición de una secuencia de unión tipo heparina presente en el dominio 2. (b) El gen que codifica PECAM-1 está organizado en 16 exones (numerados en los rectángulos), separados por intrones de longitud variable (DeLisser *et al.* 1994. *Immunol. Today* 15:490-495)

organización difiere de la encontrada para otros miembros de su familia como ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1) o VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), en los cuales un solo exón codifica para los dominios transmembrana y citoplásmico (Voraberger *et al.* 1991; Cybulsky *et al.* 1991).

Varias formas alternativas de PECAM-1 humano y su equivalente murino han sido identificadas recientemente. Sin embargo, es importante destacar que todas las variantes aisladas difieren o bien en el dominio transmembrana o en el citoplásmico. Se conocen tres variantes en humanos: 1) Una isoforma que ha perdido 63 pb correspondientes al exón 13, en el dominio citoplásmico (DeLisser *et al.* 1994b); 2) Una isoforma aislada de células endoteliales de la vena umbilical, que es soluble, como resultado de la pérdida del exón 9

correspondiente al dominio transmembrana (Goldberger *et al.* 1994a); y 3) Una isoforma también aislada de endotelio umbilical que es expresada en niveles bajos y que ha perdido la secuencia correspondiente al exón 14, también en el dominio citoplásmico (DeLisser *et al.* 1994b). En ratón también se han encontrado formas alternativas; dos variantes han sido aisladas a partir de una librería de ADNc de tejido embrionario cardíaco las cuales presentan pérdidas de los exones 12 y 15 ó 14 y 15, correspondientes también al dominio intracelular de la proteína (Baldwin *et al.* 1994). Aunque por el momento no se conoce el significado funcional de todas estas isoformas, su existencia, probablemente como consecuencia de procesamientos alternativos del ARNm, sirva como mecanismo de regulación de las interacciones con su ligando.

1.14 Distribución celular de PECAM-1

Una propiedad importante de PECAM-1 es su amplia distribución en células de origen hematopoyético así como en el endotelio. PECAM-1 está presente en la membrana de plaquetas en niveles bajos (Ohto *et al.* 1985; van Mourik *et al.* 1985; Newman *et al.* 1990; Stockinger *et al.* 1990; Metzelaar *et al.* 1991). Además, su presencia ha sido descrita en los gránulos α de las plaquetas, lo que podría indicar que los niveles de expresión en la membrana plasmática pudieran ser aumentados tras la activación plaquetaria (Cramer *et al.* 1994). PECAM-1 se expresa en grandes cantidades en células endoteliales en cultivo, concentrándose en las zonas de contacto célula-célula; en dichas zonas de contacto se ha propuesto una relación tanto temporal como espacial entre PECAM-1 y las cadherinas (Ayalon *et al.* 1994). *In situ*, PECAM-1 se ha encontrado en el endotelio continuo de todos los vasos (Muller *et al.* 1989) por lo que se ha utilizado como un marcador inmunohistoquímico de los vasos sanguíneos y en particular de la angiogénesis (Page *et al.* 1992). Entre las poblaciones leucocitarias ha sido identificado en monocitos y neutrófilos (Ohto *et al.* 1985; Goyert *et al.* 1986, Stockinger *et al.* 1990; Newman *et al.* 1994), y en subpoblaciones de linfocitos T, especialmente las de fenotipo CD8 y CD45 RA (Stockinger *et al.* 1990; Ashman y Aylett 1991; Torimoto *et al.* 1992; Stockinger *et al.* 1992; Tanaka *et al.* 1992). PECAM-1 también está presente en precursores de la médula ósea y en líneas celulares de origen mieloide y megacariocítico (Ohto *et al.* 1985; Goyert *et al.* 1986; Simmons *et al.* 1990; Zandher *et al.* 1992; Cabañas *et al.* 1989; Watt *et al.* 1993; Goldberger *et al.* 1994b).

Aunque la expresión de PECAM-1 está asignada principalmente a células del sistema vascular y sanguíneo existen evidencias de que se encuentra en otros tipos celulares, habiendo

sido identificada en líneas humanas, de ratón y rata derivadas de tumores sólidos (Teng *et al.* 1993).

1.15 Aspectos funcionales de PECAM-1

La homología entre PECAM-1 y otras moléculas de adhesión celular pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, sugirió que la función de esta molécula también sería la actuar como un componente del sistema de adhesión celular. Este punto fue confirmado mediante la utilización de la línea L de fibroblastos de ratón, en los que se había transfectado el ADNc que codifica la proteína. En los ensayos realizados con estos transfectantes se demostró la formación de agregados que eran sensibles a la temperatura y a la presencia de cationes bivalentes durante la realización del ensayo. Además, la presencia de Am dirigidos contra PECAM-1 eran capaces de inhibir dichas agregaciones (Albelda *et al.* 1991; Muller *et al.* 1992; DeLisser *et al.* 1993, DeLisser *et al.* 1994a). En la actualidad, se admite que esta proteína es una molécula de adhesión que puede participar en dichos procesos a través de dos tipos de interacciones: Por una parte PECAM-1, puede interactuar consigo mismo (mecanismo de adhesión homofílica) (Albelda *et al.* 1991; Watt *et al.* 1993), y por otra parte también se ha propuesto un mecanismo de interacción con un receptor distinto al propio PECAM-1 (mecanismo de adhesión heterofílico) (Muller *et al.* 1992; DeLisser *et al.* 1993). Esta doble capacidad de unión a su contra-receptor ha sido también descrita para otras moléculas de adhesión de esta familia, en concreto para Ng-CAM (Neurona-glia Cell Adhesion Molecule) (Grumet y Edelman 1988), Nr-CAM (Neurona-glia related Cell Adhesion Molecule), (Mauro *et al.* 1992) y N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), (Murray y Jensen 1992; Rao *et al.* 1992).

Las interacciones homofílicas entre moléculas de PECAM-1 han sido demostradas en varios sistemas experimentales. PECAM-1 se concentra en la zona de contacto entre células endoteliales adyacentes y entre células COS o fibroblastos murinos 3T3, transfectados con el ADNc correspondiente. Además, se obtuvo un patrón similar de localización cuando se realizaron ensayos mezclando células endoteliales y transfectantes 3T3. Por el contrario, la proteína no se concentra en los bordes libres o en los sitios de contacto entre células no transfectadas y transfectadas (Albelda *et al.* 1990, 1991). Los estudios de microscopía electrónica también han demostrado un comportamiento similar en las plaquetas (Newman *et al.* 1992). Estudios de unión utilizando una forma recombinante soluble de la proteína también

demonstraron que ésta se unía a células COS transfectadas con la forma de membrana, pero no lo hacía sobre transfectantes control (Watt *et al.* 1993).

El mecanismo heterofílico también ha sido demostrado utilizando ensayos de agregación en poblaciones mixtas de células (Muller *et al.* 1992; DeLisser *et al.* 1993). En esos estudios se mezclaron células L transfectadas con PECAM-1 con células no transfectadas y se estimaron los agregados formados. Se pudo demostrar que las células transfectadas se unían tanto a células transfectadas como a las no transfectadas, lo que sugiere que PECAM-1 en la superficie de la célula transfectada se unía a un receptor diferente presente en la superficie de las células L. Este receptor podría ser un proteoglicano del tipo condroitín o heparán sulfato que interactuaría con PECAM-1 a través de una secuencia consenso de unión a glicosaminoglicanos presente en el segundo dominio C2 de la proteína (DeLisser *et al.* 1993). La secuencia que comprende el sexto dominio C2, el más próximo al transmembrana, también parece intervenir en el mecanismo de interacción heterofílico, ya que los epítomos reconocidos por los Am 4G6 y PECAM-1.2, los cuales inhiben las adhesiones mediadas por este mecanismo, se localizan en dicho dominio (DeLisser *et al.* 1994a). Un dato adicional que apoya la interacción heterofílica lo constituye el que el Am LYP21 que también se une al sexto dominio, así como un péptido que mimetiza el epítomo reconocido por el anticuerpo, pueden inhibir la reacción linfocitaria en cultivos mixtos, lo que además implicaría a PECAM-1 en la activación de dichas células (DeLisser *et al.* 1994b). Muy recientemente ha sido descrita la interacción entre PECAM-1 y la integrina $\alpha_v\beta_3$ mediada por el segundo dominio C2. Esta interacción no es inhibible por la presencia de heparina, lo que implica un tercer mecanismo de interacción que no es mediado por glicosaminoglicanos (Piali *et al.* 1995).

La región citoplásmica de PECAM-1 parece jugar un papel muy importante en la modulación de la interacción con su contra-receptor. Estudios iniciales con transfectantes de la proteína a los que se les había mutado la fracción intracelular demostraron que el dominio citoplásmico es necesario para la localización de PECAM-1 en las zonas de contacto célula-célula (DeLisser *et al.* 1994a). Además, la delección del exón 14 dentro del dominio citoplásmico, puede cambiar el mecanismo de interacción de heterofílico a homofílico, lo que sugiere que las secuencias de este exón son muy importantes en la determinación de la especificidad del ligando reconocido (DeLisser *et al.* 1994a). El mecanismo concreto por el cual dicho exón pueda cambiar las propiedades funcionales de PECAM-1 es desconocido; probablemente pueden estar implicados cambios en la conformación exterior de la proteína,

alteraciones en la fosforilación y/o cambios en la asociación al citoesqueleto. La fosforilación de PECAM-1 en el dominio citoplásmico ha sido descrita en varios sistemas, siendo la PKC u otra quinasa dependiente de esta actividad la responsable de su activación en plaquetas (Zehnder *et al.* 1992, Newman *et al.* 1992). Este último grupo demostró que la activación de plaquetas con trombina o con PMA daba como resultado la rápida fosforilación de PECAM-1 en residuos de serina, su asociación con el citoesqueleto y su redistribución dentro de la membrana. La fosforilación de PECAM-1 en residuos de tirosina también ha sido descrita en neutrófilos no activados (Skubitz *et al.* 1994).

1.16 Aspectos fisiológicos que implican la función de PECAM-1

Aunque actualmente se conocen muchos aspectos de la funcionalidad de PECAM-1, hasta hace poco tiempo no se han tenido resultados sobre sus posibles implicaciones *in vivo*. Los estudios más recientes sugieren que PECAM-1 podría estar implicado en dos procesos importantes: Los que concurren en la inflamación y los de angiogénesis.

1.16.1 Inflamación e interacción entre células endoteliales y leucocitos

El reclutamiento de los leucocitos en los sitios de inflamación se produce como consecuencia de una cascada de eventos en los cuales las moléculas de adhesión celular, las citoquinas y sustancias quimiotácticas funcionan de un forma altamente regulada para dirigir los leucocitos desde el lumen, a través de la barrera endotelial, hasta donde se produce el estímulo inflamatorio (Albelda *et al.* 1994). Recientemente, se ha demostrado que PECAM-1 está implicado en dicho proceso en dos modelos diferentes de activación de neutrófilos; tanto en respuesta a la inflamación en ratones inmunodeficientes como en ratas, se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra PECAM-1 bloquean la acumulación de neutrófilos en los sitios de inflamación tras la inducción de peritonitis aguda (Bogen *et al.* 1994), o la inducción de la respuesta inflamatoria (Vaporician *et al.* 1993). Aunque el papel preciso que juega PECAM-1 en el reclutamiento de leucocitos *in vivo* no está claro, los estudios *in vitro* han implicado a esta molécula en ambos lados de la interacción, es decir, tanto en el endotelio como en los leucocitos. Las evidencias en el sentido de la contribución de PECAM-1 presente en el endotelio han sido aportadas por Muller *et al.* (1993), quien demostró que tanto anticuerpos anti-PECAM-1, como una forma soluble recombinante de la proteína, bloqueaban la migración a través del endotelio de los leucocitos sin afectar la adhesión de dichas células. Por otro lado, también hay razones para suponer que PECAM-1, presente en la membrana leucocitaria, pueda estar implicada en este proceso, ya que anticuerpos dirigidos contra la

proteína aumentan la capacidad de adhesión celular mediada por integrinas (Torimoto *et al.* 1992; Berman *et al.* 1992; Piali *et al.* 1993).

1.16.2 Angiogénesis y desarrollo cardiovascular

Varias líneas de investigación han sugerido la implicación de PECAM-1 en los procesos de angiogénesis. Así, Albelda *et al.* (1990), demostraron que las células endoteliales crecidas en presencia de anticuerpos anti-PECAM-1 no podían formar normalmente los contactos célula-célula; y dicha inhibición podía ser revertida tras retirar dichos anticuerpos. Por otro lado, la adición de estos anticuerpos a monocapas en cultivo de células endoteliales no tenían ningún efecto. Estos resultados sugieren que PECAM-1 es importante para la iniciación de los contactos célula-célula pero no para su mantenimiento. Estudios recientes sobre la expresión de PECAM-1 durante el desarrollo morfogénico murino están de acuerdo con los hallazgos en la angiogénesis humana (Baldwin *et al.* 1994). El establecimiento del sistema cardiovascular, uno de los eventos más críticos en el desarrollo del embrión de vertebrados, depende de la interacción de las células endoteliales con las células adyacentes y con la matriz extracelular. PECAM-1 es una de las primeras moléculas de adhesión endotelial que aparece durante el desarrollo embrionario. De este trabajo se deduce además que PECAM-1 es uno de los marcadores más tempranos de la diferenciación del endocardio y que su expresión podría estar regulada durante el desarrollo cardiovascular.

2.-Objetivos

El TGF- β es una citoquina multifuncional que actúa sobre muchos tipos celulares y que ejerce importantes efectos biológicos sobre crecimiento, desarrollo y diferenciación; por todo ello es un modulador crítico de la fisiología celular. Admitiendo la relación entre las respuestas celulares producidas en presencia de un estímulo externo, y la regulación a la que dichas respuestas se ven sometidas a través de receptores específicos de dichos estímulos, nos propusimos cinco objetivos en el desarrollo de este trabajo:

1-Estudiar los efectos que el TGF- β induce en células monocíticas. Caracterizar los componentes implicados, tanto desde el punto de vista de la unión del factor a sus receptores, como de las posibles vías de señalización implicadas en las respuestas.

2-Characterizar las moléculas implicadas en el fenómeno de adhesión celular, considerado como uno de los efectos particulares inducido por el TGF- β en nuestro modelo, profundizando en los mecanismos moleculares que las regulan funcionalmente.

3- Caracterizar la expresión de endoglina como molécula asociada al linaje monocítico dentro de los tipos celulares sanguíneos, y estudiar su regulación por el factor.

4- Caracterizar la expresión en membrana de dos isoformas de endoglina y estudiar la fosforilación en sus dominios citoplásmicos así como su regulación por el TGF- β .

5- Caracterizar el papel funcional que endoglina desempeña en las respuestas celulares mediadas por el TGF- β en células monocíticas, realizando un estudio comparativo de las dos isoformas en las respuestas celulares analizadas.

3.-Materiales y Métodos

3.1 Soluciones y Reactivos

En este trabajo se utilizarán nombres genéricos de soluciones y reactivos, que con el fin de simplificar el texto se resumen en esta sección.

3.1.1 Soluciones

Tampón Hepes: 150 mM NaCl, 5mM KOH, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, pH 7.4

Tampón de lisis celular: 10 mM Tris-HCl pH 7.4 ,150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Tritón X-100, 1mM benzamidina sódica, 10µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de pepstatina, 50 µg/ml de leupeptina y 1mM fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF).

Tampón de carga para electroforesis de proteínas (2x): 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% dodecil sulfato sódico (SDS), 26% Glicerol, 0.2% Azul de Bromofenol y 20 mM de β-mercaptoetanol (sólo en el caso de utilizar condiciones reductoras para la identificación de proteínas).

Tampón de desarrollo de electroforesis de proteínas: 25 mM Tris base y 190 mM Glicocola pH 8.3.

Tampón MOPS (10x): 400mM MOPS, 100mM NaAc, 20 mM EDTA, 0.15% dietil pirocarbonato pH 7.

Tampón de carga de muestra de ARN: 50% Glicerol, 1mM EDTA, 0.4% Azul de Bromofenol, 0.15% dietil pirocarbonato. Esta solución se mezcló en proporción 1:10 respectivamente con la muestra, disuelta en MOPS (1x), 50% formamida, 6.3% formaldehído, 0.15% dietil pirocarbonato, en un volumen final de 30 µls.

Tampón de desarrollo de electroforesis para ARN: Tampón MOPS (1x).

Tampón SSC (20x): 3 M NaCl, 0.3 M NaCit pH 7.

Solución de Denhardt (50x): 1% de Ficoll 400, 1% de polivinilpirrolidona, 1% de albúmina de suero bovino (BSA).

Medio LB para crecimiento bacteriano: Composición por litro, triptona 10 gr., extracto de levadura 5 gr., NaCl 10 gr., este medio fue esterilizado mediante autoclave antes de su uso.

- PBS (tampón fosfato salino): 136 mM NaCl, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM KCl y 8 mM Na₂HPO₄ pH 7.4.

3.1.2 Reactivos

El TRIS utilizado fue de Merck (Merck, Darmstadt, Alemania), así como todas las sales inorgánicas, el EDTA y EGTA. El HEPES fue de Flow (Flow Laboratories, EE.UU). El MOPS, inhibidores de proteasas (benzanidina, aprotininina, pepstatina, leupeptina y PMSF), inhibidores de fosfatasas (molibdato, ortovanadato y fluoruro sódicos); inhibidores de quinasas (H-7 y estaurosporina); agarosa, el antibiótico geneticina (G418), heparina humana, dextrano, PMA, fibronectina humana purificada, azul de toluidina, citocalasina B y los marcadores de peso molecular para electroforesis (miosina de conejo 205 kDa, β -galactosidasa de *E. coli* 117 kDa, fosforilasa B de conejo 97 kDa, albúmina bovina 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica bovina 29 kDa) fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, EE.UU). El Ficoll (tipo 400) fue de Pharmacia (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) así como la proteína G acoplada covalentemente a sefarosa. El detergente Tritón X-100 fue de Calbiochem (Calbiochem Corp., La Jolla, EE.UU). El SDS fue de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, EE.UU). El factor transformante de crecimiento, recombinante humano TGF- β 1, fue de R&D (R&D Systems, Abingdom, Inglaterra). El TGF- β 2, el GM-CSF, M-CSF e IL-3, todos ellos recombinantes humanos, fueron obtenidos de Genzyme (Genzyme Corp., Boston, EE.UU). A lo largo de esta memoria y salvo indicación expresa la nomenclatura TGF- β hace referencia a la isoforma TGF- β 1

3.2 Material de Cultivo Celular

En la realización de este trabajo todo el material de cultivo empleado, tanto para el mantenimiento de células como para los ensayos descritos, fue plástico Costar (Costar, Cambrigde, EE.UU). Los medios de cultivo fueron RPMI 1640 y DMEM (Gibco, Life Technologies, Inc., Grand Island, EE.UU), suplementados con 10% de suero fetal bovino (FCS; Flow), previamente inactivado a 56° C durante 30 minutos, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 25 μ g/ml de gentamicina como antibióticos (todos ellos productos Gibco). En lo sucesivo dicha composición, salvo indicación expresa, se especificará como medio completo. Como soluciones de lavado celular se han utilizado Hank's (Gibco) o PBS, y en los ensayos donde fue necesario despegar células adherentes se utilizó tripsina 0.25%, 1mM EDTA en Hank's. Las células fueron mantenidas rutinariamente en fase exponencial de cultivo en un incubador Heraeus (Heraeus, Osterode, Alemania), en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Todas las manipulaciones que requirieron ambiente estéril se realizaron en una campana de

flujo laminar vertical Gelaire BSB4 (Gelaire, Italia). Las células fueron colectadas mediante centrifugación con una centrífuga de mesa GRP de Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, EE.UU) a 600xg durante 3 minutos.

3.3 Células

Tipos celulares de cuatro especies diferentes se han utilizado para el desarrollo de este trabajo: humanas, ratón, rata y mono. Las células humanas han sido líneas ya establecidas, células de sangre periférica, o células endoteliales obtenidas mediante cultivos primarios. Las líneas celulares humanas utilizadas han sido U937, promonocítica; HL60, mielomonocítica; JY, linfoblástica B; Jurkat, leucémica T y K562, eritroblástica. Todas fueron cultivadas en RPMI completo en crecimiento exponencial. Las poblaciones celulares de sangre periférica se obtuvieron a partir de donantes sanos. En el caso de eritrocitos y plaquetas, éstos fueron separados de la fracción leucocitaria por centrifugación directa de la sangre. Una vez separadas las tres fracciones (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), los eritrocitos y plaquetas fueron lavados con PBS o PBS 1mM EDTA respectivamente y resuspendidos a la concentración adecuada para su posterior análisis. Las poblaciones leucocitarias fueron separadas a partir de sangre completa mediante el método descrito por Böyum (1976), y en particular la purificación de monocitos se realizó por combinación de dicho método con el descrito por Freundlich *et al.* (1983). Para ello se realizó la sedimentación de los eritrocitos con una solución de 6% dextrano 0.15 M NaCl en proporción 1/5 (solución/sangre). Después de producirse la sedimentación, en aproximadamente 30 minutos, la parte superior queda enriquecida en plaquetas y leucocitos. Esta fracción se coloca cuidadosamente sobre una solución de Lymphoprep (d=1.077 gr/ml, Nycomed, Oslo, Noruega), en proporción 2/1 respectivamente y posteriormente se centrifuga a 800xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras este proceso se obtienen tres fracciones diferentes: la superior con plasma y plaquetas, la intermedia enriquecida en linfocitos y monocitos (fracción mononuclear), y la inferior con las células polimorfonucleares y eritrocitos contaminantes. La purificación de las células polimorfonucleares se realiza mediante la repetición de varios ciclos de lisis hipotónica de los eritrocitos con agua durante 30 segundos, proceso en el cual las células polimorfonucleares no sufren alteraciones apreciables. La fase intermedia de linfocitos y monocitos es recogida y lavada dos veces con Hank's. La separación entre monocitos y linfocitos se realiza mediante adherencia a plástico de cultivo que ha sido previamente tratado a 37° C durante 1 hora con plasma autólogo, o en su defecto plasma AB+, tras incubación durante 1 hora de la fracción mononuclear de células en medio completo. Las

células no adherentes (fundamentalmente linfocitos), son separadas mediante lavados con RPMI en ausencia de suero. De este modo los monocitos quedan adheridos al frasco de cultivo, siendo el grado de pureza, según criterios morfológicos y de marcadores de membrana, de aproximadamente un 95%. En los ensayos pertinentes los monocitos purificados fueron puestos en cultivo con medio completo y a los tiempos indicados fueron recogidos con Hank's 1mM EDTA durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, fueron lavados con PBS y resuspendidos a la concentración adecuada para el correspondiente ensayo.

Las células endoteliales fueron obtenidas a partir de cordones umbilicales de donantes sanos mediante perfusión de la vena umbilical con colagenasa (Boehringer) a una concentración de 1 mg/ml (A.E.: 0.258 U/mg) tal y como se ha descrito (Muller *et al.* 1986). Tras incubación durante 30 minutos a 37°C con dicha actividad enzimática, las células fueron recogidas mediante lavado de la vena con Hank's; y una vez colectadas fueron cultivadas en RPMI suplementado con glutamina, antibióticos, 20% de FCS, 50 µg/ml de suplemento para crecimiento de células endoteliales (Collaborative Research, EE.UU) y 100 µg/ml de heparina. En los ensayos pertinentes, estas células se utilizaron entre los los pases 2-4, haciendo dilución del cultivo tras confluencia en proporción 1/5.

Las células de ratón utilizadas fueron las de la línea de fibroblastos L929. Esta línea se mantuvo en cultivo empleando RPMI completo hasta confluencia, realizando pases en dilución 1/5. Cuando fue necesario, las células fueron recogidas mediante tratamiento con tripsina/EDTA durante 3 minutos a temperatura ambiente; la reacción de la tripsina se detuvo mediante adición de RPMI completo, las células fueron lavadas con Hank's y resuspendidas a las concentraciones adecuadas.

Las células de rata utilizadas fueron las de la línea de mioblastos de músculo esquelético L₆E₉. Esta línea se mantuvo en cultivo en las mismas condiciones que las citadas para los fibroblastos de ratón, excepto que el medio fue DMEM y la proporción del suero fetal bovino fue del 20%.

Las células de mono utilizadas fueron las de la línea epitelial de riñón COS-7. Esta línea se mantuvo en cultivo en las mismas condiciones citadas anteriormente para los fibroblastos y al igual que L₆E₉, el medio utilizado fue DMEM completo (en este caso la proporción de suero fetal bovino fue del 10%).

3.4 Anticuerpos

En este trabajo se han utilizado tanto anticuerpos monoclonales como anticuerpos policlonales. Los siguientes Am fueron usados: 8E11, generado en nuestro laboratorio mediante inmunización de ratones BALB/c con células U937 tratadas con PMA durante 48 horas, siguiendo el método descrito por Cabañas *et al.* (1989). Este Am se seleccionó por su más alta reactividad, evaluada mediante un ensayo de citometría de flujo con las células U937 tratadas con el ester de forbol, frente a las no tratadas. El isotipo de este Am es IgM, como se demostró mediante un "kit" de determinación de inmunoglobulinas (Hollan Biotechnology, Amsterdam, Holanda). El Am 44G4 pertenece a la subclase IgG1 y reconoce endoglina (Gougos y Letarte 1988a). El Am HC1/6 reconoce CD31 (Cabañas *et al.* 1989; Schlossman *et al.* 1995b), y pertenece a la subclase IgG1. Los Ams HC1/1, FG1/6, FG2/2 y D3/9 reconocen CD11c, receptor de transferrina o CD71, β 2-microglobulina y CD45 respectivamente, (Cabañas *et al.* 1988; Bernabeu *et al.* 1986). Los Ams Bear1 (anti CD11b), Bear2 (anti CD14) fueron gentilmente cedidos por el Dr. C. Figdor (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam). El Am RR1/1 reconoce ICAM-1 (CD54) y fue gentilmente cedido por el Dr. T.A. Springer (Harvard Medical School, Boston). Los Ams HP1/7, TS2/16 y TS1/18 reconocen CD49d, CD29 y CD11a respectivamente y fueron una cesión generosa del Dr. Francisco Sánchez Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid). El Am P1D6 (Telios Pharmaceuticals, Palo Alto, EE.UU) está dirigido contra CD49e. HEC-75 (CLB Laboratories, Amsterdam, Holanda) reconoce CD31, así como los Ams SG134, GI18, NIH31-2, PECAM-1.3 y MB35 obtenidos de la sección de plaquetas del V Taller Internacional sobre Antígenos Humanos de Diferenciación de Leucocitos.

En nuestro laboratorio obtuvimos Aps frente a PECAM-1 en conejos tras inmunización con PECAM-1 purificado a partir de extractos solubles de células U937 tratadas con PMA. Los Aps de conejo anti Receptor tipo II humano del TGF- β , así como el péptido control, fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (California, EE.UU), y los Aps de pollo anti-TGF- β fueron de R & D Systems. Los Aps anti-fibronectina, fueron gentilmente cedidos por la Dra A. García Pardo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). La tabla 2 resume la especificidad y nomenclatura de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Especificidad
8E11	Endoglina (CD105)
44G4	Endoglina (CD105)
HCl/6	PECAM-1 (CD31)
HCl/1	gp 150,95 (CD11c)
FG1/6	Rec. Transferrina (CD71)
FG2/2	β 2-microglobulina
Bear 1	gp 160,95 (CD11b)
Bear2	gp 55 (CD14)
RR1/1	ICAM-1 (CD54)
HP1/7	Integrina $\alpha_4\beta_1$ (CD49d)
TS2/16	Integrinas cad β_1 (CD29)
TS1/18	LFA-1 α (CD11a)
D3/9	LCA, T200 (CD45)
P1D6	Integrina $\alpha_5\beta_1$ (CD49e)
HEC-75	PECAM-1 (CD31)
SG134	PECAM-1 (CD31)
GI18	PECAM-1 (CD31)
NIH31-2	PECAM-1 (CD31)
PECAM-1.3	PECAM-1 (CD31)
MB35	PECAM-1 (CD31)
Policlonal	PECAM-1 (CD31) (gen. en conejo)
Policlonal	Anti-RII del TGF- β (gen. en conejo)
Policlonal	Anti-TGF- β (gen. en pollo)
Policlonal	Anti-80 Kda Fibronectina (gen. en conejo)

Tabla 2. Resumen de los anticuerpos monoclonales y policlonales utilizados en la realización de este trabajo. Todos los Ams han sido generados en ratón

3.5 Inmunohistoquímica

Biopsias de diferentes tejidos humanos fueron obtenidas por el Dr. Agustín Acevedo (Hospital de la Princesa, Madrid). Las muestras de bazo, amígdala, nódulo linfático e hígado fueron teñidas con el correspondiente Am , seguido de incubación con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, o bien, mediante el método de antifosfatasa-fosfatasa alcalina (Cabañas *et al.* 1989).

3.6 Marcaje de Superficie

En la realización de este trabajo se han utilizado dos métodos diferentes para identificar proteínas de superficie celular: Radiomarcaje de superficie con (^{125}I) y marcaje con biotina.

El marcaje de superficie con (^{125}I) se realizó mediante IODO-GEN (Pierce), siguiendo el protocolo descrito (Fracker y Speck 1978). Tras el marcaje, se obtuvieron extractos solubles con tampón de lisis a 4°C durante 40 minutos. Tras este proceso, los lisados fueron centrifugados a 12000xg durante 15 minutos a 4°C. De esta manera, fueron separadas las fracciones soluble e insoluble. La fracción soluble fue sometida a inmunoprecipitación específica.

El marcaje de superficie con biotina se realizó sobre células U937, en suspensión, a una concentración de 2×10^6 cel/ml, y sobre cultivos confluentes de células adherentes L₆E₉ y COS-7, en placas de cultivo de 60 mm. de diámetro ($1,5-2 \times 10^6$ células/placa). En todos los casos, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con Hank's. Previamente al marcaje, las células fueron equilibradas en tampón Hepes durante 30 minutos a 4° C. Tras este período, se retiró el tampón y se añadió tampón nuevo en presencia de 0.5 mg/ml de NHS-LC-Biotina (Pierce). Tras una incubación durante dos horas a 4°C con agitación suave, las células fueron recogidas por centrifugación (en el caso de las células adherentes, se comprobó que la tripsinización no afectaba a la expresión en membrana de la proteína que se trataba de identificar). Una vez colectadas, se hicieron extractos solubles con tampón de lisis durante 40 minutos y posterior centrifugación a 12000xg durante 15 minutos, manteniendo durante todo el proceso la temperatura a 4° C. La fracción soluble fue sometida a inmunoprecipitación específica.

3.7 Inmunoprecipitación

En general, todas las inmunoprecipitaciones fueron llevadas a cabo a 4° C con proteína G unida covalentemente a Sefarosa, aunque en algún caso particular se utilizó Proteína A acoplada a Sefarosa. Para ello, los extractos solubles fueron preaclerados con 50 μl s de Proteína G durante 4 horas. Tras este proceso, las muestras fueron centrifugadas a 12000xg durante 2

minutos, y el sobrenadante fue añadido a 50 µl de Proteína G-Sefarosa, a la que previamente se había unido el correspondiente anticuerpo mediante incubación por un período mínimo de 4 horas. Los anticuerpos se utilizaron en forma de sobrenadante del hibridoma correspondiente (200 µl), diluciones 1/500 de fluido ascítico (200 µl) o cuando se dispuso de anticuerpos purificados se usaron 5µg de los Aps anti-receptor II del TGF-β ó 10 µg de los Ap anti-fibronectina. La mezcla [Sefarosa-Proteína G-Anticuerpo + extracto celular] fue incubada durante toda la noche en agitación. Cuando se utilizó el Am 8E11 (IgM), el preacoplamiento del anticuerpo se realizó sobre Sefarosa Proteína G, a su vez pretratada con el Am 187.1 de rata anti-cadena Kappa de ratón (Yelton *et al.* 1981). Tras la incubación durante toda la noche, las muestras fueron centrifugadas a 12000xg durante dos minutos y la fracción insoluble (Proteína G-Sefarosa) fue lavada dos veces con 1 ml de tampón de lisis antes de ser sometidas a electroforesis.

3.8 Análisis del ARN

ARN total fue aislado de las células utilizando el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Las muestras de ARN (10 µg) fueron desnaturalizadas y fraccionadas en geles de agarosa al 1% en presencia de formaldehído. Una vez realizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, EE.UU) mediante capilaridad durante toda la noche. Una vez transferido, el ARN fue fijado a la membrana por tratamiento térmico a 80°C durante 2 horas. Las membranas fueron pretratadas con solución de hibridación (40 ml de solución compuesta por 20 ml formamida, 10 ml SSC (20x), 2 ml Denhart's (50x), 2 ml 1M NaH₂PO₄, 1ml ADN de espermatozoos de salmón (10 mg/ml) y 5 ml agua, durante 6 horas a 42°C. Tras el pretratamiento, las membranas fueron hibridadas en la misma solución añadiendo un exceso de sonda marcada con (³²P). El marcaje de las sondas se realizó mediante el método de "Random Primer" (Feinberg y Vogelstein 1983), utilizando para ello un "kit" comercial (Amersham). La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 42°C, y a continuación se lavaron las membranas de la siguiente forma: Tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con SSC (2x) + 0.1% de SDS; un lavado de 30 minutos a 52°C con SSC (0.1x) + 0.1% de SDS. Todos estos procesos se llevaron a cabo utilizando un horno de hibridación (Techne, Inglaterra).

Las sondas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: El fragmento EcoRI de 2.6 kb a partir del ADNc de endoglina (Gougos y Letarte 1990). El fragmento XhoI de 0.7 kb a partir del ADNc de PECAM-1 (Simmons et al. 1990). El fragmento XhoI/NcoI de 2.7 kb del ADNc

de *c-fos* (Van Straaten *et al.* 1983). El fragmento EcoRI/PstI de 2.6 kb del ADNc de *c-jun* en pUC19 (Ryseck *et al.* 1988). El Fragmento ClaI/EcoRI de 1.5 Kb obtenido a partir del tercer exón de *c-myc* (Dalla Favera *et al.* 1982). El fragmento KpnI/Bgl II de 0.66 Kb obtenido a partir del ADNc de β -actina de pollo. La sonda de actina fue utilizada como control de cantidad de carga en los geles de ARN en algunos experimentos aunque, en su mayoría se utilizó la tinción con bromuro de etidio de los ARNr. Todas las sondas fueron obtenidas a partir del aislamiento del fragmento de ADNc presente en los correspondientes plásmidos, con los que se había transformado la cepa DH5 α ' de *E.coli* crecida en medio LB. Las bandas específicas radiomarcadas fueron detectadas mediante películas de autorradiografía (Kodak, USA) o mediante un PhosphorImager 410A y el "software" ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EE.UU).

3.9 Electroforesis de proteínas

Las proteínas fueron separadas y analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, básicamente utilizando el método descrito (Laemmli 1970). Muestras de extractos celulares totales, o bien inmunoprecipitados fueron diluidos con tampón de carga de muestra, hervidos durante 5 minutos y, salvo indicación expresa, fueron analizadas siempre en minigeles adaptados al sistema de electroforesis de Bio-Rad. Para la formación de los geles se utilizó acrilamida mezclada con N-N'-metilen-bis-acrilamida en una proporción de 37.5/1 respectivamente (Bio-Rad). Como agentes polimerizantes se utilizaron N,N,N',N'-tetrametilen diamina (TEMED) y persulfato amónico al 10%, ambos de Bio-Rad. Los tampones base para la formación de los geles, concentrador y separador fueron 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 y 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, respectivamente. Los geles con porcentajes de acrilamida del 6 y 7.5 % fueron los más empleados como separadores, mientras que los geles concentradores fueron del 4%. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón de electroforesis de proteínas a voltaje constante de 180 V durante aproximadamente 1 hora. Terminada la electroforesis los geles fueron fijados con una solución del 20% de metanol y 7% de ácido acético. Una vez fijados fueron secados y las bandas detectadas mediante película de autorradiografía (Kodak) o un PhosphorImager 410A (Molecular Dynamics).

3.10 Electroforesis de ARN

Una vez aislado el ARN, se cuantificó y midió el grado de pureza mediante espectrofotometría, utilizando las absorbancias a 260 y 280 nm y entonces las muestras fueron diluidas con tampón de carga. Para la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 1%, tampón

MOPS (1x), 7% formaldehído, 0.5 µg/ml bromuro de etidio, 0.15% dietil pirocarbonato. Las electroforesis se realizaron a una intensidad constante de 25mA durante toda la noche.

3.11 Citometría de Flujo

El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo tratando las muestras siempre a 4°C, mediante incubación de 100 µl de suspensión celular en PBS (concentración aproximada de 5×10^6 células/ml) con el correspondiente anticuerpo (100 µl de sobrenadante de hibridoma o 100 µl de una dilución 1/500 de fluido ascítico), durante 30 minutos. Tras un lavado con 1 ml de PBS, las células se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Sobre el sedimento celular se añadieron directamente 50 µl de una dilución 1/30 de fragmentos F(ab)² de conejo anti-ratón marcados con isotiocianato de fluoresceína (Dakopats, Noruega). Tras una nueva incubación durante 30 minutos, las células fueron lavadas como antes, centrifugadas y resuspendidas en 250 µl de PBS. Dichas muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo modelo EPICS CS o EPICS XL (Coulter Científica, Móstoles, España), usando amplificación logarítmica para detectar fluorescencia. Para determinar el blanco del ensayo se utilizó sobrenadante de cultivo del hibridoma X63 como anticuerpo irrelevante o alternativamente se hizo el marcaje en ausencia del primer anticuerpo.

3.12 Generación de transfectantes

En la realización de este trabajo se han generado tanto células transfectadas establemente como células transfectadas de modo transitorio, para ello se han seguido los procedimientos descritos (Sambrook *et al.* 1989; Ausabel *et al.* 1993). Las células transfectadas establemente fueron U937, L₆E₉ y L929. Las transfecciones transitorias correspondieron a células COS-7. Para estas transfecciones se han utilizado diferentes vectores de expresión, conteniendo en cada caso los ADNc que codifican para la proteína completa en cuestión: El ADNc de endoglina (isoformas L y S) insertado en el vector pCEXV (Miller *et al.* 1986), se utilizó para las transfecciones estables. Para las transfecciones transitorias, los ADNc se insertaron en un sitio EcoRI del vector pCMV5 (Invitrogen, EE.UU). El ADNc correspondiente a PECAM-1 en el vector CDM8 (generosamente cedido por el Dr. Brian Seed, Massachusetts General Hospital, Boston, EE.UU), fue utilizado para su transfección estable. Los receptores I y II humanos del TGF-β clonados en pCMV5 fueron generosamente cedidos por el Dr. Joan Massagué (Sloan Kettering Center, New York, EE.UU). Como método de selección en las transfecciones estables se utilizó el antibiótico G418 (Neomicina), (Southern y Berg 1982), para lo que en dichas

transfecciones se incluyó un plásmido que permitió la selección de las células transfectadas resistentes a dicho antibiótico; el plásmido utilizado fue el pSV2Neo

Los transfectantes estables de Endogлина (ambas isoformas) y PECAM-1 en fibroblastos L929 fueron generados por cotransfección de los correspondientes plásmidos y pSV2Neo por el método del fosfato cálcico, sobre $1-2 \times 10^5$ células. En la transfección se utilizaron 40 μg totales de ADN con una proporción de 10/1 para plásmido con ADNc/pSV2Neo. Tras el proceso de transfección, las células fueron seleccionadas con 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 y los clones obtenidos fueron seleccionados mediante ensayo de citometría de flujo. Los transfectantes estables de endogлина en células U937 se obtuvieron mediante electroporación utilizando, en este caso, los plásmidos linearizados mediante digestión con BamHI. La cantidad de ADN utilizada fue de 100 μg , para 3×10^7 células. Para la electroporación, las células (resuspendidas en 400 μl de RPMI) se mezclaron con el ADN (resuspendido en 100 μl), en cubetas de 2 mm de un electroporador ECM 6000 (BTX, EE.UU), utilizando las siguientes condiciones experimentales: 100 voltios, 2950 microfaradios, 186 ohmios, siendo la duración del pulso de 30 milisegundos aproximadamente. Tras este proceso, las células fueron lavadas con RPMI y puestas en cultivo en RPMI completo. A las 24 horas, se cambió el medio y se añadió 1.5 mg/ml de G418 para seleccionar las células transfectadas. La expresión de endogлина fue determinada mediante un ensayo de citometría de flujo. En la realización de este trabajo se utilizaron mayoritariamente poblaciones de clones, aunque algunos experimentos (donde se indique) se realizaron con clones obtenidos mediante dilución límite. Los transfectantes estables de Endogлина en células L₆E₉ fueron obtenidos mediante el método de lipofectina (Felgner et al. 1982). En este caso, se utilizaron las condiciones proporcionadas por el fabricante (Gibco), que consistieron en mezclar 20 μg totales de DNA (plásmido de endogлина en pCEXV sin linearizar junto con pSV2Neo en proporción 10/1 respectivamente), con 20 μg de Lipofectina en un volumen total de 200 μl de DMEM. Esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos, período tras el cual el volumen se igualó a 2 ml con DMEM y se añadió a los cultivos subconfluentes de células en placas de 60 mm de diámetro (aproximadamente $3-4 \times 10^5$ células/placa). Tras 24 horas de transfección, las células fueron expandidas en proporción 1/3 (relación de superficie) y puestas en cultivo en DMEM completo en presencia de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antibiótico G418. Tras la selección con el antibiótico, los clones fueron catalogados como positivos o negativos mediante un ensayo de citometría de flujo. En todas las transfecciones estables se incluyó un control de células transfectadas sólo con el plásmido de resistencia pSV2Neo.

Las transfecciones transitorias en células COS-7 se realizaron también con el método de Lipofectina como se acaba de describir, excepto que en estos ensayos se cotransfectaron distintas combinaciones de las isoformas de endoglina en el plásmido pCMV5 y/o los receptores Tipo I y II humanos del TGF- β , en dicho plásmido. Como control, se incluyeron transfecciones con el plásmido sin inserto. Los ensayos de expresión, (en este caso detección de receptores mediante radiomarcaje de afinidad), fueron realizados a las 72 horas pos-transfección.

3.13 Ensayos de proliferación celular

Células U937 fueron puestas en cultivo en medio RPMI completo utilizando placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano. La concentración fue de 3×10^4 células/pocillo en 100 μ l de volumen. En estos ensayos las células fueron tratadas con las concentraciones y reactivos que en cada caso se indican. Seis horas antes de la terminación del ensayo, se añadió a los cultivos 1 μ Ci/pocillo de (3 H)-metil-timidina (A.E.: 2 Ci/mmol; Amersham Ibérica, Madrid, España). Las muestras, por triplicado, fueron recogidas mediante un colector celular Skatron (Skatron, Lier, Noruega), mezcladas con líquido de centelleo y la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN fue estimada en un contador 1219 Rackbeta para emisión β (LKB, Bromma, Suecia).

