

11281

50

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL BETAGLICANO
SOLUBLE RECOMBINANTE Y SU USO EN EL
TRATAMIENTO DE LA GLOMERULONEFRITIS
EXPERIMENTAL

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS PRESENTA:
M. en C. MARIA MAGDALENA VILCHIS LANDEROS

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

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 Howard Hughes Medical Institute y el International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.

Miembros del Jurado:

Dr. Armando Gómez Puyou

Dr. Jesús Chimal Monroy

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Dra. Victoria Chagoya Sánchez

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dedico esta tesis con mucho cariño

A mis padres

Emma Landeros Jaime

y

Maximiliano Vilchis Soto

A mis hermanos

Socorro y Josué

A Jovita, Socorro y Karen

A Fernando Esparza García

y

Margarita López Carrasco

A José

A mis amigos

Agradezco en forma especial al Dr. Fernando López Casillas por su asesoría en la realización de este trabajo.

Al Dr. Armando Gómez Puyou, al Dr. Guillermo Mendoza Hernández y al Dr. José Luis Montiel miembros de mi comité tutotial por sus valiosos consejos y orientación para la realización de este trabajo.

Al Dr. José Luis Montiel por su participación en la caracterización bioquímica del betaglicano soluble recombinante.

Al M. C. Valentín Mendoza por su valiosa ayuda en la obtención del betaglicano soluble recombinante y su apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Jeff Wrana del Program in Molecular Biology and Cancer, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, and Department of Medical Genetics and Microbiology, University of Toronto, Canadá, por su ayuda en la realización de los ensayos transcripcionales para BMPs y activina.

Al Dr. Andrew Hinck del Department of Biochemistry and Center for Biomolecular Structure Analysis, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, USA, por su ayuda en la realización de los ensayos de inhibición de la proliferación de células FBHE..

Agradezco también al Dr. Rogelio Hernández Pando, a la M. en C. Diana Aguilar León y al Dr. Javier Rangel por su ayuda en la realización del análisis histológico de los riñones de las ratas con glomerulonefritis.

INDICE

INDICE.....	i
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
1. Superfamilia del TGF- β	3
2. Síntesis del TGF- β	5
3. Estructura del TGF- β	7
4. Mecanismo de transducción de señal del TGF- β	8
4.1. Receptores tipo I y II.....	9
4.2. Proteínas Smads.....	11
4.3. Coreceptores del TGF- β	15
4.3.1. Betaglicano.....	16
4.3.2. Endoglina.....	21
5. Funciones biológicas del TGF- β	21
5.1. Proliferación y diferenciación celular.....	22
5.2. Producción de matriz extracelular.....	23
6. Papel del TGF- β en enfermedades fibróticas.....	25
6.1. Glomerulonefritis.....	25
7. Inhibidores del TGF- β	30
7.1. Decorina.....	30
7.2. Receptor II soluble.....	31
7.3. Péptido asociado de latencia (LAP).....	32
7.4. Anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β	32
7.5. α_2 -macroglobulina.....	33
7.6. Péptidos sintéticos.....	34
7.7. Oligonucleótidos antisentido.....	34
7.8. Inhibidores intracelulares.....	35

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVO.....	36
MATERIAL Y METODOS	37
Reactivos y cultivos celulares	37
Transfecciones.....	37
Western blot	39
Ensayo en placa	39
Obtención de stock de baculovirus de alto título	40
Titulación del baculovirus.....	40
Purificación del betaglicano soluble recombinante.....	40
Filtración en gel.....	41
Electroforesis desnaturalizante o nativa.....	41
Desglicosilación	42
Secuenciación amino terminal.....	42
Marcado por afinidad.....	42
Ensayo de luciferasa	43
Ensayo de inhibición de la proliferación	44
Inducción de proteínas de matriz extracelular en células MMC.....	44
Glomerulonefritis aguda experimental	44
Tinción con ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS).....	45
Inmunohistoquímica	45
Norther blot	46
Análisis estadístico	47
RESULTADOS	48
1.Caracterización bioquímica del betaglicano soluble recombinante baculoviral	48
1.1. Expresión del betaglicano soluble recombinante.....	48
1.2. Purificación del betaglicano soluble recombinante.....	50
1.3. Secuenciación amino-terminal del betaglicano soluble recombinante.....	52
1.4. Glicosilación del betaglicano soluble recombinante.....	55
1.5. El betaglicano soluble recombinante es un dímero no covalente	55

1.6. El betaglicano soluble recombinante une TGF- β con alta afinidad y selectividad de isoforma.....	63
2. El betaglicano soluble es un potente inhibidor de la actividad del TGF- β <i>in vitro</i>	66
2.1. Actividad neutralizante del betaglicano soluble recombinante sobre el efecto del TGF- β en ensayos de luciferasa.....	66
2.2. Actividad neutralizante del betaglicano soluble recombinante sobre la actividad inhibidora de la proliferación celular por TGF- β	72
2.3. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la expresión de colágena I en células MMC cultivadas en alta concentración de glucosa.....	74
3. El betaglicano soluble es un potente inhibidor de la actividad del TGF- β <i>in vivo</i>	74
3.1. El betaglicano soluble recombinante previene el daño histológico en riñón de ratas con glomerulonefritis experimental aguda inducida por suero anti-timocito (ATS).....	74
3.2. Dosis mínima de betaglicano soluble recombinante requerida para prevenir la acumulación de proteínas de matriz extracelular causada por el suero anti-timocito (ATS).....	78
3.3. La glomerulonefritis inducida por el anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7) también es prevenida por el tratamiento con betaglicano soluble recombinante .	81
3.4. El betaglicano soluble disminuye la acumulación de proteínas de matriz extracelular en los glomérulos de ratas con glomerulonefritis causada por anticuerpo OX-7.....	83
3.5. El betaglicano soluble recombinante disminuye la expresión genética de la cinasa SGK causada por el anticuerpo OX-7.....	83
DISCUSION.....	88
El betaglicano soluble es expresado eficientemente en células de insecto H5	88
El betaglicano soluble recombinante es una molécula dimérica estabilizada por interacciones no covalentes.....	90
Las afinidades del betaglicano soluble recombinante para el TGF- β son semejantes al receptor silvestre.....	90
El betaglicano soluble recombinante tiene la capacidad de bloquear el efecto del TGF- β <i>in vitro</i>	91

El betaglicano soluble recombinante tiene un efecto protector del daño renal en un modelo de glomerulonefritis experimental.....	93
CONCLUSIONES.....	95
BIBLIOGRAFIA.....	96

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Precursor y forma latente del TGF- β .	6
Figura 2. Estructura del TGF- β .	8
Figura 3. Receptores de transducción de señal para el TGF- β .	10
Figura 4. Mecanismo de transducción de señal del TGF- β .	11
Figura 5. Familia de proteínas Smad.	12
Figura 6. Dominios de las Smad y su función.	13
Figura 7. Estructura de la región citoplásmica del receptor I de TGF- β y del dominio MH2 de la Smad 2.	14
Figura 8. Proteínas Smad antagonistas.	16
Figura 9. Características estructurales del betaglicano.	17
Figura 10. Efectos del betaglicano sobre la actividad del TGF- β .	18
Figura 11. El betaglicano actúa como correpressor con la inhibina y el receptor tipo II de la activina (ActRII).	19
Figura 12. Glomérulo de rata.	26
Figura 13. Construcción del betaglicano soluble.	49
Figura 14. Expresión del betaglicano soluble recombinante en células COS-1 y Sf9.	51
Figura 15. Purificación del betaglicano soluble recombinante mediante IMAC.	53
Figura 16. Expresión del betaglicano soluble recombinante en células H5.	54
Figura 17. Secuenciación amino terminal.	56
Figura 18. Glicosilación del betaglicano soluble recombinante.	57
Figura 19. Determinación del estado oligomérico del betaglicano soluble recombinante.	59
Figura 20. Efecto del SDS y DTT sobre el estado dímico del betaglicano soluble recombinante.	60
Figura 21. Efecto de la urea y la guanidina sobre el estado dímico del betaglicano soluble recombinante.	61
Figura 22. Efecto de detergentes sobre el estado dímico del betaglicano soluble recombinante.	62
Figura 23. Unión del TGF- β_1 a saturación por el betaglicano soluble recombinante.	64
Figura 24. Ensayos de competencia de unión del TGF- β_1 al betaglicano soluble recombinante.	65

Figura 25. Neutralización de la actividad del plásmido reportero 3TPlux en respuesta al TGF- β por el betaglicano soluble recombinante.	67
Figura 26. Neutralización de la actividad del plásmido reportero 3TPlux en respuesta al TGF- β por anticuerpo neutralizante anti-TGF- β	69
Figura 27. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la actividad del BMP 2, BMP 7 y la activina	70
Figura 28. Efecto del betaglicano soluble sobre la actividad de diferentes concentraciones del BMP 2, BMP 7 y la activina.....	71
Figura 29. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la inhibición de la proliferación de células FBHE inducida por TGF- β	73
Figura 30. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la síntesis de la colágena I en células MMC cultivadas en alta concentración de glucosa.....	75
Figura 31. Análisis histológico de glomérulos de ratas con glomerulonefritis inducida por ATS y tratadas con el betaglicano soluble recombinante.	77
Figura 32. Depósito de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis tratadas con el betaglicano soluble recombinante.....	79
Figura 33. Cuantificación de la acumulación de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis tratadas con diferentes concentraciones del betaglicano soluble recombinante.	80
Figura 34. Acumulación de matriz mesangial en glomérulos de ratas con glomerulonefritis inducida por el anticuerpo OX-7 y tratadas con el betaglicano soluble recombinante.	82
Figura 35. Acumulación de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis inducida por el anticuerpo OX-7 y tratadas con el betaglicano soluble recombinante.	84
Figura 36. Cuantificación de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis inducida por anticuerpo OX-7 tratadas con betaglicano soluble recombinante	85
Figura 37. Expresión genética de la cinasa SGK en ratas con glomerulonefritis inducida por anticuerpo OX-7 tratadas con el betaglicano soluble recombinante	87
Tabla 1. Superfamilia del TGF- β y actividades representativas.	4

ABREVIATURAS

ActRII.....	Activin Receptor type II
Anti-Smad.....	Smads Antagonista
ATS.....	Anti-thymocyte Serum
BMPs.....	Bone Morphogenetic Protein
BSA.....	Bovine Serum Albumin
BG.....	Betaglicano
BG sol.....	Betaglicano soluble
cDNA.....	DNA complementario
Col I.....	Colágena tipo I
Col IV.....	Colágena tipo IV
Co-Smad.....	Collaborating Smad
CDF.....	Growth abd Differentiation Factor
CDMP.....	Cartilage-Derived Morphogenetic Protein
dpp.....	decapentaplegic
DTT.....	Ditiotreitol
EGF.....	Epidermal Growth factor
FGFb.....	Basic Fibroblast Growth Factor
FN.....	Fibronectina
FSH.....	Follicle Stimulating Hormone
GA.....	Concentración alta de glucosa
GAG.....	Glycosaminoglycan
GAPDH.....	Gliceraldehido Fosfato Deshidrogenasa
GDNF.....	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GDF.....	Growth and Differentiation Factor
GN.....	Concentración baja de glucosa
SGK.....	Serum Gluco-corticoid regulated Kinase
IMAC.....	Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography
LAP.....	Latency Associated Peptide
LLC.....	Large Latent Complex
LTBP.....	Latent TGF- β Binding Protein
mRNA.....	RNA mensajero
Mad.....	Mothers Against dpp
MEC.....	Matriz Extracelular
MEE.....	Medial Edge Epitelial Cells
MIS/AMS.....	Mullerian Inhibiting Substance/anti-Mullerian hormone
NGF.....	Nerve Growth Factor
PAI-1.....	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS.....	Buffer Salino de Fosfatos
PBMCs.....	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PDGF.....	Platelet Derived Growth Factor
PPD.....	Purified Protein Derivate
R-Smad.....	Receptor-regulated Smad
SARA.....	Smad Anchor for Receptor Activation
SDS.....	Dodecilsulfato de sodio
SFB.....	Suero Fetal Bovino
SLC.....	Small Latent Complex
TB.....	Tuberculosis
TFMS.....	Acido Trifluorometanosulfónico
TGF- β	Transforming Growth Factor Type Beta
TIMP.....	Tissue Inhibitor of Metalloprotease

RESUMEN

El betaglicano es un proteoglicano de membrana que une TGF- β e incrementa la afinidad de unión de este factor al receptor II. Además de la forma membranal, el betaglicano se puede encontrar en forma soluble en suero y matriz extracelular. La forma soluble del betaglicano inhibe la acción del TGF- β evitando su unión a los receptores I y II.

El propósito de este trabajo fue analizar la capacidad del betaglicano soluble como un agente anti-TGF- β . Para ello, el betaglicano soluble se obtuvo en forma recombinante utilizando el sistema de expresión en baculovirus. Este betaglicano soluble recombinante es un homodímero formado por dos monómeros de 110 kDa asociados por interacciones no covalentes. El betaglicano soluble recombinante no presenta cadenas de glicosaminoglicanos, aunque contiene las serinas donde se lleva a cabo esta glicosilación. El betaglicano soluble recombinante contiene carbohidratos que representan aproximadamente 20 kDa de la masa molecular del monómero. La secuencia amino-terminal del betaglicano soluble recombinante mostró que la Gly²⁴ es el primer residuo de la proteína madura. El betaglicano soluble recombinante tiene una constante de disociación (K_d) de 3.5 nM para TGF- β_1 . Ensayos de competencia de ligando indican que las afinidades relativas del betaglicano soluble recombinante para las isoformas del TGF- β son TGF- β_2 > TGF- β_3 > TGF- β_1 . La potencia anti-TGF- β del betaglicano soluble recombinante *in vitro* es 10 veces mayor para TGF- β_2 que para TGF- β_1 . Comparado con anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β , el betaglicano soluble recombinante es más potente para TGF- β_2 y similar para TGF- β_1 . El betaglicano soluble recombinante es capaz de bloquear el efecto del TGF- β *in vivo* en la glomerulonefritis experimental en ratas inducida por anticuerpos anti-timocito. Este betaglicano soluble recombinante es capaz de prevenir el depósito de proteínas de matriz extracelular como la colágena I, colágena IV y fibronectina en el glomérulo de las ratas con glomerulonefritis. Además, el betaglicano soluble es capaz de inhibir la síntesis de mRNA de la SGK (serum and glucocorticoid-regulated kinase), una cinasa de proteínas que se encuentra incrementada en biopsias de riñón de pacientes con diabetes.

Estos resultados indican que el betaglicano soluble recombinante es un potente agente anti-TGF- β .

ABSTRACT

Betaglycan, is a membrane anchored proteoglycan that binds TGF- β and enhance binding affinity of this factor to type II receptor. In addition to the membrane betaglycan, a soluble form is found in serum and extracellular matrices. Soluble form of betaglycan inhibits TGF- β binding to type I and II receptors.

The purpose of this work was to analyzed the capacity of the soluble betaglycan as an anti-TGF- β agent. Recombinant soluble betaglycan was produced using baculovirus expression system. This recombinant soluble betaglycan is a homodimer formed by two 110 kDa monomers associated by no-covalent interactions. It is devoid of glycosaminoglycan chains, although it contains the serine residues where it is glycosilated. Recombinant soluble betaglycan has carbohydrates which accounts for approximately 20 kDa of the total mass of the monomer. End-terminal sequence analysis of recombinant soluble betaglycan showed that Gly²⁴ is the first reside of the mature protein. Recombinant soluble betaglycan has an equilibrium dissociation constant (k_d) of 3.5 nM for TGF- β_1 . Ligand competition assays indicate that the relative affinities of recombinant soluble betaglycan for TGF- β isoforms are TGF- β_2 > TGF- β_3 > TGF- β_1 . The anti-TGF- β potency of recombinant soluble betaglycan *in vitro* is 10-fold higher for TGF- β_2 than for TGF- β_1 . Compared with a commercial anti-TGF- β neutralizing antibody, recombinant soluble betaglycan is more potent against TGF- β_2 and similar against TGF- β_1 . Recombinant soluble betaglycan inhibits TGF- β effects *in vivo* in experimental glomerulonephritis in rats. This recombinant soluble betaglycan prevents deposition of extracelular matrix proteins like collagen I, IV and fibronectin in rat glomerulous. In addition, soluble betaglycan inhibits the expression of mRNA of SGK (serum and glicocorticoid-regulated kinase), a protein kinase that is increased in diabetic kidneys.

These results indicate that recombinant soluble betaglycan is a potent anti-TGF- β agent.

INTRODUCCION

La comunicación intercelular que guía la morfogénesis y la reparación de tejidos en organismos superiores está mediada por factores celulares y sus receptores. La caracterización de estos factores llevó al aislamiento de una molécula multifuncional que interviene en varios procesos celulares incluyendo el crecimiento, la diferenciación, la adhesión, el depósito de matriz extracelular y la inmunosupresión. A este factor se le denominó TGF- β ("transforming growth factor type beta") (1).

1. Superfamilia del TGF- β

El TGF- β pertenece a una familia de factores de crecimiento y diferenciación que incluyen alrededor de 40 miembros identificados en vertebrados e invertebrados. Dada la naturaleza multifuncional de estos factores no es sorprendente que el descubrimiento gradual de estos se haya llevado a cabo por líneas de investigación separadas. Por ejemplo, el TGF- β_1 fue identificado como un regulador del crecimiento mesenquimal y como un antimitógeno epitelial. Las activinas fueron identificadas como reguladores de la función pituitaria y como inductores del mesodermo en ranas. Las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) fueron identificadas como factores de reparación de hueso y como agentes de dorsolización en *Drosophila* (1, 2).

De acuerdo a la comparación de la secuencia de los dominios bioactivos de estos factores, esta familia ha sido dividida en varios grupos que comprenden, la subfamilia del BMP2, BMP5, GDF5, Vg1, BMP3, miembros intermedios, activina, TGF- β y miembros distantes. Estos factores muestran actividades biológicas de gran trascendencia como son la proliferación celular, la diferenciación, la movilidad, la adhesión y la muerte, y por lo tanto juegan un papel importante en el desarrollo embrionario y crecimiento, la inflamación, la reparación de tejidos y la respuesta inmunológica (Tabla 1) (2).

La estructura prototipo de esta familia de genes es el TGF- β_1 que fue aislado por primera vez de plaquetas humanas (3) y posteriormente clonado de una biblioteca de cDNA humano (4). Existen por lo menos cinco isoformas de TGF- β : el TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 que son isoformas presentes en los mamíferos, el TGF- β_4 descrito en el pollo, que es

Tabla 1. Superfamilia del TGF- β y actividades representativas.

NOMBRE	%	ACTIVIDADES REPRESENTATIVAS
Subfamilia BMP2		
BMP2 (Dpp ^D)	100	Gastrulación, neurogénesis, condrogénesis, apoptosis interdigital.
BMP4	92	
Subfamilia BMP5		
BMP5 (60 A ^D)	61	Desarrollo de órganos y neurogénesis,
BMP6/Vgr1	61	
BMP7/OP1	60	
BMP8/OP2	55	
Subfamilia GDF5		
GDF5/CDMP1	57	Condrogénesis en el desarrollo de extremidades.
GDF6/CDM2	54	
GDF7	57	
Subfamilia Vg1		
GDF1 (Vg1 ^X)	42	Inducción mesodérmica axial en ranas y peces.
GDF3/Vgr2	53	
Subfamilia BMP3		
BMP3/osteogenina	48	Diferenciación osteogénica, formación de hueso y quimiotaxis de monocitos.
GDF10	46	
Miembros intermedios		
Nodal (Xnr 1 a 3 ^X)	42	Inducción mesodermal axial, regulación de la diferenciación celular en el tubo neural, e inhibición del crecimiento de músculo esquelético.
Dorsalina	40	
GDF8	41	
GDF9	34	
Subfamilia activina		
Actinina β A	42	Producción de FSH y diferenciación celular eritroide.
Activina β B	42	
Activina β C	37	
Activina β E	40	
Subfamilia TGF-β		
TGF- β ₁	35	Control de la proliferación y diferenciación celular, producción de matriz extracelular e inmunosupresión.
TGF- β ₂	34	
TGF- β ₃	36	
Miembros distantes		
MIS/AMH	27	Regresión del tubo Mulleriano.
Inhibina α	22	Inhibición de acciones de activina.
GDNF	23	Desarrollo de riñón.

