

11281

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

7

**CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS  
DE UNION DE LIGANDO DEL BETAGLICANO**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
PRESENTA: M. EN C. JOSE ESPARZA LOPEZ**

11281



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Fernando López Casillas, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y con el financiamiento a proyectos auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, el International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology y el Howard Hughes Medical Institute.**

Miembros del Jurado:

Dr. Luis Covarrubias Robles

Dr. Jesús Chimal Monroy

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dr. Felix Recillas Targa

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Dra. Ivonne Rosenstein Azoulay

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

*A mis padres*

*Dr. Fernando José Esparza García*

*Y*

*Q.Z. Margarita López Carrasco*

*Mi más sincero agradecimiento al Dr. Fernando López Casillas por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación en el Instituto de Fisiología Celular, así como por todo su apoyo durante la realización del presente trabajo.*

*De igual forma agradezco a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y al Dr. Alejandro García Carranca, miembros de mi comité tutorial, sus valiosos consejos y sugerencias que orientaron el rumbo de este trabajo.*

*Al Dr. José Luis Montiel quien generosamente contribuyó en este trabajo con los experimentos de competencia con el betaglicano soluble.*

*A mis compañeros del laboratorio 202-Oriente del Instituto de Fisiología Celular, con quienes conviví durante muchas horas a diario.*

*A todos ustedes Muchas Gracias*

<b>Indice</b> .....	i
<b>Indice de Figuras y Tablas</b> .....	iii
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
1. La Superfamilia del TGF- $\beta$ .....	3
2. TGF- $\beta$ .....	3
2.1 Actividades biológicas del TGF- $\beta$ .....	3
2.2 Estructura del TGF- $\beta$ .....	5
3. Receptores para el TGF- $\beta$ .....	9
3.1 Receptores tipo I y tipo II para TGF- $\beta$ .....	9
3.2 Señalamiento de TGF- $\beta$ por receptores tipo I y tipo II.....	11
3.3 Proteínas Smad .....	11
4. Receptores tipo III para TGF- $\beta$ .....	17
4.1 Endoglina .....	17
4.2 Betaglicano .....	19
<b>Planteamiento del Problema</b> .....	24
<b>Hipótesis</b> .....	26
<b>Objetivo</b> .....	26
<b>Material y Métodos</b> .....	27
Reactivos.....	27
Cultivos Celulares .....	27
Transfecciones.....	27
Separación de Células por Citometría Magnética (“Magnetic Cell Sorting”).....	28
Construcción de Mutantes del Betaglicano.....	29
Análisis de Células por Citometría de Flujo (FACS).....	30
Ensayo de Inhibición de Crecimiento por TGF- $\beta$ (Incorporación de $^{125}\text{I}$ -deoxiuridina).....	30
Yodinación .....	31
Yodinación de TGF- $\beta$ (Método de Cloramina T).....	31
Yodinación de Inhibina A (Método de Lactoperoxidasa) .....	31
Marcado por Afinidad y Ensayo de Unión .....	32
Marcado por Afinidad de Proteínas en Solución.....	33
Ensayo de Fosforilación de Smad2 por incorporación de $^{32}\text{P}$ .....	33
Ensayo de Fosforilación de Smad2 por <i>Western Blot</i> .....	34
Purificación de las Proteínas Recombinantes $\Delta 10$ y $\Delta 11$ Producidas en Baculovirus .....	35
<b>Resultados</b> .....	36
Existen dos regiones de unión para TGF- $\beta$ en el ectodominio del betaglicano.....	36
Presentación de TGF- $\beta 2$ por las regiones de unión de ligando del betaglicano .....	39

Expresión estable del betaglicano y las mutantes $\Delta 10$ y $\Delta 11$ en células L6E9.....	41
Las clonas de L6E9 transfectadas con el c-myc-betaglicano unen TGF- $\beta$ .....	43
Las células L6E9 que expresan en forma estable al c-myc-betaglicano no responden a TGF- $\beta$ . .....	49
Ensayo de Inhibición de Crecimiento en células L6E9.....	49
Ensayo de Fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ .....	49
Las regiones $\Delta 10$ y $\Delta 11$ unen TGF $\beta 1$ y TGF $\beta 2$ con afinidad relativa similar al betaglicano silvestre.....	51
Presentación de TGF- $\beta 2$ por las mutantes $\Delta 10$ y $\Delta 11$ del betaglicano carentes de epítotope de myc .....	57
Ambas regiones del ectodominio del betaglicano son capaces de promover la fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta 2$ .....	60
La capacidad del betaglicano de unir inhibina A reside en la región U .....	62
<b>Discusión</b> .....	68
Las clonas de células L6E9 que expresan en forma estable al c-myc-betaglicano son refractarias a los efectos de TGF- $\beta$ .....	69
Las regiones de unión de ligando $\Delta 10$ y $\Delta 11$ del ectodominio del betaglicano unen TGF- $\beta$ con una afinidad relativa semejante.....	70
El ectodominio del betaglicano posee un arreglo modular .....	71
La región E posee actividad de presentación de TGF- $\beta$ . Sin embargo, ambas regiones (E y U) pueden potenciar el efecto de TGF- $\beta 2$ .....	72
La capacidad de unir inhibina A radica en la región U. ....	73
El betaglicano, un modular de la actividad de factores de crecimiento.....	73
<b>Conclusiones</b> .....	74
<b>Perspectivas</b> .....	76
<b>Bibliografía</b> .....	77
<b>Apéndice</b> .....	87
Yodinación de TGF- $\beta$ (Método de Cloramina T) .....	87
Ensayo de Unión y Marcado por Afinidad.....	87
Marcado por Afinidad de Proteínas en Solución.....	90
Transfección de Células Eucarióticas por el Método de Fosfato de Calcio.....	91
Transfección de Células Eucarióticas por el Método de DEAE-Dextran.....	92
Citometría de Flujo (FACS).....	93
Citometría Magnética (" <i>Magnetic Cell Sorting</i> ", MACS) .....	94
<b>Ligand Binding and Functional Properties of Betaglycan, a Co-receptor of the Transforming Growth Factor-<math>\beta</math> Superfamily. SPECIALIZED BINDING REGIONS FOR TRANSFORMING GROWTH FACTOR-<math>\beta</math> AND INHIBIN A .....</b>	<b>98</b>



**Indice de Figuras y Tablas**

<b>Figura 1.</b> Miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ y su similitud de secuencia de aminoácidos.....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ .....	7
<b>Figura 3.</b> Esquema de la estructura del factor maduro de TGF- $\beta$ 2 .....	8
<b>Figura 4.</b> Familias de receptores Tipo I y II de TGF- $\beta$ .....	10
<b>Figura 5.</b> Esquema de la estructura de la región citoplásmica del receptor tipo I de TGF- $\beta$ (T $\beta$ R-I) y del dominio MH2 de la Smad2 .....	12
<b>Figura 6.</b> La familia de proteínas Smad.....	13
<b>Figura 7.</b> Vía de transducción de señal del TGF- $\beta$ .....	16
<b>Figura 8.</b> Estructura de betaglicano y endoglina.....	18
<b>Figura 9.</b> Características estructurales del betaglicano .....	20
<b>Figura 10.</b> Efecto del betaglicano sobre la actividad del TGF- $\beta$ .....	22
<b>Figura 11.</b> El betaglicano actúa como corepresor con inhibina y el receptor tipo II de activina (ActR-II) .....	23
<b>Figura 12.</b> Mutantes del betaglicano .....	25
<b>Figura 13.</b> Esquema de las mutantes del betaglicano de rata .....	37
<b>Figura 14.</b> Unión de TGF- $\beta$ por mutantes c-myc-betaglicano.....	38
<b>Figura 15.</b> Presentación de TGF- $\beta$ 2 por mutantes c-myc de betaglicano .....	40
<b>Figura 16.</b> Presentación de TGF- $\beta$ 2 por mutantes c-myc de betaglicano .....	42
<b>Figura 17.</b> Análisis por citometría de flujo de células L6E9 transfectadas con los c-myc-betaglicanos. Enriquecimiento por MACS .....	44
<b>Figura 18.</b> Análisis por citometría de flujo de clones de células L6E9 que expresan el c-myc-betaglicano silvestre y las mutantes c-myc $\Delta$ 10 .....	45
<b>Figura 19.</b> Marcado por afinidad de clones de células L6E9 que expresan los c-myc-betaglicanos (Extracto total). y $\Delta$ 11 .....	47
<b>Figura 20.</b> Marcado por afinidad de clones de células L6E9 que expresan el c-myc-betaglicano. (Extracto inmunoprecipitado) .....	48
<b>Figura 21.</b> Ensayo de inhibición de crecimiento TGF- $\beta$ en células L6E9 .....	50
<b>Figura 22.</b> Fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ en células L6E9 transfectadas con el betaglicano silvestre .....	52

<b>Figura 23.</b> Fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ en células L6E9 transfectadas con el c-myc-betaglicano .....	53
<b>Figura 24.</b> Unión de TGF- $\beta$ por mutantes del betaglicano.....	55
<b>Figura 25.</b> Competencia específica de unión de TGF- $\beta$ en las mutantes de betaglicano.....	56
<b>Figura 26.</b> Competencia específica de unión de TGF- $\beta$ en las mutantes solubles de betaglicano ..	58
<b>Figura 27.</b> Competencia específica de unión de TGF- $\beta$ en las mutantes solubles de betaglicano ..	59
<b>Figura 28.</b> Presentación de TGF- $\beta$ 2 por mutantes de betaglicano.....	61
<b>Figura 29.</b> Las mutantes del betaglicano pueden potenciar el efecto del TGF- $\beta$ 2.....	63
<b>Figura 30.</b> Competencia de unión de ligando de inhibina A en las mutantes de betaglicano.....	66
<b>Figura 31.</b> Competencia de unión de ligando de $^{125}$ I-TGF- $\beta$ 2 por inhibina A en las mutantes de betaglicano.....	67
<b>Tabla I</b> Mutantes de betaglicano y su capacidad de unir inhibina A.....	64

## Resumen

El betaglicano, también conocido como receptor tipo III de TGF- $\beta$ , es un proteoglicano membranal con cadenas de condroitin sulfato y heparano sulfato unidos a un polipéptido de aproximadamente 120 kDa de peso molecular. El betaglicano contiene regiones homologas a otras proteínas. La región amino terminal del ectodominio, al igual que la región transmembranal y la citoplásmica poseen similitud con la endoglina, un receptor tipo III de TGF- $\beta$  en células endoteliales. El resto del ectodominio tiene homología con proteínas de diversa función dentro de las que se encuentran la uromodulina, proteína que es abundante en la orina, a los receptores espermáticos Zp2 y Zp3, y a la GP-2, una de las principales proteínas de secreción de gránulos pancreáticos. El betaglicano une las tres isoformas de TGF- $\beta$  y funciona como un potenciador del efecto de TGF- $\beta$  facilitando su unión al receptor tipo II de TGF- $\beta$ . La función potenciadora del betaglicano es más evidente con TGF- $\beta$ 2, ya que este posee una baja afinidad intrínseca por el receptor tipo II de TGF- $\beta$ . Se han identificado dos regiones de unión de TGF- $\beta$  en el ectodominio del betaglicano, una en el extremo amino terminal, región homóloga a endoglina (E) y otra en el extremo carboxilo, región homóloga a uromodulina (U). Recientemente, se ha descrito que el betaglicano une inhibina A formando un complejo terciario compuesto por el receptor tipo II de activina, inhibina A y betaglicano. Este complejo es el responsable de mediar el efecto antagónico de la inhibina.

El objetivo de este trabajo es determinar las propiedades funcionales de las regiones de unión de TGF- $\beta$  en el ectodominio del betaglicano. Para esto, se utilizó un grupo de mutantes del betaglicano generadas por delección del cDNA que representan en forma individual las regiones E y U. Los datos mostraron que ambas regiones son capaces de unir TGF- $\beta$  con una afinidad relativa semejante al betaglicano silvestre. Sin embargo, solo la región E es capaz de realizar la función presentadora de TGF- $\beta$  al receptor tipo II. En contraste, ambas regiones (E y U) son capaces de potenciar la fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ 2. Por otro lado, la capacidad de unir inhibina A reside exclusivamente en el dominio U. Estos datos sitúan al betaglicano como un importante modulador del acceso de factores de crecimiento de la superfamilia del TGF- $\beta$  a sus receptores de señalamiento.

### Abstract

Betaglycan also known as the TGF- $\beta$  type III receptor, is a membrane-anchored proteoglycan with chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycan chains attached to a core protein of 120 kDa. Betaglycan contains regions of similarity to other proteins. In the amino terminal region as well in the transmembrane and cytoplasmic regions, betaglycan shows amino acid sequence similarity to endoglin. Endoglin is a disulfide-linked homodimeric membrane glycoprotein from endothelial cells that binds TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3, but not TGF- $\beta$ 2. The second half of the betaglycan ectodomain resembles various proteins of diverse function. These proteins include the kidney-derived urinary protein, uromodulin, the sperm receptors Zp2 and Zp3, and the major pancreatic secretory granule membrane protein GP-2. Betaglycan binds all three TGF- $\beta$  forms with high affinity and facilitates TGF- $\beta$  binding to the type II receptor (T $\beta$ RII), forming a betaglycan / TGF- $\beta$  / T $\beta$ RII complex in the process. Several studies have shown the existence of two ligand binding regions in betaglycan, one on the endoglin related region (E domain), and the other one on the uromodulin related region (U domain). The role of betaglycan as a facilitator of TGF- $\beta$  binding to the signalling receptors is most evident with TGF- $\beta$ 2, which has low intrinsic affinity for T $\beta$ RII and is less potent than TGF- $\beta$ 1. Betaglycan interacts with other type II receptor of other TGF- $\beta$  superfamily member. Recently, has been shown that betaglycan binds inhibin A and participates in a ternary complex composed of the activin type II receptor and inhibin. This complex mediates the inhibin antagonism of activin, by routing the activin type II receptor into an inactive complex with betaglycan.

The objective of this work is to functionally characterized the betaglycan ligand binding regions. Similar to the wild type receptor, both ligand-binding domains bind TGF- $\beta$ 2 with higher affinity than TGF- $\beta$ 1. However, only the E-domain increases the TGF- $\beta$ 2 labeling of the TGF- $\beta$  type II receptor and associates with it and TGF- $\beta$ 2 to form the "TGF- $\beta$  presentation complex". Despite this preference, both domains, as well as the wild type receptor, enhance the TGF- $\beta$ 2-dependent Smad2 phosphorylation, indicating that they function indistinguishably as TGF- $\beta$  enhancing co-receptors. On the other hand, the recently described ability of the wild type betaglycan to bind inhibin A, is a property of the core protein that resides in the U-domain. The present results indicate that because of its two independent ligand-binding domains, betaglycan can perform specialized functions as co-receptor of distinct members of the TGF- $\beta$  superfamily

## Introducción

### 1. La superfamilia del TGF- $\beta$

La superfamilia de TGF- $\beta$  es un grupo de moléculas solubles de señalamiento que regulan procesos celulares durante el desarrollo embrionario y el crecimiento [1]. Su nombre que deriva del primer miembro en ser clonado, el factor transformante de crecimiento beta 1 (“*transforming growth factor beta 1*”, TGF- $\beta$ 1). El TGF- $\beta$ 1, es capaz de inhibir la proliferación de diferentes líneas celulares, pero su capacidad transformante descrita originalmente se debe a efectos secundarios sobre la producción de matriz extracelular y la síntesis de otros factores de crecimiento [2]. La superfamilia del TGF- $\beta$  está formada de por lo menos 25 miembros que ejercen diversas actividades [3], especialmente durante el desarrollo embrionario. Algunas de las moléculas de esta superfamilia pueden agruparse en subfamilias debido a su alto grado de homología de secuencia. Un ejemplo de esto es la subfamilia del Dpp formada por el factor decapentaplegico (Dpp) que juega un papel importante durante diferentes etapas del desarrollo de *Drosophila* y dos factores homólogos del gen *dpp* en mamíferos, la proteína morfogénica de hueso 2 y 4 (“*bone morphogenic protein*”, BMP2, BMP4 ) que inducen la formación de hueso y cartilago cuando son implantados bajo piel o en músculo [4]. Estos factores poseen 90% de homología entre ellos y 75% con el Dpp (Figura 1). Las secuencias de BMP4 humana puede rescatar defectos en el desarrollo de eje dorsoventral causado por mutaciones en el gen *dpp* en *Drosophila* [5]. En forma inversa, Dpp induce la formación de cartilago y hueso en mamíferos [6].

### 2. TGF- $\beta$

La familia del TGF- $\beta$  consta de 4 miembros o isoformas, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, presentes en mamíferos y TGF- $\beta$ 5, presente en *Xenopus*. El TGF- $\beta$ 4 descrito en pollo es un homólogo de TGF- $\beta$ 1 de mamíferos [7].

**2.1 Actividades Biológicas del TGF- $\beta$ .** Las actividades biológicas del TGF- $\beta$  son variadas siendo un factor de crecimiento y diferenciación multi-funcional. Este factor es responsable de la regulación de diversos procesos biológicos que abarcan desde procesos tempranos en

	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB5	lahbA	lahbB	nodal	BMP2	BMP4	dpp	BMP5	BMP6	OP1/BMP7	OP2/BMP8	60A	BMP3	Vgl	GDF1	GDF3/Vgr2	dorsalin	laha	MIS	GDF9	GDNF	
TGFB1	100																								
TGFB2	74	100																							
TGFB3	78	82	100																						
TGFB5	82	70	73	100																					
lahbA	36	36	33	35	100																				
lahbB	34	31	33	32	64	100																			
nodal	32	34	32	31	40	40	100																		
BMP2	36	36	38	38	44	43	42	100																	
BMP4	35	35	37	37	42	43	41	92	100																
dpp	37	36	37	37	39	39	42	74	76	100															
BMP5	36	36	38	38	43	40	40	61	59	57	100														
BMP6	37	39	40	39	44	40	42	61	60	59	91	100													
OP1/BMP7	36	39	38	38	43	40	41	60	58	58	88	87	100												
OP2/BMP8	32	37	37	35	41	37	45	55	55	53	74	75	74	100											
60A	39	41	42	38	37	38	40	57	54	54	74	71	69	63	100										
BMP3	32	33	34	32	34	37	42	49	48	44	44	45	43	42	42	100									
Vgl	36	39	40	37	44	39	41	58	56	48	56	58	57	55	51	50	100								
GDF1	38	34	39	36	36	35	37	45	46	42	47	47	48	48	41	43	59	100							
GDF3/Vgr2	36	33	35	36	42	40	40	53	51	48	51	53	51	55	48	42	57	51	100						
dorsalin	31	34	33	33	36	36	42	54	55	54	52	54	50	48	49	39	47	41	46	100					
laha	26	24	25	26	27	23	25	34	24	23	27	27	26	25	27	30	23	26	25	25	100				
MIS	32	30	33	28	25	26	23	30	30	28	32	29	32	29	27	26	32	36	26	29	29	100			
GDF9	26	29	26	26	29	27	31	34	34	33	33	32	31	29	31	30	31	29	32	29	29	24	100		
GDNF	16	21	21	19	18	20	18	18	19	19	21	20	21	23	24	18	18	16	19	20	22	19	21	100	

Figura 1. Miembros de la superfamilia del TGF-β y su similitud de secuencia de aminoácidos. Los diferentes miembros de la superfamilia fueron alineados a partir de la primera cisteína conservada en la región del polipéptido maduro. El grado de identidad por cada par de factores se expresa en porcentaje. Las secuencias comparadas son humanas, excepto: dpp y 60A (*Drosophila*), TGF-β5 y Vgl (*Xenopus*), dorsalin (pollo) y GDF3/Vgr2 (ratón). (Abreviaturas: OP/proteína osteogénica; GDF, *growth differentiation factor*; GDNF, *glial derived neurotrophic factor*; Vgr, gene relacionado con Vg; MIS, *Mullerian inhibiting substance*). Modificado de [3].

el desarrollo embrionario hasta la regulación hormonal de la reproducción. Entre los efectos del TGF- $\beta$  durante el desarrollo embrionario están los asociados con la especialización celular, el control de la proliferación y modulación de la producción de matriz extracelular. Por lo que el TGF- $\beta$  juega un papel primordial en la morfogénesis, reparación de tejidos y patogénesis de ciertos padecimientos fibróticos. El TGF- $\beta$  es también un importante regulador del sistema inmunológico, donde modula la expresión de moléculas de adhesión, sirve como agente quimiotáctico de leucocitos hacia sitios de inflamación y como inhibidor de estos una vez que se encuentran activados [1, 8, 9]. Las tres isoformas de TGF- $\beta$  muestran actividad biológica muy semejante *in vitro*, sin embargo, difieren en su patrones de expresión *in vivo* [10].

La multiplicidad de las isoformas de TGF- $\beta$  y el grado de conservación individual sugiere un importante papel para cada una de las moléculas, como lo demuestran los fenotipos no traslapados de ratones “*knockout*” de cada una de las isoformas de TGF- $\beta$ . El “*knockout*” de TGF- $\beta$ 1 muestra un padecimiento inflamatorio semejante a una autoinmunidad. El “*knockout*” de TGF- $\beta$ 2 muestra mortalidad perinatal y severos defectos en el desarrollo. El “*knockout*” de TGF- $\beta$ 3 posee un paladar hendido y defectos en el desarrollo de pulmones [11-14].

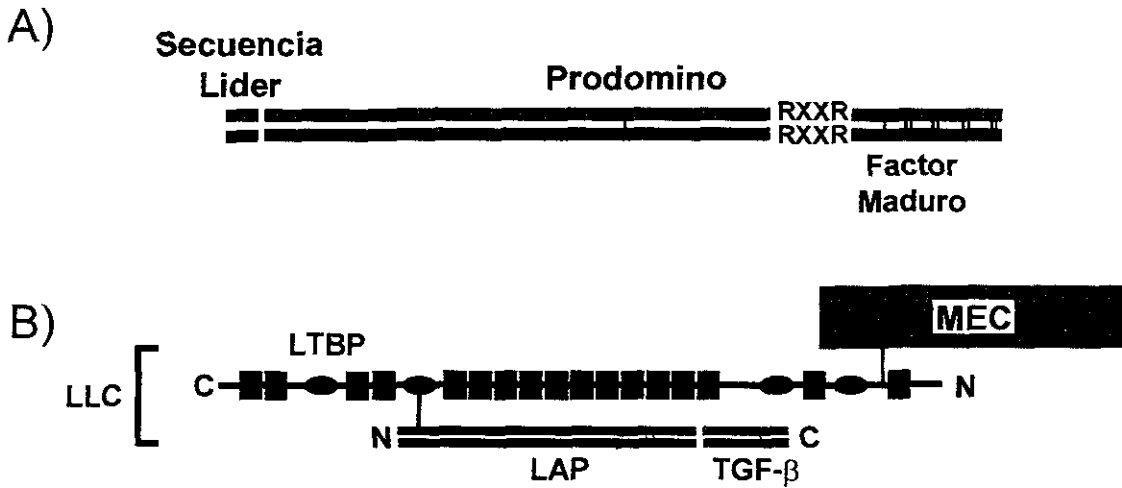
**2.2 Estructura del TGF- $\beta$ .** Todas las isoformas del TGF- $\beta$ , así como los otros miembros de la superfamilia, se sintetizan como moléculas precursoras diméricas formadas por un péptido señal en el extremo amino, y un prodominio de tamaño variable. El prodominio del TGF- $\beta$  está poco conservado entre los miembros de la superfamilia, pero normalmente lo esta entre moléculas de una misma subfamilia. El pro-dominio es necesario para la síntesis y secreción de, al menos, dos miembros de la superfamilia, TGF- $\beta$  y activina [15]. La molécula precursora sufre un corte proteolítico en un sitio dibásico (RXXR) que libera un segmento carboxilo terminal de 110 – 114 amino ácidos que constituye el factor maduro dimérico. Los residuos restantes de la porción amino terminal definen el péptido asociado de latencia (“*latency associated peptide*”, LAP) [7] que permanece unido con el fragmento maduro en forma no covalente produciendo un complejo inactivo [16]. El péptido asociado de latencia LAP se asocia en matriz extracelular a una proteína fibrilar de 125 a 190 kDa, la

LTBP (“*latent TGF- $\beta$  binding protein*”) formando un complejo inactivo de mayor tamaño, conocido como complejo latente mayor (LLC, “*large latent complex*”) (Figura 2). Para la activación completa del TGF- $\beta$  es necesario que el factor maduro se disocie del LAP. La activación del TGF- $\beta$  es un proceso no descrito del todo, que involucra la participación de una proteína de matriz extracelular, la trombospondina-1. El mecanismo de activación de TGF- $\beta$  involucra la unión del precursor latente a la trombospondina-1. El LAP se une por medio de la secuencia LSKL localizada cerca del extremo amino, que interactúa con la secuencia K<sup>412</sup>RFK<sup>415</sup> de la trombospondina-1. La secuencia LSKL del LAP está conservada en todas las isoformas de TGF- $\beta$ . La interacción del LAP con la trombospondina-1 a través de LSKL y KRFK es importante para la activación ya que péptidos con las secuencias LSKL pueden inhibir completamente la activación de TGF- $\beta$ . La interacción del LAP con la trombospondina-1 previene la reformación de complejos LAP-TGF- $\beta$  inactivos. Se ha propuesto que la interacción trombospondina-1-precursor latente genera un rearrreglo conformacional del LAP que permite la activación del TGF- $\beta$  [17-19].

La región que corresponde al factor maduro posee mayor similitud entre isoformas de TGF- $\beta$ ; el TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 comparten 80 residuos idénticos (~72%), TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 86 residuos (~77%), y entre el TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 es de 89 residuos (~80%) (Figura 1). Un aspecto de homología importante es la conservación de las 9 cisteínas presentes en las formas maduras. La estructura cristalina del TGF- $\beta$ 2 [20] reveló que seis de estas cisteínas forman una estructura central rígida conocida como nudo de cistinas (Figura 3). El nudo de cistinas consiste de un anillo de 4 cisteínas unidas por dos puentes disulfuro, con un tercero que cruza por el centro del anillo. El nudo mantiene unidas varias hojas  $\beta$  por la base, lo que probablemente contribuye a la alta resistencia de muchos miembros de la superfamilia a la exposición a calor, desnaturalizantes y pH extremo. El residuo de cisteína restante forma un enlace adicional que mantiene unidos a los monómeros como dímeros. Esta cisteína está ausente en dos miembros de la superfamilia GDF-3 y GDF-9 donde la forma dimerica se mantiene por interacciones hidrofóbicas entre los monómeros [21].

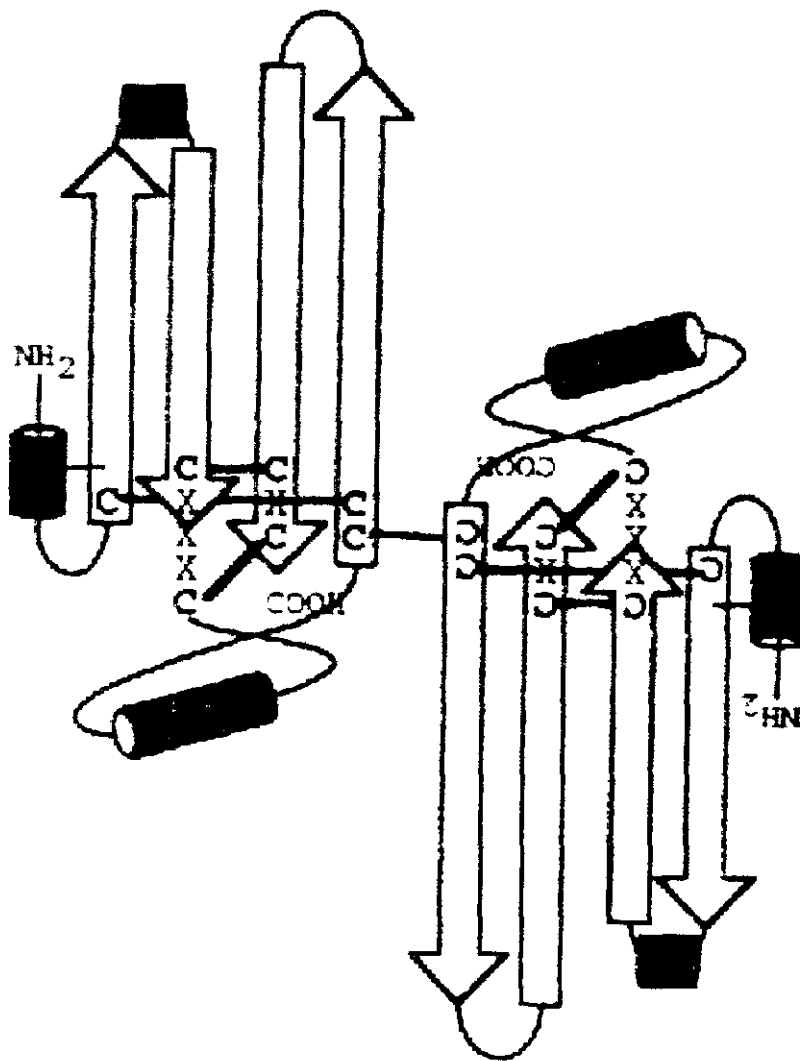
El análisis de la estructura cristalina de otras moléculas como el factor de crecimiento neuronal (“*neural growth factor*”, NGF) o el factor de crecimiento derivado de plaqueta





**Figura 2. Estructura de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ .** (A) Las proteínas relacionadas a TGF- $\beta$  son sintetizadas como grandes proteínas precursoras. El precursor posee una secuencia líder que lo dirige hacia la vía de secreción y un prodominio, que es necesario para el plegamiento, dimerización y regulación de la actividad del factor. La molécula de señalamiento (factor maduro) es un dímero formado por el extremo carboxilo terminal, que posee siete residuos de cisteínas prácticamente invariables en varios miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Se muestra la secuencia RXXR que es el sitio de corte para liberar al factor maduro del prodominio. La región amino restante constituye el LAP ("latency associated peptide").

(B) El TGF- $\beta$  se encuentra asociado a un complejo grande de latencia (LLC, "large latency complex") compuesto por la proteína LTBP ("latent TGF- $\beta$  binding protein") y por el LAP. El LAP y el LTBP se mantienen asociados entre sí y a la matriz extracelular (MEC) por medio de puentes disulfuro (|). El LAP y el factor maduro (TGF- $\beta$ ) tienen una estructura dimerica y se asocian de manera no covalente. La LTBP es una proteína fibrilar con dominios repetidos tipo EGF (■) y otros que contienen ocho cisteínas (●). Los extremos amino (N) y carboxilo (C) de LTBP y TGF- $\beta$  están indicados. Modificado de [3] y [17].



**Figura 3. Esquema de la estructura del factor maduro de TGF- $\beta$ 2.** Seis de los siete residuos de cisteína característicos forman tres puentes disulfuro intracadena. La séptima cisteína forma un puente disulfuro que mantiene unido el dímero (3,11). Modificado de [3].

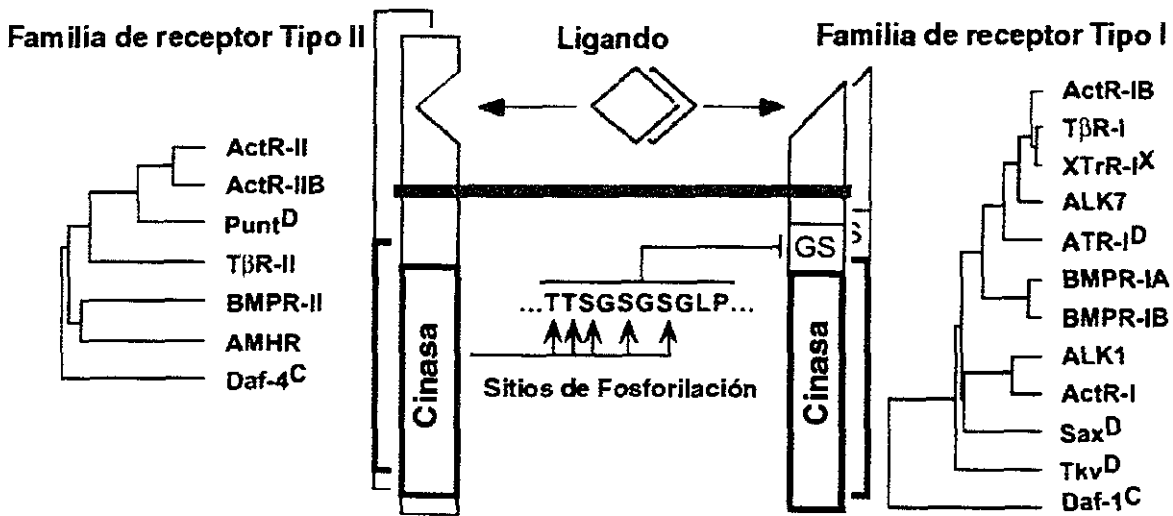
("neural growth factor", NGF) o el factor de crecimiento derivado de plaqueta ("platelet derived growth factor", PDGF-BB), mostró un arreglo estructural similar al TGF- $\beta$ , incluyendo el nudo de cistinas [22, 23]. La similitud en estructura de estos factores de crecimiento sugiere que posiblemente provengan de un antecesor común.

### 3. Receptores para el TGF- $\beta$

La mayoría de las células expresan en su membrana receptores para el TGF- $\beta$ . Estos pueden dividirse en aquellos que están relacionados con señalamiento; receptores tipo I y tipo II [24, 25]; y aquellos que actúan como reguladores del acceso del TGF- $\beta$  a los receptores de transducción de señal como el betaglicano y la endogлина [26, 27].

**3. 3.1 Receptores tipo I y tipo II para TGF- $\beta$ .** El receptor tipo I (T $\beta$ R-I) es una proteína transmembranal de 53 kDa con actividad de cinasa de serina/treonina, que requiere la presencia del receptor tipo II para unir TGF- $\beta$  [24, 28]. Una característica única de los receptores tipo I es una región conservada de 29 amino ácidos localizada justo en el extremo amino terminal del dominio de la cinasa (Figura 4). Esta región es llamada dominio GS ya que contiene una secuencia característica de SGSGSG [29]. El dominio GS es el blanco de la cinasa del receptor tipo II. La fosforilación en el dominio GS resulta en la activación de la cinasa del receptor tipo I [30]. Inmediatamente después de la secuencia SGSGSG, todos los receptores tipo I poseen una secuencia consenso de Leu-Pro que sirve de sitio de unión para el factor FKBP12. Este factor actúa como un regulador negativo de la señalización del receptor [31]. Los penúltimos amino ácidos en el dominio GS son siempre residuos de treonina o glutamina. La mutación a aspártico o glutámico origina una elevada actividad de cinasa *in vitro*, y un señalamiento constitutivo en la célula [32]. Por lo tanto, el dominio GS es una región clave que controla la actividad catalítica del receptor tipo I.

El receptor tipo II (T $\beta$ R-II) es una proteína transmembranal de 70-85 kDa con actividad de cinasa de serina/treonina, que une TGF- $\beta$  [33], pero requiere del receptor tipo I para el señalamiento [24]. La actividad de cinasa del receptor tipo II es constitutivamente activa y requiere la fosforilación en el residuo de Ser213 (localizada fuera del dominio de cinasa) para mediar su efecto autocatalítico.

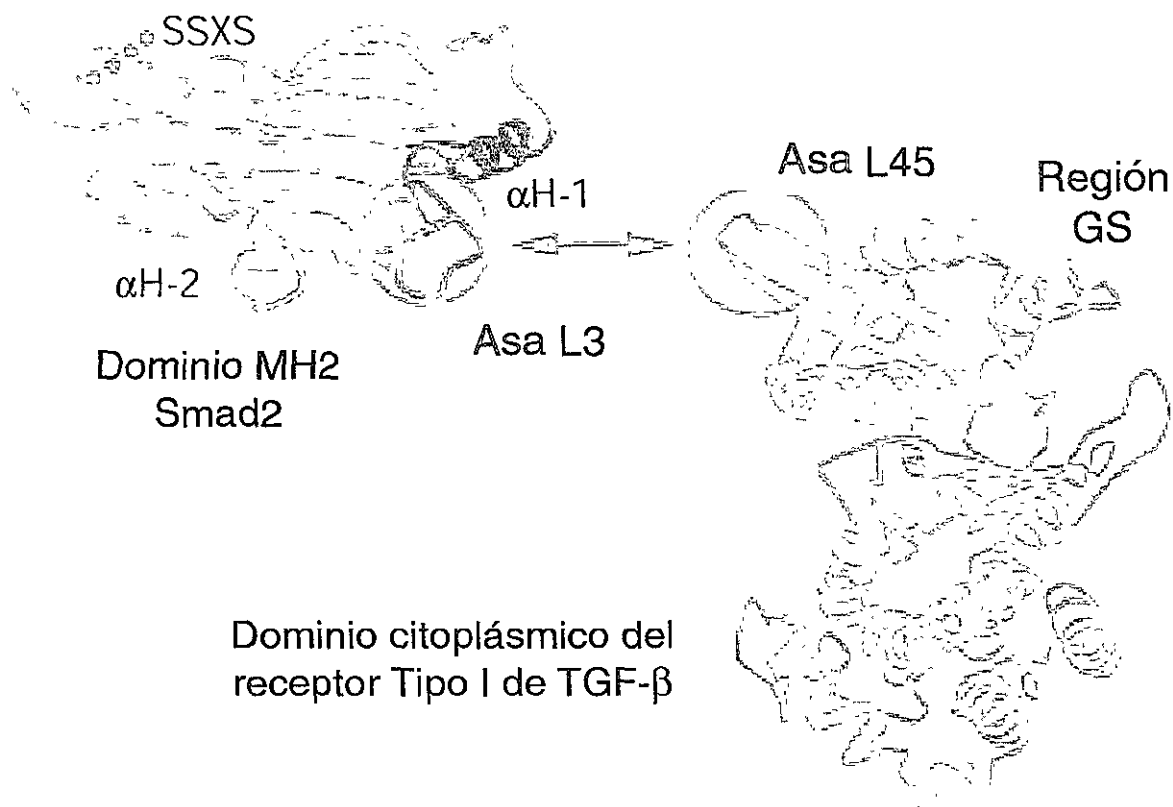


**Figura 4. Familias de receptores Tipo I y II de TGF-β.** En los receptores tipo I el dominio de la cinasa es precedido por el dominio GS (GS), se muestra la secuencia consenso característica de TβR-I indicando los sitios de fosforilación. Los receptores enlistados son de vertebrados excepto los indicados: D, *Drosophila*; C, *Caenorhabditis elegans*; X, *Xenopus*. Los dendogramas muestran el grado relativo de similitud de secuencia de amino ácidos en el dominio de la cinasa de los receptores. Modificado de [25].