3.14 Ensayos de adhesión célula-célula

Dos tipos diferentes de ensayos de adhesión célula-célula se han realizado en este trabajo: Adhesiones homotípicas entre células U937 y adhesiones heterotípicas entre células U937 y fibroblastos L929 transfectados con PECAM-1. Los primeros se realizaron en las mismas condiciones de cultivo que se han señalado en el apartado “Ensayos de Proliferación Celular”. En cada caso, los tratamientos correspondientes fueron realizados por triplicado y la cuantificación del porcentaje de células agregadas, a diferentes tiempos, se realizó mediante observación con un microscopio de contraste de fase (Nikon Diaphot, Tokio, Japón). El cálculo del porcentaje se hizo mediante ensayo ciego con tres observadores. Las adhesiones heterofílicas fueron realizadas mediante co-cultivo de células U937 y transfectantes de fibroblastos. Para ello, 2.5×10^4 fibroblastos (transfectantes control y de PECAM-1) fueron puestos en cultivo en placas de 96 pocillos de fondo plano en RPMI completo. A las cuatro horas (tiempo en el que se produce la adhesión de los fibroblastos al sustrato), se añadieron 3×10^4 células U937, en un volumen final de 200 μ l. Estos co-cultivos fueron realizados por triplicado y en ausencia o presencia de 500 pM de TGF- β , durante 24 horas. Transcurrido este tiempo las placas fueron lavadas suavemente con RPMI, previamente calentado a 37° C. La estimación del número de células U937 adheridas a los transfectantes se realizó mediante dos métodos diferentes: En el

primero, una vez lavadas las placas, las células U937 se tiñeron con el anticuerpo D3/9 (anti-CD45). Tras incubación con el anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente, los pocillos fueron lavados dos veces con RPMI y se realizó una segunda incubación en las mismas condiciones con IgG de cabra anti-ratón acoplada a Dynabeads (Dyna, Oslo, Noruega). El fundamento de este proceso es aprovechar la refringencia de las bolitas magnéticas y poder cuantificar utilizando el microscopio de contraste de fases. La preparación de Dynabeads se usó a la dilución correspondiente para añadir 2×10^5 bolitas/pocillo. Finalizada la segunda incubación se procedió de nuevo al lavado de las placas tal y como antes se ha referido. La cuantificación se realizó contando bolitas/campo en los triplicados. El segundo método se realizó mediante marcaje metabólico de las células U937 con (^3H)-metil-timidina. Para ello, células U937 (5×10^5 células/ml) fueron cultivadas en RPMI completo durante 14 horas en presencia de $5 \mu\text{Ci/ml}$ del marcador radiactivo. Tras este período las células fueron lavadas dos veces con RPMI y puestas a la concentración adecuada para realizar el co-cultivo con los transfectantes en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Transcurridas 24 horas, las placas fueron lavadas de modo similar y el cultivo contenido en el pocillo fue recogido mediante lisis con una solución $0.1 \text{ N NaOH} + 0.1\% \text{ SDS}$. La radiactividad asociada a los pocillos (por triplicado), fue estimada con líquido de centelleo en un contador para emisión β .

3.15 Ensayos de adhesión célula-sustrato extracelular

En este trabajo se han realizado dos tipos diferentes de ensayos para medir la capacidad de adhesión a sustrato de las células: Capacidad de adhesión directa al plástico de cultivo, o capacidad de unión a fibronectina previamente unida a plástico. En ambas metodologías se utilizaron células U937 transfectadas (control y ambas isoformas de endoglin), por triplicado. Los ensayos de unión directa se realizaron cultivando 5×10^4 células por pocillo en presencia o ausencia de 500 pM de $\text{TGF-}\beta$ a diferentes tiempos. En los ensayos de unión a fibronectina unida a sustrato, placas de cultivo de 96 pocillos, fueron tratadas con $100 \mu\text{l}$ de una solución de fibronectina en PBS durante 2 horas a 37°C , siendo la cantidad total de proteína añadida al pocillo de $1 \mu\text{g/cm}^2$. Transcurrido este tiempo los pocillos fueron lavados tres veces con PBS e incubados con $100 \mu\text{l}$ de una solución 1% de BSA en PBS, durante un período adicional de 1 hora a 37°C ; entonces, se lavaron de nuevo tres veces con PBS. Las células que se añadieron a estos pocillos habían sido tratadas durante 24 horas en RPMI completo (5×10^5 células/ml), en presencia de 500 pM de $\text{TGF-}\beta$. Tras este tratamiento fueron recogidas y lavadas con RPMI y

resuspendidas en RPMI , 1% BSA , 10mM Hepes pH 7.4 a la misma concentración y se añadieron 100 µl de esta suspensión a los pocillos, incubándose durante 1 hora a 37° C.

En ambos casos, terminados los tiempos de incubación el medio de cultivo fue retirado suavemente y los pocillos lavados dos veces con 100 µl de 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ en PBS. Las células unidas al pocillo fueron fijadas durante toda la noche con 1% de glutaraldehído a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS y las células teñidas con 0.1% de azul de toluidina durante 2 horas en las mismas condiciones de temperatura. Una vez teñidas las células, los pocillos se lavaron tres veces de nuevo y el colorante asociado a las células fue extraído con 100 µl de una solución al 10% de ácido acético. La absorbancia en los pocillos a 628 nm fue estimada mediante un Multiscan Biochromatic (Labsystem, Helsinki, Finlandia). El porcentaje de células unidas al sustrato se calculó utilizando un curva de calibración

3.16 Oligonucleótidos anti-sentido

En este estudio se diseñó un oligonucleótido de 21 nucleótidos correspondientes a la secuencia anti-sentido que flanquea el sitio de iniciación de la traducción del ARNm de PECAM-1. Como control, se utilizó la secuencia anti-sentido de la cadena ligera de IgG humana. Los oligonucleótidos fueron sintetizados usando monómeros modificados en forma de fosforotioato (Murray 1992), mediante un sintetizador Gene Assembler Special (Pharmacia). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

Anti-sentido PECAM-1: 5'-CCACCTCGGCTGCATCCTGAG-3'. Control: 5'-ACCCAGCTCAGCTCAGCTC-3'. En los estudios de inhibición celular realizados con células U937 los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 200µM.

3.17 Marcajes metabólicos con (³⁵S)-Met/Cys

Los marcajes metabólicos con (³⁵S)-Met/Cys fueron utilizados en dos tipos celulares diferentes: Fibroblastos L929 y células U937. En los transfectantes L929 el marcaje se realizó con cultivos confluentes de las células en frascos de 75 cm², a los que se les retiró el medio, fueron lavados con Hank's y después se incubaron a 37° C durante 30 minutos en RPMI sin metionina ni cisteína (ICN Biomedicals, Barcelona, España). Tras este período, se retiró el medio y se añadió de nuevo RPMI sin metionina/cisteína suplementado con 10% de FCS previamente dializado frente a PBS. El marcaje se hizo utilizando 100 µCi/ml de (³⁵S)-metionina/cisteína (Trans ³⁵S-label; A.E.: >1000 Ci/mmol; ICN Biomedicals) durante 12 horas a 37° C. Una vez terminado el período de incubación, el medio fue retirado y las células lavadas

con PBS, levantadas por tripsinización y colectadas mediante centrifugación. Después, las células fueron lisadas con tampón de lisis y sometidas a inmunoprecipitación con el Am 44G4 (anti-endoglina) como se describe en el apartado “Inmunoprecipitación”.

Las células U937 transfectadas fueron sometidas a marcaje metabólico en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, excepto que la densidad celular fue de 1×10^6 células/ml, la concentración de (^{35}S)-metionina/cisteína fue de 50 $\mu\text{Ci/ml}$ y el marcaje se llevó a cabo en ausencia de FCS durante 4 horas en las mismas condiciones. En este caso, se utilizó el sobrenadante para inmunoprecipitar la fibronectina secretada por las células al medio. Para ello los transfectantes fueron tratados durante 4 horas (coincidiendo con el marcaje metabólico) o 24 horas, (20 horas de tratamiento en medio RPMI completo + 4 horas de marcaje metabólico), en presencia de 500 pM de TGF- β . Una vez recogidos, los sobrenadantes fueron centrifugados a 12000xg durante 3 minutos para eliminar restos celulares y este nuevo sobrenadante fue sometido a inmunoprecipitación como se describe en el apartado “Inmunoprecipitación” utilizando Abs anti-fibronectina. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, en condiciones no reductoras (fibroblastos) o reductoras (U937).

3.18 Marcaje metabólico con (^{32}P)-Ortofosfato

El marcaje metabólico con (^{32}P)-Ortofosfato para la detección de fosfoproteínas se realizó en cuatro tipos celulares diferentes: Células U937 (línea parental), cultivos primarios de células endoteliales, transfectantes de endoglina en células L929 y transfectantes de endoglina en U937. Para las células adherentes (fibroblastos y endotelio), se utilizaron cultivos confluentes en frascos de 75 cm^2 . Las células U937 fueron marcadas a una concentración de 1×10^6 células/ml. En todos los casos se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con Hank's, después se pusieron de nuevo en cultivo a 37°C en RPMI libre de fosfatos (ICN Biomedicals) durante 30 minutos. A continuación, se retiró dicho medio y se añadió medio fresco suplementado con 10% de FCS, previamente dializado frente a solución salina de 0.9% NaCl, y 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de (^{32}P)-Ortofosfato. Las células fueron marcadas metabólicamente durante 4 horas a 37°C. Finalizado el marcaje, todas las manipulaciones se realizaron a 4°C: Las células fueron colectadas y lisadas con tampón de lisis celular en presencia de inhibidores de fosfatasas (1mM Ortovanadato sódico, 1mM Molibdato sódico y 1mM Fluoruro sódico). Tras la lisis, la fracción insoluble fue separada por centrifugación a 12000xg durante 15 minutos y el sobrenadante sometido a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-endoglina (44G4 y 8E11), anti-PECAM-1 (PECAM

1.3 y HCl/6), y anti CD11c (HCl/1), o control (X63). Algunos ensayos con las células U937 (línea parental), así como los transfectantes de endoglina en L929 y U937, fueron llevados a cabo en presencia de 500 pM de TGF- β . Para caracterizar la fosforilación de PECAM-1, los tratamientos superiores a 4 horas se realizaron cultivando las células en RPMI completo a 5×10^5 células/ml, haciendo coincidir las últimas 4 horas de tratamiento con el marcaje metabólico.

3.19 Análisis de fosfopéptidos

Células L929 transfectadas con cada isoforma de endoglina fueron metabólicamente marcadas con (32 P)-Ortofosfato, sometidas a inmunoprecipitación con el Am 44G4 y la proteína radiomarcada fue separada mediante electroforesis en un gel del 6% de acrilamida. Una vez localizadas las bandas correspondientes mediante autorradiografía, éstas fueron cortadas y eluidas del gel (Boley *et al.* 1991). Digestiones proteolíticas de los eluidos se llevaron a cabo, primero con la endoproteasa Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8 (EC 3.4.21.19; Boehringer Mannheim, Barcelona, España) en 0.1 M NH_4HCO_3 , a pH 7.4 durante toda la noche a 37°C, seguida de incubación con la endoproteasa específica de prolina de *Flavobacterium meningosepticum* (EC 3.4.21.26; ICN Biomedicals) en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0 durante 3 horas a 30°C. Los fosfopéptidos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en capa fina en 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ a pH 8.9 durante 30 minutos a 1000 voltios (Boley *et al.* 1991). Los péptidos radiomarcados fueron detectados mediante un PhosphorImager 410A utilizando el “software” ImageQuant.

3.20 Análisis de fosfoaminoácidos

Células L929 transfectadas con la isoforma larga de endoglina fueron marcadas metabólicamente con (32 P)-Ortofosfato y sometidas a inmunoprecipitación y electroforesis en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Una vez desarrollada la electroforesis, las muestras fueron sometidas a electrotransferencia (ver apartado “Transferencia de Proteínas e Inmunodetección”), utilizando una membrana de nylon (Hybond-N; Amersham International). Una vez detectada la banda correspondiente en la membrana de nylon mediante autorradiografía, ésta fue cortada y directamente digerida en 200 μ l de 6M HCl a 110° C durante 4 horas. Los fosfoaminoácidos fueron analizados mediante electroforesis bidimensional en capa fina (Boley *et al.* 1991).

3.21 Transferencia de proteínas e inmunodetección

La transferencia de proteínas desde el gel de acrilamida hasta las membranas de nitrocelulosa (0.22 μ m; Millipore), se llevó a cabo a 300 miliamperios, durante 75 minutos a 4°

C en cubetas diseñadas al efecto. La electrotransferencia se realizó en tampón de transferencia compuesto por tampón de electroforesis de proteínas, 20% metanol pH 8. Una vez realizada la transferencia, las proteínas fueron detectadas en la membrana mediante tinción con el colorante Rojo Ponceau. El filtro fue posteriormente desteñido con solución de ácido acético al 5% y lavado repetidas veces con agua. Entonces, se procedió al bloqueo del filtro para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección, mediante tratamiento de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada en polvo al 5% en PBS. Tras este bloqueo, se procedió a la incubación con el correspondiente Am. Para ello, se utilizó sobrenadante de cultivo del hibridoma correspondiente diluido al 50% en la solución de leche en PBS, o bien dilución 1/1000 de fluido ascítico en la misma solución. La incubación se llevó a cabo en bolsas de plástico, diseñadas acordes al tamaño del filtro, durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Tras este proceso, la membrana fue lavada con PBS durante cinco minutos cuatro veces y entonces se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo: Inmunoglobulina de cabra anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa (Dakopats) a dilución 1/1000 en solución de leche-PBS. Tras una incubación adicional durante 1 hora a temperatura ambiente, se procedió de nuevo a lavar las membranas como se ha descrito más arriba. Las muestras que procedían de ensayos de marcaje con biotina, inmunoprecipitación y electroforesis fueron tratadas de modo idéntico al descrito, excepto que la reacción de reconocimiento específico se realizó mediante incubación de la membrana con 2 µg/ml de estreptavidina acoplada a peroxidasa (Pierce) en las mismas condiciones de la incubación con el segundo anticuerpo de la inmunodetección. En ambos casos las bandas específicas fueron reconocidas mediante un ensayo de quimioluminiscencia utilizando un “kit” comercial (Amersham).

3.22 Ensayos de asociación al citoesqueleto

Estos ensayos fueron realizados para demostrar la asociación de PECAM-1 a la fracción insoluble celular. Para ello U937 (línea parental) fue puesta en cultivo en ausencia o presencia de 500 pM de TGF-β a una densidad de 5×10^5 células/ml. Algunos ensayos se llevaron a cabo además en presencia de 20 µM de citocalasina. Tras el tratamiento, las células fueron colectadas y lavadas con PBS. La separación de las fracciones celulares soluble e insoluble fueron básicamente realizadas como describen Newman *et al.* (1992), con algunas modificaciones. Una vez colectadas las células fueron lisadas en 400 µls de 1% Tritón X-100, 100 mM MES, 0.5 mM MgCl₂, 1mM PMSE, 1mM NaF, 1mM Na₂MoO₄, 1mM Na₃VO₄, 2mM EGTA, pH 6.7 (tampón de citoesqueleto), durante 5 minutos a 4°C. Las muestras fueron entonces centrifugadas a

15000xg durante 15 minutos a 4°C en una ultracentrífuga TL100 Beckman, con un rotor TLA 100.2 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, EE.UU). Este proceso condujo a la obtención de las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (sedimento). La fracción insoluble fue lavada suavemente tres veces con tampón de citoesqueleto mediante pipeteo, resuspendidas en 200 µl del mismo tampón e incubadas con 200 U de DNasa tipo I (A.E.: 2000 U/mg; Boehringer-Mannheim), durante 10 minutos a 37° C. A continuación, se añadió tampón de carga de electroforesis (2x) y las muestras se sonicaron durante 3 minutos a 4°C. Las fracciones solubles fueron mezcladas directamente con 1 volumen del mismo tampón de carga. Entonces, tanto las fracciones solubles como insolubles fueron hervidas y sometidas a electroforesis en geles del 6% de acrilamida en condiciones no reductoras. Una vez realizada la electroforesis, las muestras fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y se llevó a cabo un ensayo de inmunodetección con el Am HC1/6, tal y como se describe en la sección “Electrotransferencia e Inmunodetección de Proteínas”.

3.23 Determinación de actividad PKC

Células U937 (4×10^6) fueron colectadas tras el tratamiento con 500 pM TGF- β durante los tiempos indicados, lavadas dos veces con PBS y una vez resuspendidas, mantenidas en hielo, en 200 µl de tampón TEM (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM β -mercaptoetanol, 25 µg/ml de leupeptina y 25 µg/ml de aprotinina). Se obtuvieron homogeneizados de estas células mediante aspiración y expulsión con una jeringa a través de una aguja de diámetro 25. Los homogeneizados fueron centrifugados primero a 1000xg durante 5 minutos a 4°C para sedimentar los núcleos y grandes restos celulares, y después a 100.000xg en una ultracentrífuga TL-100 (Beckman) durante 30 minutos a 4° C. De esta manera, se obtuvieron dos fracciones, sedimento y sobrenadante, que se utilizaron como fuente para las medidas de PKC asociada a membrana y a citosol. Los extractos de membrana se prepararon resuspendiendo el sedimento en 50 µls de tampón TEM, en hielo. 50 µg de proteína total (estimada mediante ensayo colorimétrico realizado en paralelo con el “kit” Protein assay reagent; Bio-Rad), tanto de la fracción citosólica como de membrana, fueron utilizados para medir actividad PKC, basandonos en el método descrito por Yasuda *et al.* (1990), utilizando para ello un “kit” comercial para medir dicha actividad (Gibco). Los extractos proteicos fueron incubados durante 5 minutos a 30° C con micelas mixtas formadas por 0.28 mg/ml de fòsfatidilserina, 1mM del éster de forbol PMA y 0.3% de Tritón X-100, [γ -(32 P)]ATP (20-25 mCi/ml; 3000 Ci/mmol; Amersham), y 50 mM de péptido con secuencia específica de sustrato

para la proteína quinasa C obtenida a partir de proteína básica de mielina. Una vez llevada a cabo la reacción las muestras fueron secadas en filtros de fosfofocelulosa (Millipore) y lavadas con ácido ortofosfórico al 1%. La cantidad de radiactividad incorporada en los péptidos fue cuantificada mediante conteo por centelleo en un contador para radiación β (LKB). Las medidas fueron realizadas por triplicado y los valores netos de actividad se obtuvieron restando a la actividad de cada muestra el valor obtenido al realizar el ensayo en ausencia de la mezcla de fosfolípidos.

3.24 Ensayos de marcaje de afinidad de los receptores del TGF- β

Los marcajes de afinidad de los receptores del TGF- β , fueron realizados con células U937, L₆E₉ y COS-7, todas ellas tranfectadas con ambas isoformas de endoglin, y en el caso de COS-7, cotransfectadas además con los receptores I y II humanos del TGF- β . En todos los casos se siguió la metodología descrita por Massagué (1987), con algunas modificaciones. En el caso de las células U937, estos ensayos se realizaron con un máximo de 5×10^6 células/ml, en un volumen total máximo de 2 ml. En el caso de las células L₆E₉ y COS-7 los ensayos se realizaron con cultivos confluentes en placas de cultivo de 60 mm de diámetro (entre $1,5-2 \times 10^6$ células totales). En todos los casos, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con Hank's. A partir de este punto, todas las manipulaciones se realizaron a 4°C. Una vez lavadas, las células fueron puestas en tampón Hepes durante al menos 45 minutos. Transcurrido este tiempo se cambió por el mismo tampón fresco suplementado con 0.1% BSA (tampón de unión de la citoquina a sus receptores). Una vez equilibradas las células en dicho tampón, se añadió (¹²⁵I)-TGF- β (Amersham; actividad específica 1200-2000 Ci/mmol) a las concentraciones indicadas en cada caso. En algunos ensayos, junto a la citoquina radiomarcada, se añadió un exceso de 50 veces en concentración de la citoquina no marcada, para demostrar por competición la especificidad de los receptores detectados. Las células fueron entonces incubadas durante 4 horas con agitación en presencia de la citoquina radiomarcada. Transcurrido este tiempo las células fueron lavadas tres veces con tampón Hepes, bien por centrifugación a 600xg durante 3 minutos, bien mediante aspiración del sobrenadante en el caso de células adherentes. Una vez lavadas, las células fueron puestas de nuevo en tampón Hepes (en el mismo volumen que el de partida), y la citoquina fue unida covalentemente a sus receptores mediante el agente de entrecruzamiento disuccinimidil suberato (DSS; Pierce) a concentración 0.3 mM durante 15 minutos en agitación. Una vez realizado el entrecruzamiento, se procedió a lavar las células 4 veces con tampón Hepes como antes se ha indicado. Las células U937 fueron directamente

lisadas en tampón de lisis, mientras que a las células adherentes se les añadió tampón 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 1mM EDTA, pH 7.4, durante 10 minutos para facilitar que se despegaran; finalmente fueron recogidas mediante raspado suave de las placas con un raspador de teflón y centrifugación a 600xg durante 3 minutos. Una vez colectadas, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis en un volumen de 100 µl. La lisis celular se realizó durante un período de 45 minutos con agitación, después del cual las muestras fueron sometidas a centrifugación a 12.000xg durante 15 minutos. La fracción soluble fue utilizada para su posterior análisis, bien por inmunoprecipitación, bien de los extractos totales según se indica en cada caso. Las inmunoprecipitaciones fueron realizadas según se indica en el apartado “Inmunoprecipitación”. Para analizar los extractos totales, las muestras fueron diluidas con tampón de carga de muestra (6x) en condiciones no reductoras, salvo indicación. Tras la adición del tampón de carga, las muestras fueron hervidas durante 3 minutos y sometidas a electroforesis, que en este caso se realizó utilizando geles de acrilamida al 7.5%, de 16 x 16 y 0.15 cm de tamaño; el desarrollo se realizó en 4-5 horas a 40 mA. El resto de las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en el apartado “Electroforesis de proteínas”. Las bandas marcadas fueron detectadas mediante un PhosphorImager 410A y el paquete informático ImageQuant (Molecular Dynamics).

3.25 Ensayos de degradación del (¹²⁵I)-TGF-β

Los ensayos de degradación de (¹²⁵I)-TGF-β fueron básicamente realizados como describen (Frolik *et al.* 1984) con células U937 transfectadas con ambas isoformas de endoglin. Las células fueron recogidas de cultivo, lavadas con Hank's y resuspendidas en DMEM suplementado con 25 mM Hepes y 0.1% de BSA, pH 7.4 donde fueron incubadas durante 45 minutos a 37°C. Una vez equilibradas en dicho medio, las células fueron lavadas y resuspendidas en medio fresco a una concentración de 5x10⁶ células/ml, donde fueron incubadas durante 1 hora a 37° C en presencia de 100 pM de (¹²⁵I)-TGF-β. Tras la unión de la citoquina a sus receptores, las células fueron colectadas mediante centrifugación y lavadas cuatro veces con medio fresco a 4°C. Aliquotas de 2.5 x 10⁶ células en 0.5 ml, fueron transferidas a tubos nuevos y reincubadas en medio fresco por períodos adicionales de 30, 60 y 90 minutos a 37° C. Como control, una alícuota fue mantenida en hielo hasta el final del ensayo (considerada como tiempo=0). Al final de cada período de incubación, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 600xg durante tres minutos. Inmediatamente, el sobrenadante fue retirado y se le añadió ácido tricloroacético al 10% (concentración final) para

precipitar las proteínas. Estas muestras fueron mantenidas en hielo durante 30 minutos y una vez realizada la precipitación, se separó la fracción soluble de la insoluble mediante centrifugación a 12000xg durante 10 minutos a 4°C. Para cada tiempo de incubación los ensayos fueron realizados por triplicado y la radiactividad asociada a las células, a la fracción soluble y a la fracción insoluble fue medida mediante un contador 1282 Compugamma CS (LKB, Bromma, Suecia) de radiación γ . La radiactividad total presente en cada muestra (radiactividad en las células + radiactividad en cada fracción del sobrenadante), fue considerada 100% y a partir de estos valores se hizo el cálculo porcentual de la radiactividad asociada a la fracción soluble en tricloroacético. Para el cálculo del nivel relativo de unión de la citoquina a las células, la radiactividad asociada a las células tomadas como control (tiempo=0), se le asignó el valor arbitrario 100. La cantidad de citoquina unida a 1×10^6 células fue calculada a partir de la radiactividad asociada directamente a una alícuota 100 pM de (^{125}I)-TGF- β .

4.-Resultados

4.1 Efecto del TGF- β en proliferación celular, agregación y fenotipo de las células U937

TGF- β es un inhibidor de la proliferación de muchos tipos celulares (Massagué 1990; Roberts y Sporn 1990). De acuerdo con estos antecedentes, el tratamiento de las células U937 con dicha citoquina, mostraron inhibición de la proliferación (Fig. 10 A), produciéndose la detención del ciclo en la fase G1. El máximo efecto con el TGF- β se obtenía tras 48 horas de tratamiento y un efecto similar fue observado con el GM-CSF, mientras que los tratamientos con IL-3 o M-CSF no ejercen un efecto detectable sobre la proliferación celular. Como control en estos ensayos se incluyó el PMA, el cual es un agente prototípico utilizado en el estudio de la diferenciación macrofágica, y por tanto inhibidor del crecimiento, en este tipo celular. Al mismo tiempo que se produce este efecto inhibitorio de proliferación sobre las células, pudimos comprobar que los tratamientos con TGF- β inducían la formación de agregados celulares (Fig. 10 B). Estudios cinéticos demostraron que este efecto afectaba prácticamente al 100% de las células y alcanzaba la saturación aproximadamente a las 24 horas de tratamiento (Fig. 10 C). Este fenómeno de agregación celular requería la presencia de cationes divalentes en el medio, ya que era inhibido en presencia de un agente quelante como el EDTA; metabolismo celular activo, ya que no se producía a 4°C; y la integridad del citoesqueleto, ya que la presencia de inhibidores de la polimerización de filamentos de actina (citocalasina B), daba lugar a su inhibición (Fig. 10 D).

Muchas moléculas están implicadas funcionalmente en fenómenos de adhesión célula-célula y son expresadas de forma constitutiva en la superficie de las células U937. Sin embargo, esta línea celular crece en suspensión y los fenómenos de agregación son prácticamente inexistentes en ausencia de estímulos. Aparentemente nos encontrábamos ante una situación de activación de algún receptor de membrana, y por ello, procedimos a detectar los posibles cambios de expresión de algunos de ellos mediante ensayos de citometría de flujo (Fig. 11 A). Células no tratadas y tratadas durante 24 horas con TGF- β mostraban unos niveles de expresión similares de las integrinas leucocitarias β 2: LFA-1, Mac-1, p150,95 y la propia cadena común β 2; respecto a las integrinas del grupo β 1 (VLAs), encontramos una disminución de expresión de la cadena α 4 y aumento de α 5, resultados de acuerdo con los reportados por otros autores (Bauvois *et al.* 1992); no pudimos detectar variaciones significativas en la cadena común β 1. Respecto a moléculas del grupo CAM (Cell Adhesion Molecules) detectamos cambios, con disminución de expresión en membrana de ICAM-1 y un

fuerte aumento de expresión de PECAM-1. En relación con este aumento, se demostró mediante estudios cinéticos, que la aparición de los agregados se correlacionaba con el aumento de expresión en membrana de dicha proteína (Fig. 11 B), y que el análisis del ARN corroboraba la regulación transcripcional de su expresión pudiéndose detectar los dos transcritos específicos de 3.4 y 3.7 kb correspondientes a PECAM-1 (Fig. 11 C). Estos resultados parecían indicar que el aumento de expresión de PECAM-1 podría estar implicado en el proceso de adhesión celular inducido por TGF- β .

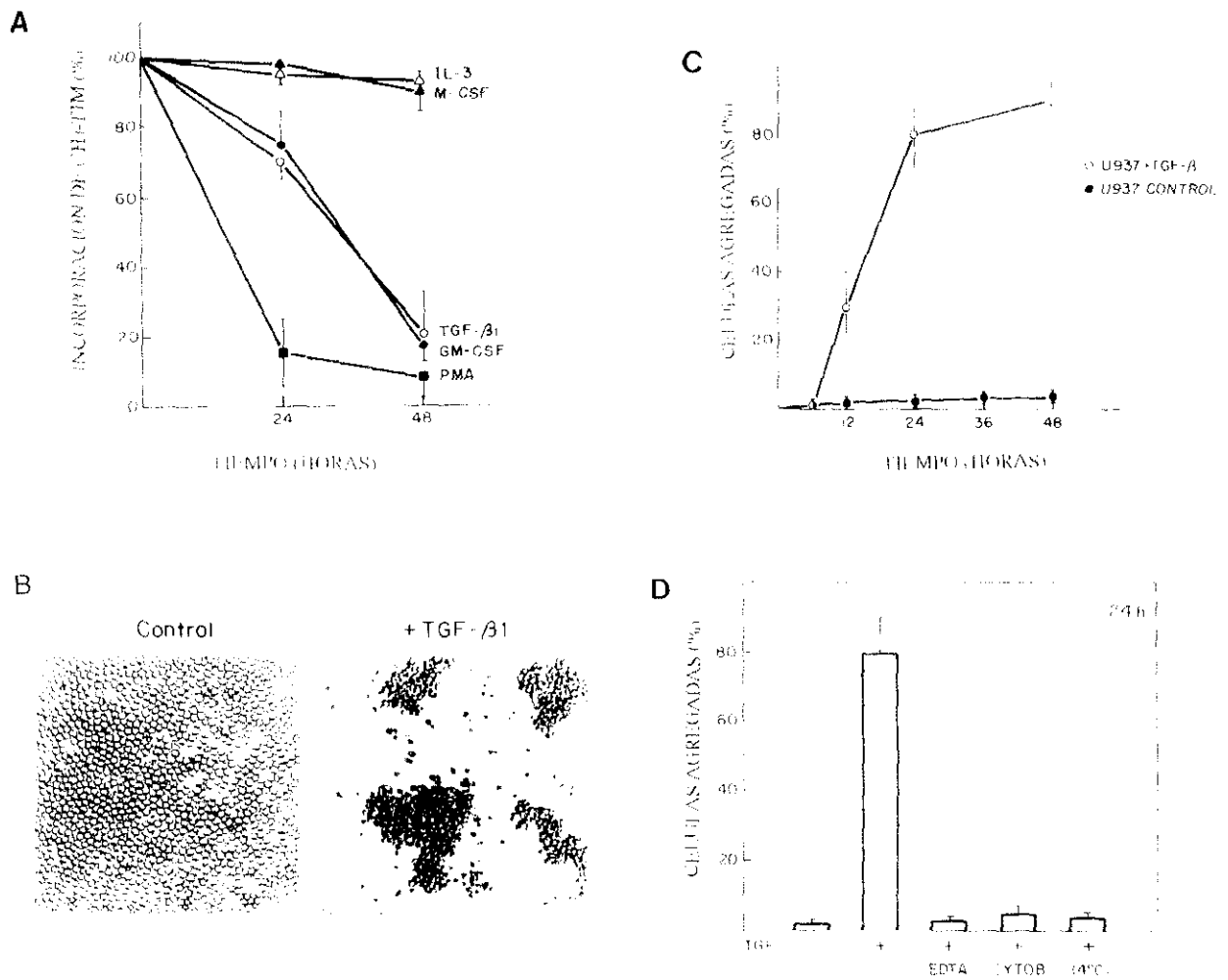


Fig. 10 Efectos del TGF- β en células U937.

A. Inhibición de proliferación. U937 (3×10^4 células/pocillo) fueron tratadas con TGF- β (500 pM), GM-CSF (100 U/ml), IL-3 (10 ng/ml), M-CSF (50 U/ml) y PMA (10 ng/ml) y la proliferación fue estimada mediante captación de (3 H)-Timidina a los tiempos indicados. Se representa la media \pm DE de triplicados.

B. TGF- β induce agregaciones homotípicas. U937 fueron incubadas en ausencia (Control) o en presencia de 500 pM de TGF- β (+ TGF- β). Tras 24 horas en cultivo, las células fueron fotografiadas en un microscopio de contraste de fases.

C. Estudios cinéticos de la agregación inducida por TGF- β en las células U937.

D. Requerimientos de la agregación celular. Las células fueron incubadas con TGF- β tanto a 4° como a 37° C en presencia de 1mM EDTA o 20 μ M de citocalasina B.

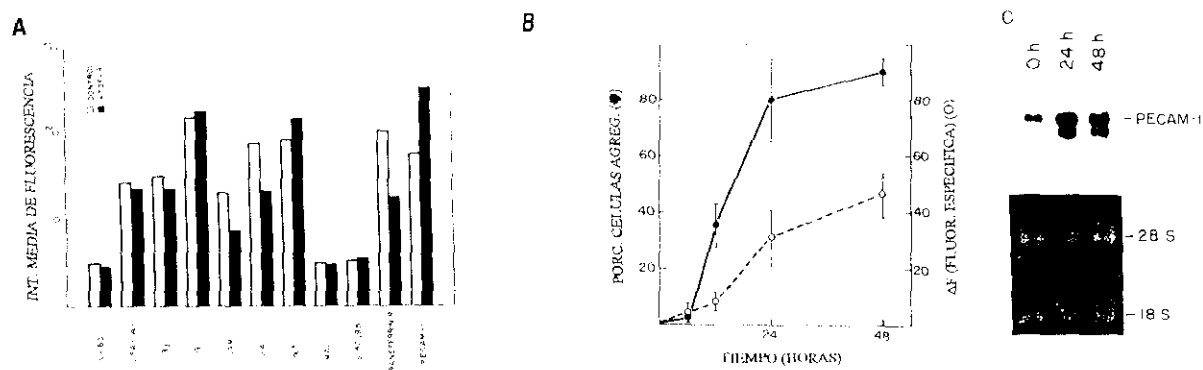


Fig. 11 Efecto del TGF- β en la expresión de moléculas de adhesión.

A. Análisis por citometría de flujo. U937 fueron tratadas durante 24 horas con TGF- β (500 pM) y la reactividad de los Ams TS1/11 (anti-LFA-1), TS1/18 (anti-CD18), TS2/16 (anti-CD29), RR1/1 (anti-ICAM-1), Bear 1 (anti-Mac-1, CD11b), HC1/1 (anti-p150,95 CD11c), FG2/2 (anti-CD71), PID6 (anti-VLA-5, cadena α , CD49e), HP1/7 (anti-VLA4 cadena α , CD49d) y HC1/6 (anti-PECAM-1) se comparó entre células tratadas y no tratadas. Se representa la media de intensidad de fluorescencia medida en escala logarítmica de un experimento representativo.

B. TGF- β induce la expresión de PECAM-1. U937 fueron incubadas con TGF- β y a los tiempos indicados se estimó el porcentaje de células agregadas y la fluorescencia específica. El incremento de fluorescencia se calculó por sustracción de la media de intensidad de las células tratadas de la media de las células no tratadas. Se representa la media \pm DE de un experimento por triplicado.

C. U937 fueron tratadas como en el panel B y los niveles de los transcritos específicos de PECAM-1 fueron detectados mediante hibridación con una sonda específica. Como control de carga se incluye la tinción con bromuro de etidio de los ARN ribosómicos.

4.2 Implicación de PECAM-1 en las agregaciones homotípicas inducidas por TGF- β

Para demostrar que realmente PECAM-1 estaba implicado en el fenómeno de adhesión celular, realizamos experimentos de inhibición mediante anticuerpos monoclonales y policlonales. Las integrinas LFA-1 (Rothlein y Springer 1986), VLA-4 (Campanero *et al.* 1990), y VLA-5 (Caixia *et al.* 1991) son moléculas que previamente habían sido implicadas en agregaciones homotípicas y se conocían anticuerpos que podían bien inducir dichas agregaciones o inhibirlas (Fig. 12 A). El Am TS2/16 (anti-CD29) inhibe las adhesiones vía VLA-4, inducidas por el el Am HP1/7. Sin embargo, TS2/16 no inhibía las inducidas por TGF- β (panel a). Por otra parte, péptidos sintéticos con la secuencia RGD inhibían las adhesiones inducidas por el Am PID6 a través de VLA-5, pero no inhibían las adhesiones mediadas por el TGF- β (panel b). Además, Ams dirigidos contra CD18 (cadena β_2 de las integrinas leucocitarias), y contra CD54 (ICAM-1) inhibían las adhesiones mediadas por LFA-1/ICAM-1 producidas tras el tratamiento de U937 con PMA; de nuevo, estos Ams no tenían efecto sobre las adhesiones inducidas por el TGF- β (panel c). Sin embargo, la presencia en los cultivos de suero policlonal anti-PECAM-1 inhibía dichas agregaciones (panel e). Estos resultados fueron

corroborados mediante estudios cinéticos realizados con Ams anti-PECAM-1, en los cuales los Ams HEC-75, SG134, GI18, NIH31-2 y MB35 inhibían las agregaciones inducidas por TGF- β (Fig. 12 B). Estos resultados implicaban directamente a PECAM-1 en las agregaciones. Como ensayo adicional, pudimos inhibir las agregaciones homotípicas al añadir oligonucleótidos antisentido específicos de PECAM-1 a las células U937 tratadas con TGF- β (Fig. 12 C); este resultado, comprobado mediante marcaje de superficie y análisis por citometría de flujo (Fig. 12 D), demostraba que el aumento de expresión en membrana de la proteína era necesario para el fenómeno de adhesión.

Por otra parte, y para demostrar la especificidad, realizamos ensayos de cocultivo de transfectantes de PECAM-1 en fibroblastos de ratón, con células U937 en presencia de la citoquina. En estas condiciones las U937 se unían a los fibroblastos PECAM-1+, sin embargo, no se producía unión apreciable cuando las células no fueron tratadas con TGF- β . Un resultado adicional demostraba la necesidad de implicar a la proteína en ambos tipos celulares, ya que el tratamiento individual de U937 con la citoquina durante 24 horas y posterior incubación con los transfectantes sin tratar no permitía obtener resultados relevantes en cuanto a la unión heterotípica entre las células (Fig. 13).

4.3 Vías de señalización implicadas en las adhesiones inducidas por TGF- β

El tratamiento de líneas celulares monocíticas con activadores de la proteína quinasa C, tales como el PMA, inducen el aumento de expresión en membrana de PECAM-1 (Cabañas *et al.* 1989; Goldberger *et al.* 1994b). Con este precedente, quisimos analizar la posible implicación de esta actividad quinasa en el aumento de expresión de PECAM-1 observado en presencia de TGF- β (Fig.14 A). El tratamiento de U937 con TGF- β demostró un aumento de dicha actividad en el citosol pero no en la membrana (al contrario de lo que ocurre con el éster de forbol), en las primeras horas de tratamiento, alcanzando el valor máximo aproximadamente a las 6 horas, para posteriormente disminuir hasta los niveles basales. Este aumento de la actividad PKC, fue corroborado mediante análisis de ARN de los mensajeros correspondientes a los protooncogenes *c-fos* y *c-jun*, que forman el factor de transcripción AP-1 (Distel y Spiegelman 1990; Vogt y Bos 1990) y que es inducido por dicha actividad quinasa (Fig. 14 B). Al mismo tiempo, pudimos detectar una disminución de los transcritos específicos de *c-myc*, lo que está de acuerdo con la pérdida de la capacidad proliferativa de las células y con el hecho de que *c-myc* es una diana en la vía de señalización de TGF- β , como previamente se había reportado para otros tipos celulares (Pietenpol *et al.* 1990a).

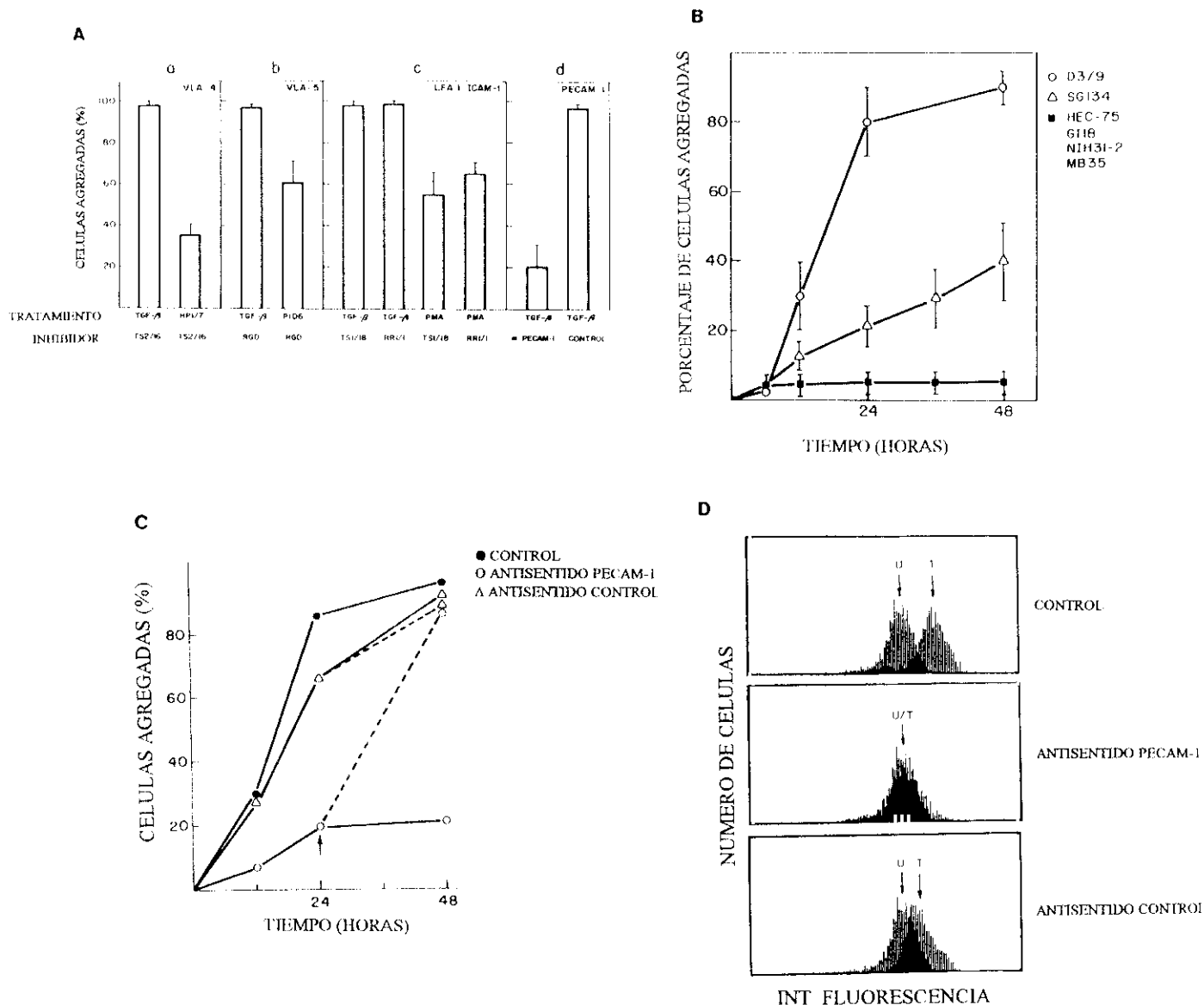


Fig. 12 Análisis de las moléculas de adhesión implicadas en la agregación inducida por TGF- β .