Todos los miembros enlistados han sido identificados en humano y/o ratón. En paréntesis se encuentran los homólogos importantes en *Drosophila* (^D) y *Xenopus* (^X). % es el porcentaje de identidad entre proteína morfogénica de hueso (BMP2) y el polipéptido maduro de GDF ("growth and differentiation factor"), CDMP ("cartilage-derived morphogenetic protein"), MIS/AMH ("Mullerian inhibiting substance/anti-Mullerian hormone") y GDNF ("glial cell-derived neurotrophic factor"). Modificado de (2).

homólogo al TGF- β_1 , y el TGF- β_5 presente en *Xenopus*. La secuencia de aminoácidos de estos TGF- β s está altamente conservada entre especies. Por ejemplo, existe una identidad mayor al 97% entre el TGF- β_1 maduro de varias especies de aves y de mamíferos. Lo mismo sucede para el TGF- β_2 y el TGF- β_3 (1). Además, existe gran similitud entre las isoformas del TGF- β , los TGF- β_1 y TGF- β_2 comparten 80 residuos idénticos (74%), TGF- β_1 y TGF- β_3 86 residuos (78%), y los TGF- β_2 y TGF- β_3 comparten 89 residuos (82%). El TGF- β_5 , comparte 82, 70 y 73% de aminoácidos idénticos con el TGF- β_1 , el TGF- β_2 y el TGF- β_3 respectivamente (5).

2. Síntesis del TGF- β

Todas las isoformas del TGF- β se sintetizan como precursores diméricos, que se secretan al medio extracelular como moléculas inactivas, de las cuales se originan los TGF- β s maduros activos.

Cada cadena del dímero es sintetizada como un precursor de 390 aminoácidos (6). Los 112 residuos localizados en el extremo carboxilo terminal constituyen la forma madura del factor, la cual contiene nueve cisteínas; mientras que los residuos restantes localizados en la porción amino terminal definen el péptido asociado de latencia (LAP). Este precursor tiene las características de un polipéptido secretor, contiene un péptido señal que permite su traslocación a través del retículo endoplasmático y está glicosilado (1). El procesamiento proteolítico del pro-TGF- β está mediado por endopeptidasas como la furina (7). El sitio de corte del precursor son cuatro aminoácidos básicos precedidos inmediatamente del dominio bioactivo. La proregión amino (LAP) no es requerida para la actividad biológica del TGF- β , pero juega un papel importante en mediar el correcto plegamiento y dimerización de las regiones maduras, y es necesario para un procesamiento proteolítico eficiente. El TGF- β procesado es secretado como un complejo latente formado por la asociación no covalente entre el LAP y la región madura de la molécula. El TGF- β asociado al LAP es denominado complejo latente pequeño (SLC). Con excepción de las plaquetas, donde este complejo latente es almacenado en los gránulos α de las plaquetas, el SLC es liberado en forma constitutiva. El SLC se puede asociar covalentemente a una proteína adicional, la proteína

de unión de TGF- β latente (LTBP), formando el complejo latente grande (LLC) (figura 1) (8). Se han descrito 4 miembros de la familia LTBP incluyendo a la LTBP1 que fue la primera que se describió en 1990 (9). Las LTBPs son proteínas que pueden existir en forma soluble o asociadas a matriz extracelular (MEC). Estas LTBPs son requeridas para la secreción eficiente y el plegamiento correcto del TGF- β , además dirigen la unión del LLC a microfibrillas de la MEC (10, 11). Sin embargo, existen algunas células como las de glioblastoma, líneas celulares parecidas a osteoblastos y células epiteliales de los túbulos renales que secretan al SLC y al TGF- β activo en ausencia de LTBP (12, 13).

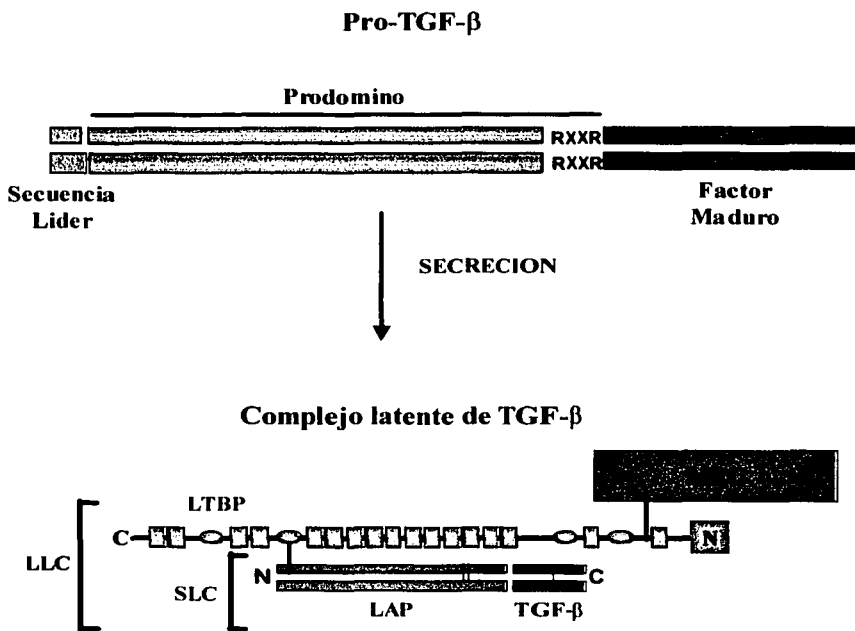


Figura 1. Precursor y forma latente del TGF- β . El precursor del TGF- β , consiste de una secuencia líder N-terminal, un prodominio y un dominio bioactivo (factor maduro) que contiene 9 cisteínas (C). La secuencia RXXR es el sitio de corte para liberar al factor maduro. Aún después de cortado el prodominio (LAP) permanece asociado con el dímero de TGF- β por interacciones no covalente, formando un complejo latente pequeño (SLC). Este complejo SLC una vez secretado se une a la proteína LTBP por medio de puentes disulfuro (|) formando el complejo latente grande (LLC). El LLC se une a matriz extracelular (MEC). Modificado de (1, 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La liberación del TGF- β bioactivo se lleva a cabo *in vitro* por tratamiento con detergentes y proteasas como la plasmina. Las proteasas pueden liberar al LTBP (como complejo latente) de la MEC producida por células en cultivo de tejidos (8). La activación del TGF- β *in vivo* implica la participación de una proteína de MEC conocida como trombospondina-1 (TSP-1). El LAP se une por medio de la secuencia LSKL localizada cerca del extremo amino, con la secuencia K⁴¹²RFK⁴¹⁵ de la trombospondina-1. Se ha propuesto que la interacción trombospondina-1-precursor latente genera un arreglo conformacional del LAP que permite la activación del TGF- β (14, 15).

El TGF- β bioactivo se puede unir a la MEC, a α_2 -macroglobulina (16) y a la decorina (17) las cuales inhiben su actividad, o se une a acarreadores como la albúmina y a IgG que le permiten conservar su actividad (18). Los complejos TGF β - α_2 -macroglobulina son atrapados en el hígado y probablemente catabolizados (16). El TGF- β bioactivo puede ser degradado por proteasas y elastasas en el sitio de la inflamación o puede ser excretado en la orina (18).

3. Estructura del TGF- β

El TGF- β bioactivo es un homodímero de dos polipéptidos de 112 aminoácidos unidos por un puente disulfuro. La estructura cristalina del TGF- β_2 revela que seis de las nueve cisteínas que se encuentran en cada monómero, forman una estructura central rígida conocida como nudo de cistinas (5, 19). Esta estructura está formada por un anillo de ocho aminoácidos cerrado por dos puentes disulfuro y atravesado por un tercer puente. De este nudo de cistinas se extienden cuatro hojas beta antiparalelas y una alfa hélice (20, 21). Una séptima cisteína forma un puente disulfuro con su correspondiente cisteína en el otro monómero. Los monómeros están orientados en forma antiparalela uno del otro y la cara interna de las hojas beta en uno de los monómeros forma interacciones hidrofóbicas con la alfa hélice del otro (figura. 2). Este contacto puede ser suficiente para dimerizar GDF-3 o GDF-9, dos miembros de la superfamilia del TGF- β que no tienen la séptima cisteína (22). A diferencia de otros miembros de la familia, los TGF- β s y las activinas contienen una región amino-terminal con dos cisteínas. En el TGF- β_2 esta región forma una pequeña alfa hélice que se encuentra unida a la primera tira beta por un puente disulfuro entre estas dos

cisteínas. Las características tridimensionales del TGF- β_2 son compartidas por todos los miembros de esta familia. Sorprendentemente, el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), dos factores diméricos que no tiene una secuencia similar al TGF- β , también tiene un nudo de cistinas (19).

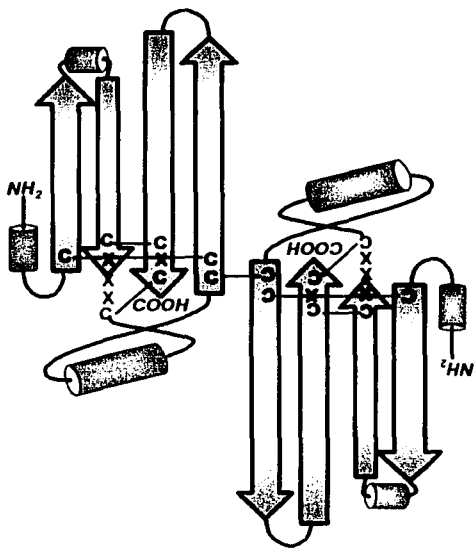


Figura 2. Estructura del TGF- β . La estructura tridimensional del TGF- β_2 incluye 6 cisteínas (C) y 4 aminoácidos adicionales (X) que forman el nudo de cistinas, 4 segmentos de hojas beta-antiparalelas (flechas), 1 alfa-hélice larga (cilindros largos) y 2 alfa-hélices cortas (cilindros cortos). Los seis residuos de cisteína (de un total de nueve que tiene la molécula) forman tres puentes disulfuro intracadena y una séptima cisteína forma un puente disulfuro que mantiene unido el dímero (—). Modificado de (5).

4. Mecanismo de transducción de señal del TGF- β

La búsqueda de proteínas que unen TGF- β en la superficie de la célula usando métodos de entrecruzamiento de ligando, reveló la existencia de varias proteínas unidoras de TGF- β que fueron clasificadas de acuerdo a su peso molecular como receptores tipo I, II y III (23). Los receptores tipo I y II son proteínas transmembranales con actividad de cinasa para serinas y treoninas y participan directamente en el señalamiento para TGF- β , mientras que los receptores tipo III o coreceptores del TGF- β no tiene una función de señalización intrínseca bien definida pero regulan el acceso del TGF- β a los receptores de señalamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1. Receptores tipo I y II

Los receptores tipo I y II son glicoproteínas transmembranales de 53 y 75 kDa respectivamente que forman homodímeros constitutivos independientemente de la unión del ligando (24, 25). Estos receptores pueden distinguirse entre las isoformas del TGF- β , en un mejor al TGF- β_1 y TGF- β_3 que al TGF- β_2 (1). Ambos receptores participan directamente en la transducción de señales, ya que en las líneas de células tumorales y las mutantes de células de epitelio pulmonar, la pérdida de expresión de cualquiera de los dos receptores resulta en pérdida del efecto inhibitorio del crecimiento del TGF- β (26).

Los receptores I y II presentan un dominio extracelular rico en cisteínas, una región transmembranal y una región citoplásmica con actividad de cinasa para serinas y treoninas (figura 3). La región extracelular es relativamente corta (aproximadamente 150 aminoácidos), está N-glicosilada y contiene 10 o más cisteínas que determinan el plegamiento de esta región (27).

El receptor I presenta además en el extremo amino del dominio cinasa, una región de 29 aminoácidos altamente conservada. Esta región se conoce como dominio GS debido a la secuencia característica SGSGSG (serina-glicina-serina-glicina-serina-glicina) que contiene (25, 28). Inmediatamente después de la región SGSGSG, el receptor tipo I tiene una secuencia L-P (leucina-prolina) que sirve como un sitio de unión para la molécula FKBP12 (29). La molécula FKBP12 actúa como un regulador negativo de la señalización del receptor. El receptor tipo II presenta una cola en el extremo carboxilo terminal rica en serinas y treoninas (figura 3). La actividad de cinasa de este receptor está constitutivamente activa y requiere su fosforilación en la Ser²¹³ (localizada fuera del dominio de cinasa) para mediar su efecto autocatalítico. Además, la fosforilación en la Ser⁴⁰⁹ estimula la capacidad del receptor II de fosforilar al receptor I; mientras que la fosforilación en la Ser⁴¹⁶ impide su autofosforilación y la fosforilación del receptor I (30).

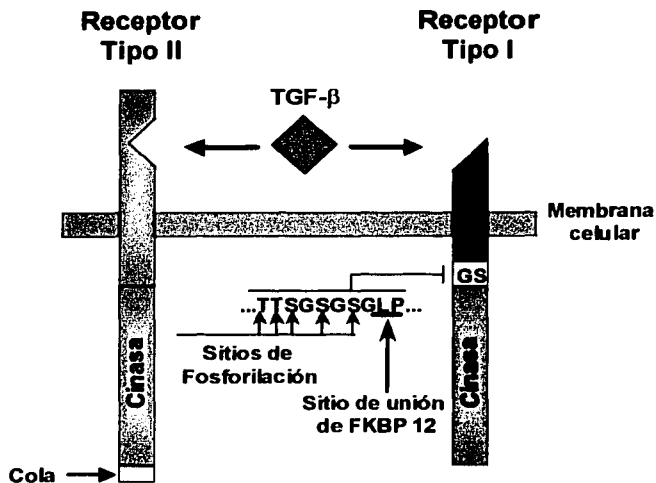


Figura 3. Receptores de transducción de señal para el TGF- β . Los receptores I y II son proteínas transmembranales con una pequeña región extracelular, una hélice transmembranal hidrofóbica y un dominio citoplásmico con actividad de cinasa para serinas y treoninas. El receptor tipo II tiene una cola en el extremo carboxilo terminal rica en serinas y treoninas. El receptor I presenta una región altamente conservada en el extremo amino del dominio cinasa, rica en glicinas y serinas conocida como dominio GS. El dominio GS contiene la secuencia característica TTSGSGSG donde el receptor I es fosforilado. El receptor I tiene una secuencia leucina-prolina inmediatamente después de la región TTSGSGSG que sirve como un sitio de unión para la molécula FKBP12. Modificado de (2).

El receptor I requiere la presencia del receptor II para unir al TGF- β . Por otro lado, el receptor tipo II puede unir de forma independiente al TGF- β pero requiere la presencia del receptor tipo I para la transducción de la señal. El TGF- β se une directamente al receptor II. El TGF- β unido al receptor II es reconocido por el receptor I, formando un complejo heterotetramérico. El receptor I es entonces fosforilado por el receptor II en las serinas y treoninas de la secuencia TTSGSGSG del dominio GS (25, 31). Esto resulta en la activación de la cinasa del receptor I, la cual actúa sobre las proteínas SMAD, que sirven como segundos mensajeros en la vía de señalamiento de TGF- β (figura 4). Para que se lleve a cabo el señalamiento es necesario la actividad de cinasa en ambos receptores (24).

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

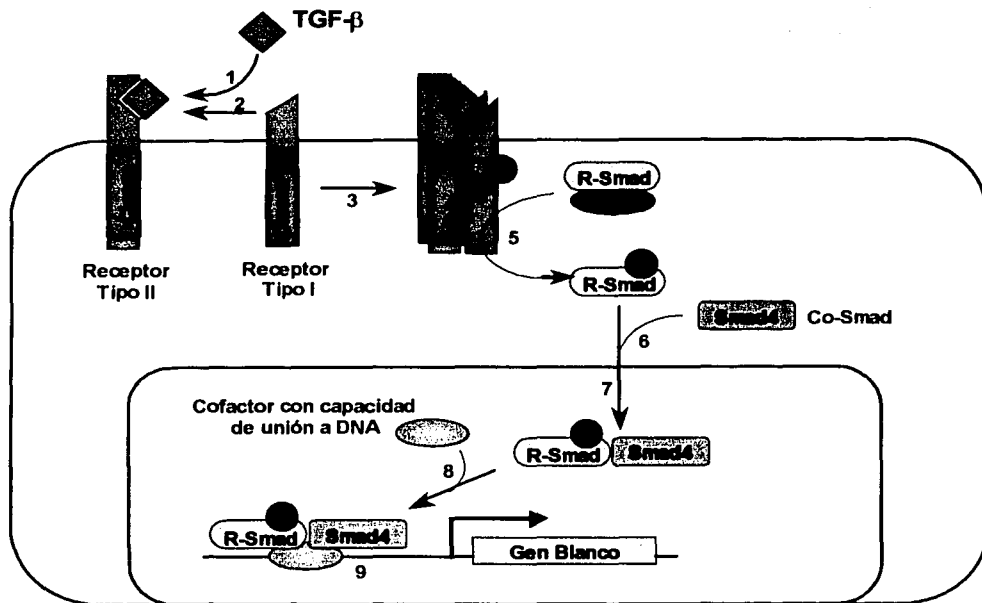


Figura 4. Mecanismo de transducción de señal del TGF-β. La unión del TGF-β a los receptores I y II lleva a la formación de un complejo (3) y fosforilación del receptor I (4). Una vez activado, el receptor I fosforila a la Smad 2 o 3 (R-Smad) (5), permitiendo que esta proteína se asocie con Smad 4 (6) y se mueva al núcleo (7). En el núcleo, el complejo de Smad se asocia con proteínas que se unen a DNA como Fast-1 (8) y este complejo se une a regiones específicas en los genes blanco, activando su transcripción (9). En el estado basal, la Smad 2 es retenida en el citoplasma por SARA. Modificado de (2).

4.2. Proteínas SMADs

Las proteínas de la familia SMAD son los primeros sustratos identificados de la cinasa del receptor I y juegan un papel central en la transducción de la señal del receptor a los genes blanco en el núcleo. El miembro fundador de la familia de las SMAD es el producto del gen *Mad* “*Mothers against dpp*”. *Mad* fue aislado en búsquedas genéticas de potenciadores de un débil fenotipo materno de un alelo de *dpp* y su descubrimiento llevó a la identificación de muchos genes relacionados en nemátodos y vertebrados (32, 33). Posteriormente, tres homólogos de *Mad*, *Sma-2*, *Sma-3* y *Sma-4* se aislaron en *C.elegans* buscando genes cuyas mutaciones causarían el mismo fenotipo de cuerpo pequeño observado en la mutante *Daf4* (receptor tipo II) (34). En los vertebrados se han identificado ocho proteínas diferentes relacionadas a SMA y MAD denominadas SMADs.

Las proteínas SMAD se han dividido en tres familias de acuerdo a su estructura y función: a) SMADs que son sustratos de las cinasa de los receptores de la familia del TGF- β (R-Smads, "Receptor-regulated SMADs"), b) SMADs que participan en la señalización asociándose a las R-Smads (Co-Smads, "collaborating SMADs") y c) SMADs antagonistas que inhiben la señalización de los otros dos grupos (Anti-Smads, "antagonistic SMADs") (figura 5).

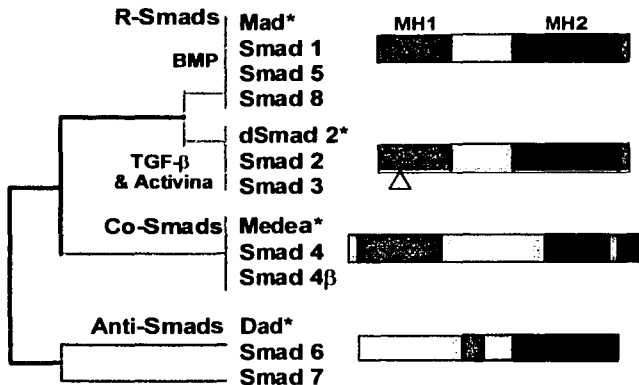


Figura 5. Familia de proteínas Smad. Dendrograma de similitud de secuencia entre las tres subfamilias de proteínas Smad. Las R-Smads y las Co-Smads poseen dominios conservados amino terminal (MH1) y carboxilo terminal (MH2), separados por una región divergente llamada región de unión. En las anti-Smads, sólo el dominio MH2 está conservado. 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 Smad 2. Los (*) indican los miembros representativos en *Drosophila*. Modificado de (35).

Entre las R-Smads se encuentran las Smad 2 y Smad 3 que son sustratos del receptor I de TGF- β y mediadores de la transducción de la señal del TGF- β y activina (36, 37) y las Smads 1, 5 y 8 que son reconocidas por receptores de BMP (2). Para la transducción de la señal, las R-Smads requieren a las Co-Smads. En vertebrados se han descrito dos proteínas muy relacionadas que pertenecen a este grupo: Smad 4 y Smad 4 β (35). Los productos de los genes *Medea*, *Sma-4* en *Drosophila* y nemátodos son homólogos de Smad 4, y al parecer llevan a cabo funciones similares en estos organismos. Las SMADs antagonistas (anti-Smads) comprenden a las Smads 6 y 7 en humanos y Dad en *Drosophila*. Estas proteínas tiene muy poca homología con otras Smads (35).