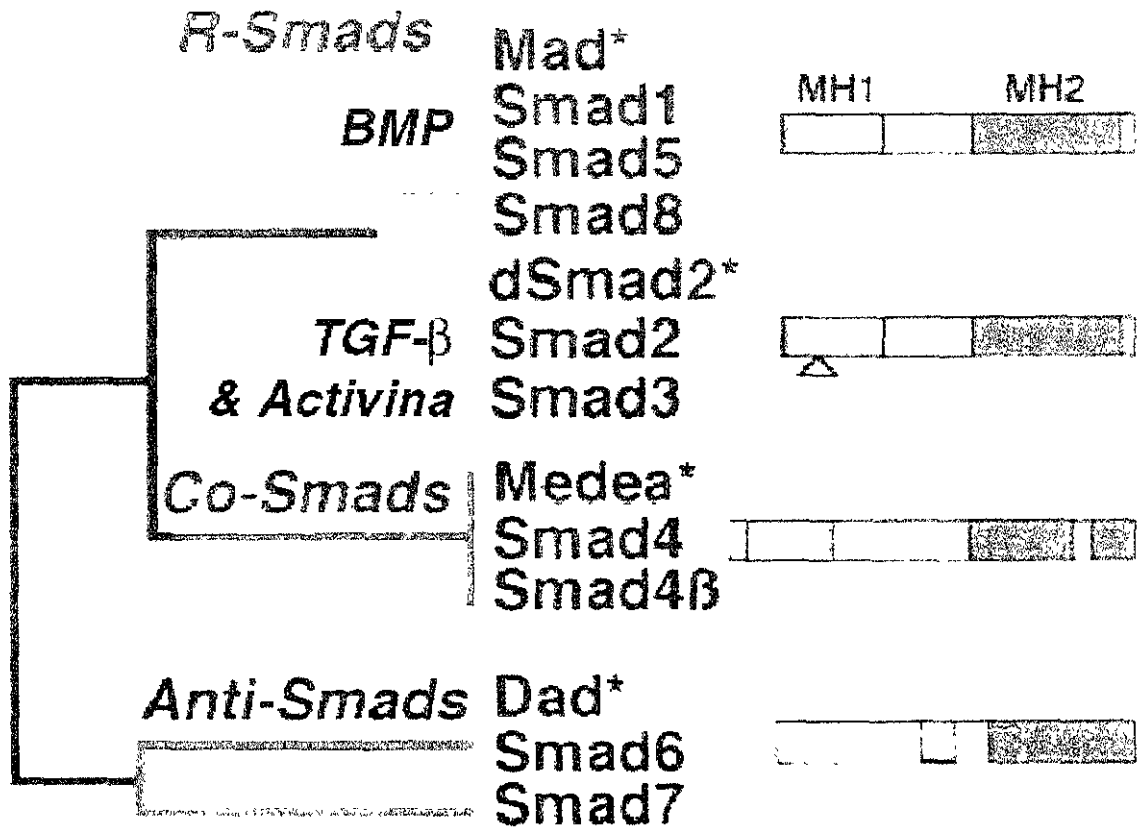
La autofosforilación dependiente de la dimerización del receptor tipo II regula diferencialmente su actividad. La fosforilación en el residuo de Ser409 estimula la capacidad del receptor tipo II de fosforilar al receptor tipo I. En cambio, la fosforilación en el residuo de Ser416 impide su autofosforilación, así como también la fosforilación del receptor tipo I ya que inhibe la actividad de cinasa del receptor tipo II [34]. La participación de estos sitios de fosforilación en la regulación de la actividad del receptor no ha sido elucidada aún.

**3.2 Señalamiento de TGF- $\beta$  por receptores tipo I y tipo II.** Los receptores tipo I y II poseen afinidad intrínseca entre ellos, pero la asociación en condiciones fisiológicas sólo se lleva a cabo en presencia del ligando. Ambos receptores pueden distinguir entre diferentes isoformas de TGF- $\beta$ , uniendo mejor TGF- $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 que TGF- $\beta$ 2. El señalamiento de TGF- $\beta$  inicia por la formación de un heterotetrámero de receptor I y II estabilizado por la molécula de TGF- $\beta$  que actúa como un adaptador [35]. Gracias a la proximidad de los receptores en el heterotetrámero, la cinasa constitutiva del receptor tipo II fosforila la región rica en residuos de serina en el dominio GS de la porción citoplasmática del receptor tipo I (Figura 5). Esto resulta en la activación de la cinasa del receptor tipo I, la cual actúa sobre las proteínas Smad, que sirven como segundos mensajeros en la vía de señalamiento del TGF- $\beta$  [36, 37].

**3.2.1 Proteínas Smad.** Las proteínas Smad fueron identificadas primeramente en estudios genéticos en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*. El miembro fundador “*Mothers against dpp*” (Mad) [38, 39] se aisló en búsquedas genéticas de potenciadores de un débil fenotipo materno de un alelo de *dpp*. Subsecuentemente, tres homólogos de *Mad*, *Sma-2*, *Sma-3* y *Sma-4* se aislaron en *C. elegans* buscando genes cuyas mutaciones causaran el mismo fenotipo de cuerpo pequeño observado en la mutante *Daf4* (un receptor tipo II con cinasa de serina/treonina) [40]. En mamíferos, se han identificado ocho proteínas diferentes relacionadas a *Sma* o a *Mad* denominadas Smads [41] (Figura 6). Las proteínas Smads funcionan como transductores de señal para los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  en



**Figura 5.** Esquema de la estructura de la región citoplásmica del receptor tipo I de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-I) y del dominio MH2 de la Smad2. En el estado basal, el T $\beta$ R-I se mantiene inactivo ya que la región GS presiona contra el dominio de cinasa dislocando el centro catalítico. La fosforilación en la región GS por el T $\beta$ R-II activa la cinasa del T $\beta$ R-I, permitiendo que este fosforile la proteína Smad en la secuencia SSXS del extremo carboxilo terminal. La especificidad del reconocimiento entre el receptor de TGF- $\beta$  y la R-Smad esta determinado por la secuencia del asa L45 dominio de cinasa del receptor y la secuencia del asa L3 en el dominio MH2 de la Smad. El asa L3 es una secuencia corta conservada que difiere en tan solo dos amino ácidos entre el subgrupo de Smad1,5,8 y el subgrupo de Smad2,3, diferencia suficiente para la discriminación por el T $\beta$ R-I (35, 36). Modificado de [53].



**Figura 6. La familia de proteínas Smad.** Dendrograma de similitud de secuencias entre las tres subfamilias de proteínas Smad. Las R-Smads y las Co-Smads poseen dominios conservados amino terminal (MH1) y carboxilo terminal (MH2), separados por una región divergente llamada región de unión. En las anti-Smads, sólo el dominio MH2 esta conservado pero carecen de secuencia consenso de fosforilación. El cuadro verde representa el sitio de fosforilación de las R-Smads en el dominio MH2, el triángulo indica el sitio de inserción de un procesamiento alternativo del mRNA de la Smad2. Los asteriscos (\*) indican los miembros representativos en *Drosophila*. Modificado de [41].

organismos que abarcan desde nemátodos hasta humanos [25, 42, 43].

Las proteínas Smad que interactúan directamente con el receptor tipo I se conocen genéricamente como Smads fosforiladas por receptor (R-Smads). En vertebrados, el receptor tipo I de BMP, el receptor de factor de crecimiento y diferenciación ("*growth and differentiation factors*", *GDFs*), y el receptor de "*anti-Müllerian hormone/Müllerian inhibiting substance*" (*AMH/MIS*) señalizan a través de Smad1, Smad5 o Smad8 que están relacionadas. Por otro lado, los receptores tipo I para TGF- $\beta$ , activina y nodal (dos factores de crecimiento miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ ), lo hacen a través de Smad2 y Smad3.

Las R-Smads consisten de dos dominios conservados que forman estructuras globulares separadas por una región de unión ("*linker region*"). El dominio amino terminal MH1 ("*Mad Homology 1*") posee la función de unión a DNA, mientras que en el dominio carboxilo terminal MH2 se encuentra la región de translocación a núcleo. Además el dominio MH2 interviene en la regulación de la transcripción de genes. La fosforilación por receptor tipo I de la secuencia SSxS en el dominio MH2 libera la interacción inhibitoria entre estos dominios permitiendo la activación de la Smad (Figura 5).

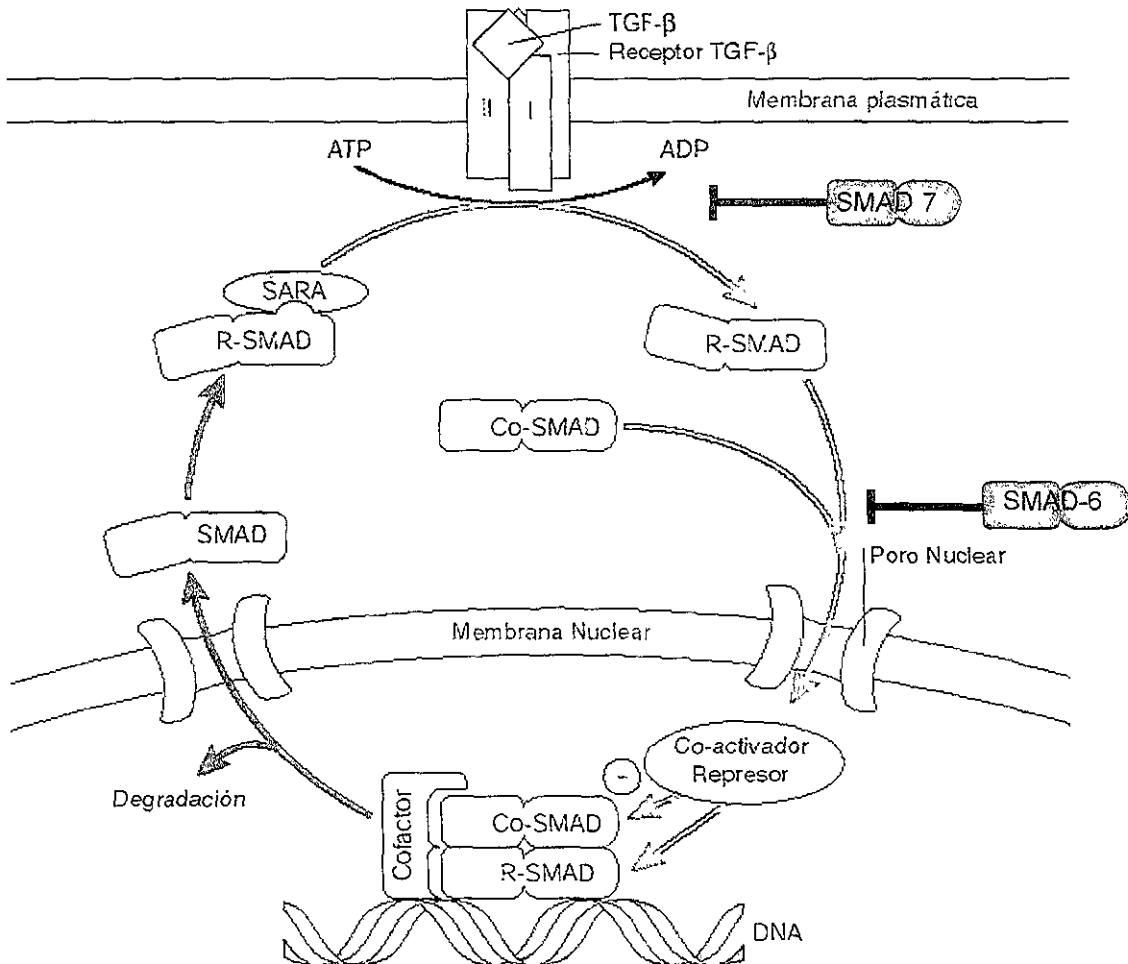
La interacción entre el receptor tipo I y R-Smad se lleva a cabo por un módulo formado por el asa L45 del receptor tipo I y el asa L3 del dominio MH2 de Smad. El asa L45 es idéntico en secuencia entre los subgrupos de TGF- $\beta$  y BMP, difiriendo sólo por tres amino ácidos. Del mismo modo, el asa L3 difiere sólo por 2 amino ácidos entre Smad1 y Smad2. Estas diferencias son suficientes para aumentar la discriminación en interacciones receptor I-Smad [44-47] (ver Figura 4). La fosforilación de R-Smad por receptor tipo I en residuos de serina en el extremo carboxilo terminal incrementa su afinidad por un miembro particular de la familia de Smads, la Co-Smad. Las Co-Smads descritas en vertebrados son Smad4 (en humanos conocida como *DPC4*, "*deleted in pancreatic carcinoma locus 4*" [48, 49] ) y Smad4 $\beta$  (Smad4 $\beta$ , conocida también como Smad10, descrita sólo en *Xenopus* [50] ), y el homólogo en *Drosophila*, que es Medea [51, 52].

Smad4 funciona asociada a la forma fosforilada de R-Smad. La Smad4 se requiere para ensamblar el complejo transcripcional activo que migra a núcleo. Ya en núcleo, R-Smad-Smad4 recluta coactivadores transcripcionales como p300 y CBP ("*CREB-binding protein*"; donde *CREB* significa "*cyclic AMP-regulated enhancer-binding protein*").



En el estado basal las proteínas Smad son retenidas en el citoplasma, en el caso de Smad2, la retención es mediada por SARA ("*Smad anchor for receptor activation*", SARA). Además de limitar el movimiento de Smads, el contacto con SARA bloquea la región de translocación a núcleo de Smad2 [50]. La fosforilación por el receptor tipo I no solo incrementa la afinidad de Smad2 por Smad4, sino que también disminuye su afinidad por SARA, liberando Smad2 y exponiendo la región de translocación a núcleo, lo que origina una rápida acumulación de Smad2 en el núcleo [53].(Figura 7).

Existe un tipo de Smads que son inhibidores de la transducción de señal de TGF- $\beta$ , Smad6 y Smad7 en mamíferos, y Dad en *Drosophila*. Smad7 murina inhibe la fosforilación dependiente de receptor tipo I de Smad2 y Smad3 [54-56], la fosforilación dependiente de BMPR-IA y BMPR-IB de Smad1 y Smad5 y la fosforilación de Smad1 por el receptor tipo I de activina (ActR-I) [56]. Por lo tanto, Smad7 es un inhibidor común de R-Smads. Smad6 ha sido implicada en la inhibición del señalamiento de TGF- $\beta$ , sin embargo, parece que su papel inhibitorio es más relevante en la vía de BMP [57]. El mecanismo de acción de las anti-Smads está bien conservado en la superfamilia del TGF- $\beta$ ; se ha demostrado que Dad, un inhibidor de Smad inducible por Dpp, interacciona con Tkv (un receptor tipo I en *Drosophila* para Dpp) lo que previene la unión y fosforilación de Mad por Tkv. Estructuralmente, el dominio amino terminal (MH1) de las anti-Smads es sumamente diverso y posee poca homología con otras Smads. El dominio carboxilo terminal (MH2) es homólogo a RSmads y Co-Smads, sin embargo, las anti-Smads carecen de la secuencia consenso de fosforilación SSXS. Esto les permite asociarse en forma estable al receptor tipo I, interfiriendo con la unión al receptor y activación de R-Smads. La fosforilación del receptor tipo I por el receptor tipo II es necesaria para la asociación de la anti-Smad [55] lo que es suficiente para que el dominio MH2 de la anti-Smad exhiba su efecto inhibitorio [56]. Smad6 puede inhibir por un mecanismo alternativo que involucra la asociación de Smad6 con Smad1 fosforilada, compitiendo con Smad4 por la heteromerización [57]. La expresión de anti-Smads se induce rápidamente por la estimulación con miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  por lo que constituye un mecanismo autoinhibidor en el señalamiento de TGF- $\beta$  [58, 59].



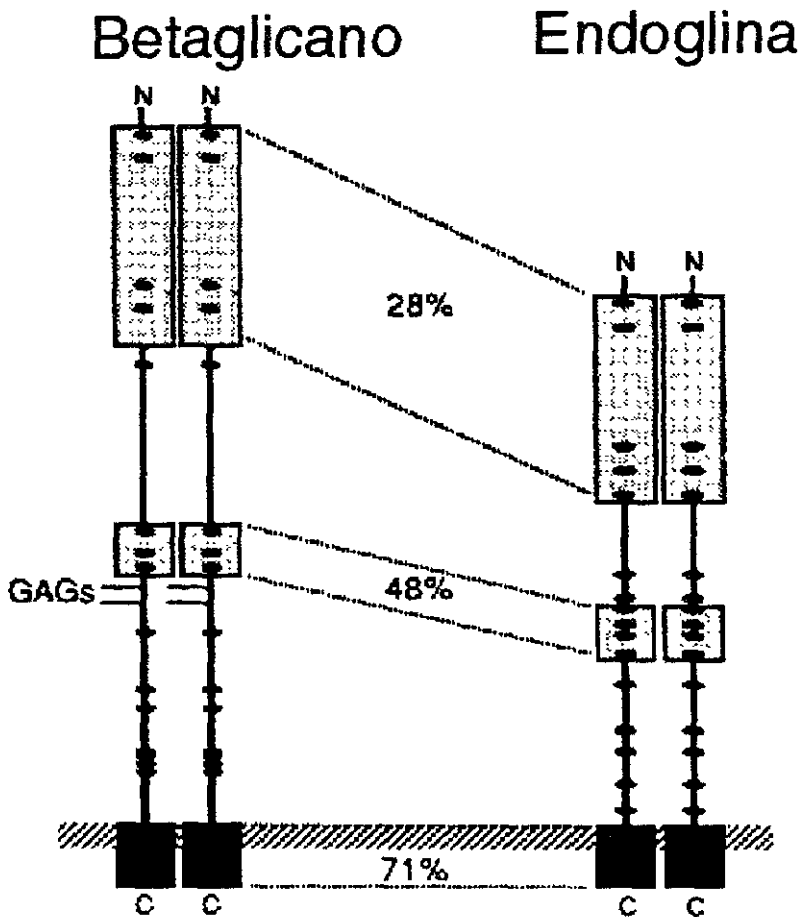
**Figura 7. Vía de transducción de señal del TGF- $\beta$ .** Las R-Smads requieren ser fosforiladas por efecto del TGF- $\beta$  para formar complejos transcripcionales con Co-Smads. Las R-Smads pueden entrar o salir del núcleo por sí mismas, sin embargo, para ser accesibles a los receptores de señalamiento son conducidas a la membrana por proteínas como SARA (SMAD anchor for receptor activation). La activación de los receptores ocurre cuando el TGF- $\beta$  induce la asociación de los receptores tipo I y II. Después que el T $\beta$ R-II ha transfosforilado en la región GS al T $\beta$ R-I, éste puede catalizar la fosforilación de R-Smads. La fosforilación disminuye la afinidad por SARA y aumenta la afinidad por Co-Smads. El complejo resultante es libre de viajar a núcleo y capaz de asociarse con coactivadores transcripcionales o corepresores. Las Smads pueden unirse a DNA, pero la unión efectiva a secuencias reguladoras de un gene se logra por cofactores específicos de unión a DNA. Las R-Smads pueden regresar a citoplasma, pero su degradación intranuclear provee una forma de regular respuestas a TGF- $\beta$ . Las anti-Smad actúan a diferente nivel. Smad7 actúa como un señuelo de R-Smad que compite por la cinasa activada de T $\beta$ R-I. Smad6 actúa como un señuelo de Co-Smad, compitiendo por R-Smads activadas vía BMP. Modificado de [53].

#### 4. Receptores tipo III para TGF- $\beta$

La búsqueda por marcado por afinidad y entrecruzamiento de moléculas en la superficie celular con capacidad de unir TGF- $\beta$ , reveló la existencia de proteínas que fueron clasificadas de acuerdo a su peso molecular como Tipo I, Tipo II (mencionados arriba) y Tipo III [60]. Los receptores tipo III detectados resultaron ser dos proteínas relacionadas, endoglina o betaglicano [26, 27]. Los receptores tipo III son correceptores, ya que no se encuentran relacionados directamente con la transducción de señal y son más abundantes que los correspondientes receptores de señalamiento.

##### 4.1 Endoglina

La endoglina (CD105), es una glicoproteína homodimérica de superficie de 180 kDa que se expresa abundantemente en células endoteliales y en menor grado en monocitos, precursores eritroides, células estromales y otros tipos celulares [26, 61, 62]. Se han descrito dos isoformas de endoglina generadas por procesamiento alternativo de RNA: la L-endoglina y la S-endoglina. La L-endoglina es una molécula de 658 residuos que posee 47 amino ácidos en la región citoplasmática y es la más abundante. La S-endoglina es una molécula de 626 residuos que posee sólo 14 amino ácidos en la región citoplasmática, de los cuales 7 residuos próximos a la región transmembranal son comunes en ambas isoformas (Figura 8). Ambas formas de endoglina son dímeros estabilizados por un puente disulfuro intercadena [63]. El gen que codifica para la endoglina, ha sido identificado como el blanco del desorden vascular conocido como telangiectasia hemorrágica tipo I ("*hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1*", HHT1 [64, 65]). HHT1 es una displasia vascular autosómica dominante asociada con epistaxis frecuente, sangrado gastrointestinal, telangiectasias y malformaciones arteriovenosas en cerebro, pulmón e hígado [66]. Las mutaciones en el gen de *endoglina* y *ALK1* (un receptor tipo I que une TGF- $\beta$  [67]) originan desórdenes hemorrágicos semejantes en humanos [68, 69]. Esto hace suponer que endoglina y ALK1 pueden estar compartiendo la misma vía de señalamiento, donde endoglina facilita la unión de ligando a ALK1. Existe la posibilidad de que dado la baja capacidad de unión de TGF- $\beta$  de ambos receptores, el ligando común de endoglina y ALK1 puede no haber sido identificado aún [25].



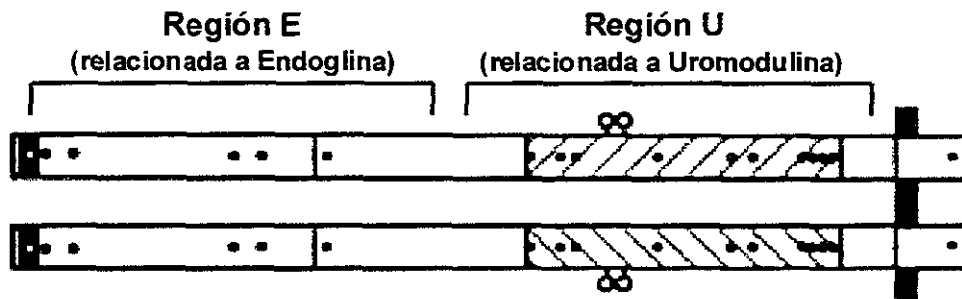
**Figura 8. Estructura de betaglicano y endoglina.** Esquema de las regiones de mayor similitud entre la secuencia del betaglicano (853 aa) y la endoglina (633aa). La región de mayor similitud corresponde a la región transmembrana y citoplásmica (cuadros negros). Existen dos regiones de menor similitud situadas en el ectodominio de las proteínas (cuadros claros). Los números indican el porcentaje de similitud de secuencia de amino ácidos entre las regiones del betaglicano y la endoglina. Los ovalos cerrados indican la posición de los residuos de cisteínas. Se indican también los sitios de anclaje de las cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) en el betaglicano. Modificado de [70].

Estudios de marcado por afinidad y entrecruzamiento mostraron que la endoglina une TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 con alta afinidad ( $K_D = 50$  pM), pero no une TGF- $\beta$ 2 [70]. Estos estudios definieron a la endoglina como un componente del sistema de receptores de TGF- $\beta$ . Sin embargo, estudios recientes mostraron que la endoglina no sólo interactúa con el TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3, también lo hace con activina-A y BMP-7, pero requiere de la coexpresión del receptor tipo II correspondiente para interactuar con el ligando (ActRII y ActRIIB). Además, la endoglina une BMP2 en presencia del receptor tipo I ALK3 o ALK6. Esto indica que la endoglina, a diferencia del betaglicano, no puede unir ligando por sí misma, no favorece la unión a los receptores de señalamiento, y mimetiza la especificidad del receptor con el que interacciona. Esto explica la afinidad de la endoglina para las isoformas de TGF- $\beta$ , la cual depende de la especificidad del receptor tipo II de TGF- $\beta$ . La endoglina forma complejos con los receptores T $\beta$ RII, ActRII y ActRIIB<sub>2</sub> aun en ausencia de ligando, sin importar el de receptor tipo I que se coexpresa. La endoglina no interfiere con la formación del complejo de señalamiento, y puede coimmunoprecipitarse con estos complejos [71]. Por lo tanto, la endoglina es un coreceptor que interacciona con múltiples complejos heteroméricos de receptores que contienen TGF- $\beta$ s, activinas y BMPs. Sin embargo, el significado fisiológico de esto se desconoce.

#### 4.2 Betaglicano

El betaglicano es un proteoglicano membranal de 250-350 kDa muy distribuido en varios tipos celulares tanto de mamíferos como de aves. Es abundante en tejido fetal, sugiriendo un papel en el desarrollo embrionario [72]. El betaglicano es un dímero, que a diferencia de la endoglina, no está estabilizado por un puente disulfuro. Sus cadenas de glicosaminoglicanos consisten generalmente de condroitin sulfato y heparan sulfato unidos a un polipéptido de aproximadamente 120 kDa. Las cadenas de glicosaminoglicanos no son necesarias para la expresión del betaglicano en la superficie celular, ni para la unión de TGF- $\beta$  [27]. La región transmembranal es seguida de la cola citoplasmática de 43 aminoácidos, rica en serinas y treoninas, cuya secuencia no presenta homología con algún motivo estructural prototípico de proteínas de señalamiento. El betaglicano contiene regiones de alta homología con proteínas de función diversa. La región amino terminal del ectodominio, al igual que la región transmembranal y la citoplásmica poseen un 28% y

71% de similitud respectivamente con la endoglina. El resto de la porción extracelular tiene homología con proteínas de diversa función dentro de las que se encuentran la uromodulina, los receptores Zp2 y Zp3, y la GP-2. La uromodulina es una proteína abundante en la orina. Las moléculas Zp2 y Zp3 son receptores espermáticos. La GP-2 es una de las principales proteínas de secreción de gránulos pancreáticos. La región carboxilo terminal del ectodominio contiene dos residuos de serina (Ser535 y Ser546) donde se unen las cadenas de glicosaminoglicanos a la proteína medular [73] (Figura 9).



**Figura 9. Características estructurales del betaglicano.** La proteína medular del betaglicano de rata es un polipéptido de 853 amino ácidos. Se muestra: la posición del péptido líder (caja negra), la región con similitud a endoglina (cajas grises) y uromodulina (caja cruzada) del ectodominio, los sitios de anclaje de las cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) (círculos abiertos) y la posición de las cisteínas (círculos negros).

El betaglicano une las tres isoformas de TGF- $\beta$  [60, 74] y facilita la unión de TGF- $\beta$  al receptor tipo II [75, 76], formando un complejo betaglicano / TGF- $\beta$  / T $\beta$ R-II en el proceso [76, 77]. El papel del betaglicano como facilitador de la unión de TGF- $\beta$  a los receptores de señalamiento es más evidente con TGF- $\beta$ 2. Al igual que TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3, el TGF- $\beta$ 2 señala a través de los receptores T $\beta$ R-I y T $\beta$ R-II. Sin embargo, el TGF- $\beta$ 2 tiene una baja afinidad intrínseca por el T $\beta$ R-II [78] y es menos potente que TGF- $\beta$ 1 en células progenitoras hematopoyéticas [79], mioblastos [76] y células endoteliales [78] que carecen de betaglicano. La transfección del betaglicano aumenta la unión y actividad de TGF- $\beta$ 2 en estas células [76, 80]. Esta propiedad del betaglicano silvestre de membrana de incrementar la unión de  $^{125}$ I-TGF- $\beta$ 2 al receptor tipo II de TGF- $\beta$  se conoce como función de presentación de ligando, y esta relacionada con el aumento de potencia del TGF- $\beta$ 2 en presencia del betaglicano [76].

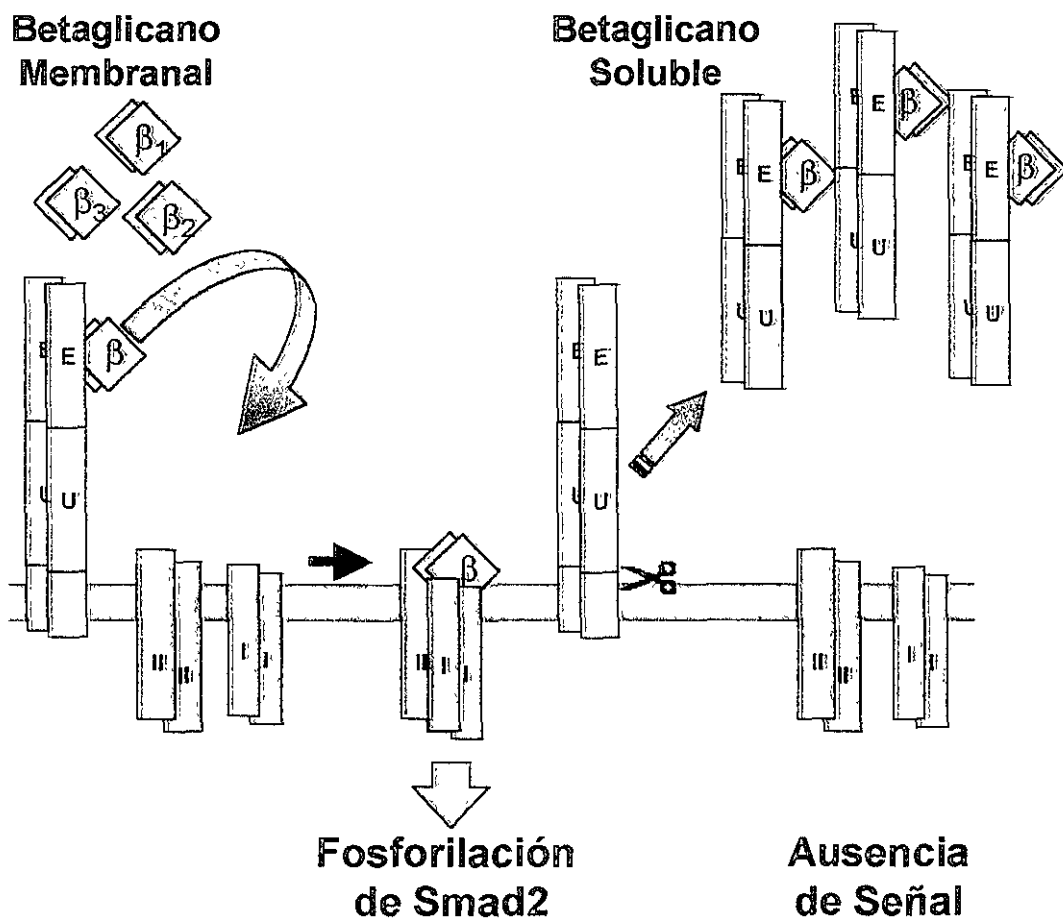
La capacidad del betaglicano de equipotenciar las tres isoformas de TGF- $\beta$  plantea la posibilidad de que la molécula no solo sirva como un concentrador de ligando en la superficie celular, sino que también pueda estabilizar al TGF- $\beta$  en una conformación óptima para unirse a los receptores de señalamiento [25].

El betaglicano puede tener un papel opuesto, funcionando como un inhibidor del acceso del TGF- $\beta$  a los receptores de señalamiento. Existe una forma soluble del betaglicano que se genera por acción de una proteasa endógena. Este proceso ocurre *in vivo* por lo que se encuentra betaglicano soluble en suero [81], sin embargo, se desconoce los mecanismos que participan en su generación y regulación. Cuando el betaglicano se expresa en forma soluble, como una proteína recombinante, secuestra al TGF- $\beta$  y actúa como un potente antagonista del factor *in vitro* [82] (Figura 10).

El betaglicano carece de una secuencia consenso de señalamiento en su porción citoplásmica. Existe evidencia de que el betaglicano se requiere para la transición epitelio-mesenquimal dependiente de TGF- $\beta$ 2 durante la formación de las válvulas del corazón [83]. Esta evidencia apunta a una participación más directa y no descrita del betaglicano en el señalamiento de TGF- $\beta$ . Por otro lado, recientemente se ha descrito la capacidad del betaglicano de unir inhibina A (un factor de crecimiento miembro de la superfamilia del

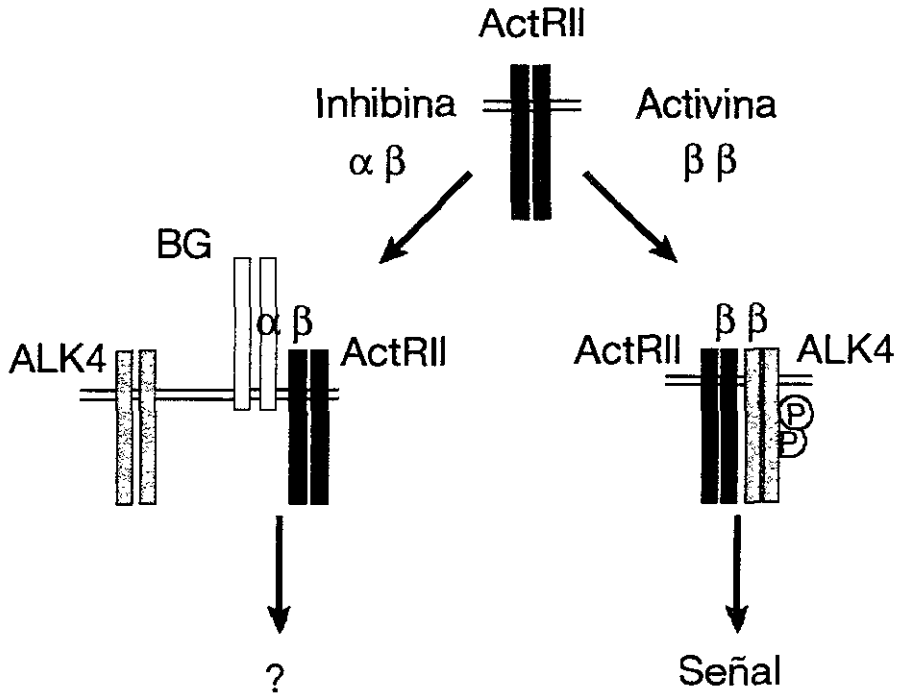
TGF- $\beta$ , con efectos antagónicos a la activina), y participar en un complejo terciario compuesto del receptor II de activina, inhibina A y betaglicano [84]. Este complejo es el responsable de mediar el antagonismo de la activina por inhibina, secuestrando al receptor tipo II de activina dentro de un complejo inactivo junto con el betaglicano (Figura 11).

Estos hallazgos hacen del betaglicano un versátil correceptor para al menos dos miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ .



**Figura 10. Efecto del betaglicano sobre la actividad del TGF- $\beta$ .** En su forma membranaral, el betaglicano potencia el efecto del factor ya que el receptor tipo II une preferentemente TGF- $\beta$  presentado por el betaglicano. Esto favorece la formación del "complejo de señalamiento" formado por el receptor tipo I, el receptor tipo II y TGF- $\beta$ . Este complejo fosforila la proteína Smad2, activando la vía de señalamiento de TGF- $\beta$ . El betaglicano soluble se genera por un corte de una proteasa endógena. En su forma soluble, el ectodominio del betaglicano secuestra al TGF- $\beta$  e inhibe su actividad.



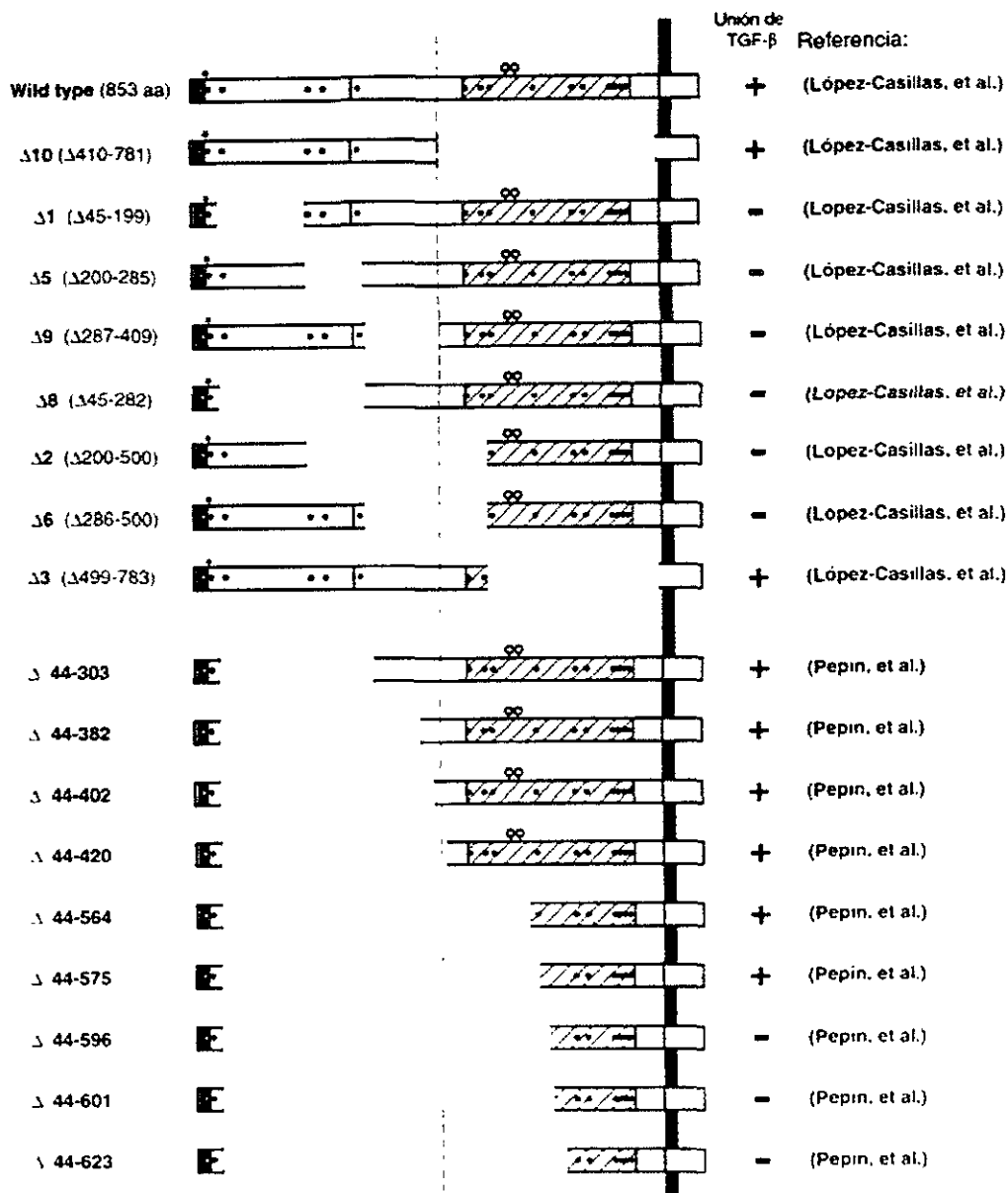


**Figura 11. El betaglicano actúa como corepresor con inhibina y el receptor tipo II de activina (ActR-II).** En ausencia del betaglicano, la activina se une al ActR-II y forma el complejo de señalamiento con ALK4. Sin embargo, en presencia de betaglicano la unión de inhibina al ActR-II se incrementa y se impide el acceso de activina. El resultado es la formación de un complejo betaglicano / inhibina / ActR-II, que impide el reclutamiento y activación de ALK4. Modificado de (84).

**Planteamiento del problema**

La capacidad del betaglicano de unir al TGF- $\beta$  es una propiedad de su ectodominio. El sitio de unión de TGF- $\beta$  se ha mapeado empleando más de 30 mutantes por delección del ectodominio del betaglicano [73, 85-89] (Figura 12). Estos estudios muestran dos sitios de unión para el TGF- $\beta$ , uno en la región amino terminal homóloga a endoglina (región E) [73], y otro en la región carboxilo homóloga a uromodulina (región U) [85]. Aunque la evidencia experimental es clara en cuanto a la existencia de dos regiones que pueden unir TGF- $\beta$ , poco se ha hecho para caracterizar las propiedades funcionales de estos sitios. De igual forma, la participación de las regiones amino y carboxilo del ectodominio en la unión de inhibina A no ha sido estudiada.