A. U937 fueron tratadas con 500 pM de TGF- β , 10 ng/ml de PMA o con los Am inductores de agregación, HP1/7 (anti-VLA-4) o PID6 (anti-VLA-5), en ausencia o presencia de inhibidores específicos de cada agregación. Se representa la media \pm DE de un experimento por triplicado. Tras 24 horas en cultivo, el porcentaje de agregación fue estimado en los pocillos. a. TS2/16 (anti-CD29) inhibe las agregaciones inducidas por HP1/7, pero no las del TGF- β . b. El péptido GRGDSPC (0.5 mg/ml) inhibe las agregaciones inducidas por PID6 pero no las del TGF- β . c. TS1/18 (anti-CD18) o RR1/1 (anti-CD54) inhiben las agregaciones inducidas por PMA pero no las de TGF- β . d. Aps anti-PECAM-1 inhiben las agregaciones inducidas por TGF- β , como control el suero preinmune no tenía efecto en la agregación (el suero anti-PECAM-1 y el control fueron usados a dilución 1/100).

B. Ams anti-PECAM-1 inhiben las agregaciones inducidas por TGF- β . El Am D3/9 (anti-CD45) fue usado como control negativo.

C. Oligonucleótidos antisentido específicos para PECAM-1 inhiben las agregaciones inducidas por el tratamiento con TGF- β a los tiempos indicados. La flecha y línea discontinua representan el efecto de retirar del cultivo los oligonucleótidos antisentido, realizados en ensayos paralelos.

D. Efecto de los oligonucleótidos antisentido sobre la expresión de PECAM-1 en membrana evaluada mediante tinción con el Am HC1/6 y análisis por citometría de flujo. Células U937 fueron incubadas en ausencia (U) o presencia de 500 pM de TGF- β (T), a su vez en ausencia (control) o presencia del correspondiente oligonucleótido antisentido.

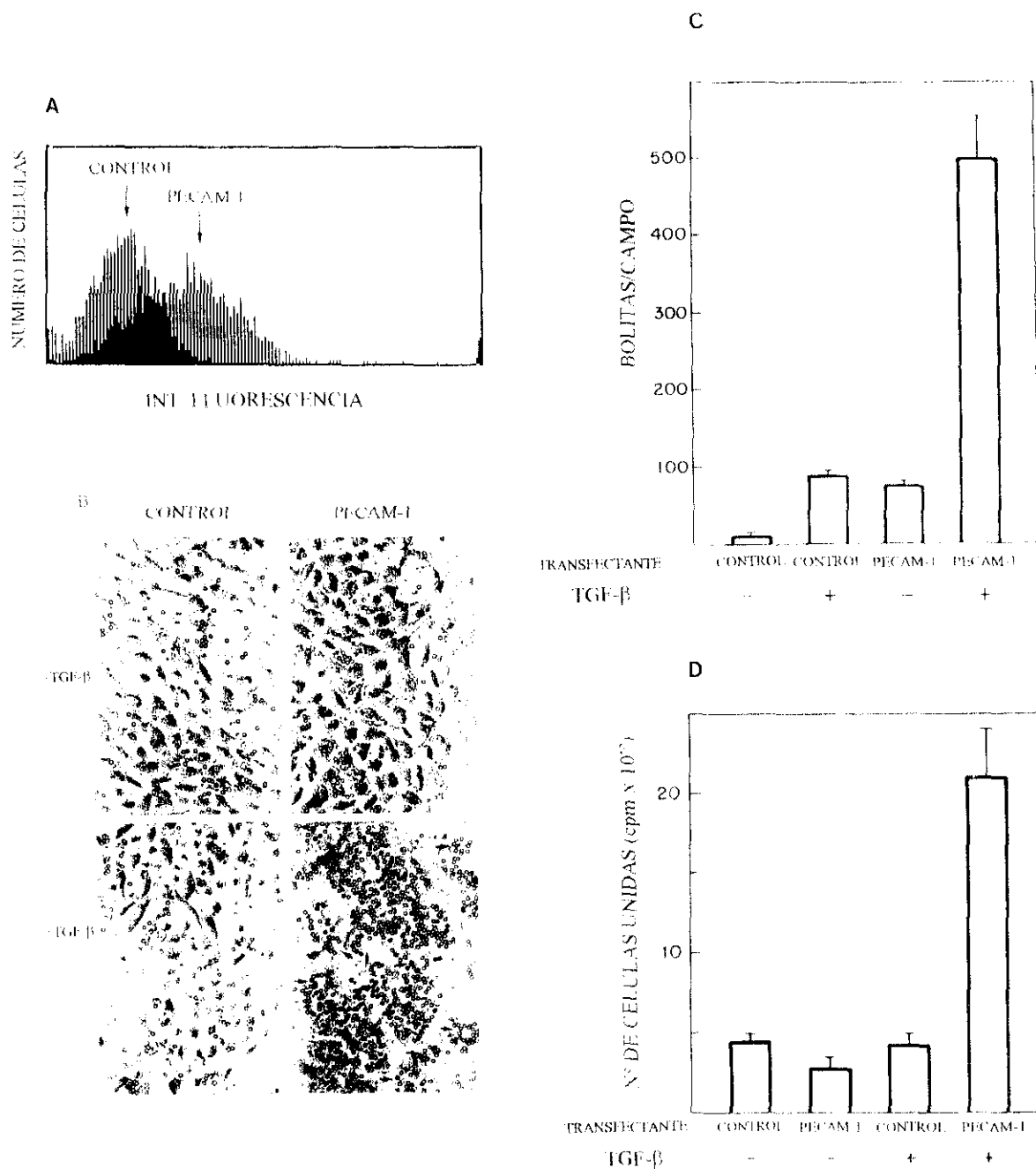


Fig. 13 Adhesión de las células U937 a transfectantes de PECAM-1

A. Fibroblastos de ratón transfectados con el ADNc de PECAM-1 (PECAM-1) o transfectantes control (CONTROL), fueron teñidos con el Am HC1/6 y analizados por citometría de flujo.

B y C Adhesión de las células U937 cocultivadas con los transfectantes, tanto en ausencia como en presencia de 500 pM de TGF- β durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo las placas fueron lavadas con RPMI e incubadas con el Am D3/9 (anti-CD45), entonces se lavaron de nuevo y se realizó una segunda incubación con IgG de cabra anti-ratón acoplada a bolitas magnéticas. Las células fueron visualizadas por microscopía de contraste de fases (B) y en tres campos al azar se contó el número de bolitas/campo (C). Se representa la media \pm DE de un experimento por triplicado.

D. El mismo ensayo que en B pero estimado mediante marcaje radiactivo. U937 marcadas con (3 H)-Timidina (66 604 \pm 5,341 cpm en 5×10^4 células/pocillo) fueron cocultivadas como se ha especificado anteriormente. Tras 24 horas en cultivo, las placas fueron lavadas con RPMI y la radiactividad que quedaba en los pocillos fue estimada mediante un contador de centelleo. Se representa la media \pm DE de un ensayo por triplicado.

La expresión en superficie de PECAM-1 se correlacionaba con la actividad PKC, puesto que la presencia de inhibidores, al menos parcialmente específicos de PKC, H-7 y estaurosporina (Hidaka *et al.* 1984; Tamaoki *et al.* 1986), reduce la expresión de PECAM-1 inducida por el TGF- β (Fig. 14 C). Como control, la expresión de PECAM-1 inducida por el activador de PKC, PMA, fue reducida en presencia de estos inhibidores. Además, estaurosporina y H-7 también inhibieron la expresión de PECAM-1 en células U937 sin estimular, sugiriendo la implicación de PKC en la expresión basal de PECAM-1. En conjunto, estos resultados implicaban a la actividad quinasa en el aumento de expresión de PECAM-1 en la membrana, y, junto con los resultados obtenidos con los oligonucleótidos antisentido, los cuales demostraban la necesidad del aumento de expresión para que las agregaciones celulares ocurrieran, sugerían que el bloqueo de la actividad PKC impediría la formación de dichos agregados. Para comprobar esta hipótesis, realizamos los ensayos de agregación en presencia de los inhibidores de la PKC, pudiendo comprobar que efectivamente las agregaciones quedaban bloqueadas al tratar las células con TGF- β en presencia de dichos inhibidores (Fig. 14 D).

Una vez comprobado que el aumento de expresión de PECAM-1 en la membrana era necesario en nuestro modelo para poder participar en el fenómeno de adhesión, analizamos si éste era el único requerimiento para tal función cuando las células eran tratadas con TGF- β , o por el contrario, estaba implicada alguna vía más de señalización de la citoquina. Con este fin, células U937 fueron tratadas durante 24 horas con TGF- β . Al final de este período, las células fueron lavadas varias veces con RPMI y fueron puestas en cultivo en ausencia del factor en medio completo (Fig. 15). En estos ensayos, se añadieron Aps anti-TGF- β en algunos pocillos y en otros se añadieron Aps utilizados como control. Las células fueron puestas en cultivo en condiciones normales (37°C, atmósfera húmeda y 5% de CO₂) y a diferentes tiempos se estimó el porcentaje de agregación presente en cada uno de los pocillos hasta un período adicional de 24 horas. En los pocillos donde se había añadido el policlonal neutralizante de la citoquina, se produjo inhibición de la agregación, mientras que no hubo efecto donde se utilizaron los anticuerpos control (Fig. 15 A). Tras el segundo período de 24 horas, se recogieron células que habían sido tratadas exactamente igual y en paralelo con los ensayos donde se estimaba el porcentaje de agregación, y fueron analizadas por citometría de flujo para evaluar la expresión de PECAM-1 en membrana (Fig 15 B). El resultado de este análisis demostraba que el nivel de PECAM-1 era equivalente en todas las células que habían sido tratadas con a citoquina.

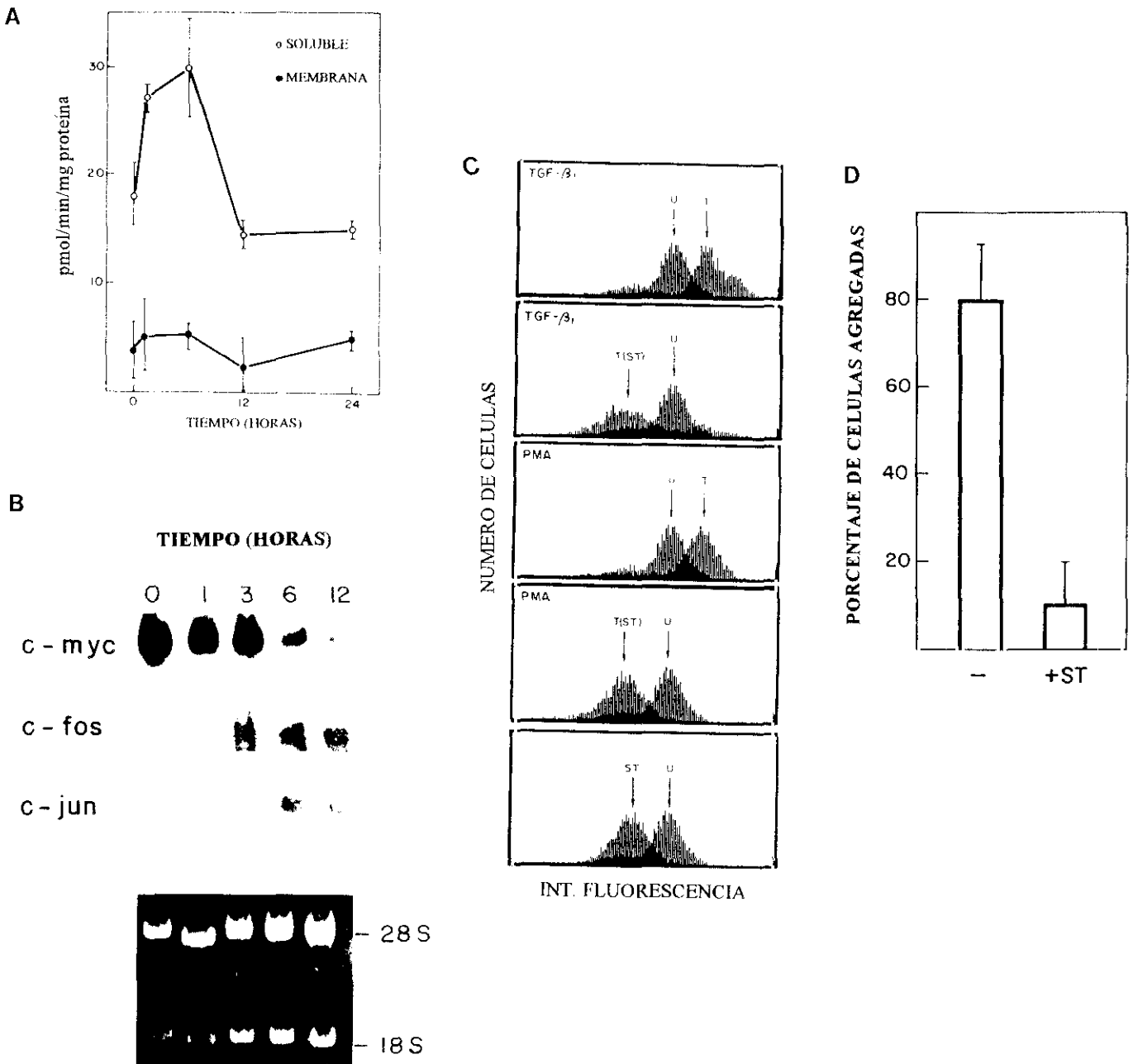


Fig. 14 Implicación de la PKC en las agregaciones inducidas por TGF-β.

A. células U937 fueron tratadas con 500 pMTGF-β y a los tiempos indicados los valores netos de la actividad PKC, tanto en forma soluble como asociada a membrana, fueron estimados utilizando un péptido sintético como sustrato. Se representa la media +/- DE de los valores obtenidos mediante triplicados. Como control positivo se incluyó el tratamiento durante 30 minutos con PMA a 10 ng/ml, encontrando unos valores de 11 pmol/min/mg de proteína en la fracción de membrana, y un descenso de hasta 8 pmol/min/mg de proteína en la fracción citosólica.

B. Análisis de transcritos específicos, mediante electroforesis, transferencia e hibridación del ARN con sondas específicas de *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* tras el tratamiento de U937 durante los tiempos indicados con TGF-β.

C. U937 fueron incubadas en ausencia (U) o en presencia de TGF-β sólo (T) ó TGF-β más estaurosporina {T(ST)}. En experimentos control, U937 fueron incubadas en ausencia (U) o presencia de PMA sólo (T), o PMA más estaurosporina {T(ST)}. La expresión de PECAM-1 en membrana fue estimada con el Am HC1/6 mediante análisis por citometría de flujo. Resultados análogos fueron obtenidos con el inhibidor H-7.

D. Estaurosporina inhibe la agregación celular inducida por TGF-β. U937 fueron incubadas con TGF-β en ausencia (-) o presencia de estaurosporina (+) y a las 24 horas se estimó el porcentaje de agregación en los pocillos. Se representa la media +/- DE de un experimento por triplicado.

incluidas las que desde el comienzo del ensayo estuvieron en presencia del TGF- β (a estas células no se les cambió el medio durante las 48 horas totales del experimento). El sobrenadante de estas células fue recogido y añadido sobre células frescas, realizando un ensayo de inhibición de proliferación (Fig. 15 C). Se obtuvo un efecto de inhibición que era mediado por TGF- β , ya que, los sobrenadantes que contenían los anticuerpos bloqueantes no ejercían tal efecto; en este ensayo se incluyó de nuevo como control positivo PMA. De esta manera demostramos que existía un mecanismo autocrino de producción de TGF- β y que éste mostraba actividad biológica al ser secretado por las células. El hecho de que el policlonal neutralizante del TGF- β inhibiera la agregación pero no se produjera, en paralelo, una disminución del nivel relativo de expresión de PECAM-1 en membrana, nos indujo a pensar que esta proteína podría necesitar alguna modificación pos-traducciona para ser funcional.

Las propiedades funcionales de PECAM-1 como molécula de adhesión, han sido potencialmente relacionadas con su capacidad para ser fosforilada en el dominio citoplásmico y su asociación con los componentes del citoesqueleto (Newman *et al.* 1992; Zehnder *et al.* 1992). En este sentido, es importante recordar que los ensayos de agregación de nuestro sistema eran inhibidos en presencia de citocalasina B. Para comprobar la posible fosforilación en el dominio citoplásmico de PECAM-1 en nuestro sistema, realizamos ensayos de marcaje metabólico con (32 P)-Ortofosfato a diferentes tiempos de tratamiento con la citoquina, para después analizar mediante inmunoprecipitación y electroforesis la marca asociada a dicha molécula. Estos estudios cinéticos (Fig. 16 A), demostraron la fosforilación de PECAM-1 a tiempos tardíos (no se detectó banda marcada tras cuatro horas de tratamiento), pero un hecho importante era que la fosforilación de PECAM-1 seguía aproximadamente la cinética de agregación celular. Decidimos comprobar entonces, si esta fosforilación podría implicar de alguna forma el anclaje de PECAM-1 al citoesqueleto. Para ello, realizamos ensayos de transferencia e inmunodetección, con las fracciones soluble e insoluble de los extractos celulares obtenidos como se describe en la sección "Materiales y métodos". Estos ensayos fueron realizados tras 24 horas de tratamiento con la citoquina, (tiempo en el cual la agregación y fosforilación eran evidentes), y como control se incluyeron tanto células sin tratar como células tratadas con la citoquina y citocalasina B (Fig. 16 B). Tras 24 horas de tratamiento, PECAM-1 pudo ser detectado en la fracción insoluble celular. Además, a pesar de que el inhibidor de la polimerización de actina inhibía las agregaciones, como antes se ha

mencionado, no era capaz de inhibir el anclaje de la glicoproteína a la fracción insoluble, sugiriendo la implicación de otros componentes del citoesqueleto en el anclaje de PECAM-1.

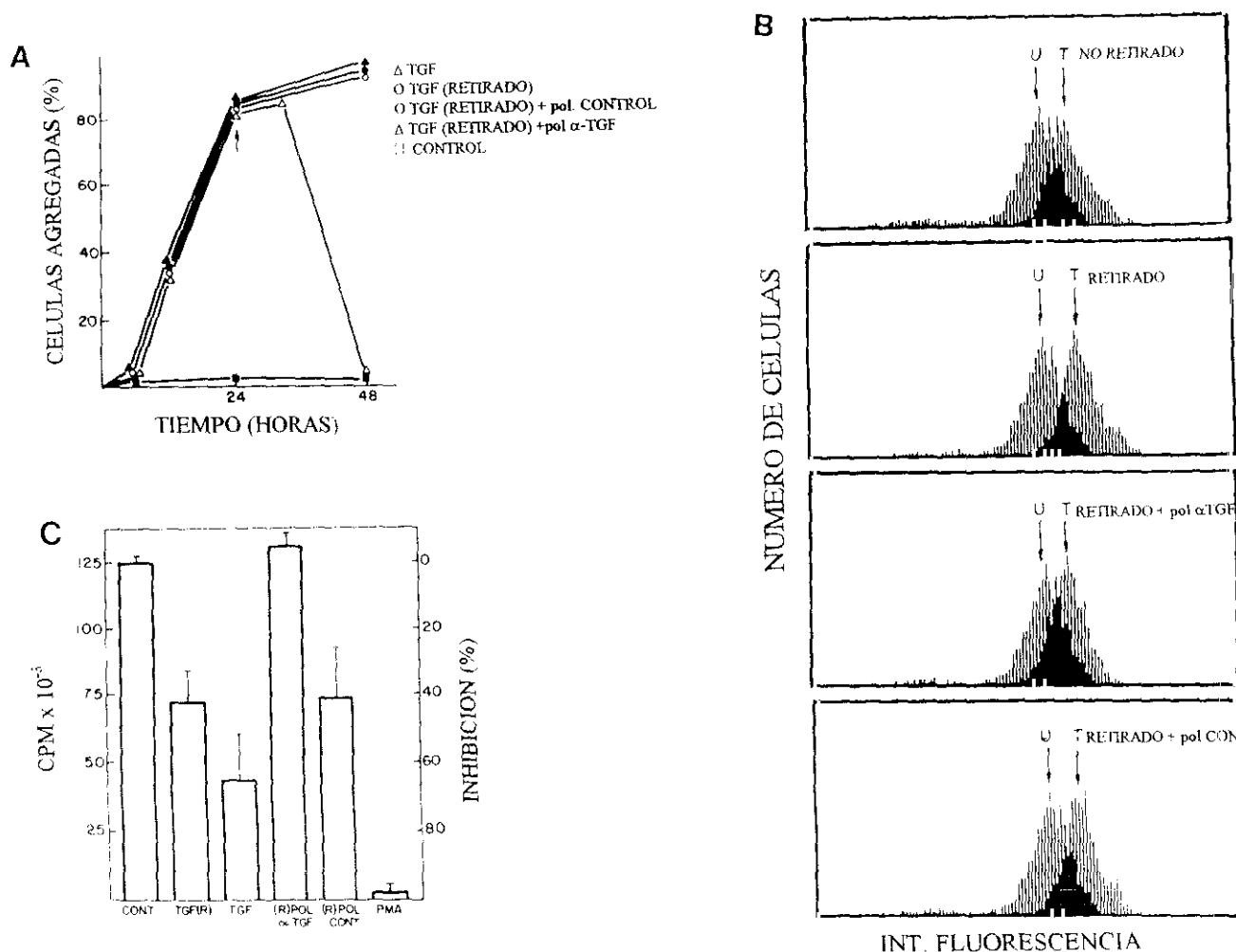


Fig. 15 Efecto de la neutralización del TGF-β sobre la agregación celular. Células U937 fueron incubadas en ausencia o presencia de 500 pM TGF-β (TGF). Tras 24 horas en cultivo (ver flecha), el medio fue descartado y las células fueron lavadas tres veces con RPMI. Tras los lavados, las células se pusieron de nuevo en cultivo en medio fresco (TGF retirado). Además de retirar el TGF-β de los cultivos, anticuerpos policlonales bloqueantes de la unión de la citoquina a sus receptores (TGF retirado + pol anti-TGF) o anticuerpos control, y (TGF retirado + pol control), fueron añadidos a los cultivos. A los tiempos indicados el porcentaje de células agregadas fue estimado (A), y tras un período adicional de 24 horas (48 horas desde el comienzo del ensayo), el nivel de expresión de PECAM-1 en membrana fue analizado por citometría de flujo (B). En este momento el sobrenadante de las células fue recogido y añadido a células frescas. Tras 36 horas en cultivo se realizó un ensayo de proliferación celular, para medir la capacidad inhibidora que había en los sobrenadantes (C). El PMA fue incluido como un control positivo en las células frescas. Se representa la media +/- DE de un ensayo por triplicado

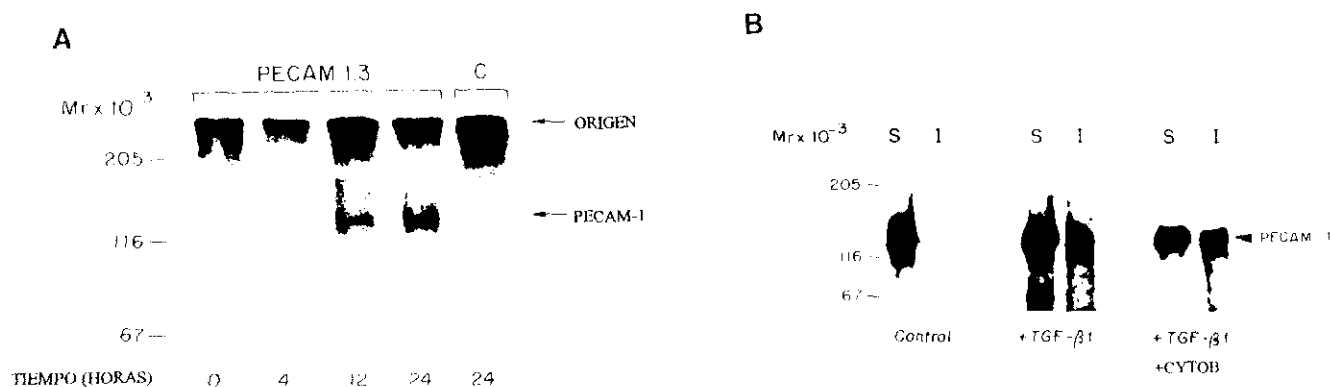


Fig. 16 Efecto del TGF- β sobre la fosforilación y asociación al citoesqueleto de PECAM-1.

A. Fosforilación de PECAM-1. Células U937 fueron incubadas con 500 pM TGF- β durante los tiempos indicados y marcadas metabólicamente con (32 P)-ortofosfato. Las células fueron lisadas y los extractos solubles sometidos a inmunoprecipitación con el Am PECAM1.3 (anti-PECAM-1) o con un Am irrelevante de la misma subclase (C). Los inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida y las bandas marcadas detectadas mediante un PhosphorImager 410.

B. Asociación de PECAM-1 con el citoesqueleto. Células U937 fueron incubadas en ausencia (control) o presencia de TGF- β sólo, o TGF- β más 20 μ M citocalasina B durante 24 horas. Las células fueron lisadas y ultracentrifugadas. Las fracciones soluble (S) e insoluble (I) fueron sometidas a electroforesis seguida de electrotransferencia e inmunodetección con el Am HC1/6 (anti-PECAM-1).

4.4 Endoglina está presente en la membrana de los macrófagos

En nuestro laboratorio generamos Ams frente a proteínas de membrana cuya expresión se modificaba durante el proceso de diferenciación macrófágica. Para seleccionar estos Ams se utilizó el modelo de diferenciación de la línea U937 tratada con PMA durante 2 días y se analizó mediante citometría de flujo la reactividad que presentaban en las células tratadas con el éster de forbol, frente a las no tratadas. Uno de estos Am designado como 8E11, pertenecía al isotipo IgM y en los ensayos de inmunoprecipitación, tras marcaje de superficie con (125 I), reconocía una proteína con un peso molecular aparente de 180 kDa, formada por dos monómeros idénticos de peso aproximado 90 kDa (Fig. 17 A). Este Am mostraba reactividad no sólo frente a células monocíticas U937, sino también frente a células endoteliales. Tanto el patrón de reactividad del Am 8E11 como las características de su antígeno diana, coincidían

con los del Am 44G4 y su correspondiente antígeno denominado endoglina (Gougos y Letarte 1988, 1990). Por tanto, nuestro primer objetivo fue demostrar que el Am 8E11 reconocía endoglina y para ello, utilizando como referencia el Am 44G4 se llevó a cabo un marcaje de superficie con (^{125}I) de células U937 tratadas con PMA y se hicieron ensayos de inmunoprecipitación secuencial para comprobar si ambos reconocían la misma proteína; Estos ensayos demostraron que el Am 8E11 también reconocía endoglina. (Fig. 17 B).

Identificada la proteína reconocida por el 8E11 procedimos a caracterizarla como una glicoproteína asociada a la diferenciación de los macrófagos. Dentro del sistema vascular-hematopoyético, su expresión se restringía a endotelio y macrófagos, ya que la reactividad del anticuerpo era negativa con todas las células de sangre periférica, tanto no estimuladas como estimuladas, excepto en el caso de los monocitos (Fig. 18).

Para analizar en detalle la expresión de endoglina en los macrófagos, realizamos tanto ensayos de citometría de flujo como análisis del ARN de monocitos purificados a partir de sangre periférica y cultivados durante varios días (Fig. 19). Este método conlleva la diferenciación *in vitro* de dichas células (Zembala y Asherson 1989), demostrando los estudios cinéticos que las reactividades de los Ams 8E11 y 44G4 eran prácticamente idénticas y que aumentaban con el tiempo, desde prácticamente cero en los monocitos recién purificados, hasta llegar al 100 % de la población a los 7 días en cultivo alcanzando una meseta aproximadamente el día cuatro. Es importante destacar que la cinética de expresión se ve sometida a cambios que son inherentes a la metodología utilizada, ya que se trata de cultivos primarios y existen muchas variaciones individuales respecto al grado de madurez de los monocitos extraídos directamente de la sangre y el grado de activación al que se ven sometidos tras su puesta en cultivo. Los resultados de los ensayos de citometría de flujo fueron corroborados mediante análisis del ARN e hibridación de los transcritos específicos de endoglina (Fig. 20).

La distribución tisular de endoglina reconocida por el Am 8E11, fue visualizada mediante tinción de secciones congeladas de tejido con el anticuerpo e inmunoperoxidasa o inmunofosfatasa alcalina (Fig. 21). Los macrófagos intersticiales de la pulpa roja del bazo eran claramente positivos (Fig. 21 A), mientras que las células de Kupffer del hígado eran negativas (B). Además en hígado, nódulo linfático y amígdala la reactividad del 8E11 con las células endoteliales fue muy alta, y la reactividad con los macrófagos presentes en dichos tejidos fue negativa. En el hígado la vena central y los sinusoides mostraban una alta reactividad (B); también las células endoteliales de las vénulas de nódulo linfático y amígdala fueron altamente

reactivas con dicho Am (C y D). En conjunto estos resultados demostraron que endoglina estaba presente en algunos tipos de macrófagos tisulares además del sistema vascular.

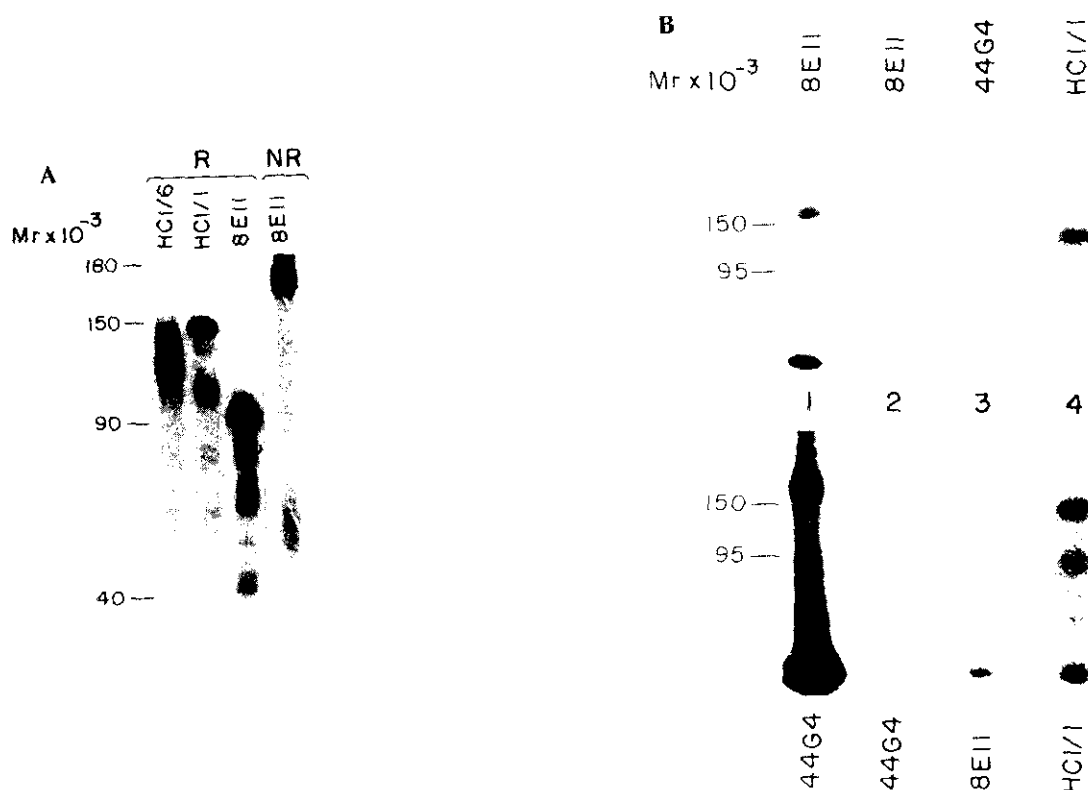


Fig. 17 Análisis por inmunoprecipitación del antígeno reconocido por el Am 8E11. Células U937 fueron tratadas con 10 ng/ml de PMA durante 2 días, marcadas en superficie con (125 I), lisadas e inmunoprecipitadas con diferentes Ams.

A. Análisis mediante electroforesis del antígeno reconocido por 8E11 en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R), y de los reconocidos por los Am HC1/1 (anti-CD11c) y HC1/6 (anti-CD31; PECAM-1) en condiciones reductoras.

B. Inmunoprecipitaciones secuenciales con los Ams 8E11 y 44G4. Los lisados radiomarcados fueron preclarados mediante cinco inmunoprecipitaciones con 8E11 (panel superior) o 44G4 (panel inferior). La calle 1 representa el resultado de la primera inmunoprecipitación. Una vez realizado el preaclaramiento, el lisado que quedaba fue dividido en tres alícuotas iguales, las cuales fueron de nuevo sometidas a inmunoprecipitación con los anticuerpos que se indican (calles 2-4) y posterior electroforesis. El Am HC1/1 fue incluido como un control positivo. La banda marcada que precipitaba el 44G4 fue más intensa, probablemente debido a una mayor afinidad por el antígeno y/o los problemas derivados de utilizar una IgM como reactivo, en el caso del 8E11.

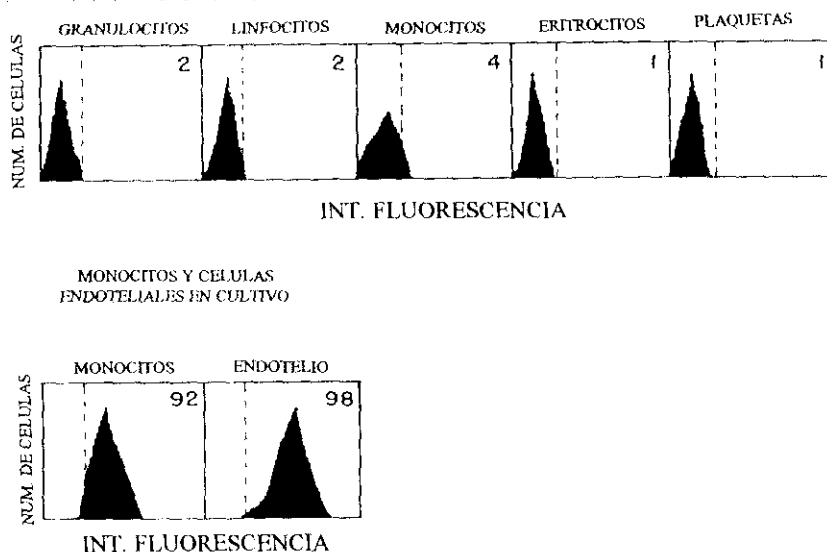


Fig. 18 Análisis por citometría de flujo de la expresión de endoglina con el Am 8E11 en células de sangre periférica, cultivos primarios de monocitos y células endoteliales. Los números en la parte superior derecha indican el porcentaje de células positivas y la barra vertical indica el límite de la fluorescencia específica. Endoglina no está presente en la membrana de ningún tipo celular de sangre periférica y sólo se expresa tras la diferenciación *in vitro* de los monocitos; también está presente en la membrana de células endoteliales.

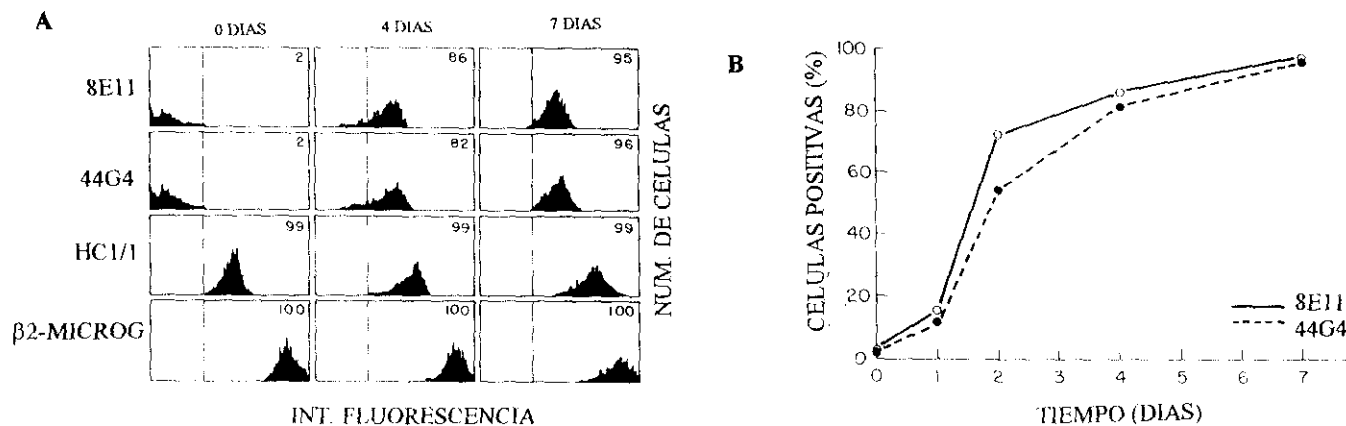


Fig. 19 Análisis por citometría de flujo de la expresión de endoglina en la membrana de monocitos diferenciados *in vitro*.

A. Monocitos purificados de sangre periférica fueron puestos en cultivo durante los tiempos indicados y la reactividad de los Ams 8E11, 44G4 (ambos anti-endoglina), HC1/1 (anti-CD11c) y FG2/2 (anti β_2 -microglobulina) fue estimada mediante citometría de flujo. (El anticuerpo FG2/2 fue utilizado como control positivo, no variable. El control negativo está señalado por la barra vertical. Los números de la parte superior derecha muestran el porcentaje de células positivas.

B. Cinética de expresión de endoglina detectada con los Ams 8E11 y 44G4 en monocitos en cultivo.

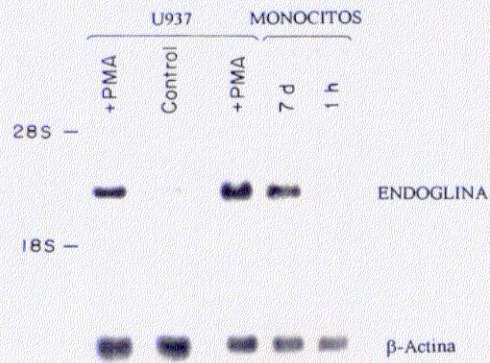


Fig. 20 Detección de los transcritos de endoglina en monocitos en cultivo y en células U937 tratadas con PMA. El ARN total se extrajo de monocitos tras 1 hora (1 h) o 7 días de cultivo (7d) y de U937 no tratadas (Control) o tratadas con 10 ng/ml PMA durante 48 horas (PMA). El ARN fue transferido a membrana e hibridado con una sonda específica de endoglina. Como control se muestra la hibridación con una sonda de β -actina

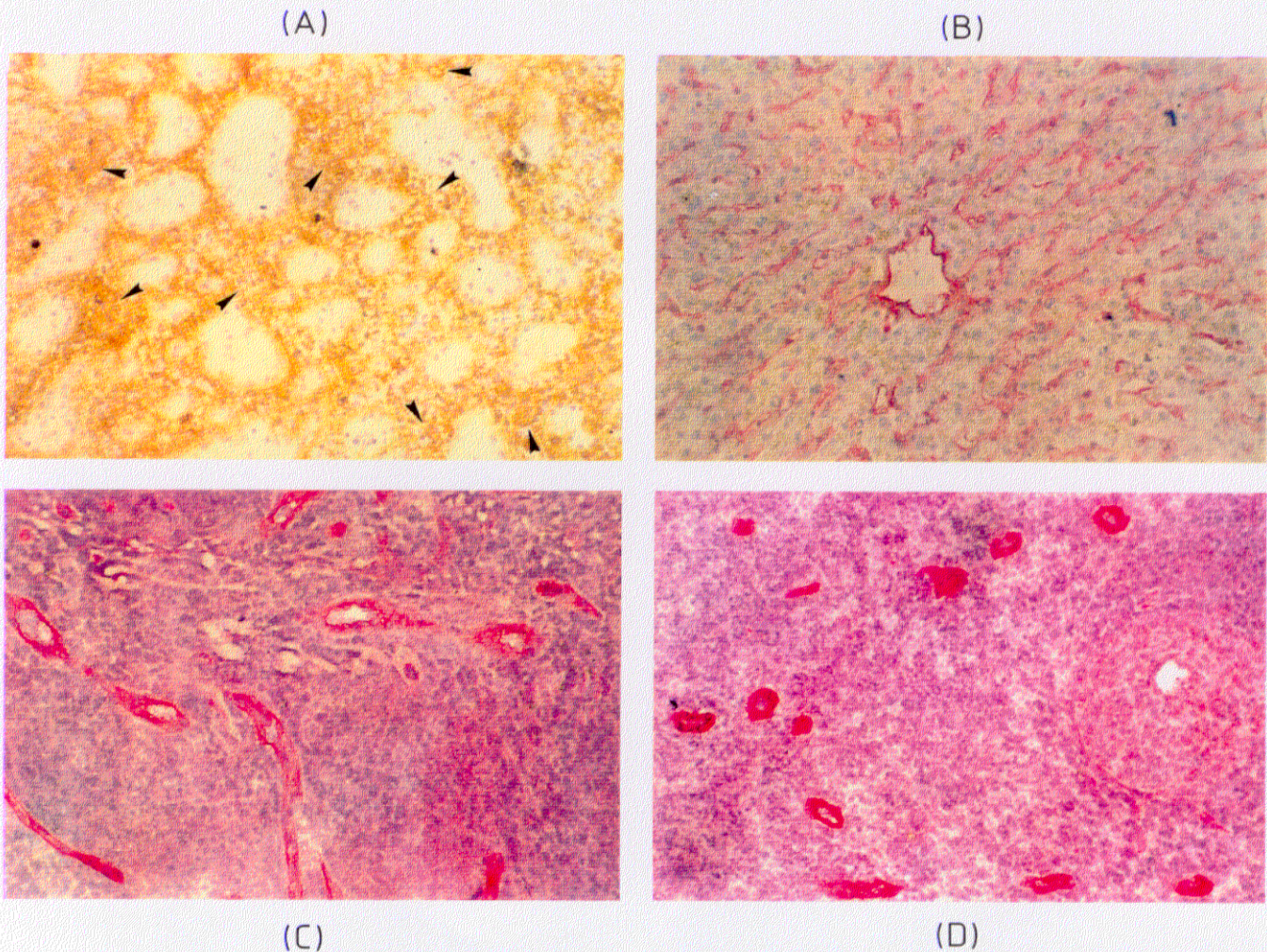


Fig. 21 Tinción de cortes de tejido con el Am 8E11: (A) Bazo, (B) Hígado, (C) Nódulo linfático y (D) amígdala, seguido de inmunodetección con peroxidasa (A) o antifosfatasa/fosfatasa alcalina (B-D). El Am 8E11 reconoce los macrófagos intersticiales de la pulpa roja del bazo como pone de manifiesto la tinción marrón de la peroxidasa. Las células endoteliales del hígado, nódulo linfático y amígdala muestran una reacción intensa (B-D, respectivamente). Las muestras fueron teñidas con hematoxilina para aumentar el contraste. El aumento de la figura en origen fue ($\times 250$)

4.5 La diferenciación de líneas monocíticas conlleva el aumento de expresión de endoglina

Endoglina es débilmente expresada en la superficie de la línea U937, sin embargo su expresión aumenta tras la diferenciación a macrófago inducida por tratamiento con PMA (Fig. 22 A). Con fines comparativos, otros antígenos mieloides también fueron medidos: Las integrinas leucocitarias CD11c/CD18 y CD11b/CD18 también aumentan; por el contrario la expresión del receptor de transferrina (CD71) disminuye fuertemente, al mismo tiempo que se produce una pérdida de la capacidad proliferativa de las células. Los estudios cinéticos demostraron que el aumento de expresión inducido por el PMA es máximo a los 2 días de tratamiento, lo que fue corroborado mediante el análisis del ARNm específico de endoglina (Fig. 20).