Las proteínas SMADs contienen dominios amino-terminal y carboxilo-terminal (MH1 y MH2 respectivamente) muy conservados y una región de unión ("linker") que es

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

de tamaño y secuencia variable (figura 6). El dominio MH1 está conservado en las R-Smads y Smad 4, pero no en las anti-Smads. En el estado basal, el dominio MH1 inhibe las actividades transcripcionales y biológicas del dominio MH2. Este efecto inhibitor es debido a la asociación de los dos dominios. Además, el dominio MH1 tiene actividad de unión al DNA en su estado activado. El dominio MH2 contiene los sitios de fosforilación por el receptor (en las R-Smads) y participa en varias interacciones proteína-proteína importantes. En estado basal, las SMADs forman homo-oligómeros por interacción entre sus dominios MH2. El dominio MH2 también participa en la asociación de la R-Smad con el receptor I, Smad 4 y factores de unión a DNA (2).

Las R-Smads interaccionan con el receptor I activado, a través del dominio MH2 y son activadas por la fosforilación por el receptor I en la región SS(V/M)S carboxilo terminal (36) (figura 6). En el estado activado las R-Smads fosforiladas se asocian con la Smad 4. Como un complejo, las R-Smads y las Co-Smads se mueven al núcleo y regulan negativa y positivamente la transcripción de genes, reclutando coactivadores o correpresores. El mecanismo de apagado de la señal implica la ubiquitinación de las SMADs en el núcleo seguida por la degradación mediada por proteosomas (38).

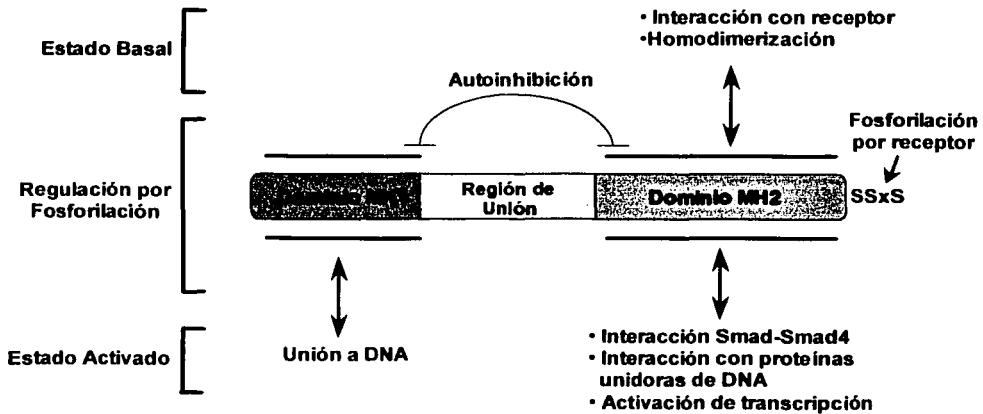


Figura 6. Dominios de las Smad y su función. En el estado basal, las Smads forman homo-oligómero y permanecen en un estado inactivo a través de interacción entre los dominios MH1 y MH2. La R-Smad interacciona con el receptor I activado, a través del dominio MH2 y es activada por la fosforilación por el receptor I en la región SSXS carboxilo terminal. En el estado activado las Smads se asocian con Smad 4 y con proteínas unidoras de DNA a través del dominio MH2. El dominio MH1 en algunas Smads también participa en la unión a DNA. Modificado de (2).

La especificidad del reconocimiento de las R-Smads por el receptor I está determinada por la secuencia del asa L45 en el dominio de cinasa del receptor I y la secuencia del asa L3 en el dominio MH2 en la R-Smad (figura 7). El asa L45 tiene secuencia semejante en los miembros de TGF- β y BMP, solo difieren en tres residuos. El asa L3 en la Smad 1 y Smad 2 difiere por sólo dos aminoácidos. Estas diferencias parecen permitir la discriminación en las interacciones receptor-SMAD (39).

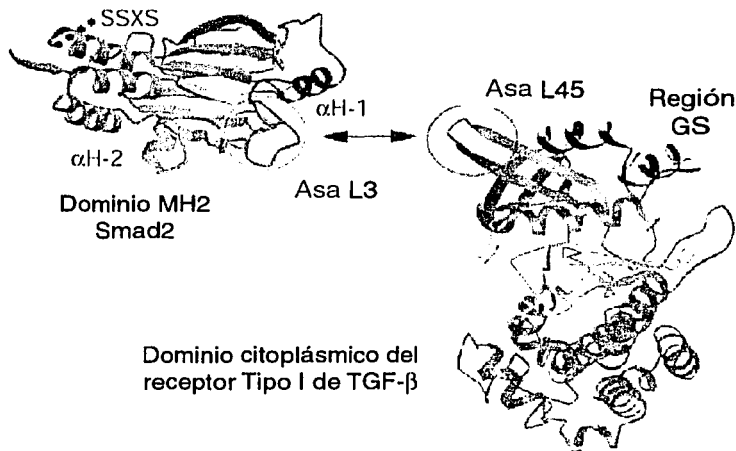


Figura 7. Estructura de la región citoplásmica del receptor I del TGF- β y del dominio MH2 de la Smad 2. En el estado basal, el receptor I se mantiene inactivo ya que la región GS presiona contra el dominio de cinasa dislocando el centro catalítico. La fosforilación en la región GS por el receptor II activa la cinasa del receptor I, permitiendo que este fosforile a la proteína Smad en la secuencia SSXS del extremo carboxilo terminal. La especificidad de reconocimiento entre el receptor de TGF- β y la R-Smad está determinado por la secuencia del asa L45 del dominio de cinasa del receptor y la secuencia del asa L3 en el dominio MH2 de la Smad. Modificado de (39).

En el estado basal, las Smads permanecen en un estado inactivo a través de interacción entre los dominios MH1 y MH2 y son retenidas en el citoplasma (2). En el caso de Smad 2, esta retención es mediada por SARA (“SMAD anchor for receptor activation”) (40). Además de limitar el movimiento de la SMAD, el contacto con SARA ocluye una región de la Smad 2 que interviene en su movimiento a núcleo. La fosforilación mediada por el receptor no solo incrementa la afinidad de Smad 2 por Smad 4, sino también

disminuye su afinidad por SARA, liberando a Smad 2 y permitiendo su movimiento a núcleo, lo cual lleva a la acumulación rápida de Smad 2 activada en el núcleo (41).

Las Smads activadas logran una afinidad alta en su interacción con el DNA asociándose con cofactores que unen DNA. Algunos cofactores para Smads funcionan solamente como adaptadores de unión a DNA. En este grupo se encuentran las proteínas OAZ (“Olf-associated zinc finger”) para Smad 1, y FAST (“forkhead activin signal transducer”) y Mixer para Smad 2 (42). Otro grupo de proteínas que facilitan la unión de las Smads a los promotores blanco son los factores de transcripción que tienen la capacidad de reclutar coactivadores y en otros contextos funcionan independientemente de la Smads. Ejemplos de estas proteínas son: JUNB, TFE3 (“transcription factor binding to immunoglobulin heavy constant mu enhancer), AML (“acute myeloneous leukaemia”) y LEF1 (“lymphoid enhancer-binding factor). El complejo de Smad activado puede activar o reprimir la expresión de un gen, reclutando no solo coactivadores sino también corepresores. Entre los coactivadores que se han descrito se encuentran p300 y CBP (“CREB binding protein) y entre los corepresores se encuentran TGIF (“TG3-interacting factor”), SKI (“Sloan-Kettering Institute proto-oncogene”) y SnoN (“Ski-related novel gene N”) (35, 39).

Otro tipo de SMADs son las anti-Smads que tienen muy poca homología con otras SMADs en el dominio MH1 y no tienen el sitio de fosforilación típico en el extremo carboxilo-terminal. A este grupo pertenecen la Smad 6 y Smad 7. La Smad 7 se une al receptor I e inhibe la transducción de la señal impidiendo la fosforilación de la R-Smad por la cinasa del receptor I (43). La Smad 6 por otro lado, inhibe la transducción de la señal uniéndose a la R-Smad y bloqueando su unión a la Co-Smad (figura 8) (44). La Smad 7 es principalmente un inhibidor de la vía de señalamiento para el TGF- β , mientras que la Smad 6 específicamente bloquea la señalización para el BMP (45)

4.3. Coreceptores del TGF- β

Entre los receptores tipo III o coreceptores del TGF- β se encuentran: el betaglicano y la endogлина. Estos coreceptores no participan directamente en la transducción de la señal por TGF- β , sin embargo son de gran importancia ya que modulan el acceso del TGF- β a los receptores I y II.

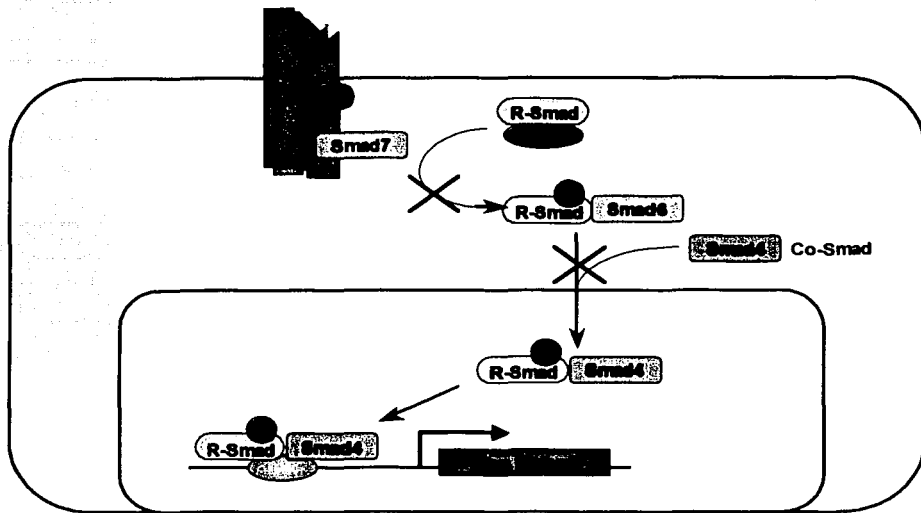


Figura 8. Proteínas Smad antagonistas (anti-Smads). Las anti-Smads tienen muy poca homología con otras SMADs en el dominio MH1 y no tienen el sitio de fosforilación típico en el extremo carboxilo-terminal. Smad 7 se une al receptor I e inhibe la transducción de la señal impidiendo la fosforilación de la R-Smad por la cinasa del receptor I. Smad 6 por otro lado, inhibe la transducción de la señal uniéndose a la R-Smad y bloqueando su unión a la Co-Smad. Smad 7 es principalmente un inhibidor de la vía de la transducción de la señal para TGF- β , mientras que Smad 6 específicamente bloquea la transducción de la señal para BMP.

4.3.1. Betaglicano

El betaglicano es un proteoglicano transmembranal con cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), que se identificó por su capacidad de unirse al TGF- β con alta afinidad (1). La deducción de la estructura primaria del betaglicano de rata reveló que es una proteína sintetizada a partir de un precursor de 853 aminoácidos, con un gran dominio extracelular que contiene 16 cisteínas, una región transmembranal y una cola citoplasmática de 43 aminoácidos rica en serinas y treoninas (46). La región extracelular en su dominio amino tiene homología con la endoglina (46) y en su dominio carboxilo con la uromodulina, los receptores espermáticos Zp2 y Zp3 y la proteína de secreción de gránulos pancreáticos GP-2 (47). La cola citoplasmática del betaglicano no tiene una región conocida de señalamiento pero tiene una sorprendente homología con la endoglina (48). La proteína medular del betaglicano tiene una masa molecular aproximada de 100 kDa. A la proteína medular se unen cadenas sulfatadas de heparano y condroitina ancladas en las serinas 535 y 546. La serina 546 une solamente cadenas sulfatadas de condroitina y la serina 535 une

predominantemente cadenas sulfatadas de heparano (figura 9). El betaglicano con GAGs migra electroforéticamente en un intervalo de 280 a 330 kDa (46). El TGF- β se une a la proteína y su interacción no requiere las cadenas de GAGs (46, 49). Sin embargo, las cadenas sulfatadas de heparano pueden unir al factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb) (50).

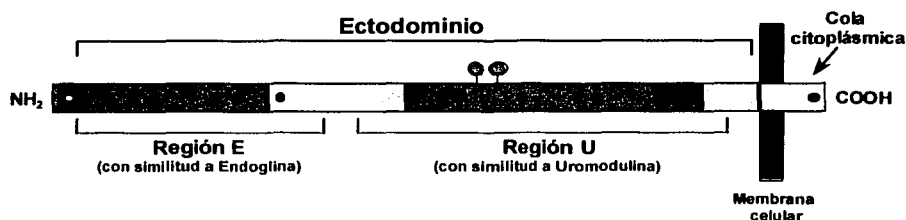


Figura 9. Características estructurales del betaglicano. La proteína medular del betaglicano es un polipéptido de 853 aminoácidos. Este polipéptido contiene un péptido señal (caja negra), un gran dominio extracelular, una región transmembranal y una pequeña cola citoplásmica rica en serinas y treoninas. El dominio extracelular tiene una región de similitud a endoglina (E) y otra a uromodulina (U), además contiene 2 sitios de anclaje de las cadenas de GAGs (círculos verdes) y 16 cisteínas (puntos negros).

El betaglicano se expresa en tejido fetal y adulto, incluyendo células mesenquimales, epiteliales, neuronales y otros tipos celulares. Sin embargo, no está presente en cierto tipo de células como mioblastos, endotelios y células hematopoyéticas que tienen la capacidad de responder al TGF- β , por lo que el betaglicano no parece participar directamente en la transducción de señales (1).

El betaglicano tiene la capacidad de unir las tres isoformas del TGF- β con alta afinidad (TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3) (51, 52). El betaglicano facilita la unión del TGF- β al receptor II formando un complejo ternario betaglicano/TGF- β /receptor II en el proceso (figura 10) y potenciando así su acción (53). El papel potenciador del betaglicano es más evidente para la isoforma TGF- β_2 . Aunque el TGF- β_2 señaliza a través de los receptores I y II, esta isoforma tiene menor afinidad intrínseca para el receptor II y su acción es menos potente que el TGF- β_1 en células progenitoras hematopoyéticas (54), mioblastos (53) y células endoteliales (52) que no tienen betaglicano. La transfección del betaglicano en estas células aumenta la unión de TGF- β_2 y su actividad (53). La capacidad del betaglicano de

Betaglicano membranal

Betaglicano soluble

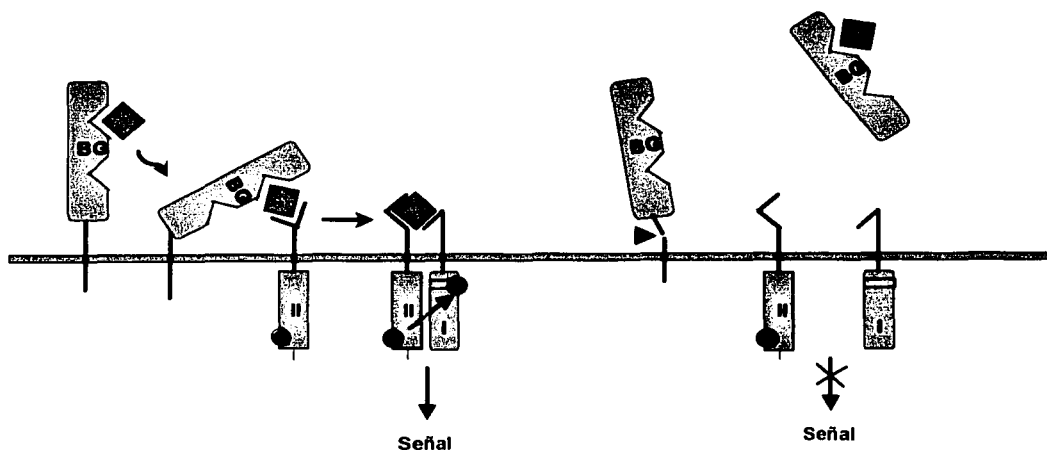


Figura 10. Efectos del betaglicano sobre la actividad del TGF- β . En betaglicano membranal potencia los efectos del TGF- β , facilitando la unión de este factor al receptor II. La forma soluble del betaglicano generada a partir de la forma membranal por corte proteolítico (\blacktriangleright), secuestra al TGF- β y previene su unión a los receptores I y II inhibiendo su actividad.

igualar la potencia de las tres isoformas de TGF- β , aumenta la posibilidad de que el betaglicano no sólo concentre al TGF- β en la superficie celular, sino también puede estar estabilizando la conformación óptima del TGF- β para su unión a los receptores de señalamiento (2).

La expresión recombinante del betaglicano resulta en la producción de la proteína transmembranal y una versión secretada que corresponde al dominio extracelular(46). Esto es consistente con la observación de que muchas líneas celulares secretan betaglicano soluble (55). La liberación puede ser debida a la presencia de un sitio de corte para proteasas (lisina-lisina) antes de la región transmembranal o a la presencia de la secuencia leucina⁷⁵²-alanina-valina-valina que es idéntica a una secuencia en el precursor del TGF- α , el cual es liberado al medio como TGF- α soluble (46). Esta forma soluble del betaglicano también se encuentra presente en forma natural en matriz extracelular y suero (55).

La forma soluble del betaglicano evita la unión del TGF- β a los receptores de señalamiento previniendo su acción (figura 10). Debido a las características funcionales del betaglicano, este receptor se considera como un regulador dual del acceso del TGF- β a los

receptores de señalamiento, ya que cuando se encuentra anclado a la membrana aumenta la unión del TGF- β a estos receptores, mientras que cuando está en forma soluble evita la unión del TGF- β a los receptores de señalamiento previniendo su acción.

El dominio extracelular del betaglicano presenta dos sitios de unión al TGF- β , uno en la región similar a endoglina (49) y el otro en la región similar a uromodulina (56). La identificación de estos dos sitios de unión de TGF- β al betaglicano y el hallazgo de que la plasmina es capaz de cortarlo en un sitio intermedio (57, 58) apoyan el hecho de que el ectodominio del betaglicano se encuentre dividido en dos dominios.

El betaglicano tiene la capacidad de unir a la inhibina A, un factor que pertenece a la familia del TGF- β y cuya función es inhibir la producción de la hormona foliculo estimulante (FSH) y otras acciones de la activina. El betaglicano forma un complejo ternario con la inhibina A y el receptor II de la activina (ActRII). Este complejo es el encargado de mediar el antagonismo de la activina por la inhibina, secuestrando al receptor II de la activina dentro de un complejo inactivo junto con el betaglicano (figura 11) (59). La capacidad del betaglicano de unir a la inhibina A reside exclusivamente en la región semejante a la uromodulina (60).

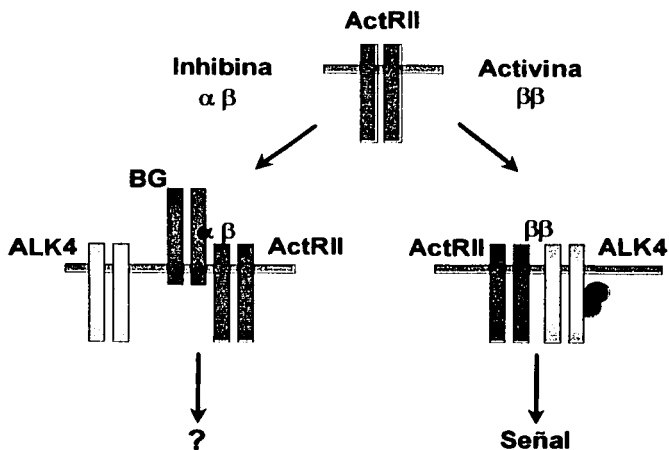


Figura 11. El betaglicano actúa como corepresor con la inhibina y el receptor tipo II de la activina (ActR-II). En ausencia del betaglicano (BG), la activina se une al ActR-II y forma el complejo de señalamiento con ALK4. Sin embargo, en presencia de betaglicano la unión de la inhibina al ActR-II se incrementa y se impide el acceso de la activina. El resultado es la formación de un complejo betaglicano/inhibina/ActR-II, que impide el reclutamiento y la activación de ALK4. Modificado de (59).