Estos estudios contribuirán a un mejor entendimiento del papel fisiológico del betaglicano como modulador de las acciones de dos factores de crecimiento, el TGF- $\beta$  y la inhibina A. Por otro lado, la caracterización de las regiones E y U del ectodominio, permitirá comprender mejor la capacidad del betaglicano de unir las tres isoformas de TGF- $\beta$ .



**Figura 12. Mutantes del betagalactano.** Esquema de las diferentes mutantes del betagalactano generadas por deleción para mapear el sitio de unión del TGF-β. Los números indican los segmentos de amino ácidos removidos de la secuencia. Se muestra: su capacidad de unir TGF-β, las regiones con similitud a endoglina (caja gris), con similitud a uromodulina (caja cruzada) y sin similitud a alguna proteína conocida (caja blanca), la barra negra indica la posición de la región transmembranal, los círculos abiertos indican la posición de las serinas 535 y 546 donde se anclan las cadenas de glicosaminoglicanos. La primera serie de mutantes, López-Casillas, et al., poseen la secuencia del epítipo c-myc indicado por un asterisco (\*). La línea punteada indica una división arbitraria de las regiones de unión de TGF-β sobre el ectodominio. Modificado de [73] y [85].

El betaglicano es un proteoglicano membranal que une las tres isoformas de TGF- $\beta$  e inhibina A por medio de su ectodominio donde se han descrito dos regiones con capacidad de unión para el TGF- $\beta$ , llamadas región E y U por su similitud con endogлина y uromodulina respectivamente.

### **Hipótesis**

Si las regiones E y U del ectodominio del betaglicano poseen una especialización para unir las isoformas del TGF- $\beta$  o la inhibina A, entonces la expresión aislada de las regiones E y U debe de ser capaz de mediar las funciones del betaglicano silvestre, mostrando las propiedades particulares de cada región.

### **Objetivo**

El presente trabajo está enfocado a analizar la funcionalidad de las regiones de unión de ligando del ectodominio del betaglicano. Para esto se emplearan mutantes del betaglicano generadas por eliminación de porciones discretas del ectodominio y al betaglicano silvestre. Estas mutantes seran expresadas por transfección estable o transitoria en diferentes células. Los mioblastos L6E9, que no expresan en su superficie betaglicano seran transfectadas en forma estable. Las células COS-1, que expresan bajos niveles de betaglicano serán transfectadas en forma transitoria. Los criterios experimentales para evaluar la función de estas construcciones serán: la capacidad de las mutantes de unir diferentes isoformas de TGF- $\beta$ ; la afinidad relativa de unión de ligando al receptor; su capacidad de llevar a cabo la función de presentación de TGF- $\beta$ 2 al T $\beta$ R-II, su capacidad de activar la vía de transducción de señal del TGF- $\beta$  por la fosforilación de Smad2 y en el caso de inhibina A, determinar la participación del ectodominio del betaglicano en la formación de un sitio de alta afinidad junto con el receptor II de activina.

## Material y Métodos

**Reactivos.** El TGF- $\beta$ 1 y la Inhibina A se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN); el TGF- $\beta$ 2 se obtuvo de CIBA-Geigy (Basel, Switzerland). Las endonucleasas de restricción y otras enzimas fueron de Roche (Basel, Switzerland). Los amortiguadores, sales e inhibidores de proteasas y fosfatasas fueron adquiridos y preparados a partir de reactivos de SIGMA-Aldrich Co. (México). Los vectores de expresión para el receptor tipo II de TGF- $\beta$  humano (marcado con el epítotope de HA1) y para el receptor tipo II de activina humano (marcado con una cola de hexa-histidina en el extremo carboxilo terminal) han sido descritos previamente [76, 90]. Todos los reactivos para cultivos celulares fueron adquiridos de GIBCO/BRL. El material de plástico empleado para cultivos celulares se obtuvo de CORNING COSTAR Corp, Cambridge, MA.

**Cultivos Celulares.** Las células COS-1 (CRL-1650, ATCC, Manassas, VA) y los mioblastos de rata L6E9 fueron cultivados en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % o 20 % de suero fetal bovino, respectivamente. Las células de insecto Sf9 (células ováricas de *Spodoptera frugiperda*, Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron cultivadas en medio Grace (GIBCO/BRL) suplementado con 10 % suero fetal de ternera, "yeastolate" (GIBCO/BRL) e hidrolizado de lactoalbúmina. Las células H5 "High five", (células ováricas de *Tricoplusia ni*, Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron cultivadas en medio "Express Five" (GIBCO/BRL) sin suero suplementado con 4 mM de glutamina en matraces "spinners" (Belco Glass, Inc., Vineland NJ) a 27 °C a 100 rpm .

**Transfecciones.** Para la expresión transitoria en células COS-1, el cDNA que codifica para las diversas construcciones mutantes del betaglicano fueron subclonadas en el vector pCMV5 [91]. La transfección para expresión transitoria en células COS-1, se hizo por el método de diethylaminoetil-dextran [92]. Las células COS-1 se sembraron a una densidad de 600,000 cels por plato de 78.5 cm<sup>2</sup> de area un día antes de la transfección. Al día siguiente, se removió el medio de crecimiento, se lavó la caja 2 veces con DMEM sin suero, se adicionó la mezcla de transfección (5  $\mu$ g de plásmido, cloroquina 0.1 mM, DEAE-dextran 0.4 mg/mL, en 5 mL de DMEM sin suero) y se incubó a 37 °C por 3.5 hs en 5 % CO<sub>2</sub>. Se removió la mezcla de transfección y se adicionó 5 mL de DMSO al 10 % en PBS

durante 2 min. Se removió el DMSO diluyendolo directamente en la caja con 10 mL de PBS. La caja se lavó 1 vez más y se adicionó DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37 °C y se ensayaron 48 hs después de la transfección.

Para la expresión estable en células L6E9, los cDNA que codifican para el betaglicano silvestre y las diferentes mutantes en versión con epítotope y sin epítotope de c-myc, fueron subclonados en el vector pcDNA3 (Invitrogen). La transfección para expresión estable en células L6E9 se hizo por el método de precipitación de fosfato de calcio [93]. Las células se crecieron en platos de 78.5 cm<sup>2</sup> de area a un 50 % de confluencia. Se removió el medio de crecimiento y se sustituyó por 5 mL de medio de crecimiento fresco. Se adicionó la mezcla de transfección gota a gota (10 µg de DNA en 250 µL de agua esteril más 250 µL de CaCl<sub>2</sub> 250 mM mezclado en vortex con 250 µL de amortiguador de HEPES (NaCl 224.5 mM, HEPES 40 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM pH 7.05), y se incubó por 16 hs. Se retiró la mezcla de transfección. Sin lavar, se adicionaron 3 mL de glicerol al 10% en PBS por 2 min. Se lavó el plato con 10 mL de PBS 2 veces, se adicionó medio de cultivo completo y se incubo a 37 °C por 4 hs. Las transfectantes se seleccionaron con 400 µg/mL de Geneticin (GIBCO/BRL).

**Separacion de Células por Citometría Magnética (“Magnetic Cell Sorting”).** Las células transfectadas para la expresión estable del betaglicano y las diferentes mutantes se enriquecieron por tres rondas de citometría magnética (“Magnetic cell Sorting”, MACS, Miltenyi Biotec Inc, Aubur, CA), usando como anticuerpo primario el antisuero anti betaglicano # 822, dirigido contra el ectodominio [76], y como anticuerpo secundario antisuero de cabra anti inmunoglobulina total de conejo conjugado a micro perlas magnéticas (Miltenyi Biotec Inc, Aubur, CA). El procedimiento de MACS consistió pasar por una columna magnética 2 x 10<sup>7</sup> células marcadas con ambos anticuerpos. Las células retenidas en la columna magnética fueron las reconocidas por el antisuero # 822. Estas células expresan en su superficie la molécula de betaglicano. La columna se separó del magneto y las células se cluyeron de la columna con 1 mL de PBS-BSA 0.5 % EDTA 5 mM. se lavaron 2 veces con PBS y se sembraron en medio de cultivo completo.

**Construcción de Mutantes del Betaglicano.** En este trabajo se emplearon varias mutantes del betaglicano las cuales han sido reportadas previamente. Estas mutantes son:  $\Delta 2$ ,  $\Delta 3$ ,  $\Delta 10$  y  $\text{gag}^-$ . El cDNA del betaglicano de rata, que contiene la secuencia de un epítipo c-myc humano reconocido por el anticuerpo monoclonal 9E10 [76], sirvió como plantilla para la construcción de los cDNAs mutantes  $\Delta 2$ ,  $\Delta 3$ ,  $\Delta 10$  y  $\text{gag}^-$  [73]. Las construcciones mutantes  $\Delta 2$  ( $\Delta 200-500$ );  $\Delta 3$  ( $\Delta 499-783$ );  $\Delta 10$  ( $\Delta 410-781$ ) fueron obtenidas eliminando los amino ácidos indicados utilizando sitios únicos para endonucleasas de restricción presentes en la secuencia del cDNA. La mutante  $\Delta 2$  se generó por la ligación del fragmento grande resultante de la digestión con AflIII reparado con fragmento Klenow, seguido de la digestión con XhoI recortado con “mung bean nuclease”. Esta manipulación introduce un residuo de Trp en la posición 200. La mutante  $\Delta 3$  se generó por la ligación del fragmento grande resultante de la digestión con XhoI y NcoI recortado con la “mung bean nuclease”; esta manipulación introduce un residuo Arg en la posición 499. La mutante  $\Delta 10$  se generó por la ligación del fragmento grande de DNA resultante de la digestión con EcoRV y NcoI y reparado con fragmento Klenow. La construcción  $\text{gag}^-$  se modificó en los residuos Ser535Ala y Ser546Ala en la región semejante a uromodulina mediante mutagénesis dirigida utilizando estrategias de PCR.

Para este trabajo se generaron dos nuevas mutantes, la mutante  $\Delta 11$  y la  $\Delta 12$ . La mutante  $\Delta 11$  fue construida a partir de la mutante  $\Delta 8$  ( $\Delta 45-282$ ) [73]. La mutante  $\Delta 8$  se generó por la inserción de los oligonucleótidos alineados 5'CCGGCAACTGGGT3' y 5'GATCACCCAGTTGCCGG3' en el fragmento de DNA grande resultante de la digestión en StuI y BclII, esta manipulación introduce una Gly en la posición 45 y genera un sitio NaeI *de novo*. Esta mutante se cortó en los sitio Nae I y en el EcoRV, el fragmento grande resultante se ligó y generó la mutante  $\Delta 11$  ( $\Delta 45-409$ ). La mutante  $\Delta 12$  se generó por la eliminación del fragmento comprendido entre los sitios StuI y XhoI de la secuencia del betaglicano, y reparada por el fragmento Klenow. El polipéptido resultante es:  $\Delta 12$  ( $\Delta 44-499$ ).

Para este trabajo también se generaron versiones carentes de epítipo de c-myc de las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  además de versiones solubles de las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$ . Las versiones solubles de  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  fueron creadas por la inserción de oligonucleótidos que

introducen un codón de paro precedido por una cola de hexa-histidina en el extremo carboxilo terminal. Para la mutante  $\Delta 10$  soluble los oligonucleótidos fueron insertados entre el sitio EcoRV y el sitio NcoI del c-myc-betaglicano silvestre y para la mutante  $\Delta 11$  soluble, entre los sitios NcoI y AvrII del c-myc- $\Delta 11$ . Todas las construcciones se verificaron por secuenciación siguiendo técnicas estándar [94].

**Análisis de Células por Citometría de Flujo (FACS).** Las células L6E9 se crecieron en cajas para cultivos celulares de 9.5 cm<sup>2</sup> a un 70 % de confluencia. Las células se incubaron en medio DMEM sin suero (2 cambios de 30 min cada uno) por 60 min y se marcaron con 10 µg/ml de antisuero anti-betaglicano # 822 en PBS-BSA 5% a 4 °C por 30 min. Las cajas se lavaron 3 veces con PBS frío, se adicionó el antisuero de cabra anti inmunoglobulina G de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (SIGMA-Aldrich) diluido 1:5000 en PBS-BSA 5% y se incubaron por 30 min a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS frío y un 1 vez con PBS-EDTA 5mM. Se adicionó a las cajas 500 µL de PBS-EDTA 5mM por 10 min y una vez despegadas las células de la caja de cultivo se depositaron en tubos para citometria (FALCON). La citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur con el programa CELLQuest (Becton Dickinson).

**Ensayo de Inhibición de Crecimiento por TGF- $\beta$ : Incorporación de <sup>125</sup>I-deoxiuridina.** Las células se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 25,000 a 30,000 células/cm<sup>2</sup>. Al día siguiente se adicionaron las diluciones de TGF- $\beta$  (0, 3, 10, 30 y 100 pM) en medio DMEM 0.5% de suero fetal bovino (GIBCO/BRL) y se incubaron a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub> por 20 hs. Las placas se pulsaron con 0.5 µCi de <sup>125</sup>I-deoxiuridina por pozo (NEN, Life Science) y se incubaron a 37 °C por 4 hs. Al termino de la incubación las placas se enfriaron en una cama de hielo y se lavaron 3 veces con PBS frío. Las células se fijaron con metanol al 95 % a 4 °C por 1.5 hs en agitación y se lavaron 2 veces con PBS frío. Las células se solubilizaron en 500 µL de NaOH 0.5 N a temperatura ambiente, toda la noche. Al día siguiente, se transfirieron los extractos a tubos y se cuantificaron en un contador de radiación gamma (Packard).



**Yodinación.** El TGF- $\beta$  se marco con  $^{125}\text{I}$  usando cloramina T [74], mientras que la inhibina A se marcó con el método de lactoperoxidasa [95].

- Yodinación de TGF- $\beta$  (Método de Cloramina T). Se tomaron 2  $\mu\text{g}$  de TGF- $\beta$  en 5  $\mu\text{L}$  acetonitrilo al 30% - TFA 0.1 % y se mezclaron con 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato de sodio 1.5 M. Se añadieron 400  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  y se mezcló suavemente. A la mezcla de yodinación se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de cloramina T (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 3 veces en lapsos de incubación de 2, 1.5 y 1 min, mezclando suavemente en cada ocasión. Se detuvo la reacción con 10  $\mu\text{L}$  de N-acetiltirosina 50 mM, 100  $\mu\text{L}$  de KI 60 mM y 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético en urea 1M. El análisis de incorporación se hizo por cromatografía en capa fina, por triplicado. Para esto, se depositaron 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de yodinación en una tira de fibra de vidrio impregnada de sílica gel (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Se utilizó ácido tricloroacético al 10% como fase móvil. Las tiras se cortaron por la mitad y se midió la radioactividad en la base y en el frente en un contador para radiación gamma (Packard). Una incorporación igual o mayor al 30% fue aceptable. La separación del yodo libre de la mezcla de racción se hizo por cromatografía de exclusión. Se tomó toda la mezcla de racción y se depositó en una columna PD-10 de sephadex G-25 (Pharmacia Biotech). La columna se equilibrio con amortiguador de columna (HCl 4mM, NaCl 75 mM y BSA 0.1%). El eluido de la columna se recuperó en fracciones de 500  $\mu\text{L}$ . Se seleccionó la fracción con el mayor índice de cuentas por minuto. La concentración de ligando marcado se determinó por cromatografía en capa fina tomando 2  $\mu\text{L}$  de la fracción seleccionada. Se alicuotó y se almacenó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .
- Yodinación de Inhibina A (Método de Lactoperoxidasa). Se tomaron 5  $\mu\text{g}$  de inhibina A en un volumen de 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador acetato de sodio 0.1 M (pH 5.6) y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetato de sodio 0.4 M (pH 5.6) y 0.5 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$ . Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de la solución de lactoperoxidasa (Calbiochem) diluida 1:100 en amortiguador de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.6) (solución concentrada 100 UI/mL; diluir a un volumen final de 300  $\mu\text{L}$ ). Se añadieron 17 ng de peróxido de hidrógeno (diluir la solución concentrada al 37% en

agua). La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min con agitación intermitente (vortex). Se agregó nuevamente 17 ng de peróxido de hidrógeno, y se incubó a temperatura ambiente por 5 min con agitación intermitente (vortex). La reacción se detuvo adicionando 500  $\mu$ L de buffer de columna (PBS, BSA 0.5%, Timerosal 0.01%). El análisis de incorporación se hizo por cromatografía en capa fina, por triplicado. Para esto, se depositaron 2  $\mu$ L de la mezcla de yodinación en una tira de fibra de vidrio impregnada de sílica gel (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Se utilizó ácido tricloroacético al 10% como fase móvil. Las tiras se cortaron por la mitad y se midió la radioactividad en la base y en el frente en un contador para radiación gamma (Packard). Una incorporación igual o mayor al 30% fue aceptable. La separación del yodo libre de la mezcla de racción se hizo por cromatografía de exclusión. Se tomó toda la mezcla de racción y se depositó en una columna PD-10 de sephadex G-25 (Pharmacia Biotech). La columna se equilibro con amortiguador de columna (PBS, BSA 0.5%, Tween 20 0.05%, NaCl 1 M, Timerosal 0.01%) . El eluido de la columna se recuperó en fracciones de 500  $\mu$ L. Se seleccionó la fracción con el mayor índice de cuentas por minuto. La concentración de ligando marcado se determinó por cromatografía en capa fina tomando 2  $\mu$ L de la fracción seleccionada. Se alicuotó y se almacenó a  $-20$  °C.

**Marcado por Afinidad y Ensayo de Unión.** Los ensayos de unión, marcado por afinidad, e inmunoprecipitación en condiciones nativas o desnaturalizantes se hicieron como se describen anteriormente [76]. Brevemente, las células crecidas en cajas de cultivo de 9.5  $\text{cm}^2$  se incubaron en amortiguador Krebs Ringers HEPES-BSA 5% (KRH-BSA) pH 7.4 (NaCl 1.28 M, KCl 50 mM,  $\text{MgSO}_4$  50 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  13 mM, HEPES 0.5 M, BSA 5%) a 37 °C por 30 min. Las cajas se enfriaron en cama de hielo, y se adicionó la solución de TGF- $\beta$  iodinado ( $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ ) a una concentración de 100 ó 150 pM. Las cajas se incubaron a 4 °C por 3.5 hs en agitación. Después de la incubación, las cajas se lavaron 3 veces con KRH-BSA 5 %, y 1 vez con con KRH. \* Se adicionó a cada caja 500  $\mu$ L de solución de entrecruzador en KRH (solución de entrecruzador: 10 mg/mL de disuccinimidilsuberato (DSS) (PIERCE Chemical Co.) en DMSO), en una proporción de 6  $\mu$ L de solución de entrecruzador por mL de KRH. Se incubo a 4 °C por 15 min en agitación. Después se lavó

una vez con STE-PMSF (sacarosa Tris-EDTA 5 mM pH 7.4, 1 mM PMSF). Raspar las células y transferir a tubos Epp. Centrifugar a 8,000 rpm 4 °C/10 min, descartar sobrenadante. Solubilizar el paquete celular en 120 µL de TTE (1% Triton X-100, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA) más Inhibidores de Proteasas. Incubar a 4 °C/40 min en agitación, centrifugar a 15,000 rpm y recuperar el sobrenadante. Analizar por SDS-PAGE al 7%, secar y obtener autoradiograma.

\* Ensayo de Unión: Si sólo se requieren los datos pegado total, en este punto adicionar 500 µL de de TTE (Triton X-100 0.1%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM) y solubilizar a 4 °C por 40 min. Colectar el sobrenadante y contar.

**Marcado por Afinidad de Proteínas en Solución.** El marcado por afinidad en solución se hizo con las proteínas solubles Δ10 y Δ11 como se describió en [73]. Para esto, 50 ng de la proteína soluble recombinante se resuspendió en PBS-Tritón X-100 al 0.05% y se incubó con 250 pM de <sup>125</sup>I-TGF-β y diferentes concentraciones de TGF-β a 4 °C por 3 hs. El ligando unido se entrecruzó a la proteína soluble con disuccinimidilsuberato (DSS) (PIERCE Chemical Co.) a una concentración final de 0.1 mg/mL. La reacción de entrecruzamiento se detuvo después de 15 min con Tris a una concentración final de 10 nM. Las muestras se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10 (SIGMA-Aldrich) diluido 1:2000 y se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE). Los resultados se visualizaron en “*Phosphorimager*” (Molecular Dynamics) y la densitometría cuantitativa se hizo con el programa “*ImageQuant*” (Molecular Dynamics).

**Ensayo de Fosforilación de Smad2 por incorporación de <sup>32</sup>P.** Las células L6E9 y células FBHE se crecieron en cajas de 9.5 cm<sup>2</sup> de area y se incubaron por 2 hs en medio DMEM sin fosfatos (SIGMA-Aldrich). Se adicionó a las cajas 0.750 mL de medio sin fosfatos conteniendo 0.250 mCi/mL de [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub> (NEN Life Science) y se incubaron a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> por 2 hs. Se adicionó a las cajas 0, 10, 25 y 100 pM de TGF-β1 o TGF-β2 en medio sin fosfatos y se incubaron a 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub> por 30 min. Las cajas se enfriaron en cama de hielo, se lavaron 2 veces con PBS frío y se solubilizaron en 500 µL de regulador de lisis TTE (Triton X-100 0.1%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM), suplementado con inhibidores de proteasas (10 µg/mL de leupeptina, 10 µg/mL de antipaina, 100 µg/mL de

hidrocloruro de benzamidina, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de aprotinina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de inhibidor de tripsina de frijol de soya, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pepstatina y PMSF 1 mM) y de fosfatasas (pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 5 mM, ortovanadato de sodio 100  $\mu\text{M}$  y beta-glicerofosfato 10 mM) por 1 hr a 4°C, en agitación. Los extractos se centrifugaron a 12,500 g a 4°C por 15 min. El sobrenadante se preabsorbió con 20  $\mu\text{L}$  de sefarosa CL-4B a 4°C por 30 min. El sobrenadante se incubó con el antisuero anti-Smad2 (un generoso regalo del Dr. J. L. Wrana) a 4°C por 2 hs. A los inmunoprecipitados se les adicionó sefarosa proteína-A y se incubaron a 4°C por 30 min. Las sefarosas se lavaron 5 veces en PBS frío conteniendo Triton X-100 0.1% y SDS 0.01% y se resuspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de regulador de Laemmli para análisis por electroforesis (SDS-PAGE). Los resultados se visualizaron en "Phosphorimager" (Molecular Dynamics). El análisis de los cromatogramas se hizo empleando el programa "ImageQuant" (Molecular Dynamics).

**Ensayo de Fosforilación de Smad2 por Western Blot.** La determinación de la fosforilación de Smad2 se hizo por Western Blot utilizando un antisuero anti-fosfo-Smad2 (dirigido contra el sitio de fosforilación en los residuos de Ser465/Ser467) donado generosamente por el Dr. C.-H. Heldin, Uppsala, Suiza. Mioblastos L6E9 expresando el betaglicano silvestre y las mutantes del betaglicano fueron tratados con 20 pM de TGF- $\beta$ 2 o TGF- $\beta$ 1 por 15 min. Las células fueron lisadas en regulador TTE (Triton X-100 0.1%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM), suplementado con inhibidores de proteasas (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antipaina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hidrocloruro de benzamidina, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de aprotinina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de inhibidor de tripsina de frijol de soya, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pepstatina y PMSF 1 mM) y de fosfatasas (pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 5 mM, ortovanadato de sodio 100  $\mu\text{M}$  y beta-glicerofosfato 10 mM). Cantidades equivalentes de proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 9%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se probaron con antisuero anti-fosfo-Smad2. Para el control de carga, las membranas se probaron con antisuero anti-Smad2 (un generoso regalo del Dr. J. L. Wrana). Los inmunoblots se revelaron por quimioluminiscencia (ECL / Amersham) y autorradiografía.

**Purificación de las Proteínas Recombinantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  Producidas en Baculovirus.**

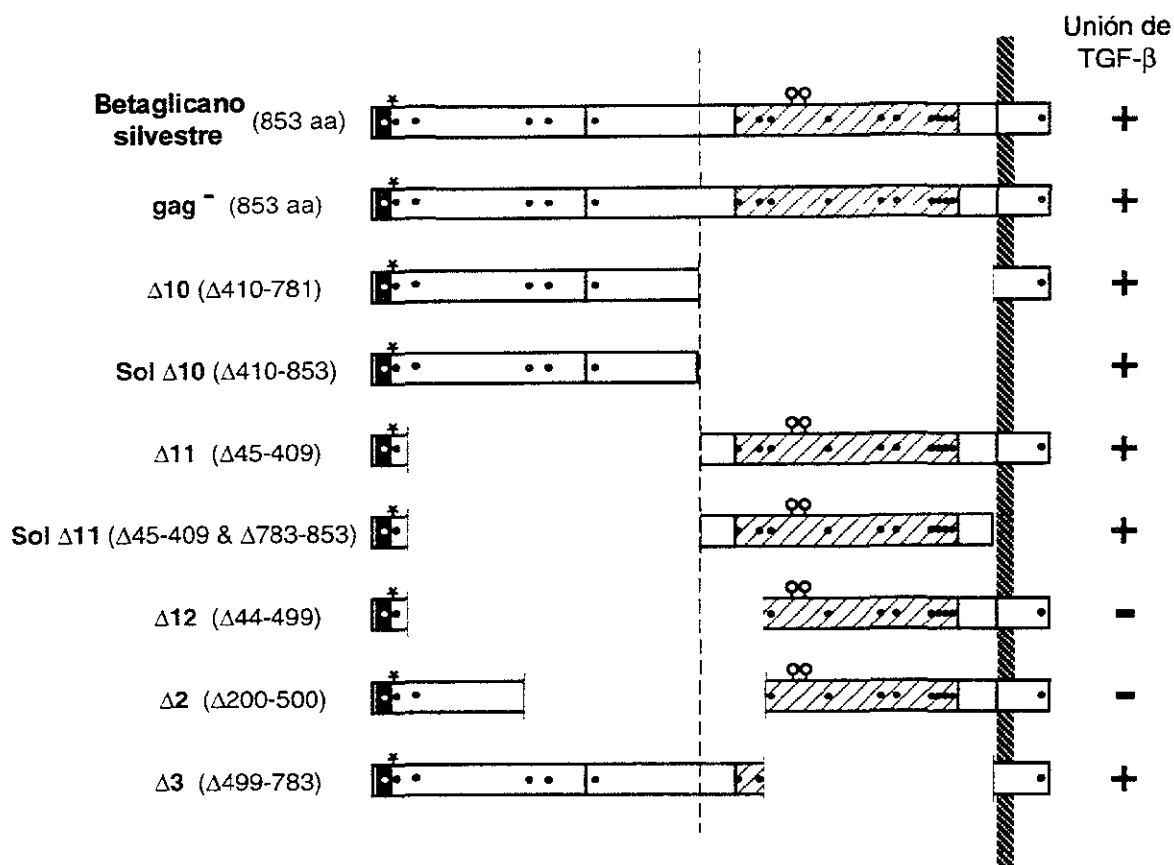
Para la generación de las cepas de baculovirus, los cDNAs que codifican para las mutantes c-myc  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  solubles con cola de hexa-histidina fueron subclonados en el vector de transferencia pBlueBac4 (Invitrogen). Las células Sf9 fueron cotransfectadas con las construcciones  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  en pBlueBac y el DNA del baculovirus Bac-N-Blue (Invitrogen) utilizando Lipofectina (GIBCO/BRL). Las cepas se amplificaron hasta obtener una suspensión de alto título ( $1 \times 10^{10}$  pfu/mL). Células H5 a una densidad de  $2 \times 10^6$  cels/mL fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 10 con una suspensión de alto título de partículas de baculovirus  $\Delta 10$  ó  $\Delta 11$ . El medio condicionado se cosechó a las 48 hs post-infección y se procesó inmediatamente. El medio condicionado fué suplementado con 1mM de PMSF, centrifugado a 11,000 rpm por 20 min a 4 °C para remover detritus, concentrado 10 veces usando el sistema de ultrafiltración Minitan (Millipore, Bedford, MA) y sujeto a cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) usando sefarosa quelante de flujo rápido (Amersham Pharmacia Biotech, UK). La sefarosa quelante (columna de 60 mL) se cargó con  $\text{NiCl}_2$  50 mM y se equilibró en regulador de lavado (Hepes 25 mM pH 7.5, KCl 1 M, imidazol 20 mM, PMSF 1 mM). El medio condicionado se cargó a la columna, se lavó con 6 volúmenes de regulador de lavado y se eluyó con un gradiente de 20 a 250 mM de imidazol. La identificación de las fracciones que contenían la proteína  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  soluble se realizó por SDS-PAGE y tinción de plata. Las fracciones positivas se juntaron y se concentraron en un sistema Amicon de Ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA). Las fracciones positivas se dializaron contra amortiguador de fosfatos con 1% (v/v) de glicerol y PMSF 1mM y se almacenaron a  $-70$  °C. Este procedimiento produjo entre 3-4 mg de proteína recombinante purificada por litro de medio condicionado.

**Nota:** Todas los métodos mencionadas en esta sección se describen ampliamente en el Apéndice.

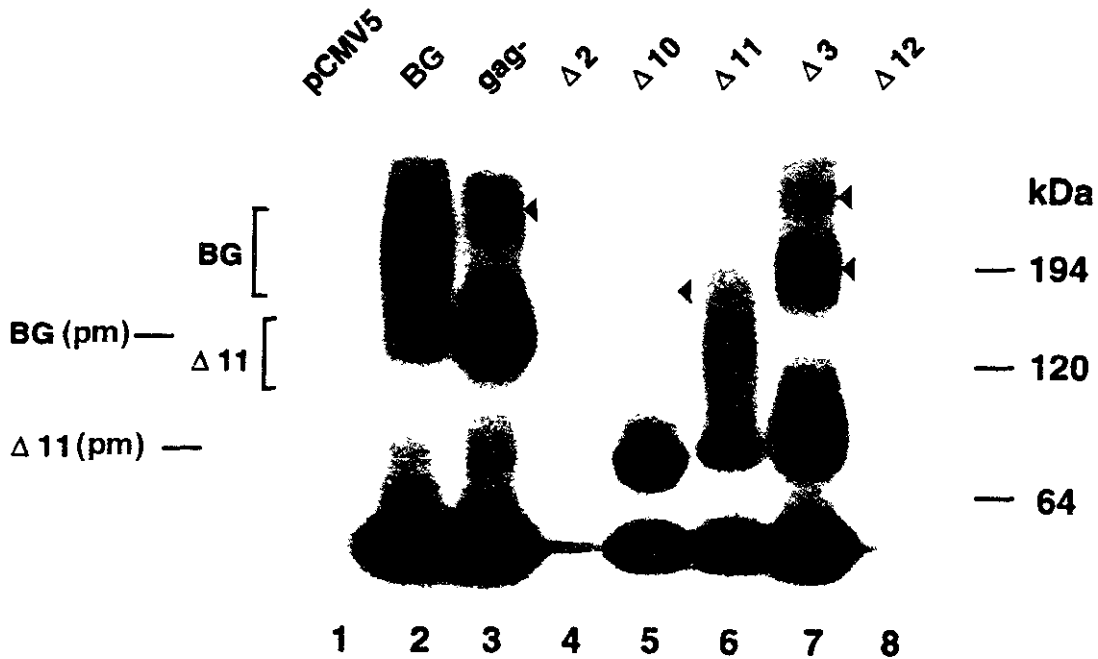
## Resultados

**Existen dos regiones de unión para TGF- $\beta$  en el ectodominio del betaglicano.** Diversos estudios han mostrado la existencia de dos sitios de unión para el TGF- $\beta$  sobre el ectodominio del betaglicano, uno en la mitad amino terminal [73, 87] y otro en la mitad carboxilo terminal [85, 86] del ectodominio del betaglicano. Debido a que las mitades contienen las regiones similares a endoglina y uromodulina, se referirá a ellas como la región E (amino terminal) y la región U (carboxilo terminal). Para determinar las propiedades funcionales de las regiones de unión de TGF- $\beta$  del ectodominio del betaglicano se decidió probar la afinidad por el ligando, la presentación de TGF- $\beta$ 2, y la capacidad de potenciar el efecto del TGF- $\beta$ 2. Para esto, se ensayó un panel de mutantes del betaglicano, algunas mutantes previamente descritas [73]. Estas mutantes se generaron a partir del cDNA del betaglicano de rata que contiene al epítotope c-myc. Para este estudio se crearon dos nuevas mutantes la  $\Delta$ 11 y la  $\Delta$ 12. Las nuevas mutantes  $\Delta$ 11 y  $\Delta$ 12 carecen de los residuos 45 a 409 ( $\Delta$ 45-409) y 44 a 499 ( $\Delta$ 44-499) respectivamente, del ectodominio del betaglicano silvestre de rata. La mutante  $\Delta$ 11 carece de la región amino terminal y es complementaria a la mutante  $\Delta$ 10 ( $\Delta$ 410-781) que carece de la región carboxilo terminal del ectodominio (Figura 13).

Las mutantes  $\Delta$ 2 ( $\Delta$ 200-500),  $\Delta$ 3 ( $\Delta$ 499-783),  $\Delta$ 10,  $\Delta$ 11,  $\Delta$ 12 y gag<sup>-</sup> se probaron en su capacidad de unir TGF- $\beta$ . Para esto, células COS-1 transfectadas para expresión transitoria de las mutantes del betaglicano, fueron marcadas por afinidad con <sup>125</sup>I-TGF- $\beta$ 1. Los diferentes productos marcados fueron inmunoprecipitados y separados en geles SDS-PAGE y visualizados por autorradiografía (Figura 14). El betaglicano silvestre aparece como un proteoglicano de “tiempo parcial”, esto es, un producto con cadenas de glicosaminoglicanos que aparece como un barrido de mas de 200 kDa, además de una proteína medular de 120 kDa (Figura 14, carril 2). La mutante gag<sup>-</sup> aparece solamente como proteína medular ya que es una doble mutante puntual de los residuos de serina que se ha demostrado son los sitios de anclaje de las cadenas de GAG (S535-546A). La mutante gag<sup>-</sup> no es procesada como proteoglicano, sin embargo, une TGF- $\beta$  al igual que el receptor silvestre [73]. Las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 3 carecen también del sitio de anclaje de las cadenas de GAG, por lo que aparecen como proteínas medulares de aproximadamente 85 y 97 kDa,



**Figura 13. Esquema de las mutantes del betaglicano de rata.** Los aminoácidos removidos se muestran en paréntesis. Se indican, los sitios de anclaje de las cadenas de GAG en las serinas 535 y 546 (círculos), el péptido señal (caja negra) y la posición de las cisteínas (puntos). También se muestran, la membrana plasmática (barra rayada) y el epítipo de c-myc (asterisco). En este trabajo también se emplearon versiones del betaglicano y sus mutantes Δ10 y Δ11 carentes de epítipo c-myc, como se indica en los pies de figura correspondientes. Las regiones de homología de secuencia con endoglina y uromodulina se muestran como caja sombreada y cruzada respectivamente. Las cajas vacías indican regiones del péptido sin homología a proteínas conocidas. Dentro de la región con homología a uromodulina existe una pequeña zona con homología a endoglina que incluye las primeras 3 cisteínas. La línea punteada situada entre los residuos 409-410, indica los límites de la región de unión de TGF-β distal y proximal a la membrana (relacionada a E o relacionada a U respectivamente).



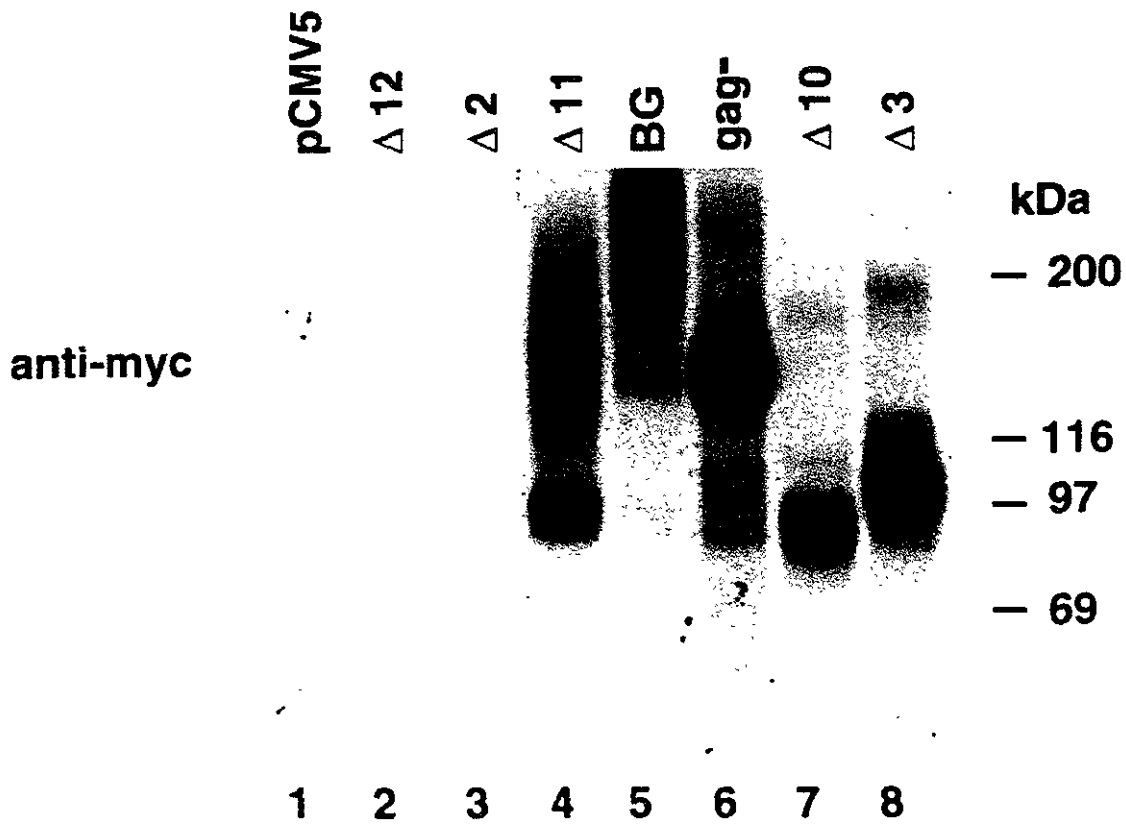
**Figura 14. Unión de TGF- $\beta$  por mutantes c-myc-betaglicano.** Células COS-1 fueron transfectadas en forma transitoria con el vector de expresión vacío (pCMV5), o las mutantes c-myc del betaglicano. Al segundo día posterior a la transfección los cultivos fueron marcados por afinidad con 200 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 1. Los lisados de las células fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10. Los inmunoprecipitados fueron analizados por SDS-PAGE y visualizados por autorradiografía de los gels. Se indica la migración de los patrones de peso molecular (kDa) y la posición de oligómeros generados por entrecruzamiento de algunos de los receptores mutantes (triángulos). BG, betaglicano. pm, proteína medular.



respectivamente. Las mutantes gag<sup>-</sup>,  $\Delta 10$  y  $\Delta 3$  muestran productos de alto peso molecular que resultan de entrecruzamiento de formas diméricas u oligoméricas de estos receptores [73, 85]. La mutante  $\Delta 11$ , que incluye 10 residuos de cisteína que definen la similitud con uromodulina [96], pudo unir TGF- $\beta 1$  (Figura 14, carril 6). La mutante  $\Delta 11$  aparece tanto como una proteína medular de aproximadamente 95 kDa, y como proteoglicano que se observa como un barrido de entre 120-194 kDa. Esto se esperaba, ya que la mutante  $\Delta 11$  conserva los residuos de serina 535 y 546. La mutante  $\Delta 12$  carece de los residuos 44 a 499, que incluye los dos primeros residuos de cisteína de la región U y no une TGF- $\beta$  (Figura 14, carril 8). Como control negativo se incluyó al vector pCMV5 vacío, y a la mutante  $\Delta 2$  [73]. El análisis de las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  junto con el panel de mutantes, confirman la existencia de dos regiones en el ectodominio del betaglicano con capacidad de unir TGF- $\beta$ .