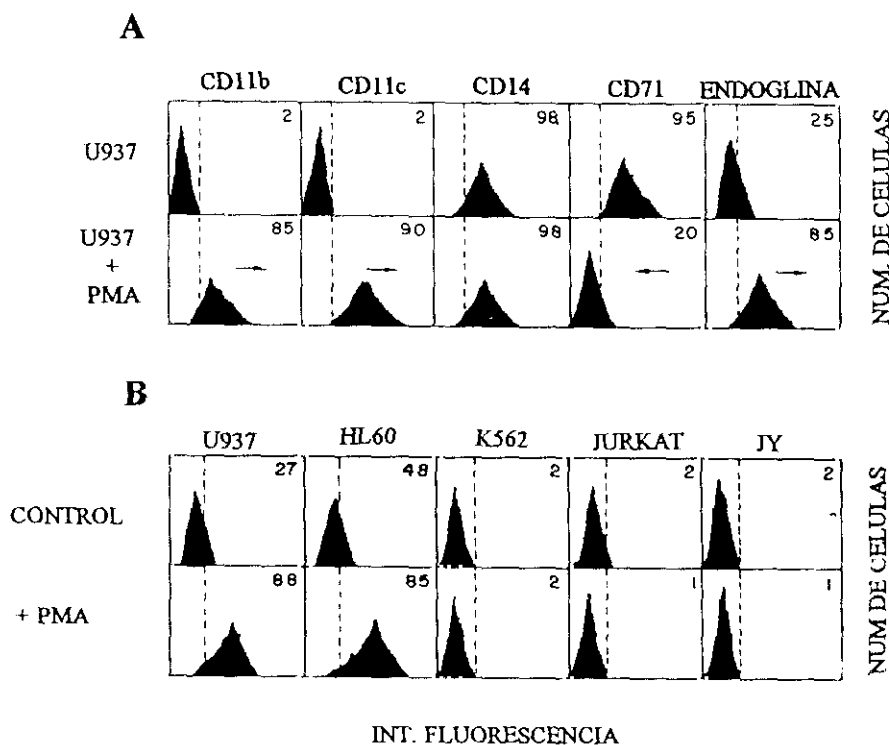


Fig. 22 Efecto del tratamiento con PMA sobre la expresión de endoglina. Las células fueron incubadas con el correspondiente Am y la expresión del antígeno correspondiente estimada mediante citometría de flujo. Los números en la parte superior derecha muestran el porcentaje de células positivas, la línea discontinua limita el valor de fluorescencia del control negativo (X63).

A. Células U937 no tratadas o tratadas con 10 ng/ml de PMA durante dos días fueron incubadas con los Ams Bear 1 (anti-CD11b), HC1/1 (anti-CD11c), Bear 2 (anti-CD14), FGI/6 (anti-receptor de transferrina) o 8E11 (anti-endoglina). Las flechas indican el incremento o disminución en la fluorescencia de las células si se compara con las células no tratadas.

B. Reactividad del Am 8E11 con células no tratadas (control) o tratadas con PMA (+PMA). Las líneas celulares utilizadas fueron: U937 (promonocítica), HL60 (mielomonocítica), K562 (eritroblástica), Jurkat (linfoblástica T) y JY (linfoblástica B)

Para comprobar la especificidad de la inducción por PMA de la expresión de endoglina en el linaje monocito-macrófago, la reactividad del Am 8E11 fue analizada mediante citometría de flujo en varias líneas celulares tanto no tratadas como tratadas con PMA (Fig. 22 B). El resultado fue negativo en la línea eritroblástica K562, en la línea linfoblástica B JY, y en la linfocítica T Jurkat, tanto en las células no tratadas como tratadas con el éster de forbol. Sólo las líneas U937 (promonocítica) y HL60 (mielomonocítica), con capacidad de diferenciación hacia macrófago en presencia de PMA, mostraron un aumento de expresión en membrana tras el tratamiento.

4.6 Caracterización de dos formas de endoglina

El clonaje inicial de endoglina se hizo a partir de un clon de ADNc al que le faltaba la secuencia correspondiente al péptido señal (Gougos y Letarte 1990). En nuestro laboratorio se consiguió clonar un ADNc con la secuencia completa de endoglina. Para su aislamiento se utilizó una librería de expresión de células HL60 tratadas con PMA, y entre los clones obtenidos se identificó una nueva isoforma de la proteína, idéntica en las secuencias extracelular y transmembrana a la previamente reportada, pero que incluía un inserto de 135 pb en la zona intracelular. Este ADNc nuevo contenía secuencias consenso de procesamiento alternativo flanqueando el inserto, dentro del cual aparecía un codón de terminación. La presencia de este inserto implicaría la generación de dos ARNm maduros diferentes: El primero correspondiente al "splicing" del inserto que codificaría para la endoglina con 47 residuos en el dominio citoplásmico, y un segundo correspondiente a una proteína madura con sólo 14 residuos. Posteriormente se demostró (Bellón *et al.* 1993), mediante experimentos de PCR, que esta nueva forma de la proteína era expresada, aunque minoritariamente, en todas las células ensayadas que expresaban endoglina en membrana. La diferencia en peso de ambas isoformas es aproximadamente de 10 kDa y dada la diferencia en longitud entre ellas fueron denominadas L-endoglina (la isoforma larga con 47 residuos en el citoplásmico) y S-endoglina (la isoforma corta con sólo 14 residuos). La figura 23 representa esquemáticamente los dominios citoplásmicos de ambas formas así como las homologías de secuencias con betaglicano.

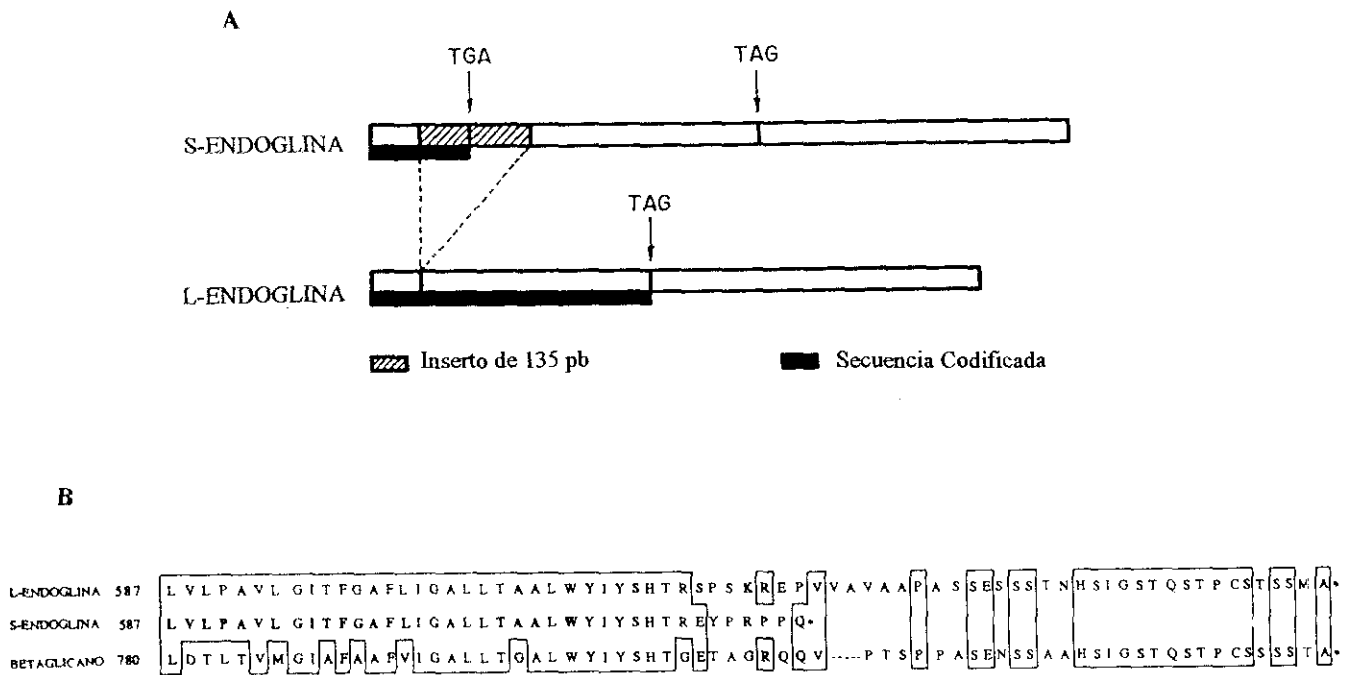


Fig. 23 Análisis de la región citoplásmica de endoglina y comparación de secuencias con betaglicano.

A. Diagrama del ADNc que codifica para las dos formas alternativas de endoglina. Sólo se representa la región correspondiente al 3' que es la que codifica la región citoplásmica. El ADNc aislado por Bellón et al. (1993) contiene un inserto de 135 pb correspondiente a S-endoglina, no presente en la secuencia previamente reportada de L-endoglina (Gougos y Letarte 1990). La posición de los codones de terminación está indicada y la correspondiente secuencia traducida se representa con una línea negra gruesa.

B. Alineación de los dominios citoplásmicos y transmembrana de S-endoglina con las correspondientes secuencias de L-endoglina y el betaglicano humano. Las cajas engloban secuencias idénticas. Los números indican la posición del primer residuo en la secuencia completa. Dos regiones principales de homología fueron encontradas. La primera (73% de identidad) incluye la secuencia entre los residuos 587-617 de S-endoglina y L-endoglina y los residuos 780-810 del betaglicano. La segunda región (74% de identidad), comprende la secuencia 634-660 de L-endoglina y los residuos 823-849 de betaglicano. La región transmembrana de S-endoglina se representa en **negrita**. Los trazos se han insertado para hacer coincidir el alineamiento. Los asteriscos marcan el último residuo de la proteína (Bellón et al 1993. *Eur. J. Immunol.* 23:2340-2345)

Los ADNc correspondientes a cada isoforma fueron clonados en el vector de expresión eucariota pCEXV, y para comprobar que dichas isoformas eran proteínas correctamente expresables se generaron transfectantes estables con dichas construcciones en fibroblastos de ratón L929 (Fig. 24). Tras una primera selección de los clones con el antibiótico G418, estos fueron analizados mediante citometría de flujo y los positivos fueron amplificados (Fig. 24 A). Mediante marcaje metabólico con (35 S)-Metionina/Cisteína y posterior inmunoprecipitación con el Am 44G4, pudimos detectar las bandas correspondientes a las dos isoformas de la proteína (Fig. 24 B). El diferente peso molecular de ambas en los transfectantes (170 para la forma larga y 160 para la forma corta), también se puso de manifiesto mediante electroforesis

en condiciones no reductoras, electrotransferencia e inmunodetección. En estos ensayos se incluyeron extractos solubles de células U937 tratadas con PMA, y el peso molecular de la banda detectada coincidió con el de la isoforma larga transfectada, lo que sugería que ésta era la forma mayoritariamente expresada por dichas células (Fig. 24 C). El marcaje radiactivo de superficie con (^{125}I), inmunoprecipitación y electroforesis en condiciones tanto no reductoras, como reductoras, demostró la formación de homodímeros en la membrana unidos por puentes disulfuro intercatenarios (Fig. 24 D). Estos enlaces se localizan en la región extracelular, ya que la ausencia de residuos de cisteína en el dominio citoplásmico de la forma corta, no evita que la expresión de la proteína madura sea la de un homodímero (muy probablemente en la isoforma larga esto ocurra de una forma similar ya que sólo se encuentra una cisteína en dicho dominio, fig. 23 A). Además del correcto ensamblaje de las dos proteínas en las células transfectadas, éstas eran funcionales ya que ambas isoformas tenían capacidad para unir TGF- β Bellón *et al.* (1993).

4.7 Endoglina es un fosfoproteína

Betaglicano y la forma de endoglina predominantemente expresada en los tipos celulares analizados hasta hoy, L-endoglina, comparten una región de alta homología en el dominio citoplásmico, en cuya secuencia el contenido en serinas y treoninas es muy alto (40%). El hecho de que endoglina y betaglicano sean receptores del TGF- β y que precisamente el mecanismo de transmisión de señal de la citoquina sea a través de dos Ser/Thr quinasas (los receptores I y II), nos indujo a pensar que el dominio citoplásmico de endoglina pudiese ser fosforilado. El estado de fosforilación de endoglina fue analizado primeramente utilizando células endoteliales, las cuales tienen un alto grado de expresión de dicha proteína. Tras el marcaje metabólico durante cuatro horas con (^{32}P)-ortofosfato, las células fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación (Fig. 25 A). Los dos anticuerpos, 8E11 y 44G4, precipitaban específicamente la proteína fosforilada en ausencia de cualquier estímulo, lo que demostraba que endoglina se encontraba fosforilada de forma constitutiva. Para analizar más en detalle el fenómeno de la fosforilación de endoglina y estudiar si el nivel de fosforilación variaba entre ambas isoformas, utilizamos los transfectantes de ambas isoformas generados en fibroblastos de ratón. El marcaje metabólico y posterior inmunoprecipitación con 44G4 demostró que ambas isoformas se encontraban constitutivamente fosforiladas en los fibroblastos. Sin embargo, el grado de fosforilación de la isoforma larga era unas ocho veces superior al de la

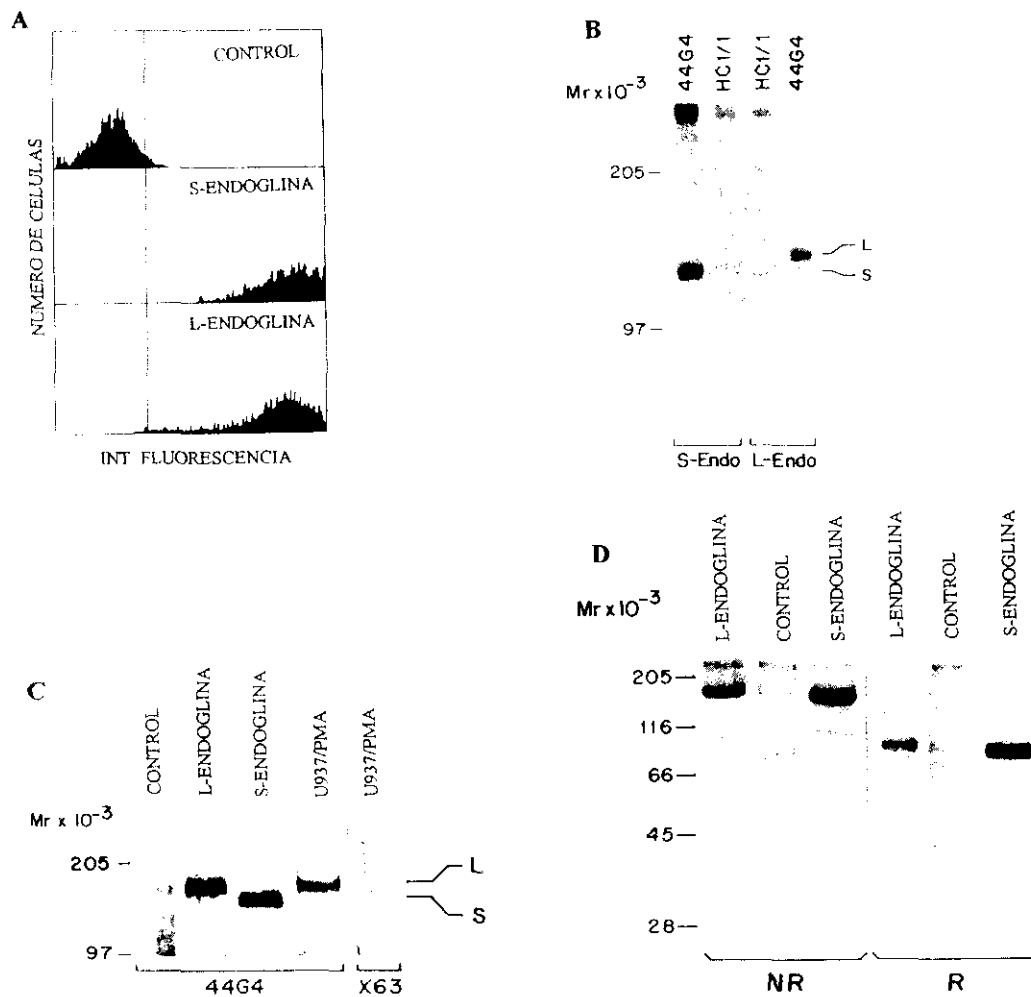


Fig. 24 Expresión de L-endoglina y S-endoglina en transfectantes L929 de ratón.

A. Análisis por citometría de flujo de la expresión de endoglina utilizando el Am 8E11. Como control negativo, se incluye la expresión detectada en el transfectante control.

B. Inmunoprecipitación, tras marcaje metabólico con (³⁵S)-metionina/cisteína de los transfectantes, con los Ams 44G4 y HC1/1 (incluido como control negativo). Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel en gradiente (6-12%) de acrilamida en condiciones no reductoras.

C. Electrotransferencia e inmunodetección con 44G4 de extractos solubles de los transfectantes (Control, L-endoglina y S-endoglina), así como de células U937 tratadas con PMA. Los extractos fueron sometidos a electroforesis en un gel del 6% en condiciones no reductoras y posteriormente electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa. El Am X63 fue utilizado como control negativo. Este ensayo no es cuantitativo.

D. Inmunoprecipitación con el Am 44G4 tras marcaje de superficie con (¹²⁵I) de transfectantes control, L-endoglina y S-endoglina. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel del 10% de acrilamida tanto en condiciones no reductoras (NR) como reductoras (R).

corta. Estos datos sugerían la existencia de más sitios de fosforilación en la forma L que en la S, lo que estaba de acuerdo con los datos de sus secuencias: La isoforma L-endogлина contiene en su dominio citoplásmico 19 residuos de Ser/Thr, mientras que S-endogлина presenta sólo dos. Como control de la expresión de ambas, en estos ensayos se incluyeron marcajes metabólicos con (^{35}S)metionina/cisteína y posterior inmunoprecipitación, en las mismas condiciones que los marcajes con (^{32}P)-ortofosfato, y las cantidades detectadas de ambas isoformas eran equivalentes (Fig. 25 B). Para confirmar que las diferencias en el grado de fosforilación se debían a diferencias en el número de sitios, realizamos análisis de fosfopéptidos tras digestión con proteasas específicas para residuos de glutamina y prolina, encontrando al menos tres sitios diferentes en L-endogлина frente a uno en S-endogлина (Fig 25 C). Como la forma larga es la mayoritariamente expresada por las células que son positivas para endogлина, se estudió en esta isoforma el tipo de residuos fosforilables. El análisis de fosfoaminoácidos demostró que endogлина se encontraba fosforilada mayoritariamente en residuos de serina, en mucho menor grado en residuos de treonina, y no se detectó fosforilación en residuos de tirosina (Fig. 25 D).

4.8 Efecto del TGF- β sobre la fosforilación de endogлина

Yamashita et al. (1994) reportaron que la endogлина porcina formaba complejos heteroméricos en células endoteliales con los receptores tipo I y II en presencia del ligando; complejos similares han sido descritos para betaglicano en otros tipos celulares (López-Casillas et al. 1991). Por otra parte, los receptores tipo I y II tienen actividad Ser/Thr quinasa en sus dominios citoplásmicos (Lin et al. 1992; Ebner et al. 1993). Para analizar si la fosforilación de endogлина podría modificarse por el TGF- β , se realizaron experimentos de marcaje metabólico con (^{32}P)-ortofosfato en presencia del ligando (Fig. 26 A). El tratamiento con TGF- β disminuía el grado de fosforilación de L-endogлина. Como control, se incluyeron ensayos en paralelo realizados mediante tinción con 44G4 y análisis por citometría de flujo, para comprobar si este descenso se pudiera deber a internalización de la proteína (Fig. 26 B). Sin embargo, en este ensayo no se detectó cambio en la cantidad de proteína presente en la membrana, excluyendo una internalización de la proteína como responsable de la disminución de la fosforilación. Los efectos inhibitorios del TGF- β sobre la fosforilación de endogлина se observaron en las dos isoformas tanto en fibroblastos de ratón como de células U937 (fig. 27). (La generación de transfectantes de endogлина sobreexpresando las dos isoformas en células U937 serán descritos en una sección posterior).

endoglina sobreexpresando las dos isoformas en células U937 serán descritos en una sección posterior).

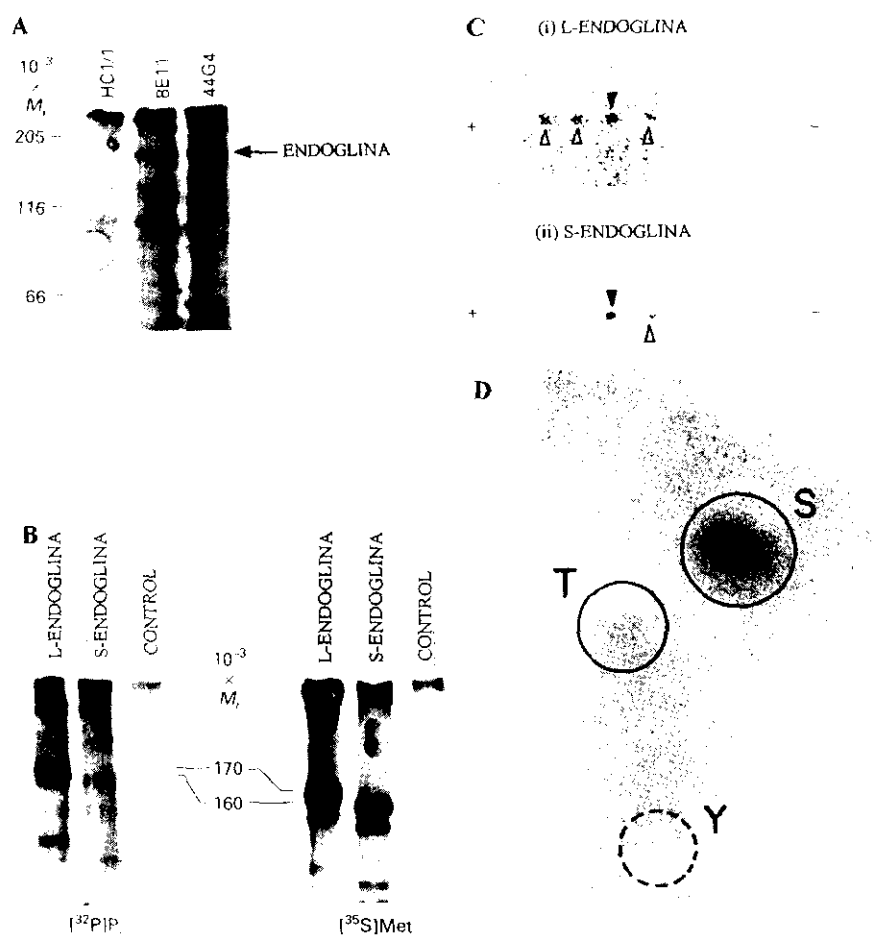


Fig. 25 Fosforilación de endoglina.

A. Cultivos primarios de células endoteliales humanas fueron metabólicamente marcadas con (^{32}P)ortofosfato durante 4 horas, lisadas y sometidas a inmunoprecipitación con los Ams HC1/1, 8E11 y 44G4. (HC1/1 fue utilizado como control negativo). Las muestras fueron sometidas a electroforesis y las bandas marcadas fueron detectadas mediante autorradiografía.

B. Fibroblastos L929 de ratón transfectados con ambas isoformas fueron metabólicamente marcados con (^{32}P)ortofosfato o con (^{35}S)metionina/cisteína durante 4 horas, lisados e inmunoprecipitados con el Am 44G4. Las bandas de 170 y 160 kDa corresponden a L-endoglina y S-endoglina, respectivamente.

C. Análisis de fosfopéptidos de las dos isoformas de endoglina. L-endoglina y S-endoglina fueron inmunoprecipitadas de los transfectantes marcados con (^{32}P)ortofosfato y las bandas específicas fueron digeridas con endoproteínasa Glu-C de *S. aureus* y con endopeptidasa específica de Prolina de *P. meningosepticum*. Los fosfopéptidos fueron separados por electroforesis de alto voltaje en capa fina. El origen de aplicación de la muestra y los péptidos obtenidos están indicados por triángulos rellenos y vacíos, respectivamente.

D. Análisis de fosfoaminoácidos a partir de inmunoprecipitados de los transfectantes de L-endoglina marcados con (^{32}P)ortofosfato. S, fosfoserina, T, fosfotreonina, Y, fosfotirosina.

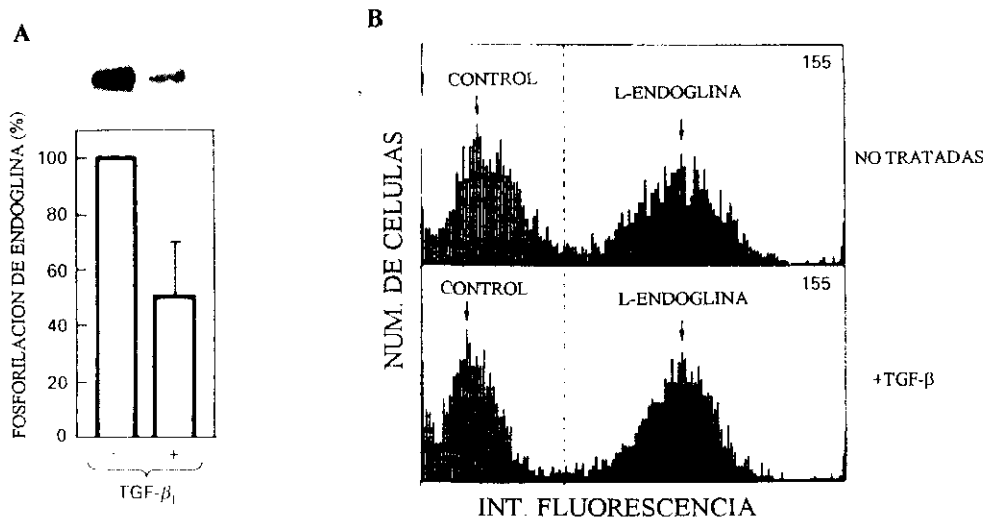


Fig. 26 Efecto del TGF-β sobre la fosforilación de endoglina.

A. Fibroblastos L929 de ratón transfectedos con L-endoglina fueron metabólicamente marcados durante cuatro horas con (³²P)-ortofosfato en ausencia o en presencia de 500 pM TGF-β. Las células fueron lisadas, inmunoprecipitadas con 44G4 y sometidas a electroforesis. Las bandas fueron detectadas mediante autorradiografía y cuantificadas mediante densitometría. Los valores fueron representados como porcentaje respecto a los valores obtenidos en ausencia de tratamiento. Los resultados representan la media +/- DE de tres experimentos.

B. Análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana de L-endoglina en dichos transfectedos. Las células fueron no tratadas (control) o tratadas durante cuatro horas con TGF-β (500pM), entonces fueron teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta con 44G4 y analizadas por citometría de flujo. Como control negativo, se incluye la tinción con transfectedos control. Los números en la esquina superior derecha representan la media de intensidad de fluorescencia en los transfectedos de endoglina. La línea vertical limita la fluorescencia específica.

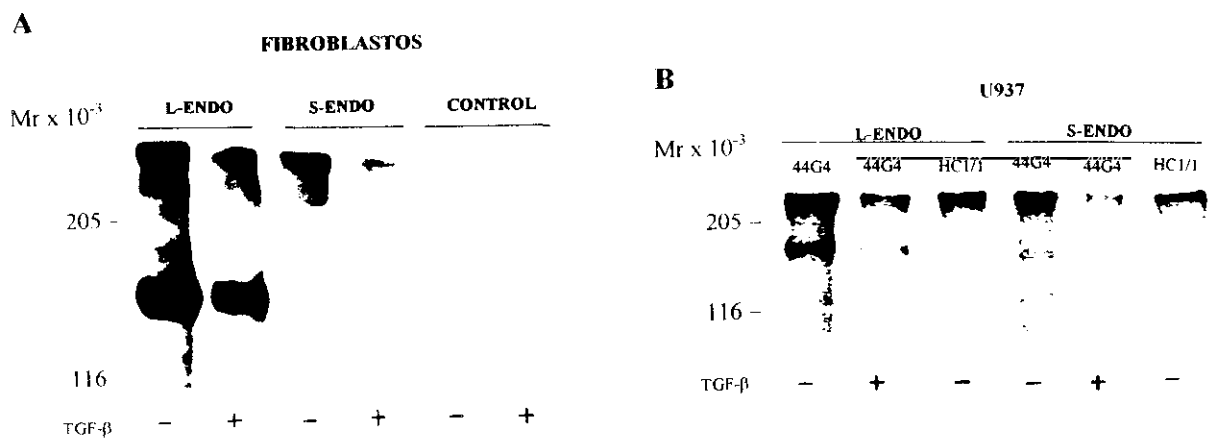


Fig. 27 Efecto del TGF-β sobre la fosforilación de ambas isoformas de endoglina.

A. Fibroblastos L929 de ratón transfectedos, control o con cada isoforma de endoglina, fueron marcados metabólicamente durante 4 horas con (³²P)-ortofosfato en ausencia o presencia de 500 pM de TGF-β en las mismas condiciones que las descritas en la fig. 26. Los extractos celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación con el Am 44G4 y posteriormente analizados mediante electroforesis en condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida del 6%.

B. Células U937 transfectedas con cada isoforma de endoglina fueron marcadas metabólicamente en las condiciones antes descritas. Los extractos celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación con los Am 44G4 o HC1/1, este último utilizado como control. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis en condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida del 7,5%.

4.9 TGF- β regula la expresión de endoglina en células monocíticas

Dado que endoglina es un receptor del TGF- β era de interés analizar si su expresión podría ser modificada en presencia de la citoquina. Los niveles de expresión de endoglina en la superficie de las células U937 es baja, sin embargo, después del tratamiento con TGF- β , la expresión de la proteína aumentaba siguiendo una cinética más lenta que la descrita para PECAM-1, alcanzándose una inducción de 3-4 veces tras 3 días de tratamiento (Fig. 28 A). Este resultado fue confirmado sobre monocitos de sangre periférica puestos en cultivo. En este sistema experimental se demostró que la cinética de aparición de la proteína en membrana era acelerada tras la adición de TGF- β exógeno, consiguiendo un aumento de 4-5 veces sobre el nivel basal de expresión tras sólo 24 horas en cultivo (Fig. 28 B). Este efecto regulador se pudo comprobar que actuaba aumentando la transcripción del ARNm de endoglina en ambos sistemas (Fig. 28 C). Assoian *et al.* (1987) reportaron que los macrófagos tienen la capacidad de sintetizar TGF- β de forma autocrina, y por ello decidimos comprobar si el aumento de expresión de endoglina que observamos durante el proceso de diferenciación *in vitro* podría responder directamente a la producción endógena de la citoquina. Para ello realizamos cultivos de monocitos purificados en presencia de anticuerpos bloqueantes de la unión del TGF- β a sus receptores y pudimos comprobar que la expresión de la proteína en membrana era inhibida (Fig. 28 D).

En colaboración con el grupo de Michelle Letarte (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada), se comprobó que el efecto sobre la expresión de endoglina en las células U937 tratadas con TGF- β se podía generalizar al resto de los receptores de la citoquina, así como a la síntesis endógena del propio TGF- β , tal y como demostraron los ensayos de PCR cuantitativa que este grupo llevó a cabo con estas células (datos no mostrados). Este resultado corroboraba los que previamente se habían obtenido al estudiar la regulación funcional de PECAM-1 (Fig. 15).

Todos estos datos, junto con otros experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio indicaban que el TGF- β inducía muchas respuestas en las células U937 y por tanto estas células constituían un buen modelo para estudiar la señalización de dicho factor. El conjunto de dichas respuestas se resumen en la tabla 3. (Los resultados de adhesión a laminina y colágeno, obtenidos en nuestro laboratorio, no se muestran en esta memoria, los de fibronectina se presentan en la sección 4.10)

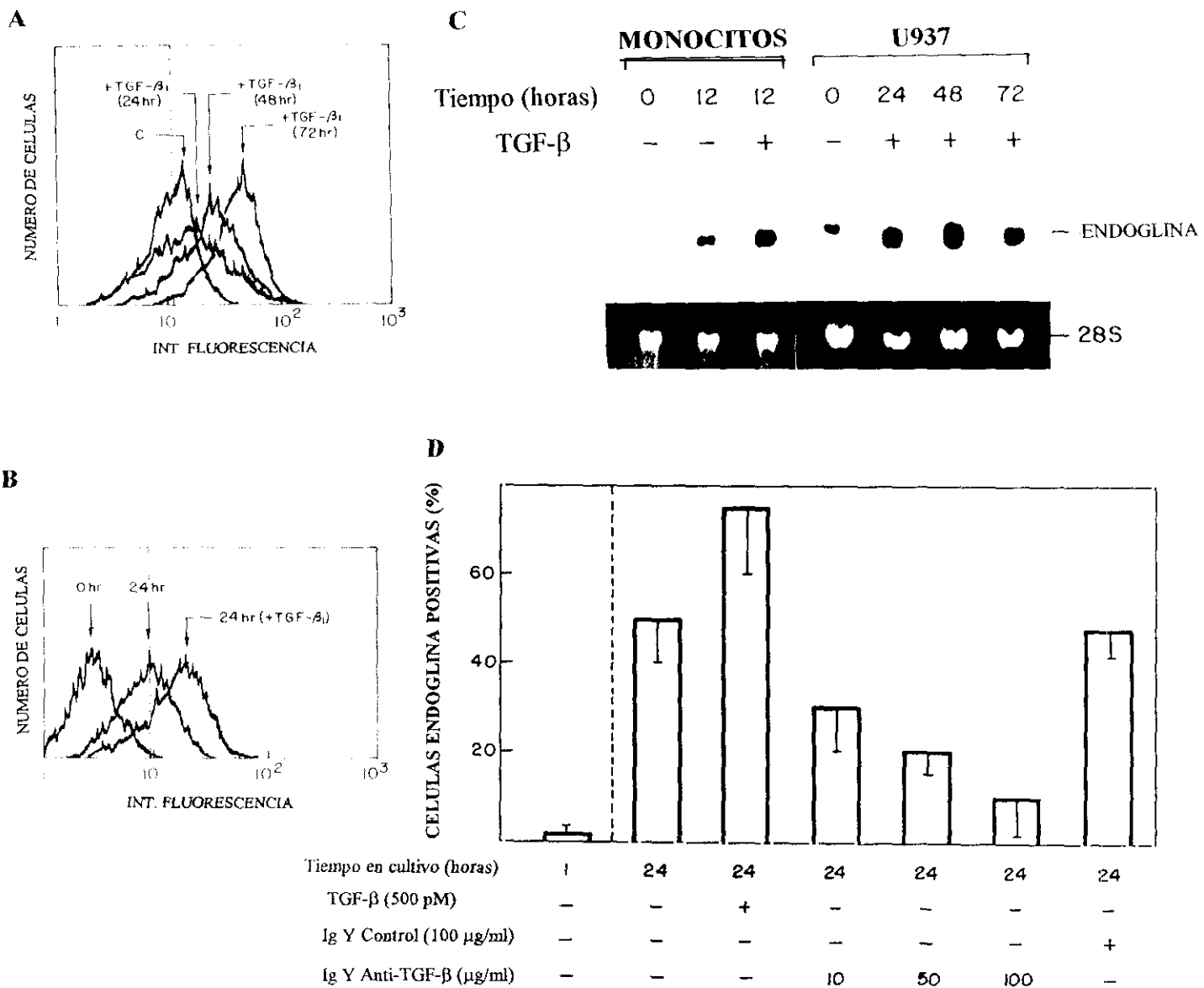


Fig. 28 Efecto del TGF-β sobre la expresión de endoglina en células monocíticas.

A. Análisis por citometría de flujo de células U937. Las células fueron no tratadas (c) o tratadas con 500 pM de TGF-β durante los tiempos indicados y la reactividad del Am 8E11 fue estimada mediante citometría de flujo. La línea vertical representa el límite del control negativo del ensayo medido con un anticuerpo irrelevante.

B. Análisis por citometría de flujo de la expresión de endoglina en monocitos de sangre periférica puestos en cultivo. Las condiciones usadas fueron similares a las descritas en (A).

C. Detección de los transcritos de endoglina en células monocíticas. Monocitos y células U937 fueron incubados en ausencia o presencia de 500 pM TGF-β durante los tiempos indicados. Los transcritos específicos de endoglina fueron detectados usando una sonda específica; como control de carga se incluye la tinción con bromuro de etidio del ARNr 28S.

D. Efecto del TGF-β producido de forma autocrina sobre la expresión de endoglina por los monocitos. Monocitos de sangre periférica fueron puestos en cultivo en presencia de anticuerpos bloqueantes de la unión del TGF-β a sus receptores, anticuerpos control o TGF-β añadido exógenamente. A los tiempos indicados, la expresión en membrana de endoglina fue estimada mediante citometría de flujo con el Am 44G4. En la figura se representa la media +/- DE de tres experimentos diferentes.

FUNCION	U937	U937 (+TGF- β)
PROT. DE ADHESION		
Integrina α 4	presente	disminuye
Integrina α 5	presente	aumenta
Integrina β 1	presente	no varía
Integrina β 2	presente	no varía
PECAM-1	presente	aumenta
ICAM-1	presente	disminuye
Agregación	NO	SI (mediada por PECAM-1)
ADHESION A MATRIZ		
fibronectina	NO	SI
laminina	NO	SI
colágeno I	NO	SI
sustrato	NO	SI
SEÑALIZACION		
<i>c-myc</i>	fuertemente expresado	fuerte disminución
<i>c-fos</i>	expresión débil	aumenta
<i>c-jun</i>	expresión débil	aumenta
Proliferación	SI	inhibición
PKC (membrana)	existe nivel basal	no varía
PKC (citosólica)	existe nivel basal	aumenta
Receptores de TGF- β	I, II y endoglina, bajos niveles de betaglicano	todos aumentan
Síntesis de TGF- β	NO	SI
Proteínas de matriz extracelular	NO	Fibronectina
Otras vías no caracterizadas	NO	SI (actividad quinasa de PECAM-1)

Tabla 3. Respuestas mediadas por TGF- β en la línea celular U937

Una vez comprobado el efecto regulador que el TGF- β ejerce sobre endogлина, se abordó la caracterización funcional de este receptor desde dos puntos de vista. Por una parte, demostrando que endogлина es un receptor funcional de la citoquina en el linaje macrófagico, y por otra, averiguando cual es la función que como receptor podía tener en las respuestas antes mencionadas. Para comprobar el primer punto, se realizaron ensayos de marcaje de afinidad con (125 I)-TGF- β en dos de las situaciones en que habíamos comprobado el aumento de expresión de la proteína en membrana (Fig. 29): Macrófagos obtenidos mediante diferenciación *in vitro* de monocitos de sangre periférica (Fig. 29 C) y células U937 tras tratamiento durante 48 horas con PMA (Fig. 29 D). El segundo objetivo fue abordado mediante la generación de transfectantes en U937 que sobreexpresaran ambas isoformas de endogлина; en la figura 30 se presentan los resultados concernientes a la caracterización de dichos transfectantes (fig. 30 A, B) y un ensayo cuantitativo mediante inmunodetección que pretende reflejar el grado de expresión en membrana de la proteína en las células U937, (no tratadas o tratadas con TGF- β y PMA), y en los transfectantes generados de ambas isoformas de endogлина (fig. 30 C).

Para demostrar la capacidad funcional de endogлина como receptor del TGF- β en el linaje macrófagico se realizaron ensayos de unión de la citoquina marcada con (125 I), entrecruzamiento covalente y posterior análisis mediante electroforesis de los receptores. En primer lugar, se caracterizaron los receptores presentes en las células U937 (Fig. 29 A, B). Como control de especificidad, se llevaron a cabo ensayos donde se había incluido un exceso de 50 veces la citoquina no marcada (Fig. 29 A), y mediante inmunoprecipitación específica se identificaron los receptores I y II. Para ello, se utilizaron anticuerpos policlonales comerciales, dirigidos contra una secuencia específica del dominio citoplásmico del receptor II (Fig. 29 B). Esta inmunoprecipitación dio como resultado tres bandas principales: Una banda bien definida con un peso molecular de aproximadamente 70 Kda (receptor I), una banda difusa con un peso entre 100-120 Kda (receptor II) y una banda ancha en la zona superior de los geles con peso > 170 Kda (correspondiente a betaglicano y endogлина, y homo- o hetero- oligómeros formados entre todos los receptores como consecuencia del entrecruzamiento covalente (Fig. 29 B, calle 1). La especificidad de las bandas radiomarcadas se demostró realizando la inmunoprecipitación en presencia de un exceso del péptido con la secuencia reconocida por los anticuerpos (Fig. 29 B, calle 2).