Recientemente se ha demostrado un papel esencial del betaglicano en la señalización del TGF- β . El betaglicano participa en la transición epitelio-mesenquimal de las células endoteliales que permite la formación de las válvulas cardíacas (61, 62). Durante el desarrollo del corazón de pollo, el epitelio que recubre el lumen del corazón se activa en la zona del canal atrioventricular. Las células endoteliales se transforman en células mesenquimales e invaden la MEC. Este proceso se conoce como transformación epitelio-mesenquimal e implica dos procesos importantes: la activación de las células endoteliales y la subsecuente invasión de las células mesenquimales. La activación del endotelio se caracteriza por pérdida del contacto célula-célula, la hipertrofia celular, la polarización y un incremento en la expresión de moléculas de MEC (63). Las células endoteliales activadas sufren cambios morfológicos para transformarse en células mesenquimales que invaden la MEC. En el proceso de transformación epitelio-mesenquimal, el TGF- β_2 es crítico para la activación de las células endoteliales, mientras que el TGF- β_3 lo es para la formación de las células mesenquimales (64). El receptor II y el betaglicano son requeridos para mediar la transformación epitelio-mesenquimal en el corazón. El betaglicano media respuestas distintas a las del receptor II. El bloqueo del betaglicano pero no del receptor II utilizando anticuerpos, inhiben el paso de separación célula-célula endotelial. El estudio de marcadores de desarrollo revela un patrón de expresión distinto cuando se bloquea al betaglicano o al receptor II. Estos datos sugieren que el betaglicano y el receptor II llevan a cabo la transformación epitelio-mesenquimal en el corazón a través de distintas vías de transducción de señal (62).

El betaglicano puede modular la unión del TGF- β_3 al receptor tipo II en las células epiteliales del borde medio (MEE "medial edge epitelial cells") contribuyendo así a la transformación epitelio-mesenquimal durante la fusión del paladar (65). Durante la fusión del paladar, las MEE selectivamente presentan transformación epitelio-mesenquimal. Este proceso es regulado por el TGF- β_3 endógeno (66). Los receptor I y II se expresa en todas las células epiteliales del paladar durante la fusión (65), sin embargo la expresión del betaglicano está restringida a las células MEE durante la fusión del paladar. De esta forma, el betaglicano puede modular la unión del TGF- β_3 al receptor II en las células MEE.

El betaglicano inhibe la señalización por TGF- β bloqueando la formación del complejo T β R1/T β RII en células de epitelio renal LLC-PK (67). Este fenómeno se presenta

por la presencia de modificaciones en los glicosaminoglicanos del betaglicano en estas células, ya que en mioblastos de rata L₆ se observa el fenómeno de potenciación del efecto del TGF- β por el betaglicano. Estos resultados tienen implicaciones importantes en el entendimiento de la función del betaglicano y la regulación de la respuesta del TGF- β en diferentes tipos celulares.

4.3.2. Endoglina

La endoglina es una molécula expresada en la superficie de células endoteliales en alta concentración y en monocitos, precursores eritroides y otros tipos celulares en menor concentración (68). El gen que codifica para la endoglina se ha localizado en el cromosoma 9 y ha sido identificado recientemente como un gen blanco para un desorden vascular autosómico dominante conocido como telangectasia hemorrágica tipo 1 (69). La endoglina une TGF- β_1 y TGF- β_3 con alta afinidad ($K_d=50$ pM) en células endoteliales humanas, pero no une TGF- β_2 (48). Se han caracterizado dos isoformas de la endoglina, la L-endoglina y la S-endoglina. Ambas isoformas tiene capacidad de unir TGF- β pero difieren en la composición de aminoácidos en su cola citoplásmica. La isoforma predominante es la L-endoglina, la cual contiene 658 aminoácidos, mientras que la S-endoglina tiene solamente 625 aminoácidos. El betaglicano y la L-endoglina comparten una región con alta identidad en la cola citoplásmica, la cual tiene un alto contenido de residuos de serina y treonina potencialmente fosforilables (46, 68, 70). A pesar de que se han observado complejos entre la endoglina y los receptores del TGF- β , su papel en la señalización no está claro. La unión del TGF- β por la endoglina es limitada si se compara con el betaglicano y se incrementa cuando se coexpresa el receptor II de TGF- β . La sobreexpresión de la endoglina puede disminuir más que aumentar la respuesta de TGF- β en monocitos (71).

5. Funciones biológicas del TGF- β

Los miembros de la familia del TGF- β son ubicuos, multifuncionales y esenciales para la sobrevivencia del organismo. El TGF- β es una citocina que regula muchos procesos biológicos, los cuales se pueden categorizar en tres grandes grupos: efectos sobre la

proliferación celular, sobre el estado de diferenciación celular y sobre la producción de la matriz extracelular (1, 72).

La importancia del papel del TGF- β está ilustrado por modelos *in vivo* en los cuales se ha eliminado el gen que codifica para cada una de las isoformas del TGF- β y algunos de sus receptores. En el caso de los ratones “knockout” para el gen de TGF- β_1 , el 50% de los animales mueren en el útero y los sobrevivientes mueren por una inflamación exagerada 4 semanas después del nacimiento (73). El 75% de los ratones “knockout” para TGF- β_2 mueren en el útero por defectos pulmonares, cardiovasculares y urogenitales, además hay osificación disminuida en cráneo y esqueleto (74). Por otro lado, los ratones “knockout” para TGF- β_3 mueren los primeros días después del nacimiento al parecer por problemas pulmonares, además presentan paladar hendido (75, 76). En el caso de los receptores para TGF- β , los ratones “knockout” del receptor II del TGF- β mueren durante la gestación por defectos en el desarrollo vascular y la hematopoyesis (77), mientras que los ratones “knockout” del receptor I del TGF- β mueren durante la gestación por defectos en el desarrollo vascular, sin embargo muestran un potencial hematopoyético normal (78).

5.1. Proliferación y diferenciación celular

La proliferación celular está controlada por la acción de moléculas que la estimulan o la inhiben. El TGF- β induce un fuerte efecto inhibitorio de la proliferación en muchos tipos celulares. En células de origen epitelial, endotelial y fibroblástico, el TGF- β inhibe reversiblemente la proliferación celular, y en células de epitelio pulmonar y queratinocitos detiene completamente la proliferación (79).

El TGF- β actúa negativamente en la proliferación celular al detener a las células en la última parte de la fase G1 del ciclo celular (26). La inhibición de la proliferación mediada por el TGF- β se lleva a cabo a través de dos mecanismos: la inhibición de cinasas dependientes de ciclina (cdks) y la disminución de la expresión del c-myc. En las células de mamíferos, los complejos ciclina D-cdk4, ciclina D-cdk6, ciclina E-cdk2 y ciclina A-cdk2 actúan secuencialmente durante la transición G1/S y son requeridos para la progresión del ciclo celular durante este periodo. La inhibición de G1 Cdks por el TGF- β es llevada a cabo por inducción de p15 y p21, los cuales son inhibidores de cdks, y por la disminución de c-

myc. Aunque no se conoce el mecanismo exacto, es posible que el c-myc participe directamente como un represor del gen p15 (80, 81).

En contraste a lo mencionado anteriormente, se ha observado que el TGF- β estimula la proliferación de células principalmente mesenquimales. Esta proliferación ocurre por la expresión de factores de crecimiento endógenos inducida por el TGF- β , tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (82), el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (83) o incremento en la expresión de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (84).

Además del efecto del TGF- β en la proliferación celular, este factor participa en la diferenciación celular y juega un papel importante en la regulación del desarrollo embrionario. Se ha observado que el TGF- β se expresa durante la embriogénesis y es particularmente elevado en las áreas de morfogénesis rápida tales como los sitios de condrogénesis y osteogénesis (72, 85).

Por otro lado, el TGF- β suprime la proliferación y diferenciación de células B y T *in vitro*, antagonizando los efectos de citocinas que participan en inflamación como son IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , y suprime la expresión de los receptores para IL-1 β e IL-2 en las células. En macrófagos, la producción de superóxido y óxido nítrico son bloqueadas por el TGF- β . El estudio de los efectos inmunosupresores del TGF- β han llevado al descubrimiento de su papel endógeno y su posible aplicación terapéutica en enfermedades autoinmunes (86).

5.2. Producción de matriz extracelular

El TGF- β controla la producción y remodelación de la MEC (1). Este factor incrementa la síntesis y el depósito de componentes extracelulares tales como la fibronectina y algunas formas de colágena como las tipo I, III, VI y X (87, 88). Además, el TGF- β incrementa la síntesis de inhibidores de enzimas de degradación tales como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y el inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMP), mientras que disminuye la expresión de proteasas tales como la colagenasa, y el activador del plasminógeno (89, 90). Este aumento en la síntesis de los inhibidores y la disminución en la síntesis de proteasas aumentan la acumulación de las proteínas de la MEC inducidas por el TGF- β .

El TGF- β también altera la capacidad de las células de interaccionar con otras células y con la MEC debido a su efecto en la expresión de las integrinas. Este factor puede alterar la expresión de subunidades de integrinas entre las que se encuentran: las subunidades α_1 a α_6 y la subunidad β_1 las cuales se combinan para formar los receptores para la fibronectina, la colágena, la laminina y otras moléculas de la MEC; las subunidades α_v y β_3 que forman el receptor para vitronectina y la α_1 que combinada con la β_2 constituyen el LFA-1, un receptor de adhesión célula-célula que se une a ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular I) en la superficie de otras células linfoides.

Debido a los efectos del TGF- β mencionados anteriormente, este factor tiene un papel importante en la reparación de tejidos. Después de la liberación del TGF- β por la desgranulación de las plaquetas en el sitio de la herida, se inicia una cascada de procesos que incluyen reclutamiento de células por el efecto quimiotáctico para monocitos y fibroblastos que tiene el TGF- β , formación de nuevos vasos sanguíneos y síntesis de colágena para dar soporte a la herida (72). El papel del TGF- β en la reparación de tejidos no está limitada a lesiones en donde participa el tejido conjuntivo. Recientemente se ha puesto interés en sus efectos en reparación o modulación del tejido cardiaco dañado como resultado de la isquemia o el infarto. Estudios del patrón inmunohistoquímico del TGF- β_1 en corazón después de infarto al miocardio inducido en forma experimental, han llevado a la sugerencia de que el TGF- β puede acelerar la reparación y restablecer la función de los miocitos (91). Además, su administración sistémica antes de inducir el infarto experimental en ratas ha mostrado tener un efecto cardioprotector (92). Uno de los efectos de esta administración sistémica, es la supresión de la liberación del IL-1 β y el TNF- α a la circulación debido indirectamente a la capacidad del TGF- β de preservar y estabilizar la función endotelial además de inhibir la adhesión endotelial de neutrófilos y linfocitos (93, 94). Esta función del TGF- β hace suponer que puede ser útil en el tratamiento del choque séptico y puede ser administrado junto con agentes trombolíticos.

6. Papel del TGF- β en enfermedades renales

Las actividades del TGF- β son benéficas y de duración limitada dentro del contexto de la reparación de heridas. Sin embargo, en algunas ocasiones existe desregulación en la producción y la activación de este factor que resulta en un depósito excesivo de tejido conjuntivo y fibrosis del riñón, hígado y pulmón (95). Se ha visto que la expresión del mRNA del TGF- β y la producción del factor está incrementada en pacientes con enfermedades fibróticas del riñón, incluyendo nefropatía por IgA, nefropatía membranosa, nefritis en lupus y diabetes y nefropatía asociada a HIV y en pacientes con infección con el virus de hepatitis C, fibrosis hepática autoinmune o inducida por alcohol y fibrosis pulmonar idiopática o inducida por bleomicina, esclerosis sistémica, mielofibrosis, ciertas formas de artritis reumatoide, esquistosomiasis, enfermedad de Crohn, y vitreoretinopatía proliferativa (96).

6.1. Glomerulonefritis

El riñón excreta los productos de deshecho del metabolismo, regula con gran precisión las concentraciones de agua y sales del organismo, mantiene el equilibrio ácido-base adecuado del plasma y actúa como órgano endocrino, secretando hormonas tales como la eritropoyetina, la renina y las prostaglandinas. Los mecanismos fisiológicos que el riñón ha desarrollado para llevar a cabo estas tareas exigen un alto grado de complejidad estructural. La unidad funcional del riñón es la nefrona. Una nefrona está formada por dos porciones: un túbulo renal individual y una maraña de capilares (corpúsculo) que se llama glomérulo. El glomérulo está formado entonces por la invaginación de una madeja de capilares en el extremo dilatado, ciego de la nefrona (cápsula de Bowman). Los capilares son profundos por una arteriola aferente y drenados por una arteriola eferente. En la cápsula de Bowman la sangre está separada del filtrado glomerular por dos capas de células: el endotelio capilar y células del epitelio visceral que se encuentran encima de los capilares glomerulares. Estas capas están separadas por la lámina basal. El glomérulo presenta además, una membrana basal glomerular formada por colágena tipo IV, laminina, proteoglicanos, fibronectina y otras glicoproteínas; células mesangiales (M) que están situadas entre los capilares y la matriz mesangial similar a la membrana basal, formando un entramado sobre el cual descansan las células mesangiales (figura 12). Las células

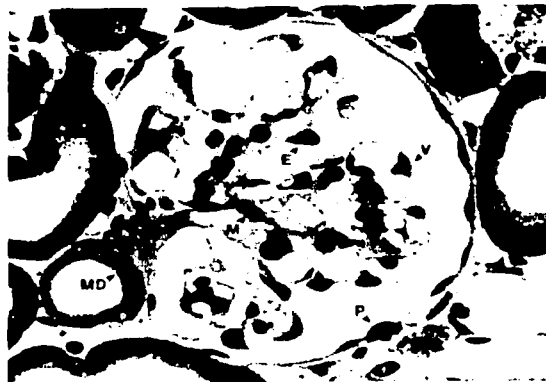


Figura 12. Glomérulo de rata. Imagen de un glomérulo de rata mostrando los cuatro componentes celulares principales: célula mesangial (M), célula endotelial (E), célula de epitelio visceral (V) y célula de epitelio parietal (P). Aumento 750X.

mesangiales son de origen mesenquimal, y pueden contraerse, fagocitar, proliferar y producir la matriz (97, 98).

Las enfermedades del riñón son tan complejas como la propia estructura del órgano pero su estudio resulta más fácil clasificandolas en los cuatro componentes morfológicos básicos: glomérulos, túbulos, intersticio y vasos sanguíneos.

Las enfermedades glomerulares son algunos de los problemas más importantes de la nefrología. De hecho, las glomerulonefritis crónicas son una de las causas más frecuentes de insuficiencia renal crónica en el hombre. Los glomérulos pueden verse afectados por trastornos inmunitarios, como el lupus eritematoso diseminado; por enfermedades vasculares, como la hipertensión y por alteraciones metabólicas como la diabetes mellitus. En estos casos se habla de enfermedades glomerulares secundarias, para diferenciarlas de las glomerulonefritis primarias en las que el riñón se afecta de forma exclusiva o predominante (97).

Las glomerulonefritis primarias se caracterizan por uno o más de cuatro reacciones tisulares básicas: hiper celularidad glomerular, engrosamiento de la membrana basal, hialinización y esclerosis. La hiper celularidad se debe a la proliferación de las células mesangiales o endoteliales, o a la infiltración leucocitaria compuesta por neutrófilos, monocitos y en algunos casos linfocitos. El engrosamiento de la membrana se manifiesta por un engrosamiento de las paredes capilares que se observa mejor en los cortes teñidos

con la técnica de ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). Este engrosamiento se debe al engrosamiento propio de la membrana basal o a un depósito de material amorfo electrodenso formado por proteínas precipitadas en los lados endotelial o epitelial de la membrana basal o en el interior de ésta. La hialinización se refiere a la acumulación de un material extracelular que corresponde a una sustancia amorfa formada por proteínas plasmáticas precipitadas, así como a un aumento de la membrana basal o de la matriz mesangial (97).

Aunque es poco lo que se sabe acerca de las causas de las glomerulopatías, es evidente que en muchos casos existen mecanismos inmunitarios subyacentes a casi todas las glomerulonefritis primarias. En los animales de experimentación, es fácil inducir glomerulonefritis mediante reacciones antígeno-anticuerpo y en más del 70% de los pacientes con glomerulonefritis se encuentran depósitos glomerulares de inmunoglobulinas, a menudo asociados a distintos componentes del complemento. Se han demostrado dos tipos de lesiones asociadas a anticuerpos: las lesiones causadas por anticuerpos que reaccionan *in situ* dentro del glomérulo, con antígenos glomerulares fijos e insolubles (intrínsecos) o moléculas que han depositado en ellos y las lesiones secundarias al depósito de complejos antígeno-anticuerpo. Se ha comprobado experimentalmente que los anticuerpos dirigidos contra los componentes de las poblaciones celulares del glomérulo también pueden dar lugar a lesiones glomerulares (97).

De todas las afecciones renales, la glomerulonefritis ha sido estudiada ampliamente en relación a la importancia del TGF- β en la patogénesis de la enfermedad. El TGF- β es producido por las células del parénquima renal y células linfoides infiltradas. En el riñón normal humano se detectan niveles bajos de mRNA del TGF- β en algunas células glomerulares, en células del epitelio parietal de la cápsula de Bowman, en células de túbulo distal y ocasionalmente en células intersticiales. Muchas enfermedades glomerulares están asociadas con un incremento en la expresión del TGF- β . En la glomerulonefritis mesangial proliferativa, incluyendo la nefropatía por IgA, hay un aumento del TGF- β dentro del glomérulo consistente con un aumento de células mesangiales. En la glomerulonefritis con semilunas, en la cual hay proliferación de las células epiteliales del glomérulo y migración de macrófagos al espacio de Bowman, hay una expresión elevada de TGF- β_1 , - β_2 y - β_3 (99). En la glomeruloesclerosis focal y segmentaria hay un incremento en la expresión de

mRNA del TGF- β_1 y - β_3 en las células de los epitelios visceral y parietal, en macrófagos intersticiales y en células de epitelio tubular (100).

En estudios *in vitro* se ha confirmado que las células de riñón responden al TGF- β . El TGF- β tiene un efecto bifásico en la proliferación de células mesangiales: niveles bajos de TGF- β estimulan la proliferación, mientras que niveles altos la inhiben (101). La adición de TGF- β a cultivos de células mesangiales de ratón y humano, aumenta la expresión de mRNA y proteína de componentes de la MEC, particularmente colágena tipo I, IV y fibronectina (102, 103) y proteoglicanos como el biglicano y la decorina (104) e induce TIMP (105). Además, concentraciones elevadas de glucosa estimulan la expresión del gen de colágena y la síntesis de la proteína en células mesangiales de ratón mediante una activación autócrina del TGF- β (102). El TGF- β participa también en la producción de matriz por los fibroblastos derivados del intersticio renal y por las células túbuloepiteliales. El TGF- β incrementa la producción de las colágenas tipo I, III y V en cultivo de fibroblastos renales (106). Además, las células epiteliales tubulares incrementan la producción de proteoglicanos y colágena tipo IV bajo la influencia del TGF- β (107).

En estudios en animales de experimentación se ha demostrado una asociación entre la expresión glomerular de TGF- β y la fibrosis, incluyendo el modelo Thy-1 de glomerulonefritis proliferativa en ratas (108), la glomerulonefritis anti-membrana basal glomerular en conejos (109) y la glomerulonefritis focal y segmentaria en el modelo de nefrectomía en ratas (110). La sobreexpresión del TGF- β en los glomérulos por la transfección del gen de TGF- β induce la glomeruloesclerosis después de varios días. Por otro lado, la expresión hepática de un transgen del TGF- β_1 resulta en fibrosis hepática pero también en lesiones renales caracterizadas por una expansión mesangial y fibrosis túbulointersticial (111).

El modelo Thy-1 de glomerulonefritis proliferativa mesangial aguda se demuestra un incremento en el mRNA del TGF- β_1 , un incremento en la proteína y un incremento en la producción de proteoglicanos como la decorina y el biglicano y otros componentes de matriz en el glomérulo (108). En este modelo se administra un anticuerpo contra el antígeno Thy-1 expresado en las células mesangiales de rata, que genera una mesangiólisis dependiente de complemento, seguida por una proliferación celular mesangial exuberante y

expansión de matriz (112). La historia natural de este modelo de glomerulonefritis es la resolución eventual de todas las anomalías histológicas en pocas semanas después de la administración inicial del anticuerpo anti-Thy-1. Si se administra una segunda dosis de anticuerpo anti-Thy-1, se puede desarrollar glomeruloesclerosis progresiva. En este modelo se ha demostrado además, que la administración del anticuerpo anti-TGF- β atenúa la producción de componentes de matriz glomerular y previene la expansión mesangial (113), lo cual apoya la idea de que el TGF- β es causa y no consecuencia de la enfermedad.