#### **Presentación de TGF- $\beta 2$ por las regiones de unión de ligando del betaglicano.**

Los resultados de los ensayos de marcado por afinidad muestran que las regiones de unión de ligando representadas por  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  unen TGF- $\beta$  en forma similar a la del receptor intacto, por lo que decidimos probar si conservan la función de presentación del TGF- $\beta 2$  del betaglicano silvestre [75-77]. Para medir la función de presentación de TGF- $\beta 2$  en las regiones de unión del betaglicano, células COS-1 fueron cotransfectadas transitoriamente con algunas de las construcciones de betaglicano que llevan el epítotope c-myc y el receptor tipo II de TGF- $\beta$  humano. El receptor tipo II de TGF- $\beta$  usado en estos experimentos lleva el epítotope HA1 de la hemaglutinina del virus de la influenza, que es reconocido por el anticuerpo 12CA5 [97]. Después de la cotransfección, las células fueron marcadas por afinidad con  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta 2$  y los lisados celulares fueron desnaturalizados, reducidos y luego inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-c-myc 9E10 [98] o el anticuerpo anti-HA1. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se revelaron por autorradiografía. Los pasos de desnaturalización y reducción eliminan cualquier complejo no covalente formado en los receptores durante el marcado por afinidad, lo que previene su coinmunoprecipitación. Los inmunoprecipitados con anti-c-myc muestran que el  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta 2$  se une a las mutantes c-myc-betaglicano (Figura 15), y exhiben un patrón de migración en gel similar al observado cuando se marca con TGF- $\beta 1$  (Figura 14). Esto sugiere que la

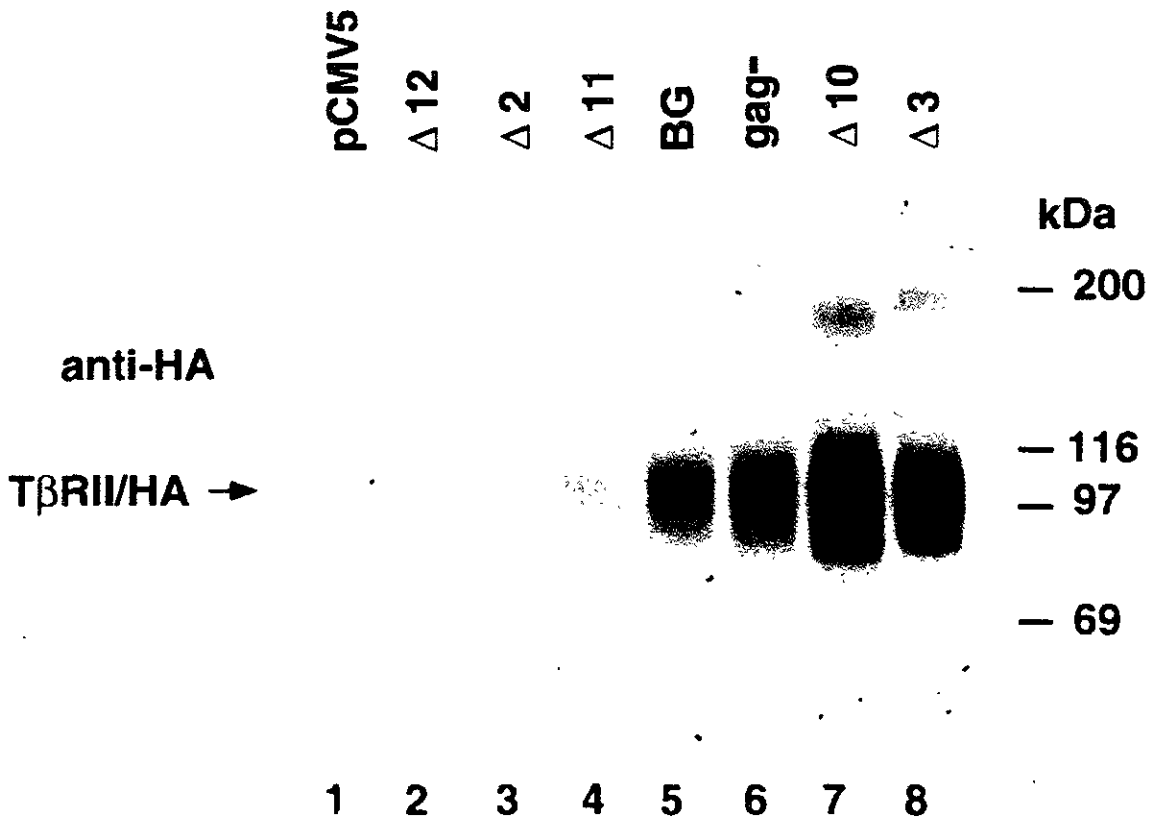


**Figura 15. Presentación de TGF-β2 por mutantes c-myc de betaglicano.** Células COS-1 fueron co-transfectadas con el receptor tipo II de TGF-β marcado con el epítotope de hemaglutinina (TβRII/HA) y las mutantes c-myc de betaglicano o el vector de expresión vacío (pCMV5). Dos días después de la transfección las células fueron marcadas por afinidad con 100 pM de <sup>125</sup>I-TGF-β2, y los lisados celulares fueron desnaturalizados por ebullición en presencia de SDS y ditiotreitolo. La figura corresponde a la mitad del extracto que se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10. Los inmunoprecipitados se analizaron por SDS-PAGE y se visualizaron por autoradiografía de los geles.

coexpresión del betaglicano y el receptor tipo II de TGF- $\beta$  no altera la unión de TGF- $\beta$  a las mutantes del betaglicano, sin embargo, el marcado del receptor tipo II se regula por el betaglicano. Los inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-HA1 muestra los casos en los cuales la coexpresión del betaglicano aumenta el marcado del receptor tipo II (Figura 16). La cotransfección con el betaglicano silvestre, ya sea en su forma de proteoglicano (silvestre) o sólo como proteína medular (GAG), resulta en un incremento en el marcado del receptor tipo II (Figura 16, carril 5 y 6). La cotransfección con el vector vacío resulta en un marcado casi imperceptible del receptor tipo II, demostrando su baja afinidad endógena por el TGF- $\beta$  (Figura 16, carril 1). La cotransfección con las mutantes  $\Delta 2$  y  $\Delta 12$ , que no unen TGF- $\beta 2$ , resultó en un ligero incremento en el marcado del receptor tipo II en comparación con el vector vacío (Figura 16, carril 2 y 3) que puede considerarse como fondo en este tipo de experimentos. La cotransfección con  $\Delta 11$ , que une TGF- $\beta 2$  en forma similar al betaglicano silvestre (Figura 15, carril 4 y 5), resultó en un ligero incremento sobre el marcado de fondo del receptor tipo II (comparar carril 4 contra carril 2 y 3, en Figura 16). Por otro lado, la cotransfección con  $\Delta 3$  o  $\Delta 10$  resultó en un incremento de 2 o 3 veces respectivamente sobre el nivel de marcado del receptor tipo II en presencia del betaglicano silvestre (comparar carril 7 y 8 contra carril 5 y 6, en Figura 16). Por lo tanto, a pesar de que  $\Delta 3$ ,  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  unen TGF- $\beta 2$ , difieren en su capacidad de “presentación” al receptor tipo II de TGF- $\beta$ .

**Expresión estable del betaglicano y las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  en células L6E9.** Los datos presentados muestran que la función de presentación del betaglicano es una propiedad de la región E (mutante  $\Delta 10$ ). Lo anterior sugiere que la región E sería la responsable de potenciar la señal por TGF- $\beta 2$ . Para evaluar esta posibilidad, se decidió probar las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  en cuanto a su capacidad de potenciar el efecto de TGF- $\beta 2$ . Para esto las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  se expresaron establemente en células L6E9.

El betaglicano es un receptor de superficie distribuido ampliamente en varios tipos celulares [99]. Sin embargo, existen algunas células que no lo expresan, como las células progenitoras hematopoyéticas [79], algunas líneas de mioblastos [76] y células endoteliales [78]. Las células L6E9 son una línea celular de mioblastos de rata los cuales no expresan en



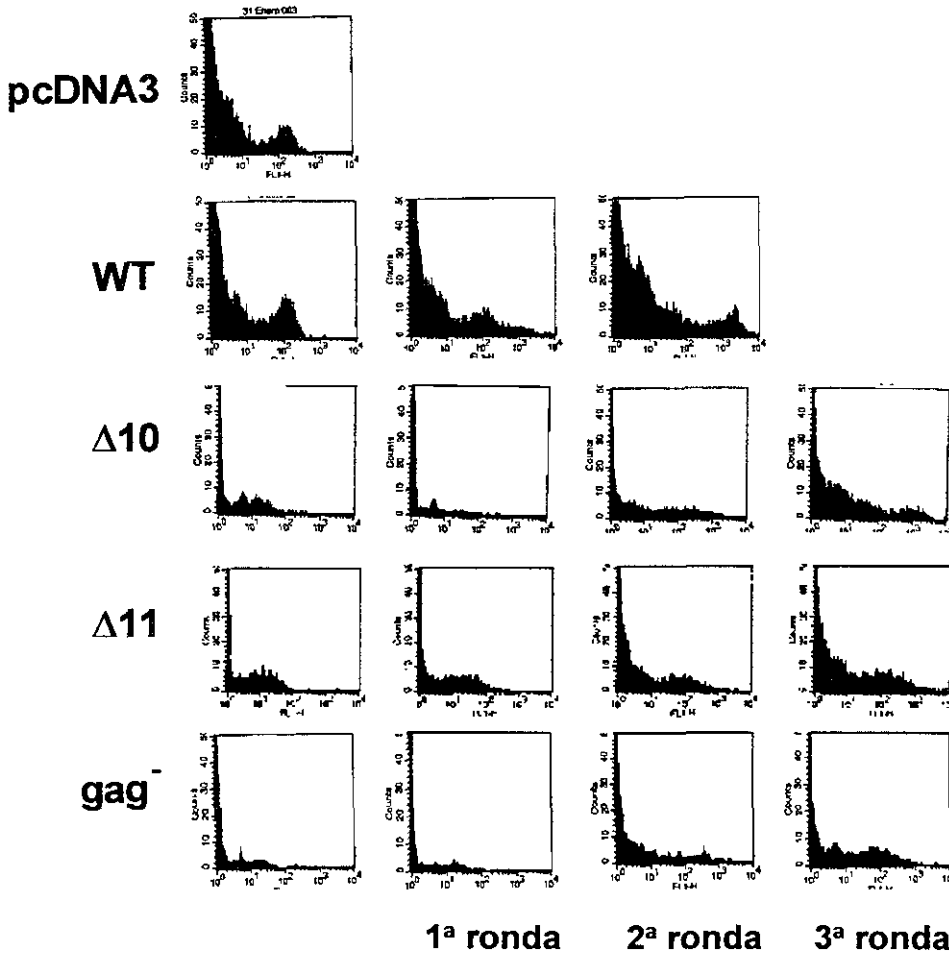
**Figura 16. Presentación de TGF-β2 por mutantes c-myc de betaglicano.** Células COS-1 fueron cotransfectadas con el receptor tipo II de TGF-β marcado con el epítipo de hemaglutinina (TβRII/HA) y las mutantes c-myc de betaglicano o el vector de expresión vacío (pCMV5). Dos días después de la transfección las células fueron marcadas por afinidad con 100 pM de <sup>125</sup>I-TGF-β2, y los lisados celulares fueron desnaturalizados por ebullición en presencia de SDS y ditiotreitól. La figura corresponde a la mitad del extracto que se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal anti-HA 12CA5. Los inmunoprecipitados fueron analizados por SDS-PAGE y visualizados por autoradiografía de los geles.

ningún momento de su desarrollo al betaglicano [100]. Este hecho hace de los mioblastos L6E9 un candidato ideal para generar clonas que expresen sólo betaglicano de origen exógeno.

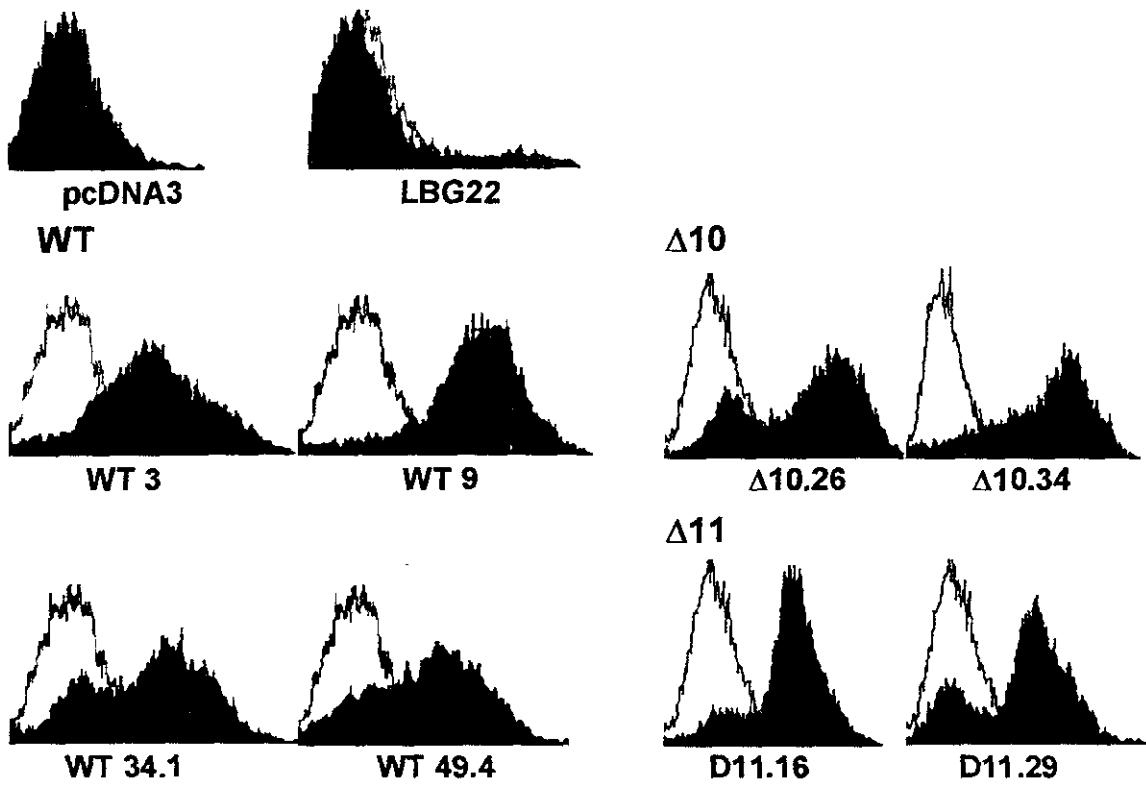
Los mioblastos L6E9 fueron transfectados con los cDNA que codifican para el c-myc-betaglicano silvestre y las c-myc-mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$ . Las células transfectadas se analizaron por citometría de flujo (FACS) después de varios pases en medio selectivo. El análisis por FACS mostró que, a pesar de que las células eran capaces de crecer en medio selectivo, la expresión de betaglicano y las mutantes era menor al 0.1 % (Figura 17, primera columna). Debido a esto, se decidió enriquecer la población de células expresoras empleando el sistema de citometría magnética (MACS).

El sistema de MACS permitió marcar las células que expresan betaglicano en la superficie con anticuerpos conjugados a esferas magnéticas. Las células marcadas son retenidas en columnas magnéticas y eluidas posteriormente. Después de 3 rondas de enriquecimiento la población de células expresoras se enriqueció en un 30 a 50 % (Figura 17). La población enriquecida de células expresoras sirvió para obtener clonas que expresan tanto al betaglicano silvestre como a las mutantes. Las clonas fueron analizadas por FACS (Figura 18). Los datos obtenidos de los análisis por FACS muestran un incremento en el nivel de fluorescencia con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (células pcDNA3) que indica la presencia del betaglicano en la superficie celular. Como control positivo se utilizó la clona LBG22 [76]. La clona LBG22 se construyó en mioblastos de rata L6E9. Esta clona expresa establemente al betaglicano de rata silvestre que carece de epítipo c-myc. Este análisis permitió seleccionar clonas con altos niveles de expresión de betaglicano. Las clonas seleccionadas fueron caracterizadas en su capacidad de unir y responder a TGF- $\beta$ .

**Las clonas de L6E9 transfectadas con el c-myc-betaglicano unen TGF- $\beta$ .** El análisis de FACS de las clonas de células L6E9 transfectadas con el c-myc-betaglicano mostró que estas células expresan la moléculas en la superficie. Para comprobar la funcionalidad de la molécula, las clonas se probaron en su capacidad de unir TGF- $\beta$ . Para esto, las células se marcaron por afinidad con 100 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta 2$ . Los extractos celulares conteniendo los diferentes productos marcados se dividieron en dos partes. Una parte del extracto se separó



**Figura 17. Análisis por citometría de flujo de células L6E9 transfectadas con los c-myc-beta-galactosidos. Enriquecimiento por MACS.** Las células se marcaron con el antisuero anti beta-galactosido # 822 y se enriquecieron por citometría magnética (MACS). La figura muestra los resultados de cada ronda de enriquecimiento de las células con el c-myc-beta-galactosido y las mutantes Δ10, Δ11 y gag<sup>-</sup>. Las células pcDNA3 corresponde a las transfectadas con el plásmido vacío. El incremento en el número de células positivas en cada ronda de enriquecimiento se aprecia en el eje horizontal como un desplazamiento del pico hacia la derecha. (La primera columna corresponde a las células después de varios pases posteriores a la transfección, sin enriquecer por MACS).



**Figura 18. Análisis por citometría de flujo de clonas de células L6E9 que expresan el c-myc-beta-galactosilvestre y las mutantes c-myc  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$ .** Las células se marcaron con el antisuero anti beta-galactosilvestre # 822 y se analizaron por citometría de flujo (FACS). La figura muestra los resultados del análisis de cuatro clonas que expresan al c-myc-beta-galactosilvestre y dos clonas que expresan las mutantes c-myc  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$ . El pico en blanco representa la imagen de las células control pcDNA3 transfectadas con el plásmido vacío. El desplazamiento horizontal del pico en negro hacia la derecha con respecto al pico en blanco representa un incremento de células que expresan al beta-galactosilvestre. Como control se incluyó la clona LBG22.

directamente en geles SDS-PAGE (extracto total) y se visualizaron en “*Phosphorimager*” (Figura 19). La otra parte fue inmunoprecipitada con el antisuero # 822, contra el ectodominio del betaglicano, separada en geles SDS-PAGE y visualizados en “*Phosphorimager*” (Figura 20).

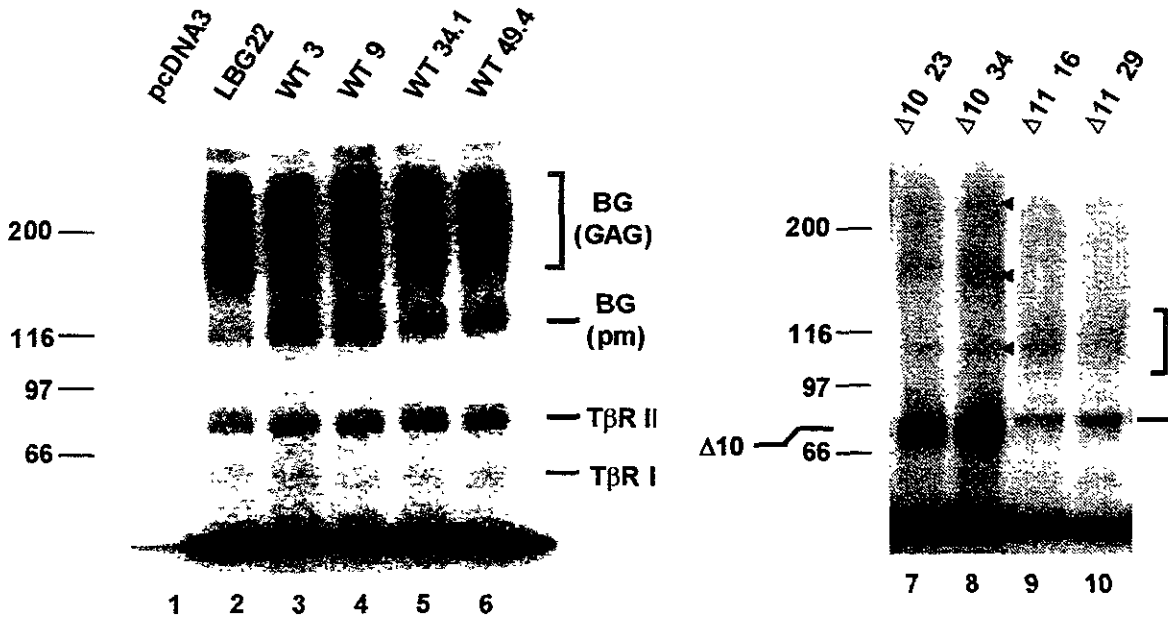
Los geles que contienen los extractos totales muestran que a 100 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 el marcado de las células pcDNA3 es nulo. El c-myc-betaglicano aparece como un barrido de mas de 200 kDa que corresponde al proteoglicano que contiene las cadenas de glicosaminoglicanos, además de una proteína medular de 120 kDa (carriles 2-6, Figura 19). Como control positivo se utilizó la clona LBG22 que muestra un patrón semejante (carril 2, Figura 19). Por otro lado, tanto las células que expresan el c-myc-betaglicano como las LBG22 mostraron un incremento en el marcado del receptor tipo II de TGF- $\beta$  endógeno.

Este efecto no se observa en las células pcDNA3 que carecen de betaglicano, y por lo tanto no pueden incrementar la afinidad del TGF- $\beta$ 2 por el receptor tipo II (carril 1 Figura 19). Las clonas de las mutantes  $\Delta$ 10 (carriles 7 y 8 Figura 19) y  $\Delta$ 11 (carriles 9 y 10 Figura 19) aparecen como proteínas medulares de aproximadamente 85 y 95 kDa de peso molecular respectivamente. La mutante  $\Delta$ 11 aparece también como proteoglicano de 120 kDa, ya que conserva los residuos de serina 535 y 546. La mutante  $\Delta$ 10 muestra productos de alto peso molecular que resultan de formas diméricas y oligoméricas del receptor. (Figura 19 y 20 carriles 7 y 8, triángulos). En las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 no se aprecia el aumento del marcado del receptor tipo II debido los pesos moleculares son semejantes, quedando enmascarado el receptor tipo II.

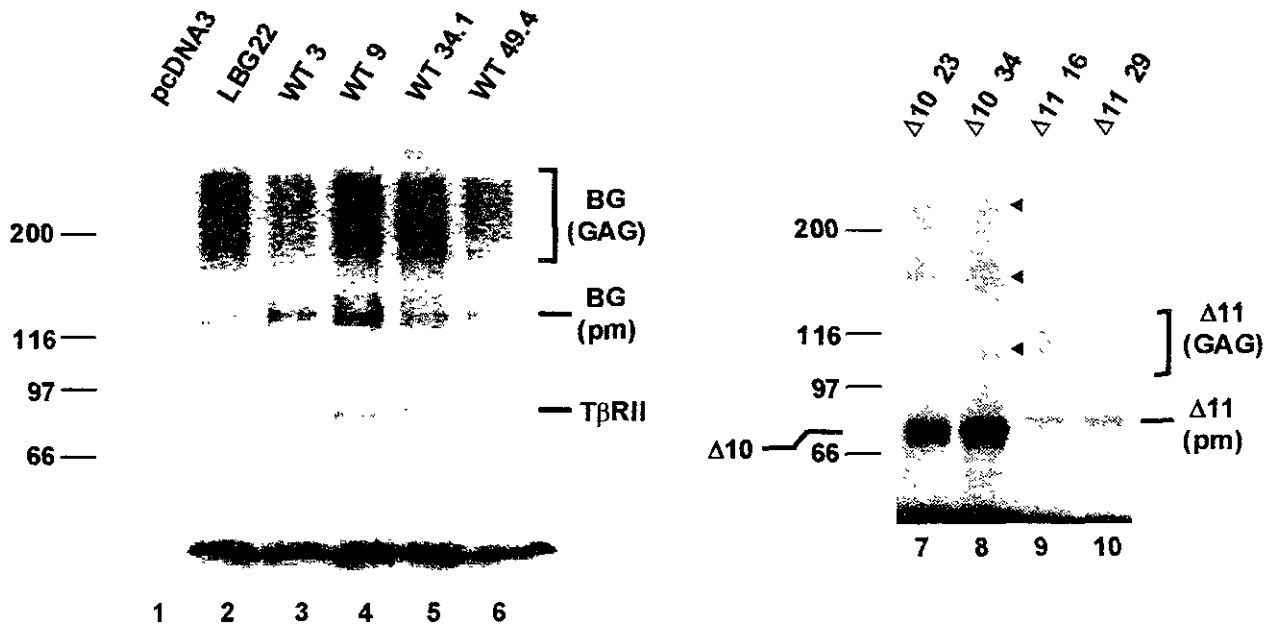
Los geles de los extractos inmunoprecipitados con el antisuero anti betaglicano # 822 mostraron una imagen semejante a los geles de los extractos totales (Figura 20). Cabe mencionar que el betaglicano y el receptor tipo II de TGF- $\beta$  forman un complejo inmunoprecipitable en presencia del TGF- $\beta$  [76]. Esto explica el marcado del receptor tipo II en estos geles (Figura 20).

En conclusión, las clonas de células L6E9 que expresan establemente al c-myc betaglicano y sus mutantes en la superficie celular, fueron capaces de unir  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2. La presencia del betaglicano silvestre y el TGF- $\beta$  en estas células favorece la formación del “complejo de presentación” con el receptor tipo II. Este complejo se demostró por coimmunoprecipitación con anticuerpos contra el betaglicano.





**Figura 19. Marcado por afinidad de clones de células L6E9 que expresan los c-myc-betaglicanos (Extracto total).** Las células se marcaron con 100 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2. Los extractos celulares se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en "Phosphorimager". El carril 1 muestra el marcado de las células control transfectadas con el vector vacío. El carril 2 corresponde a las células LBG22 usadas como control positivo. Los carriles 3-6 corresponden a las clonas que expresan el c-myc-betaglicano silvestre. Los carriles 7, 8 y 9, 10, corresponden a clonas que expresan la mutante c-myc  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 respectivamente. Se muestra, la posición de los marcadores de peso molecular, y de formas oligoméricas entrecruzadas de  $\Delta$ 10, triángulos (▲). BG, betaglicano. GAG, glicosaminoglicanos. pm, proteína medular. TβRI, receptor tipo I de TGF- $\beta$ . TβRII, receptor tipo II de TGF- $\beta$ .

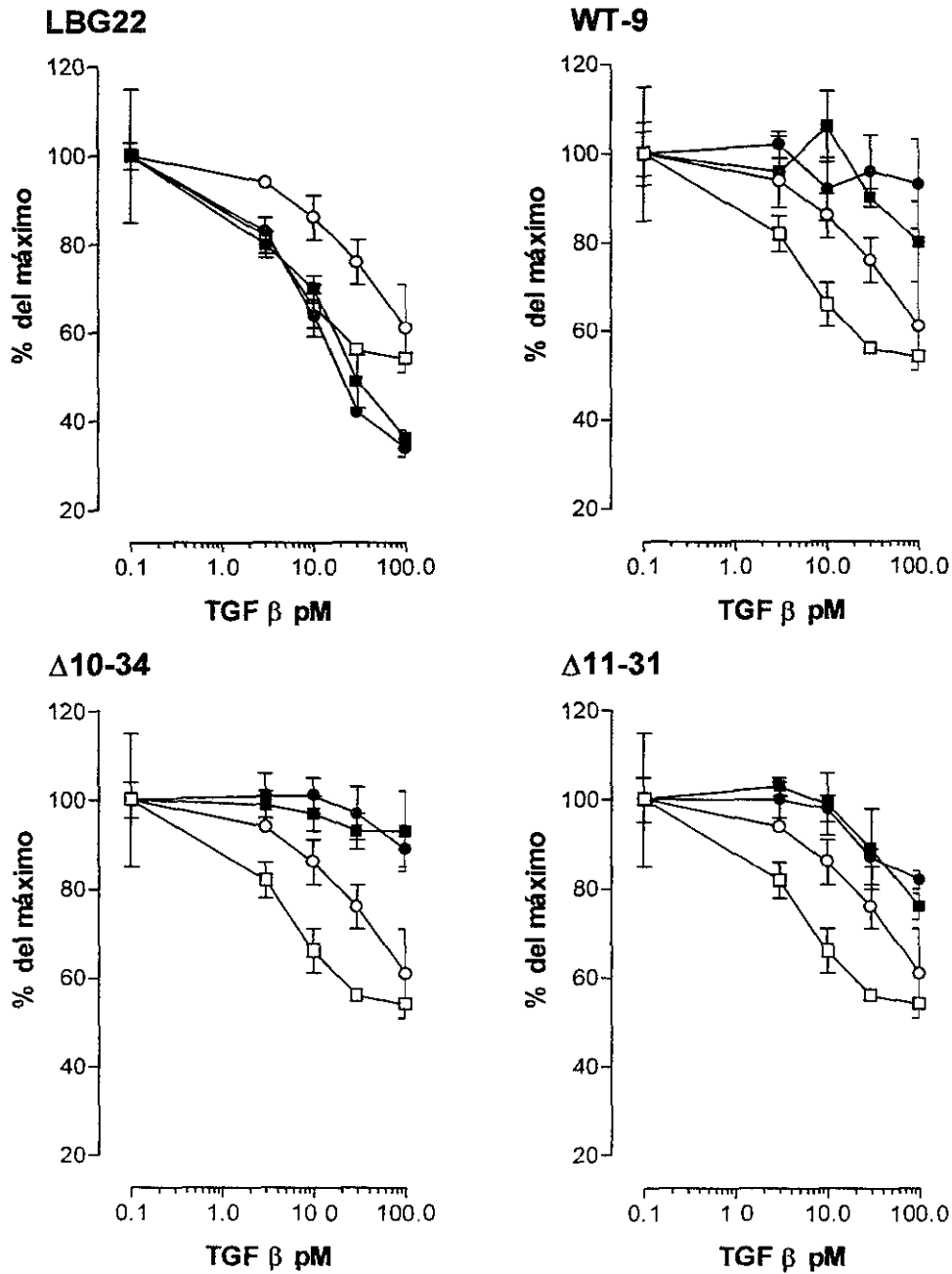


**Figura 20. Marcado por afinidad de clones de células L6E9 que expresan el c-myc-betaglicano. (Extracto inmunoprecipitado).** Las células se marcaron con 100 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con antisuero # 822 contra el ectodominio del betaglicano. El inmunoprecipitado se separó en geles SDS-PAGE y se analizaron en "Phosphorimager". El carril 1 muestra el marcado de las células control transfectadas con el vector vacío. El carril 2 corresponde a las células LBG22 usadas como control positivo. Los carriles 3-6 corresponden a las clones que expresan el c-myc-betaglicano. Los carriles 7, 8 y 9, 10, corresponden a clones que expresan la mutante c-myc  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 respectivamente. Se muestra, la posición de los marcadores de peso molecular, y de formas oligoméricas entrecruzadas de  $\Delta$ 10, triángulos (▲). BG, betaglicano. GAG, glicosaminoglicanos. pm, proteína medular. T $\beta$ RII, receptor tipo II de TGF- $\beta$ .

**Las células L6E9 que expresan establemente al c-myc-betaglicano no responden a TGF- $\beta$ .** Las clonas de células L6E9 que expresan en su superficie al c-myc-betaglicano y las diferentes mutantes se evaluaron en su capacidad de respuesta a TGF- $\beta$ . Las células se probaron en ensayos de inhibición de crecimiento, y activación de la vía de transducción de señal del TGF- $\beta$ , específicamente la fosforilación de Smad2.

Ensayo de Inhibición de Crecimiento. El TGF- $\beta$ 2, a diferencia del TGF- $\beta$ 1, requiere del betaglicano para unirse al receptor tipo II con alta afinidad. Por lo tanto, las células L6E9 son poco sensibles al TGF- $\beta$ 2 en ausencia del betaglicano. La expresión de betaglicano en estas células elimina las diferencias entre isoformas de TGF- $\beta$ , haciendo al TGF- $\beta$ 2 tan potente como el TGF- $\beta$ 1 [76]. Para evaluar la respuesta de las transfectantes estables de betaglicano a TGF- $\beta$  se ensayo la inhibición de crecimiento por TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2. Las clonas de células L6E9 se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de TGF- $\beta$  por 20 hs. La inhibición en el crecimiento celular se midió por la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -deoxiuridina incorporada a DNA. Como control positivo se utilizó la clona LBG22. Como control negativo se utilizaron las células transfectadas con el vector vacío (células pcDNA3). Los resultados con las células pcDNA3 mostraron que el TGF- $\beta$ 1 es un potente inhibidor del crecimiento celular ( $\text{ED}_{50} = 8 \text{ pM}$ ), sin embargo, el TGF- $\beta$ 2 resultó ser aproximadamente 10 veces menos potente (Figura 21). Las células LBG22 que expresan el betaglicano silvestre mostraron un incremento de 10 veces en la sensibilidad a TGF- $\beta$ 2 sobre las células pcDNA3, además de mantener su sensibilidad a TGF- $\beta$ 1. Los resultados con las clonas de las células L6E9 que expresan al c-myc-betaglicano y las mutantes fueron completamente inesperados. Todas las clonas ensayadas fueron refractarias a la inhibición de crecimiento por TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2. Las células no inhibieron su crecimiento inclusive a 100 pM, la concentración mas alta empleada (Figura 21).

Ensayo de Fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ . Las clonas de células L6E9 que fueron transfectadas con el c-myc-betaglicano o con las diferentes mutantes, no respondieron a TGF- $\beta$  en el ensayo de inhibición de crecimiento. Por lo tanto, se decidió probar las clonas con el c-myc betaglicano en un ensayo de fosforilación de Smad2. Para



**Figura 21. Ensayo de inhibición de crecimiento TGF-β en células L6E9.** Las células L6E9 se trataron con concentraciones crecientes de TGF-β1 (cuadros) o TGF-β2 (círculos). Las células pcDNA3 (símbolos abiertos) se emplearon como control negativo. La clona LBG22, expresa al betaglicano silvestre. La clona WT 9 expresa al c-myc-betaglicano: Las clonas Δ10-34 y Δ11-31 expresan las mutantes c-myc del betaglicano. Los resultados se muestran como % del máximo de crecimiento en ausencia de TGF-β (0 pM).

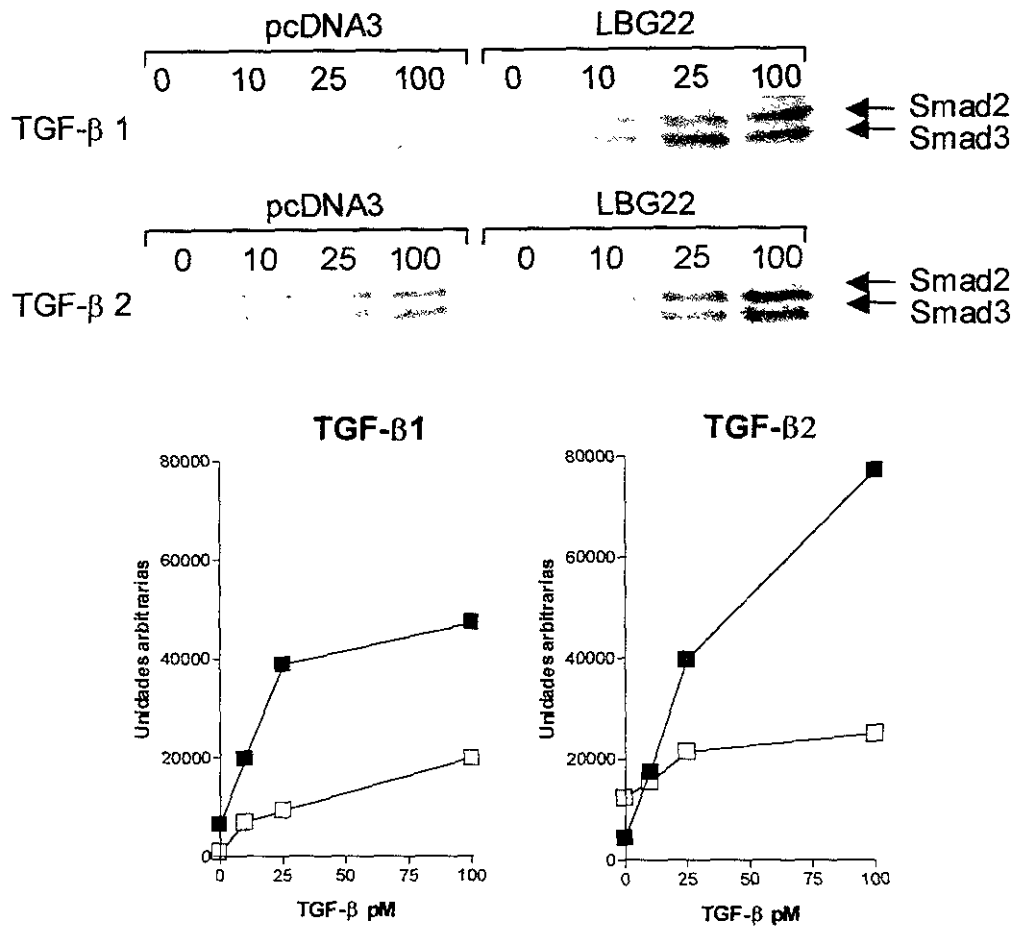
esto, las clonas de las células L6E9 se incubaron en medio sin fosfatos adicionado de  $^{32}\text{P}$  por 2 hs. Posteriormente, se trataron con diferentes concentraciones picomolares de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 y se incubaron a 37 °C por 30 min. Las células se lisaron y los extractos se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE. Como control positivo se utilizó la clona LBG22 y como control negativo la clona pcDNA3. Las células LBG22 mostraron un nivel de fosforilación de Smad2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1 dos veces mayor al que se obtuvo con las células pcDNA3. Cuando las células LBG22 se trataron con TGF- $\beta$ 2 el nivel de fosforilación de Smad2 se incrementó, siendo tres veces mayor que el observado con las células control pcDNA3 (Figura 22). Por otro lado, el nivel de fosforilación de Smad2 en las clonas de células L6E9 que expresan el c-myc-betaglicano no sufrió cambio cuando se trataron con TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2. El nivel de fosforilación en estas clonas no es mayor que el nivel basal que se obtuvo en ausencia de TGF- $\beta$  (Figura 23).

En conclusión, las células con el c-myc-betaglicano fueron negativas al tratamiento con TGF- $\beta$  en los ensayos de inhibición de crecimiento, y fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ . Cabe mencionar que esta falta de respuesta a TGF- $\beta$  se observó solamente en las clonas de células que expresan la versión del betaglicano con epítipo de c-myc.