Los experimentos de marcaje de afinidad en macrófagos y U937 tratadas con PMA demostraron la presencia de endoglina como una banda radiomarcada con un peso aparente de 200 kDa, correspondiente a la proteína más la citoquina unida. En los extractos totales dicha banda era especialmente apreciable en el caso de las U937 tratadas con el éster de forbol, y en ambos casos, el complejo citoquina más receptor pudieron ser inmunoprecipitados específicamente con el Am 44G4. Experimentos similares fueron realizados con U937 tratadas durante tres días con el TGF- β a tres concentraciones diferentes, demostrando un aumento generalizado de la unión de la citoquina a todos sus receptores (datos no mostrados); este resultado corroboraba el aumento de expresión detectado mediante PCR tanto de endoglina como betaglicano y de los receptores I y II tras el tratamiento con la citoquina.

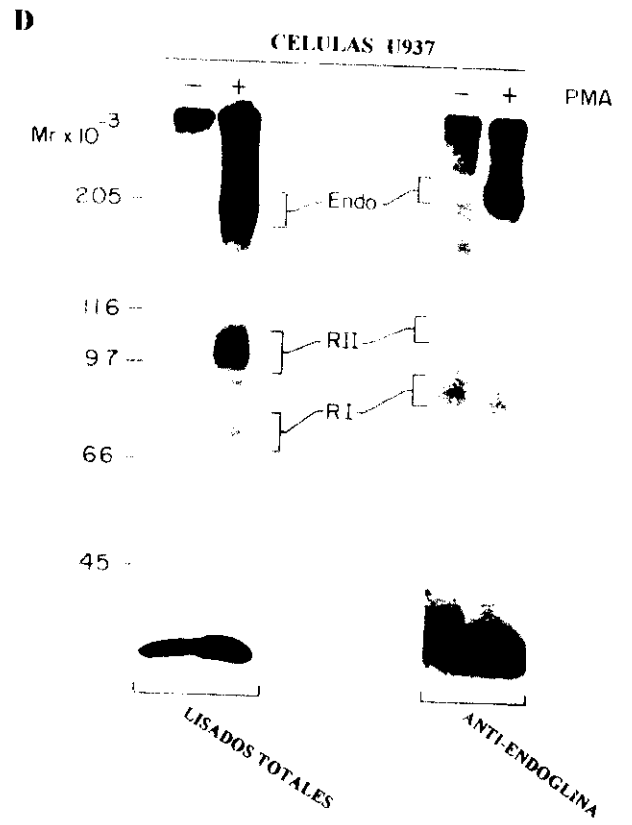
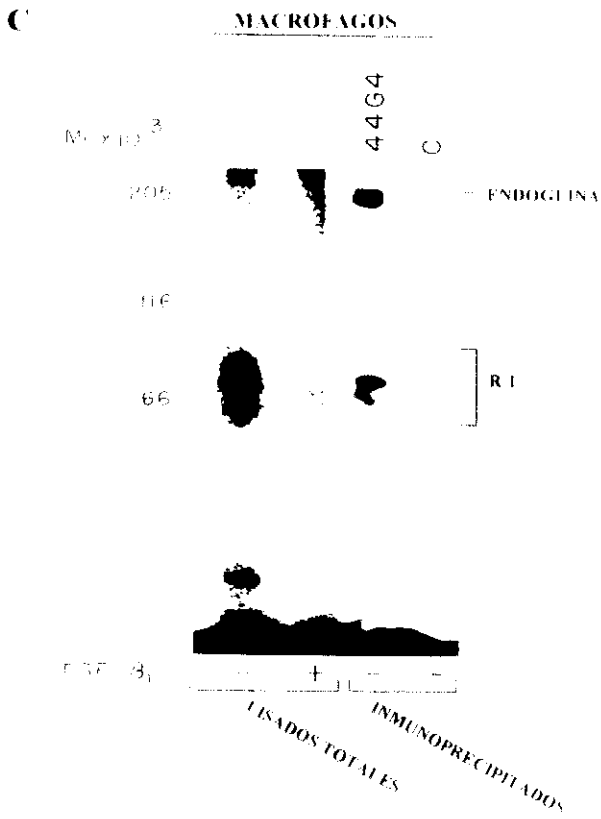
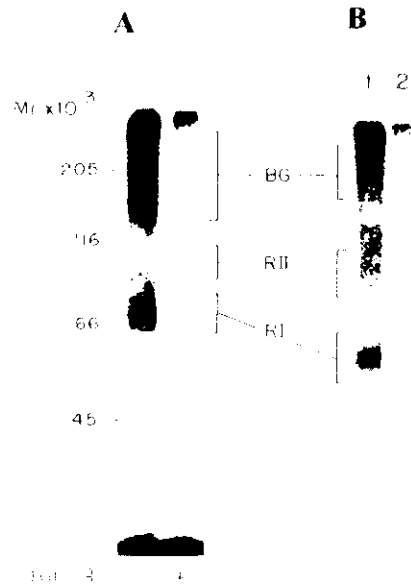
Fig. 29 Caracterización de los receptores del TGF- β en células U937 y detección de endoglina expresada por los macrófagos y U937 tratadas con PMA mediante marcaje de afinidad. (Se muestra en pag. 92)

A. Marcaje de afinidad con (125 I)-TGF- β de sus receptores específicos en células U937. Células U937 fueron incubadas con 250 pM de (125 I)-TGF- β , solo (-) o en presencia de un exceso de 50 veces de la citoquina no marcada, seguido de unión covalente con el agente químico DSS. Los lisados celulares fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y las bandas detectadas mediante un PhosphorImager.

B. Marcaje de afinidad e inmunoprecipitación. Transfectantes control fueron marcados como en A, y los lisados celulares sometidos a inmunoprecipitación con Aps de conejo anti-receptor II (calles 1-4). Calle 1: La inmunoprecipitación da lugar a una banda difusa con un peso molecular aparente entre 100-120 kDa correspondiente al receptor II, una banda clara con peso de 70 Kda correspondiente al receptor I y una amplia banda de peso >170 kda correspondiente a betaglicano y endoglina (poco expresados en estas células), y muy probablemente oligómeros de los receptores. Calle 2: La misma que la calle 1 pero realizando la inmunoprecipitación en presencia de un exceso del péptido que contiene la secuencia contra la que están dirigidos los Aps anti-receptor II.

C. Monocitos de sangre periférica fueron purificados y puestos en cultivo durante 4 días, tras este período se realizaron ensayos de marcaje de afinidad con (125 I)-TGF- β a una concentración de 250 pM, solo, o en presencia de un exceso de 50 veces de la citoquina no marcada. Tras el marcaje, la citoquina fue unida covalentemente a sus receptores con DSS. Extractos totales de las células o los inmunoprecipitados del Am 44G4 fueron analizados mediante electroforesis en condiciones no reductoras. Las bandas radiomarcadas fueron detectadas mediante un PhosphorImager.

D. Experimento similar al descrito en B realizado con células U937 no tratadas o tratadas durante 48 horas con PMA (la exposición de la figura está atenuada para poder distinguir los receptores en las células tratadas)



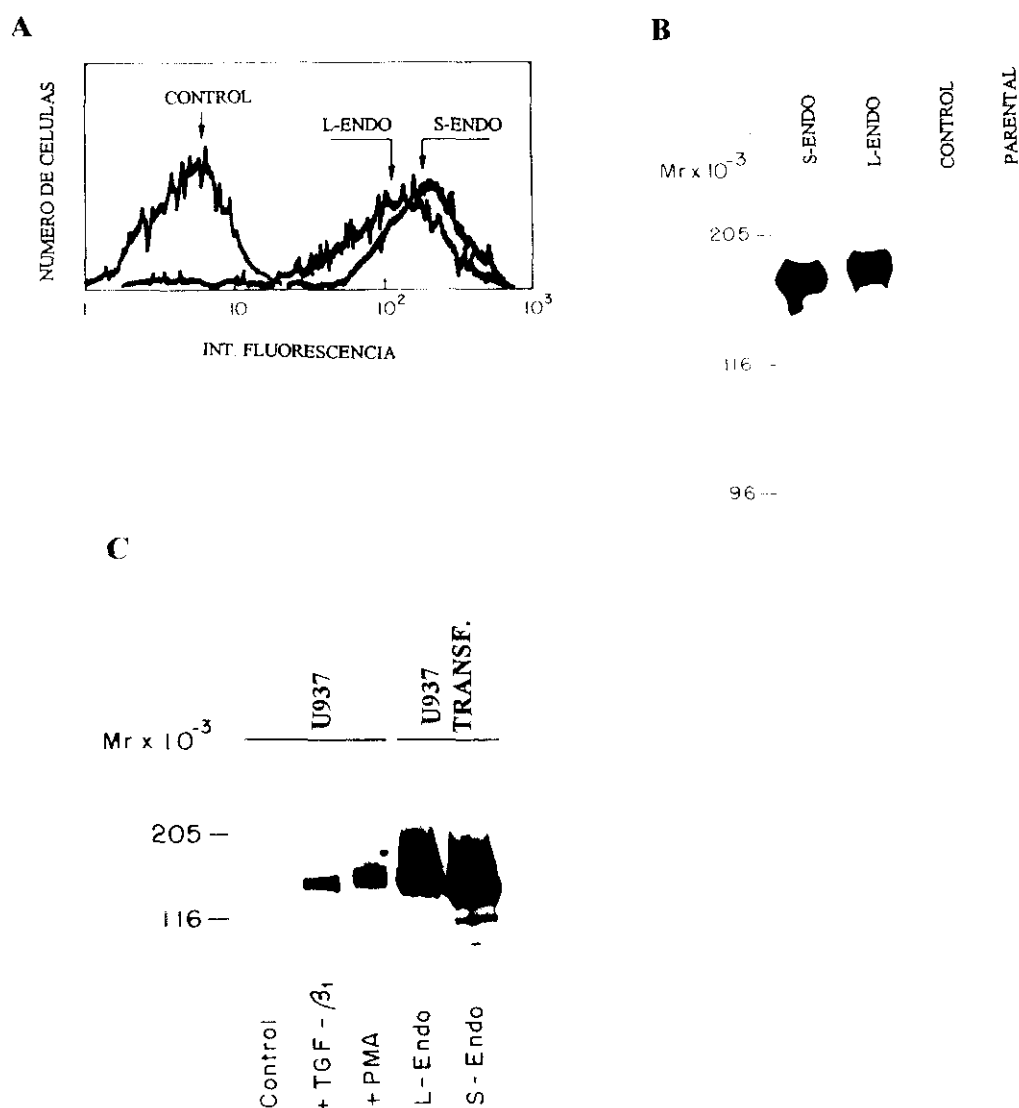


Fig. 30 Caracterización de los transfectantes de endoglina en células U937.

A. Análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana de ambas isoformas de endoglina. Las células fueron teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta con el Am 44G4. La expresión de la proteína en membrana del transfectante control también se muestra.

B. Análisis mediante inmunoprecipitación con el Am 44G4 tras marcaje de superficie con biotina de los transfectantes, control y de ambas isoformas de endoglina, en células U937. Tras la inmunoprecipitación, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras, transferidas a filtros de nitrocelulosa y las bandas biotinadas detectadas mediante incubación con streptavidina-peroxidasa seguida de un ensayo de quimioluminiscencia.

C Análisis cuantitativo mediante electroforesis en condiciones no reductoras, electrotransferencia e inmunodetección con el Am 44G4 de lisados celulares de U937 (línea parental), U937 tratadas con 500 pM de TGF- β durante 72 horas, U937 tratadas con PMA durante 48 horas y los transfectantes de ambas isoformas generados en dichas células

4.10 Análisis del papel de endoglina en la señalización del TGF- β

Una vez caracterizados los transfectantes, se procedió a la realización de ensayos funcionales para estudiar el papel que pudiera desempeñar la proteína en las respuestas celulares al TGF- β . En primer lugar, se analizó la proliferación celular, una de las actividades celulares que era inhibida en células control; sin embargo, los transfectantes de endoglina no mostraban inhibición o esta era menor cuando eran tratados a tres concentraciones diferentes de TGF- β 1 durante 24 horas (Fig. 31A). Cuando los transfectantes eran tratados con las mismas concentraciones de TGF- β 2, utilizado como control, sí se podía observar el efecto de inhibición de proliferación. La isoforma β 2 fue ensayada porque endoglina sólo une TGF- β 1 y β 3, lo que demostraba que el efecto funcional que encontrábamos se debía específicamente a la presencia de endoglina en la membrana. Este comportamiento descarta cualquier problema inespecífico de pérdida de respuesta por parte de las células, como consecuencia de la transfección. Además, los niveles de transcritos de *c-myc*, disminuidos en respuesta a la citoquina, y la pérdida de capacidad proliferante, no eran alterados tras el tratamiento en los transfectantes de la isoforma larga, mientras que eran sólo parcialmente disminuidos en la isoforma corta. Es importante destacar que los niveles basales de expresión de *c-myc* eran prácticamente el doble en los transfectantes de endoglina que en el transfectante control (Fig. 14B). Aunque el transfectante de la isoforma corta mostraba una pequeña pérdida de expresión del proto-oncogen, tras seis horas de tratamiento, sus niveles eran superiores a los basales del transfectante control. En conjunto, estos datos demostraban que la sobreexpresión de endoglina en membrana afectaba a la señalización de la citoquina, y en concreto, la proliferación se veía afectada en la regulación de la expresión de *c-myc*.

Uno de los efectos más significativos, observados en las células U937 tras el tratamiento con TGF- β , es la formación de agregados celulares, y la regulación funcional de la proteína de adhesión PECAM-1. De acuerdo con los resultados mostrados en secciones anteriores, la glicoproteína PECAM-1 se encuentra sometida a una doble regulación en este sistema experimental: El aumento de expresión en membrana y la fosforilación a tiempos más tardíos; ambos son necesarios para que el fenómeno de agregación tenga lugar. Cuando se analizó este fenómeno en los transfectantes de endoglina, no se pudo observar la formación de agregados celulares en presencia de la citoquina (Fig. 32 A); esto nos llevó a plantearnos si la expresión

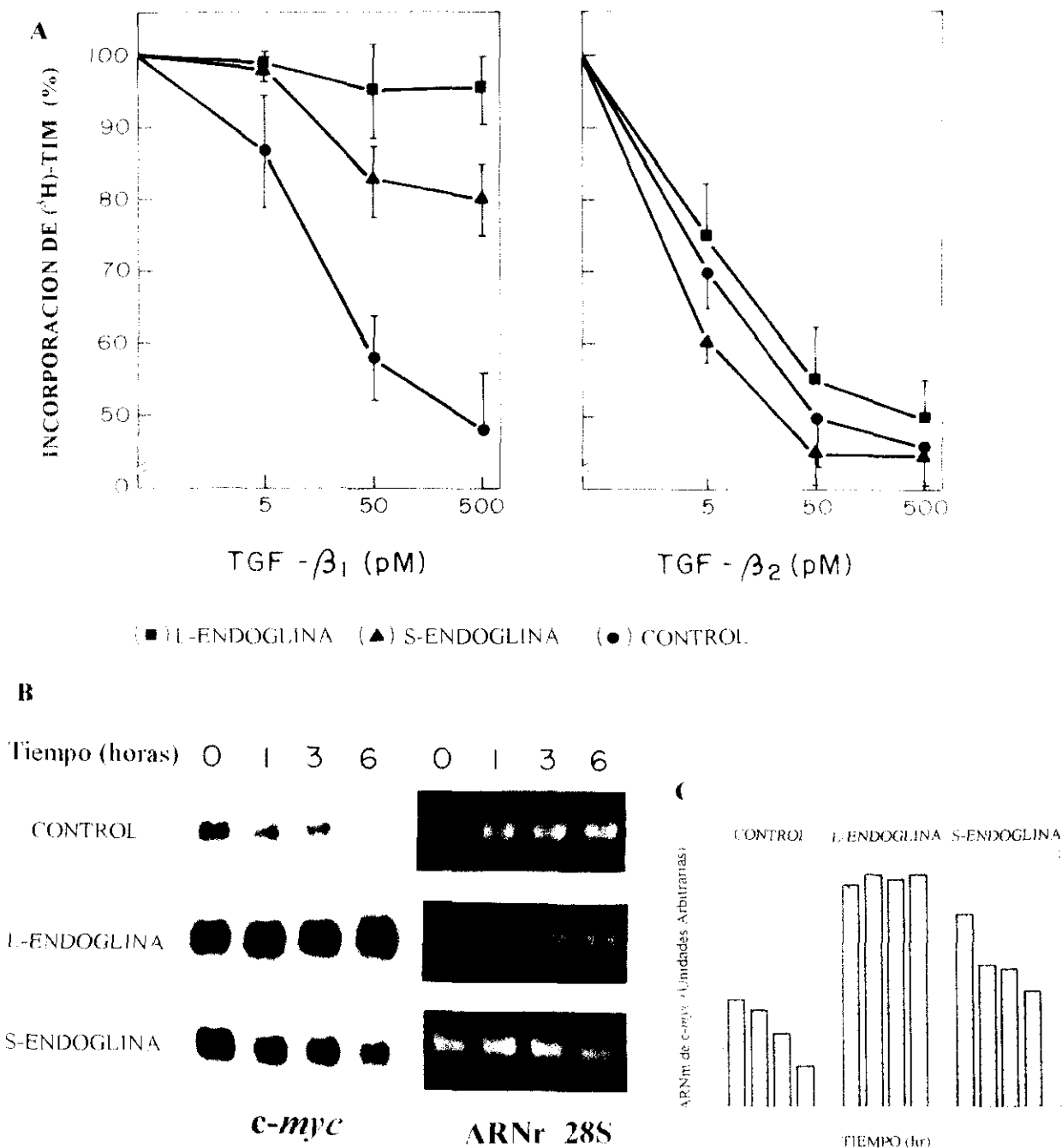


Fig. 31 Efecto de la sobreexpresión de endoglin en las respuestas proliferativas de U937 mediadas por el TGF- β .

A. Efecto sobre la inhibición de la proliferación. Transfectantes, control y de ambas isoformas de endoglin, fueron tratados con TGF- β_1 (panel izquierdo) o TGF- β_2 (panel derecho) a las concentraciones indicadas y a las 24 horas de tratamiento se estimó la inhibición de la proliferación mediante la captación de $(^3\text{H})\text{Timidina}$. Se representa la media de tres experimentos realizados por triplicado \pm DE. El valor 100 fue asignado al número de cuentas en cada uno de los transfectantes, en ausencia de las citoquinas.

B. Efecto sobre la inhibición de expresión de *c-myc*. U937 transfectadas fueron tratadas durante los tiempos indicados con 500 pM de TGF- β_1 y los niveles de los transcritos específicos de *c-myc* detectados mediante una sonda específica. Como control de carga se incluye la tinción con bromuro de etidio de los ARNr 28 S (panel izquierdo). Los niveles de *c-myc* fueron cuantificados utilizando el programa informático de ImageQuant (C).

de endoglina estaba ejerciendo un efecto negativo sobre el aumento de expresión y/o fosforilación de PECAM-1. El análisis por citometría de flujo, reveló que la expresión de PECAM-1 aumentaba de forma similar en los transfectantes control que en los transfectantes de ambas isoformas de endoglina. Sin embargo, al realizar ensayos de marcaje metabólico con (^{32}P)-ortofosfato seguido de inmunoprecipitación de PECAM-1, pudimos comprobar que la fosforilación en los transfectantes estaba inhibida (Fig 32 B), lo que podía explicar la no formación de agregados en dichas células.

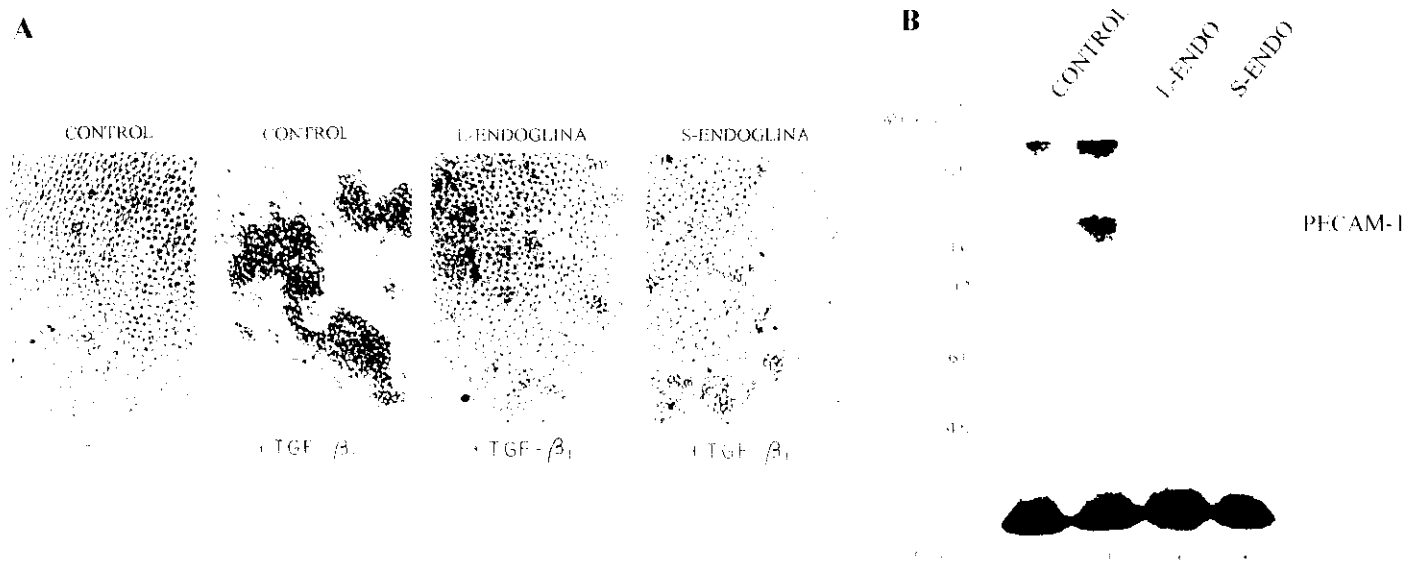


Fig. 32 Efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre la formación de agregados celulares

A. Transfectantes control y de ambas isoformas de endoglina fueron incubados con 500 pM de TGF- β durante 24 horas y la formación de agregados celulares fue visualizado mediante microscopia de contraste de fases. B. Fosforilación de PECAM-1 en dichos transfectantes. Transfectantes control sin tratar, así como transfectantes control y de ambas isoformas de endoglina tratados con 500 pM de TGF- β durante 20 horas fueron marcados metabólicamente con (^{32}P)-ortofosfato durante 4 horas en ausencia o presencia de la citoquina. Tras obtener los lisados celulares, estos fueron sometidos a inmunoprecipitación con el Ab HC1/6 (anti-PECAM-1) y las muestras obtenidas sometidas a electroforesis en geles de poliacrilanuda en condiciones no reductoras. Las bandas radiomarcadas fueron detectadas usando un PhosphorImager.

Otro efecto observable en los cultivos de las células U937, cuando son tratadas con TGF- β , es la adquisición de formas extendidas que adquieren la capacidad de adhesión

directamente al sustrato de cultivo (no mostrado). La aparición de esta morfología ésta muy ligada a la capacidad de síntesis de componentes de la matriz extracelular, de los que el TGF- β es un potente inductor, así como de la regulación de los receptores de adhesión a dichos componentes en el membrana celular. Cuando se analizaron estas propiedades en los transfectantes de endoglina, estos mostraban un comportamiento diferente a los transfectantes control o la línea parental, adquiriendo en mucha menor proporción el fenotipo antes mencionado. Con estas observaciones se realizaron tres tipos de ensayos dirigidos a conocer el grado de respuesta que los transfectantes tenían en relación a su capacidad de adhesión. En primer lugar, la síntesis de fibronectina es un marcador de la respuesta celular al TGF- β tal y como reportaron Igotz y Massagué (1986). Por tanto, se llevaron a cabo marcajes metabólicos con (35 S)-metionina/cisteína a diferentes tiempos, y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación específica de la fibronectina presente en el sobrenadante de las células (Fig. 33 A). Los transfectantes control mostraban una débil respuesta a las 4 horas de tratamiento, mientras que a las 24 horas el efecto sobre la síntesis ya era importante. Sin embargo, los transfectantes de endoglina no mostraban el mismo efecto. Esta disminución en la capacidad de respuesta de las células podría explicar la no aparición del fenotipo “extendido” que se observaba en los transfectantes control. Un segundo tipo de ensayos estaba dirigido a comprobar la capacidad de adhesión directa al sustrato de cultivo, lo que indirectamente está en relación con la capacidad de síntesis de componentes de la matriz extracelular y la activación de los receptores celulares de estos componentes. Para ello, se realizaron cultivos de células U937 en ausencia o presencia de la citoquina y se valoró el porcentaje de células que quedaban directamente adheridas al plástico de cultivo (Fig. 33 B). De nuevo, el comportamiento de los transfectantes de endoglina era diferente al de los transfectantes control y el aumento de la capacidad adhesiva de las células estaba inhibido en respuesta al TGF- β . Por último, se realizaron ensayos de adhesión directa a fibronectina, previamente fijada al sustrato, que demostraron de nuevo que la capacidad de adhesión de los transfectantes de endoglina era menor que la de los transfectantes control o la línea parental (Fig. 33 C). Es importante destacar en este punto que el aumento de expresión en membrana del receptor de fibronectina, la integrina $\alpha_5\beta_1$, también ocurría en los transfectantes de endoglina, por lo que la regulación funcional de dicho receptor debe estar sometida a algún tipo de modificación pos-traducciona, en los transfectantes control y la línea parental, pero no en los transfectantes de endoglina en respuesta a la citoquina.

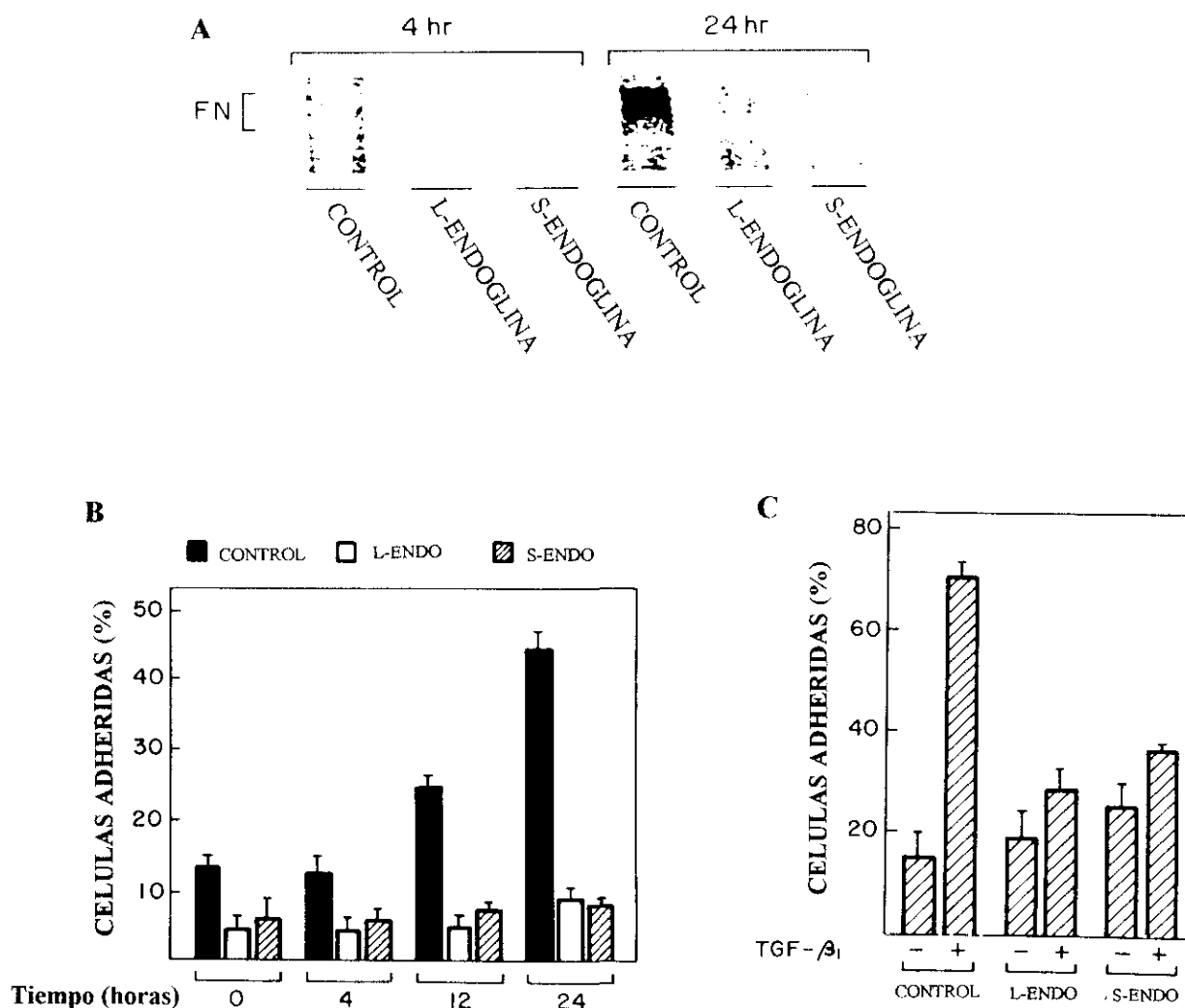


Fig. 33 Efecto de la sobreexpresión de endoglina en la síntesis de fibronectina y la regulación de sus receptores en membrana.

A. Efecto sobre la síntesis de fibronectina: Transfectantes control y de ambas isoformas de endoglina fueron incubados con 500 pM de TGF- β durante los tiempos indicados y marcados metabólicamente con (35 S)metionina/cisteína durante 4 horas. En el caso del tratamiento durante 4 horas, éste coincidió con el marcaje. En el caso del tratamiento durante 24 horas, las células fueron pretratadas durante 20 horas seguido de las 4 horas adicionales de marcaje en presencia de la citoquina. Los sobrenadantes de las células fueron sometidos a inmunoprecipitación con Aps de conejo anti-fibronectina. Los productos de la inmunoprecipitación fueron entonces sometidos a electroforesis en condiciones reductoras y las bandas detectadas en un PhosphorImager.

B. Efecto sobre la adhesión directa a sustrato de cultivo. Los transfectantes fueron tratados con 500 pM de TGF- β en placas de 96 pocillos sobre superficie no cubierta con ningún componente de la matriz extracelular. A los tiempos indicados el medio de cultivo fue retirado y los pocillos lavados dos veces. Las células adheridas fueron fijadas con glutaraldehído al 1% durante toda la noche y después de lavar fueron teñidas con azul de toluidina al 0.1%. Tras los lavados correspondientes, el colorante asociado a las células fue extraído con ácido acético al 10%. La densidad óptica en los pocillos fue medida a 628 nm con un Multiscan Biochromatic. La gráfica representa la media \pm DE de un experimento representativo por triplicado.

C. Efecto sobre la adhesión a superficie de cultivo cubierta con fibronectina. Los transfectantes fueron tratados con 500 pM TGF- β . Tras 24 horas en cultivo, las células fueron lavadas y resuspendidas en RPMI con 1% de BSA y 10 mM HEPES e incubadas en placas de 96 pocillos, sobre los cuales se había fijado fibronectina. Tras 1 hora de incubación a 37 °C, las placas fueron lavadas, fijadas y teñidas como se describe en el apartado B.

Otros dos efectos de la células U937 en respuesta al TGF- β eran el aumento de expresión en membrana de todos sus receptores (tipo I y II, betaglicano y endoglina), así como la síntesis del propio TGF- β . Respecto a estos efectos, se pudo demostrar mediante análisis por PCR cuantitativa, en colaboración con el grupo de Michelle Letarte que no había inhibición de ninguna de las dos respuestas tras 3 días de tratamiento con la citoquina (datos no mostrados).

4.11 La sobreexpresión de endoglina no aumenta la degradación del TGF- β

Una vez demostrado el efecto regulador que endoglina tiene en las respuestas celulares al TGF- β , se caracterizó este fenómeno desde el punto de vista bioquímico. Una de las posibles explicaciones a los efectos negativos que se observaban en los transfectantes, podrían sustentarse en que la presencia de endoglina estuviera facilitando una tasa más rápida de degradación de la citoquina en dichas células. Los receptores del TGF- β sufren internalización y el factor es degradado tras la unión a la membrana (Frolik *et al.* 1984; Massagué 1987), y este efecto podría estar modificado por la sobreexpresión de endoglina. La contribución de endoglina podría ser posible, bien por un mecanismo directo tras la unión de la citoquina, o bien por un mecanismo indirecto por el cual endoglina facilitara la internalización y degradación de los receptores señalizadores una vez hubieran unido el factor. De este modo, endoglina actuaría bien como un secuestrador del TGF- β en membrana, o bien tras la asociación a los receptores señalizadores en presencia de la citoquina (Yamashita *et al.* 1994) facilitaría su internalización. Por una u otra vía, la cantidad de complejos señalizadores (receptores I y II) efectivos podrían disminuir y esto explicaría porqué algunas de las respuestas celulares, son inhibidas en los transfectantes.

Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos de unión y degradación de la citoquina unida a las células (Fig. 34). La realización de estos ensayos se llevaron a cabo básicamente como describen Frolik *et al.* (1984). Como se puede comprobar, no se encontraron diferencias significativas entre los transfectantes control y los de ambas isoformas de endoglina. Estos ensayos descartaban que el mecanismo de actuación de endoglina se restringiera a la degradación del factor y apuntaban hacia la existencia de un mecanismo más fino de regulación del acceso de la citoquina a los receptores señalizadores, y/o la existencia de algún efecto pos-señalización (vía abajo respecto al complejo I, II) modificado por la presencia de endoglina.

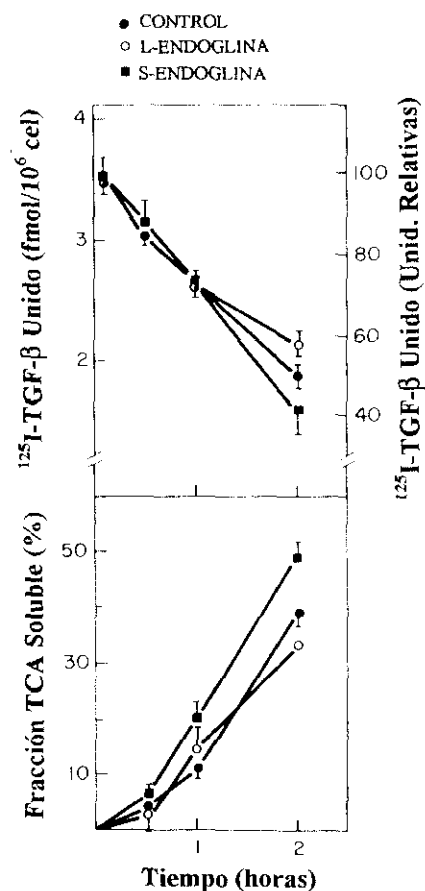


Fig. 34 Degradación del ¹²⁵I-TGF-β unido a los transfectantes de células U937. Transfectantes control (Control), sobreexpresando L-endoglina (L-Endo) y S-endoglina (S-Endo) fueron incubados durante 1 hora a 37 °C con ¹²⁵I-TGF-β a una concentración 100 pM en DMEM 0.1% de BSA y 25 mM HEPES. Tras el marcaje de afinidad, las células fueron lavadas varias veces con medio fresco y alícuotas de 2,5 x 10⁶ células fueron reincubadas a 37 °C durante los períodos indicados. Al final de cada intervalo, las células fueron recogidas por centrifugación y los sobrenadantes colectados. Dichos sobrenadantes fueron precipitados con ácido tricloroacético al 10% (concentración final) en hielo. La radiactividad asociada a las células, así como la asociada a las fracciones insoluble y soluble del sobrenadante fue medida en un contador gamma. Los porcentajes fueron calculados como se describe en la sección "Materiales y métodos" En la gráfica se representa la media +/- DE de un experimento por triplicado.

4.12 Endoglina facilita la unión del TGF-β a sus receptores señalizadores

Para estudiar el efecto que endoglina estaba ejerciendo sobre la unión del ligando a los receptores señalizadores, se realizaron ensayos de unión a diferentes concentraciones de la citoquina marcada con (¹²⁵I), entrecruzamiento covalente y posterior análisis mediante

electroforesis con los transfectantes de endoglina. De esta manera se analizaron las posibles variaciones con respecto a los transfectantes control o la línea parental (fig. 35)

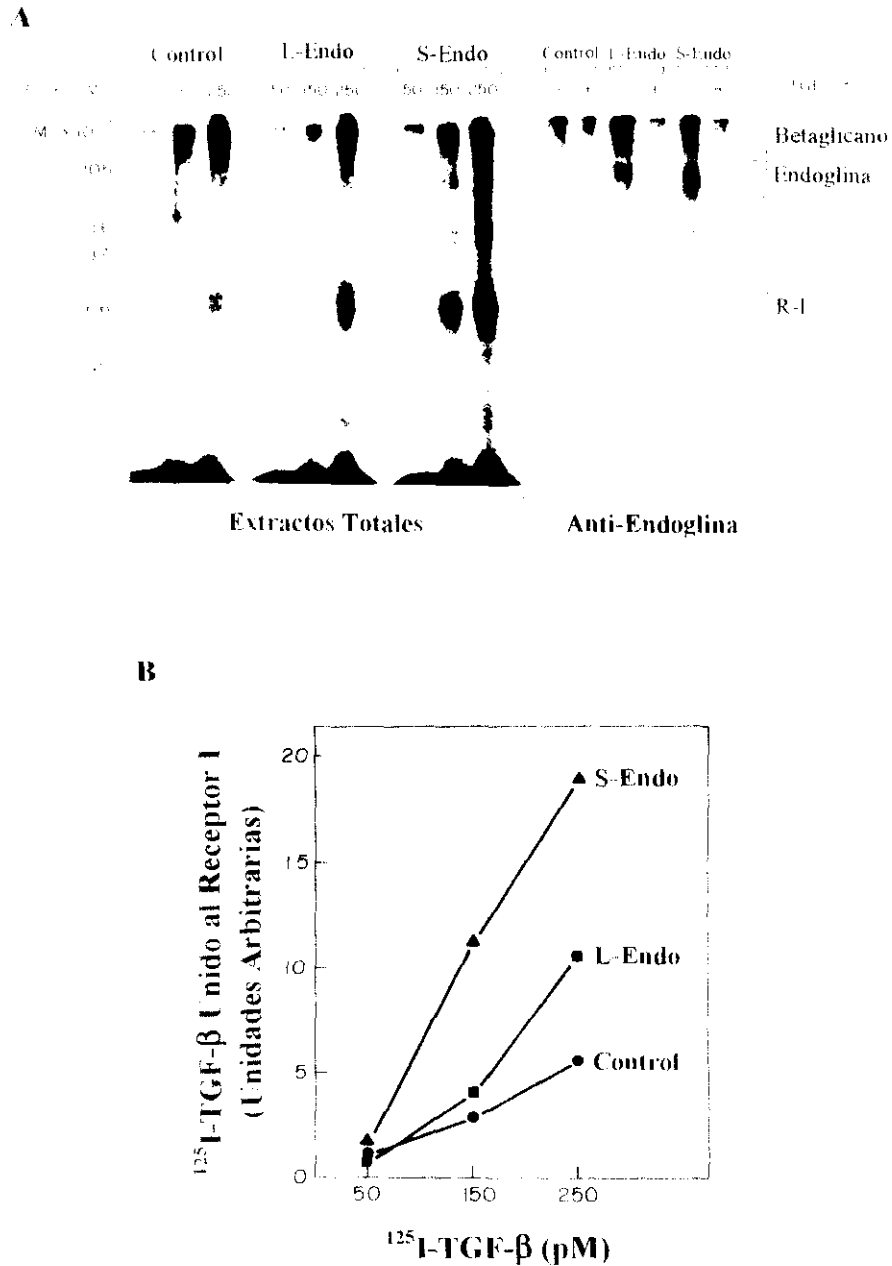


Fig. 35 Marcaje de afinidad en los transfectantes de células U937

A. Unión del TGF- β a sus receptores específicos en los transfectantes. Células transfectadas, expresando L-endoglina (L-Endo) o S-endoglina (S-Endo) y células control fueron marcadas con 50, 150 o 250 pM de (^{125}I)-TGF- β , y posteriormente se realizó la unión covalente de la citoquina a sus receptores con DSS. Las células fueron lisadas y los extractos analizados mediante electroforesis en condiciones no reductoras. En paralelo, se realizaron ensayos a 250 pM de (^{125}I)-TGF- β , en ausencia o presencia de un exceso de 50 veces la citoquina no marcada. Los lisados celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación con el Am 44G4, y posterior electroforesis. Las bandas radiomarcadas fueron detectadas mediante un PhosphorImager.

B. Efecto de la expresión de endoglina sobre la unión del TGF- β al receptor I. Análisis densitométrico de la banda correspondiente al receptor I mostrada en el panel A utilizando el programa informático ImageQuant. Los niveles relativos de radiactividad asociada con el receptor I están representados frente a las concentraciones del ligando marcado utilizado en el ensayo

Estos ensayos demostraron que a concentraciones crecientes de la citoquina se producía un desplazamiento de la unión del ligando a los receptores señalizadores, en particular al receptor I (Fig. 35 A). Este efecto era más evidente en el transfectante de la isoforma corta y los ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-endoglina demostraban que en los transfectantes de ambas isoformas se coprecipitaban dos bandas correspondientes a los receptores I y II. El análisis densitométrico de la banda correspondiente al receptor I en cada uno de los transfectantes está representado en la Figura 19 B. Tal como se deduce de dicha figura, endoglina es capaz de aumentar la unión del TGF- β al receptor I, dos veces en el caso de la isoforma L y cuatro veces en el de la isoforma S, a la concentración más alta del ensayo, 250 pM de TGF- β . Estudios de PCR realizados en colaboración con el grupo de Michelle Letarte demostraron que la sobreexpresión de endoglina en dichos transfectantes no alteraba la expresión del resto de los receptores del TGF- β , descartando que el aumento de citoquina unida se pudiera deber a alteraciones en dichos niveles (datos no mostrados).