Además de la glomerulonefritis, en la cual se presenta un proceso inflamatorio inicial antes de la fibrosis progresiva del riñón, existen enfermedades que presentan este fenómeno inflamatorio antes de la glomeruloesclerosis. La nefropatía diabética y la glomeruloesclerosis focal y segmentaria son dos entidades que caen dentro de esta última categoría y que han sido estudiadas en relación al papel del TGF- β en la patogénesis de la fibrosis. En todos los modelos de nefropatía, diabética y de otras etiologías, se ha observado un incremento en la producción de TGF- β en el riñón que precede al daño histopatológico y funcional (114). Frecuentemente ocurre que el TGF- β estimula su propia síntesis, estableciendo un círculo de autoestimulación, que puede mantenerse aún en ausencia del estímulo inicial. En pacientes diabéticos también se han encontrado niveles aumentados del TGF- β en el riñón y en circulación, lo cual sugiere que los mismos mecanismos fisiopatológicos se presentan en la enfermedad humana (115). Lang y cols. (116), proponen un nuevo mecanismo que involucra la participación de una cinasa de proteínas (hSGK) recién descrita, que responsabiliza al TGF- β de los cambios funcionales de la nefropatía diabética. En este caso se demuestra que en biopsias renales de pacientes diabéticos existe un aumento notable en glomérulo, tubo distal y asa de Henle, del mRNA de la hSGK ("human Serum and Gluco-corticoid-regulated Kinase"), una cinasa de proteínas clonada originalmente como un gen regulado por el volumen celular. La hSGK es capaz de regular la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a furosemida del asa ascendente de Henle (BSC1) y del canal epitelial de sodio (EnaC) del túbulo colector. Esta función sugiere un mecanismo para explicar la hiperfiltración glomerular y la hipertensión sistémica que se observan en la nefropatía diabética. El TGF- β y concentraciones elevadas de glucosa en fibroblastos 3T3 en cultivo (que estimula la producción autócrina de TGF- β), aumentan el mRNA de la hSGK (116). Estos hallazgos

añaden al gen de la hSGK a la lista de los genes regulados transcripcionalmente por TGF- β (117).

7. Inhibidores del TGF- β

El TGF- β participa en la homeostasis del organismo y su desregulación desencadena varios procesos patológicos caracterizados principalmente por inflamación o fibrosis. La inhibición del TGF- β puede detener el desarrollo de estados patológicos asociados con fibrosis, tales como la cirrosis, la fibrosis pulmonar, el escleroderma, la pancreatitis crónica y la nefroesclerosis, entre otros. La búsqueda de inhibidores de este factor es de gran importancia y es por ello que se han desarrollado varios reactivos con actividad anti-TGF- β .

7.1. Decorina

La decorina es un proteoglicano de MEC que puede interactuar con el TGF- β . Es el prototipo de un grupo de proteoglicanos caracterizados por un polipéptido de aproximadamente 40 kDa que consiste principalmente de una secuencia repetida de 20 a 24 aminoácidos rica en leucinas. Los TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 se unen a la decorina con la misma eficiencia, permitiendo que funcione como un reservorio de factores de crecimiento (17).

La expresión de decorina inhibe la proliferación de células de ovario de hamster (CHO), las cuales normalmente no sintetizan esta proteína. Esta inhibición de la proliferación es causada por el bloqueo de la actividad de TGF- β por la decorina (17). Ya que las células CHO requieren TGF- β para su proliferación, se concluye que la decorina induce inhibición de la proliferación por bloqueo de este factor de crecimiento.

Aunque hay evidencias de que la decorina bloquea la acción del TGF- β , existe controversia en cuanto a si la decorina puede funcionar siempre como un inhibidor, ya que en ciertos sistemas celulares aumenta la actividad de este factor de crecimiento, como es el caso de osteoblastos, en los que se ha visto que la decorina aumenta la unión de TGF- β radioactivo a sus receptores (118). Además, se ha descrito que la decorina es capaz de unirse al receptor del EGF ("epidermal growth factor") y desencadenar los efectos mitogénicos de este factor (119). No obstante la controversia en cuanto a su acción

inhibidora, se ha visto que la decorina es capaz de prevenir la glomerulonefritis en ratas por la administración durante 6 días de 450 μg de decorina recombinante o purificada de tejido bovino, después de la inyección de suero anti-timocito. Este tratamiento disminuyó en un 50 %, el depósito de fibronectina y tenascina en el glomérulo (120). Además, las lesiones causadas por el daño glomerular fueron aminoradas por terapia génica con un vector de expresión para la decorina directamente transfectado en el músculo esquelético (121).

La decorina inhibe además, los efectos del TGF- β en la tuberculosis pulmonar (TB). A una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fue capaz de inducir respuesta proliferativa de células T de pacientes con TB. La decorina aumentó el nivel de IFN- γ en cultivo de células PBMCs de pacientes con TB en respuesta a PPD y disminuyó un 50 % el crecimiento de micobacterias en monocitos infectados con *M. tuberculosis* (122).

Recientemente, se ha demostrado que la expresión transitoria de la decorina en el pulmón de ratones tratados con bleomicina, reduce la respuesta fibrogénica de estos animales, por lo que podría tener un uso potencial en la fibrosis pulmonar (123).

7.2. Receptor II soluble

La transducción de la señal del TGF- β se lleva a cabo mediante su unión a los receptores I y II. Basados en el hecho de que el TGF- β es primeramente reconocido por el receptor II y después por el receptor I, se generó un receptor II soluble para impedir la actividad del TGF- β . Este receptor soluble presentó 10 veces menor afinidad de unión del TGF- β que el receptor de membrana, probablemente por el hecho de que el receptor tipo II soluble es una molécula monomérica y el receptor de membrana es un homodímero al igual que el TGF- β (124).

Con el fin de crear un inhibidor eficiente con la capacidad de bloquear la unión de TGF- β al receptor II y prevenir así la subsecuente transducción de señal, se generó una quimera de cDNA denominada TGF- β RII/Fc que codifica para un dominio extracelular del receptor tipo II de TGF- β fusionado a un dominio Fc de inmunoglobulina G. Cuando se transfectó esta construcción en células de mamífero, el TGF- β RII/Fc se secretó como una molécula dimérica unida por puentes disulfuro. Este TGF- β RII/Fc recombinante fue capaz de revertir la respuesta antiproliferativa inducida por TGF- β_1 en células Bnui-7 en cultivo a

la concentración de 1.25 µg/ml (9.6 nM). Además, 10 µg/ml (77 nM) del TGF-β_{II}/Fc disminuyó la producción de fibronectina EIIIA-positiva inducida por TGF-β₁ en cultivos de células de riñón de ratas normales. El cDNA quimérico se introdujo en el músculo esquelético de ratas nefríticas con el fin de bloquear la actividad del TGF-β en el glomérulo nefrítico por la liberación sistémica de la molécula quimérica. El tratamiento con transfección genética de 5 a 20 µg de cDNA TGF-β_{II}/Fc pudo suprimir el mRNA de TGF-β glomerular en ratas nefríticas en un 50 %, con un efecto comparable en la reducción de la acumulación de MEC. De acuerdo a lo anterior, el TGF-β_{II}/Fc es capaz de inhibir la acción del TGF-β *in vitro* e *in vivo* por lo que la terapia génica con esta molécula puede ser útil en la glomeruloesclerosis (125).

Además, la molécula quimérica tiene un efecto inhibitorio en la fibrogénesis experimental inducida por ligación del conducto biliar común en ratas. Esto implica que sería importante hacer una evaluación clínica de esta molécula como un agente para controlar la fibrosis hepática en enfermedad hepática crónica (126).

Se ha demostrado que el receptor soluble tipo II para TGF-β inhibe la señalización de TGF-β en células de cáncer pancreático *in vitro* y atenúa la formación de tumor en ratones (127).

7.3. Péptido asociado de latencia (LAP).

Otra proteína recombinante capaz de bloquear los efectos del exceso de TGF-β es el péptido asociado de latencia (LAP). Ensayos *in vitro* de inhibición de proliferación e inducción genética demostraron que el LAP es un potente inhibidor de las actividades del TGF-β₁, TGF-β₂ y TGF-β₃. Además, en ensayos *in vivo* usando ratones transgénicos que sobreexpresan el TGF-β₁ en hígado, se pudo demostrar que la administración del LAP suprime el efecto antiproliferativo hepático que el TGF-β tiene en estos animales cuando se someten a hepatectomía parcial (128).

7.4. Anticuerpos neutralizantes anti-TGF-β

En varios padecimientos, la fibrosis ha sido bloqueada por la inyección de anticuerpos neutralizantes anti-TGF-β. La administración de 1 ml de suero de conejo anti-

TGF- β al mismo tiempo de la inducción de glomerulonefritis en ratas y durante 6 días consecutivos, suprimió el incremento en la producción de MEC y atenuó dramáticamente las manifestaciones histológicas de la enfermedad. La síntesis de proteoglicanos en este caso disminuyó en un 80 % (113).

La hipertrofia renal es uno de los hallazgos en la diabetes humana y experimental. Esta hipertrofia puede ser bloqueada por anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β (129). En ratones con diabetes inducida por estreptozotocina se observó un incremento en la expresión renal del TGF- β , colágena y fibronectina, aparición de TGF- β en orina e hipertrofia. En este caso, la administración de 300 μ g de anticuerpo neutralizante anti-TGF- β administrado durante 8 días (en días alternados), suprimió la producción de TGF- β_1 , colágena IV (α 1) y fibronectina en un 40, 50 y 90 % respectivamente. Se redujo además el incremento del peso del riñón en un 50% (130).

Además del uso de anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β , se ha empleado un anticuerpo anti-receptor II del TGF- β para bloquear la actividad de este factor en la glomerulonefritis en ratas inducida por anticuerpo monoclonal anti-timocitos. El anticuerpo monoclonal humano anti-receptor II del TGF- β se produjo en ratones. El tratamiento de las ratas con 9 mg de este anticuerpo el día de la inducción de la glomerulonefritis y 4 días después, fueron capaces de disminuir la expansión mesangial en ratas con glomerulonefritis. Este anticuerpo fue capaz de disminuir en un 50 % la expresión de α -actina, fibronectina-EDA y colágena tipo I (131).

7.5. α_2 -macroglobulina

Además de la interacción con receptores de superficie, el TGF- β también se une a varias proteínas solubles. Estas incluyen la α_2 -macroglobulina, la decorina, el biglicano, la trombospondina, el precursor β -amiloide y la α -fetoproteína (1). La relevancia biológica de estas proteínas que unen TGF- β no se conoce, sin embargo, pueden alterar la disponibilidad del ligando por los receptores de señalamiento.

La α_2 -macroglobulina es una glicoproteína de 718 kDa que fue originalmente caracterizada como un inhibidor de proteasas de amplio espectro. Su estructura consiste de 4 subunidades idénticas, cada una de 1451 aminoácidos (132). Las subunidades están

unidas en dímeros por puentes disulfuro y en homotetrámeros por interacciones no covalentes (133). Además de su actividad como inhibidor de proteasas, esta proteína funciona como el principal acarreador y regulador de ciertas citocinas, incluyendo isoformas de la familia del TGF- β . Se ha demostrado que gran parte del TGF- β del suero esta asociado con esta proteína y que este TGF- β está inactivo (16). La unión del TGF- β a la α_2 -macroglobulina no es dependiente de la estructura cuaternaria de α_2 -macroglobulina. La α_2 -macroglobulina une al TGF- β_1 y TGF- β_2 con una K_d de 300 y 10 nM respectivamente. Para localizar el sitio de unión del TGF- β a la α_2 -macroglobulina, se diseñaron 5 fragmentos de DNA que juntos codifican los aminoácidos 122 a 1302. Los fragmentos de DNA fueron expresados como proteínas de fusión. En este caso el péptido que incluye los aminoácidos del 614 a 797, fue capaz de unir al TGF- β_1 y TGF- β_2 y neutralizó la actividad del TGF- β_1 y TGF- β_2 en ensayos de proliferación en células endoteliales de corazón fetal bovino a la concentración de 200 nM (134).

7.6. Péptidos sintéticos

Se han desarrollado varios péptidos sintéticos designados como β_1 (41-65), β_2 (41-65) y β_3 (41-65) cuya secuencia de aminoácidos corresponde a los residuos 41 a 65 del TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 respectivamente. Estos péptidos fueron capaces de inhibir la unión de isoformas radioactivas de TGF- β a los receptores de las células de epitelio pulmonar de bisón (Mv1Lu). El β_1 (41-65) a la concentración de 10 μ M fue capaz de bloquear la inhibición de la proliferación y la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno inducido por el TGF- β en estas células (135). Aunque estos péptidos bloquean la acción del TGF- β *in vitro*, no se ha demostrado su utilidad *in vivo*.

Se ha sintetizado además el péptido LSKL derivado de la secuencia del LAP que bloquea la activación del TGF- β por trombospondina. Este péptido ha sido capaz de reducir el daño renal en un modelo de nefropatía experimental (anti-Thy1) (136).

7.7. Oligonucleótidos antisentido.

La administración de oligonucleótidos antisentido ha bloqueado la expresión de genes *in vitro* e *in vivo*. El uso de RNA antisentido se basa en que una secuencia antisentido

puede hibridar a un mRNA específico evitando su procesamiento y por lo tanto la expresión de una proteína dada. En el caso del TGF- β_1 se ha observado que la inhibición de la expresión del gen del TGF- β por oligonucleótidos antisentido ha podido suprimir el desarrollo de glomerulonefritis experimental (137). También se ha logrado bloquear la expresión del gen para TGF- β_1 en células hepáticas en cultivo utilizando oligonucleótidos (138). Recientemente se ha descrito que el tratamiento con oligonucleótidos de TGF- β_1 antisentido en ratones diabéticos disminuyó la producción de TGF- β_1 y la hipertrofia de las células del túbulo proximal inducida por altas concentraciones de glucosa *in vitro* y previno parcialmente el incremento de peso y expresión de matriz extracelular del ratón (139).

7.8. Inhibidores intracelulares.

Otra estrategia para inhibir las acciones del TGF- β ha sido el uso de inhibidores intracelulares de la vía de señalamiento. Se ha descrito que la expresión del transgen para Smad 7 en ratones con fibrosis en el pulmón inducida por la bleomicina suprime el mRNA de precolágena tipo I, reduce el contenido de hidroxiprolina y evita el daño morfológico fibrótico en el pulmón. Además, bloquea la fosforilación de Smad2 inducida por bleomicina en este órgano. Estos datos indican que el transgen de Smad7 previene la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, sugiriendo que la Smad7 puede tener aplicación en el tratamiento de la fibrosis pulmonar (140). Se han desarrollado también inhibidores de las cinasa de los receptores de señalamiento. Entre ellos se encuentra el compuesto llamado SB431542 que es un inhibidor de la cinasa del receptor I .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se han buscado intensamente moléculas neutralizadoras del TGF- β que permitan disminuir la síntesis exagerada de matriz extracelular dependiente de TGF- β que es común en varias enfermedades renales, hepáticas, pulmonares y de otros órganos. Se han descrito varias moléculas que pueden inhibir la actividad del TGF- β en diferentes modelos animales, sin embargo la mayoría de estos inhibidores no se encuentran en forma natural en el organismo por lo que podrían desencadenar reacciones inmunológicas adversas. Se ha observado que el medio condicionado de células que expresan la forma soluble del betaglicano, tiene la capacidad de unir al TGF- β con alta afinidad y puede bloquear la unión del factor a los receptores de señalamiento (49). En vista de que la forma soluble del betaglicano se encuentra en forma natural en suero y matriz extracelular (55) cabría esperar que la administración del betaglicano soluble recombinante no desencadenará reacciones inmunológicas adversas, por lo que es un candidato ideal como agente anti-TGF- β .

HIPÓTESIS

El betaglicano soluble recombinante es capaz de unir al TGF- β con alta afinidad y evitar la unión del factor a los receptores I y II y por lo tanto puede actuar como un potente inhibidor de los efectos del TGF- β *in vivo*.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímicamente al betaglicano soluble recombinante y analizar su capacidad como un agente terapéutico anti-TGF- β .

Para ello, se obtuvo betaglicano soluble recombinante de rata utilizando el sistema de expresión en baculovirus. El betaglicano soluble recombinante se empleó en el estudio de sus propiedades bioquímicas, su selectividad de unión a las diferentes isoformas de TGF- β y su capacidad anti-TGF- β *in vitro* mediante ensayos de activación transcripcional y de inhibición de la proliferación. Además, se analizó la potencia del betaglicano soluble recombinante como un agente anti-TGF- β *in vivo* empleando el modelo de glomerulonefritis experimental en ratas inducida por anticuerpos anti-timocito.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos y cultivos celulares

Las células COS-1 (CRL-1654, ATTC), Mv1Lu (CCL-64, ATCC) y HepG2 (HB-8065, ATCC) fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO/BRL) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, GIBCO/BRL) y antibiótico-antimicótico (100 unidades de penicilina G, 100 µg de sulfato de estreptomycin y 0.25 µg/ml de anfotericina B en solución salina 0.85%, GIBCO/BRL). Las células FBHE (CRL-1395, ATCC) fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y mitógeno endotelial. Las células MMC fueron cultivadas en medio DMEM bajo en glucosa (1 g/l) suplementado con 10 % de SFB y 2 mM de glutamina (GIBCO/BRL). Las células de insecto Sf9 (células ováricas de *Spodoptera frugiperda*, Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron cultivadas en medio Grace (GIBCO/BRL) suplementado con 10 % de SFB, "yeastolate" (GIBCO/BRL), hidrolizado de lactoalbúmina (GIBCO/BRL) y antibiótico-antimicótico. Las células H5 "High five" (células ováricas de *Tricoplusia ni*, Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron cultivadas en "spinners" a 27 °C a 100 rpm usando medio Express Five (GIBCO/BRL) sin suero suplementado con 4 mM de glutamina y antibiótico-antimicótico. El TGF-β₁ y el anticuerpo neutralizante anti-TGF-β (AB-100-NA) fueron de R & D System (Minneapolis, MN, U.S.A.). Los TGF-β₂ y TGF-β₃ fueron donados por el Dr. N. Cerletti (Ciba Geigy, Basel, Switzzeland). La activina y los BMPs fueron donados por el Dr. Wrana (Hospital of Sick Children, Toronto, Ontario Canada). Los amortiguadores y sales fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (México). El material de plástico empleado para cultivos celulares se obtuvo de Corning Costar (Cambridge, MA).

Transfecciones

Las células COS-1 y las Mv1Lu se transfectaron mediante el método de dietilaminoetil-dextran (DEAE-Dextran) (141). Para ello, las células se sembraron en cajas Petri para cultivo de 78.5 cm² de área. Al siguiente día, se removió el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con medio DMEM sin suero y se adicionó la mezcla de transfección (10 µg de plásmido, cloroquina 0.1 mM, 0.4 mg/ml de DEAE-Dextran). Las células se incubaron 4 h a 37 °C. Posteriormente, se quitó el medio a las células y se

incubaron con DMSO al 10% en PBS durante 1.5 min. Se enjuagaron 1 vez con medio DMEM y se les agregó medio DMEM suplementado con 10% de SFB y antibiótico-antimicótico. Las células COS-1 se ensayaron 48 horas después de la transfección, para lo cual se sembraron en placas de 28 cm² y se incubaron en medio DMEM sin suero durante 36 horas. Se colectó el medio condicionado y se analizó la presencia de la proteína recombinante mediante la técnica de western blot. Las células Mv1Lu se sembraron para ser ensayadas por el método de luciferasa.

Las células HepG2 se transfectaron utilizando el método de precipitación de fosfato de calcio (142). Para ello, las células se crecieron en cajas de Petri de 78.5 cm² de área a un 50 % de confluencia en medio de cultivo DMEM adicionado de SFB al 10% y antibiótico-antimicótico. Se removió el medio de cultivo y se sustituyó por 9 ml de medio fresco. Se adicionó la mezcla de transfección gota a gota (10 µg de DNA en 250 µl de agua estéril más 250 µl de CaCl₂ 250 mM mezclando en vortex con 250 µl de amortiguador de HEPES (NaCl 224.5 mM, HEPES 40 mM, Na₂HPO₄ 1.2 mM pH 7.05)), y se incubó por 16 horas. Se retiró la mezcla de transfección y se adicionaron 4 ml de glicerol al 10 % en PBS por 2 min. La placa se lavó 2 veces con PBS, se adicionó medio completo y se incubó a 37 °C por 4 horas. Después de este tiempo, las células se sembraron para ser ensayadas por el método de luciferasa.