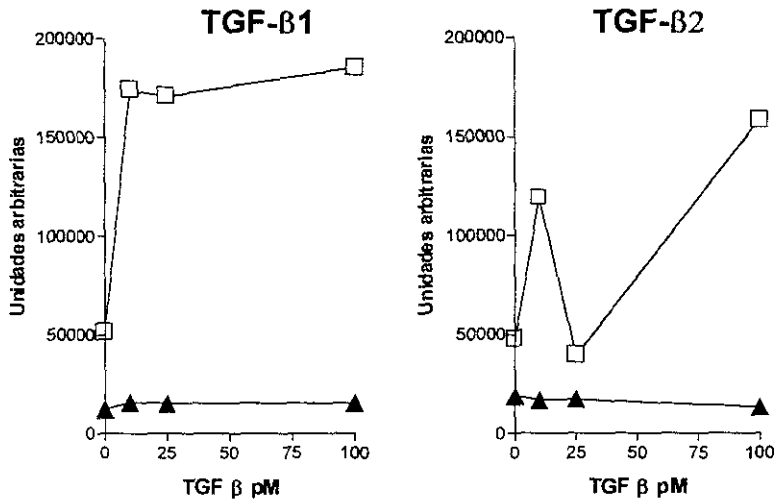
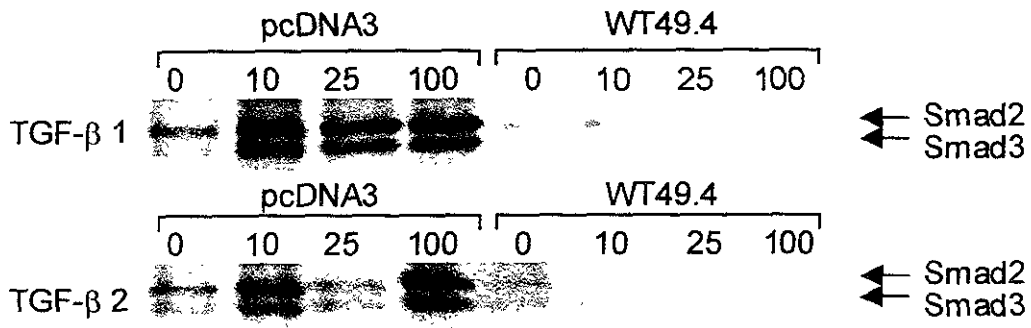
Este hecho hizo necesario crear nuevas versiones del betaglicano silvestre y de las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 carentes del epítipo c-myc que pudieran ser utilizadas en ensayos funcionales. Estas mutantes fueron transfectadas en células COS1 para su expresión transitoria y caracterizadas en su capacidad de unir TGF- $\beta$ 2 y su afinidad relativa de unión de ligando. Posteriormente los cDNAs del betaglicano silvestre y de las nuevas mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 carentes del epítipo c-myc fueron transfectadas en células L6E9 para su expresión estable. Las transfectantes estables de células L6E9 se evaluaron en su capacidad de realizar la función de presentación del TGF- $\beta$ 2 y en su capacidad de potenciar el efecto del TGF- $\beta$ 2.

### **Las regiones $\Delta$ 10 y $\Delta$ 11 unen TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 con afinidad relativa similar al betaglicano silvestre.**

El primer paso en la caracterización de las nuevas versiones carentes de epítipo c-myc de las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 fue evaluar su capacidad de unir TGF- $\beta$ 2. Para esto, células COS-1



**Figura 22. Fosforilación de Smad2 dependiente de TGF-β en células L6E9 transfectadas con el betaglicano silvestre .** Las células pcDNA3 (cuadros abiertos) y las LBG22 (cuadros cerrados) fueron incubadas en medio de cultivos sin fosfatos que contenía 250  $\mu$ Ci por mL de  $^{32}$ P por dos horas y posteriormente tratadas con concentraciones picomolares (pM) de TGF-β1 y TGF-β2 por 30 min a 37 °C. Después del tratamiento, los cultivos se enfriaron y lisaron en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los extractos celulares se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en "Phosphorimager". La gráfica muestra la cuantificación de las bandas de Smad2 en los geles de SDS-PAGE. Se indica la posición de Smad2 en los geles.



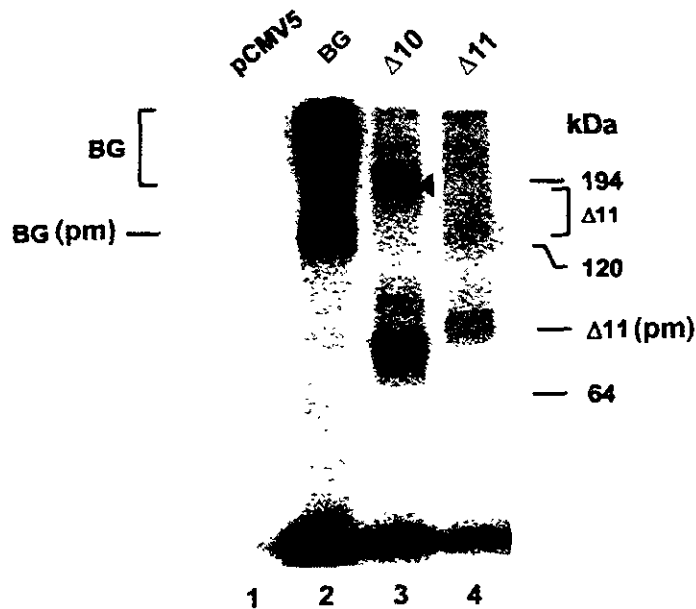
**Figura 23. Fosforilación de Smad2 dependiente de TGF-β en células L6E9 transfectadas con el c-myc-betaglicano.** Las células pcDNA3 (cuadros abiertos) y la clona WT 49.4 (triángulos cerrados) fueron incubadas en medio de cultivos sin fosfatos que contenía 250 μCi por mL de <sup>32</sup>P por dos horas y posteriormente tratadas con concentraciones picomolares (pM) de TGF-β1 y TGF-β2 por 30 min a 37 °C. Después del tratamiento, los cultivos se enfriaron y lisaron en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los extractos celulares se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en “Phosphorimager”. La gráfica muestra la cuantificación de las bandas de Smad2 en los geles de SDS-PAGE. Se indica la posición de Smad2 en los geles.

fueron transfectadas con las mutantes del betaglicano carentes de epítotope c-myc para su expresión transitoria. Las células fueron marcadas por afinidad con  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2. Los diferentes productos marcados fueron inmunoprecipitados y separados en geles SDS-PAGE y visualizados por autorradiografía (Figura 24). El betaglicano silvestre aparece como proteoglicano, un producto con cadenas de glicosaminoglicanos que se observa como un barrido de más de 200 kDa, además de una proteína medular de 120 kDa (Figura 24, carril 2). La mutante  $\Delta$ 10 carece del sitio de anclaje de las cadenas de GAG, por lo que aparece como proteína medular de aproximadamente 85 kDa (Figura 24 carril 3). La mutante  $\Delta$ 10 muestra un producto de alto peso molecular que resulta de entrecruzamiento de formas oligoméricas del receptor [73, 85]. La mutante  $\Delta$ 11 aparece tanto como una proteína medular de aproximadamente 95 kDa, y como proteoglicano que se observa como un barrido de entre 120-194 kDa (Figura 24 carril 4). Esto se esperaba, ya que la mutante  $\Delta$ 11 conserva los residuos de serina 535 y 546. El análisis por marcado por afinidad del betaglicano silvestre y las nuevas mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 carentes de epítotope c-myc confirman que son capaces de unir TGF- $\beta$ .

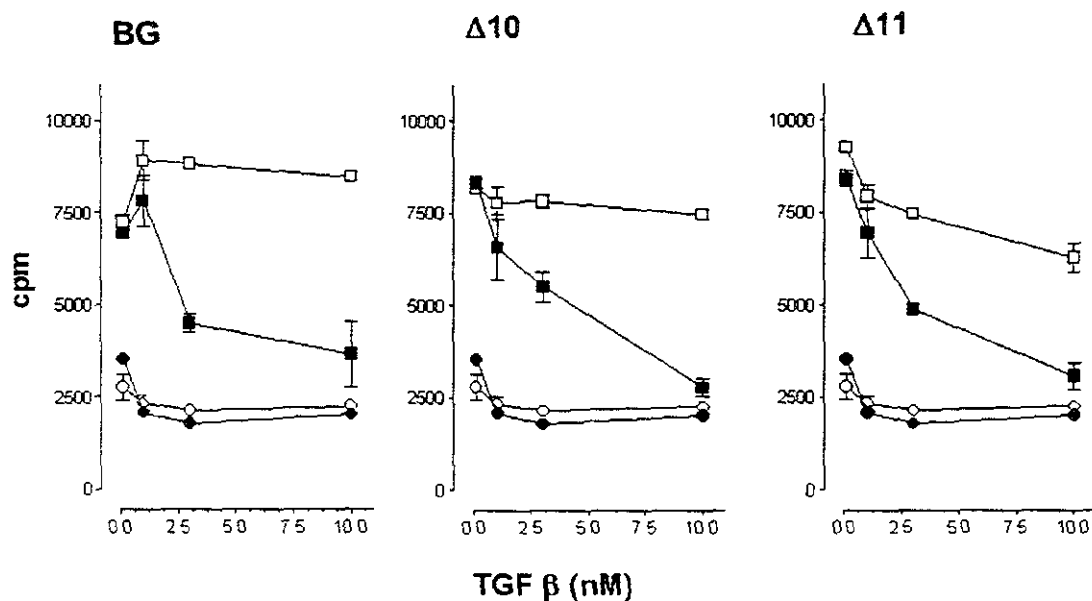
El siguiente paso en la caracterización de las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 consistió en evaluar la capacidad de unir TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en ensayos de competencia. Para esto, células COS-1 fueron transfectadas con las construcciones en pCMV5 del betaglicano silvestre y las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 carentes de epítotope c-myc y sujetas a ensayo de unión de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 en presencia de concentraciones crecientes de competidor frío (TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2). Los resultados muestran que para el betaglicano silvestre aproximadamente 3 nM de TGF- $\beta$ 2 frío inhibe al 50 % la unión de 50 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2, sin embargo, la competencia con TGF- $\beta$ 1 frío no afecta la unión, aun a concentraciones del intervalo de 10 nM (Figura 25, BG). Las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 mostraron patrones de competencia y de unión de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 similares al receptor silvestre, mostrando una afinidad relativa a las isoformas de TGF- $\beta$  similar al betaglicano silvestre (Figura 25,  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11).

Para demostrar que los patrones de unión de TGF- $\beta$  son intrínsecos a las regiones E y U del ectodominio del betaglicano representadas por las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11, se llevaron a cabo ensayos de unión y competencia de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 a formas solubles del betaglicano. Las





**Figura 24. Unión de TGF- $\beta$  por mutantes del betaglicano.** Células COS-1 fueron transfectadas en forma transitoria con el vector de expresión vacío (pCMV5), o la mutantes del betaglicano indicadas. Al segundo día posterior a la transfección los cultivos fueron marcados por afinidad con 200 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2. Los lisados de las células fueron inmunoprecipitados con el antisuero anti-betaglicano # 822 generado contra el ectodominio del betaglicano. Los inmunoprecipitados fueron analizados por SDS-PAGE y visualizados por imagen de "Phosphorimager" de los geles. Se indica la migración de los patrones de peso molecular (kDa) y la posición de oligómeros generados por entrecruzamiento de algunos de los receptores mutantes (triángulos). BG, betaglicano. pm, proteína medular.



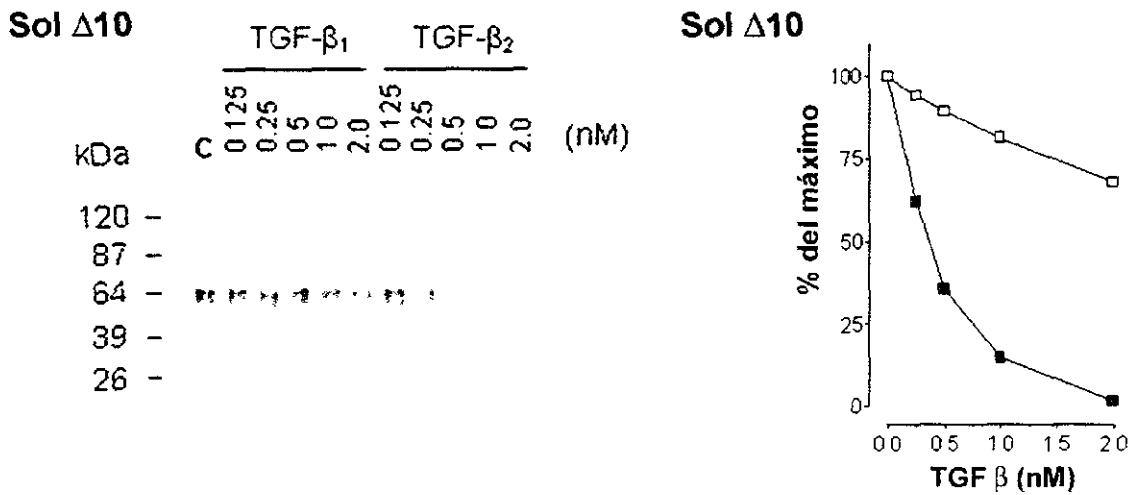
**Figura 25. Competencia específica de unión de TGF- $\beta$  en las mutantes de betaglicano.** Células COS-1 fueron transfectadas en forma transitoria con el vector de expresión vacío pCMV5, (círculos) o los vectores de los betaglicanos indicados carentes de epítopo c-myc (cuadros). Un día después de la transfección las células se sembraron en placas de 24 pozos para el ensayo. Al siguiente día las células se marcaron con 50 pM de  $^{125}$ I-TGF- $\beta$ 2 en presencia de 0, 1, 3, 10 nM de TGF- $\beta$ 1 frío (símbolos abiertos) o TGF- $\beta$ 2 (símbolos cerrados). BG, betaglicano silvestre.

formas solubles de las mutantes se generaron a partir de cepas de baculovirus cuyos productos proteicos pueden ser purificados del medio condicionado de células de insecto infectadas. Las proteínas solubles  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  poseen una cola de hexahistidina en el extremo carboxilo terminal lo que permite purificarlas a homogeneidad por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Las proteínas solubles  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  fueron sometidas en solución a marcado por afinidad con 250 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta 2$  y cantidades crecientes (0 a 2 nM) de competidor frío (TGF- $\beta 1$  o TGF  $\beta 2$ ). Las proteínas  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  solubles son glicoproteínas con un Mr de 52 ( $\Delta 10$ ) y 63 ( $\Delta 11$ ) kDa, que después de marcarse migran alrededor de la banda del marcador de 64 kDa (Figura 26 y 27). La cantidad de  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  soluble marcada en presencia de competidor frío (TGF- $\beta 1$  o TGF- $\beta 2$ ) se cuantificó a partir de geles SDS-PAGE que fueron analizados en "Phosphorimager". Los datos del análisis se graficaron como porcentaje de unión en la competencia con respecto al control (% del máximo), contra la concentración de competidor frío (Figura 26 y 27, panel derecho). En forma similar a lo observado en sus contrapartes de membrana, la concentración de TGF- $\beta 2$  que inhibe la unión de ligando radioactivo, es al menos un orden de magnitud menor comparado con TGF- $\beta 1$ . En conjunto los resultados sugieren que las afinidades relativas de los receptores de membrana y las formas solubles de  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  para el TGF- $\beta 1$  y TGF- $\beta 2$  son muy similares entre ellos y con betaglicano silvestre.

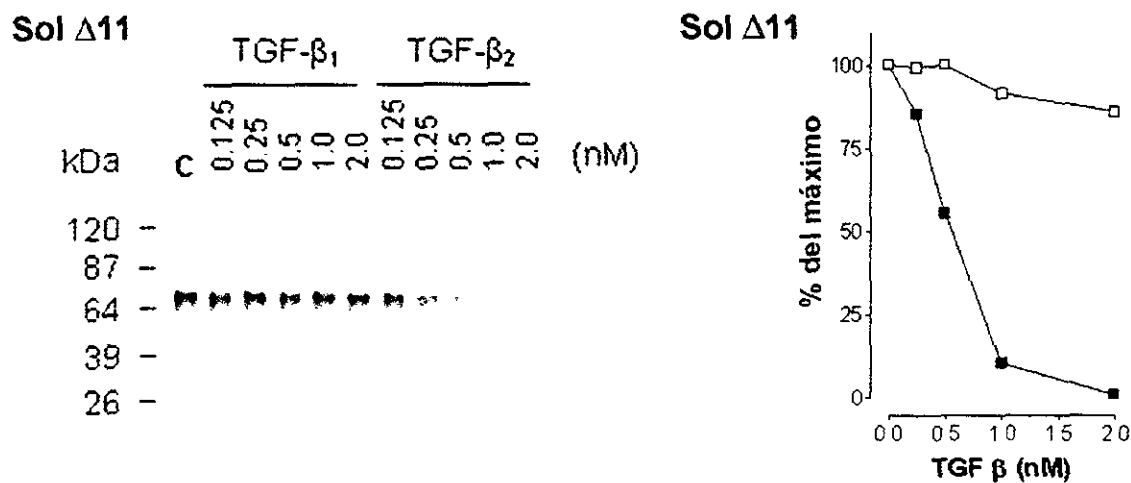
#### **Presentación de TGF- $\beta 2$ por las mutantes $\Delta 10$ y $\Delta 11$ del betaglicano carentes de epítotope de myc.**

Los ensayos de afinidad mostraron que las nuevas versiones de las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  unen TGF- $\beta 2$  con una afinidad semejante a la del receptor intacto. Ya que se comprobó que estas mutantes carentes de epítotope c-myc eran capaces de unir TGF- $\beta$ , se decidió generar transfectantes estables con estas construcciones. Las células L6E9 fueron transfectadas con el betaglicano silvestre y las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  carentes de epítotope c-myc. La población de células que expresaban betaglicano o las mutantes fue enriquecida por MACS, como se mencionó anteriormente.

Las nuevas células que expresan establemente al betaglicano o las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  carentes de epítotope c-myc fueron probadas en su función de presentación al receptor



**Figura 26. Competencia específica de unión de TGF-β en las mutantes solubles de betaglicano.** Proteína purificada soluble (50 ng por ensayo) de Δ10 (Sol Δ10) fue marcada por afinidad en solución con 100 pM de <sup>125</sup>I-TGF-β2 en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de competidor frío (TGF-β1 o TGF-β2). El ligando se entrecruzó con disuccinimidilsuberato y la reacción se neutralizó con Tris-Cl. La proteína se inmunoprecipitó con antisuero anti betaglicano # 822, se analizó en geles de SDS-PAGE y se visualizó en “Phosphorimager” (panel izquierdo). La gráfica (panel derecho), muestra los datos del análisis de los geles. Los datos se graficaron como porcentaje de unión de <sup>125</sup>I-TGF-β2, con respecto al control (% del máximo), contra concentración de competidor frío, TGF-β1 (cuadros abiertos), o TGF-β2 (cuadros cerrados). C, control.

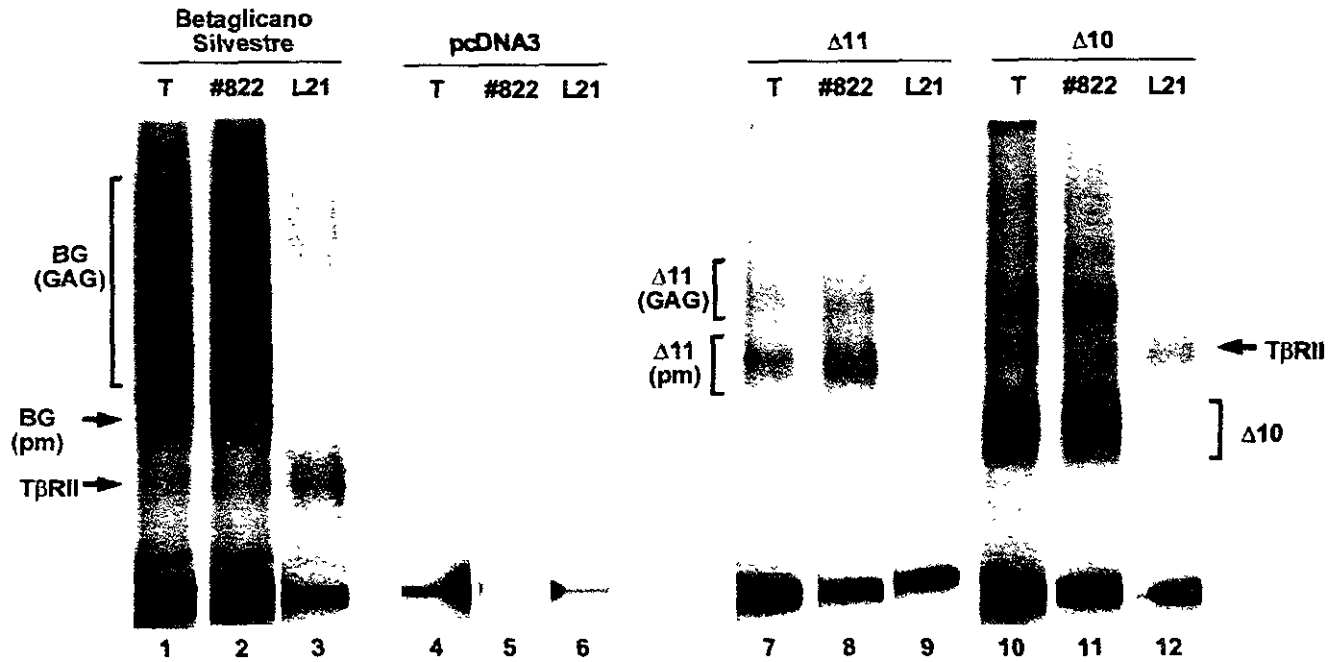


**Figura 27. Competencia específica de unión de TGF-β en las mutantes solubles de betaglicano.** Proteína purificada soluble (50 ng por ensayo) de Δ11 (Sol Δ11) fue marcada por afinidad en solución con 100 pM de <sup>125</sup>I-TGF-β2 en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de competidor frío (TGF-β1 o TGF-β2). El ligando se entrecruzó con disuccinimidilsuberato y la reacción se neutralizó con Tris-Cl. La proteína se inmunoprecipitó con antisuero anti betaglicano # 822, se analizó en geles de SDS-PAGE y se visualizó en "Phosphorimager" (panel izquierdo). La gráfica (panel derecho), muestra los datos del análisis de los geles. Los datos se graficaron como porcentaje de unión de <sup>125</sup>I-TGF-β2, con respecto al control (% del máximo), contra concentración de competidor frío, TGF-β1 (cuadros abiertos), o TGF-β2 (cuadros cerrados). C, control.

endógeno tipo II de TGF- $\beta$ . Esto para confirmar que esta función no depende del epítipo c-myc presente en los receptores previamente ensayados. Las poblaciones enriquecidas se marcaron por afinidad con 150 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 y los productos marcados se recuperaron por inmunoprecipitación bajo condiciones no desnaturalizantes (Figura 28). A esta concentración de TGF- $\beta$ , el nivel de marcado de las células L6E9 control es prácticamente nulo (Figura 28, carril 4-6). Por otro lado la expresión del betaglicano silvestre resultó en un incremento considerable en el marcado del receptor tipo II endógeno (Figura 28, comparar carril 3 y 6). Este efecto, previamente observado, se debe a un incremento en la afinidad relativa del receptor tipo II endógeno por el TGF- $\beta$ 2 en presencia del betaglicano, mas que un aumento en la cantidad de receptor [75, 76]. También en presencia de TGF- $\beta$ 2 el receptor II endógeno forma un complejo con el betaglicano [76] que puede demostrarse por coimmunoprecipitación con anticuerpos contra el receptor (Figura 28, carril 2-3). En este ensayo, la mutante  $\Delta$ 10 fue capaz de incrementar el marcado con TGF- $\beta$ 2 del receptor tipo II endógeno y formar un complejo inmunoprecipitable (Figura 28, carril 10-12). Sin embargo, en forma similar a lo observado en las células COS-1, la mutante  $\Delta$ 11 une TGF- $\beta$ 2 eficientemente, pero no puede incrementar el marcado del receptor tipo II (Figura 28, carril 7-9).

### **Ambas regiones del ectodominio del betaglicano son capaces de promover la fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ 2.**

Los datos obtenidos en los experimentos con las células L6E9 confirman que la función de presentación del betaglicano es una propiedad de la región E (representada por la mutante  $\Delta$ 10). Para evaluar la posibilidad de que la región E fuera la responsable de potenciar la señal de TGF- $\beta$ 2, se decidió probar como influye la expresión de las mutantes  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 en la fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ 2 en células L6E9. La fosforilación de Smad2 es uno de los primeros eventos en la señalización por TGF- $\beta$  y puede mostrar más directamente si la función de presentación tiene algún efecto en la vía de TGF- $\beta$  [37]. También, para descartar cualquier efecto clonal, decimos emplear las poblaciones enriquecidas de transfectantes estables en células L6E9 y como control negativo adicional las células L6E9 sin transfectar. Estas células se trataron con 20 pM de TGF- $\beta$ 2 por 15 min,



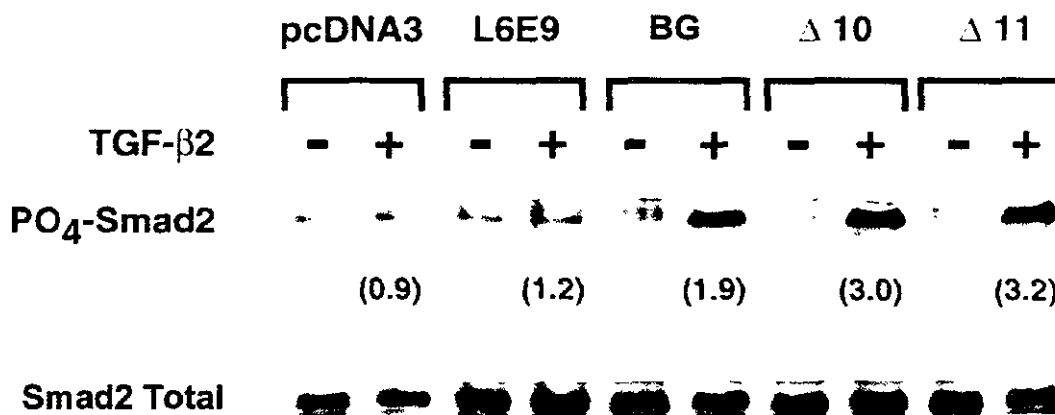
**Figura 28. Presentación de TGF-β2 por mutantes de betaglicano.** Cultivos de células L6E9 transfectadas en forma estable con las mutantes de betaglicano carentes de epítipo c-myc o con el vector de expresión vacío (pcDNA3), fueron marcados por afinidad con 150 pM <sup>125</sup>I-TGF-β2. Los lisados celulares fueron divididos para ser inmunoprecipitados con el antisuero anti-betaglicano # 822, o el anticuerpo anti-TβRII (L21, Santa Cruz). Los inmunoprecipitados, así como el lisado total, se analizaron en SDS-PAGE y se visualizaron en "Phosphorimager" a partir de los geles. BG, betaglicano. GAG, glicosaminoglicanos. pm, proteína medular. TβRII, receptor tipo II de TGF-β. T, extracto total.

los lisados celulares se separaron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El análisis de la membrana se hizo por "Western Blot" con antisuero que reconoce la forma fosforilada de Smad2 [101]. La señal de Smad2 fosforilada fue normalizada usando como referencia la señal de Smad2 total obtenida con un antisuero que reconoce todas las formas de Smad2 [102]. En las células L6E9 no transfectadas o en las células transfectadas con el vector vacío (pcDNA3) no se observó un incremento en la fosforilación basal de Smad2. Por otro lado, la expresión del betaglicano silvestre causó un incremento de 1.9 veces en la fosforilación de Smad2. Sin embargo, la expresión de las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  causó un incremento de 3 y 3.2 veces respectivamente en la fosforilación de Smad2 (Figura 29). Estos resultados son representativos de un total de tres ensayos independientes. En conclusión, el betaglicano silvestre como las regiones de unión de TGF- $\beta$  expresadas por separado son igualmente capaces de potenciar la fosforilación de Smad2 inducida por TGF- $\beta 2$ . Cabe mencionar que el bajo nivel de respuesta observado en las clonas que expresan establemente las versiones del betaglicano con epítotope c-myc no se observó en la nueva generación de mutantes que carecen del epítotope. Esto hace suponer que la baja respuesta de las clonas con moléculas con epítotope c-myc es debido a la presencia de este.

### **La capacidad del betaglicano de unir inhibina A reside en la región U.**

Recientemente se ha descrito que el betaglicano une inhibina A, potencia la unión de inhibina A al receptor tipo II de activina y establece un complejo betaglicano-inhibina A-receptor tipo II que media el antagonismo de activina [84]. Con base en lo anterior, se decidió determinar si la capacidad de unión de inhibina A del betaglicano es una propiedad del ectodominio completo, o esta restringida a alguna de las 2 regiones de unión de TGF- $\beta$ . Para esto, células COS-1 fueron transfectadas con el betaglicano silvestre o sus mutantes carentes de epítotope c-myc, en ausencia o en presencia del receptor tipo II de activina y se cuantificó la unión de  $^{125}\text{I}$ -inhibin A. La Tabla I muestra las cuentas por min de células marcadas con  $^{125}\text{I}$ -inhibin A en un experimento representativo de un total de tres. Las células transfectadas con el betaglicano silvestre o el betaglicano gag<sup>-</sup> tuvieron una unión de  $^{125}\text{I}$ -inhibin A mayor que las células transfectadas con el vector vacío. Estos resultados coinciden con los publicados previamente [84], e indican que las cadenas de





**Figura 29. Las mutantes del betaglicano pueden potenciar el efecto del TGF-β2.** Cultivos de células L6E9 silvestres, o células L6E9 transfectadas en forma estable con las mutantes del betaglicano, o el vector de expresión vacío (pcDNA3), fueron tratadas con 20 pM de TGF-β2 (+) o con medio solo (-), DMEM 0.2 % SFB) por 15 min a 37 °C. Inmediatamente después del tratamiento, los cultivos fueron enfriados y lisados en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Cantidades equivalentes de los lisados celulares fueron analizados en SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa para revelarse por “Western Blot” usando anticuerpos que reconocen Smad2 (Smad2 Total) o específicamente la forma fosforilada (PO<sub>4</sub>-Smad2). Los números en paréntesis indican el incremento en la fosforilación de Smad2 por el tratamiento con TGF-β2, con respecto al nivel de fosforilación basal. BG, betaglicano.

**Tabla I. Mutantes de betaglicano y su capacidad de unir inhibina A**

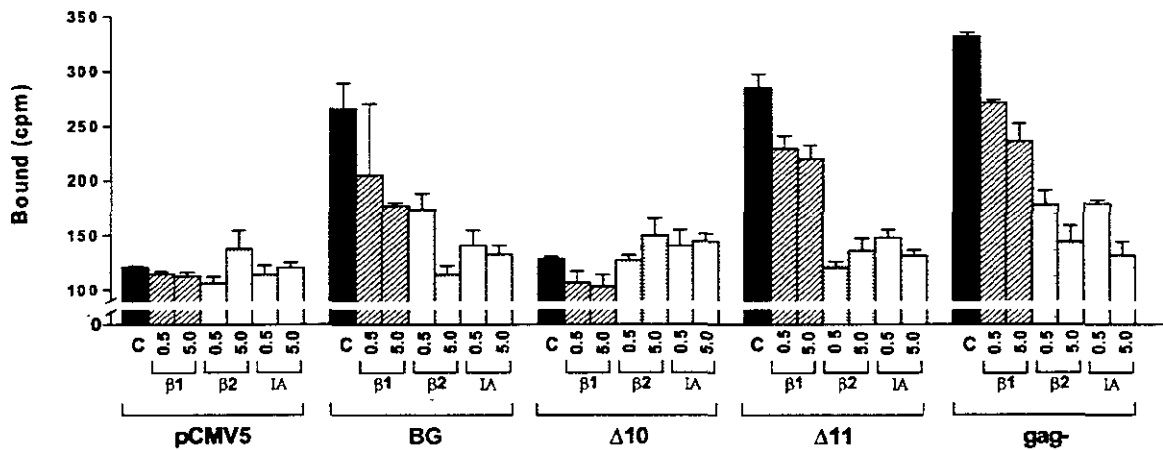
<b>Unión de inhibina A por mutantes de betaglicano</b>				
<b>pCMV5 (control)</b>	<b>BG</b>	<b>Δ10</b>	<b>Δ11</b>	<b>gag<sup>-</sup></b>
<b>1,918 (1.0)</b>	<b>4,333 (2.3)</b>	<b>1,722 (0.9)</b>	<b>8,070 (4.2)</b>	<b>9,475 (4.9)</b>
<b>Unión de inhibina A por mutantes de betaglicano en presencia del ActRII</b>				
<b>pCMV5 (control) ActRII</b>	<b>BG ActRII</b>	<b>Δ10 ActRII</b>	<b>Δ11 ActRII</b>	<b>gag<sup>-</sup> ActRII</b>
<b>10,182 (1.0)</b>	<b>27,614 (2.7)</b>	<b>15,655 (1.5)</b>	<b>26,762 (2.6)</b>	<b>42,088 (4.1)</b>

Las células COS-1 fueron transfectadas transitoriamente con el vector vacío (pCMV5) o los betaglicanos sin epítoto c-myc; o cotransfectados con el vector del receptor tipo II de activina (ActRII). Dos días después de la transfección las células se marcaron con 125 pM de <sup>125</sup>I-inhibina A. Los datos muestran las cuentas por minuto de <sup>125</sup>I-inhibina A unida a las mutantes de betaglicano. Los números en paréntesis son el valor normalizado del incremento en la unión de ligando, con respecto al control (pCMV5). BG, betaglicano.

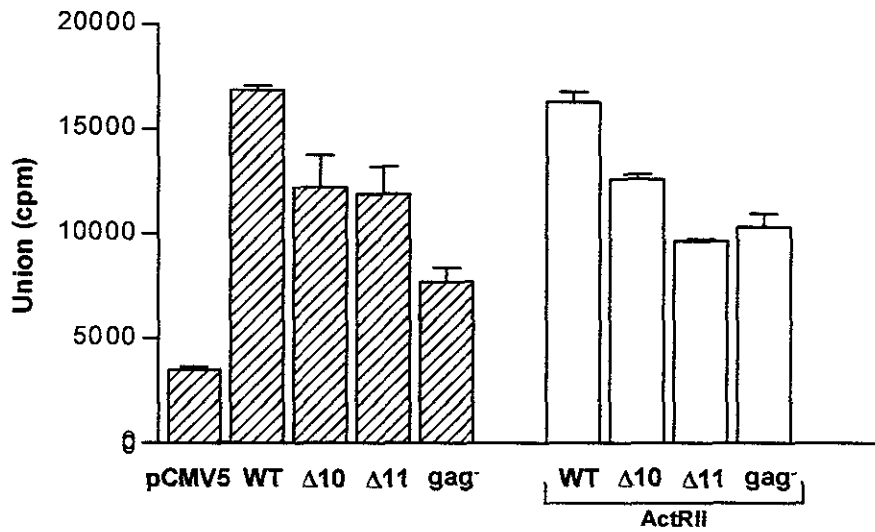
glicosaminoglicanos del betaglicano no se requieren para la unión de la inhibina A. En todos los experimentos realizados la mutante  $\Delta 11$  unió inhibina A en forma comparable con el betaglicano silvestre o el betaglicano gag<sup>-</sup>. Por otro lado la mutante  $\Delta 10$  mostró consistentemente una unión de inhibina A similar a las células control transfectadas con el vector vacío. La cotransfección del receptor tipo II de activina junto con los vectores del betaglicano silvestre, el betaglicano gag<sup>-</sup>, o la mutante  $\Delta 11$  incrementó la unión de inhibina A como era de esperarse. Sin embargo, la mutante  $\Delta 10$  incrementó la unión de inhibina A al receptor tipo II de activina ligeramente por arriba del control. Estos resultados sugieren que la capacidad intrínseca del betaglicano de unir inhibina reside exclusivamente en la región U, representada por la mutante  $\Delta 11$ .

Para probar la afinidad relativa de esta región a diferentes ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$ , células COS-1 fueron transfectadas para expresión transitoria con el vector vacío, el betaglicano silvestre y sus diferentes mutantes, para realizar ensayos de competencia. Las células fueron marcadas con 50 pM de <sup>125</sup>I-inhibina A y competidas con 0.5 y 5.0 nM de TGF- $\beta 1$ , con TGF- $\beta 2$  o con inhibina A fría. Este experimento confirma que la región U une inhibina A en forma semejante al betaglicano silvestre o el betaglicano gag<sup>-</sup>, obteniéndose una competencia completa de ligando homólogo con 0.5 nM de ligando frío. Sin embargo, la competencia heteróloga de 100 veces más TGF- $\beta 1$  desplaza parcialmente la inhibina A. Por otro lado, el TGF- $\beta 2$  resultó un fuerte competidor de la inhibina A ya que mostró un patrón de competencia equiparable al ligando homólogo (Figura 30). En cambio, la unión de 100 pM de <sup>125</sup>I-TGF- $\beta 2$  al betaglicano silvestre, a las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$ , o al betaglicano gag<sup>-</sup>, no fue desplazada por 7 nM de inhibina A, aun en presencia del receptor tipo II de activina (Figura 31).

En conjunto, estos resultados muestran que la región E del ectodominio del betaglicano une solamente TGF- $\beta$ . La región U une TGF- $\beta$  y también inhibina A, con una afinidad relativa mayor para el TGF- $\beta 2$  que para la inhibina A y que para el TGF- $\beta 1$ .



**Figura 30. Competencia de unión de ligando de inhibina A en las mutantes de betaglicano.** Células COS-1 fueron transfectadas en forma transitoria con el vector vacío (pCMV5) o las mutates de betaglicano sin epítoto c-myc. Un día después de la transfección, las células se dividieron en placas de 24 pozos para ensayo. Al día siguiente, las células se marcaron con 50 pM de  $^{125}\text{I}$ -inhibina A en ausencia (C, barras negras), o en presencia de las concentraciones indicadas (0.5, o 5.0 nM) de TGF- $\beta$ 1 frío (barras cruzadas), TGF- $\beta$ 2 frío (barras punteadas), o inhibina A (barras vacías). Las cuentas por minuto corresponden a la cantidad de ligando marcado unido, contra la concentración indicada de competidor frío.



**Figura 31: Competencia de unión de ligando de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 por inhibina A en las mutantes de betaglicano.** Células COS1 fueron transfectadas para expresión transitoria con el vector vacío (pCMV5) o las mutantes de betaglicano sin epítopo c-myc (barras cruzadas); o cotransfectadas con el vector del receptor tipo II de activina (ActRII) (barras vacías). Un día después de la transfección las células se dividieron en placas de 24 pozos para ensayo. Al día siguiente, las células se marcaron con 100 pM de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 en presencia de 7 nM de inhibina A. Las cuentas por minuto corresponden a la cantidad de ligando marcado unido a los receptores.

## Discusión

El betaglicano pertenece a una clase de moléculas de superficie que regulan el acceso de ligandos a los receptores de señalamiento, ya que modula el efecto de al menos dos miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ . El betaglicano de membrana es un potenciador del efecto de TGF- $\beta$ , ya que facilita su unión al receptor tipo II de TGF- $\beta$ . La forma soluble del betaglicano presente en suero y en matriz extracelular es capaz de unir TGF [81, 82]. El betaglicano soluble funciona como un potente antagonista que secuestra al TGF- $\beta$  jugando un papel opuesto a su contraparte de membrana [73]. El betaglicano forma parte del sistema de antagonismo de la inhibina A en la señal de activina, ya que forma un complejo inactivo junto con el receptor tipo II de activina, impidiendo la activación del receptor ALK1 [84]. Por otro lado, el betaglicano posee un claro papel en desarrollo embrionario como potenciador del efecto de TGF- $\beta$ . Se ha demostrado su participación en sistemas como la transición epitelio-mesenquimal de células en el corazón dependiente de TGF- $\beta$ 2 [83]. Por otro lado, se ha sugerido la probable participación del betaglicano en la fusión de paladar por células de epitelio medio ("*medial edge epithelial cells*", MEE) actuando como un localizador del efecto del TGF- $\beta$ 3 [103]. Estas propiedades sitúan al betaglicano como un importante regulador de las acciones de miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  *in vivo*. Sin embargo, la caracterización de las propiedades de unión de los diferentes ligandos que se unen al ectodominio del betaglicano es necesaria para una mejor comprensión del papel fisiológico del betaglicano.