4.13 Endoglina necesita la presencia del receptor II para unir el TGF- β

Estos resultados sugerían que endoglina pudiera estar asociándose y presentando el ligando directamente al receptor I. Además, pese a la alta expresión en membrana de la endoglina, su contribución como tal receptor en el total de la citoquina unida a las células no era muy importante. El efecto realmente apreciable, tal como se puede comprobar en la fig. 19 era que endoglina actuaba como un presentador del ligando al receptor I, más que actuar como un receptor estático. El hecho de que la cantidad de TGF- β unido a endoglina no estuviera en relación directa con su expresión en membrana, más bien sugería que existiera un factor limitante en la capacidad de unión del ligando, este factor podría ser alguno de los otros receptores. Para analizar este punto se realizaron ensayos de expresión transitoria en células COS-7, mediante cotransfección de combinaciones endoglina/receptor I y endoglina receptor II seguidos por ensayos de unión y entrecruzamiento covalente (Fig.36). El panel A muestra los controles de nuestros ensayos donde se puede comprobar que, tal como se ha descrito (Wrana *et al.* 1992), el receptor I no une la citoquina en ausencia del receptor II; éste por su parte es independiente, desde el punto de vista de la unión del ligando, de la presencia del I; y por último, el receptor II presenta la citoquina al receptor I. Cuando se realizaron cotransfecciones del receptor I y endoglina, se pudo comprobar que ni el receptor I unía el ligando ni endoglina tampoco. Sin embargo al realizar las cotransfecciones del receptor II y

endoglina, ambos unían el TGF- β (Fig. 36 panel B). El panel C muestra una inmunoprecipitación con el Am 44G4 tras un marcaje de superficie con biotina, de las mismas células que el panel B (realizado en paralelo), donde se demuestra la presencia de endoglina en la superficie de las células tanto cuando se cotransfectó con el receptor I, como con el II.

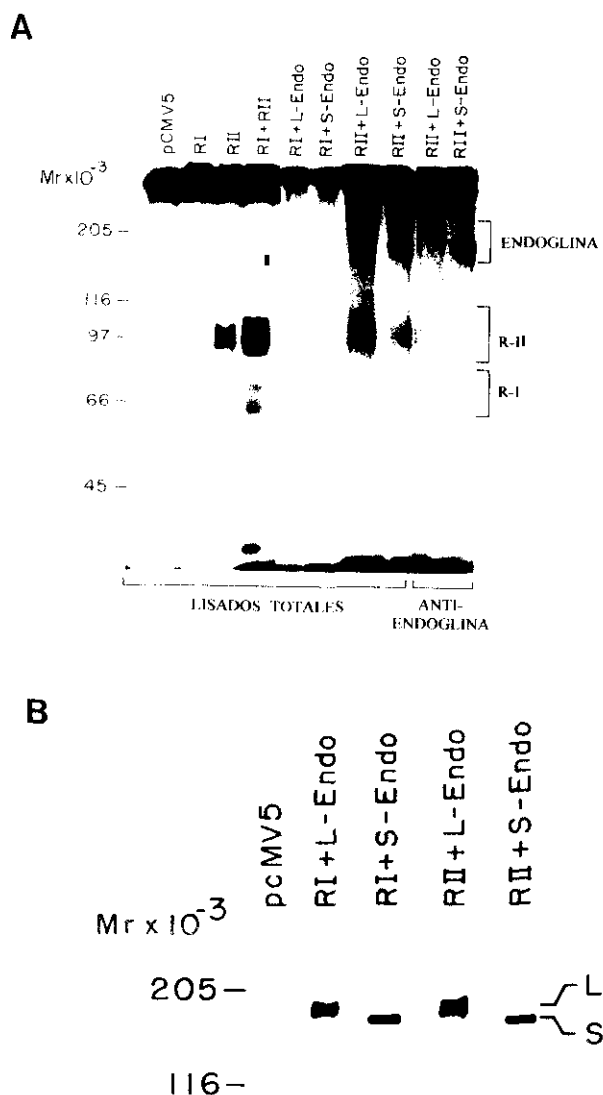


Fig. 36 Unión del TGF- β a células COS-7 transfectadas con RI, RII y endoglina

A. Células COS-7 fueron transfectadas de forma transitoria con el vector de expresión pCMV5 conteniendo los ADNc que codifican para los receptores I y II, L-Endoglina y S-Endoglina. A las 72 horas de realizar la transfección con las construcciones indicadas, las células fueron marcadas con (125 I)-TGF- β a una concentración de 250 pM y el ligando fue unido a sus receptores con DSS. Los lisados celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación con el Am 44G4 donde se indica. La separación de los receptores radiomarcados se realizó mediante electroforesis en condiciones no reductoras y las bandas detectadas con un PhosphorImager. Las posiciones de los receptores I y II así como las de endoglina están indicadas.

B. Marcaje de superficie con biotina e inmunoprecipitación de células COS-7 transfectadas con las combinaciones que se indican. Tras la inmunoprecipitación, las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones no reductoras, transferencia a nitrocelulosa y ambas isoformas de endoglina detectadas mediante estreptavidina-peroxidasa y ensayo de quimioluminiscencia. Este ensayo sirve de control al mostrado en A respecto a la presencia de endoglina en la superficie de las células transfectadas.

Los resultados obtenidos mediante transfección transitoria en células COS-7 fueron corroborados mediante la generación de transfectantes estables de ambas isoformas de endogлина en mioblastos de rata L₆E₉ (Fig.37). Se eligió este tipo celular porque estas células no expresan ni betaglicano ni endogлина y sirvieron como modelo de estudio de la función de betaglicano mediante la generación de transfectantes de dicha molécula (López-Casillas *et al.* 1993).

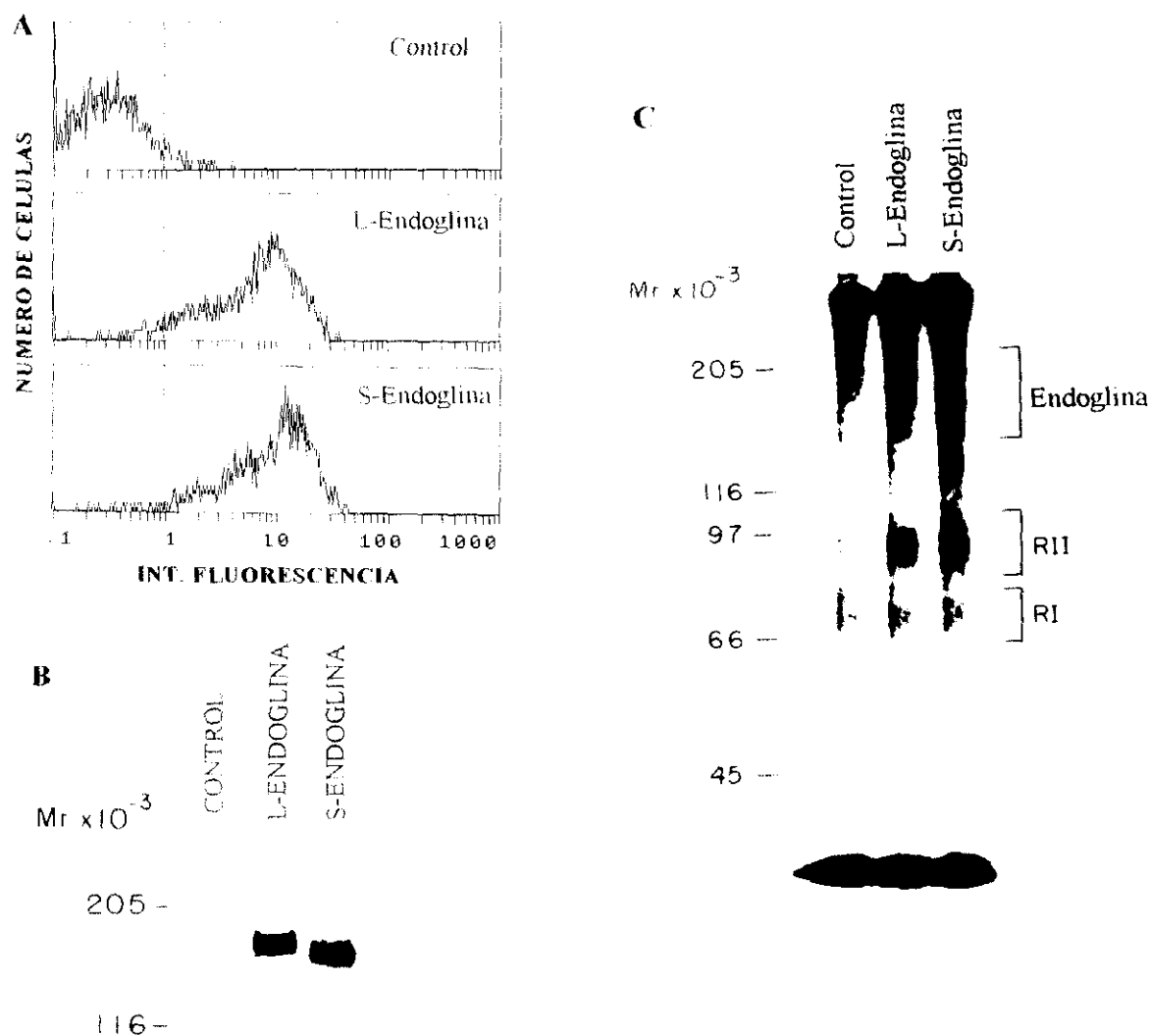


Fig. 37 Caracterización de los transfectantes de endogлина en mioblastos L₆E₉. La línea mioblástica de rata L₆E₉ fue transfectada establemente con los ADNs de L-endogлина (L-Endo) o S-endogлина (S-Endo) en el vector de expresión pCEXV y su expresión en membrana fue analizada.

A. Análisis por citometría de flujo de la expresión de ambas isoformas de endogлина con el Am 44G4. En la figura también se representa la tinción del transfectante control con dicho Am.

B. Análisis mediante inmunoprecipitación. Los transfectantes fueron marcados en superficie con biotina, sometidos a inmunoprecipitación con el Am 44G4 y las bandas biotinadas detectadas tras la transferencia de las proteínas a nitrocelulosa, utilizando streptavidina conjugada a peroxidasa y un ensayo de quimioluminiscencia.

C. Marcaje de afinidad con 250 pM de (¹²⁵I)-TGF-β y posterior unión covalente con DSS. Los lisados celulares fueron analizados mediante electroforesis y la detección de las bandas se realizó con un PhosphorImager.

5.-Discusión

En este trabajo se han estudiado algunos de los efectos que el TGF- β induce en células monocíticas, empleando como modelo la línea U937 (Sundström y Nilsson 1976), por constituir un sistema experimental ampliamente utilizado para analizar la diferenciación macrofágica. Aunque no se han presentado resultados formalmente relacionados con el proceso de diferenciación, sí se han estudiado algunas propiedades funcionales que son reguladas durante dicho proceso. Por otra parte, la línea celular U937 conserva la capacidad de respuesta al TGF- β , capacidad ausente en muchos tipos celulares como consecuencia de su origen transformado (Kimchi *et al.* 1988; Roberts y Sporn 1990; Filmus *et al.* 1992; Markowitz *et al.* 1995).

A continuación, se discutirán los tres puntos alrededor de los cuales giran los resultados obtenidos:

- Regulación funcional de PECAM-1 por el TGF- β
- Regulación de la expresión y fosforilación de endogлина
- Papel de endogлина en las respuestas celulares mediadas por el TGF- β .

5.1 Regulación funcional de PECAM-1 por el TGF- β

El presente estudio demuestra que el TGF- β induce la formación de agregados en las células U937 y que en dicho proceso participa PECAM-1, lo que nos ha permitido utilizar las células U937 como un modelo para el estudio de la activación *in vitro* de PECAM-1 en células monocíticas. La figura 38 resume de forma esquemática los resultados obtenidos respecto a la regulación de PECAM-1. El TGF- β ejerce sus efectos de dos formas diferentes (vías a y b). En primer lugar, la citoquina regula transcripcionalmente la expresión en membrana de PECAM-1. Este efecto es muy probablemente mediado por la PKC, ya que la presencia de inhibidores de dicha actividad reducen el aumento de expresión de dicha molécula. Otra serie de evidencias experimentales también apoyan que la expresión de PECAM-1 en membrana sea dependiente de la actividad PKC. Así, el tratamiento de las células con estaurosporina o H-7 en ausencia de otro estímulo, disminuye los niveles basales de expresión de la proteína. Por otra parte, el aumento de expresión de PECAM-1 asociado a la diferenciación de líneas mieloides ha sido descrito en las líneas celulares humanas U937, HL60 y HEL (Cabañas *et al.* 1989; Goldberger *et al.* 1994b). Entre otros, el agente inductor utilizado en dichos estudios es el PMA, potente activador de la PKC tanto *in vivo* como *in vitro* (Exton 1990), habiéndose reportado además, la necesidad de una actividad sostenida de esta quinasa en la diferenciación hacia macrófago

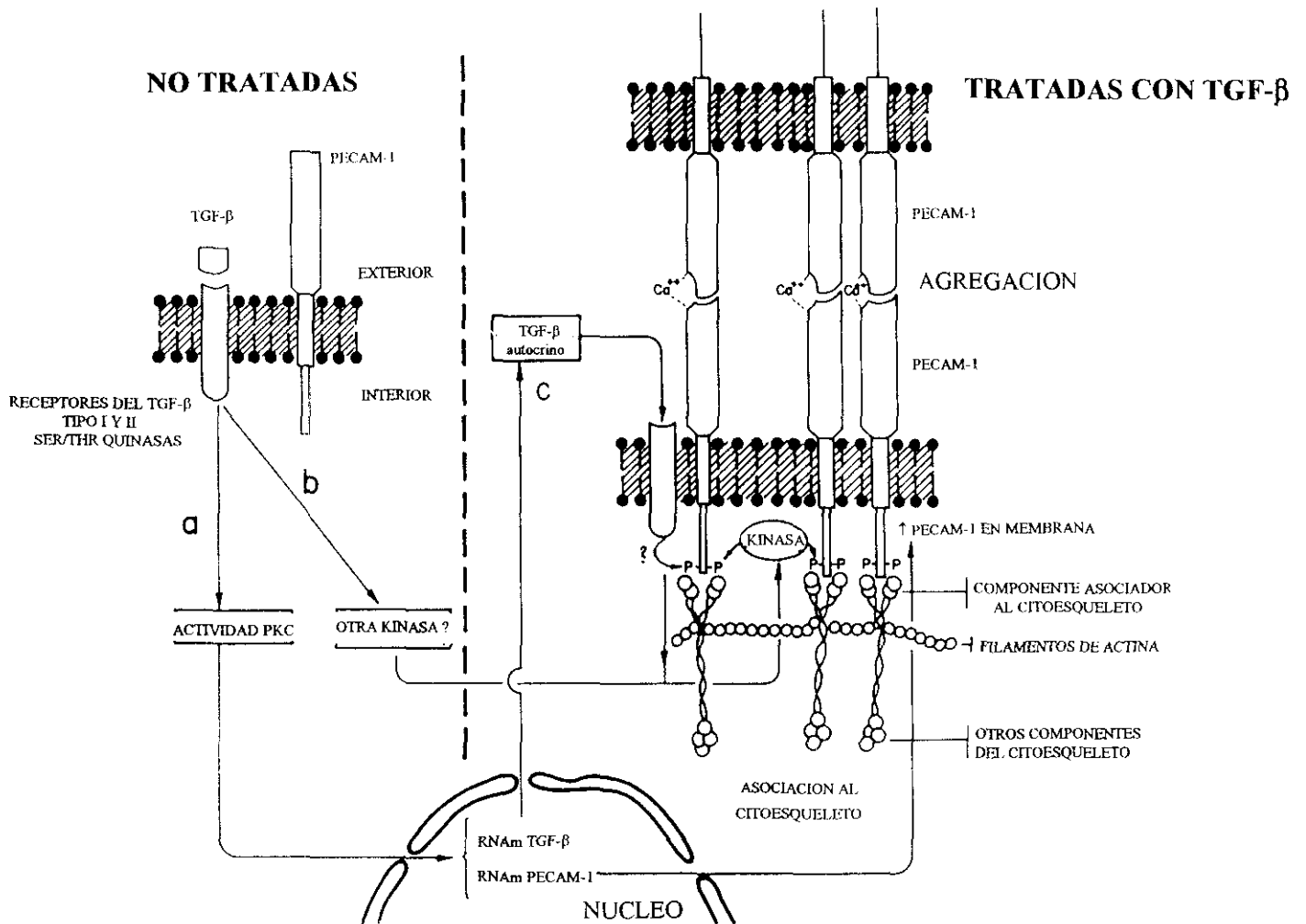


Figura 38. Regulación funcional de PECAM-1 por TGF- β . a) TGF- β se une a los receptores señalizadores en la membrana de la célula, lo que conduce a la activación de alguna isoforma citosólica de la PKC, el aumento de esta actividad quinasa es responsable del aumento de la tasa de transcripción y expresión en membrana de PECAM-1. b) TGF- β activa otra quinasa, de naturaleza desconocida hasta el momento, la cual fosforila a PECAM-1, promoviendo en este estado su asociación al citoesqueleto. Una vez ocurridos estos eventos, PECAM-1 adquiere una conformación activa desde el punto de vista de la adhesión, uniéndose a su receptor en otra célula. En la figura hemos representado un modelo de unión homofilico (interacción PECAM-PECAM). c) El TGF- β añadido exógenamente induce la síntesis de forma autocrina de más TGF- β , lo que permite una amplificación de los procesos a y b.

de la línea celular HL60 (Aihara *et al.* 1991). Se conocen al menos diez isoformas de PKC con diferentes patrones de expresión tisular y requerimientos para su activación (Nishizuka 1992). En este sentido, se han reportado cuatro isoformas de esta quinasa, α y β (mayoritaria), ϵ y ζ (minoritarias) en monocitos humanos, siendo sólo la isoforma α translocada a membrana tras

la activación con el éster de forbol (Chang y Beezhold 1993). En células U937 también se ha descrito la presencia de la isoforma ζ la cual no es translocada a la membrana tras su activación (Ways *et al.* 1992). El TGF- β induce un aumento de la actividad PKC en la fracción citosólica de las células U937, aunque están por determinar cual pueda ser la isoforma(s) implicada en este proceso. No obstante, cabría esperar una alta especificidad de dicha forma ya que, el proceso de diferenciación de dichas células es muy dependiente de la activación de la PKC (Aihara *et al.* 1991) y por el contrario, el TGF- β no es un agente diferenciador *per se* de dichas células; dicho factor sólo actúa potenciando los efectos que ejercen otros estímulos como TNF α o la vitamina D3 (De Benedetti *et al.* 1990; Testa *et al.* 1993). La activación de la PKC por el TGF- β ha sido demostrada además, en otros tipos celulares (Chakrabarty *et al.* 1992; Halstead *et al.* 1995). Por otra parte, también se ha descrito la regulación de la expresión de otros dos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas estructuralmente relacionados con PECAM-1, el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la molécula de adhesión presente en neuronas (N-CAM) (Chakrabarty *et al.* 1992; Roubin *et al.* 1990), así como la regulación por otro miembro de la superfamilia del TGF- β , la proteína OP-1, de la molécula N-CAM (Perides *et al.* 1993).

PECAM-1 ha sido implicada en fenómenos de adhesión celular en varios sistemas experimentales (datos revisados se encuentran en DeLisser *et al.* 1994b). Dada su distribución tan amplia dentro del sistema vascular, así como la alta representación que esta proteína tiene en células endoteliales (se han calculado 1×10^6 moléculas en membrana, Newman 1994), es lógico suponer que su función se encuentre regulada más allá de la mera presencia en superficie. De hecho, nuestros resultados indican que otras señales intracelulares inducidas por el TGF- β actúan sobre PECAM-1. La presencia de anticuerpos bloqueantes de la citoquina tiene como resultado la inhibición de la agregación, a pesar del aumento de expresión en membrana de la proteína. Este resultado indica que el alto nivel de expresión no es el responsable del fenómeno de agregación, lo que por otra parte podría justificar la ausencia de agregaciones espontáneas entre leucocitos, plaquetas y endotelio, si se acepta un mecanismo homofílico de interacción entre moléculas de PECAM-1. Es razonable suponer que el TGF- β regule las propiedades adhesivas de esta proteína a través de su fosforilación y posterior asociación al citoesqueleto; un modelo similar ha sido propuesto en plaquetas por Newman *et al.* (1992). Aunque la actividad quinasa responsable de la fosforilación de PECAM-1 no ha sido identificada en nuestro sistema experimental, en otros modelos se ha propuesto la

implicación de PKC, sin excluir la participación de otras quinasas (Newman *et al.* 1992; Zehnder *et al.* 1992). La inducción por el TGF- β de la PKC no se correlaciona, ni con la formación de los agregados celulares (fig. 10 C), ni con la cinética de fosforilación de la proteína (fig. 16 A), lo que sugiere la existencia de otra actividad quinasa como responsable de la fosforilación de PECAM-1. En este punto, cabe recordar que el complejo señalizador del TGF- β formado por los receptores I y II ejercen actividad Ser/Thr quinasa en sus dominios citoplásmicos (Wrana *et al.* 1994), y por ello, es razonable especular que la actividad de ambos receptores, bien directamente, o bien indirectamente a través de otra quinasa(s) sean los responsables de esta fosforilación. Los estudios cinéticos de fosforilación también admiten la posibilidad de que dicha quinasa necesite ser sintetizada *de novo* como una de las respuestas celulares inducidas por el factor. Un dato adicional debe ser tenido en cuenta respecto a la quinasa responsable de la fosforilación de PECAM-1, la existencia de formas alternativas de la proteína expresando diferentes dominios citoplásmicos puede ser la determinante de la regulación funcional de la proteína por parte del TGF- β ; en este sentido se ha reportado un papel importante del dominio citoplásmico de PECAM-1 en la funcionalidad de la proteína (DeLisser *et al.* 1994a; Baldwin *et al.* 1994).

La implicación de los componentes del citoesqueleto (utilizando este término en el sentido más amplio e incluyendo filamentos de actina y filamentos intermedios), en el fenómeno de agregación es patente en cuanto que la presencia de citocalasina B inhibe la formación de dichos agregados. Este resultado indica que los filamentos de actina intervienen en la reorganización en membrana a que PECAM-1 se ve sometido durante la agregación celular (Newman *et al.* 1992). Sin embargo, los experimentos de asociación al citoesqueleto demostraron que la citocalasina B no inhibe la unión de la proteína a dichos componentes (Fig. 16 B). En conjunto, estos datos sugieren que la participación de los filamentos de actina no implican su interacción directa con PECAM-1, más bien indican que estos facilitan el agrupamiento de la molécula en los puntos de contacto célula-célula. Este modelo es compatible con la existencia de otros componentes que actuarían como puente entre los del citoesqueleto y los de membrana, y/o la existencia de otra proteína relacionada con los filamentos (Bretscher 1991).

Los experimentos cinéticos demuestran que la activación de PECAM-1 en las células U937 tiene lugar en horas (fig. 1 C). Sin embargo, la adhesión/transmigración de los monocitos a través de la barrera endotelial ocurre en minutos (Muller *et al.* 1993). Dos posibles

explicaciones podrían aclarar esta discrepancia. Por una parte, la línea celular U937 representa un estado inmaduro de diferenciación respecto a los monocitos de sangre periférica, lo que podría explicar la falta de algún componente celular. En segundo lugar, otras moléculas presentes en la superficie endotelial, y posiblemente ausentes en las células monocíticas están implicadas en el fenómeno de adhesión/transmigración; en la actualidad se admite que la extravasación es un fenómeno complejo, que puede ser dividido en al menos tres etapas: interacción inicial de los leucocitos con el endotelio activado (rolling), activación de los leucocitos y adhesión “firme” a la célula endotelial, y finalmente, la extravasación a los tejidos circundantes (Butcher 1991; Shimizu *et al.* 1992; Springer 1994). En este último paso (extravasación), es cuando PECAM-1 parece ejercer sus propiedades adhesivas (Muller *et al.* 1993).

Los resultados de los experimentos con transfectantes de la molécula indican que el mecanismo de interacción es de tipo homofílico (fig. 13). Además, la necesidad de realizar los ensayos utilizando co-cultivos de células U937 y transfectantes apuntan hacia la necesidad de activar PECAM-1 a “ambos lados”. Se ha reportado que transfectantes de PECAM-1 se unen heterofílicamente a través de glicosaminoglicanos a células no transfectadas (DeLisser *et al.* 1993). En dicho trabajo, la presencia de heparina bloqueaba la agregación celular; en nuestro sistema la presencia de heparina no ejercía ningún efecto sobre los agregados de U937 (resultados no mostrados). No obstante, no se puede excluir la participación de otras moléculas de adhesión en las agregaciones celulares inducidas por el TGF- β ; se podría pensar en un modelo cooperativo en que existiera un primer “disparador” de la adhesión, el cual facilitaría la participación de PECAM-1. Sin embargo, los resultados parecen excluir la participación de las integrinas LFA-1, VLA-4 y VLA-5 previamente implicadas en fenómenos de adhesión homotípica (Rothlein *et al.* 1986; Campanero *et al.* 1990; Caixia *et al.* 1991 respectivamente), lo que no implica la participación de otras integrinas no analizadas.

La agregación celular inducida por el TGF- β es compatible con el aumento de expresión que el factor ejerce sobre sí mismo (McCartney-Francis *et al.* 1990) y con la actividad quimiotáctica que induce en células monocíticas (Wahl *et al.* 1987). Desde este punto de vista, se ha reportado que las células de Kupffer migran en respuesta al factor y participan en la formación de granulomas hepáticos inducidos por componentes de las paredes bacterianas (Kossmann *et al.* 1992). El TGF- β es un potente inductor de los procesos de reparación tisular, y dichos procesos conllevan la creación de un microambiente que facilita

la adhesión celular. Desde este punto de vista, hay que destacar que en los lugares donde se produce el daño tisular tiene lugar la activación plaquetaria, proceso que conlleva, tanto el aumento de expresión en membrana de PECAM-1, a consecuencia de la fusión con la membrana plasmática de los gránulos α donde dicha proteína se encuentra (Cramer *et al.* 1994), como la liberación del TGF- β contenido en dichos gránulos; lo que en conjunto contribuye a la creación del ambiente antes mencionado. Tomando este modelo como referencia, y teniendo en cuenta que tras la activación de las plaquetas PECAM-1 es fosforilado, se asocia al citoesqueleto y se localiza en los puntos de contacto célula-célula (Newman *et al.* 1992), es razonable especular con la posibilidad de que la activación de PECAM-1 en la membrana de la plaqueta pudiera ocurrir tras la liberación del TGF- β durante la degranulación, contribuyendo así al proceso de agregación.

5.2 Regulación de la expresión y fosforilación de endoglina

Esta glicoproteína fue originalmente descrita en la membrana de células endoteliales (Gougos y Letarte 1988a, 1990). Los resultados de este trabajo indican que dentro de las células sanguíneas su expresión está asociada al linaje monocítico y que las líneas mieloides diferenciadas hacia macrófagos confirman dicha asociación. Las tinciones de cortes de tejido demuestran la presencia de endoglina sólo en ciertas poblaciones de macrófagos *in vivo*, lo que probablemente sea un reflejo de la heterogeneidad de este tipo celular (Lewis y McGee 1992). Dichos resultados están de acuerdo con los reportados por O'Connell *et al.* (1992), en los cuales se demuestra la presencia de la proteína en macrófagos alveolares y peritoneales. En conjunto, todos estos resultados sugieren que endoglina constituye un marcador asociado a la maduración de los macrófagos. Este proceso conlleva muchos cambios tanto fenotípicos como funcionales (Zembala y Asherson 1989), y probablemente endoglina juegue un papel como receptor del TGF- β modulando respuestas específicas durante la maduración de este tipo celular.

El hecho de que la expresión de endoglina en membrana sea inducida por el PMA en las células U937 y HL60, sugiere una regulación dependiente de la PKC. Por otra parte, el TGF- β ejerce un efecto positivo sobre la expresión de endoglina tanto en la línea celular U937 como en monocitos de sangre periférica. De acuerdo con estos resultados, dos posibles mecanismos podrían explicar la regulación de endoglina por dicha quinasa. El primero, supondría la activación directa de la PKC, y se produciría en células U937 tras el tratamiento con el éster de forbol, y en monocitos tras la activación de la quinasa que induce la adhesión a fibronectina

(Chang *et al.* 1993). En este punto es necesario señalar, que el método de purificación de monocitos utilizado en este trabajo se fundamenta en la adhesión que estos experimentan sobre la fibronectina del plasma, previamente fijada al sustrato de cultivo (Freundlich y Avdalovic 1983). El segundo mecanismo sería indirecto, y se produciría como consecuencia del TGF- β producido por las células tras la activación de la PKC. Se ha descrito que los monocitos en cultivo y las células U937 tratadas con PMA producen TGF- β (Assoian *et al.* 1987); además también se ha reportado que la expresión del factor puede ser regulada por la PKC (Wager y Assoian 1990). En los monocitos purificados y puestos en cultivo, la presencia de anticuerpos bloqueantes del TGF- β inhiben el aumento de expresión de endoglina (fig. 27 D), lo que sugiere un mecanismo indirecto a través del factor.

La figura 39 representa de forma esquemática la regulación de la expresión de endoglina durante la maduración macrófaga *in vitro*. Los resultados de inhibición con los anticuerpos bloqueantes del TGF- β indican que el aumento de expresión pudiera deberse a un mecanismo autocrino de producción de la citoquina por parte de los monocitos. Sin embargo, este hallazgo necesita una caracterización más precisa; sea cual fuere el origen del TGF- β presente en los cultivos de monocitos, la citoquina ejerce un efecto positivo sobre la expresión de endoglina tal y como demuestran los experimentos realizados en presencia del factor exógeno. La cinética de este proceso conllevaría que el TGF- β presente en el medio se uniera a sus receptores señalizadores en el monocito (receptores I y II), y entre las respuestas celulares inducidas se encontraría el aumento de expresión de endoglina. Este proceso coincide en el tiempo con la maduración o diferenciación monocito-macrófago. Cuando este proceso concluye, la expresión de endoglina es suficientemente alta como para intervenir en funciones específicas del macrófago dentro del contexto de las respuestas celulares inducidas por el TGF- β . Utilizando el modelo de las células U937 se analizó el papel de endoglina en dichas respuestas, utilizando el mismo mecanismo que el factor induce en las células, aumentando la expresión de la proteína. Para ello, se generaron transfectantes en dichas células.

El dominio citoplásmico de la isoforma L-endoglina, mayoritariamente expresada en las células, se compone de 47 residuos y presenta un alto grado de homología con betaglicano Gougos y Letarte 1990; López-Casillas *et al.* 1991; Wang *et al.* 1991; Moren *et al.* 1992), existiendo en dicho dominio 19 residuos de Ser/Thr. Por el contrario, la isoforma S-endoglina no conserva dicha homología y sólo contiene dos residuos de Ser/Thr (Bellón *et al.* 1993) (fig.

23). A pesar de estas diferencias las dos proteínas son funcionales desde el punto de vista de la unión del ligando (Bellón *et al.* 1993). Dado el alto número de residuos de Ser/Thr en la

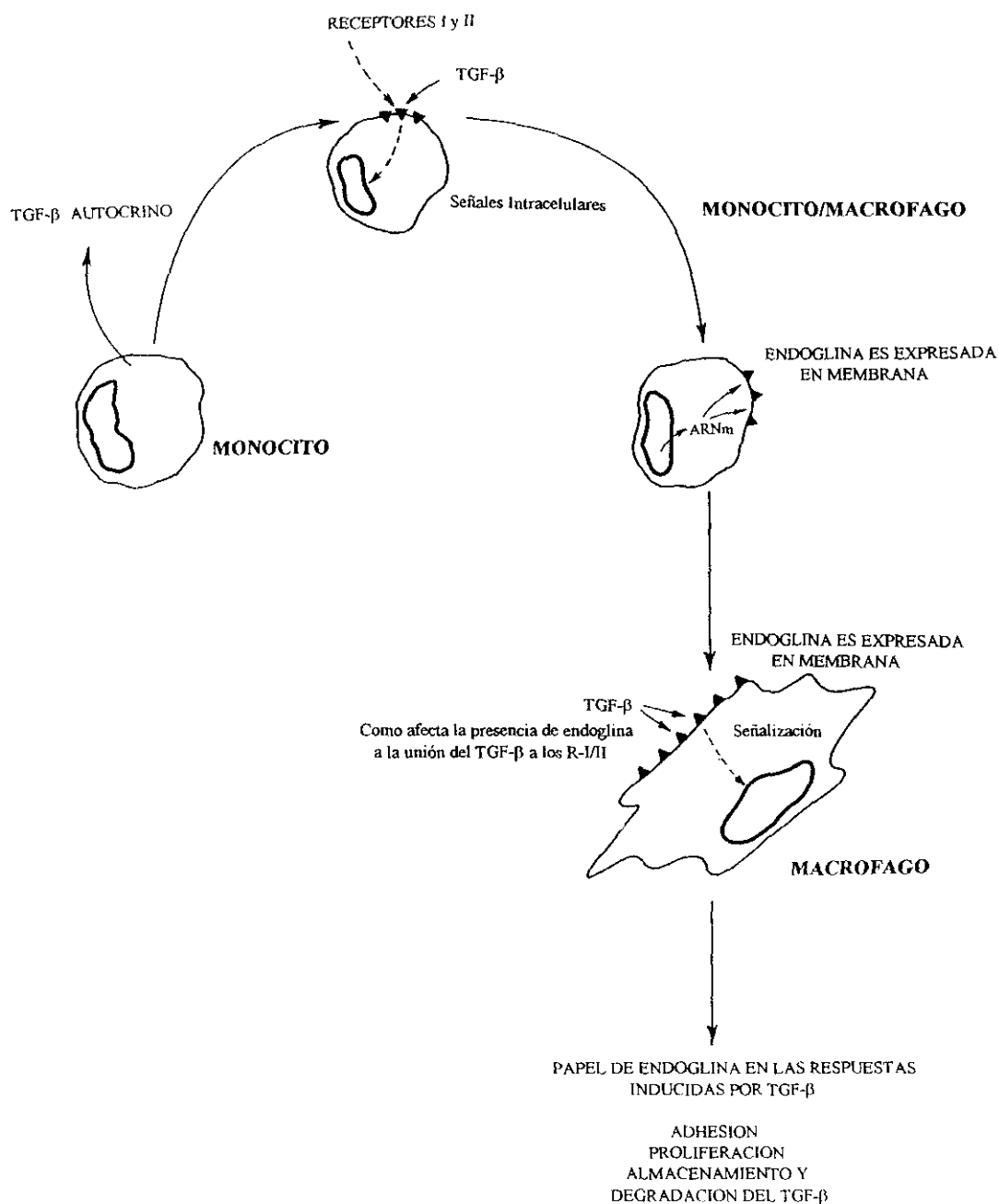


Figura 39. Representación esquemática de la regulación por el TGF-β de la expresión de endoglina y la implicación funcional que ésta pueda tener en las respuestas inducidas por el factor.

isoforma larga, se analizó su estado de fosforilación, encontrándose que la proteína está constitutivamente fosforilada. Dichos resultados se obtuvieron en tres sistemas celulares diferentes, células endoteliales, transfectantes de fibroblastos y células U937. Además, estos experimentos demostraron que la isoforma S-endoglina también se encuentra constitutivamente fosforilada y que el grado de fosforilación de la forma larga es ocho veces mayor que el de la corta en transfectantes de fibroblastos, según se deduce de los experimentos de marcaje metabólico realizados en paralelo con ambas isoformas, lo que está de acuerdo con la composición en Ser/Thr de sus dominios citoplásmicos. El análisis de fosfopéptidos determinó la existencia de al menos tres sitios potenciales de fosforilación en la forma L frente a uno en la forma S. Por otra parte, el análisis de fosfoaminoácidos dio como resultado que la fosforilación de la forma L se produce mayoritariamente en Ser (90%), y minoritariamente en Thr (10%). En ninguna de las dos isoformas fueron detectados residuos de fosfo-Tyr utilizando ensayos de inmunodetección (datos no mostrados). Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Yamashita *et al.* 1994; Rokhlin *et al.* 1995). Ambos grupos han demostrado la fosforilación de endoglina tanto en células endoteliales bovinas, como en una línea celular de origen linfoblástico B. Estos resultados adquieren importancia si se tiene en cuenta que por similitud con betaglicano (López-Casillas *et al.* 1993), endoglina puede asociarse a los receptores señalizadores del TGF- β en presencia del ligando (Yamashita *et al.* 1994), y que dichos receptores poseen actividad Ser/Thr quinasa (Laiho *et al.* 1991; Franzen *et al.* 1993; Wrana *et al.* 1992, 1994b). A este respecto, el estudio de la regulación de la fosforilación de endoglina por el TGF- β , demostró que los niveles de fosforilación disminuían en ambas isoformas y en dos sistemas experimentales diferentes, transfectantes de fibroblastos y de células U937 (fig. 27).

Una ulterior caracterización de la fosforilación de endoglina es necesaria, sobre todo en el sentido de identificar la actividad quinasa(s) que mantiene la fosforilación constitutiva de su dominio citoplásmico. En este sentido, el receptor tipo II del factor podría actuar como tal quinasa, ya que ejerce dicha actividad independientemente de la presencia del ligando (Wrana *et al.* 1994b). También, la inhibición de la fosforilación inducida por el TGF- β necesita una caracterización más profunda; los resultados obtenidos no aclaran si dicha disminución se debe a un menor número de moléculas fosforiladas, conservando los sitios en cada molécula, o por el contrario, se debe a una disminución en el número de sitios/molécula conservando el número de moléculas fosforiladas. De este modo, se abren dos posibilidades para la regulación del

grado de fosforilación de endoglina cuando el factor induce la transducción de señal: La inactivación de la quinasa(s) o la activación de una fosfatasa(s) potencialmente asociadas al dominio citoplásmico de la proteína. El complejo equilibrio que se establece entre quinasas y fosfatasas es hoy aceptado como método de regulación de la mayoría de las funciones celulares (Hunter *et al.* 1995), y la regulación por el TGF- β de ambos tipos de actividades ha sido reportada (Howe *et al.* 1991; Abraham *et al.* 1992; Gruppuso *et al.* 1991). El conocimiento de los componentes implicados en la fosforilación de endoglina, ayudarán a entender el mecanismo molecular mediante el cual la proteína interviene en las respuestas celulares inducidas por el factor.

5.3 Papel de endoglina en las respuestas celulares mediadas por el TGF- β

El sistema de receptores del TGF- β se compone de varias proteínas de membrana entre las que se incluyen el receptor I y II, betaglicano y endoglina. La asociación heteromérica entre los receptores I y II, ambos con actividad Ser/Thr quinasa, en presencia del ligando, así como la fosforilación del receptor I por parte del II, se han descrito como elementos esenciales en el inicio de las señales inducidas por el TGF- β (Laiho *et al.* 1991; Lin *et al.* 1992; Franzen *et al.* 1993; Bassing *et al.* 1994; Wrana *et al.* 1992, 1994b; Cárcamo *et al.* 1994; Koenig *et al.* 1994). Por otra parte, la falta de secuencias implicadas en la transducción de señal tanto de betaglicano (López-Casillas *et al.* 1991; Wang *et al.* 1991; Moren *et al.* 1992), como de endoglina (Gougos y Letarte 1990; Cheifetz *et al.* 1992; Bellón *et al.* 1993), ha hecho que se les considere receptores auxiliares o moduladores tanto desde el punto de vista de la unión del ligando a los receptores señalizadores, como de las respuestas celulares inducidas. Se ha reportado que betaglicano potencia la unión del factor al complejo señalizador, aumentando la capacidad de respuesta celular (López-Casillas *et al.* 1993; Moustakas *et al.* 1993); respecto a endoglina también se ha reportado su capacidad de asociación a dicho complejo en células de endotelio bovino (Yamashita *et al.* 1994). Sin embargo, el papel que endoglina desempeña sobre las respuestas celulares mediadas por la citoquina no es conocido.

Los resultados de este trabajo indican que endoglina es un receptor funcional del TGF- β en células monocíticas (fig. 28). La sobreexpresión de endoglina interfiere con la señalización del factor, encontrándose que este efecto es selectivo sobre determinadas funciones celulares: Proliferación, agregación, síntesis de fibronectina y de adhesión a sustrato. Por el contrario, los efectos sobre la regulación de las integrinas VLA-4 y VLA-5, así como de las moléculas de la familia CAM, PECAM-1 y ICAM-1, no se alteran. Los efectos a largo

plazo, medidos sobre la inducción de los receptores o la expresión del propio factor, tampoco se modifican. La sobreexpresión de *c-myc* encontrada en los transfectantes está de acuerdo con el efecto inhibitorio que el TGF- β ejerce sobre la proliferación celular. La inhibición de la expresión de dicho producto oncogénico en respuesta al factor ha sido reportado en varios sistemas celulares (Coffey *et al.* 1988; Pietenpol *et al.* 1990a). Por otra parte, se ha descrito que la sobreexpresión de *c-myc* bloquea el efecto inhibitorio de la citoquina (Alexandrow *et al.* 1995). Será de interés analizar la relación que pueda existir entre la sobreexpresión de endoglina y los elevados niveles basales de *c-myc* en los transfectantes.

El hecho de que la expresión de PECAM-1, y de las integrinas VLA-4 y VLA-5, principales receptores de fibronectina en las células (Takada *et al.* 1987; Wayner *et al.* 1989), se encuentre regulada de forma similar en los transfectantes que en la línea parental, apoya la existencia de mecanismos pos-traduccionales que regulen la función de dichos componentes en membrana. En este trabajo, se han presentado resultados que demuestran la fosforilación de PECAM-1. La sobreexpresión de endoglina inhibe dicha fosforilación, constituyendo un argumento para explicar la inhibición de agregación en los transfectantes. La inhibición de la adhesión tanto a fibronectina como al sustrato de cultivo, junto al efecto inhibitorio sobre la síntesis de fibronectina, permiten asumir mecanismos pos-traduccionales sobre las integrinas VLA-4 y/o VLA-5. Como control de la especificidad de los efectos encontrados en los transfectantes de endoglina, algunos ensayos fueron realizados utilizando la isoforma $\beta 2$ del TGF- β (Fig. 31). Dichos experimentos demostraron que la capacidad de respuesta de las células está conservada, y además está de acuerdo con el hecho de que endoglina no une dicha isoforma (Cheifetz *et al.* 1992). El hecho de que la forma $\beta 2$ induzca respuestas celulares, pese a la sobreexpresión de endoglina, demuestra que el papel de ésta es mediado por la presencia del TGF- $\beta 1$ y por tanto no se trata de un efecto constitutivo. Por otra parte, los resultados indican que los efectos ejercidos por endoglina no se deben a un aumento de la tasa de degradación del factor, excluyendo que su función sea la de actuar como un secuestrador de la citoquina en la membrana, internalizándose tras la unión y facilitando su degradación. La tabla 4 resume la diferencia de efectos encontrados entre la línea parental o el transfectante control y los transfectantes de ambas isoformas de endoglina.