La transfección de las células de insecto Sf9 se realizó utilizando el kit de transfección Bac-N-Blue (Invitrogen). Para ello, se sembraron 1 X 10⁶ células Sf9 en cajas Petri de 9.5 cm² de área con medio Grace completo. En un tubo de poliestireno se mezclaron 100 ng de DNA AcMNPV (DNA baculoviral) y 1 ng del vector pbluebac4 con la secuencia para el betaglicano soluble. Se adicionó igual volumen de lipofectina diluida 1:1.5 con agua estéril. La solución se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. La monocapa de células Sf9 se lavó 2 veces con medio Grace sin suplementos. Se adicionaron a la monocapa de células, 1 ml de medio Grace sin suplementos y la mezcla de DNA-lípido. Las células se incubaron en cámara húmeda a 27 °C por 5 horas. Después de este tiempo, se adicionó 1 ml de medio de cultivo completo a las células y se continuo la incubación durante 8 días. El medio condicionado conteniendo al baculovirus recombinante se cosechó en condiciones estériles y se mantuvo a 4 °C hasta su uso (143).

Western blot

Los medios condicionados fueron sometidos a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, transferidos a membranas de nitrocelulosa y probados con anticuerpo monoclonal anti-c-myc (9E10) (144). Para la detección con el anticuerpo, las membranas fueron bloqueadas en PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T) conteniendo leche descremada al 5%. Las membranas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10 (145) diluido 1:2000 en PBS-T, durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (SIGMA ALDRICH) diluido 1:5000 en PBS-T, durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron y se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia Biotech).

Ensayo en placa

Se sembraron cajas Petri de 9.5 cm² con 1.5 X 10⁶ células Sf9 en 2 ml de medio Grace completo. Se incubaron 2 horas a 27 °C. El medio condicionado obtenido de la transfección de las células Sf9, el cual contenía al baculovirus recombinante, se diluyó a 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ en medio Grace completo. Se removió el medio de las células y adicionaron 100 µl de la dilución del virus. La infección se hizo por duplicado. Las células se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se descartó el inóculo de virus en una solución desinfectante y se cubrieron las células con 2 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (GIBCO, BRL) en medio Grace completo a 27 °C. Una vez gelificada la agarosa (10-15 min), cada placa se cubrió con 1 ml de medio Grace completo. Se pusieron las cajas Petri en cámara húmeda y se incubaron a 27 °C por 5 días. Para teñir las placas de lisis de virus recombinante (virus lac-Z positivo), se removió el líquido que cubría la caja Petri y se descartó en una solución desinfectante. Se adicionó 1 ml de medio Grace completo conteniendo 15 µl de X-gal (al 2 % en dimetilformamida). Las cajas se incubaron 5 horas a 27 °C y se les quitó la solución de tinción. Estas cajas se invirtieron y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche, protegidas de la luz (143).

Obtención de stock de baculovirus de alto título

Las células Sf9 se sembraron a una concentración de 5×10^4 células/pozo en placas para cultivo de 12 pozos. Usando una pipeta Pasteur estéril y un bulbo, se penetró la agarosa y se removió la placa de lisis de virus recombinante. Se transfirió una placa de lisis a cada pozo. Se selló la placa con parafilm y se incubó a 27°C durante 6 días. Se cosechó el medio condicionado de cada pozo, se centrifugó y se mantuvo el sobrenadante a 4°C . Este sobrenadante se denominó stock viral P-1. Posteriormente, se sembraron 2×10^6 células Sf9 en 5 ml de medio completo en cajas Petri de 28.2 cm^2 . Se adicionaron $20\ \mu\text{l}$ del stock P-1 a cada caja y se incubaron a 27°C entre 5 y 10 días, o hasta tener del 80 al 90 % de lisis. Se cosechó el medio condicionado mediante centrifugación. Se colectó el sobrenadante y se le denominó stock viral P-2. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se congeló a -80°C como stock de reserva. El resto se guardó a 4°C protegido de la luz.

Para obtener un stock de virus de alto título a gran escala, se adicionaron 5 ml de stock viral P-2 a 500 ml de células Sf9 creciendo en suspensión a una densidad de 1.8 a 2.2×10^6 células/ml. Se incubó el cultivo a 27°C con una agitación constante de 100 rpm durante varios días. El cultivo se cosechó cuando se obtuvo $\geq 90\%$ de de lisis celular, mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se guardó a -70°C protegido de la luz hasta su uso.

Titulación del baculovirus

La titulación del baculovirus se hizo mediante el ensayo en placa descrito anteriormente. Para la titulación se ensayaron diluciones del virus de 10^{-4} a 10^{-9} .

Purificación del betaglicano soluble recombinante

Las células H5 crecidas a una densidad de 2×10^6 células/ml se infectaron a una multiplicidad de infección de 10 con un stock de alto título de baculovirus recombinante. Después de 48 h, se adicionó PMSF al cultivo a una concentración final de 1mM y se obtuvo el medio condicionado mediante centrifugación a 12000 rpm durante 30 min a 4°C . El medio condicionado se concentró 10 veces usando un sistema de ultrafiltración Minitan (Millipore, Bedford, MA). El betaglicano soluble recombinante se purificó a partir del medio condicionado mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados

(IMAC). Para ello, se utilizó sefariosa quelante de flujo rápido (Amersham Pharmacia Biotech, UK) cargada con níquel y equilibrada con buffer de lavado (hepes 25 mM pH 7.5, KCl 1M, imidazole 20mM y PMSF 1mM). El betaglicano se eluyó utilizando un gradiente continuo de imidazol de 20 a 250 mM en un volumen de 200 ml. Se colectaron fracciones de 5 ml y se detectó el betaglicano mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras, tinción con plata y western blot utilizando el anticuerpo policlonal 822. Las fracciones conteniendo el betaglicano puro se concentraron mediante un sistema de amicón (Millipore, Bedford, MA). La muestra se dializó contra buffer de fosfatos y salina (PBS) conteniendo 1% (v/v) de glicerol y 1 mM de PMSF. Se determinó la concentración de proteínas en la muestra mediante el método de Bradford y se congeló en alícuotas a -70°C hasta su uso. Para poder reutilizar la columna quelante se despegó el níquel con buffer de lavado adicionado de 50 mM de EDTA. Se lavó con agua ultrapura y se cargó nuevamente con NiCl_2 50 mM. La columna se guardó a 4°C hasta su uso.

Filtración en gel

Para la filtración en gel, 30-50 μg de betaglicano soluble recombinante fueron pasados a través de una columna de cromatografía BioSpe Sec-S3000 (300 x 7.8 mm) usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Beckman Gold 126.

El buffer de la columna fue NaH_2PO_4 25 mN, NaCl 150mM, pH 6.8 a un flujo de 1 ml/min. Las proteínas se detectaron por su absorbancia a 280 nm y las fracciones fueron colectadas y analizadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en condiciones reductoras, mediante tinción con plata. El peso molecular del betaglicano soluble en condiciones nativas se obtuvo comparando el volumen de elusión del betaglicano con el volumen de elusión de proteínas estándar (tiroglobulina, IgG, ovoalbumina, mioglobina y vitamina B12).

Electroforesis desnaturalizante o nativa

La electroforesis en geles nativos de poliacrilamida fue hecha de acuerdo a métodos descritos anteriormente (146, 147). Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida y las bandas fueron detectadas mediante tinción con plata. Para la titulación de los agentes

desnaturalizantes o reductores: urea, HCl-guanidina, ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, dodecilsulfato de sodio (SDS), Tritón X-100 y Nonidet P40, el betaglicano soluble fue incubado con estos agentes por 30 minutos a 37 °C antes de la electroforesis. El cálculo del peso molecular fue hecho de acuerdo al método de Ferguson usando estándares de peso molecular: catalasa y monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros de BSA (148).

Desglicosilación

La desglicosilación química del betaglicano soluble fue llevada a cabo mediante el método descrito por Sojar y Bahl (149). Brevemente, 50 μ g del betaglicano soluble recombinante alquilado y liofilizado fueron incubados en la oscuridad a 4 °C por 2 hr con 100 μ l de ácido trifluorometanosulfónico (TFMS) en tubos de vidrio saturados con N₂. La reacción se detuvo adicionando piridina al 60% a -20 °C. La proteína fue dializada exhaustivamente contra agua y concentrada en un Speed Vac (Savant Instrument). Para su análisis, la proteína fue solubilizada y repurificada por IMAC via su extremo carboxilo terminal de seis histidinas. Posteriormente, la muestra fue sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras y detectada por western blot usando anticuerpo 9E10 anti-myc y concanavalina A.

Secuenciación amino-terminal

Para la secuenciación amino-terminal, el betaglicano soluble recombinante fue sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras y transferido a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA). La proteína transferida fue teñida con azul de Coomassie y sometida a degradación de Edman automatizada en un secuenciador de proteínas (LF 3000, Beckman Instrument) equipado con un sistema de HPLC Beckman.

Marcado por afinidad

El marcado por afinidad del betaglicano soluble recombinante se realizó mediante la técnica descrita por Andres y cols. en 1989 (55) utilizando TGF- β marcado radiactivamente con ¹²⁵I. La iodinación del TGF- β se realizó de acuerdo al método de cloramina T (23). Para ello, se mezclaron 2 μ g de TGF- β (en 5 μ l de acetonitrilo al 30 % y TCA 0.1%) con 5

μl de fosfato de sodio 1.5 M. Se adicionaron en campana de extracción, 4 μl de Na¹²⁵I (aproximadamente 400 μCi) y 2 μL de cloramina T (50 μg/ml). Se incubó la mezcla durante 2 min con agitación constante. Se adicionaron 2 μl de cloramina T y se incubó durante 1.5 min. Se adicionaron nuevamente 2 μl de cloramina T y se incubó durante 1 min. La reacción se detuvo adicionando 10 μl de N-acetiltirosina 50 mM, 100 μl de KI 60 mM y 100 μl de urea (1.2 g en ácido acético 1 M). Se realizó la separación del TGF-β marcado del ¹²⁵I libre, utilizando columnas de sephadex-G25 (Pharmacia Biotech) y se cuantificó su actividad específica mediante cromatografía de capa fina.

Los ensayos de unión de TGF-β a saturación, se realizaron con 10 ng de betaglicano recombinante resuspendido en PBS con tritón X-100 al 0.05%. Las muestras se incubaron con diferentes concentraciones (0.05-16 nM) de TGF-β₁ marcado con ¹²⁵I durante 3 horas a 4°C. La reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo mediante la adición de disuccinimidilsuberato (DSS) a una concentración de 0.1 mg/ml. La reacción se detuvo después de 15 min., adicionando Tris a una concentración de 10 nM. Las muestras se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo monoclonal 9E10 anti-c-myc a la dilución de 1:250 y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7%. La unión del TGF-β₁ al betaglicano se detectó mediante escaneo en un Phosphorimager (Molecular Dynamics). La densitometría cuantitativa se llevó a cabo mediante el programa de computadora ImageQuant y los datos fueron analizados con el programa de computación Prism.

Los ensayos de competencia de unión del TGF-β al betaglicano se realizaron de acuerdo al protocolo anterior, incubando 10 ng de betaglicano soluble recombinante con 100 pM de con ¹²⁵I-TGF-β y diferentes concentraciones de TGF-β frío (0.25- 4 nM).

Ensayo de luciferasa

Las células Mv1Lu y HepG2 fueron transfectadas con 10 μg de plásmido reportero mediante el método de dietilaminoetil-dextran y el método de precipitación de fosfato de calcio respectivamente. Las células transfectadas fueron tripsinizadas y sembradas en cajas para cultivo de células de 24 pozos a una concentración de 50,000 células/pozo. Al siguiente día, se adicionaron diferentes concentraciones de betaglicano soluble

recombinante y TGF- β a una concentración de 20 pM, y se incubaron 18 h. Por último, las células fueron lisadas en buffer de lisis (Tris-fosfato 25 mM pH 7.8, DTT 2 mM, ácido 1,2 diaminociclohexano-N,N,N',N' tetracético 2 mM, glicerol 10% y Tritón X-100) y ensayadas para actividad de luciferasa usando un sistema de ensayo para luciferasa (Promega) mezclando 50 μ l del extracto celular con 50 μ l del reactivo de luciferasa. La emisión de luz fue medida durante los primeros 30s de la reacción usando un luminómetro (Berthold Lumat LB 9501). El ensayo se realizó también utilizando diferentes concentraciones de un anticuerpo anti-TGF- β comercial.

Ensayo de inhibición de la proliferación

Se sembraron células FBHE en cajas para cultivo de células de 96 pozos a una concentración de 1×10^4 células/pozo en medio de cultivo DMEM con 0.2 % de SFB y mitógeno endotelial. Al siguiente día, se adicionó TGF- β a una concentración de 40 pM y diferentes concentraciones de betaglicano soluble recombinante en medio de cultivo DMEM con 0.2 % SFB y mitógeno endotelial. Las células se incubaron durante 48 h a 37 °C y se pulsaron con 0.5 μ Ci de 3H-Timidina en 25 μ l de medio de cultivo, 18 horas antes de ser cosechadas. Las células se cosecharon y se midió la incorporación de timidina en las muestras utilizando un contador de centelleo (Beckman).

Inducción de proteínas de matriz extracelular en células MMC

Las células MMC se incubaron durante 48 horas en medio DMEM bajo en glucosa (1 g/l) suplementado con 2mM de glutamina (GIBCO/BRL). Posteriormente las células se incubaron en medio DMEM con baja (1 g/l) o alta concentración de glucosa (4.5 g/l), en presencia o ausencia de 100 nM de betaglicano soluble recombinante durante 24 horas.

Glomerulonefritis aguda experimental

Para la inducción de la glomerulonefritis se utilizó el anticuerpo policlonal anti-timocito (ATS) donado por el Dr. Jonson, Division of Nephrology, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA y el anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7) purificado mediante precipitación con sulfato de amonio, a partir de medio condicionado de células de hibridoma (European Collection of Cell Culture No.

84112008) crecidas en medio de cultivo libre de proteínas (SIGMA). La glomerulonefritis se indujo en ratas macho de 150 a 200 g de peso, inyectando 1 ml de anticuerpo ATS o 300 µg de anticuerpo OX-7 por vía intravenosa. Un día después, las ratas fueron tratadas con PBS o diferentes dosis de betaglicano soluble recombinante. Cada dosis se administró diariamente por vía intraperitoneal durante 6 días. Al octavo día las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones para su estudio.

Tinción con ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS)

Los riñones fueron cortados longitudinalmente en dos partes. Uno de los fragmentos se fijó con formaldehído al 10 % en PBS y posteriormente se incluyó en parafina. Se hicieron cortes de 3 µm de grosor y se tiñeron de acuerdo al protocolo establecido. Brevemente, los tejidos se desparafinaron e hidrataron, incubando 30 min a 60 °C, 5 min en xileno (2 veces), alcohol absoluto, alcohol al 96° y agua destilada. Los tejidos fueron incubados en ácido peryódico al 0.5 %, se lavaron con agua destilada y se incubaron con el reactivo de Schiff durante 30 min. Posteriormente, se lavaron con agua corriente caliente y se contratiñeron con Hematoxilina de Harris incubando en hematoxilina 5 min y lavando con agua corriente, alcohol ácido, agua corriente, agua amoniacal y agua corriente. Los cortes de tejido se deshidrataron incubando en alcohol 96°, alcohol absoluto y xileno, se montaron en resina y se observaron al microscopio.

Inmunohistoquímica

Se hicieron cortes por congelación de 4 µm de grosor a partir de tejido incluido en Tissue-Tek y se colocaron en portaobjetos silanizados. Las laminillas con los cortes de tejido se incubaron en PBS 0.15 M durante 2 min y en etanol al 96 % durante 2 min. Los tejidos se incubaron en H₂O₂ al 15 % en metanol durante 1.5 h y posteriormente en alcohol al 96 % durante 2 min y en agua destilada durante 2 min. Los tejidos se incubaron 30 min con BSA al 2 % en PBS, se eliminó el exceso de buffer y se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.05 %. Los tejidos se incubaron con los anticuerpo anti-colágena IV o anti-colágena I (Rockland) diluidos 1:250 en BSA al 1 % en PBS, durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda protegidos de la luz. Los tejidos se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1 % y se incubaron con el anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo

biotinilado (DAKO) diluido 1:400, durante 2 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Posteriormente, los tejidos se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1 % y se incubaron 30 min con el complejo AB/HRP (DAKO) diluido 1:150 en BSA al 1 % en PBS. Los tejidos se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1 % y con PBS. Finalmente, los tejidos se revelaron con diaminobencidina (SIGMA). Los tejidos se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1 % y con agua destilada. Los tejidos se contrastaron con hematoxilina de Harris 5 min, se deshidrataron, se montaron con resina y se observaron al microscopio. Se hizo el análisis morfométrico de los tejidos mediante el programa de computadora LeikaQwin, que permitió medir el área glomerular teñida por los anticuerpos utilizando un microscopio óptico conectado a la computadora.

Northern blot

Se extrajo el RNA de las células MMC utilizando el método de Trizol (Life Technologies). Brevemente, las células se disgregaron en 1 ml de Trizol. Las muestras se incubaron 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se les adicionó 0.2 ml de cloroformo. Las muestras se agitaron vigorosamente 5 seg, se incubaron a temperatura ambiente 3 min y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el RNA adicionando 0.5 ml de isopropanol e incubando 10 min a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El botón de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75 % y se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 min a 4 °C. El RNA se secó al aire y se resuspendió en agua-DEPC 0.2 % esterilizada. El RNA fue cuantificado midiendo la absorbancia de las muestras a 260 nm.

También se obtuvo RNA a partir de 100 mg de riñón congelado a -70 °C, utilizando el método de Trizol. Para ello, los tejidos se disgregaron en 1 ml de Trizol utilizando un homogenizador (Polytron-A, Kinematica, Switzerland). El RNA se purificó como se describió anteriormente.

Los RNAs se separaron en geles de agarosa al 0.9 % conteniendo formaldehído 2.2 M y se transfirió a membranas de nylon (ICN) mediante capilaridad (144). El RNA fue entrecruzado a la membrana mediante luz ultravioleta (UV Stratalinker 1800, Stratagene). Las membranas se prehibridaron a 42 °C durante 4 horas con un buffer de formamida 50 %, solución denhardt's 5X, SSC 0.1 %, SDS 0.1 %, buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6.8 y

RNA de torula 250 µg/ml. Posteriormente, las membranas fueron hibridadas con 50 ng de la sonda Col I (αII) o la sonda mSGK marcadas radioactivamente con 50 µCi (α³²)dCTP utilizando el kit Random primer DNA labeling (Boehringer Mannheim Biochemica). Las membranas se hibridaron durante 18 h a 42 °C en buffer de prehibridación. La cuantificación de la señal del northern blot fue medida mediante escaneo en un Phosphorimager (Molecular Dynamics). La densitometría cuantitativa se llevó a cabo mediante el programa de computadora ImageQuant. Los datos fueron normalizados utilizando la expresión de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en las muestras. Los datos fueron analizados mediante el programa de computación Prism.

Análisis estadístico

Todos los datos están expresados como promedio ± desviación estandar. Los datos fueron analizados usando la prueba t de Student. $P \leq 0.05$ fue considerada como significativa.

RESULTADOS

1. Caracterización bioquímica del betaglicano soluble recombinante baculoviral

1.1. Expresión del betaglicano soluble recombinante

Se ha descrito anteriormente que el medio condicionado de células que expresan la forma soluble del betaglicano, tiene la capacidad de unir TGF- β con alta afinidad y bloquear la unión del factor a los receptores de señalamiento. La forma soluble del betaglicano también se encuentra en forma natural en el suero y la matriz extracelular. Debido a estas propiedades, el betaglicano soluble se considera un buen candidato como agente anti-TGF- β . Para obtener cantidades suficientes del betaglicano soluble que nos permitieran evaluar su efecto inhibitor sobre la acción del TGF- β , fue necesario recurrir a la producción del betaglicano soluble en forma recombinante utilizando el sistema de baculovirus, ya que la alternativa de purificar al betaglicano soluble de fuentes naturales sería muy elaborada y de bajo rendimiento (150). Para obtener el betaglicano soluble recombinante, el cDNA del betaglicano de rata (49) fue modificado para codificar una proteína de secreción que contenía un epitopo c-myc en el extremo amino-terminal para facilitar su inmunodetección y un codón de terminación justo antes de la secuencia que codifica para la región transmembranal del receptor, precedido de una secuencia para seis histidinas que nos permitió su purificación (figura 13).