El betaglicano une a través de su ectodominio todas las isoformas de TGF- $\beta$  en mamíferos, y además inhibina A. Se han empleado diversas estrategias para mapear los sitios de unión de ligando sobre el ectodominio del betaglicano [73, 85-89] (Figura 12). Curiosamente, los dos sitios de unión de ligando descritos sobre el ectodominio coinciden con lo que pueden considerarse dominios estructurales.

El betaglicano parece ser una molécula modular, donde el dominio distal a la membrana posee homología con la endoglina (dominio E) y el dominio proximal a la membrana con la uromodulina (dominio U) (Figura 12 y 13).

**Las clonas de células L6E9 que expresan en forma estable al c-myc-betaglicano y sus mutantes son refractarias a los efectos de TGF- $\beta$ .** En este trabajo se obtuvieron clonas que expresan en forma estable al betaglicano y las mutantes  $\Delta 10$ ,  $\Delta 11$  y gag<sup>-</sup>. Las células empleadas para esto fueron los mioblastos de rata L6E9, la cuales no expresan betaglicano [104]. Las células L6E9 fueron transfectadas por fosfato de calcio, con los cDNA que codifican para el c-myc-betaglicano. La transfección fue exitosa, sin embargo, el nivel de expresión resultó muy bajo (menor al 0.5 %). La población de células expresoras se enriqueció por MACS (Figura 17), empleando el antisuero # 822, dirigido contra el ectodominio del betaglicano. A partir de la población enriquecida se generaron clonas las cuales se analizaron por FACS (Figura 18) y marcado por afinidad con <sup>125</sup>I-TGF- $\beta$ 2 (Figura 19 y 20) para verificar la expresión del betaglicano en la superficie. Se seleccionaron 4 clonas que expresan al c-myc-betaglicano, y 2 clonas que expresan las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$ . Estas clonas se evaluaron funcionalmente por ensayos de inhibición de crecimiento, y fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ . Las clonas de las células L6E9 con el c-myc-betaglicano o las mutantes fueron muy poco sensibles al efecto de TGF- $\beta$  como lo demuestran los ensayos de inhibición de crecimiento y fosforilación de Smad2 (Figura 21-23). Esto resulta paradójico ya que como control positivo se empleó clona LBG22 [104] la cual mostró la respuesta esperada de inhibición de crecimiento y fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ . De hecho, la única diferencia significativa es la presencia del epítotope c-myc en el extremo amino terminal de las nuevas clonas estables. Resulta lógico pensar que la falta de respuesta a TGF- $\beta$  de estas clonas esta relacionada a la adición del epítotope c-myc en la secuencia del cDNA del betaglicano. Además, las células estables que expresan la versión de betaglicano sin epítotope c-myc responden a TGF- $\beta$ , como lo demuestran los experimentos de fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ 2 presentados en este trabajo (Figura 29).

Cual es el efecto del epítotope c-myc sobre estas células? Los resultados de los experimentos de FACS y marcado por afinidad muestran que las células expresan en su superficie la molécula de c-myc-betaglicano. El c-myc-betaglicano une TGF- $\beta$ , y forma el complejo de presentación con el T $\beta$ RII como se observa en la coimmunoprecipitación utilizando el

antisuero # 822 (Figura 20, carriles 2-6). Con base en esto, es posible suponer que la adición del epítoto c-myc al ectodominio del betaglicano no interfiere con la unión del TGF- $\beta$ , ni con la función de presentación al receptor tipo II de TGF- $\beta$ . Sin embargo, de alguna forma el epítoto c-myc puede estabilizar el complejo de betaglicano / TGF- $\beta$  / T $\beta$ RII. El efecto de estabilizar este complejo origina el secuestro del T $\beta$ RII, imposibilitando la interacción con el receptor tipo I. Se puede descartar algún defecto en la vía de transducción de señal del TGF- $\beta$  ya que las células poseen los receptores tipo I y II (Figura 19), además de que Smad2 está presente en estas células, como se observa en los ensayos de fosforilación (Figura 22 y 23).

En conclusión, el c-myc-betaglicano une TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, y forma el complejo de presentación con el receptor tipo II. Sin embargo, la molécula de c-myc-betaglicano parece estar actuando como un dominante negativo que secuestra al receptor tipo II, ya que estabiliza el complejo de presentación. El efecto de estabilizar el complejo de presentación es que impide la interacción del receptor tipo II con receptor tipo I para formar el complejo de señalización, originando una baja sensibilidad a TGF- $\beta$  en las células que expresan la versión c-myc del betaglicano o sus mutantes.

La baja respuesta del panel de mutantes con epítoto c-myc motivo la creación de un nuevo panel de mutantes carentes de este epítoto. Las nuevas mutantes carentes de epítoto c-myc se evaluaron en su capacidad de unir TGF- $\beta$ , su afinidad relativa por el ligando, y en ensayos funcionales de fosforilación de Smad2.

**Las regiones de unión de ligando  $\Delta$ 10 y  $\Delta$ 11 del ectodominio del betaglicano unen TGF- $\beta$  con una afinidad relativa semejante.** Se crearon dos mutantes del betaglicano que son parte de la región U ( $\Delta$ 11 y  $\Delta$ 12) completando un panel de mutantes previamente descrito [73]. Este panel de mutantes permitió el estudio de las propiedades funcionales de estas regiones. Tanto las mutantes que contienen la región E ( $\Delta$ 3 y  $\Delta$ 10) como la mutante que contiene la región U ( $\Delta$ 11) fueron capaces de unir TGF- $\beta$  (Figura 24). Además, estas regiones poseen una afinidad relativa semejante a la molécula silvestre. Los ensayos de



competencia (Figura 25) muestran que las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  tienen una afinidad relativa semejante para el TGF- $\beta$ , siendo de un orden de magnitud mayor para el TGF- $\beta 2$  que para el TGF- $\beta 1$ . Esta selectividad de isoforma es la misma mostrada por el receptor silvestre [72, 105, 106]. Esta misma afinidad relativa la muestran los dominios E y U, cuando son expresados en forma de receptores solubles (Figura 26 y 27), apoyando la posibilidad de que estructuralmente el ectodominio del betaglicano se encuentra conformado por dos dominios independientes.

**El ectodominio del betaglicano posee un arreglo modular.** Los resultados obtenidos en mutantes previamente reportadas  $\Delta 1$  ( $\Delta 45-199$ ),  $\Delta 5$  ( $\Delta 200-285$ ),  $\Delta 8$  ( $\Delta 45-282$ ) y la  $\Delta 9$  ( $\Delta 287-409$ ) (ver Figura 12 y 13) apoyan el arreglo de dominios en el ectodominio del betaglicano [73]. Estas mutantes a pesar de tener la región U completa son incapaces de unir TGF- $\beta$ . La falta de unión probablemente se debe a los segmentos de la región E presentes que ocasionan un plegamiento inadecuado de la región U generando pérdida de la función de unión. La posibilidad de una maduración incompleta de la mutante se descarta, ya que todas las construcciones llegan a la superficie. Este es el caso de la mutante  $\Delta 12$  ( $\Delta 44-499$ ) (Figura 13, 15 y 16) la cual es incapaz de unir TGF- $\beta$  a diferencia de las mutantes  $\Delta 44-564$  y  $\Delta 44-575$  reportadas por el grupo de O'Connor-McCourt [85] (ver Figura 12). La mutante  $\Delta 12$  carece de las dos primeras cisteínas que definen el dominio U, lo que origina la pérdida de capacidad de unión de TGF- $\beta$ . Sin embargo, la remoción de la tercera cisteína y la remoción de la tercera y cuarta cisteína como en las mutantes  $\Delta 44-564$  y  $\Delta 44-575$  no afecta la capacidad de unión de la región U. Estos sugiere que el plegamiento erróneo de la molécula afecta los sitios de unión de TGF- $\beta$  en una forma impredecible. Por otro lado, los últimos 213 aminoácidos son relevantes en la unión de ligando, sin embargo, la creación de mutantes con una eliminación mayor, como es el caso de la  $\Delta 44-596$ , no aporta mayor información. La falta de unión de la mutante  $\Delta 44-596$  se atribuye a una maduración inadecuada de la molécula, dificultando el análisis de su capacidad de unir TGF- $\beta$  [86]. Es claro que la determinación de los residuos de amino ácidos involucrados en la unión precisa del ligando requerirá de un análisis fino empleando técnicas como difracción por rayos X o resonancia magnética nuclear.

**La región E posee actividad de presentación de TGF- $\beta$ . Sin embargo, ambas regiones (E y U) pueden potenciar el efecto de TGF- $\beta$ 2.**

Otro aspecto abordado en este trabajo es la actividad de presentación de las regiones de unión de TGF- $\beta$ . Se ha demostrado que el receptor II de TGF- $\beta$  posee baja afinidad por el TGF- $\beta$ 2, situación que se compensa con la presencia del betaglicano [76, 77]. La capacidad de presentación del ectodominio del betaglicano puede evaluarse por el nivel de marcado del receptor tipo II de TGF- $\beta$  con  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2. Para esto se realizaron dos tipos de experimentos, uno utilizando moléculas marcadas con un epítipo (c-myc ó HA) cotransfectadas en forma transitoria en células COS-1 y otro expresando el betaglicano y sus mutantes sin epítipo en forma estable en células L6E9, utilizando el receptor tipo II de TGF- $\beta$  endógeno de las células. En ambos experimentos, el nivel de marcado basal del receptor tipo II con  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 en ausencia de betaglicano es prácticamente nulo. La presencia del betaglicano silvestre, el betaglicano gag $\bar{}$ , o la mutante  $\Delta$ 3, incrementa considerablemente en nivel de marcado del receptor tipo II de TGF- $\beta$ , tanto en células COS-1 como en células L6E9. La mutante  $\Delta$ 11 no fue capaz de incrementar el marcado del receptor tipo II de TGF- $\beta$  en las células COS-1 ni en las células L6E9. Por otro lado, la expresión de  $\Delta$ 10 en células COS-1 induce un marcado del receptor tipo II mayor al que se observa con el receptor silvestre o la mutante gag $\bar{}$ . En células L6E9 que expresan la mutante  $\Delta$ 10 también se incrementa el marcado del receptor tipo II, sin embargo, en este caso el betaglicano silvestre resultó ser mejor presentador.

La diferencia de marcado del receptor tipo II de TGF- $\beta$  radica en que los experimentos mostrados en las figuras 16 y 28 son diferentes, ya que en las células COS-1 el receptor tipo II es exógeno y se encuentra sobre expresado, mientras que en las células L6E9 se trata de un receptor tipo II endógeno. Además, la eficiencia de entrecruzamiento entre el receptor y el ligando es difícil de predecir, lo que hace a cualquier suposición basada en términos de números de receptores poco real. Sin embargo, ambos experimentos coinciden en que la región E confiere un mejor marcado de receptor tipo II que la región U, como lo muestra el marcado por afinidad con  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2. Con base en estos resultados, es lógico proponer que la potenciación del efecto de TGF- $\beta$ 2 radica en el dominio E. Los resultados del experimento de la fosforilación de Smad2 dependiente de TGF- $\beta$ 2 muestran un panorama

diferente, ya que tanto la mutante  $\Delta 10$  como la mutante  $\Delta 11$  son capaces de promover la activación de la esta vía de señalización (Figura 29). Esto indica que la llamada función de presentación, es al parecer, un artefacto del marcado por afinidad, y por lo tanto, los datos obtenidos a partir de marcado por afinidad deben interpretarse con cautela, sino se cuenta con los correspondientes ensayos funcionales.

**La capacidad de unir inhibina A radica en la región U.** El último aspecto abordado fue la capacidad del ectodominio del betaglicano de unir inhibina A. Nuestros resultados muestran que la capacidad del betaglicano de unir inhibina A se reside en la región U, y que las cadenas de GAG son indispensables para esto (Tabla 1 y Figura 29). Esto sugiere que la región U es la responsable de crear un sitio de alta afinidad junto con el receptor tipo II de activina siendo responsable de mediar el antagonismo de la activina por inhibina.

**El betaglicano, un modulador de la actividad de factores de crecimiento.** Estos resultados abren nuevas interrogantes sobre las regiones de unión de ligando del ectodominio del betaglicano. Resulta interesante el hecho de que existan dos regiones sobre la misma molécula con diferente secuencia pero que poseen propiedades de unión semejantes. Un posible modelo que puede ayudar a explicar esto consiste en suponer que el betaglicano une al TGF- $\beta$  en forma de "sandwich", donde la molécula de TGF- $\beta$  queda en el centro con los dominios a los lados en forma horizontal. Este arreglo sería ventajoso, ya que ubicaría los dominios en el mismo plano sobre la membrana explicando además como es que ambos dominios por separado son capaces de presentar el factor al receptor tipo II. Además, esta disposición se apoyaría en la hipótesis de que el ectodominio del betaglicano esta conformado por dominios de plegamiento independiente. Sin embargo, ¿existe el betaglicano como un dominio único en la naturaleza, semejante a las mutantes  $\Delta 10$  o  $\Delta 11$ ? Se ha descrito un fragmento de aproximadamente 60 kDa que se encuentra sobre la superficie celular [107], y que puede liberarse al medio por tratamiento de las células con plasmina [108]. La naturaleza de esta molécula no se ha demostrado completamente, pero se presume que puede tratarse de un fragmento de betaglicano, ya que el marcado por afinidad con  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$  de células tratadas con plasmina muestra una disminución en la cantidad de betaglicano en la membrana, mientras que los receptores tipo I y II permanecen

sin cambio. Esta molécula de 60 kDa sugiere la posibilidad de que el betaglicano exista en forma de un dominio único, en este, caso la porción proximal a la membrana denominada región U. La posibilidad de que este fragmento sea funcional es grande, ya que esta región es capaz de potenciar el efecto de TGF- $\beta$  y mediar el antagonismo de inhibina hacia activina.

Un hallazgo reciente, pone de manifiesto la importancia del betaglicano como potenciador del efecto no solo del TGF- $\beta$ 2, sino de cualquiera de las isoformas del factor en general. Se ha descrito que el receptor tipo II B de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-II B), una isoforma variante de receptor II generada por arreglo alternativo del mRNA, une TGF- $\beta$ 2 y es capaz de señalizar vía Smad2 en ausencia de betaglicano [109]. Con base en esto se puede suponer que la existencia del betaglicano como receptor accesorio permite alternativas de sensibilidad a TGF- $\beta$ ; primero en sistemas donde se expresa T $\beta$ R-II B en el cual las células responden a cualquier isoforma de TGF- $\beta$ , sin posibilidad de regular la respuesta mas que por la disponibilidad del factor; y un segundo sistema mediado por T $\beta$ R-II, en el cual las células responden únicamente a TGF- $\beta$ 1, sin embargo, la expresión de betaglicano permite no solo la respuesta a TGF- $\beta$ 2 sino también una regulación basada en la expresión temporal de la molécula, ya que solamente las células que lo presenten en la superficie responden a una baja disponibilidad o a una isoforma específica del factor de crecimiento. Esto permite regular la respuesta celular, como se observa en los sistemas de diferenciación epitelio-mesenquimal mencionados anteriormente [83, 103].

## Conclusiones

- La clonas de células L6E9 que expresan en forma estable al c-myc-betaglicano unen TGF- $\beta$ , forman el complejo de presentación con el receptor tipo II, pero son incapaces de responder fisiológicamente a cualquier isoforma de TGF- $\beta$ . Esto posiblemente se debe a que el epítopo c-myc introducido en la secuencia del betaglicano, estabiliza el complejo de presentación secuestrando al receptor tipo II. El secuestro del receptor tipo II impide la formación del complejo de señalamiento. Las versiones del betaglicano que carecen de epítopo c-myc no muestran este comportamiento.
- Las mutantes  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  (que representan las regiones E y U respectivamente del ectodominio del betaglicano) unen preferencialmente TGF- $\beta 2$  que TGF- $\beta 1$  con una afinidad relativa semejante a la del betaglicano silvestre.
- La mutante  $\Delta 11$  no forma en marcado por afinidad, un complejo de presentación inmunoprecipitable a diferencia de la mutante  $\Delta 10$ , sin embargo, ambas regiones del ectodominio potencian el efecto del TGF- $\beta 2$  en forma semejante al betaglicano silvestre.
- La capacidad de unir inhibina A reside en la región U del ectodominio del betaglicano, y no depende de las cadenas GAG presentes en esta zona. Por el contrario, la región E no une inhibina A, pero es capaz de unir TGF- $\beta$ .
- Estos resultados apoyan fuertemente el hecho de que estructuralmente el ectodominio del betaglicano tenga un arreglo modular, ya que tanto la función de presentación, la capacidad de potenciar el efecto de TGF- $\beta 2$  y la capacidad de unir inhibina A, se conservan cuando las regiones del ectodominio se expresan en forma independiente como las mutante  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$ .

## Perspectivas

Los datos presentados en éste trabajo abren nuevas interrogantes en cuanto al papel fisiológico del betaglicano. Sin embargo, faltan varios aspectos por explorar sobre la fisiología y estructura del betaglicano. El panel de mutantes del ectodominio del betaglicano y las células que las expresan en forma estable constituyen una poderosa herramienta para continuar los estudios. Algunos aspectos que podrán ser abordados son los siguientes:

- Se ha demostrado que la región U del ectodominio del betaglicano interacciona con TGF- $\beta$  e inhibina A. Existe la posibilidad de que la región E interaccione con otros factores de crecimiento pertenecientes, o no, a la superfamilia del TGF- $\beta$ . El hecho de contar con la mutante  $\Delta 10$  del betaglicano, permitirá explorar este hecho en diferentes tipos celulares.
- Por otro lado, se ha estudiado poco del papel del betaglicano como proteoglicano. Se ha descrito que el betaglicano es capaz de unir bFGF a través de sus cadenas de GAGs [110]. Sin embargo, se desconoce el papel fisiológico de esta actividad. La mutante de betaglicano gag<sup>-</sup>, y las células L6E9 que la expresan en forma estable permitirán estudiar la función de unión de bFGF de los GAGs del betaglicano.
- Este trabajo confirma lo reportado previamente en cuanto a la capacidad del betaglicano de unir inhibina A [84]. Nuestros datos muestran que esta actividad es exclusiva del dominio U. La participación como antagonista de la activina del betaglicano no ha sido explorada aún en ningún sistema biológico. La mutante  $\Delta 10$  del betaglicano ofrece la posibilidad de ensayar esto, ya que permitirá abolir completamente la función del betaglicano con respecto a inhibina A, manteniendo la respuesta hacia TGF- $\beta$ .
- La confirmación definitiva del arreglo estructural del ectodominio del betaglicano requiere de métodos mas sensibles como resonancia magnética nuclear o la generación del cristal del ectodominio. Esto último se ve enormemente favorecido por el hecho de que cada una de las regiones es capaz de funcionar en forma individual. Inclusive, es posible diseñar regiones aun más discretas de cada región que permita su cristalización en conjunto con la molécula de TGF- $\beta$ , y probablemente el receptor tipo II de TGF- $\beta$ .

En conclusión, a pesar de los avances en el campo del betaglicano como receptor accesorio para factores de crecimiento, aún restan muchos aspectos de su función y estructura por ser abordados.

**Bibliografia**

1. Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 597-641.
2. Moses, H.L., E.Y. Yang, and J.A. Pietenpol, *TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights*. Cell, 1990. **63**(2): p. 245-7.
3. Kingsley, D.M., *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*. Genes Dev, 1994. **8**(2): p. 133-46.
4. Wozney, J.M., *The bone morphogenetic protein family and osteogenesis*. Mol Reprod Dev, 1992. **32**(2): p. 160-7.
5. Padgett, R.W., J.M. Wozney, and W.M. Gelbart, *Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2905-9.
6. Sampath, T.K., et al., *Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6004-8.
7. Burt, D.W. and I.R. Paton, *Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family*. DNA Cell Biol, 1992. **11**(7): p. 497-510.
8. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)*. Growth Factors, 1993. **8**(1): p. 1-9.
9. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 137-61.
10. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues*. Mol Reprod Dev, 1992. **32**(2): p. 91-8.
11. Letterio, J.J., et al., *Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1936-8.
12. Sanford, L.P., et al., *TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes*. Development, 1997. **124**(13): p. 2659-70.

13. Kaartinen, V., *et al.*, *Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction.* Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 415-21.
14. Proetzel, G., *et al.*, *Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion.* Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 409-14.
15. Gray, A.M. and A.J. Mason, *Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro- regions in homodimer assembly.* Science, 1990. **247**(4948): p. 1328-30.
16. Gentry, L.E. and B.W. Nash, *The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor.* Biochemistry, 1990. **29**(29): p. 6851-7.
17. Munger, J.S., *et al.*, *Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation.* Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1376-82.
18. Crawford, S.E., *et al.*, *Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo.* Cell, 1998. **93**(7): p. 1159-70.
19. Murphy-Ullrich, J.E. and M. Poczatek, *Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology.* Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 59-69.
20. Daopin, S., *et al.*, *Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily.* Science, 1992. **257**(5068): p. 369-73.
21. McPherron, A.C. and S.J. Lee, *GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines.* J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3444-9.
22. McDonald, N.Q. and W.A. Hendrickson, *A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif.* Cell, 1993. **73**(3): p. 421-4.
23. Griffith, D.L., *et al.*, *Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 878-83.
24. Wrana, J.L., *et al.*, *TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex.* Cell, 1992. **71**(6): p. 1003-14.
25. Massague, J., *TGF-beta signal transduction.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.



26. Gougos, A. and M. Letarte, *Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8361-4.
27. Lopez-Casillas, F., *et al.*, *Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system*. Cell, 1991. **67**(4): p. 785-95.
28. Laiho, M., *et al.*, *Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II*. J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 9108-12.
29. Massagué, J., L. Attisano, and J.L. Wrana, *The TGF-beta family and its composite receptors*. Trends in Cell Biology, 1994. **4**: p. 172-178.
30. Franzen, P., C.H. Heldin, and K. Miyazono, *The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(2): p. 682-9.
31. Chen, Y.G., F. Liu, and J. Massague, *Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12*. Embo J, 1997. **16**(13): p. 3866-76.
32. Wieser, R., J.L. Wrana, and J. Massague, *GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex*. Embo J, 1995. **14**(10): p. 2199-208.
33. Lin, H.Y., *et al.*, *Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase*. Cell, 1992. **68**(4): p. 775-85.
34. Lou, K.X. and H.F. Lodish, *Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues*. EMBO J., 1997. **16**: p. 1970-1981.
35. Weis-Garcia, F. and J. Massague, *Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF-beta receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling*. Embo J, 1996. **15**(2): p. 276-89.
36. Wrana, J.L., *et al.*, *Mechanism of activation of the TGF-beta receptor*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 341-7.
37. Macias-Silva, M., *et al.*, *MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1215-24.

38. Raftery, L.A., *et al.*, *Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila*. *Genetics*, 1995. **139**(1): p. 241-54.
39. Sekelsky, J.J., *et al.*, *Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1995. **139**(3): p. 1347-58.
40. Savage, C., *et al.*, *Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(2): p. 790-4.
41. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. *Embo J*, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
42. Whitman, M., *Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily*. *Genes Dev*, 1998. **12**(16): p. 2445-62.
43. Raftery, L.A. and D.J. Sutherland, *TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads*. *Dev Biol*, 1999. **210**(2): p. 251-68.
44. Feng, X.H. and R. Derynck, *A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity*. *Embo J*, 1997. **16**(13): p. 3912-23.
45. Chen, Y.G., *et al.*, *Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction*. *Genes Dev*, 1998. **12**(14): p. 2144-52.
46. Lo, R.S., *et al.*, *The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors*. *Embo J*, 1998. **17**(4): p. 996-1005.
47. Huse, M., *et al.*, *Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12*. *Cell*, 1999. **96**(3): p. 425-36.
48. Hahn, S.A., *et al.*, *DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1*. *Science*, 1996. **271**(5247): p. 350-3.
49. Lagna, G., *et al.*, *Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways*. *Nature*, 1996. **383**(6603): p. 832-6.
50. Xu, L., Y.G. Chen, and J. Massague, *The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(8): p. 559-62.

51. Wisotzkey, R.G., *et al.*, *Medea is a Drosophila Smad4 homolog that is differentially required to potentiate DPP responses*. *Development*, 1998. **125**(8): p. 1433-45.
52. Hudson, J.B., *et al.*, *The Drosophila Medea gene is required downstream of dpp and encodes a functional homolog of human Smad4*. *Development*, 1998. **125**(8): p. 1407-20.
53. Massague, J., *How cells read TGF-beta signals*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(3): p. 169-78.
54. Hayashi, H., *et al.*, *The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling*. *Cell*, 1997. **89**(7): p. 1165-73.
55. Nakao, A., *et al.*, *Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling [see comments]*. *Nature*, 1997. **389**(6651): p. 631-5.
56. Souchelnytskyi, S., *et al.*, *Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor- beta receptors*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(39): p. 25364-70.
57. Hata, A., *et al.*, *Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor*. *Genes Dev*, 1998. **12**(2): p. 186-97.
58. Afrakhte, M., *et al.*, *Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **249**(2): p. 505-11.
59. Takase, M., *et al.*, *Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **244**(1): p. 26-9.
60. Cheifetz, S., *et al.*, *The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross- reactive ligands and receptors*. *Cell*, 1987. **48**(3): p. 409-15.
61. St-Jacques, S., *et al.*, *Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells*. *Endocrinology*, 1994. **134**(6): p. 2645-57.
62. Lastres, P., *et al.*, *Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1*. *J Cell Biol*. 1996. **133**(5): p. 1109-21.

63. Bellon, T., *et al.*, *Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2340-5.
64. Fernandez-Ruiz, E., *et al.*, *Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter*. Cytogenet Cell Genet, 1993. **64**(3-4): p. 204-7.
65. McAllister, K.A., *et al.*, *Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1*. Nat Genet, 1994. **8**(4): p. 345-51.
66. Shovlin, C.L., *Molecular defects in rare bleeding disorders: hereditary haemorrhagic telangiectasia*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 145-50.
67. Attisano, L., *et al.*, *Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors*. Cell, 1993. **75**(4): p. 671-80.
68. McAllister, K.A., *et al.*, *Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(10): p. 1983-5.
69. Johnson, D.W., *et al.*, *Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2*. Nat Genet, 1996. **13**(2): p. 189-95.
70. Cheifetz, S., *et al.*, *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.
71. Barbara, N.P., J.L. Wrana, and M. Letarte, *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- beta superfamily*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 584-94.
72. Andres, J.L., *et al.*, *Purification of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteoglycan betaglycan*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 23282-7.
73. Lopez-Casillas, F., *et al.*, *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, 1994. **124**(4): p. 557-68.
74. Cheifetz, S., *et al.*, *Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms*. J Biol Chem, 1990. **265**(33): p. 20533-8.

75. Wang, X.F., *et al.*, *Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor*. *Cell*, 1991. **67**(4): p. 797-805.
76. Lopez-Casillas, F., J.L. Wrana, and J. Massague, *Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor*. *Cell*, 1993. **73**(7): p. 1435-44.
77. Moustakas, A., *et al.*, *The transforming growth factor beta receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(30): p. 22215-8.
78. Cheifetz, S. and J. Massague, *Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(31): p. 20767-72.
79. Ohta, M., *et al.*, *Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells*. *Nature*, 1987. **329**(6139): p. 539-41.
80. Sankar, S., *et al.*, *Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(22): p. 13567-72.
81. Andres, J.L., *et al.*, *Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3137-45.
82. Vilchis-Landeros, M.M., *et al.*, *Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent*. *Biochem J*, 2001. **355**(Pt 1): p. 215-22.
83. Brown, C.B., *et al.*, *Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart*. *Science*, 1999. **283**(5410): p. 2080-2.
84. Lewis, K.A., *et al.*, *Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling*. *Nature*, 2000. **404**(6776): p. 411-4.
85. Pepin, M.C., *et al.*, *Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor beta receptor type III by deletion mutagenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(15): p. 6997-7001.
86. Pepin, M.C., *et al.*, *Mutagenesis analysis of the membrane-proximal ligand binding site of the TGF-beta receptor type III extracellular domain*. *FEBS Lett*, 1995. **377**(3): p. 368-72.

87. Taniguchi, A., *et al.*, *Ligand-dependent and -independent interactions with the transforming growth factor type II and I receptor subunits reside in the aminoterminal portion of the ectodomain of the type III subunit*. In *Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998. **34**(3): p. 232-8.
88. Fukushima, D., *et al.*, *Localization of transforming growth factor beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(30): p. 22710-5.
89. Kaname, S. and E. Ruoslahti, *Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor- beta 1*. *Biochem J*, 1996. **315**(Pt 3): p. 815-20.
90. Attisano, L., *et al.*, *Activation of signalling by the activin receptor complex*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(3): p. 1066-73.
91. Andersson, S., *et al.*, *Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P- 450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(14): p. 8222-9.
92. Seed, B. and A. Aruffo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987. **84**: p. 3365-3369.
93. Kingston, R.E., C.A. Chen, and H. Okayama, *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. V.B. Chanda. Vol. 9.1.1-9.1.9. 1990, New York: John Wiley and Sons, New York.
94. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
95. Roberts, V.J., *et al.*, *Tissue-specific binding of radiolabeled activin A by activin receptors and follistatin in postimplantation rat and mouse embryos*. *Endocrinology*, 1996. **137**(10): p. 4201-9.
96. Bork, P. and C. Sander, *A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor*. *FEBS Lett*, 1992. **300**(3): p. 237-40.
97. Meloche, S., G. Pages, and J. Pouyssegur, *Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk*. *Mol Biol Cell*, 1992. **3**(1): p. 63-71.
98. Evan, G.I., *et al.*, *Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product*. *Mol Cell Biol*, 1985. **5**(12): p. 3610-6.

99. Andres, J.L., *et al.*, *Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3137-45.
100. Cheifetz, S., B. Like, and J. Massague, *Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(21): p. 9972-8.
101. Faure, S., *et al.*, *Endogenous patterns of TGFbeta superfamily signaling during early Xenopus development*. *Development*, 2000. **127**(13): p. 2917-31.
102. Macias-Silva, M., *et al.*, *Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 25628-36.
103. Cui, X.M. and C.F. Shuler, *The TGF-beta type III receptor is localized to the medial edge epithelium during palatal fusion*. *Int J Dev Biol*, 2000. **44**(4): p. 397-402.
104. Lopez-Casillas, F., J.L. Wrana, and J. Massague, *Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor*. *Cell*, 1993. **73**(7): p. 1435-44.
105. Segarini, P.R., *et al.*, *Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor-beta*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(30): p. 14655-62.
106. Mitchell, E.J., L. Fitz-Gibbon, and M.D. O'Connor-McCourt, *Subtypes of betaglycan and of type I and type II transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors with different affinities for TGF-beta 1 and TGF-beta 2 are exhibited by human placental trophoblast cells*. *J Cell Physiol*, 1992. **150**(2): p. 334-43.
107. Butzow, R., *et al.*, *A 60-kD protein mediates the binding of transforming growth factor-beta to cell surface and extracellular matrix proteoglycans*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(3): p. 721-7.
108. Lamarre, J., J. Vasudevan, and S.L. Gonias, *Plasmin cleaves betaglycan and releases a 60 kDa transforming growth factor-beta complex from the cell surface*. *Biochem J*, 1994. **302**(Pt 1): p. 199-205.
109. Rotzer, D., *et al.*, *Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetaRII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor*. *Embo J*, 2001. **20**(3): p. 480-90.

110. Andres, J.L., *et al.*, *Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan.* J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 5927-30.
111. Frolik, C.A., *et al.*, *Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- beta in normal rat kidney fibroblasts.* J Biol Chem, 1984. **259**(17): p. 10995-1000.



## Apéndice

### 1. Iodinación de TGF- $\beta$ (Método de Cloramina T).

#### 1.1 Soluciones y Reactivos

##### Amortiguador de Fosfato de Sodio pH 7.4

1.2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.704 g / 10 mL

0.3 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.414 g / 10 mL

##### Urea en ácido acético 1M

Disolver 1.2 g de urea ultrapura en 1.0 mL de ácido acético 1M (preparar fresco).  
(Para 1.5 mL, tomar 86  $\mu$ L de ácido acético glacial en 1,414  $\mu$ L de agua).

##### Cloramina T

100  $\mu$ g / mL en ddH<sub>2</sub>O

Preparar una solución fresca de 1 mg / mL; tomar a partir de esta 100  $\mu$ L en 900  $\mu$ L para una solución final. **USAR INMEDIATAMENTE.**

##### N-acetil tirosina 50 mM (NAT)

223.2 g / L = 1M ; 11.16 mg / mL = 50 mM

##### Ioduro de Potasio 60 mM (KI)

166.01 g / L = 1M ; 9.96 mg / mL = 60 mM

##### Amortiguador de Columna

Concentración Final	Solución concentrada	Volumen
HCl 4 mM	HCl 1 M	16 $\mu$ L
NaCl 75 mM	NaCl 5 M	0.74 mL (0.22g)
BSA 0.1%	(solido)	0.05 g
Volumen Final		50 mL

#### 1.2 Protocolo de Iodinación.

a) Mezclar:

5  $\mu$ L (2  $\mu$ g) TGF- $\beta$  en acetonitrilo 30 %, TFA 0.1 %

5  $\mu$ L de amortiguador de fosfato de sodio 1.5 M.

b) En la campana añadir:

4  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (aproximadamente 400  $\mu\text{Ci}$ )

2  $\mu\text{L}$  Cloramina T (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Incubar 2 min

Adicionar 2  $\mu\text{L}$  de Cloramina T

Incubar 1.5 min

Adicionar 2  $\mu\text{L}$  de Cloramina T

Para detener la reacción:

10  $\mu\text{L}$  N-acetiltirosina 50 mM

100  $\mu\text{L}$  KI 60 mM

100  $\mu\text{L}$  ácido acético, urea 1M

### MUY IMPORTANTE:

- Cuando se añade solución a la muestra hacerlo por la pared baja del tubo, NUNCA TOCAR LA MUESTRA CON LA PUNTA DE LA PIPETA.
- Si es necesario, la solución de TGF- $\beta$  puede estar en ácido acético 1M (es importante verificar el pH si el TGF- $\beta$  esta en ácido acético). Los 2  $\mu\text{g}$  de TGF- $\beta$  pueden estar en un volumen mayor, si es el caso adicionar igual volumen de amortiguador de fosfato de sodio 1.5 M.
- Usar una pipeta Hamilton específica para medir el  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , enjuagar la pipeta en agua tres veces después de usarse. (Nota: usar siempre un tubo de agua diferente al momento de enjuagar).

### 1.3 Analisis de Incorporación por Cromatografía en Capa Fina

A partir de la mezcla de iodación, tomar una alícuota (3–5  $\mu\text{L}$ ) y depositarla sobre una tira de fibra de vidrio (3 mm x 5 cm) impregnada de silica gel (Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel Impregnated Glass Fibre Sheets, 5 x 20 cm, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, product # 61885), hacerlo por triplicado.

Colocar las tiras en un recipiente pequeño (las tapas azules para tubos de 10 mL son buenas) que contiene ácido tricloroacético al 10%. Dejar que el ácido se absorba hasta cerca del borde, pero que no lo rebase. Cortar las tiras por la mitad (base y tope por separado), y depositar cada mitad en tubos para el contador de  $\gamma$ . Si la incorporación es menor al 30 %, intentar nuevamente.

## 1.4 Separación de TGF- $\beta$ de $^{125}\text{I}$ libre

Si la incorporación de yodo al TGF- $\beta$  es mayor al 30%, tomar todo el volumen de reacción y pasarlo por una columna PD-10 previamente equilibrada con 25 mL de amortiguador de columna (PD-10 prepacked disposable columns Sephadex G-25 M, Pharmacia Biotech, product # 17-0851-01). Eluir el contenido de la columna con aproximadamente 15 mL de amortiguador de columna, recolectar el eluido en fracciones de 0.5 mL cada una. Para identificar las fracciones que contienen el TGF- $\beta$  marcado, tomar una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  de cada fracción y depositarla sobre un filtro de papel 3M de 0.5 mm de diámetro colocado previamente dentro de un tubo para el contador de  $\gamma$ . El primer pico corresponde a las fracciones que contienen el  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ , el segundo pico corresponde al yodo libre. Las fracciones con cuentas más altas pueden juntarse, cuidando que no se diluya demasiado la muestra.

## 1.5 Segundo Análisis de Incorporación por Cromatografía en Capa Fina

A partir de la fracción(es) seleccionada(s) tomar una alícuota de (3–5  $\mu\text{L}$ ) y repetir el paso 1.4. Este ensayo sirve para conocer la concentración final del TGF- $\beta$  en nano Moles.

Modificado de [111].

## 2. Ensayo de Unión y Marcado por Afinidad

### 2.1 Soluciones y Reactivos

#### Mezcla de Inhibidores de Proteasas 100 x (Cocktail I)

1 mg / mL leupeptin  
1 mg / mL antipain  
10 mg / mL benzamidine hydrochloride  
5 mg / mL aprotinina  
10 mg / mL soybean trypsin inhibitor

Preparar en Tris 10 mM pH 7.4; EDTA 1mM  
Guardar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### Pepstatina (100 X)

1 mg / mL Pepstatina en DMSO

#### PMSF (200 X) (phenyl methyl sulfonyl fluoride)

200 mM PMSF (0.871 g / 25 mL) en etanol

#### Buffer de Krebs Ringer HEPES pH 7.4 10 X (KRH)

NaCl 1.28 M	37.4 g
KCl 50.0 mM	1.865 g
MgSO <sub>4</sub> 50.0 mM	3.01 g
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 13.0 mM	1.42 g
HEPES 0.5 M	59.6 g
H <sub>2</sub> O	500 mL

Ajustar pH 7.6

Filtrar

**Saracosa / Tris / EDTA (STE)**

Sacarosa	0.25 M
Tris-Cl	10.0 mM
EDTA	1.0 mM
H <sub>2</sub> O	500 mL

**Triton-Tris-EDTA (TTE)**

1% Triton X-100  
 10 mM Tris-Cl pH 7.4  
 1 mM EDTA

**DSS (dissucinimidyl suberato)**

10 mg / mL en DMSO      **PREPARAR FRESCO**

**2.2 Ensayo de Unión y Marcado por Afinidad**

**Tener listos los siguientes reactivos**

KRH (Krebs Ringers HEPES amortiguador pH 7.4). Solución concentrada 1x, 10 x en el refrigerador

KRH + 0.5% BSA es amortiguador de unión.

STE (sacarosa Tris-EDTA, pH 7.4) + 1mM PMSF. Solución concentrada de STE y PMSF 200 mM en refrigerador.

DSS (disuccimidil suberato- reactivo de entrecruzamiento que reacciona con aminas primarias).

Solución de Entrecruzamiento = 6 µL de solución de DSS por mL de KRH

Amortiguador de Lisis = Triton 1% X-100 en amortiguador HEPES BSA (Usado para extraer células en ensayo de unión). Solución concentrada en refrigerador.

Tris-Triton-EDTA (TTE) = Triton X-100 1%, TRIS 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM (Usado para extraer células en marcado por afinidad). Solución concentrada 1x, 10x en refrigerador

TTE + Inhibidores de Proteasas (Cocktail I, pepstatin, PMSF). Solución concentrada 100x en congelador, 200x en refrigerador.