FUNCION	U937 (+TGF-β)	U937 L-ENDO (+TGF-β)	U937 S-ENDO (+TGF-β)
PROT. DE ADHESION			
Integrina α4	disminuye	disminuye	disminuye
Integrina α5	aumenta	aumenta	aumenta
Integrina β1	no varía	no varía	no varía
Integrina β2	no varía	no varía	no varía
PECAM-1	aumenta	aumenta	aumenta
ICAM-1	disminuye	disminuye	disminuye
Agregacion	SI (med por PECAM-1)	NO	NO
ADHESION A MATRIZ			
fibronectina	SI	NO	NO
laminina	SI		
colágeno I	NO		
sustrato	SI	NO	NO
SEÑALIZACION			
c-myc	fuerte disminución	expresión fuerte	disminución relativa
c-fos	aumenta		
c-jun	aumenta		
Proliferación	inhibición	no inhibición	no inhibición
PKC (membrana)	existe nivel basal		
PKC (citósólica)	aumenta		
Receptores de TGF-β	todos aumentan	todos aumentan	todos aumentan
Síntesis de TGF-β	SI	SI	SI
Proteínas de matriz extracelular	Fibronectina	NO	NO
Otras vías no caracterizadas	SI (actividad quinasa de PECAM-1)	NO	NO

Tabla 4. Efectos comparativos del TGF-β en la línea parental y los transfectantes de endoglina en las células U937

Los ensayos de marcaje por afinidad a los receptores presentes en los transfectantes demuestran que endoglina se asocia al complejo formado por los receptores I y II, y que la unión del ligando a dichos receptores se ve favorecida por la sobreexpresión en membrana de endoglina. Sin embargo, los resultados mostrados en la figura 29 merecen algunos comentarios aclaratorios:

- Pudiera parecer extraño que la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-RII, rindan la mayor parte de la citoquina unida al receptor I (fig. 29 B calle 1) . En este sentido, es importante recordar que ambos receptores forman un complejo altamente estable en presencia de la citoquina. La estequiometría y geometría de este complejo triple es poco conocida y por lo tanto el que la citoquina quede entrelazada covalentemente a un receptor u otro va a depender mucho de estos parámetros.

- El receptor II no queda plenamente definido en este tipo celular ni tampoco en los macrófagos (fig. 29 A y C). Este resultado, está de acuerdo con lo descrito por otros autores para determinados tipos celulares tanto hematopoyéticos como de origen transformado (Ohta *et al.* 1987; Brandes *et al.* 1991 a,b; Geiser *et al.* 1992; Ichijo *et al.* 1990). El hecho de que determinadas células expresen predominantemente el receptor I, o que expresen un subtipo de receptor II al que la unión covalente de la citoquina ocurra menos eficientemente, o bien, que el receptor I transmita señales en presencia de un bajo número de receptores tipo II, son posibilidades que se han propuesto en la literatura (Miyazono *et al.* 1994). Sin embargo, pese a no poder ser plenamente identificado, el receptor II debe estar presente en la membrana ya que su presencia es necesaria para la unión del ligando al receptor I (Wrana *et al.* 1992; 1994b).

- La banda superior (>170 kDa), presente en las inmunoprecipitaciones con anti-RII puede deberse a asociaciones betaglicano-RII y endoglina-RII (López-Casillas *et al.* 1993; Yamashita *et al.* 1994), además de asociaciones oligoméricas causadas por el agente de entrecruzamiento.

- Los pesos moleculares aparentes de los receptores I y II en dichas células son más altos que los descritos en otros sistemas celulares. Sin embargo, también se han reportado variaciones como consecuencia de posibles cambios en el patrón de glicosilación de dichas proteínas (Massagué 1990).

- Los ensayos de marcaje por afinidad en las células U937 tratadas con PMA (fig. 28 C) permiten la identificación de los receptores I , II y endoglina con toda claridad respecto a las células no tratadas. Una posible explicación de este resultado es que el éster de forbol

ejerza un efecto regulador positivo sobre los receptores I y II, de forma análoga a como lo hace con endoglina. Por otra parte, el PMA induce la expresión del factor en dichas células (Assoian *et al.* 1987) y los resultados de PCR (no mostrados), obtenidos con estas células demuestran el aumento de expresión de todos los receptores tras el tratamiento con la citoquina. Poco es sabido sobre la regulación de los receptores del TGF- β y por tanto las células U937 constiuyen un modelo útil para su estudio.

La imposibilidad de caracterizar correctamente en este tipo celular al receptor II, asociado con endoglina, de forma similar a betaglicano (López-Casillas *et al.* 1993), mientras que el receptor I sí se asocia con endoglina, sugiere un modelo complementario entre ambas moléculas. Los resultados obtenidos en células COS-7, así como los de mioblastos L₆E₉ demuestran que la asociación de endoglina al complejo señalizador se produce a través del receptor II. De acuerdo con el modelo general de unión del TGF- β a sus receptores, el último eslabón de la cadena de receptores de membrana es el receptor I y es probable que dependiendo del tipo celular concreto, la unión del ligando pueda quedar reflejada con mayor o menor claridad sobre el receptor I ó el II. Es de resaltar que el nivel de unión del TGF- β a la endoglina es mucho mayor en las células U937 tratadas con PMA que en los transfectantes de endoglina, sobre todo si se tienen en cuenta los niveles de expresión de la proteína en cada caso. De estos resultados se podría concluir la falta de una relación directa entre la expresión de endoglina y la cantidad de TGF- β que ésta une, es decir, no todas las moléculas de endoglina presentes en la superficie celular son capaces de unir el ligando. Una conclusión similar se obtuvo a partir de los estudios de unión de la citoquina a células endoteliales, en los cuales se encontró que de todas las moléculas de endoglina presentes en la membrana celular (1×10^6 moléculas/célula), sólo un 1% aproximadamente participaba en la unión al ligando (Cheifetz *et al.* 1992). Todos estos datos sugieren que endoglina debe tener algún requerimiento adicional para unir el TGF- β . Este requerimiento podría ser la asociación con el receptor II. En este sentido, los resultados en células COS-7 demuestran que la proteína no une el factor en ausencia del receptor II. Si esto supone la formación de un complejo en presencia del ligando, cual es el grado de estabilidad de dicho complejo y si esto supone facilitar la unión del ligando al receptor I, necesita ser estudiado. En conjunto, nuestros resultados de unión al ligando y los de función se encuentran aparentemente en contradicción. Los resultados de unión a los receptores señalizadores indican más citoquina unida, sin embargo, se producen inhibiciones selectivas de determinadas respuestas inducidas por el

factor. Dos modelos se pueden proponer de modo tentativo para explicar dicha discrepancia, asumiendo la necesaria comprobación experimental que ambos necesitan:

1- Endoglina se asocia al receptor II en presencia del ligando, este complejo a su vez, facilita la unión del factor al receptor I. El efecto observado sería un aumento de ligando unido. Sin embargo, la presencia de endoglina en el complejo heteromérico de los tres receptores podría impedir la fosforilación de un determinado número de receptores I (fig. 6), paso obligado en la transmisión de la señal (Wrana *et al.* 1994).

2- Endoglina se asocia al receptor II en presencia del ligando y cambia la afinidad de éste para presentar el factor a otro miembro de la familia de receptores I presente en las células. De nuevo, el efecto observado sería un aumento del ligando unido, pero en este caso el receptor mayoritariamente marcado de la figura 35, no correspondería al receptor I del TGF- β , sería otro miembro de dicha familia, cuya unión al factor se vería favorecida por la presencia de endoglina. En apoyo de esta hipótesis, ha sido reportada la existencia de reacciones cruzadas entre los miembros de la superfamilia del TGF- β y las de los receptores (Attisano *et al.* 1993; Yamashita *et al.* 1995), siendo diferentes las respuestas obtenidas por diferentes factores sobre los mismos receptores (Attisano *et al.* 1993).

El análisis comparativo de ambas isoformas de endoglina en nuestro modelo experimental, demuestra que no existen diferencias significativas funcionales entre las dos. Sin embargo, dos aspectos merecen ser comentados. La isoforma corta, une y presenta el ligando de forma más eficiente que la larga (fig. 35); por otra parte, la isoforma corta ejerce un efecto inhibitorio sobre las respuestas de la citoquina más leve que la forma larga (fig. 31). Estos resultados sugieren la intervención del dominio citoplásmico en la función de endoglina. Cabe recordar que las dos isoformas de endoglina tienen la capacidad de ser fosforiladas, y dicha fosforilación está regulada por el TGF- β , por tanto, es posible que el nivel de fosforilación del dominio tenga capacidad de regular las propiedades funcionales de endoglina.

Tomados en conjunto, todos los resultados endoglina indican que el TGF- β tiene la capacidad de aumentar la expresión de endoglina, probablemente como parte de un efecto general sobre todos sus receptores, y que dicho aumento pudiera estar dirigido hacia el control de la amplitud de las respuestas que puede inducir en las células. Con esta perspectiva, endoglina constituye el primer receptor de membrana del TGF- β que actuaría como un inhibidor de determinadas respuestas inducidas por el factor. El mecanismo molecular por el cual ocurre dicho proceso no está aclarado, pero los datos sugieren la existencia de un sistema

muy fino de regulación que incluiría la relación entre el número de receptores de cada tipo presentes en un momento determinado en la superficie celular, la posible asociación entre ellos y la regulación pos-traducciona l a la que pueden ser sometidos para ejercer su función.

6.-Conclusiones

1- El TGF- β induce en las células U937: Inhibición de la proliferación, agregación celular, adhesión a varios componentes de la matriz extracelular y síntesis de fibronectina.

2- El TGF- β modula en las células U937 la expresión y/o función de algunas integrinas, y proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Induce su propia expresión así como la de sus tres receptores principales.

3- Algunas de las vías de señalización intracelular inducidas por el TGF- β en dichas células son: Actividad citosólica de PKC, disminución de la expresión del producto oncogénico *c-myc*, y aumentos de *c-fos* y *c-jun*.

4- El fenómeno de agregación celular inducido por el TGF- β en las células U937 está mediado por la proteína PECAM-1. En este modelo experimental, dicha molécula está regulada transcripcional y pos-traduccionalmente. La regulación transcripcional es dependiente de la actividad PKC, mientras que la regulación pos-traduccionale, consistente en la fosforilación del dominio citoplásmico de la proteína, es dependiente de otra actividad quinasa no identificada hasta el momento.

5- El fenómeno de agregación celular inducido por el TGF- β necesita la integridad del citoesqueleto y la asociación de PECAM-1 con sus componentes. Esta interacción, sin embargo, no es dependiente de los filamentos de actina, aunque estos participan en el fenómeno de agregación.

6- La interacción celular en este sistema es de tipo homofílico, es decir PECAM-PECAM, y necesita la presencia de cationes bivalentes en el medio.

7- Endoglina es una proteína cuya expresión está restringida al linaje monocítico, dentro de los tipos celulares sanguíneos, de forma asociada a la diferenciación macrofágica, constituyendo un receptor funcional del TGF- β en dicho linaje. El factor tiene la capacidad de regular su expresión durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Análogamente, la expresión de endoglina aumenta tras el tratamiento con el TGF- β en la línea celular U937, siendo el nivel de regulación transcripcional en ambos casos.

8- Las dos isoformas de endoglina son expresadas correctamente a partir de los ADNc correspondientes mediante experimentos de transfección. Ambas isoformas se encuentran constitutivamente fosforiladas en células transfectadas y la isoforma L-endoglina, mayoritariamente expresada por las células, es fosforilada en residuos de Ser y en mucha

menor extensión en residuos de Thr. El TGF- β regula el grado de fosforilación de ambas isoformas, disminuyendo el contenido total de ortofosfato incorporado a dichas proteínas.

9- La sobreexpresión de ambas isoformas de endogлина en células U937 modula las respuestas inducidas por el TGF- β . Las dos isoformas inhiben los efectos de la citoquina sobre la proliferación, adhesión, agregación y síntesis de fibronectina. El efecto sobre la proliferación va acompañado de la no disminución de los niveles de expresión de *c-myc*, y el efecto sobre la agregación se fundamenta en la inhibición de la actividad quinasa responsable de la fosforilación de PECAM-1. Por otro lado, existen funciones no modificadas por su presencia en la membrana, tales como la regulación de los niveles de expresión de las integrinas VLA-4 y VLA-5 o los de PECAM-1 y ICAM-1. Además, los efectos medidos a largo plazo sobre el aumento de sus receptores y la expresión del propio TGF- β tampoco son inhibidos por la presencia de ambas isoformas en la membrana.

10- La inhibición de los efectos mediados por el TGF- β en células U937 que sobreexpresan ambas formas de endogлина, no se debe a un aumento de la tasa de degradación de la citoquina, tal como se podría esperar si la función de endogлина fuera la de actuar como un receptor en membrana, inductor de la degradación del factor.

11- La sobreexpresión en la membrana de las células U937 de ambas isoformas de endogлина aumenta la unión del ligando a los receptores señalizadores; además, existe asociación física entre ambas isoformas y los receptores I y II en presencia del TGF- β , ya que pueden ser coprecipitados mediante anticuerpos anti-endogлина. En estas células transfectantes, el receptor que más aumenta la unión del TGF- β es el receptor tipo I, aunque es necesaria la presencia del receptor II para la unión del ligando al receptor I. Ambas isoformas de endogлина requieren la presencia del receptor II para unir eficientemente el ligando en la membrana.

12- El comportamiento de ambas isoformas de endogлина es similar desde el punto de vista de las respuestas celulares mediadas por el TGF- β , siendo algo menos efectiva en la inhibición de los efectos la isoforma corta, especialmente en el caso de la proliferación. Sin embargo, desde el punto de vista de la unión del ligando, la isoforma corta es más efectiva.

7.-Referencias

- Abraham S.E., M.C. Carter and E. Moran.** 1992. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) reduces cellular levels of p34 cdc2, and this effect is abrogated by adenovirus independently of the E1A-associated pBR binding activity. *Mol. Biol. Cell* 3:655-665
- Aihara H., Y. Asaoka, K. Yoshida and Y. Nishizuka.** 1991. Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:11062-11066
- Albelda S.M., P.D. Oliver, L.H. Romer and C.A. Buck.** 1990. EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 110:1227-1237
- Albelda S.M., W.A. Muller, C.A. Buck and P.J. Newman.** 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 114:1059-1068
- Albelda S.M., C.W. Smith and P.A. Ward.** 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8:504-512
- Alexandrow M.G., M. Kawabata, M.A. Akre and H. Moses.** 1995. Overexpression of the c-myc oncoprotein blocks the growth inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor β 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3239-3243
- Altman D.J., S.L. Schneider, D.A. Thompson, H.L. Cheng and T.B. Tomasi.** 1990. A transforming growth factor β 2 (TGF- β 2)-like immunosuppressive factor in amniotic fluid and localization of TGF- β 2 mRNA in the pregnant uterus. *J. Exp. Med.* 172:1391-1401
- Andres J.L., K. Stanley, S. Cheifetz and J. Massagué.** 1989. Membrane anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J. Cell. Biol.* 109:3137-3145
- Andres J.L., D. DeFalcis, M. Noda and J. Massagué.** 1992. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J. Biol Chem.* 267:5927-5930
- Archer S.J., A.Bax, A.B. Roberts, M.B. Sporn, Y. Ogawa, K.A. Plez, J. Weatherbee, M. Tsang, B. Zheng, J. Wanker and D.A. Torchia.** 1993. Transforming growth factor beta-1: secondary structure as determined by heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32:1164-1171
- Ashman L.K. and G.W. Aylett.** 1991. Expression of CD31 epitopes on human lymphocytes: CD31 monoclonal antibodies differentiate between naive (CD45 RA+) and memory (CD45 RA-) CD4 positive T cells. *Tissue Antigens* 38:208-212
- Ashman L.K., G.W. Aylett, A.C. Cambareri and S.R. Cole.** 1991. Different epitopes of the CD31 antigen identified by monoclonal antibodies: cell type-specific patterns of expression. *Tissue Antigens* 38:199-207

- Assoian R. K.**, A. Komoriya, C.A. Meyers, D.M. Miller and B.M. Sporn. 1983. Transforming growth factor- β in human platelets: Identification of a major storage site, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 258:7155-7160
- Assoian R.K.**, B.E. Fleurdelys, H.C. Stevenson, P.J. Miller, D.K. Madtes, E.W. Raines, R. Ross and M.B. Sporn. 1987. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6020-6024
- Attisano L.**, J.L. Wrana, S. Cheifetz and J. Massagué. 1992. Novel activin receptors: Distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 68:97-108
- Attisano L.**, J. Cárcamo, F. Ventura, F.M.B. Weis, J. Massagué and J.L. Wrana. 1993. Identification of human activin and TGF- β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680
- Attisano L.**, J.L. Wrana, F. López-Casillas and J. Massagué. 1994. TGF- β receptors and actions. *Biochim. et Biophys. Acta* 1222:71-80
- Aussubel M.**, R. Brent, R.E. Kingston et al. (ed.). 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol 2: sec 9. Willey
- Ayalon O.**, H. Sabanai, M-G. Lampugnani, E. Dejana and B. Geiger. 1994. Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 126:247-258
- Baird A. and T. Durkin.** 1986. Inhibition of endothelial cells proliferation by type- β transforming growth factor: Interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:476-482
- Baldwin H.S.**, H. M. Shen, H-C. Yan, et al. 1994. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 120:2539-2553
- Bascom C.C.**, J.R. Wolfshohl, R.J. Coffey, L. Madisen, N.R. Webb, A.F. Purchio, R. Derync and H.L. Moses. 1989. Complex regulation of transforming growth factor β 1, β 2 y β 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factor β 1 and β 2. *Mol. Cell. Biol.* 9:5508-5515
- Basler K.**, T. Edlund, T.M. Jessell, and T. Yamada. 1993. Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by Dorsalin-1, a novel TGF- β family member *Cell* 73:687-702
- Bassing C.H.**, J.M. Yingling, D.J. Howe, T. Wang, W.W. He, M.L. Gustafson, P. Shah, P.K. Donahoe and X.F. Wang. 1994. A transforming growth factor β type I receptor that signals to activate gene expression. *Science* 263:87-89

- Battaway E.J., E.W. Raines, R.A. Seifert, D.F. Bowen-Pope and R. Ross.** 1990. TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of autocrine PDGF loop. *Cell* 63:515-524
- Bauvois B., D. Rouillard, J. Sanceu and J. Wietzerbin.** 1992. IFN- γ and transforming growth factor- β 1 differently regulate fibronectin and laminin receptors of human differentiating monocytic cells. *J. Immunol.* 148:3912-3919
- Bellón T., A. Corbí, P. Lastres, et. al.** 1993. Identification and expression of two forms of human transforming growth factor- β binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 23:2340-2345
- Berman M.E., and W.A. Muller.** 1992. Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) stimulates adhesive activity of leukocyte integrin CD11b/CD18 *FASEB J.* 6:A1888
- Bernabeu C., G. Morago, M.O. de Landazuri, J. Carreira y F. Sánchez-Madrid.** 1986. Anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de histocompatibilidad y activación de leucocitos humanos. *Inmunología* 5:83-90
- Bodmer S., M.B. Podlisny, D.J. Selkoe, I. Heid and A. Fontana.** 1990. Transforming growth factor-beta bound to soluble derivatives of the beta amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171:890-897
- Bogen S., J. Park, M. Garifallou, X. Deng and W.A. Muller.** 1994. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J. Exp. Med.* 179:1059-1064
- Boley W.J., P. van der Geer and T. Hunter.** 1991. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol.* 201:110-149
- Border W.A. and N.A. Noble.** 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New Engl. J. Med.* 331:1286-1292
- Border W.A. and Ruoslahti.** 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J. Clin. Invest.* 90:1-7
- Border W.A., N.A. Noble, T. Yamamoto, J.R. Harper, Y. Yumaguchi, M.D. Pierschbacher and E. Ruoslahti.** 1992. Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360:361-364
- Bork F.T. and C.Sander.** 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- β type III receptor. *FEBS Lett.* 300:237-240
- Boyd F.T. and J. Massagué.** 1989. Transforming growth factor- β inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membrane receptor. *J. Chem. Biol.* 13:2272-2278

- Boyüm A.** 1976. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 21(Suppl. 97):77-89
- Brabletz T., Y. Pfeueffer, E. Schorr, F. Siebelt, T. Wirth and E. Serfling.** 1993. Transforming growth factor β and cyclosporin inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cell through a noncanonical octamer-binding site. *Mol. Cell. Biol.* 13:1155-1162
- Brandes M.E., U.E.H. Mai, K. Ohura and S.M. Wahl.** 1991a. Type I transforming growth factor- β receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor- β . *J. Immunol.* 147:1600-1606
- Brandes M.E., L.M. Wakefield and S.M. Wahl.** 1991b. Modulation of monocyte type I transforming growth factor- β receptors by inflammatory stimuli. *J. Biol. Chem.* 266:19697-19703
- Bretscher A.** 1991. Molecular aspects of microfilament structure and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:281-287
- Brown P.D., L.M. Wakefield, A.D. Levison and M.B. Sporn.** 1990. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2 and 3. *Growth Factors* 3:35-43
- Buhring, H.J., C.A. Muller, M. Letarte, A. Gougos, A. Saalmuller, A. van Agthoven and F.W. Busch.** 1991. Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal bone marrow. *Leukemia* 5:841-847
- Butcher E.C.** 1991. Leukocyte endothelial cell migration: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036
- Cabañas C., F. Sánchez-Madrid, A. Acevedo, J.M. Fernández, T. Bellón, V. Larraga y C. Bernabeu.** 1988. Characterization of a CD11c-reactive monoclonal antibody obtained by immunizing with phorbol ester differentiated U-937 cells. *Hybridoma* 7:167-176
- Cabañas C., F. Sánchez-Madrid, T. Bellón, C.G. Figdor, A.A. Te Velde, J.M. Fernández, A. Acevedo and C. Bernabeu.** 1989. Characterization of a novel myeloid differentiation antigen regulated during differentiation of monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* 19:1373-1378
- Caixia S., S. Stewart, E. Wayner, W. Carter and J. Wilkins.** 1991. Antibodies to different members of the $\beta 1$ (CD29) integrins induce homotypic and heterotypic cellular aggregation. *Cell. Immunol.* 138:216-228
- Campanero M.R., R. Pulido, M.A. Ursa, M. Rodríguez-Moya, M.O. de Landázuri and F. Sánchez-Madrid.** 1990. An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism, LFA-1/ICAM-1 independent, triggered through the human VLA-4 integrin. *J. Cell Biol.* 110:2157-2165

- Cárcamo J.**, F.M. Weis, F. Ventura, R. Weiser, J.L. Wrana, L. Attisano and J. Massagué. 1994. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth β and activin. *Mol. Cell. Biol.* 14:3810-3821
- Cardin A.D. and H.J.R. Weintraub.** 1989. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycans interactions. *Arteriosclerosis* 9:21-32
- Cate R.L.**, R.J. Mattaliano, C. Heission, et al. 1986. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*: 45:685-698
- Celada A. and R. Maki.** 1992. Transforming growth factor- β enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J. Immunol.* 148:1102-1105
- Chakrabarty S.** 1992. Role of protein kinase C in transforming growth factor- β 1 induction of carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma cells. *J. Cell Physiol.* 152:494-499
- Chang Z.L. and D.H. Beezhold.** 1993. Protein kinase C activation in human monocytes: regulation of PKC isoforms. *Immunology* 80:360-366
- Chang Z.L.**, D.H. Beezhold, C. Personius and Z.L. Shen. 1993. Fibronectin cell-binding domain triggered transmembrane signal transduction in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 53:79-85
- Chantry D, M. Turner, E. Abney, and M. Fedelmann.** 1989. Modulation of cytokine production by transforming growth factor- β . *J. Immunol.* 142:4295-4300
- Cheifetz S.**, B. Like and J. Massagué. 1986. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 261:9972-9978
- Cheifetz S.**, J.A. Weatherbee, M. L-S. Tsang, J.K. Anderson, J.E. Mole, R. Lucas and J. Massagué. 1987. The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48:409-415
- Cheifetz S.**, J.L. Andres and J. Massagué. 1988a. The transforming growth factor- β receptor type III is a membrane proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 263:16984-16991
- Cheifetz S.**, N. Ling, R. Guillemín and J. Massagué. 1988b. A surface component on GH3 pituitary cells that recognizes transforming growth factor- β , activin and inhibin. *J. Biol. Chem.* 263:17255-17228
- Cheifetz S.**, H. Hernandez, M. Lahio, P. ten Dijke, K.K. Iwata and J. Massagué. 1990. Distinct transforming growth factor- β (TGF- β) receptor subset a determinants of cellular responsiveness to three TGF- β isoforms. *J. Biol. Chem.* 265:20533-20538
- Cheifetz S. and J. Massagué.** 1991. Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 266:20767-20772

- Cheifetz S., T. Bellón, C. Calés, S. Vera, C. Bernabeu, J. Massagué and M. Letarte. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267:19027-19030
- Childs S.R., J.L. Wrana, K. Arora, L. Attisano, M.B. O'Connor and J. Massagué. 1993. Identification of a *Drosophila* activin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9475-9479
- Chomczynski P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159
- Coffey R.J., L.J. Kost, R.M. Lyons, H.L. Moses and N.F. LaRusso. 1987. Hepatic processing of transforming growth factor- β in the rat. *J. Clin Invest.* 80:750-757
- Coffey R.J., C.C. Bascom, N.J. Sipes, R. Graves-Deal, B.E. Weissman and H.L. Moses. 1988. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor β . *Mol. Cell. Biol.* 8:3088-3093
- Coffman R.L., D.A. Leberman and B. Shrader. 1989. Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170:1039-1044
- Cramer E.M., G. Berger and M.C. Berndt. 1994. Platelet α -granule and plasma membrane share two new components: CD9 and PECAM-1. *Blood* 84:1722-1730
- Cybulsky M.J., J.W.U. Fries, A.J. Williams, et. al. 1991. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM-1 gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:7859-7863
- Czarniecki C.W., H.H. Chiu, G.H.W. Wong, S.M. McCabe and M.A. Palladino. 1988. Transforming growth factor- β 1 modulates the expression in class II histocompatibility antigens on human cells. *J. Immunol.* 140:4217-4223
- Dalla Favera R., E.P. Gelmann, S. Martinotti, G. Franchini, T.S. Papas, R.C. Gallo and F. Wong-Staal. 1982. Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (c-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6497-6501.
- Daopin S., K.A. Piez, Y. Ogawa and D.R. Davies. 1992. Crystal structure of transforming growth factor- β 2: An unusual fold for the superfamily. *Science* 257:369-373
- De Benedetti F., L.A. Falk, L.R. Ellingsworth, F.W. Ruscetti and C.R. Faltynek. 1990. Synergy between transforming growth factor- β and tumor necrosis factor- α in the induction of monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *Blood* 75:626-632
- DeLisser H.M., H-C. Yan, W.A. Muller, P.J. Newman, C.A. Buck and S.M. Albelda. 1993. Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 268:16037-16046

- DeLisser H.M.**, J. Chilkotowsky, H-C. Yang, M. Daise, C.A. Buck and S.M. Albelda. 1994a. Deletions in the cytoplasmic domain of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties. *J. Cell Biol.* 124:195-203
- DeLisser H.M.**, P.J. Newman and S.M. Albelda. 1994b. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunology Today* 15:490-495
- de Martin R.**, B. Haendler, R. Hofer-Warbinek, H. Gaugitsch, M. Wrann, H. Schlüsener, J.M. Seifert, S. Bodmer, A. Fontana and E. Hofer. 1987. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor- β gene family. *EMBO J.* 6:3673-3677
- Derynck R.**, J.A. Jarret, E.Y. Chen, D.H. Eaton, J.R. Bell, R.K. Assoian, A.B. Roberts, M.B. Sporn and D.V. Goeddel. 1985. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316:701-705
- Derynck R.**, J.A. Jarret, E.Y. Chen and D.V. Goeddel. 1986. The murine transforming growth factor- β precursor. *J. Biol. Chem.* 261:4377-4379
- Derynck R.**, P.B. Lindquist, A. Lee, D. Wen, J. Tamm, J.L. Graycar, L. Rhee, A.J. Mason, D.A. Miller, R.J. Coffey, H.L. Moses and E.Y. Chen. 1988. A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. *EMBO J.* 12:3737-3743
- Díaz-Meco M.T.**, I. Domínguez, L. Sanz, M.M. Municio, E. Berra, M.E. Cornet, A.G. de Herreros, T. Johansen and J. Moscat. 1992. Phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine is a target of transforming growth factor β 1 inhibitory signals. *Mol. Cell. Biol.* 12:310-316
- Distel R.J. and B.M. Spiegelman.** 1990. Protooncogene *c-fos* as a transcription factor. *Advances in Cancer Research* 55:37-55
- Doctor J.S.**, P.D. Jackson, K.E. Rashka, M. Visalli and M. Hoffmann. 1992. Sequence, biochemical characterization and developmental expression of a new member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 151:491-505
- Donaldson C.J.**, L.S. Mathews and W.W. Vale. 1992. Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:310-316
- Dubois C.M.**, F.W. Ruscetti, E.W. Palaszynski, L.A. Falk, J.J. Ophenheim and J.R. Keller. 1990. Transforming growth factor β is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: Proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J. Exp. Med.* 172:737-744
- Ebner R.**, R-H Chen, L. Shum, S. Lawler, T.F. Zioncheck, A. Lee, A.R. López and R. Derynck. 1993. Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β binding to type II receptor. *Science* 260:1344-1348

- Edwards, D.R., G. Murphy, J.J. Reynolds, S.E. Whitham, A.J.P., Docherty, P. Angel and J.K. Heath.** 1987. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* 6:1899-1904
- El-Deiry W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parson, J.M. Trent, D. Lin, E. Mercer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein.** 1993. WAF-1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825
- Espevik T., I.S. Figari, M.R. Shalaby, G.A. Lackides, G.D. Lewis, H.M. Shepard and M.A. Palladino.** 1987. Inhibition of cytokine production by ciclosporin A and transforming growth factor β . *J. Exp. Med.* 166:571-576
- Espevik T., I.S. Figari, G.E. Ranges and M.A. Palladino.** 1988. Transforming growth factor-1 (TGF- β 1) and recombinant tumor necrosis factor- α reciprocally regulate the generation of lymphokine-activated killer cell activity. *J. Immunol.* 140:2312-2316
- Estevez M. L. Attisano, J.L. Wrana, P.S. Albert, J. Massagué, and D.L. Riddle.** 1993. The daf-4 gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Cell* 75:681-692
- Ewen M.E., H.K. Sluss, C.J. Sherr, H. Matsushime, J-Y. Kato and D.M. Livingston.** 1993a. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73:487-497
- Ewen M.E., H.K. Sluss, I.L. Whitehouse and D.M. Livingston.** 1993b. TGF- β inhibition of CDK4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74:1009-1020
- Exton J.H.** 1990. Signaling through phosphatidylcholine break-down. *J. Biol. Chem.* 265:1-4
- Fafeur V., B.I. Terman, J. Blum and P. Bohlen.** 1990. Basic FGF treatment of endothelial cells down-regulates the 85-kDa TGF- β receptor subtype and decreases the growth inhibitory response to TGF- β 1. *Growth Factors* 3:237-245
- Fava R.A. and D.B. McClure.** 1987. Fibronectin-associated transforming growth factor. *J. Cell Physiol.* 131:184-189
- Feinberg A.P. and B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13
- Felgner P.L., T.R. Gadek, M. Holm et al.** 1987. Lipofectin: A highly efficient, lipid mediated DNA/transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417
- Ferguson E.L. and K.V. Anderson.** 1992. Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 71:451-461
- Fernández-Ruiz E., S. St-Jacques, T. Bellón, M. Letarte and C. Bernabeu.** 1993. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-qter. *Cytogenet. Cell. Genet.* 64:204-207

- Filmus J.**, J. Zhao and R.N. Buick. 1992. Overexpression of H-ras oncogene induces resistance to the growth-inhibitory action of transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) and alters the number and type of TGF- β 1 receptors in rat intestinal epithelial cell clones. *Oncogene* 7:521-526
- Flaumenhaft, R.M.** Abe, Y. Sato, K. Miyazono, J. Harpel, C-H. Heldin and D.B. Rifkin. 1993. Role of latent TGF- β binding protein in the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial cells and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 120:995-1002
- Florini J.R.**, A.B. Roberts, D.Z. Ewton, S.L. Falen, K.C. Flanders and M.B. Sporn. 1986. Transforming growth factor: A very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the differentiation inhibitor secreted by Buffalo rat liver cells. *J. Biol. Chem.* 261:16509-16513
- Fracker P.J.** and **J.C. Speck Jr.** 1978. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6,-tetrachloro 3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:849-857
- Franzén P.**, P. ten Dijke, H. Ichio, P.Schulz, C-H Heldin and K. Miyazono. 1993. Cloning of a type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell* 75:681-692
- Frater-Schroder M.**, G. Muller, W. Birchmeir and P. Bohlen. 1986. Transforming growth factor- β inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:295-302
- Freundlich B.** and **N. Avdalovic.** 1983. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes. *J. Immunol. Methods* 62:31-37
- Frolik C.A.**, L.M. Wakefield, D.M. Smith and B.M. Sporn. 1984. Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- β in normal rat kidney fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259:10995-11000
- Fukushima D.**, R. Bützow, A. Hildebrand and E. Ruoslahti. 1993. Localization of transforming growth factor beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 268:22710-22715
- Furukawa Y.**, S. Uenoyama, M. Ohta, A. Tsunoda, J.D. Griffin and M. Saito. 1992. Transforming growth factor- β inhibits phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human monocytic leukemia cell line JOSK-I. *J. Biol. Chem.* 267:17121-17127
- Gamble J.R.** and **M.A. Vadas.** 1988. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor- β . *Science* 242:97-99
- Ge A.Z.** and **C. Butcher.** 1994. Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF- β ligand. *Gene* 138:201-206
- Geiser A.G.**, J.K. Burmester, R. Webbink, A.B. Roberts and M.B Sporn. 1992. Inhibition of growth by transforming growth factor- β following fusion of two nonresponsive human

carcinoma cell lines: Implication of the type II receptor in growth inhibitory responses. *J. Biol. Chem.* 267:2588-2593

Geng Y. and R.A. Weinberger. 1993. Transforming growth factor β effects on expression of G1 cyclin and cyclin-dependent protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10315-10319

Gentry L.E., N.R. Webb, G.J. Lim, A.M. Brunner, J.E. Ranchalis, D.R. Twardzik, M.N. Lioubin, H. Marquard and A.F. Purchio. 1987. Type I transforming growth factor beta: Amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptide in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:3418-3427

Georgi L.L., P.S. Albert and D.L. Riddle. 1990. *daf-1*, a *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor kinase. *Cell* 61:635-645

Goldberger A., K. Middleton, C. Paddock, et. al. 1994a. Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form. *J. Biol. Chem.* 269: 17183-17191

Goldberger A., K.A. Middleton and P.J. Newman. 1994b. Changes in expression of the cell adhesion molecule PECAM-1 (CD31) during differentiation of human leukemic cell lines. *Tissue Antigens* 44:285-293

Gougos A. and M. Letarte. 1988a. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J. Immunol.* 141:1925-1933

Gougos A. and M. Letarte. 1988b. Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J. Immunol.* 141:1934-1940

Gougos A. and M. Letarte. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265:8361-8364

Gougos A., S. St. Jacques, A. Greaves, P.J. O'connell, A.J.F. d'Apice, H.J. Buhning, C. Bernabeu, J.A. van Mourik and M. Letarte. 1992. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int. Immunol.* 4:83-92

Goyert S.M., E.M. Ferrero, S.V. Seremetis, R.J. Winchester, J. Silver and A.C. Mattison. 1986. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J. Immunol.* 137:3909-3914

Green J.B.A., and J.C. Smith. 1990. Graded changes in dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. *Nature* 347:391-394

Grumet M. and G.M. Edelman. 1988. Neuron-Glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanism. *J. Cell Biol.* 106:487-503

Gruppuso P.A., R. Mikumo, D.L. Brautigan and L. Braun. 1991. Growth arrest induced by transforming growth factor β 1 is accompanied by protein phosphatase activation in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 266:3444-3448

- Halstead J., K. Kemp and R.A. Ignatz.** 1995. Evidence for involvement of phosphatidylcholine-phospholipase C and protein kinase C in transforming growth factor- β signaling. *J. Biol. Chem.* 270:13660-13663
- Hampson J., I.L.O. Ponting, N. Cook, L.Vodinelich, S. Redmon, A.B. Roberts and T.M. Dexter.** 1988. The effects of TGF- β on haematopoietic cells. *Growth Factors* 1:193-202
- Hanazaba S., A. Takeshita, Y. Tsukamoto, Y. Kawata, K. Otha, I. Takara and S. Kitano.** 1991. Transforming growth factor- β induced gene expression of monocyte chemoattractant JE in mouse osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:1130-1136
- Hannon G.J and D. Beach.** 1994. p15^{ink4b} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257-261
- Harper J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S.J. Elledge.** 1993. The p21 CDK-interacting protein Cip-1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816
- Hatzfeld J., M-L Li, E.L. Brown, H. Sookdeo, J-P. Levesque, T. O'Toole, C. Gurney, S. C. Clark and A. Hatzfeld.** 1991. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor β 1 or Rb oligonucleotides. *J. Exp. Med.* 174:925-929
- He W.W., M.L. Gustafson, S. Hirobe and P.K. Donahoe.** 1993. Developmental expression of four novel serine/threonine kinase receptors homologous to the activin/transforming growth factor-beta type II receptor family. *Dev. Dynamics* 196:133-142
- Heimark R.L., D.R. Twardzik and S.M. Schwartz.** 1986. Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* 233:1078-1080
- Heino J. and J. Massagué.** 1989. Transforming growth factor- β switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes selective loss of cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.* 264:21806-21811
- Heldin C. H.** 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223
- Hemmati-Brivanlou A. and D.A. Melton.** 1992. A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359:609-614
- Henis Y.I., A. Moustakas, H.Y. Lin and H.F. Lodish.** 1994. The types II and III transforming growth factor- β form homo-oligomers. *J. Cell Biol.* 126:139-154
- Hidaka H., M. Inagaki, S. Kawamoto and Y. Sasaki.** 1984. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23: 5036-5041

- Hino M.**, A. Tojo, K. Miyazono, Y. Miura, S. Chiba, Y. Eto, H. Shibai and F. Takaku. 1989. Characterization of cellular receptors for erythroid differentiation factor on murine erithroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 264:10309-10314
- Howe P.H.**, G. Draetta and E.B. Leof. 1991. Transforming growth factor β 1 inhibition of p34^{cdc2} phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. *Mol. Cell. Biol.* 11:1185-1194
- Huang S.S.**, P. O'Grady and J.S. Huang. 1988. Human transforming growth factor β - α 2-macroglobulin complex is a latent form of transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 263:1535-1541
- Hunter T. and J. Pines.** 1994. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors. Come of age. *Cell* 79:573-582
- Hunter T.**, 1995. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236
- Hynes R.O.** 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25
- Ichijo H.**, L. Rönstrand, K. Miyagawa, H. Ohashi, C.-H. Heldin and K. Miyazono. 1991. Purification of transforming growth factor- β 1 binding proteins from porcine uterus membranes. *J. Biol. Chem.* 266: 22459-22464
- Ichijo H.**, U. Hellman, C. Wernstedt, L.J. Gonez, L. Claesson-Welsh, C.-H. Heldin and K. Miyazono. 1993. Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. *J. Biol. Chem.* 268:14505-14513
- Ignotz R.A. and J. Massagué.** 1986. Transforming growth factor stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 261:4337-4345
- Ignotz R.A. and J. Massagué.** 1987. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action. *Cell* 51:189-197
- Ignotz R.A.**, J. Heino and J. Massagué. 1989. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 264:389-392
- Inagaki M.**, A. Moustakas, H.Y. Lin, H.F. Lodish and B.I. Carr. 1993. Growth inhibition by transforming growth factor beta (TGF-beta) type I is restored in TGF-beta resistant hepatoma cells after expression of TGF-beta receptor type II cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5359-5363
- Ishibashi T.**, S.L. Miller and S.A. Burstein. 1987. Type β transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 69:1737-1741

- Jacobsen S.E.W.**, F.W. Ruscetti, C.M. Dubois, J. Lee, T.C. Boone and J.R. Keller. 1991. Transforming growth factor- β -trans-modulates the expression of colony stimulating factor receptors on murine hematopoietic progenitor cell lines. *Blood* 77:1706-1716
- Jakowlew S.B.**, P.J. Dillard, P. Kondiah, M.B. Sporn and A.B. Roberts. 1988a. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor- β messenger ribonucleic acid from chicken embryo chondrocytes. *Mol. Endocrinol.* 2: 747-755
- Jakowlew S.B.**, P.J. Dillard, M.B. Sporn and A.B. Roberts. 1988b. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor β 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol.* 2:1186-1195
- Jennings J.C.**, S. Mohan, T.A. Linkhart, R. Widstrom and D.J. Baylink. 1988. Comparison of the biological actions of TGF- β 1 and TGF- β 2: Differential activity in endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 137:167-172
- Johns L.D.**, K.C. Flanders, G.E. Ranges, and S. Sriram. 1991. Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor- β 1. *J. Immunol.* 147:1792-1796
- Johnson D.W.**, M. Qumsiyeh, M. Benkhalifa and D.A. Marchuk. 1995. Assignment of human transforming growth factor- β type I and type III receptor genes (TGFBR1 and TGFBR3) to 9q33-q34 and 1p32-p33, respectively. *Genomics* 28:356-357
- Joyce M.E.**, A.B. Roberts, M.B. Sporn and M.E. Bolander. 1990. Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.* 110:2195-2207
- Kanzaki T.**, A. Olofsson, A. Morén, C. Wernstedt, U. Hellman, K. Miyazono, L. Claesson-Welsh and C.-H. Heldin. 1990. TGF- β 1 binding protein: A component of the large latent complex of TGF- β 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61:1051-1061
- Keller J.R.**, C. Mantel, G.K. Sing, L.R. Ellingsworth, S.K. Ruscetti and F.W. Ruscetti. 1988. Transforming growth factor β 1 selectively regulates early murine hematopoietic progenitors and inhibits the growth of IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *J. Exp. Med.* 168:737-750
- Keller J.R.**, S.E.W. Jacobsen, K.T. Sill, L.R. Ellingsworth and F.W. Ruscetti. 1991. Stimulation of granulopoiesis by transforming growth factor β : synergy with granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7190-7194
- Kerhl J.H.** 1991. Transforming growth factor- β : An important mediator of immunoregulation. *Int. J. Cell Cloning* 9:438-450
- Kerhl J.H.**, A.B. Roberts, L.M. Wakefield, S.B. Jakowlew, M.B. Sporn and A.S. Fauci. 1986a. Transforming growth factor β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* 137:3855-3860