Para probar que la construcción del cDNA mutagenizado para el betaglicano soluble era funcional, se procedió a transfectar en las células COS-1 este cDNA y una versión modificada del betaglicano soluble sin los sitios de unión de GAGs. La transfección se realizó mediante el método de DEAE-Dextran y los medios condicionados fueron sometidos a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, transferidos a membranas de nitrocelulosa y probados con anticuerpo monoclonal anti-c-myc (9E10) para detectar la presencia del betaglicano soluble. El cDNA del betaglicano soluble de rata modificado expresado en las células COS-1 generó una proteína de secreción, la cual fue detectada por el anticuerpo monoclonal anti-c-myc. Este betaglicano soluble presentó un patrón de migración de un proteoglicano de tiempo parcial, ya que se sintetizó con las cadenas de glicosaminoglicanos y sin ellas. Este proteoglicano se observó como una

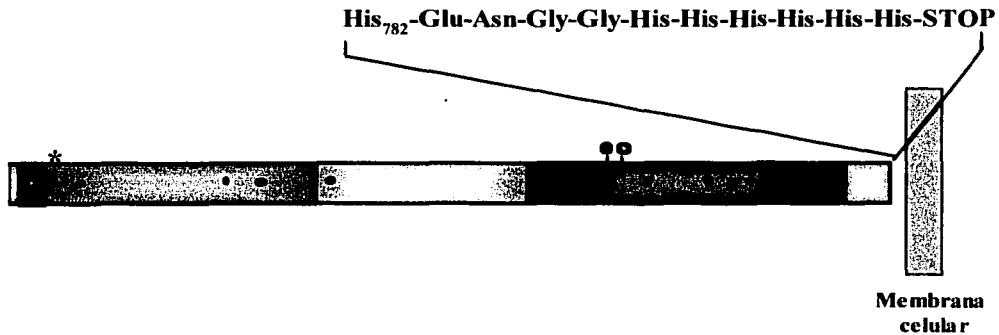


Figura 13. Construcción del betaglicano soluble. El cDNA que codifica para el betaglicano membranal de rata fue mutagenizado insertando un codón de terminación justo antes de la región transmembranal del cDNA. Se incluyó una secuencia de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal y la secuencia del epítipo *c-myc* en el amino terminal. Se muestran los sitios de unión de cadenas GAG (círculos vacíos), el péptido señal (región negra), la posición de los residuos de cisteínas (puntos negros) y el epítipo *c-myc* en el extremo amino-terminal (asterisco). Las regiones de secuencia similar a endoglina y uromodulina están indicadas en color gris claro y oscuro respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mancha de alta masa molecular (aproximadamente 200 kDa) que corresponde al betaglicano soluble con cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) y una banda que corresponde a la proteína medular de 100 kDa (figura 14, carril 1). Sin embargo, cuando el cDNA modificado se expresó en células de insecto Sf9 usando el sistema de baculovirus, se produjo sólo una proteína medular con una masa molecular de 110 kDa (figura 14, carril 3). El betaglicano soluble producido usando el sistema de baculovirus migró ligeramente más rápido que el betaglicano sin cadenas GAG expresado en células COS-1 (figura 14, carriles 2 y 3). La movilidad de la proteína viral indica la incapacidad de las células de insecto de adicionar GAG a la proteína y también una disminución en la capacidad de adicionar otro tipo de oligosacáridos generando una proteína con una masa molecular menor a la producida en las células de mamífero. Las bandas observadas alrededor y por debajo de 69 kDa pueden corresponder a productos de degradación derivados de las proteínas de secreción.

1.2. Purificación del betaglicano soluble recombinante

Una vez demostrado que la construcción del betaglicano soluble era funcional, se procedió a obtener cantidades mayores del betaglicano soluble recombinante que nos permitieran explicar el porque de las diferencias encontradas entre la proteína producida en células de insecto y en células de mamífero, y analizar si a pesar de estas diferencias, el betaglicano soluble producido en células de insecto era capaz de bloquear los efectos del TGF- β tanto *in vitro* como *in vivo*.

Para obtener cantidades mayores de betaglicano soluble se utilizaron células de insecto H5, las cuales producen más proteína recombinante que las células Sf9. Las células H5 se crecieron en suspensión en medio Express five, el cual es un medio sintético libre proteínas que nos permitió purificar la proteína en forma más sencilla. Las células H5 se infectaron con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección de 10 para asegurar que todas las células se infectaran y sintetizaran la proteína al mismo tiempo. Después de 2 días de infección, se obtuvo el medio condicionado mediante centrifugación y se concentró usando un sistema de ultrafiltración Minitan. El betaglicano soluble recombinante se purificó a partir del medio condicionado mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, utilizando sefarosa quelante cargada con níquel

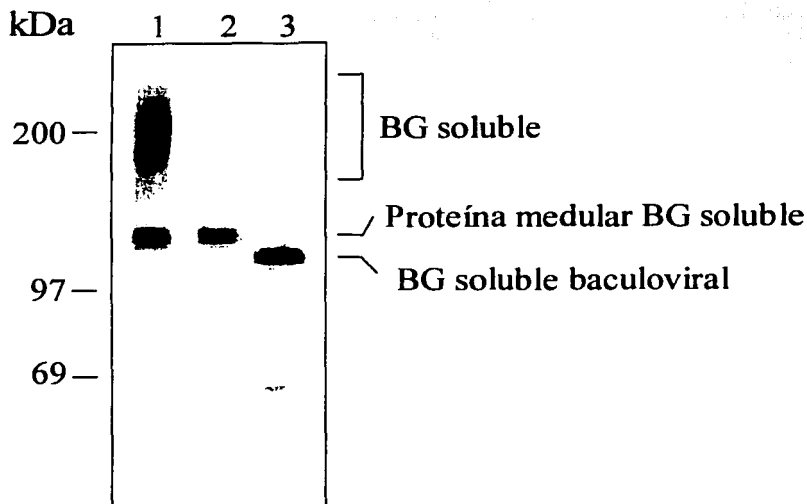


Figura 14. Expresión del betaglicano soluble recombinante en células COS-1 y Sf9. El medio condicionado de células COS-1 transfectadas con el cDNA que codifica para el betaglicano soluble (BG soluble) (carril 1) o su versión sin GAGs (carril 2) y el medio condicionado de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante (carril 3) fueron analizados por western blot con el anticuerpo monoclonal 9E10 anti-c-myc. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda del gel.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la cual nos permitió purificar al betaglicano soluble a través de su cola de histidinas. El betaglicano se eluyó utilizando un gradiente continuo de imidazol de 20 a 250 mM en un volumen de 200 ml. Se colectaron fracciones de 5 ml y se detectó el betaglicano mediante SDS-PAGE, tinción con plata y western blot utilizando el anticuerpo policlonal 822. La proteína eluida de la columna a través del gradiente fue detectada por su absorbancia a 280 nm y graficada (figura 15). En el cromatograma se observa una región de mayor absorbancia a 280 nm que corresponde al betaglicano soluble recombinante el cual eluyó de la columna a partir de la concentración de 120 nM de imidazol. El betaglicano se detectó en las fracciones mediante SDS-PAGE y tinción de los geles con plata (figura 15). Las fracciones conteniendo el betaglicano puro se concentraron mediante un sistema de amición ("Stirred cell") de 50 ml utilizando una membrana de corte de 10 kDa (Durapore, Millipore) y la muestra se dializó contra PBS. Se determinó la concentración de proteínas en la muestra y se congeló en alícuotas a -70°C hasta su uso para evitar su degradación. Como se muestra en la figura 16, con este sistema se logró la purificación a homogeneidad del betaglicano soluble recombinante. La purificación del betaglicano soluble recombinante tuvo un rendimiento de entre 6 a 10 mg por litro de medio condicionado.

1.3. Secuenciación amino-terminal del betaglicano soluble recombinante

La diferencia en masa molecular encontrada entre el betaglicano soluble producido en células de insecto y en células de mamífero podría deberse a un procesamiento post-traducciona defectuoso, el cual ha sido descrito en proteínas membranales o de secreción de mamíferos en células de insecto (151). Por lo tanto, fue importante determinar si el extremo amino del betaglicano producido en células de insecto era el esperado, lo cual nos demostraría que el péptido señal del betaglicano soluble se procesó correctamente en las células de insecto generando la proteína completa. Sólo se analizó el extremo amino, ya que su extremo carboxilo estaba intacto porque contenía la cola de histidinas que nos permitió purificarlo en la columna de afinidad.

Se determinó la secuencia amino-terminal del betaglicano soluble recombinante mediante degradación de Edman automatizada y los primeros 16 ciclos de la degradación de Edman revelan la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 17. Esta secuencia confirma la identidad de la proteína recombinante e indica que su péptido señal fue

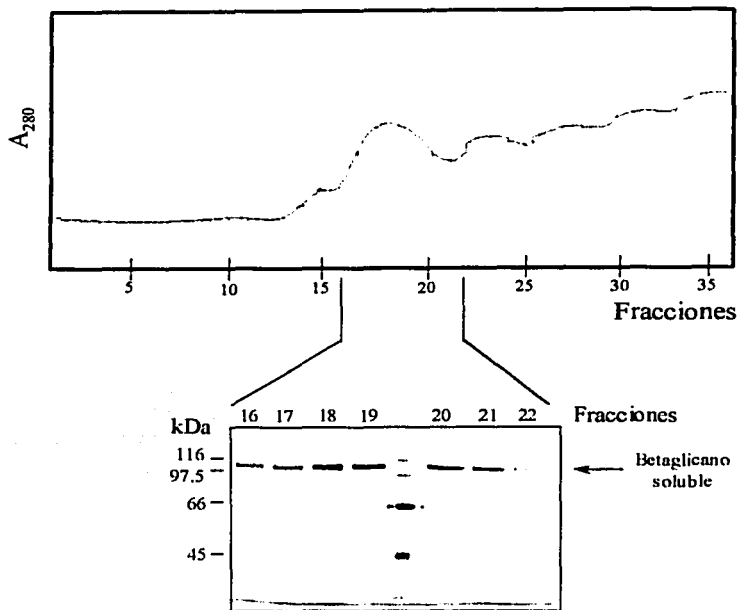


Figura 15. Purificación del betaglicano soluble recombinante mediante IMAC. El betaglicano soluble recombinante se purificó a partir del medio condicionado mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). El betaglicano se eluyó utilizando un gradiente continuo de imidazol de 20 a 250 mM. Se colectaron fracciones y se detectó el betaglicano mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras, tinción con plata y western blot utilizando el anticuerpo policlonal 822. La proteína eluida de la columna a través del gradiente fue detectada por su absorbancia a 280 nm y graficada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

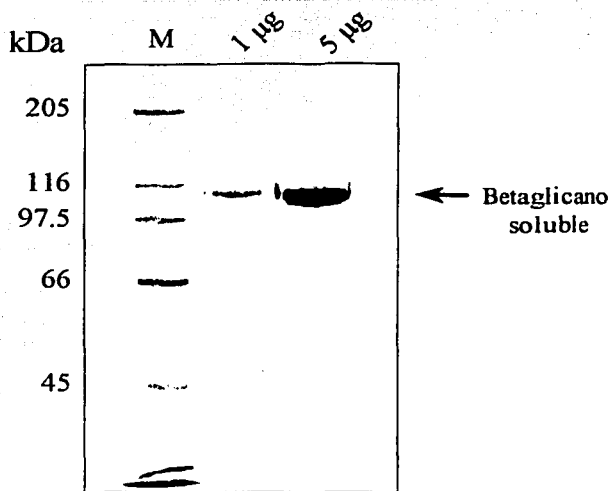


Figura 16. Expresión del betaglicano soluble recombinante en células H5. El betaglicano soluble recombinante purificado de medio condicionado de células H5 infectadas con el baculovirus recombinante utilizando IMAC fue separado en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras y teñido con azul de Coomassie.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

procesado apropiadamente en las células H5. El corte del péptido señal ocurre entre Ala²³-Gly²⁴ del propéptido (figura 17), exactamente predicho por las reglas von Heijne (70).

1.4. Glicosilación del betaglicano soluble recombinante

Debido a que el péptido señal del betaglicano soluble producido en células H5 fue procesado adecuadamente, las diferencias en la masa molecular observadas entre el betaglicano soluble producido en células H5 y en células COS-1 podrían deberse a diferencias en el patrón de glicosilación. Para confirmar esto, se dedujo la masa molecular del betaglicano producido en células H5 después de su tratamiento con TFMS para eliminar los carbohidratos de la molécula. La masa molecular se calculó a partir de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. El análisis del betaglicano soluble baculoviral glicosilado, mediante western blot y la detección con concanavalina A (figura 18, línea 3) reveló la presencia de oligosacaridos ricos en manosa en esta molécula, muy probablemente pertenecientes a la clase que están unidos a asparagina. La desglicosilación química del betaglicano soluble baculoviral con TFMS resultó en la generación de una proteína de 87 kDa que se pudo purificar por IMAC (figura 18). El producto desglicosilado fue reconocido por el anticuerpo anti-myc, pero no pudo unir concanavalina A (figura 18, líneas 2 y 4). Estos resultados indican que el TFMS desglicosiló completamente al betaglicano soluble recombinante baculoviral, removiendo aproximadamente 20 kDa de su masa molecular determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. La masa molecular del betaglicano baculoviral desglicosilado concuerda con la masa molecular de 87.3 kDa predicha a partir del cDNA.

1.5. El betaglicano soluble recombinante es un dímero no covalente

Se ha descrito que el betaglicano de membrana forma homo-oligómeros en ausencia o presencia del TGF- β . Para determinar si el betaglicano soluble baculoviral forma estos homo-oligómeros, se decidió determinar su masa molecular en condiciones nativas utilizando cromatografía de filtración en gel. Para ello, el betaglicano soluble baculoviral

ORF
conceptual ATGCGAGTGACATCCACCCACATGATCCCGGTGATGCTTGTCTCGATGAGCGCCTGCCTGGCCACCGCC
 K A V T E H H M I F V M V L E M S A C L A T A

Gly²⁴

ORF
conceptual GGTCCAGAGCCCAGCACCCCGGAGGAACAGAAAGCTGATCTCCGAGGAAGATCTGCTCCGGTGT---->
 G P E P S T R E E C K L I S E E D L I F C---->

Ciclo # 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
experimental G P E P S T R E E C K L I S E E

Figura 17. Secuenciación amino terminal. La secuenciación amino-terminal del betaglicano soluble recombinante fue determinada mediante degradación de Edman automatizada. Se muestran los residuos identificados mediante esta técnica y se alinean los residuos con la traducción conceptual deducida del cDNA que codifica para el betaglicano soluble. El primer residuo de la proteína corresponde a la Gly²⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

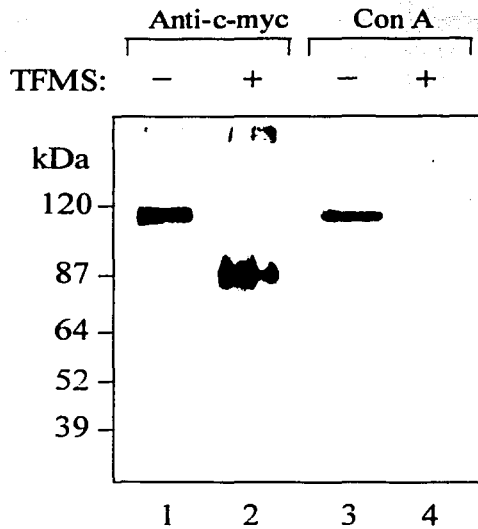


Figura 18. Glicosilación del betaglicano soluble recombinante. El betaglicano soluble recombinante fue desglucosilado químicamente con TMSF (+) y después purificado por IMAC. Esta muestra fue separada en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (carriles 2 y 4) y detectada por western blot utilizando concanavalina A (Con A) o anticuerpo anti-c-myc (Anti-c-myc). Como control se incluyó betaglicano soluble recombinante sin tratamiento con TMSF (carriles 1 y 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fue pasado a través de una columna de cromatografía BioSpe Sec-S3000 usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución. La proteína fue detectada por su absorbancia a 280 nm y se colectaron fracciones de los picos de mayor absorbancia. Las fracciones se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras para determinar en cual se encontraba el betaglicano. El betaglicano soluble baculoviral eluyó a los 7.4 min. La masa molecular del betaglicano soluble calculada utilizando estándares de masa molecular conocida fue de 220 kDa. Este betaglicano soluble migró como una proteína de 110 kDa bajo condiciones reductoras en geles de poliacrilamida (figura 19). Por lo tanto, el betaglicano soluble baculoviral es una molécula dimerica de 220 kDa constituida por dos monómeros de 110 kDa cada uno.

Debido a la naturaleza dimerica del betaglicano soluble, se decidió determinar la estabilidad de esta molécula a diferentes agentes desnaturizantes y reductores. Para ello, el betaglicano soluble se sometió a tratamiento con diferentes agentes desnaturizantes o reductores como urea, HCl-guanidina, ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, dodecilsulfato de sodio (SDS), Tritón X-100 y Nonidet P40. Después del tratamiento, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida. Las bandas fueron detectadas mediante tinción con plata. El cálculo de la masa molecular fue hecho de acuerdo al método de Ferguson usando estándares de peso molecular conocido. Como se puede observar en la figura 20, la concentración de SDS y DTT requerida para disociar completamente el dímero a monómeros fue de 350 μ M y 10 mM respectivamente. A menor concentración sólo se pudo detectar la forma dimerica del betaglicano soluble. Experimentos similares mostraron que el tratamiento del dímero con 4 M de urea o 2 M de guanidina provocaron su disociación (figura 21). Además, la mezcla de agentes como la guanidina y el DTT disociaron al dímero a concentraciones menores que las utilizadas para cada reactivo por separado (figura 21). El tratamiento con tritón X-100 y Nonidet P-40 no logró disociar el dímero aún a la concentración de 1% (figura 22). Estos datos sugieren que a pesar del número impar de residuos de cisteína por monómero de betaglicano soluble (figura 9), el dímero de betaglicano soluble recombinante está unido por interacciones no-covalentes. Además, la presencia de puentes disulfuro intracadena parecen participar en la estabilidad del dímero, ya que el tratamiento con DTT provocó su disociación.

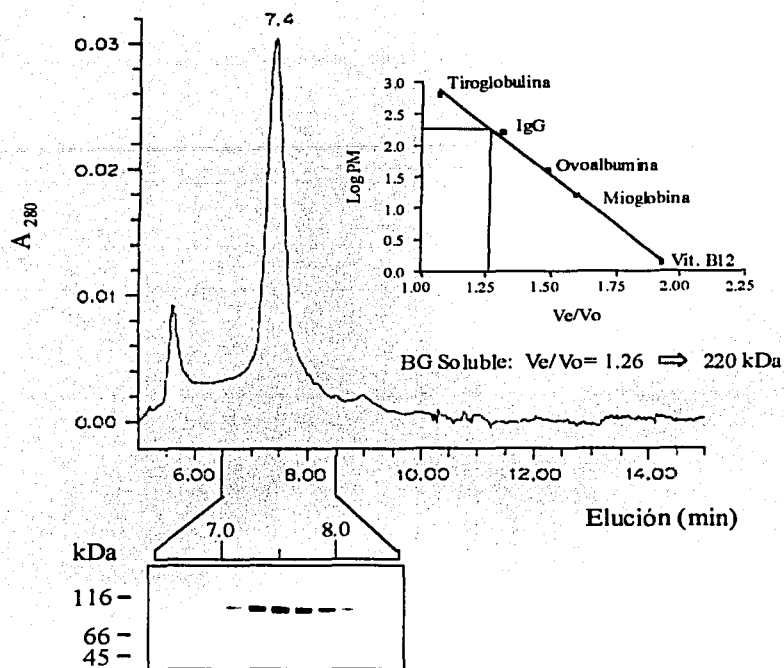


Figura 19. Determinación del estado oligomérico del betagalactosidasa soluble recombinante. El betagalactosidasa soluble recombinante (BG) fue sometido a filtración en gel como se describió anteriormente. Las alícuotas eluidas de la cromatografía que corresponden al pico mayor obtenido a los 7.4 min fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Los geles fueron teñidos con plata. La gráfica muestra la relación de volumen de elución de cada proteína (V_e) y volumen vacío de la columna (V_o) contra el logaritmo de la masa molecular del betagalactosidasa soluble y estándares de masa molecular utilizados para calibrar la columna.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

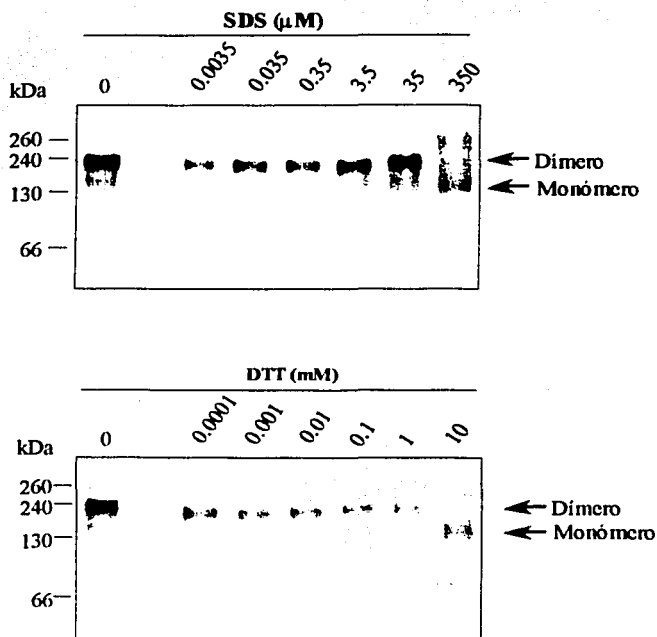


Figura 20. Efecto del SDS y DTT sobre el estado dímero del betaglicano soluble recombinante El betaglicano soluble baculoviral fue sometido a tratamiento con diferentes concentraciones de SDS o DTT y separado en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Se incluyó además betaglicano soluble baculoviral intacto. Los geles fueron teñidos con plata.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