Solución de TGF- $\beta$  iodinado. Preparar solución de trabajo en KRH-BSA.

NOTA: TGF- $\beta$  es muy pegajoso, usar siempre tubos de polipropileno (opacos) para preparar soluciones concentradas.

### Ensayo de Binding

- Incubar las monocapas confluentes de células en KRH-BSA 30 min / 37 °C. (Esto es para remover las proteínas del suero que puedan disminuir la unión de TGF- $\beta$  y para remover TGF- $\beta$  endógeno unido a las células).
- Colocar las células sobre hielo, y lavar una vez con KRH-BSA frío (las células se mantienen en frío de aquí en adelante).
- Adicionar la solución de  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ . (Para placas de 24 pozos usar 500  $\mu\text{L}$  / mL, para placas de 6 o 12 pozos usar 1 mL, Usar de 50 – 100 pM. Para determinar la especificidad de la unión adicionar 10 nM de TGF- $\beta$  frío a un pozo).
- Incubar 3.5 hs / 4 °C en plataforma giratoria.
- Lavar las células 4 veces con KRH-BSA 4 °C (mantener las células en hielo).
- Si solamente nos interesa la unión total: extraer las células con 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de solubilización por 40 min / 4 °C y contar los extractos; de lo contrario proceder al Marcado por Afinidad.

### Marcado por Afinidad

- Lavar las células 2 veces con KRH (para hacer el entrecruzamiento es necesario remover el BSA acarreador presente durante la unión).
- Preparar la solución concentrada de DSS en DMSO; y la solución de entrecruzamiento en KRH.
- Aspirar el KRH y reemplazar con la solución de entrecruzamiento (500  $\mu\text{L}$ /mL para placas de 12 y 24 pozos; 1 mL para placas de 6 pozos) Solución de entrecruzamiento: 6  $\mu\text{L}$  de DSS 10 mg/mL en DMSO por mL de KRH; la solución concentrada de DSS en DMSO se prepara fresco y se mantiene a temperatura ambiente

- Para asegurar que la solución de entrecruzamiento sea homogénea, preparar un exceso de solución adicionando la solución concentrada de DSS a KRH frío y mezclando inmediatamente. (NOTA: DSS es relativamente inestable en solución acuosa, por lo que la dilución final se hace justo al momento de usarse).
- Incubar 15 min a 4 °C en plataforma giratoria.
- Lavar las células dos veces con STE-PMSF (El TRIS en este amortiguador es una fuente de grupos amino que previene el posterior entrecruzamiento de proteínas celulares).
- Remover el STE y remplazar con aproximadamente 1 mL de STE-PMSF
- Despegar las células usando un rastrillo o a chorro de pipeta en STE-PMSF
- Transferir las células a un tubo eppendorf
- Lavar las células con un volumen adicional de STE-PMSF, despegar nuevamente y juntar con la primera cosecha.
- Centrifugar 5,000 rpm 8 min.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en TTE más inhibidores de proteasas. Disgregar el botón celular. (El volumen requerido depende del tamaño del botón celular, pero generalmente 50 - 100 µL son suficientes para placas de 6 y 12 pozos.
- Extraer 40 min / 4 °C en agitación.
- Centrifugar 15 min / 4 °C 15,000 rpm.
- Recolectar sobrenadante, guardar a - 70 °C.

### 3. Marcado por Afinidad de Proteínas en Solución

#### 3.1 Soluciones y Reactivos

Triton X-100 10 % (solución concentrada guardar a 4 °C)

TRIS 1 M pH 8 (esterilizar en autoclave)

**DSS 10 mg / mL en DMSO**

**PREPARAR FRESCO**

#### 3.2 Marcado por Afinidad de Proteínas en Solución

- Resuspender en un volumen de 100 µL aproximadamente.
- Adicionar Triton X-100 a una concentración final de 0.05 %
- Adicionar <sup>125</sup>I-TGF-β a una concentración final de 250 pM. Incubar 3.5 hs / 4 °C.
- Entrecruzar con DSS, concentración final 0.1 mg/mL. Incubar por 15 min/4 °C.
- Detener la reacción adicionando TRIS a una concentración final de 10 mM.
- La muestra esta lista para analizarse por SDS-PAGE.

## 4. Transfección de Células Eucarióticas por el Método de Fosfato de Calcio

### 4.1 Reactivos y Soluciones

#### CaCl<sub>2</sub> 5.0 M (Concentración final 250 mM)

#### HEPES Buffer Saline 2X (2X HeBS)

NaCl	16.4 g
HEPES	11.9 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.21 g
H <sub>2</sub> O	800 mL

Ajustar pH 7.05 con NaOH 5 N

Filtrar para esterilizar (filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm)

Guardar a 4 °C (Para almacenamiento prolongado, alicuotar y guardar a - 20 °C).

**NOTA:** Es extremadamente importante un pH exacto para una transfección eficiente. El intervalo óptimo de pH es 7.05 – 7.12.

#### Glicerol 10 %

Preparar glicerol 10 % en PBS estéril.

### 4.2 Transfección de células eucarióticas por fosfato de calcio

- Crecer las células en placas de 100 mm de diámetro hasta un 50 % de confluencia (Opcional: cambiar medio 4 hs antes de la transfección).
- Poner en un tubo eppendorf estéril 10 µg de DNA de plásmido, precipitar en etanol toda la noche.
- Retirar el etanol con pipeta estéril, secar lo tubos en campana de flujo laminar. Cuando el DNA este seco, resuspender en 250 µL de agua Milli Q estéril.
- Adicionar 250 µL de CaCl<sub>2</sub> (solución concentrada 0.5 M en agua Milli Q estéril) a cada tubo y mezclar (vortex). Concentración final del CaCl<sub>2</sub> 250 mM.
- Poner 500 µL de 2X HeBS en un tubo cónico de 15 mL estéril.
- Con la ayuda de un pipeteador automático y una pipeta de 1 mL, burbujear la solución de 2X HeBS mientras se adiciona gota a gota el CaCl<sub>2</sub>-DNA. Mezclar inmediatamente (vortex 5 seg). Reposar a temperatura ambiente por 10 min.
- Adicionar el precipitado (1 mL) directamente a las placas de 100 mm (espaciar las gotas). El medio debe tornarse más anaranjado. Debe de ser posible ver el precipitado. Incubar 16 hs.
- Después de 16 hs., retirar la solución de precipitado (NO LAVAR), adicionar 3 mL de glicerol 10 % precalentado. Incubar por 2 min aproximadamente (NO INCUBAR POR MAS TIEMPO).

- Adicionar 10 mL de PBS precalentado a la solución de glicerol en las células, agitar para mezclar y remover. Adicionar el volumen necesario de medio completo. Incubar por 4 hs. (NOTA: Es importante diluir la solución de glicerol en las células con PBS antes de remover la solución de glicerol a modo de que las células no estén con el glicerol mucho tiempo. La exposición excesiva al glicerol matará a las células).
- Cambiar las células a medio selectivo.

Referencia: Modificado de [93].

## 5. Transfección de Células Eucarióticas por el Método de DEAE-Dextran

### 5.1 Reactivos y Soluciones

#### DMEM sin suero / *HIGH Glucose*

#### Cloroquina 10 mM

Preparar 5.159 mg / mL en agua (10 mM). Esterilizar. Alicuotar y guardar a - 20 °C en oscuridad.

#### DEAE-dextran 10 mg / mL

DEAE-dextran 10 mg / mL en H<sub>2</sub>O. Filtrar para esterilizar. Guardar a 4 °C.

#### 10 % DMSO

10 % DMSO en PBS, filtrar para esterilizar. Guardar a 4 °C.

### 5.2 Transfección de células eucarióticas por DEAE-dextran

- Sembrar 600.000 células por plato de 10 cm un día antes de la transfección. (Esto representa aproximadamente un pase 1:10.
- El día de la transfección:

Preparar la mezcla de transfección como sigue (el ejemplo mostrado es para 4 transfecciones en platos de 10 cm).

- a) Preparar DMEM (sin suero) /cloroquina:

DMEM sin suero	19.8 mL
cloroquina 10 mM	0.2 mL
volumen final	20.0 mL (volumen para 4 transfecciones)

- b) Adicionar plásmido a una concentración final de 1 µg / mL. Para cada plato de 10 cm preparar:



DMEM sin suero / cloroquina	5.0 mL
Plásmido (hasta 10 µg de plásmido)	3 – 10 µL
<b>Mezclar bien (vortex)</b>	

c) Adicionar DEAE-dextran:

DEAE-dextran 10 mg / mL	200 µL / 5 mL
<b>Mezclar bien (vortex)</b>	

- Remover medio de las células y lavar 2 veces con DMEM sin suero, usando de 8 – 10 mL por plato.
- Adicionar la mezcla de transfección; 5 mL por plato.
- Incubar las células en 3 – 4 hs / 5 % CO<sub>2</sub> / 37 °C. Durante este tiempo checar las células, buscar signos de daño como vaculación o retracción.
- Dar choque de DMSO.  
Remover mezcla de transfección / DEAE-dextran. Adicionar 5 mL / plato de DMSO 10 % en PBS. Esperar 1.5 a 2.0 min a temperatura ambiente. **(NO MAS DE 2 MINUTOS)**. Diluir el DMSO con PBS, removerlo inmediatamente.
- Adicionar 10 – 12 mL de medio de cultivo completo. Incubar 37 °C / 5% CO<sub>2</sub>.
- El día posterior a la transfección: Dividir las células por tripsinización y sembrar para ensayo. Esperar de 1 – 2 días más para ensayar. (Se recomienda ensayar al tercer día después de la transfección).

Referencia: Modificado de [93].

## 6. Citometría de Flujo (FACS).

### Reactivos, Soluciones y Materiales

Medio DMEM sin Suero

PBS

PBS-BSA 5 % (Preparar y esterilizar por filtración. Guardar a 4 °C).

PBS-EDTA 5mM (Preparar al momento. Solución concentrada EDTA 5 M)

Anticuerpos (Nota: el anticuerpo secundario se encuentra conjugado a un fluorocromo que es excitable a 488 nm por un laser de Argón).

Tubos para FACS (Tubos Falcon catalogo No. 2058).

### 6.2 Citometría de flujo

- Sembrar células a un 50 – 60 % de confluencia en platos de 3.5 cm de diámetro. Dejar que crezcan por aproximadamente 18 hs.
- Ayunar las células en DMEM sin suero, por 60 min (2 cambios / 30 min c/u). Incubar 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>.
- Colocar las células en cama de hielo, enfriar por 5 min. Lavar 2 veces con PBS-BSA 5% frío.

NOTA: De este punto en adelante todo en frío.

- Adicionar el primer anticuerpo en PBS-BSA 5%. Incubar 30 min / 4 °C / en agitador orbital.
- Lavar 3 veces con PBS-BSA 5%.
- Adicionar el segundo anticuerpo en PBS-BSA 5%. Incubar 30 min / 4 °C / en agitador orbital.
- Lavar 3 veces con PBS-BSA 5%.
- Lavar 1 vez con PBS-EDTA 5mM frío. Incubar en agitador orbital 10 min.
- Despegar las células a chorro de pipeta con 0.5 mL de PBS-EDTA 5mM y colectarlas en tubos para FACS.

## 7. Magnetic Cell Sorting

### 7.1 Reactivos, Soluciones y Materiales

PBS-BSA 0.5 % - EDTA 5 mM

Magnetic Cell Separator (VarioMACS o SuperMACS)

Adaptador de columna y columnas

MACS MicroBeads para marcado de células (Anticuerpos conjugados a perlas magnéticas)

### 7.2 Separación de células por citometría magnética

- Tomar  $10^7$  (pueden ser hasta  $2 \times 10^8$  células totales) y resuspenderlas en 500  $\mu$ L (Si las células son adherentes, tripsinizar las células y recuperarlas por 3 hs en platos para microbiología. Desprender las células a chorro de pipeta, centrifugar (800 rpm / 8 min) y resuspender en 500  $\mu$ L de PBS-BSA en tubo eppendorf. Colocar las células en frío.
- Adicionar el primer anticuerpo en PBS-BSA-EDTA. Incubar 30 min / 4 °C / en agitación.
- Lavar 3 veces con PBS-BSA-EDTA.
- Adicionar el segundo anticuerpo (MACS Micro Beads) en PBS-BSA-EDTA. Incubar 30 min / 4 °C / en agitación.
- Lavar 3 veces con PBS-BSA-EDTA.
- Colocar el adaptador de columna y la columna en el magneto (VarioMACS). La columna RS+ puede retener hasta  $10^7$  células positivas marcadas con perlas MACS en un total de  $2 \times 10^8$  células).
- Equilibrar la columna con 500  $\mu$ L de PBS-BSA desgasificado. El tiempo de llenado de una columna es de 30 segundos a 3 min. La columna es de flujo controlado por lo que no se seca.
- Tomar la suspensión de células marcadas (aprox.  $2 \times 10^8$  células totales máximo) y colocarlas en la columna. Permitir que la suspensión de células corran a través de la columna.
- Lavar con 2 – 3 x 500  $\mu$ L de PBS-BSA-EDTA. Las células colectadas son la fracción negativa.

- Retirar la columna del magneto. Cambiar a un tubo de recolección nuevo.
- Eluir las células con 1 mL de PBS-BSA-EDTA, empujar las células con el émbolo de la columna. Las células colectadas son la fracción positiva.
- (Opcional) Repetir la separación en una columna nueva para incrementar la pureza de la fracción positiva.
- Las células colectadas se siembran en platos adecuados, dependiendo del tamaño de la población.

## **Ligand Binding and Functional Properties of Betaglycan, a Co-receptor of the Transforming Growth Factor- $\beta$ Superfamily**

SPECIALIZED BINDING REGIONS FOR TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$  AND INHIBIN A

José Esparza-López, José Luis Montiel, M. Magdalena Vilchis-Landeros, Toshihide Okadome, Kohei Miyazono, and Fernando López-Casillas.

# Ligand Binding and Functional Properties of Betaglycan, a Co-receptor of the Transforming Growth Factor- $\beta$ Superfamily

SPECIALIZED BINDING REGIONS FOR TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$  AND INHIBIN A\*

Received for publication, September 28, 2000, and in revised form, December 28, 2001  
Published, JBC Papers in Press, February 5, 2001, DOI 10.1074/jbc.M008866200

José Esparza-López<sup>‡</sup>, José Luis Montiel<sup>‡</sup>, M. Magdalena Vilchis-Landeros<sup>‡</sup>, Toshihide Okadome<sup>§</sup>, Kohei Miyazono<sup>§</sup>, and Fernando López-Casillas<sup>‡</sup>¶

From the <sup>‡</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM Apartado Postal 70-246, México City, D. F., 04510, México and <sup>§</sup>The Cancer Institute, Tokyo, 1-37-1 Kami-ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170-8455, Japan

Betaglycan, also known as the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) type III receptor, is a membrane-anchored proteoglycan that binds TGF- $\beta$  via its core protein. Deletion mutagenesis analysis has revealed two regions of betaglycan ectodomain capable of binding TGF- $\beta$ : one at the amino-terminal half, the endoglin-related region (López-Casillas, F., Payne, H., Andres, J. L., and Massagué, J. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 557–568), and the other at the carboxyl-terminal half, the uromodulin-related region (Pepin, M.-C., Beauchemin, M., Plamondon, J., and O'Connor-McCourt, M. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6997–7001). In the present work we have functionally characterized these ligand binding regions. Similar to the wild type receptor, both regions bind TGF- $\beta$ 2 with higher affinity than TGF- $\beta$ 1. However, only the endoglin-related region increases the TGF- $\beta$ 2 labeling of the TGF- $\beta$  type II receptor, the so-called “TGF- $\beta$  presentation” function of the wild type receptor. Despite this preference, both regions as well as the wild type receptor mediate the TGF- $\beta$ 2-dependent Smad2 phosphorylation, indicating that they can function indistinguishably as TGF- $\beta$ -enhancing co-receptors. On the other hand, we found that the recently described ability of the wild type betaglycan to bind inhibin A is a property of the core protein that resides in the uromodulin-related region. Binding competition experiments indicate that this region binds inhibin and TGF- $\beta$ 2 with the following relative affinities: TGF- $\beta$ 2 > inhibin A > TGF- $\beta$ 1. All together, the present results suggest that betaglycan ectodomain is endowed with two *bona fide* independent ligand binding domains that can perform specialized functions as co-receptors of distinct members of the TGF- $\beta$  superfamily.

proliferation, differentiation, and development (1, 2). TGF- $\beta$  signals through a complex of transmembrane serine/threonine kinase receptors, the TGF- $\beta$  type I and type II receptors. Ligand binding promotes the association between the type I and II receptors. In this complex, phosphorylation of the type I receptor kinase by the constitutively active type II receptor kinase results in its activation. Active type I receptor phosphorylates members of a novel family of transcriptional regulators, the Smads, which transduce the TGF- $\beta$  signal into the cell nucleus (3, 4).

TGF- $\beta$  has two known co-receptors, betaglycan and endoglin, which are transmembrane glycoproteins with large extracellular regions that bind TGF- $\beta$  and small cytoplasmic regions without any clearly identifiable signaling motif (5–8). Betaglycan is a membrane proteoglycan containing heparan and chondroitin sulfate chains whose core protein binds all three TGF- $\beta$  isoforms (9–11). Betaglycan is capable of fine tuning the availability of TGF- $\beta$  to the signaling receptors, thereby determining the outcome of the TGF- $\beta$  stimulation (12, 13). This regulation is both positive and negative. Although the membrane-bound form of betaglycan increases the binding of TGF- $\beta$  to the signaling complex, the soluble form of betaglycan prevents this binding and therefore blocks the actions of TGF- $\beta$  (14). These effects are more dramatic for TGF- $\beta$ 2, the isoform for which betaglycan has higher affinity (15–17). Expression of membrane betaglycan in cells that normally do not express this co-receptor increases their binding to TGF- $\beta$ 2 and corrects for their low sensitivity to this TGF- $\beta$  isoform (18, 19). Presumably, this effect is mediated by a TGF- $\beta$ -induced “presentation complex” formed between membrane-bound betaglycan and the TGF- $\beta$  type II receptor (18, 20). However, the presentation function is insufficient to account for the betaglycan strict requirement for the epithelial-mesenchymal transition leading to the heart valve formation (21). This latter work has raised the possibility of a more direct, albeit unknown, role of betaglycan in the TGF- $\beta$  signaling.

Betaglycan also interacts with type II receptors of another TGF- $\beta$  superfamily member. Lewis *et al.* (22) shows that betaglycan also binds inhibin A and participates in a ternary complex composed of the activin type II receptor and inhibin. This complex mediates the inhibin antagonism of activin by a simple and elegant mechanism: the routing the activin type II receptor into an inactive complex with betaglycan instead of the signaling complex with activin and the activin type I receptor (22). These findings indicate that betaglycan is a versatile co-receptor for at least two distinct members of the TGF- $\beta$  superfamily and open the question of the nature of the structural determinants that make this versatility possible

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>1</sup> is the prototype of a superfamily of growth factors involved in the regulation of cell

\* This work was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM, the Howard Hughes Medical Institute, and the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ An International Research Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-56-22-56-25; Fax: 52-56-22-56-11, E-mail: fcasilla@ifisiol.unam.mx

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$ , GAG, glycosaminoglycan chains, E-related, endoglin-related, U-related, uromodulin-related; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

The TGF- $\beta$  binding function of betaglycan is a property of its ectodomain core protein. Although betaglycan GAG chains are capable of binding basic fibroblast growth factor, they are dispensable for TGF- $\beta$  binding and TGF- $\beta$ 2 presentation function (8, 10, 14, 23). Amino acid sequence comparisons have disclosed regions in betaglycan ectodomain with similarity to other receptors or extracellular proteins. The 260 residues at its amino-terminal end have 28% similarity to the corresponding amino-terminal portion of endoglin ectodomain (7), whereas the 330 residues at its carboxyl-terminal end have similarity to proteins related to uromodulin (24) (Fig. 1A). Several groups have utilized deletion mutants of the wild type receptor to map the ligand binding domain of betaglycan (14, 25–29). These studies show the existence of two ligand binding regions in betaglycan that roughly match to each half of its ectodomain, the membrane-distal and the membrane-proximal regions (26). In the present work we have characterized the functional properties of these ligand binding regions. Our results indicate that betaglycan ligand binding regions are equivalent for its TGF- $\beta$  isoform affinities and TGF- $\beta$ -enhancing function but differ in their ability to bind inhibin A.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—TGF- $\beta$ 1 and inhibin A were from R&D Systems (Minneapolis, MN); TGF- $\beta$ 2 was from Ciba-Geigy AG (Basel, Switzerland). Restriction endonucleases and modifying enzymes were from Roche Molecular Biochemicals. Buffers, salts, and protease and phosphatase inhibitors were from Sigma-Aldrich. The expression vectors for the human TGF- $\beta$  type II receptor (tagged with the HA1 epitope) and the human activin type II receptor (tagged with a carboxyl-terminal hexahistidine tail) have been described (18, 30).

**Betaglycan Deletion Mutants**—Betaglycan mutants were constructed from the wild type rat betaglycan cDNA engineered with the human c-Myc epitope recognized by the monoclonal antibody 9E10 (18). Construction of deletion mutants  $\Delta$ 2,  $\Delta$ 3,  $\Delta$ 10, and  $\text{gag}^-$  has been described (14). Mutant  $\Delta$ 11 ( $\Delta$ 45–409) was constructed from our previously described  $\Delta$ 8 ( $\Delta$ 45–282) mutant. The construction of  $\Delta$ 8 was done by the insertion at the *Stu*I/*Bcl*I sites of the wild type betaglycan cDNA of a double-stranded oligonucleotide encoding, in addition to the  $\Delta$ 8 intended changes, a novel *Nae*I site (14). For the creation of  $\Delta$ 11,  $\Delta$ 8 was cut at the *Eco*RV site and at its engineered *Nae*I site, and the resulting large restriction fragment was self-ligated. Mutant  $\Delta$ 12 ( $\Delta$ 44–499) resulted from the self-ligation of the large fragment produced by digestion of the wild type c-Myc-tagged betaglycan vector with *Stu*I and *Xho*I followed by filling-in with the Klenow fragment of the DNA polymerase. In addition, untagged versions of  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 betaglycan mutants were created and used in diverse experiments as indicated in the figure legends. The soluble versions of the  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 mutants were created by suitable insertion of double-stranded oligonucleotides encoding a stop codon preceded by a hexahistidine carboxyl-terminal tail. For soluble  $\Delta$ 10, the oligonucleotide was inserted between the *Eco*RV and *Nco*I sites of wild type c-Myc-tagged betaglycan, and for soluble  $\Delta$ 11, at the *Nco*I and *Avr*II sites of c-Myc-tagged  $\Delta$ 11. All DNA manipulations were done and verified by nucleotide sequencing after standard techniques (31).

**Cell Culture, Transfections, and Generation of Baculoviral Strains**—COS-1 and L6E9 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% or 20% fetal bovine serum, respectively. Sf9 cells were grown in Grace's insect cell culture medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% fetal calf serum, yeastolate, and lactalbumin hydrolysate. High five cells (H5, Invitrogen, Carlsbad, CA) were grown in spinner flasks at 27 °C at 100 rpm using Express Five serum-free medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 4 mM glutamine. For expression in COS-1 cells, the cDNAs encoding the diverse mutant betaglycan constructs were subcloned in the pCMV5 vector (32). For stable L6E9 cells transfections, the cDNAs encoding the wild type betaglycan and the untagged  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 mutants were subcloned in the pDNA3 vector (Invitrogen). Transfer vectors for the generation of baculoviral strains consisted of the pBlueBac4 vector (Invitrogen) subclones of the inserts encoding c-Myc and hexahistidine-tagged soluble  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 mutants. Transient transfections were done by the diethylaminoethyl-dextran method (33), and assays were done 48 h post-transfection. Stable L6E9 transfection was done by the calcium phosphate precipitation method (34). Stable transfectants were

selected with 400  $\mu$ g/ml geneticin (Life Technologies, Inc.) and enriched by three rounds of magnetic cell sorting using anti-betaglycan anti-serum #822, which is directed against the ectodomain (18), and goat anti-rabbit IgG magnetic microbeads (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA). The generation of recombinant baculoviral strains expressing the soluble  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 was done by co-transfection in Sf9 cells of the pBlueBac4-based constructs with Bac-N-Blue DNA (Invitrogen) employing the calcium phosphate precipitation method.

**Purification of Baculoviral Soluble  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 Proteins**—High five cells at a density of  $2 \times 10^6$ /ml were infected at a multiplicity of infection of 10 with a high titer stock of the soluble  $\Delta$ 10 or  $\Delta$ 11 baculovirus. The conditioned media were harvested 48 h post-infection and immediately processed. Conditioned media were supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, spun at 11,000 rpm for 20 min at 4 °C to remove debris, concentrated 10 times using the Minitan ultrafiltration system (Millipore, Bedford, MA), and subjected to immobilized metal ion affinity chromatography using fast flow chelating Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech). Chelating Sepharose (a 60-ml bead column) was loaded with 50 mM  $\text{NiCl}_2$  and then equilibrated in washing buffer (25 mM Hepes pH 7.5, 1 M KCl, 20 mM imidazole, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The concentrated conditioned media were loaded, and the column was washed with 6 volumes of washing buffer and eluted with a 20–250 mM linear gradient of imidazole. Identification of the fractions containing soluble  $\Delta$ 10 or  $\Delta$ 11 proteins was done by SDS-PAGE and silver staining. Positive fractions were pooled and concentrated in an Amicon ultrafiltration chamber (Millipore, Bedford, MA). After dialysis against phosphate-buffered saline containing 1% (v/v) glycerol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, the recombinant soluble  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 proteins were stored at –70 °C. This procedure usually yielded between 3 and 4 mg of homogeneously purified proteins from each liter of conditioned media.

**Affinity Labeling and Binding Assays**—TGF- $\beta$  was radiolabeled with [ $^{125}$ I]iodine using chloramine T (11), whereas a lactoperoxidase method was employed for inhibin A labeling (35). Binding assays, affinity labeling, and immunoprecipitations under native or denaturing/reducing conditions were done as described (18). TGF- $\beta$  affinity labeling in solution was done with the purified soluble  $\Delta$ 10 or  $\Delta$ 11 proteins (50 ng/assay) as described before (14).

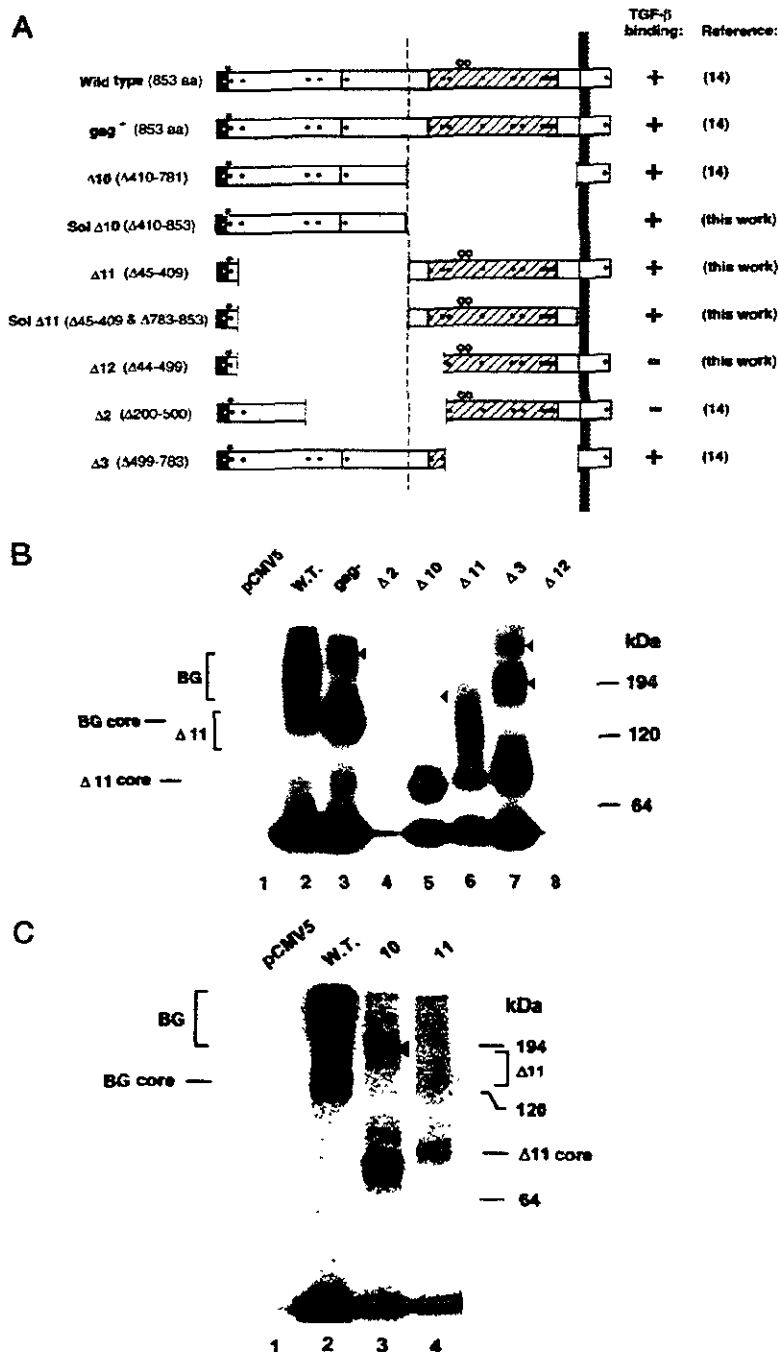
**Smad2 Phosphorylation Assay**—Determination of phosphorylated Smad2 was done by Western blot with anti-phospho-Smad2 (Ser465/467) anti-serum (a generous gift of C.-H. Heldin, Uppsala, Sweden). L6E9 myoblast cells expressing the wild type and betaglycan mutants were stimulated with 20 pM TGF- $\beta$ 2 or TGF- $\beta$ 1 for 15 min. Cells were lysed in TTE buffer (0.1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA) supplemented with inhibitors of proteases (10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml antipain, 100  $\mu$ g/ml benzamide hydrochloride, 50  $\mu$ g/ml aprotinin, 100  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10  $\mu$ g/ml pepstatin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and phosphatases (10 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 100  $\mu$ M sodium orthovanadate, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate). Equal amounts of protein from cell lysates were separated by SDS-PAGE (9% gels), transferred to nitrocellulose membranes, and probed with anti-phospho-Smad2. Equal loading of Smad2 was verified by probing the membranes again with an anti-Smad2 antibody (a generous gift of J. L. Wrana). Immunoblots were revealed using the enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) and autoradiography.

#### RESULTS

**Betaglycan Deletion Mutagenesis Has Identified 2 Independent TGF- $\beta$  Binding Regions**—At least 20 deletion mutants of rat betaglycan have been created and assayed in eukaryotic expression systems with the purpose of mapping its TGF- $\beta$  binding sites (14, 25–27). These studies identify two binding regions that are approximately located at the membrane-distal (amino-terminal) half (14, 27) and at the membrane-proximal (carboxyl-terminal) half of betaglycan ectodomain (25, 26). Because these halves contain the regions of similarity to endoglin and uromodulin, here we will refer to them as the E-related and the U-related regions, respectively (Fig. 1A).

To determine the functional properties of betaglycan TGF- $\beta$  binding regions, we decided to test their ligand binding affinities, TGF- $\beta$ 2 presentation, and TGF- $\beta$ 2-enhancing functions. For that purpose we constructed betaglycan mutants analogous to those described by Pepin *et al.* (25), *i.e.* lacking the amino-terminal half of betaglycan ectodomain. Our new trun-

**FIG. 1. Betaglycan mutants and their TGF- $\beta$  binding activity.** *A*, the rat betaglycan mutants employed in this study are presented schematically. The amino acids deleted are indicated in parentheses. Betaglycan GAG attachment sites at serines 535 and 546 (circles), its signal peptide (black box), and the position of its cysteines (dots) are indicated. The cell plasma membrane (stripped bar) and the c-Myc epitope tag (asterisk) are also indicated. Untagged versions of the wild type betaglycan and its  $\Delta 10$  and  $\Delta 11$  mutants were also used in the present work as described in the corresponding figure legends. Regions of sequence similarity to endoglin and uromodulin are indicated as shadowed and cross-hatched boxes, respectively. Flanking the uromodulin-related region there are sequences (empty boxes) without similarity to known proteins. Within the uromodulin-related region, there is an additional short region of similarity to endoglin that includes its first three cysteines (7). A dashed line drawn through residues 409–410 indicates the boundaries of the membrane-distal (E-related) and membrane-proximal (U-related) TGF- $\beta$  binding regions of betaglycan ectodomain. COS-1 cells were transiently transfected with the empty expression vector (pCMV5) or the indicated c-Myc-tagged betaglycan mutants (*B*) or with the indicated untagged betaglycan mutants (*C*). Two days post-transfection the cultures were affinity-labeled with 200 pM  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta 1$  (*B*) or 200 pM  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta 2$  (*C*). Cell lysates were immunoprecipitated with the anti-c-Myc 9E10 monoclonal antibody (*B*) or with the anti-betaglycan ectodomain rabbit antiserum #822 (*C*). The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography (*B*) or phosphorimager scanning (*C*) of the gels. Migration of molecular mass standards (in kDa) and the position of cross-linked oligomers of some mutant receptors (arrowheads) are indicated. *W.T.*, wild type betaglycan.



cated mutants  $\Delta 11$  and  $\Delta 12$  lack residues 45–409 ( $\Delta 45$ –409) and 44–499 ( $\Delta 44$ –499) of wild type rat betaglycan, respectively (Fig. 1*A*). Mutants  $\Delta 11$  and  $\Delta 12$  are complementary to the set that we have described before (14). In particular  $\Delta 11$ , which lacks the entire amino-terminal half, is the complement of our previous  $\Delta 10$  ( $\Delta 410$ –781) mutant, which lacks the entire carboxyl-terminal half of the ectodomain. Mutants  $\Delta 11$  and  $\Delta 12$  along with the wild type betaglycan and our previously characterized  $\Delta 2$  ( $\Delta 200$ –500),  $\Delta 3$  ( $\Delta 499$ –783),  $\Delta 10$ , and *gag*<sup>-</sup> mutants (14), were tested for TGF- $\beta$  binding activity. For that purpose, COS-1 cells transiently transfected with these mutant vectors were affinity-labeled with  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta 1$  or  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta 2$ . Betaglycan-specific labeled products were revealed by immunoprecipitation of the cell lysates followed by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 1, *B* and *C*). As reported

before, the wild type betaglycan appeared as a “part time” proteoglycan, that is, a GAG-containing product of smeared mobility above 200 kDa plus the 130-kDa core protein (Fig. 1, *B* and *C*, lanes 2). Also as before, the *gag*<sup>-</sup> mutant showed exclusively as a core protein, devoid of GAG chains (Fig. 1*B*, lane 3). The *gag*<sup>-</sup> betaglycan is a double point mutant of the serines that have been shown to be the GAG chain acceptor amino acids (S535, 546A), and therefore, it is not processed as a proteoglycan; however, it displays the wild type receptor TGF- $\beta$  binding activity (14). Mutants  $\Delta 10$  and  $\Delta 3$ , which do not contain the serines 535 and 546, also appeared as core proteins with relative mobilities of ~85 and 97 kDa, respectively. The high molecular weight affinity-labeled proteins exhibited by *gag*<sup>-</sup>,  $\Delta 10$ , and  $\Delta 3$  mutants (Fig. 1, *B* and *C*, arrowheads), result from cross-linked dimeric and oligomeric forms of these

mutant receptors (14, 25). In agreement with Pepin *et al.* (25), our new  $\Delta 11$  mutant, which includes all the 10 cysteines residues that define the uromodulin similarity (24), also bound TGF- $\beta 1$  and TGF- $\beta 2$  (Figs. 1, *B*, lane 6, and *C*, lane 4). The protein expressed by  $\Delta 11$  was affinity-labeled both as a core protein of ~95 kDa as well as a proteoglycan (smear between 120–194 kDa), as could be expected since it contains the serines 535 and 546. Mutant  $\Delta 12$ , which lacks residues 44–499 of betaglycan core protein, including the first two cysteines of the U-related region, did not bind any of the three TGF- $\beta$  isoforms (Fig. 1*B*, lane 8, and data not shown). In addition, the empty pCMV5 vector and our previously reported  $\Delta 2$  mutant were included in these experiments as negative controls. The TGF- $\beta$  binding incapacity of  $\Delta 2$  and  $\Delta 12$  was not due to lack of expression. All the deletion mutants shown in Fig. 1*A* were verified for cell surface expression by fluorescence-activated cell sorter analysis using the appropriate antibody (data not shown). In summary, the analysis of our new mutants along with those previously described confirmed the existence of two discrete regions of betaglycan ectodomain with TGF- $\beta$  binding activity. The functional characterization of these regions, which are located between residues 45–410 and 410–781 and are present in our  $\Delta 10$  and in  $\Delta 11$  mutants, respectively, will be presented in the following sections.

**Both Betaglycan Ligand Binding Regions Bind TGF- $\beta 1$  and TGF- $\beta 2$  with Relative Affinities Similar to the Wild Type Receptor**—As a first step to characterize the betaglycan TGF- $\beta$  binding regions, we assayed the  $\Delta 10$  and  $\Delta 11$  mutants in binding competitions with the  $\beta 1$  and  $\beta 2$  isoforms. As a reference, we also tested the wild type betaglycan, which has a characteristic higher affinity for TGF- $\beta 2$  that is revealed by a very weak TGF- $\beta 2$  binding competition by the other isoforms (15–17). For this purpose, COS-1 cells were transfected with the wild type betaglycan, the  $\Delta 10$ , or the  $\Delta 11$ , pCMV5-based constructs and subjected to a  $^{125}\text{I}$ -labeled TGF- $\beta 2$  binding assay in the presence of increasing concentrations of competing unlabeled TGF- $\beta 1$  or TGF- $\beta 2$ . As expected for the wild type betaglycan, 50% of its binding of 50 pM  $^{125}\text{I}$ -labeled TGF- $\beta 2$  was prevented by ~3 nM cold TGF- $\beta 2$ , whereas it was not affected by concentrations as high as 10 nM cold TGF- $\beta 1$  (Fig. 2*A*, *WT*). The  $\Delta 10$  and  $\Delta 11$  mutants exhibited  $^{125}\text{I}$ -labeled TGF- $\beta 2$  total binding and competition patterns that are similar to those observed in the intact receptor, indicating that they have the same TGF- $\beta$  isoform relative affinities as the wild type betaglycan (Fig. 2*A*,  $\Delta 10$  and  $\Delta 11$ ).