- Kerhl J.H.**, L.M. Wakefield, A.B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M.B. Sporn and A.S. Fauci. 1986b. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163:1037-1050
- Kerr L.D.**, D.B. Miller and L.M. Matrisian. 1990. TGF- β 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61:267-278
- Kim S-J.**, P. Angel, R. Lafyatis, K. Hattori, K.Y. Kim, M.B. Sporn, M. Karin and A.B. Roberts. 1990. Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell. Biol.* 10:1492-1497
- Kimchi A.**, X-F. Wang, R.A. Weinberger, S. Cheifetz and J. Massagué. 1988. Absence of TGF- β receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science* 240:196-199
- Kingsley D.M.**, A.E. Bland, J.M. Grubber, P.C. Marker, L.B. Russel, N.G. Copeland and N.A. Jenkins. 1992. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetics member of the TGF- β superfamily. *Cell* 71:399-410
- Knap W.**, B.Dorken, P. Reiber, R.E. Schmidt, H. Stein and A.E. von dem Borne. 1989. CD Antigens 1989. *Blood* 74:1448-1450
- Koennig B.B.**, J.S. Cook, D.H. Wolsing, J. Ting, J.P. Tieman, P.E. Correa, C.A. Olson, A.L. Pecquet, F. Ventura, R.A. Grant, G.X. Chen, J.L. Wrana, J. Massagué and J.S. Rosenbaum. 1994. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:5961-5974
- Koff A.**, M. Ohtsuki, K. Polyac, J.M. Roberts and J. Massagué. 1993. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* 260:536-539
- Kondaiah P.**, M.J. Sands, J.M. Smith *et al.* 1990. Identification of a novel transforming growth factor- β (TGF- β 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265:1089-1093
- Kossmann T.**, C.L. Manthey, M.E. Brandes, M.C. Morganti-Kossmann, K. Ohura, J.B. Allen, S.E. Mergenhagen and S.M. Wahl. 1992. Kupffer cells express type I TGF- β receptors, migrate to TGF- β and participate in streptococcal cell wall induced hepatic granuloma formation. *Growth Factors* 7:73-83
- Kramer I.J.M.**, Y. Koornneef, S.W. de Laat and A.J.M. van den Eijnden-van Raaij. 1991. TGF- β 1 induces phosphorylation of the cyclic AMP responsive element binding protein in ML-CC164 cells. *EMBO J.* 10:1083-1089
- Krystal G.**, V. Lam, W. Dragowska, C. Takahashi, J. Appel, A. Gontier, A. Jenkins, H. Lam, L. Quon and P. Lansdorp. 1994. Transforming growth factor β 1 is an inducer of erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* 180:851-860

- Kulkarni A.B.**, C-G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K.C. Flanders, A.B. Roberts, M.B. Sporn, J.M. Ward and S. Karlsson. 1993. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:770-774
- Kuruville A.P.**, R. Shah, G.M. Hochwald, H.D. Liggitt, M.A. Palladino and G.J. Thorbecke. 1991. Protective effect of transforming growth factor β 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2918-2921
- Laemmli U.K.**. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lafon C.**, P. Mazars, M. Guerrin, N. Barboule, J-Y. Charcosset and A. Valette. 1995. Early gene responses associated with transforming growth inhibition and autoinduction in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Biochim.et Biophys. Acta* 1266:288-295
- Laiho M.**, O. Saksela, P.A. Andreasen and J. Keski-Oja. 1986. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor- β . *J. Cell Biol.* 103:2403-2410
- Laiho M.**, O. Saksela and J. Keski-Oja. 1987. Transforming growth factor- β induction of type-I plasminogen activator inhibitor: Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *J. Biol. Chem.* 262:17467-17474
- Laiho M.**, F.M.B. Weis and J. Massagué. 1990a. Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)- β receptor types I y II in TGF- β -resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 265:18518-18524
- Laiho M.**, J.A. DeCaprio, J.W. Ludlow, D.M. Livingston and J. Massagué. 1990b. Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62:175-185
- Laiho M.**, F.M.B. Weis, F.T. Boyd, R.A. Ignatz and J. Massagué. 1991a. Responsiveness to transforming growth factor- β (TGF- β) restored by genetic complementation between cells defective in TGF- β receptors I and II. *J. Biol. Chem.* 266:9108-9112
- Laiho M.**, L. Rönstrand, J. Heino, J.A. DeCaprio, J.W. Ludlow, D.M. Livingston and J. Massagué. 1991b. Control of JunB and extracellular matrix protein expression by transforming growth factor- β 1 is independent of Simian virus 40 T antigen-sensitive growth-inhibitory events. *Mol. Cell.Biol.* 11:972-978
- Lamarre J.**, J. Vasudevan and L. Gonias. 1994. Plasmin cleaves betaglycan and releases a 60 kDa transforming growth factor- β complex from the cell surface. *Biochem. J.* 302:199-205
- Landesman Y.**, M. Pagano, G. Draetta, V. Rotter, N.E. Fusenig and A. Kimchi. 1992. Modifications of cell cycle controlling nuclear proteins by transforming growth factor β in the HaCatT keratinocyte cell line. *Oncogene* 7:1661-1665

- Legerski R., X. Xhou, J. Dresback, H. Eberspaecher, S. McKinney, P. Segarini and B. Crombrughe.** 1992. Molecular cloning and characterization of a novel rat activin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:672-679
- Leof E.B., J.A. Proper, A.S. Goustin, G.D. Shipley, P.E. DiCorleto and H.L. Moses.** 1986. Induction of *c-sis* mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor β : A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:2453-2457
- Lewis C.E. and J. O'D. McGee.** (Eds). 1992. The Macrophage. *IRL Press* pp. 3-74.
- Lin H.Y., X-F. Wang, E. Ng-Eaton, R.A. Weinberg and H.F. Lodish.** 1992. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68:775-785
- Lin H.Y. and H.F. Lodish.** 1993. Receptors for the TGF- β superfamily: Multiple polypeptides and serine/threonine kinases. *Trends Cell Biol.* 3:14-19
- López-Casillas F., S. Cheifetz, J. Doody, J.L. Andres, W.S.Lane and J. Massagué.** 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor. *Cell* 67:785-795
- López-Casillas F., J.L. Wrana and J. Massagué.** 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444
- López-Casillas F., H.M. Payne, J.L. Andrés and J. Massagué.** 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J. Cell Biol.* 124:557-568
- Lotem J. and L. Sachs.** 1992. Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood* 80:1750-1757
- Lowrance J.H., F.X. O'Sullivan, T.E. Caver, W. Waegell and M.D. Greshman.** 1994. Spontaneous elaboration of transforming growth factor β suppress host defense against bacterial infection in autoimmune MRI/lpr mice. *J. Exp. Med.* 180:1693-1703
- Lyons K.M., C.M. Jones and B.L.M. Hogan.** 1991. The DVR gene family in embryonic development. *Trends Genet.* 7:408-412
- Markowitz S., J. Wang, L. Myeroff et al.** 1995. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336-1338
- Massagué J., S. Cheifetz, T. Endo and B. Nadal-Guinard.** 1986. Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8206-8210
- Massagué J.** 1987. Identification of receptors for type- β transforming growth factor. *Method Enzymol.* 146:174-195

- Massagué J.** 1990. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:597-641
- Massagué J.** 1992. Receptors for the TGF- β family. *Cell* 69:1067-1070
- Masui T., L.M. Wakefield, J.F. Lechner, M.A. LaVeck, M.B. Sporn and C.C. Harris.** 1986. Type β transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2438-2442
- Mathews L.S. and W.W. Vale.** 1991. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell.* 65:973-982
- Mathews L.S. and W.W. Vale.** 1993. Characterization of type II activin receptors binding, processing, and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 268:19013-19018
- Matsuzaki K., J. Xu, F. Wang, W.L. McKeehan, L. Krummen and M. Kan.** 1993. A widely expressed transmembrane serine/threonine kinase that does not bind activin, inhibin, transforming growth factor beta or bone morphogenic factor. *J. Biol. Chem.* 268:12719-12723
- Matzuk M.M. and A. Bradley.** 1992. Cloning of the human activin receptor cDNA reveals high evolutionary conservation. *Biochim. Biophys. Acta* 1130:105-108
- Matzuk M.M., T.R. Kumar, A. Vassalli, J.R. Bickenbach, D.R. Roop, R. Jaenisch and A. Bradley.** 1995a. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 374:354-356
- Matzuk M.M., T.R. Kumar and A. Bradley.** 1995b. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374:356-360
- Matzuk M.M., N. Lu, H. Vogel, K. Sellheyer, D.R. Roop and A. Bradley.** 1995c. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 374:360-363
- Mauro V.P., L.A. Krushel, B.A. Cunningham and G.M. Edelman.** 1992. Homophilic and heterophilic binding activities of Nr-CAM, a nervous system cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* 119:191-202
- McAllister K.A., K.M. Grogg, D.W. Johnson, et. al.** 1994. Endoglin a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type I. *Nature Genetics* 8:345-351
- McCartney-Francis N., D. Mizel, H. Wong, L. Wahl and S. Wahl.** 1990. TGF- β regulates production of growth factors and TGF- β by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors* 4:27-35
- Mercier T., I. Gaillard-Sanchez, P. Martel and C. Seillan-Heberden.** 1995. Constitutive overexpression of *c-fos* protein in rat liver epithelial cells decrease TGF- β synthesis and increases TGF- β 1 receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1266:64-72

- Merwin J.R.**, W. Newman, L.D. Beall, A. Tucker and J. Madri. 1991. Vascular cells respond differentially to transforming growth factors beta1 and beta2 in vitro. *Am. J. Pathol.* 138:37-51
- Metzelaar M.J.**, J. Korteweg, J.J. Sixma and H.K. Nieuwenhuis. 1991. Biochemical characterization of PECAM-1 (CD31 antigen) on human platelets. *Thromb. Haemostasis* 66:700-707
- Millan F.A.**, F. Denhez, P. Kondaiah and R.J. Akhurst. 1991. Embryonic gene expression patterns of TGF- β 1, β 2 and β 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* 111:131-144
- Miller A.**, O. Lider, A.B. Roberts, M.B. Sporn and H.L. Weiner. 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:421-425
- Miller D.A.**, A. Lee, R.W. Pelton E.Y. Chen, H.L. Moses and R. Derynck. 1989a. Murine transforming growth factor- β 2 cDNA sequence and expression in adult tissues and embryos. *Mol. Endocrinol.* 3:1108-1114
- Miller D.A.**, A. Lee, Y. Matsui, E.Y. Chen, H.L. Moses and R. Derynck. 1989b. Complementary DNA cloning of the murine transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) precursor and the comparative expression of TGF- β 3 and TGF- β 1 messenger RNA in murine embryos and adult tissues. *Mol. Endocrinol.* 3:1926-1934
- Miller J. and R. Germain.** 1986. Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain. *J. Exp. Med.* 164:1478-1489
- Mitchell E.J. and M.D. O'Connor-McCourt.** 1991. A transforming growth factor β (TGF- β) receptor from human placenta exhibits a greater affinity for TGF- β 2 than for TGF- β 1. *Biochemistry* 30:4350-4356
- Mitchell E.J.**, K. Lee and M.D. O'Connor-McCourt. 1992a. Characterization of transforming growth factor- β (TGF- β) receptors on BeWo choriocarcinoma cells including the identification of a novel 38-kDa TGF- β binding glycoprotein. *Mol. Biol. Cell* 3:1259-1307
- Mitchell E.J.**, L. Fitz-Gibbon and M.D. O'Connor-McCourt. 1992b. Subtypes of betaglycan and type I and type II transforming growth factor- β (TGF- β) receptors with different affinities for TGF- β 1 and TGF- β 2 are exhibited by human placental trophoblast cells. *J. Cell Physiol.* 150:334-343
- Miyazono K.**, U. Hellman, C. Westedt and C-H. Heldin. 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1: Purification from human platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem.* 263:6407-6415
- Miyazono K. and C-H. Heldin.** 1991. Latent forms of TGF- β : Molecular structure and mechanism of activation. *Ciba Found. Symp.* 157:81-92

- Miyazono K.**, P. ten Dijke, H. Ichijo and C-H. Heldin. 1994. Receptors for transforming growth factor- β . *Advances in Immunology* 55:181-220
- Moren A.**, H. Ichijo and K. Miyazono. 1992. Molecular cloning and characterization of the human and porcine transforming growth factor- β type III receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189:356-362
- Moses H.L.**, R.F. Tucker, E.B. Leof, R.J. Coffey, J. Halper and G.D. Shipley. 1985. Type β transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. En "Cancer Cells" (J. Feramisco, B. Ozanne and Stiles, Eds.), Vol 3, pp. 65-71. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Moses H.L.**, E.Y. Yang and J.A. Pietenpol. 1990. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mecanistic insights. *Cell* 63:245-247
- Moustakas A.**, H.Y. Lin, Y.J. Henis, J. Plamondon, M.O'Connor-McCourt and H.F. Lodish. 1993. The transforming growth factor β receptors type I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J. Biol. Chem.* 268:22215-22218
- Mulder K.M. and S.L. Morris.** 1992. Activation of p21 ras by transforming growth factor β in epithelial cell. *J. Biol. Chem.* 267:5029-5031
- Muller W.A. and M.A. Gimbrone Jr.** 1986. Plasmalemmal protein of cultured vascular endothelial cells exhibit apical-basal polarity: Analysis by surface-selective iodination. *J. Cell Biol.* 103:2389-2402
- Muller W. A.**, C.M. Ratti, S.L. McDonnell and Z.A. Cohn. 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemma protein enriched in intercellular junctions. *J. Exp. Med.* 170:399-414
- Muller W.A.**, M.E. Berman, P.J. Newman, H.M. DeLisser and S.M. Albelda. 1992. A heterofilic adhesion mechanism for platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31). *J. Exp. Med.* 175:1401-1404
- Muller W.A.**, S.A. Weigl, X. Deng and D.M. Philips. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178:449-460
- Munger K.**, J.A. Pietenpol, M.R. Pittelkow, J.T. Holt and H.L. Moses. 1992. Transforming growth factor β 1 regulation of *c-myc* expression, pRB phosphorylation, and cell cycle progression in keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 3:291-298
- Murphy-Ullrich J.E.**, S. Schultz-Cherry and M. Höök. 1992. Transforming growth factor- β complexes with thrombospondin. *Mol. Biol. Cell* 3:181-188
- Murray B.A. and J.J. Jensen.** 1992. Evidence for heterophilic adhesion of embrionic retinal cells and neuroblastoma cells to substratum-adsorbed NCAM. *J. Cell Biol.* 117:1311-1320

- Murray J.A.H.** (ed.). 1992. Antisense RNA and DNA. *Modern Cell Biology* Vol 11. Wiley-Liss
- Mustoe T. A.**, G.F. Pierce, A. Thomason, P. Gramates, M.B. Sporn, and T.F. Deuel. 1987. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor type- β . *Science* 237:1333-1336
- Newman P.J.**, M.C. Berndt, J.Gorski, G.C. White II, S. Lyman, C. Paddock, W.A. Muller. 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219-1222
- Newman P.J.**, C.A. Hillery, R. Albrecht, et. al. 1992. Activation-dependent changes in human platelet PECAM-1: Phosphorylation, Cytoskeletal association, and surface membrane redistribution. *J. Cell Biol.* 119: 239-246
- Newman P.J.** 1994. The role of PECAM-1 in vascular cell Biology. *Ann. New York Acad. Sci.* 714:165-174
- Nilsen-Hamilton M.** 1990. Transforming growth factor- β and its actions on cellular growth and differentiation. *Current Topics in Developmental Biology* 24:95-136
- Nishizuka Y.** 1992. Intracellular signaling by hidrolisis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614
- Niswander L and G.R. Martin.** 1993. FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* 361:68-71
- Noble P.W.**, P.M. Henson, C. Lucas, M. Mora-Worms, P. C. Carré and D.W.H. Riches. 1993. Transforming growth factor- β primes macrophages to express inflammatory gene products in response to particulate stimuli by an autocrine/paracrine mechanism. *J. Immunol.* 151:979-989
- Ogawa Y.**, D.K. Schmith, J.R. Dasch, R.J. Chang and C.B. Glaser. 1992. Purification and characterization of transforming growth factor β 2.3 and - β 1.2 heterodimers from bovine bone. *J. Biol. Chem.* 267:2325-2328
- O'Connell P.J.**, A. McKenzie, N. Fisicaro, S.P. Rockman, M.J. Pearse and J.F. d'Apice. 1992. Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin. Exp. Immunol.* 90:154-159
- O'Connor-McCourt M.D. and L.M. Wakefield.** 1987. Latent transforming growth factor- β in serum: A specific complex with α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 262:14090-14099
- O'Grady P.**, Q. Liu, S.S. Huang and J.S. Huang. 1992. Transforming growth factor β (TGF- β) type V receptor has a TGF- β -stimulated serine/threonine-specific autophosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* 267:21033-21037

- Ohta M.**, J.S. Greenberger, P. Anklesaria, A. Bassols and J. Massagué. 1987. Two forms of transforming growth factor- β distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329:539-541
- Ohto H.**, H. Maeda, Y. Shibata, et. al. 1985. A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120 Kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. *Blood* 66: 873-881
- Okada F.**, K. Yamaguchi, A. Ichihara and T. Nakamura. 1989. Purification and structural analysis of a latent form of transforming growth factor- β from rat platelets. *J. Biochem.* 106:304-310
- Olson E.N.**, E. Sternberg, J.S.Hu, G. Spizz and C. Wilcox. 1986. Regulation of myogenic differentiation by type β transforming growth factor. *J. Cell Biol.* 103:1799-1805
- Ortaldo J.R.**, A.T. Mason, J.J. O'Shea, M.J. Smyth, L.A. Falk, I.C.S. Kennedy, D.L. Longo and F.W. Ruscetti. 1991. Mechanistic studies of transforming growth factor- β inhibition of IL-2 dependent activation of CD3- large granular lymphocyte functions: Regulation of IL-2R (p75) signal transduction. *J. Immunol.* 146:3791-3798
- Ottmann O.G and L.M. Pelus.** 1988. Differential proliferative effects of transforming growth factor- β on human hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 140:2661-2665
- Overall C.M.**, J.L. Wrana and J. Sodek. 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72 kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- β 1 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266:14064-14071
- Padgett R.W.**, R.D. St Johnston and W.M. Gelbart. 1987. A transcrip from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor- β family. *Nature* 325:81-84
- Page C.**, M. Rose, M Yacoub and R. Piggot. 1992. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 141:673-683
- Paralkar V.M.**, S. Vukicevic and A.H. Reddi. 1991. Transforming growth factor β type I binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Dev. Biol.* 143:303-308
- Paralkar V.M.**, B.S. Weeks, Y.M. Yu, H.K. Kleinman and A.H. Reddi. 1992. Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: Potentiation and binding to type IV collagen. *J. Cell Biol.* 119:1721-1728
- Pelton R.W.**, B. Saxena, M. Jones, H.L. Moses and L.I. Gold. 1991. Immunohistochemical localization of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 in the mouse embryo: Expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J. Cell Biol* 115:1091-1105

- Perides G., G. Hu, D.C. Rueger and M.E. Charness.** 1993. Osteogenic protein-1 regulates L1 and neural cell adhesion molecule gene expression in neural cells. *J. Biol. Chem.* 268:25197-25205
- Pertovaara L., L. Sistonen, T.J. Bos, P.K. Vogt, J. Keski-Oja and K. Alitalo.** 1989. Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor β stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 9:1255-1262
- Peters G.** 1994. Stifled by inhibitions. *Nature* 371:204-205
- Piali L., S.M. Albelda, H.S. Baldwin, P. Hammel, R.H. Gisler and B.A. Imhof.** 1993. Murine Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1)/CD31 modulates β 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2464-2471
- Piali L., P.Hammel, C. Uherek, F. Bachmann, R.H. Gisler, D. Dunon and B.A. Imhof.** 1995. CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha_v\beta_3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J. Cell Biol.* 130:451-460
- Pietenpol J.A., J.T. Holt, R.W. Stein and H.L. Moses.** 1990a. Transforming growth factor β 1 suppression of c-myc gene transcription: Role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3758-3762
- Pietenpol J.A., R.W. Stein, E. Moran, P. Yaciuk, R. Schlegel, R.M. Lyons, M.R. Pittelkow, K. Münger, P.M. Howley and H.L. Moses.** 1990b. TGF- β 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell* 61:777-785
- Pietenpol J.A., K. Münger, P.M. Howley, R.W. Stein and H.L. Moses.** 1991. Factor-binding element in the human c-myc promoter involved in transcriptional regulation by transforming growth factor β 1 and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10227-10231
- Pinson D.M., R.D. LeClaire, R.B. Lorsbach, M.J. Parmely and S.W. Russel.** 1992. Regulation by transforming growth factor- β 1 of expression and function of the receptor for IFN- γ on mouse macrophages. *J. Immunol.* 149:2028-2034
- Pircher R., D.A. Lawrence and P. Jullien.** 1984. Latent β -transforming growth factor in nontransformed and Kirsten sarcoma virus-transformed normal rat kidney cells, clone 49F. *Cancer Res.* 44:5538-5543
- Polyak K., J-Y. Kato, M.J. Solomon, C.J. Sherr, J. Massagué, J.M. Roberts and A. Koff.** 1994a. p27kip1, a cyclin -CDK inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8:9-22
- Polyak K., M-H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J.M. Roberts, P. Tempst and J. Massagué.** 1994b. Cloning of p27^{kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78:59-66

- Postlethwaite A.E.**, J. Keski-Oja, H.L. Moses, and A.H. Kang. 1987. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β . *J. Exp. Med.* 165:251-256
- Qian S.W.**, J.K. Burmester, J.R. Merwin, J.A. Madri, M.B. Sporn and A.B. Roberts. 1992. Identification of a structural domain that distinguishes the actions of the type 1 and 2 isoforms of transforming growth factor β on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6290-6294
- Quackenbush E.J. and M. Letarte.** 1985. Identification of several cell surface proteins of non-T, non B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134:1276-1285
- Quackenbush E.J.**, A. Gougos, R. Baumal and M. Letarte. 1986. Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Immunol.* 136:118-124
- Qureshi S.T.**, P. Gros, M. Letarte and D. Malo. 1995. The murine endoglin gene (ENG) maps to chromosome 2. *Genomics* 26:165-166
- Ranges G.E.**, I.S. Figari, T. Espevik and M.A. Palladino. 1987. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor β and reversal by recombinant tumor necrosis α . *J. Exp. Med.* 166:991-998
- Rao Y.**, X. Wu, J. Gariepy, U. Rutishauser and C. Siu. 1992. Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM. *J. Cell Biol.* 118:937-949
- Riccio A.**, P.V. Pedone, L.R. Lund, T. Olesen, H.S. Olsen and P.A. Andreasen. 1992. Transforming growth factor β 1-responsive element: Closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-nuclear factor-I in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene. *Mol. Cell. Biol.* 12:1846-1855
- Ristow H-J.** 1986. BSC-1 growth inhibitor type β transforming growth factor is a strong inhibitor of thymocytes proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5531-5533
- Ritzlander J.D.**, R.H. Goldstein, A. Fine, A. Litchler, D.W. Rowe and B.D. Smith. 1991. Transforming growth factor β activation elements in the distal promoter region of the rat α 1 type I collagen gene. *Biochem. J.* 280:157-162
- Roberts A.B.**, M.A. Anzano, L.M. Wakefield, N.S. Roche, D.F. Stern and M.B. Sporn. 1985. Type β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:119-123
- Roberts A.B.**, M.B. Sporn, R.K. Assoian, D.M. Smith, N.S. Roche, L.M. Wakefield, U.I. Heine, L.A. Liotta, V. Falanga, J.H. Kerhl and A.S. Fauci. 1986. Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4167-4171

- Roberts A.B. and M.B. Sporn.** (Eds) 1990. The transforming growth factor- β s. *En "Peptide growth factors and their receptors"* (M.B. Sporn and A.B. Roberts, eds.). Parte 1, pp. 419-472. Springer-Verlag, Berlin
- Roberts A.B.,** S-J. Kim, T. Noma, A.B. Glick, R. Lafyatis, R. Lechleider, S.B. Jakowlew, A. Geiser, M.A. O'Reilly, D. Danielpour, and M.B. Sporn.1991. Multiple forms of TGF- β : Distinct promoters and differential expression. *Ciba Found. Symp.* 157:7-28
- Rokhlin O.W.,** M.B. Cohen, H. Kubagawa, M. Letarte and M.D. Cooper. 1995. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J. Immunol.* 154:4456-4465
- Rook A.H.,** J.H. Kehrl, L.M. Wakefield, A.B. Roberts, M.B. Sporn, D.B. Burlington, H.C. Lane and A.S. Fauci. 1986. Effects of transforming growth factor β on the functions of natural killer cells: Depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J. Immunol.* 136:3916-3920
- Rosen V. and R.S. Thies.** 1991. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet.* 8:97-102
- Rossi P.,** G. Karsenty, A.B. Roberts, N.S. Roche, M.B. Sporn and B. de Crombrughe. 1988. A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor- β . *Cell* 52:405-414
- Rothlein R. and T.A. Springer.** 1986. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* 163:1132-1149
- Roubin R.,** H. Deagostini-Bazin, M.R. Hirsch and C. Goridis. 1990. Modulation of NCAM expression by transforming growth factor- β serum, and autocrine factors. *J. Cell Biol.* 111:673-684
- Ruoslahti E. and M.D. Pierschbacher.** 1987. New perspectives en cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-495
- Ruscetti, F.W. and M.A. Palladino.** 1991. Transforming growth factor- β and the immune system. *Prog. Growth Factor Res.* 3:159-175
- Ryseck R-P.,** S.I. Hirai, M. Yaniv and R. Bravo. 1988. Transcriptional activation of *c-jun* during G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* 334:535-537
- Salo T.,** J.G. Lyons, F. Rahemtulla, H. Birkedal-Hansen and H. Larjava. 1991. Transforming growth factor- β 1 upregulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 266:11436-11441
- Sambrook J.,** E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Vol. 3: sec 16. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

- Sanderson N., V. Factor, P. Nagy, J. Kopp, P. Kondalait, L. Wakefield, A.B. Roberts, M.B. Sporn and S.S. Thorgeirsson. 1995. Hepatic expression of mature transforming growth factor β in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2572-2576.
- Sankar S., N. Mahooti-Brooks, M. Centrella, T.L. McCarthy and J.A. Madri. 1995. Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor β 2. *J. Biol. Chem.* 270:13567-13572
- Sato Y. and D.B. Rifkin 1989. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transforming growth factor- β 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* 109:309-315
- Schlossman S.F., L. Boumsell, W. Gilks, et al. (Eds). 1995a. Leucocyte Typing V. *Oxford University Press*. Vol 2, pp 1756-1764
- Schlossman S.F., L. Boumsell, W. Gilks, et al. (Eds). 1995b. Leucocyte Typing V. *Oxford University Press*. Vol 2, pp 1259-1265
- Schlunegger M.P. and M.G. Grütter. 1992. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor- β 2. *Nature* 358:430-434
- Segarini P.R., A.B. Roberts, D.M. Rosen and S.M. Seyedin. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 262:14655-14662
- Segarini P.R. and S.M. Seyedin. 1988. The high molecular weight receptor to transforming growth factor- β contains glycosaminoglycan chains. *J. Biol. Chem.* 263:8366-8370
- Segarini P. R., D.M. Rosen and S.M. Seyedin 1989. Binding of transforming growth factor- β to cell surface proteins varies with cell type. *Mol. Endocrinol.* 3:261-272
- Segarini P.R. 1993. TGF- β receptors: a complicated system of multiple binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1155:269-275
- Serrano M., Hannon G.L. and D. Beach. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707
- Sherr C.J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059-1065
- Shimizu Y., W. Newman, Y. Tanaka and S. Shaw. 1992. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today* 13:106-112
- Shinozaki H., I. Ito, Y. Hasegawa, K. Nakamura, S. Igarashi, M. Nakamura, K. Miyamoto, Y. Eto, Y. Ibuki and T. Minegishi. 1992. Cloning and sequencing of a rat type II activin receptor. *FEBS Lett.* 312:53-56

- Shipley G.D.**, R.F. Trucker and H.L. Moses. 1985. Type β transforming growth factor/growth inhibitor stimulates entry of monolayer cultures of ARK-2B into S phase after a prolonged prereplicative interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:4147-4151
- Shull M.M.**, Y. Ormsby, A.B. Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, N. Annunziata and T. Doetschman. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699
- Simmons D.L.**, C. Walker, C. Power and R. Piggot. 1990. Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. *J. Exp. Med.* 171:2147-2152
- Skubitz K.M.**, S.A. Goueli. 1994. CD31 (PECAM-1), Cdw32 (Fc γ RII) and anti-HLA Class I monoclonal antibodies recognize phosphotyrosine-containing proteins on the surface of human neutrophils. *J. Immunol.* 152:5902-5911
- Smith J.C.** 1993. Mesoderm-inducing factors in early vertebrate development. *EMBO J.* 12:4463-4470
- Soma Y. and G.R. Grotendorst.** 1989. TGF- β stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *J. Cell. Physiol.* 140:246-253
- Southern P.J. and P. Berg.** 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* 1:327-341
- Springer T.A.**, 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314
- St-Jacques S.**, M. Forte, S.J. Lye and M. Letarte. 1994a. Localization of endoglin, a transforming growth factor- β binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol. Reprod.* 51:405-413
- St-Jacques S.**, U. Cymerman, N. Pece and M. Letarte. 1994b. Molecular characterization and *in situ* localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor- β binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134:2645-2657
- Stockinger H.**, S.J. Gadd, R. Eher, et. al. 1990. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J. Immunol.* 145:3889-3897
- Stockinger H.**, W. Schreiber, O. Majdic, W. Holter, D. Maurer and W. Knapp. 1992. Phenotype of human T cells expressing CD31, a molecule of the immunoglobulin supergene family. *Immunology* 75:53-58
- Streuli C.H.**, C. Schmidhauser, M. Kobrin, M.J. Bissel and R. Derynck. 1993. Extracellular matrix regulates expression of the TGF- β 1 gene. *J. Cell Biol.* 120:253-260

- Sundström C. and K. Nilsson.** 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic cell line (U937). *Int. J. Cancer* 17:565-577
- Suzuki K., T. Ono and K Takahashi.** 1992. Inhibition of DNA synthesis by TGF- β 1 coincides with inhibition of phosphorylation and cytoplasmic translocation of p53 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:1175-1183
- Taetle R., C. Payne, B. Dos Santos, M. Russell and P. Segarini.** 1993. Effects of transforming growth factor β 1 on growth and apoptosis of human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 53:3386-3393
- Takada Y., C. Huang and M.E. Hemler.** 1987. Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers. *Nature* 326:607-609
- Tamaoki T., H. Nomoto, Y. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomita.** 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:397-402
- Tanaka Y., S.M. Albelda, K.J. Horgan, et. al.** 1992. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of β 1 integrin-mediated adhesion. *J. Exp. Med.* 176:245-253
- ten Dijke P., P. Hansen, K.K. Iwata, C. Pieler and JG. Foulkes.** 1988. Identification of another member of the transforming growth factor type β gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4715-4719
- ten Dijke P., H. Ichijo, P. Franzén, P. Schulz, J. Saras, H. Toyoshima, C-H. Heldin and K. Miyazono.** 1993. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8: 2879-2887
- Teng D.J., Y.Q. Chen, P.J. Newman, et. al.** 1993. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J. Biol. Chem.* 268: 22833-22894
- Testa U., M. Rosalba, E. Tritarelli, R. Pustorino, G. Mariani, R. Martucci, T. Barberi, A. Camagna, M. Valtieri and Cesare Peschle.** 1993. Transforming growth factor- β potentiates vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *J. Immunol.* 150:2418-2430
- Thompson N.L., K.C. Flanders, J.M. Smith, L.R. Ellingsworth, A.B. Roberts and M.B. Sporn.** 1989. Expression of transforming growth factor- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J. Cell Biol.* 108:661-669
- Torimoto Y., D.M. Rothstein, N.H. Dang, S.F. Schlossman and C. Morimoto.** 1992. CD31, a novel cell surface marker for CD4 cells of suppressor lineage, unaltered by state of activation *J. Immunol.* 148:388-396

- Tsuji T., F. Okada, K. Yamaguchi, and T. Nakamura. 1990. Molecular cloning of the large subunit of transforming growth factor type β masking protein and expression of the mRNA in various rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8835-8839
- Tsunawaki S., M.B. Sporn, A. Ding and C. Nathan. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature* 334:260-262
- Vale W., A. Hsueh, C. Rivier and J. Yu. 1990. The inhibin/activin family of hormones and growth factors. En "Peptide Growth Factors and Their Receptors" Parte 2 (M.B. Sporn and A.B. Roberts eds.)
- van Mourik J.A., O.C. Leeksa, J.H. Reinders, P.G. de Groot and J. Zandbergen-Spaargaren. 1985. Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa. *J. Biol. Chem.* 260:11300-11306
- Van Obberghen-Schilling E., N.S. Roche, K.C. Flanders, M.B. Sporn and A.B. Roberts. 1988. Transforming growth factor β positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.* 263:7741-7746
- Van Straaten F., R. Muller, T. Curran, C. van Beveren and I.M. Verma. 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-oncogene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3183-3187
- Vaporician A.A., H.M. DeLisser, H-C. Yan et. al. 1993. Involvement of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 in Neutrophil Recruitment in vivo. *Science* 262:1580-1582
- Ventura F., J. Doody, F. Liu, J.L. Wrana and J. Massagué. 1994. Reconstitution and transphosphorylation of TGF- β receptor complexes. *EMBO J.* 13:5581-5589
- Vivien D., L. Attisano, J.L. Wrana and J. Massagué. 1995. Signaling activity of homologous and heterologous transforming growth factor-beta receptor kinase complexes. *J. Biol. Chem.* 270: 7134-7141
- Vogt P.K. and T.J. Bos. 1990. *jun*: oncogene and transcription factor. *Advances in cancer research* 55:1-35
- Voraberger G., R. Schafer, and C. Stratowa. 1991. Cloning of the human gene for the intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J. Immunol.* 147:2777-2786
- Wager R.E. and R.K. Assoian. 1990. A phorbol ester-regulated ribonuclease system controlling transforming growth factor β 1 gene expression in hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 10:5983-5590
- Wahl S.M., D.A. Hunt, L.M. Wakefield, N. McCartney-Francis, L.M. Wahl, A.B. Roberts and M.B. Sporn. 1987. Transforming growth factor type β induces monocytes chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5788-5792

- Wahl S.M.**, J.B. Allen, B.S. Weeks, H.L. Wong and P.E. Klotman. 1993. Transforming growth factor β enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4577-4581
- Wahl S.M.** 1994. Transforming growth factor β : The good, the bad, and the ugly. *J. Exp. Med.* 180:1587-1590
- Wakefield L.M.**, D.M. Smith, K.C. Flanders and M.B. Sporn. 1988. Latent transforming growth factor- β from human platelets: A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J. Biol. Chem.* 263:7646-7654
- Wakefield L.M.**, D.M. Smith, T. Masui, C.C. Harris and M.B. Sporn. 1987. Distribution and modulation of the cellular receptor for transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* 105:965-975
- Waltenberger J.**, A. Wanders, B. Fellström, K. Miyazono, C-H. Heldin and K. Funai. 1993. Increasing levels of transforming growth factor- β during cardiac allograft rejection in rats. *J. Immunol.* 151:1147-1157
- Wallick S.C.**, I.S. Figari, R.E. Morris, A.D. Levinson and M.A. Palladino. 1990. Immunoregulatory role of transforming growth factor β (TGF- β) in development of killer cells: Comparison of active and latent TGF- β 1. *J. Exp. Med.* 172:1777-1784
- Wallick S.C.**, L.I. Gold and M.A. Palladino. 1992. Transforming Growth Factor β (TGF- β). En *Encyclopedia of Immunology*, pp. 1498-1502 (I. Roitt and P.J. Delves, eds). *Academic Press*
- Wang D.**, G-h. Zhou, T.M. Birkenmeier, J. Gong, L. Sun and M. Brattain. 1995. Autocrine transforming growth factor β 1 modulates the expression of integrin $\alpha_5\beta_1$ in human colon carcinoma FET cells. *J. Biol. Chem.* 270:14154-14159
- Wang J.M.**, S. Kumar, D. Pye, A.J. Agthoven, J. Krupinski and R.D. Hunter. 1993. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int. J. Cancer* 54:363-370
- Wang X-F.**, H.Y. Lin, E Ng-Eaton, J. Downward, H.F. Lodish and R.A. Weinberg. 1991. Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell* 67:797-805
- Watt S.M.**, J. Williamson, H. Genevier, et. al. 1993. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 82:2649-2663
- Wayner E.A.**, A. García-Pardo, M.J. Humphries, J.A. McDonald and W.G. Carter. 1989. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* 109:1321-1330
- Ways D.K.**, P.P. Cook, C. Webster and P.J. Parker. 1992. Effect of phorbol esters on protein kinase C- ζ . *J. Biol. Chem.* 267:4799-4805

- Westerhausen D.R.**, W.E. Hopkins, J. Billadello. 1991. Multiple transforming growth factor- β -inducible elements regulate expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene in Hep G2 cells. *J. Biol. Chem.* 266:1092-1100
- Westphal J.R.**, H.W. Willems, C.J.M. Schalkwijk, D.J. Ruiter and R.M.W. De Waal. 1993. A new 180 kDa dermal endothelial cell activation antigen: *in vitro* and *in situ* characteristics. *J. Invest. Dermatol.* 100:27-34
- Wharton K.A.**, G.H. Thomsen and W.M. Gelbart. 1991. *Drosophila* 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9214-9218
- Wieser R.**, L. Attisano, J.L. Wrana and J. Massagué. 1993. Signaling activity of transforming growth factor beta type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Mol. Cell. Biol.* 13:7239-7247
- Wieser R.**, J.L. Wrana and J. Massagué. 1995. GS domain mutations that constitutively activate T β R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J.* 14:2199-2208
- Williams A.F.** 1987. A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunology Today* 8:298-303
- Wozney J.M.**, V. Rosen, A.J. Celeste, L.M. Mitsock, M.J. Whitters, R.W. Kriz, R.M. Hewick and E.A. Wang. 1988. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534
- Wrana J.L.**, L. Attisano, J. Cárcamo, A. Zentella, J. Doody, M. Laiho, X-F. Wang and J. Massagué. 1992. TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014
- Wrana J.L.**, H. Tran, L. Attisano, K. Arora, S.L. Childs, J. Massagué and M.B. O'Connor. 1994a. Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol. Cell. Biol.* 14:944-950
- Wrana J.L.**, L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura and J. Massagué. 1994b. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-347
- Xie Y. and W.A. Muller.** 1993. Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5569-5573
- Yamaguchi A.**, T. Katagiri, T. Ikeda, J.M. Wozney, V. Rosen, E.A. Wang, A.J. Kahn, T. Suda and S. Yoshiki. 1991. Recombinant human morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J. Cell Biol.* 113:681-687

- Yamaguchi Y.**, D.M. Mann and E. Ruoslahti. 1990. Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281-284
- Yamakage A.**, K. Kikuchi, E.A. Smith, E.C. LeRoy and M. Trojanowska. 1992. Selective upregulation of platelet-derived growth factor α receptors by transforming growth factor β in scleroderma fibroblasts. *J. Exp. Med.* 175:1227-1234
- Yamashita H.**, H. Ichijo, S. Grimsby, A. Morén, P. ten Dijke and K. Miyazono. 1994. Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 269:1995-2001
- Yamashita H.**, P. ten Dijke, D. Huylebroeck, T.K. Sampath, M. Andries, J.C. Smith, C-H. Heldin and K. Miyazono. 1995. Osteogenic Protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J. Cell Biol.* 130:217-226
- Yang E.Y. and H.L. Moses.** 1990. Transforming growth factor β 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell Biol.* 111: 731-741
- Yasuda Y.**, A. Kishimoto, S. Tanaka, M. Tominaga, A. Sakuna and Y. Nishizuka. 1990. A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:1220-1227
- Yelton D.E.**, C. Desaynard and M.D. Scharff. 1981. Use monoclonal anti-mouse immunoglobulin to detect mouse antibodies. *Hybridoma* 1:5-11
- Zambruno G.**, P.C. Marchisio, A. Marconi, C. Vaschieri, A. Melchiori, A. Giannetti and M. De Luca. 1995. Transforming growth factor- β 1 modulates β 1 and β 5 integrin receptors and induces de novo expression of the α _v β ₆ heterodimer in normal keratinocytes: implications for wound healing. *J. Cell Biol.* 129:853-865
- Zehnder, J.L.**, J. Hirai, M. Shatsky, J.L. McGregor, L.J. Levitt and L.L.K. Leung. 1992. The cell adhesion molecule CD31 is phosphorylated after cell activation. *J. Biol. Chem.* 267:5243-5249.
- Zembala M. and G.L. Asherson (Eds).** 1989. Human Monocytes. *Acad. Press.* pag. 49-58
- Zentella A.**, F.M.B. Weis, D.A. Ralph, M. Laiho and J. Massagué. 1991. Early gene responses to transforming growth factor- β in cells lacking growth-suppressive RB function. *Mol. Cell. Biol.* 11:4952-4958
- Zentella A. and J. Massagué.** 1992. Transforming growth factor β induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5176-5180

8.-ANEXO

La realización de esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Lastres P., T. Bellón, C. Cabañas, F. Sánchez-Madrid, A. Acevedo, Anne Gougos, M. Letarte and C. Bernabeu. 1992. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp containing surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 22:393-397

Bellón T., A. Corbí, P. Lastres, C. Calés, M. Cebrian, S. Vera, S. Cheifetz, J. Massagué, M. Letarte and C. Bernabeu. 1993. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 23:2340-2345

Lastres P., J. Martín-Pérez, C. Langa and C. Bernabeu. 1994. Phosphorylation of the human transforming growth factor- β binding protein endoglin. *Biochem. J.* 301:765-768

Lastres P., N. Almendro, T. Bellón, J.A. López-Guerrero, Ramón Eritja and C. Bernabeu. 1994. Functional regulation of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 by TGF- β 1 in promonocytic U937 cells. *J. Immunol.* 4207-4218

Lastres P., M. Cebrián, C. Langa and C. Bernabeu. 1995. Modulation by specific mAb of CD31-dependent cellular adhesions. *Leukocyte Typing V*, Vol 2 pp. 1262-1263 (Schlossman *et al.* Eds) Oxford University Press

Lastres P., C. Langa and C. Bernabeu. 1995. Studies on endoglin (CD105) transfectants. *Leukocyte Typing V*, Vol 2 pp. 1760-1761 (Schlossman *et al.* Eds) Oxford University Press

Lastres P., A. Letamendia, H. Zhang, C. Rius, N. Almendro, U. Raab, L.A. López, C. Langa, A. Fabra, M. Letarte and C. Bernabeu. 1995. Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. Sometido

Robledo M.M., A. Hidalgo, P. Lastres, A. G. Arroyo, C. Bernabeu, F. Sánchez-Madrid and J. Teixido. 1995. Human Bone marrow stromal cells express endoglin: binding to TGF- β and association with the Type I TGF- β receptor. Sometido