To demonstrate that these TGF- $\beta$  binding properties are intrinsic to these regions, we did a similar  $^{125}\text{I}$ -labeled TGF- $\beta 2$  binding competition analysis with the purified soluble forms of the  $\Delta 10$  and  $\Delta 11$  mutants (Fig. 2*B*). For this purpose we created baculoviral strains of soluble  $\Delta 10$  and  $\Delta 11$  whose protein products could be secreted into the conditioned media of infected insect cells. Since the soluble  $\Delta 10$  and soluble  $\Delta 11$  mutants were engineered with a hexa-histidine carboxyl-terminal tail, they could be purified to homogeneity by immobilized metal ion affinity chromatography as described under "Experimental Procedures." Purified soluble  $\Delta 10$  and soluble  $\Delta 11$  proteins were subjected to affinity labeling in solution with a constant amount of  $^{125}\text{I}$ -labeled TGF- $\beta 2$  and increasing amounts (from 0–2 nM) of competing unlabeled TGF- $\beta 1$ , or TGF- $\beta 2$ . Purified soluble  $\Delta 10$  and soluble  $\Delta 11$  are glycoproteins with a molecular mass of 52 and 63 kDa, respectively (data not shown), which after  $^{125}\text{I}$ -labeled TGF- $\beta 2$  cross-linking, migrate just below and above and 64-kDa marker (Fig. 2*B*). The amount of labeled soluble  $\Delta 10$  and soluble  $\Delta 11$  was quantified from the Phosphor-Imager (Molecular Dynamics) scans of the SDS-PAGE gels and plotted as the percent of affinity-labeling competition against

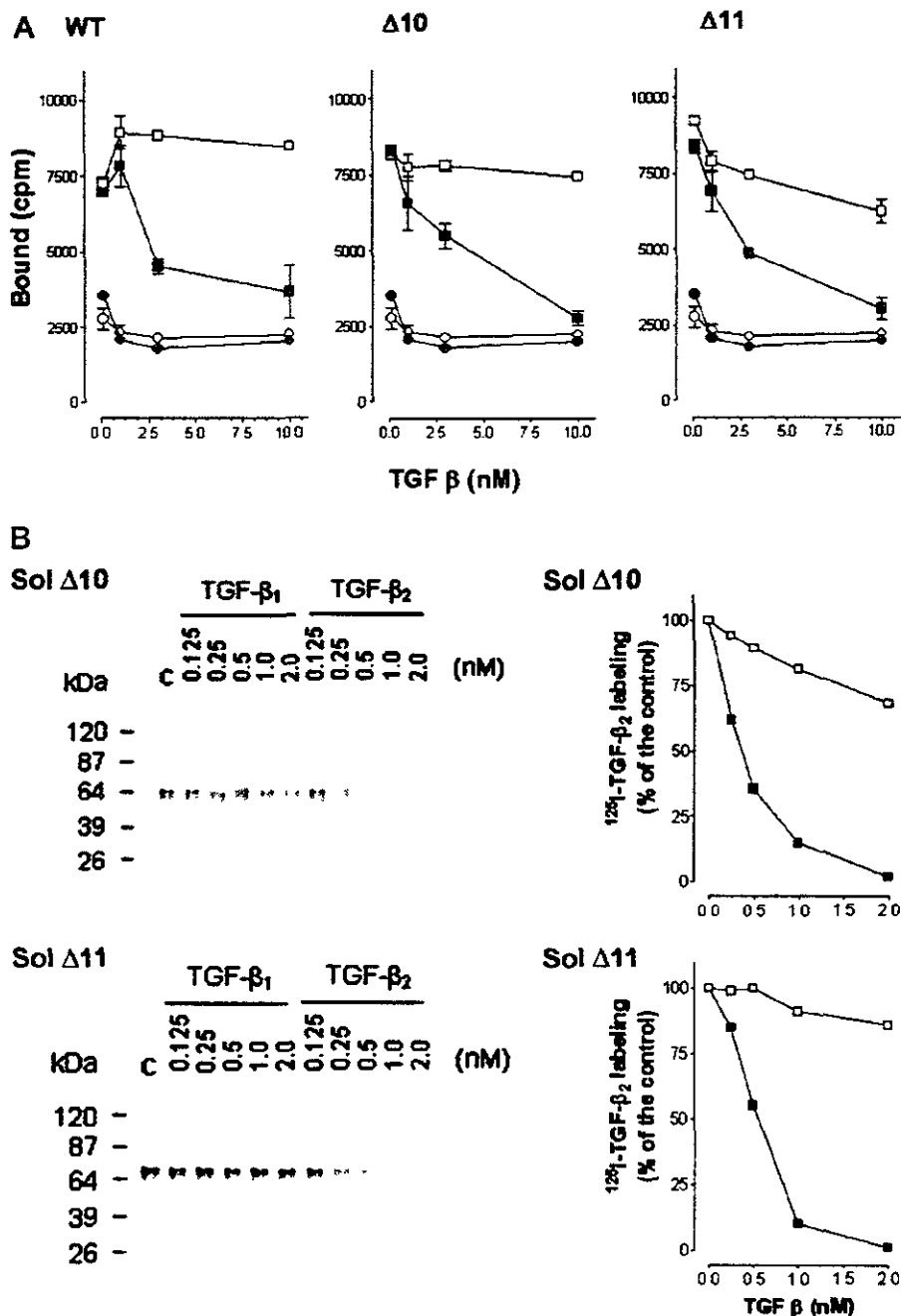
the cold competitor concentration (Fig. 2*B*, right panels). Similar to what was observed for their membrane counterparts, the half-maximal homologous competition of the TGF- $\beta 2$  labeling was at least one order of magnitude higher than the TGF- $\beta 1$  heterologous competition. Taken together, the data suggested that the relative affinities of both membrane-bound and soluble  $\Delta 10$  and  $\Delta 11$  mutants for TGF- $\beta 1$  and TGF- $\beta 2$  are very similar to each other and to the wild type betaglycan.

**TGF- $\beta 2$  Presentation Function of Betaglycan Ligand Binding Regions**—Since both betaglycan TGF- $\beta$  binding regions have TGF- $\beta 2$  binding affinities that are comparable with those of the intact receptor, we decided to test whether or not they conserved the TGF- $\beta 2$  presentation function of the wild type betaglycan (6, 18, 20). This presentation function refers to the capacity of the membrane-bound betaglycan to increase the TGF- $\beta 2$  labeling of the TGF- $\beta$  type II receptor. Presumably, this function accounts for the enhanced potency of the TGF- $\beta 2$  isoform in the presence of betaglycan (18). To measure the TGF- $\beta 2$  presentation function of betaglycan TGF- $\beta$  binding regions, we co-expressed a few of our c-Myc-tagged mutants along with the human TGF- $\beta$  type II receptor by transient transfection of COS-1 cells. The type II receptor cDNA used in this experiment has been tagged with the influenza virus hemagglutinin HA1 epitope that is recognized by the monoclonal antibody 12CA5 (36). After co-transfection, these cells were affinity-labeled with  $^{125}\text{I}$ -labeled TGF- $\beta 2$ , and the cell lysates were subjected to denaturation and reduction and then to immunoprecipitation with either the anti-c-Myc antibody 9E10 (37) or the anti-HA1 antibody. The immunoprecipitates were resolved in SDS-PAGE and revealed by autoradiography. The denaturation and reduction step abrogates any noncovalent complex formed between the two receptors during the affinity labeling, thus preventing their co-immunoprecipitation. The anti-c-Myc immunoprecipitates revealed that the TGF- $\beta 2$ -labeled c-Myc-betaglycan mutants (Fig. 3*A*) exhibit gel migration patterns similar to those observed with TGF- $\beta 1$  (Fig. 1*B*). This suggests that the co-expression of the TGF- $\beta$  type II receptor did not alter the binding properties of the betaglycan mutants; however, the labeling of the former was regulated by the expression of the latter. The anti-HA1 immunoprecipitates revealed the extent to which the co-transfection partner enhanced the labeling of the type II receptor (Fig. 3*B*). Co-transfection with the wild type betaglycan, either in its proteoglycan (*W.T.*) or core protein form (*gag*<sup>-</sup>) resulted in an increased labeling of the type II receptor (Fig. 3*B*, lanes 5 and 6). Co-transfection with the empty pCMV5 vector resulted in negligible labeling of the type II receptor, revealing its endogenous poor TGF- $\beta 2$  binding activity (lane 1, Fig. 3*B*). Similarly, co-transfection with  $\Delta 2$  or  $\Delta 12$ , mutants without TGF- $\beta 2$  binding, resulted in a barely detectable increase in the labeling of type II receptor (when compared with the empty vector, lanes 2 and 3, Fig. 3*B*), which may be regarded as non-specific "background" of this kind of experiments. Co-transfection with  $\Delta 11$ , which had a level of TGF- $\beta 2$  labeling similar to the wild type betaglycan (lanes 4 and 5, Fig. 3*A*), resulted only in a slight increase over the background level of labeling of the type II receptor (compare lane 4 against lanes 2 and 3 in Fig. 3*B*). On the other hand, co-transfection with  $\Delta 3$  or  $\Delta 10$  resulted in an approximate 2- or 3-fold increase, respectively, over the level of type II receptor labeling promoted by the wild type betaglycan (compare lanes 7 and 8 against lanes 5 and 6 in Fig. 3*B*). Thus, despite sharing the property of binding TGF- $\beta 2$ , the  $\Delta 3$ ,  $\Delta 10$ , and  $\Delta 11$  betaglycan mutants are not equal in their ability to "present" this isoform to the TGF- $\beta$  type II receptor.

To confirm that this effect also could be observed with the endogenous type II receptor and that it did not depend on any of the epitope tags present in the tested receptors, we analyzed the



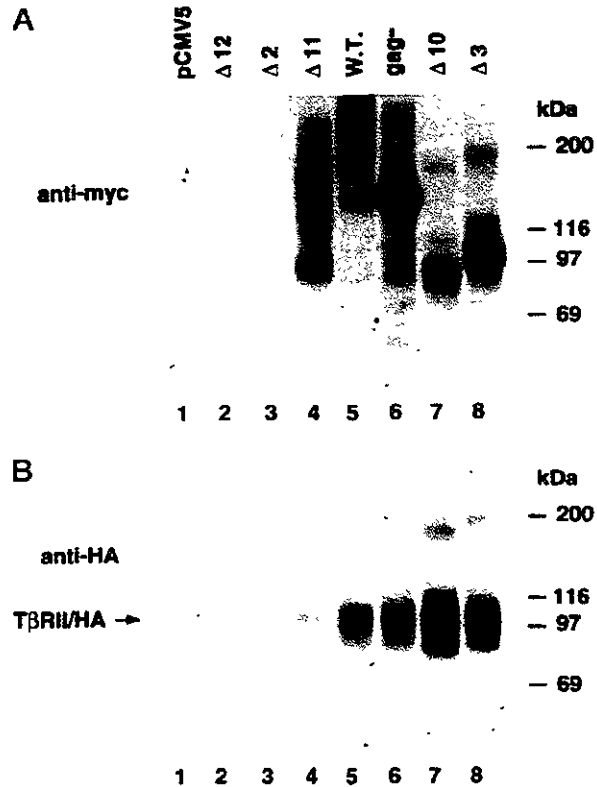
**FIG. 2. TGF- $\beta$  isoform specific binding competition of betaglycan mutants.** A, COS-1 cells were transiently transfected with the empty expression vector (pCMV5 (circles)) or the indicated untagged betaglycan vectors (squares). One day after transfection, the cells were split into 24-well plates for assay. On the next day, cells were labeled with 50 pM  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta$ 2 in the presence of the indicated concentrations (0, 1, 3, or 10 nM) of cold TGF- $\beta$ 1 (open symbols) or TGF- $\beta$ 2 (closed symbols). The bound iodinated ligand is plotted against the concentration of the unlabeled competitor. B, purified soluble  $\Delta$ 10 (Sol  $\Delta$ 10) or soluble  $\Delta$ 11 (Sol  $\Delta$ 11) proteins (50 ng/assay) were subjected to affinity-labeling in solution with 100 pM  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta$ 2 in the absence (C) or presence of the indicated concentration of competing unlabeled TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2. After cross-linking with disuccinimidyl suberate, the labeling reactions were quenched with Tris-Cl and immunoprecipitated with anti-betaglycan antiserum #822, and the immunoprecipitates were revealed by SDS-PAGE and phosphorimager scanning (left panels). The percentage of competition was estimated from densitometric analysis of the labeled soluble  $\Delta$ 10 and soluble  $\Delta$ 11 using the ImageQuant Software and plotted against the competitor TGF- $\beta$  concentration (right panels). WT, wild type betaglycan.



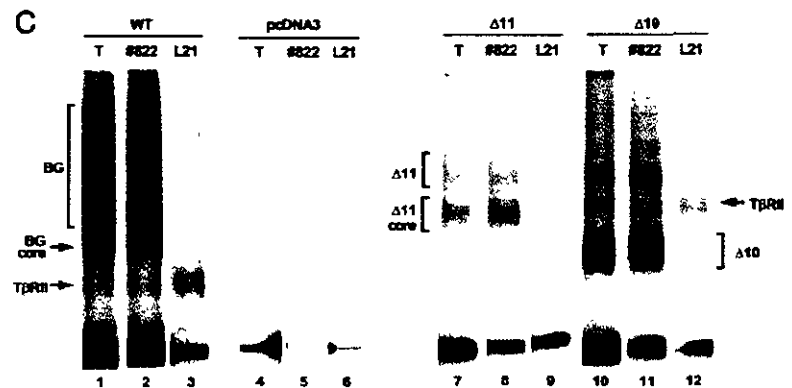
TGF- $\beta$ 2 presentation function of the untagged betaglycan mutants in rat L6E9 myoblasts. For that purpose we transfected L6E9 cells, which normally do not express betaglycan (6, 18), with the wild type and the  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 betaglycan mutants and used magnetic bead immunoabsorption to obtain enriched pools of stable transfectants. The enriched pools were subjected to affinity labeling with 150 pM  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta$ 2, and the identity of the labeled products was revealed by specific immunoprecipitation under nondenaturing conditions (Fig. 3C). At this TGF- $\beta$ 2 concentration, the level of labeling of control-transfected L6E9 cells was practically negligible (Fig. 3C, lanes 4–6). On the other hand, expression of the wild type betaglycan resulted in a significant increase in the labeling of the endogenous type II receptor (Fig. 3C, compare lanes 3 and 6). This effect, which has been observed before, is due to an increase in TGF- $\beta$ 2 relative affinity of the endogenous type II receptor in the presence of

betaglycan rather than to an increase in the amount of the receptor (6, 18). Also, as has been observed before (18), in the presence TGF- $\beta$ 2 the endogenous type II receptor forms a complex with betaglycan that can be demonstrated by co-immunoprecipitation with specific receptor antibodies (Fig. 3C, lanes 2–3). In this kind of assay, the betaglycan mutant  $\Delta$ 10 was capable of increasing the TGF- $\beta$ 2 labeling of the endogenous type II receptor and of forming an immunoprecipitable complex with it (Fig. 3C, lanes 10–12). However, and similar to what was observed in co-transfected COS-1 cells, the  $\Delta$ 11 mutant efficiently bound TGF- $\beta$ 2 but fails to increase the labeling of the type II receptor (Fig. 3C, lanes 7–9).

**Both Betaglycan Ligand Binding Regions Enhance the TGF- $\beta$ 2-dependent Smad2 Phosphorylation**—The data presented in Fig. 3 indicated that the TGF- $\beta$ 2 presentation function of betaglycan is a property of the E-related region and, therefore,

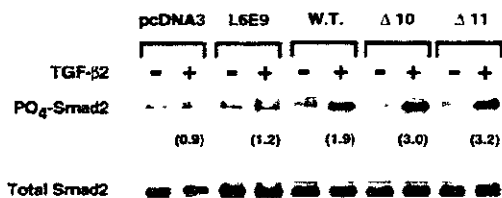


**FIG. 3. TGF- $\beta$ 2 presentation activity of betaglycan mutants.** *A* and *B*, COS-1 cells were transiently co-transfected with the HA1 epitope-tagged TGF- $\beta$  type II receptor (*T $\beta$ RII/HA*) vector and the indicated c-Myc-tagged betaglycan mutants or the empty expression vector (pCMV5). Two days post-transfection the cultures were affinity-labeled with 100 pM  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta$ 2, and the cell lysates were denatured by boiling in the presence of SDS and dithiothreitol. Then, one-half of the cell lysate was immunoprecipitated with the 9E10 monoclonal anti-c-Myc antibody (*A*) and the other half with the 12CA5 monoclonal anti-HA antibody (*B*). The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography of the gels. *C*, cultures of L6E9 cells, stably transfected with indicated untagged betaglycan (*BG*) mutants or the empty expression vector (pcDNA3), were affinity-labeled with 150 pM  $^{125}$ I-labeled TGF- $\beta$ 2. Equivalent aliquots of their cell lysates were immunoprecipitated with the anti-betaglycan antiserum (#822) or with the anti-TGF- $\beta$  type II receptor antibody (L21, Santa Cruz). The immunoprecipitates as well as an aliquot of the total cell lysates (*T*) were separated by SDS-PAGE and visualized by phosphorimager scanning of the gels. WT, wildtype betaglycan.



strongly suggested that this ligand binding region would preferentially enhance the TGF- $\beta$ 2 signals. To evaluate this possibility, we decided to determine how the expression of the  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 mutants affected the TGF- $\beta$ 2-induced Smad2 phosphorylation in L6E9 cells. We chose to measure Smad2 phosphorylation because it is one of the earliest steps in TGF- $\beta$  signaling and could most directly reveal if the TGF- $\beta$ 2 presentation function of betaglycan had any effect in the TGF- $\beta$  pathway (38). Also, to rule out any possible idiosyncratic behavior of a single clones, we preferred to employ for this experiment the pool of stable L6E9 transfectants analyzed in Fig. 3C and to include as an additional negative controls, the untransfected L6E9 cells. These cells were treated with 20 pM TGF- $\beta$ 2 for 15 min, and their lysates were separated in SDS-PAGE and blotted for immunodetection with an antiserum that recognizes Smad2 phosphorylated at serines 465 and 467 (39). It has been demonstrated that these Smad2 serines are the phosphorylation target of the activated TGF- $\beta$  type I receptor kinase (40, 41). The phopho-Smad2 signal was normalized using as a standard the amount of total Smad2, as detected by probing the stripped blot with an antiserum that recognizes all forms of

Smad2 (42). Control untransfected L6E9 or pcDNA3-transfected cells did not significantly increase basal phosphorylation of Smad2. As it was expected for the wild type betaglycan, its expression caused a 1.9-fold increase in the Smad2 phosphorylation. Surprisingly, expression of the  $\Delta$ 10 or  $\Delta$ 11 betaglycan mutants caused similar increases of Smad2 phosphorylation, 3.0- and 3.2-fold, respectively (Fig. 4). The experiment shown in Fig. 4 is representative of a total of three in which the same result was observed, namely, that both betaglycan ligand binding regions were equally capable of enhancing the TGF- $\beta$ 2-induced Smad2 phosphorylation. Importantly, this short term exposure and limiting concentration of TGF- $\beta$ 2 was required to demonstrate any betaglycan dependence of the Smad2 phosphorylation. Similar treatment with TGF- $\beta$ 1 or longer treatment with higher concentrations of TGF- $\beta$ 2 (50 pM) caused equivalent increases of the Smad2 phosphorylation in the tested cell pools (data not shown). Overall, these experiments indicate that the E- and U-related regions, despite their contrasting TGF- $\beta$  presentation ability, both enhance the TGF- $\beta$  signal as well as the wild type betaglycan. In addition, this enhancement occurs in a TGF- $\beta$  isoform-specific manner and



**FIG. 4. TGF- $\beta$ 2-enhancing activity of betaglycan mutants.** Cultures of untransfected L6E9 cells or pools of L6E9 cells stably transfected with indicated untagged betaglycan mutants or the empty expression vector (pcDNA3) were treated with 20 pM TGF- $\beta$ 2 (+) or with the plain medium (-; DMEM plus 0.2% FBS) for 15 at 37 °C. After treatment the cultures were quickly chilled and lysed in the presence of phosphatase and protease inhibitors. Equivalent amounts of cell lysates were separated SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting with antibodies that recognize Smad2 (Total Smad2) or, specifically, its phosphorylated form (PO<sub>4</sub>-Smad2). WT, wild type betaglycan.

only under limiting concentrations of the factor.

**Betaglycan Ability to Bind Inhibin A Resides in Its U-related Ligand Binding Region**—Recently it has been described that betaglycan binds inhibin A, enhances inhibin A binding to the activin type II receptor, and establishes a receptor complex that mediates the inhibin antagonism of activin (22). Therefore, we determined whether or not the inhibin A binding function of betaglycan could be assigned to any of its 2 TGF- $\beta$  binding regions. For that purpose, we transfected COS-1 cells with the wild type betaglycan or its mutants alone or in the presence of the activin type II receptor and measured their <sup>125</sup>I-labeled inhibin A binding. Table I shows the total counts bound to these cells in one representative experiment of the three performed with similar results. Cells transfected with the wild type or the gag<sup>-</sup> betaglycan vector had higher inhibin A binding than the pCMV5-transfected control cells. These results are in agreement with those of Lewis *et al.* (22) and indicate that betaglycan GAG chains are dispensable for the inhibin A binding. In all the experiments performed, the  $\Delta$ 11 mutant exhibited inhibin A binding that was comparable with that of the cells expressing the wild type or the gag<sup>-</sup> betaglycan. On the other hand, the  $\Delta$ 10 mutant consistently showed inhibin A binding that was similar to pCMV5-transfected control cells. COS-1 cells transfected with the activin type II receptor also exhibited inhibin A binding above the control cells. As expected, the inhibin A binding of cells expressing the activin type II receptor could be further increased by co-transfection with the wild type, the gag<sup>-</sup> betaglycan, or the  $\Delta$ 11 vectors. However, the  $\Delta$ 10 mutant could only marginally increase the inhibin A binding of the type II activin receptor. These results suggest that the intrinsic inhibin A binding capacity of betaglycan resides exclusively in the U-related ligand binding region.

To probe the relative affinities of this region for its TGF- $\beta$  superfamily ligands, the binding of 50 pM <sup>125</sup>I-labeled inhibin A was competed with a 10- and 100-fold excess of unlabeled TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, or inhibin A. This experiment, shown in Fig. 5, confirms that the U-related region, but not the E-related region, binds inhibin A as efficiently as the wild type and gag<sup>-</sup> betaglycan. A practically complete homologous competition of this binding could be obtained with 0.5 nM unlabeled ligand. However, in the heterologous competition, even at 100-fold excess, TGF- $\beta$ 1 could only partially compete the inhibin A binding. On the other hand, TGF- $\beta$ 2 was a strong competitor of the inhibin A binding, exhibiting degrees of competition that are indistinguishable from those observed with the homologous ligand. Interestingly, the binding of 100 pM <sup>125</sup>I-labeled TGF- $\beta$ 2 to wild type betaglycan or its gag<sup>-</sup>,  $\Delta$ 10, and  $\Delta$ 11 mutants could not be competed at all by 7 nM inhibin A (data not shown). All

together, these experiments suggest that, although the E-related ligand binding region of betaglycan binds only TGF- $\beta$ , the U-related region also binds inhibin A with the following relative affinities: TGF- $\beta$ 2 > inhibin A > TGF- $\beta$ 1.

## DISCUSSION

Betaglycan belongs to a class of cell surface receptor molecules that regulate the access of ligands to the signaling receptors. The functional relevance of this growing class of co-receptors is exemplified by cell surface heparan sulfates, which are necessary for the high affinity binding and signaling of basic fibroblast growth factor (43, 44). Betaglycan is a particularly interesting and versatile co-receptor because it modulates the effects of at least three members of the TGF- $\beta$  superfamily. In one hand, membrane-bound betaglycan positively regulates TGF- $\beta$ , whereas in the other, it mediates the inhibin antagonism of the activin signal (18, 22). Furthermore, a soluble form of betaglycan capable of binding TGF- $\beta$  with high affinity has been found in serum and extracellular matrix (45). A recombinant version of soluble betaglycan binds, sequesters, and thereby antagonizes TGF- $\beta$ , playing an opposite role to the membrane-bound counterpart (14). Because of these dual actions, it has been proposed that betaglycan could be one of TGF- $\beta$  major *in vivo* regulators (46). To fully understand and take advantage of betaglycan properties, it is necessary to characterize its interactions with its different ligands and signaling receptors. Betaglycan binds inhibin A and all three mammalian TGF- $\beta$  isoforms through its ectodomain core protein, which is disproportionately large when compared with the ectodomains of the corresponding signaling receptors. The regional similarities that betaglycan ectodomain exhibits with endoglin (7) and with a class of extracellular proteins related to uromodulin (24) suggest a modular design with separate domains. Interestingly, this modular design seems to adjust well to the identified regions of TGF- $\beta$  binding activity. Several groups have used deletion mutants of rat betaglycan to map betaglycan TGF- $\beta$  binding regions (14, 25–29). This experimental approach has revealed two ample portions of betaglycan with TGF- $\beta$  binding activity that approximately correspond to each half of its ectodomain, the membrane-distal (E-related) and the membrane-proximal (U-related) regions (Fig. 1A). In the present work we report the creation of additional betaglycan mutants that contain the U-related regions ( $\Delta$ 11 and  $\Delta$ 12) and, thus, complete our previously described set of mutants (14). The availability of these new mutants has provided us with the materials to study the functional properties of these regions.

The TGF- $\beta$  affinity labeling of our new and a few selected old mutants (Figs. 1, B and C, and 3A) confirmed the presence of TGF- $\beta$  binding activity in the E-related region, present in mutants  $\Delta$ 3,  $\Delta$ 10, and in the U-related region, present intact in mutant  $\Delta$ 11. In addition, we have found that these regions have TGF- $\beta$  binding affinities that are very similar to the intact receptor. Ligand binding competitions (Fig. 2) indicate that  $\Delta$ 10 and  $\Delta$ 11 exhibit the same relative TGF- $\beta$  affinities, approximately one order of magnitude higher for TGF- $\beta$ 2 than for TGF- $\beta$ 1. This TGF- $\beta$  isoform selectivity has been shown before for the intact wild type receptor (15–17). Interestingly, when the E-related and the U-related regions are expressed as soluble receptors, they have the same relative TGF- $\beta$  affinities of their membrane counterparts and the wild type receptor. These results further support the possibility that the residues in the E- and U-related regions may constitute *bona fide* independent structural domains of the betaglycan extracellular region.

Nonetheless, the precise determination of the sites or residues involved in the ligand binding activity in these domains will be difficult to obtain by further analysis of betaglycan-

TABLE I  
Betaglycan mutants and their inhibin A binding activity

COS-1 cells were transiently co-transfected with the indicated untagged betaglycan vector and the empty expression vector (pCMV5) or the type II activin receptor (ActRII) vector. Two days after transfection the cells were labeled with 125 pM <sup>125</sup>I-labeled inhibin A, and the bound ligand was counted. The bound counts were normalized using as the unit the counts bound by the pCMV5 vector alone or in the presence of the ActRII, and the normalized values are shown within parenthesis.

	pCMV5	Wild type	Δ 10	Δ 11	gag <sup>-</sup>
Without ActRII	1,918 (1.0)	4,333 (2.3)	1,722 (0.9)	8,070 (4.2)	9,475 (4.9)
In the presence of ActRII	10,182 (1.0)	27,614 (2.7)	15,655 (1.5)	26,762 (2.6)	42,088 (4.1)

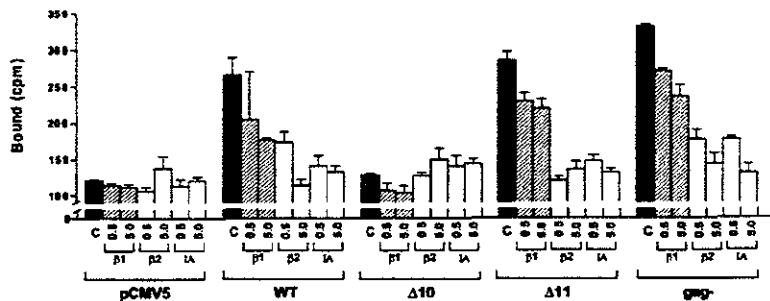


FIG. 5. Ligand binding competition of inhibin A binding of the betaglycan mutants. COS-1 cells were transiently transfected with the empty expression vector (pCMV5) or the indicated untagged betaglycan vectors. One day after transfection, the cells were split into 24-well plates for assay. On the next day, cells were labeled with 50 pM <sup>125</sup>I-labeled inhibin A in the absence (C (closed bars)) or in the presence of the indicated concentrations (0.5 or 5.0 nM) of cold TGF-β1 (cross-hatched bars), TGF-β2 (dotted bars), or inhibin A (empty bars). The bound iodinated ligand is plotted against the indicated unlabeled competitor. WT, wild type betaglycan.

truncated mutants, an approach that has met with puzzling results. As an example is the case of our previously published Δ1 (Δ45–199), Δ5 (Δ200–285), Δ8 (Δ45–282), and Δ9 (Δ287–409) mutants, which despite having complete the U-related region, do not bind TGF-β (14). A plausible explanation for this inability is that the portions of the E-related region that were not deleted in Δ1, Δ5, Δ8, and Δ9 indirectly affect the TGF-β binding activity of the U-related region by a “downstream folding effect.” Presumably, the leftover segments of the upstream E-related region in these mutants would cause an improper folding of the downstream U-related region and thereby loss of its TGF-β binding activity. The incomplete maturation of the mutant receptor, which would be another consequence of its putative improper folding, has been ruled out for all our mutants (old and new), since each one of them has been shown to reach the cell surface. Downstream folding effects may also explain the discrepancies in TGF-β binding activity shown by mutants that look alike. A case in point is our inactive Δ12 (Δ44–499) mutant (Figs. 1 and 3), which is very similar to the active Δ44–564 and Δ44–575 mutants published by the group of O’Connor-McCourt (25). The removal of the first two cysteines that define the uromodulin similarity of the U-related region, as in mutant Δ12, renders this TGF-β binding region inactive. Surprisingly, O’Connor’s group has found that the additional removal of the third or the third and fourth of these cysteines, as in their mutants Δ44–564 and Δ44–575, do not affect the binding activity of the U-related region (25). This would suggest that downstream folding effects impair the major determinants of the TGF-β binding activity of the U-related region in a very unpredictable manner. Also, these results would indicate that the last 213 residues of the U-related region are the most relevant for its TGF-β binding activity; unfortunately, further deletion of residues within this region has been uninformative. The inactivity of their Δ44–596 mutant has been attributed to improper maturation of the mutant receptor, making it difficult to assess its intrinsic TGF-β binding activity (26). In view of the shortcomings of the analysis by deletion mutants, it is likely that the precise determination of the residues directly involved in the TGF-β-binding activity of the betaglycan E- and U-related regions will require the use of

biophysical techniques. These techniques, such as x-ray diffraction or nuclear magnetic resonance could be employed with our purified soluble Δ10 and Δ11 mutants.

Another issue addressed in this work is the TGF-β2 presentation activity of the betaglycan TGF-β binding regions. We and others have demonstrated that the endogenous low affinity that the type II receptor has for TGF-β2 is compensated by the TGF-β presentation activity of the membrane-bound wild type betaglycan (18, 20). We evaluated the TGF-β2 presentation activity of the betaglycan TGF-β binding regions by determining the extent of TGF-β2 labeling that they confer to the type II receptor. For that we performed two kinds of experiments; in one we used epitope-tagged receptors in transiently transfected COS-1 cells (Fig. 3, A and B), and in another we used stably expressed untagged receptors in L6E9 cells (Fig. 3C). Both experiments led, essentially, to the same conclusion; the TGF-β binding regions of betaglycan have opposite ability to present this TGF-β isoform to the type II receptor. In both experiments the basal level of TGF-β2 binding of type II receptor, either the one endogenously present in the L6E9 cells or the one transiently transfected in COS-1 cells, is negligible in the absence of betaglycan (Fig. 3, B and C). In COS-1 cells, co-transfection with the wild type betaglycan or its gag<sup>-</sup> mutant greatly increased the TGF-β2 labeling of the type II receptor. Co-expression of Δ11, the betaglycan mutant encoding the complete U-related region, did not promote the same level of binding. At best, Δ11 improved the levels obtained with mutants devoid of TGF-β binding activity, which may be regarded as background. Similarly, when the Δ11 mutant was expressed in L6E9 cells, it did not increase the TGF-β2 binding of the type II receptor. On the other hand, in COS-1 cells, co-expression of Δ10 or Δ3 betaglycan mutants encoding the complete E-related region promoted the type II receptor TGF-β2 binding at levels even higher than those observed with the wild type betaglycan. In the L6E9 cells, the expression of the Δ10 mutant also increased the labeling of the type II receptor; however, in this case the wild type betaglycan was a better TGF-β2 presenter than the Δ10 mutant. The slightly better labeling of the L6E9 endogenous TGF-β type II receptor in the presence of the wild type betaglycan than in the presence of the Δ10 mutant contrasts

with the opposite situation in the COS-1 cells experiment (compare the  $\Delta 10$  and *WT* lanes in Figs. 3, B and C). However, very little can be said about the structure or nature of the interacting receptors based on this result. The experiments shown in Figs. 3, B and C correspond to different type of assays. In one we used a transiently expressed, tagged human type II receptor, whereas in the other, an untagged endogenous rat receptor was evaluated. These facts, added to unknown TGF- $\beta$  cross-linking efficiencies for these receptors, would make any quantitative conclusion derived from these results unreliable. Nonetheless, the finding that the E-related region confers better TGF- $\beta 2$  labeling of the type II receptor than the U-related region is evidenced by the two types of assays shown in Fig. 3. Based on these observations, it was reasonable to guess that the E-related region would be responsible of the TGF- $\beta 2$  functional enhancement property of the wild type betaglycan. Contrary to this expectation, our experiments measuring the TGF- $\beta 2$ -dependent Smad2 phosphorylation indicated that both ligand binding regions were equally capable of performing that function (Fig. 4). This fact raises a paradox which indicates that the so-called TGF- $\beta$  presentation function is, very likely, an artifact of the cross-linking step during the affinity labeling. These results also indicate that without sustaining functional experiments, affinity labeling data should be interpreted very cautiously.

The last issue addressed in this work is related to the betaglycan inhibin A binding ability. Here we have shown that the intrinsic inhibin A binding capacity of betaglycan is confined to the U-related ligand binding region and that the GAG chains are dispensable for this capacity. Additionally, these findings suggest that the U-related region is the one that creates with the type II activin receptor the high affinity inhibin binding site, and that is the most likely candidate to mediate the inhibin antagonism of activin. This raises another question of why two polypeptide sequences so distinct from each other, as is the case for the E- and U-related regions, have such peculiar ligand binding properties. Their similar TGF- $\beta$  binding and functional properties, their different inhibin A binding abilities, plus the fact that they are confined to discrete portions of the co-receptor would support the hypothesis that the E- and U-related regions reflect two independently folded domains of betaglycan. These facts also would favor the hypothesis that the TGF- $\beta 2$ -enhancing effect of betaglycan results from a simple ligand-concentrating mechanism; that is, that wild type receptor or its independently expressed ligand binding regions simply increase the local TGF- $\beta 2$  concentration in the neighborhood of the TGF- $\beta$  type II receptor. However, with the currently available evidence, the argument for a specific more-favorable TGF- $\beta 2$  conformation, imposed by betaglycan or any of its ligand binding regions, cannot be ruled out. This last possibility is especially enticing due to the fact that only one of the regions is capable of binding inhibin A, which would suggest that very specific ligand-receptor interactions occur for each region. A more conclusive answer to these questions will have to wait for biophysical structural studies of betaglycan ligand binding regions.

**Acknowledgments**—We thank P ten Dijke, C-H. Heldin, and J. Massagué and J. A. García-Sainz for helpful suggestions and comments, Valentin Mendoza for superb technical assistance, N. Cerletti (Ciba-Geigy AG) for the generous gift of TGF- $\beta$ , and C-H. Heldin and J. L. Wrana for the generous gift of anti-Smad2 antibodies

## REFERENCES

- Roberts, A. B., and Sporn, M. B. (1993) *Growth Factors* 8, 1–9
- Kingsley, D. M. (1994) *Genes Dev.* 8, 133–146
- Massagué, J. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753–791
- Pek, E., Heldin, C.-H., and ten Dijke, P. (1999) *FASEB J.* 13, 2105–2124
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S., and Massagué, J. (1991) *Cell* 67, 785–795
- Wang, X.-F., Lin, H. Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H. F., and Weinberg, R. A. (1991) *Cell* 67, 797–805
- Cheifetz, S., Bellón, T., Calés, C., S., V., Bernabeu, C., Massagué, J., and Letarte, M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 19027–19030
- Ponce-Castañeda, M. V., Esparza-López, J., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza, R. V., and López-Casillas, F. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1384, 189–196
- Cheifetz, S., Andres, J. L., and Massagué, J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16984–16991
- Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., ten Dijke, P., Iwata, K. K., and Massagué, J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20533–20538
- Chen, C., Wang, X.-F., and Sun, L. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12862–12867
- Sun, L., and Chen, C. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25367–25372
- López-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L., and Massagué, J. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 557–568
- Segarini, P. R., Roberts, A. B., Rosen, D. M., and Seyedin, S. M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 14655–14662
- Andres, J. L., Rønnstrand, L., Cheifetz, S., and Massagué, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 23282–23287
- Mitchell, E. J., Fitz-Gibbon, L., and O'Connor-McCourt, M. D. (1992) *J. Cell. Physiol.* 150, 334–343
- López-Casillas, F., Wrana, J. L., and Massagué, J. (1993) *Cell* 73, 1435–1444
- Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Centrella, M., McCarthy, T. L., and Madri, J. A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13567–13572
- Moustakas, A., Lin, H. Y., Henis, Y. I., Plamondon, J., O'Connor-McCourt, M. D., and Lodish, H. F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 22215–22218
- Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B., and Barnett, J. V. (1999) *Science* 283, 2080–2082
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Water, E., Bilezikian, L. M., and Vale, W. (2000) *Nature* 404, 411–414
- Andres, J., DeFalco, D., Noda, M., and Massagué, J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 5927–5930
- Bork, P., and Sander, C. (1992) *FEBS Lett.* 300, 237–240
- Pepin, M.-C., Beauchemin, M., Plamondon, J., and O'Connor-McCourt, M. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6997–7001
- Pepin, M.-C., Beauchemin, M., Collins, C., Plamondon, J., and O'Connor-McCourt, M. D. (1995) *FEBS Lett.* 377, 368–372
- Taniguchi, A., Matsuzaki, K., Nakano, K., Kan, M., and McKeehan, W. L. (1998) *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 34, 232–238
- Fukushima, D., Butzow, R., Hildebrand, A., and Ruoslahti, E. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 22710–22715
- Kaname, S., and Ruoslahti, E. (1996) *Biochem. J.* 315, 815–820
- Attisano, L., Wrana, J. L., Montalvo, E., and Massagué, J. (1996) *Mol. Cell Biol.* 16, 1066–1073
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Andersson, S., Davis, D. N., Dahlback, H., Jornvall, H., and Russell, D. W. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8222–8229
- Seed, B., and Aruffo, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 3365–3369
- Kingston, R. E., Chen, C. A., and Okayama, H. (1990) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., eds), pp 9.1.1–9.1.9, John Wiley and Sons, Inc., New York
- Roberts, V. J., Bently, C. A., Guo, Q., Matzuk, M. M., and Woodruff, T. K. (1996) *Endocrinology* 137, 4201–4209
- Meloche, S., Pages, G., and Pouyssegur, J. (1992) *Mol. Biol. Cell* 3, 63–71
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, M. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5, 3610–3616
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996) *Cell* 87, 1215–1224
- Faure, S., Lee, M. A., Keller, T., ten Dijke, P., and Whitman, M. (2000) *Development* 127, 2917–2931
- Abdollah, S., Macias-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27678–27685
- Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engström, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P., and Heldin, C.-H. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28107–28115
- Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M., and Wrana, J. L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 25628–25636
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P., and Ornatz, D. M. (1991) *Cell* 64, 841–849
- Park, P. W., Reizes, O., and Bernfield, M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29923–29926
- Andres, J. L., Stanley, K., Cheifetz, S., and Massagué, J. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 3137–3145
- Attisano, L., Wrana, J. L., López-Casillas, F., and Massagué, J. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1222, 71–80