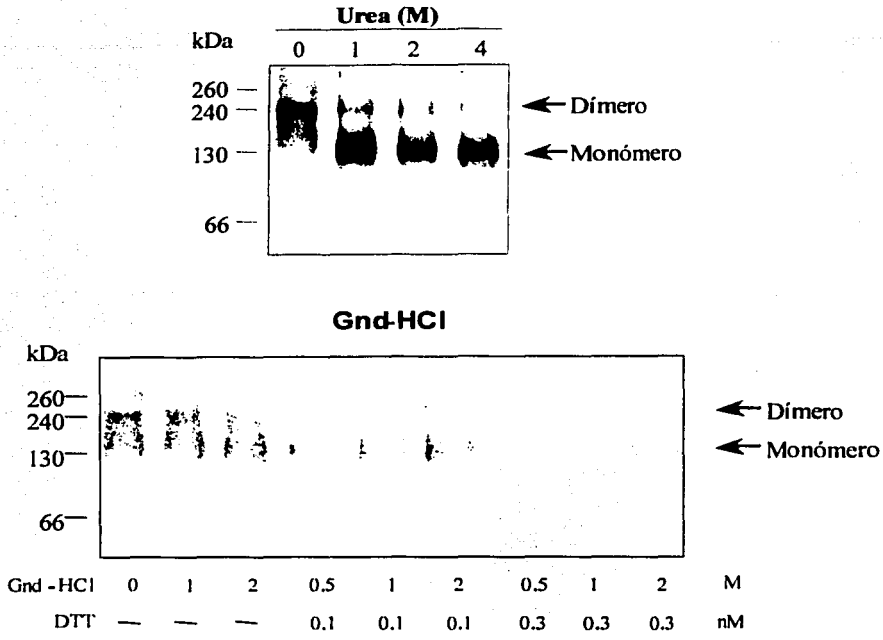


Figura 21. Efecto de la urea y la guanidina sobre el estado dímico del betaglicano soluble recombinante. El betaglicano soluble recombinante fue incubado con diferentes concentraciones de urea o guanidina y diferentes combinaciones de guanidina (Gnd-HCl) y DTT. Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Los geles fueron teñidos con plata. Se incluyó además betaglicano soluble baculoviral intacto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

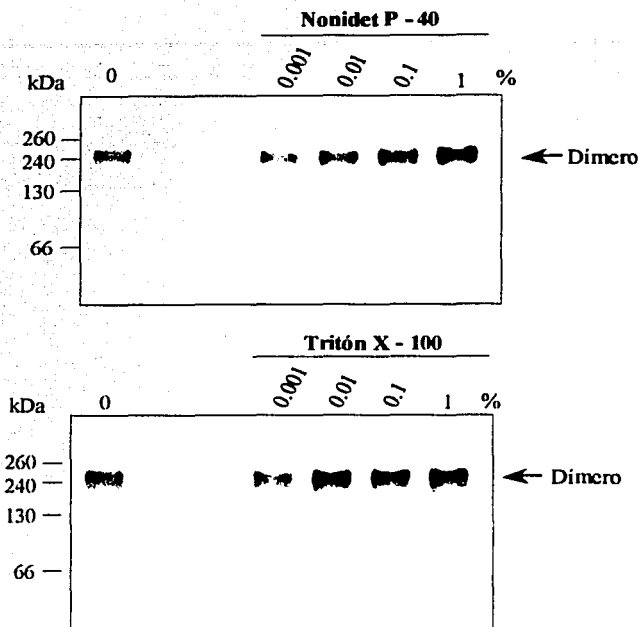


Figura 22. Efecto de detergentes sobre el estado dímico del betaglicano soluble recombinante. El betaglicano soluble baculoviral fue incubado con diferentes concentraciones de nonidet P40 o Tritón X-100. Las muestras fueron sometidas a electroforésis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y los geles fueron teñidos con plata. Se incluyó betaglicano soluble baculoviral intacto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.6. El betaglicano soluble recombinante une TGF- β con alta afinidad y selectividad de isoforma

El betaglicano soluble encontrado en fuentes naturales tiene alta afinidad para el TGF- β_1 (55), por lo tanto fue importante evaluar las afinidades del betaglicano soluble baculoviral para las tres isoformas mamíferas del TGF- β . Para ello, se realizaron ensayos de unión de TGF- β a saturación utilizando 10 ng de betaglicano soluble baculoviral y diferentes concentraciones (0.05-16 nM) de TGF- β_1 marcado con ^{125}I . El ^{125}I -TGF- β_1 unido al betaglicano se entrecruzó utilizando DSS. Las muestras se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo monoclonal 9E10 anti-c-myc y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. La unión del TGF- β_1 al betaglicano se detectó mediante escaneo en un PhosphorImager (Molecular Dynamics). En el gel de la figura 23 se muestran el corrimiento electroforético del betaglicano soluble, al cual se unieron diferentes cantidades de $^{125}\text{TGF-}\beta_1$. El $^{125}\text{TGF-}\beta_1$ unido al betaglicano soluble se cuantificó y los datos fueron analizados con un programa de computación. En la figura 23 se muestra la curva de saturación de unión del TGF- β_1 al betaglicano soluble y la gráfica de Scatchard, a partir de la cual se calculó que el betaglicano soluble viral une una molécula de $^{125}\text{I-TGF-}\beta_1$ por molécula de dímero, con una K_d de 3.5 nM. Este valor de K_d está en acuerdo con lo reportado para el betaglicano soluble producido por fibroblastos 3T3-L1 (55).

Con el fin de establecer la afinidad relativa del betaglicano soluble recombinante para las otras isoformas del TGF- β , se realizaron experimentos de competencia de unión del ligando. Para ello, se realizaron marcados por afinidad en solución con una cantidad constante de 100 pM de $^{125}\text{I-TGF-}\beta_1$ y cantidades crecientes del competidor no radiactivo TGF- β_1 , TGF- β_2 o TGF- β_3 (figura 24). La cantidad de $^{125}\text{I-TGF-}\beta$ entrecruzado al betaglicano soluble fue cuantificada a partir de geles desnaturalizantes de poliacrilamida utilizando un PhosphorImager y graficados como porcentaje del TGF- β radioactivo unido contra la concentración de competidor no radioactivo. La concentración de TGF- β_1 que bloqueó la mitad de los sitios de unión (EC_{50}) fue de aproximadamente 0.5 nM, resultado similar a lo observado para el betaglicano soluble natural (55). Sin embargo, las otras isoformas mostraron un grado mayor de competencia. En presencia de 0.5 nM de TGF- β_3 , el $^{125}\text{I-TGF-}\beta_1$ unido al betaglicano soluble fue de aproximadamente 75%, mientras que con

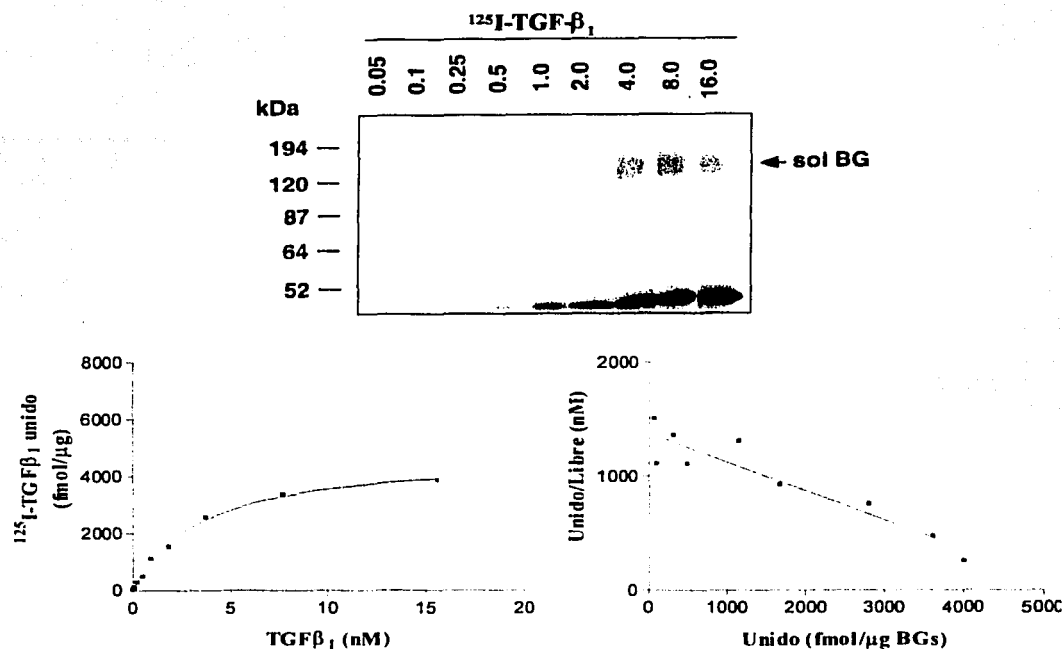


Figura 23. Unión del TGF- β_1 a saturación por el betaglicano soluble recombinante. El betaglicano soluble recombinante (BG sol) fue marcado por afinidad en solución con las concentraciones indicadas de $^{125}\text{I-TGF-}\beta_1$. Las mezclas de reacción fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-c-myc, sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras y la unión del TGF- β_1 al betaglicano se detectó mediante escaneo en un Phosphorimager (Molecular Dinamics). La localización del betaglicano marcado está indicada con una flecha. El nivel de pegado fue estimado por análisis de densitometría del betaglicano marcado utilizando el programa de computadora ImageQuant. Los datos fueron analizados mediante el programa de computación Prism. Se muestran la curva de saturación de unión del TGF- β_1 al betaglicano soluble baculoviral y la gráfica de Scatchard.

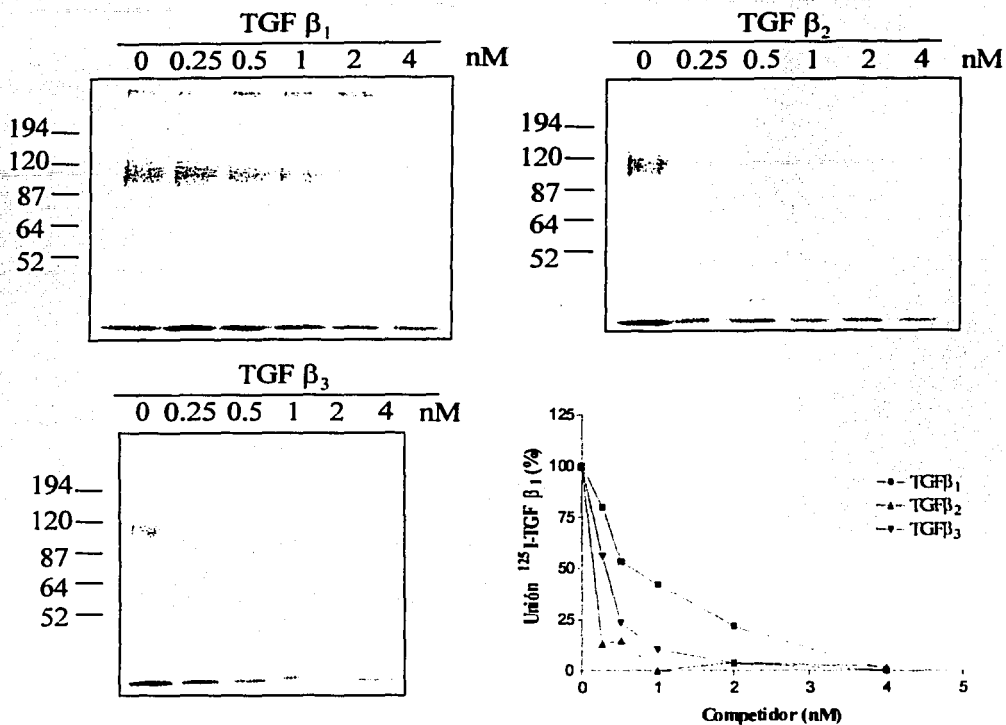


Figura 24. Ensayos de competencia de unión del TGF- β al betaglicano soluble recombinante. El betaglicano soluble recombinante fue sometido a marcado por afinidad en solución con 100 pM de $^{125}\text{TGF-}\beta_1$ y las concentraciones indicadas del TGF- β competidor. Las muestras fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-c-myc, sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizante y la unión del TGF- β al betaglicano se detectó mediante escaneo en un Phosphorimager (Molecular Dynamics). El porcentaje de competencia fue estimado por análisis de densitometría del betaglicano marcado utilizando el programa de computadora ImageQuant y graficado contra la concentración del TGF- β competidor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la misma concentración de TGF- β_2 fue de 10%. Estos resultados sugieren que la afinidad relativa del betaglicano soluble viral para las tres isoformas mamíferas del TGF- β fue, TGF- β_2 > TGF- β_3 > TGF- β_1 .

2. El betaglicano soluble es un potente inhibidor de la actividad del TGF- β *in vitro*

2.1. Actividad neutralizante del betaglicano soluble recombinante sobre el efecto del TGF- β en ensayos de luciferasa

Se ha demostrado previamente que el medio condicionado que contiene betaglicano soluble recombinante bloquea la unión del TGF- β a los receptores I y II e inhibe el efecto antiproliferativo del TGF- β en células Mv1Lu (49). Para determinar la potencia precisa del betaglicano soluble baculoviral, se ensayó su efecto en la expresión de luciferasa dependiente de TGF- β por células transfectadas con p3TP-lux, un plásmido reportero que responde a TGF- β (24). Para ello, fue necesario determinar la concentración mínima de TGF- β que induce la máxima expresión de luciferasa. Las células Mv1Lu transfectadas por el plásmido p3TPlux fueron incubadas con diferentes concentraciones de TGF- β . Posteriormente, estas células se lisaron y los extractos fueron ensayados para determinar su actividad de luciferasa. La concentración mínima de TGF- β que indujo la respuesta máxima de luciferasa fue 20 pM. Utilizando esta concentración de TGF- β , se indujo la síntesis de luciferas en células Mv1Lu transfectadas con el plásmido p3TPlux en presencia de diferentes concentraciones de betaglicano soluble baculoviral. La figura 25 muestra que el betaglicano soluble baculoviral inhibe la respuesta de luciferasa en células Mv1Lu tratadas con 20 pM de TGF- β . Esta inhibición depende de la concentración de betaglicano soluble adicionado. En varios experimentos, el valor estimado para la EC₅₀ del betaglicano soluble recombinante para el TGF- β_1 fue de 20 nM aproximadamente. Por otro lado, como se esperaba por su alta afinidad por TGF- β_2 , la EC₅₀ para esta isoforma fue un orden de magnitud menor (aproximadamente 2 nM) que para TGF- β_1 . En este ensayo, el betaglicano soluble recombinante a una concentración de aproximadamente 25 nM fue capaz de inhibir el 100% de respuesta a TGF- β_2 . Sin embargo, a una concentración 10 veces mayor

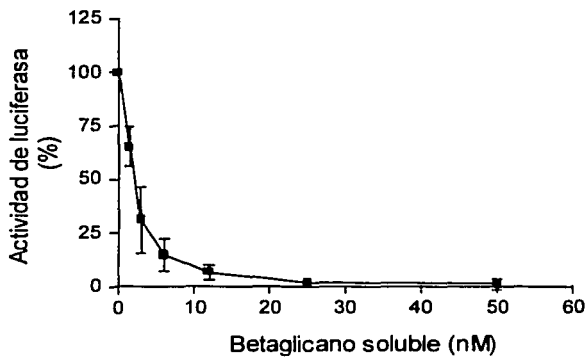
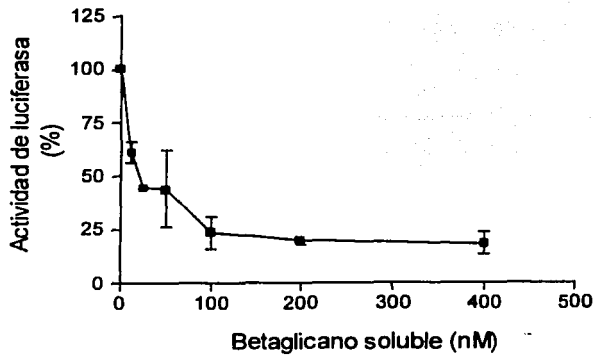


Figura 25. Neutralización de la actividad del plásmido reportero 3TPlux en respuesta al TGF-β por el betaglicano soluble recombinante. Las células Mv1Lu fueron transfectadas con el plásmido reportero 3TPlux e incubadas con 20 pM de TGF-β₁ o TGF-β₂ en presencia de las concentraciones indicadas de betaglicano soluble recombinante. La actividad de luciferasa fue graficada contra la concentración de betaglicano soluble. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado y los resultados fueron normalizados al 100 %, el cual es el valor obtenido en la células que no se trataron con betaglicano soluble. Los resultados son el promedio ± la desviación estandar.

(400nM), la máxima inhibición de la respuesta de TGF- β_1 fue aproximadamente 75 % (figura 25), lo cual enfatiza que el betaglicano soluble recombinante tiene mayor afinidad por la isoforma TGF- β_2 .

El efecto bloqueador del betaglicano soluble baculoviral sobre la actividad del TGF- β fue comparado con el efecto de un anticuerpo comercial neutralizante anti-TGF- β . En este caso, el anticuerpo inhibió la actividad del TGF- β con una EC₅₀ de 20 nM y 11 nM para TGF- β_1 y TGF- β_2 respectivamente (figura 26). Por lo tanto, el betaglicano soluble recombinante inhibe la actividad del TGF- β_1 en forma semejante al anticuerpo neutralizante anti-TGF- β y es 5 veces más potente que el anticuerpo en el caso de la isoforma TGF- β_2 . Además, es importante hacer notar que a diferencia del betaglicano soluble, el anticuerpo anti-TGF- β no fue capaz de inhibir al 100 % la actividad del TGF- β_2 .

De acuerdo a los resultados anteriores, el betaglicano soluble baculoviral fue capaz de bloquear el efecto del TGF- β y este efecto fue mayor sobre la isoforma TGF- β_2 . Para determinar si el betaglicano soluble baculoviral únicamente bloquea la actividad del TGF- β y no la de otros miembros de la familia del TGF- β , se analizó el efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la actividad de BMPs y activina. Para ello, las células HepG2 fueron transfectadas con plásmidos C-77 y p3TPlux que responden a BMP y activina respectivamente. Las células transfectadas fueron incubadas con diferentes concentraciones de BMP 2, BMP 7 o activina y 100 nM de betaglicano soluble baculoviral. El betaglicano soluble baculoviral aún a la concentración de 100 nM no fue capaz de bloquear la actividad de 2 nM de BMP 2, BMP 7 y 0.5 nM de activina (figura 27). Tampoco concentraciones menores de estos factores se pudieron bloquear con 100 nM de betaglicano soluble baculoviral (figura 28). Estos resultados indican que el betaglicano soluble baculoviral bloquea en forma específica la actividad del TGF- β . Este hallazgo hace al betaglicano soluble un candidato importante como agente anti-TGF- β , ya que su empleo *in vivo* bloqueará específicamente la actividad del TGF- β y no la actividad de otros factores de la familia del TGF- β que tienen una función importante en diversos procesos celulares como son BMPs y activina.

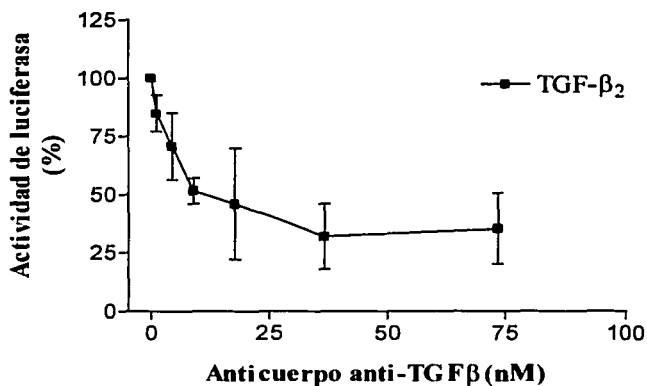
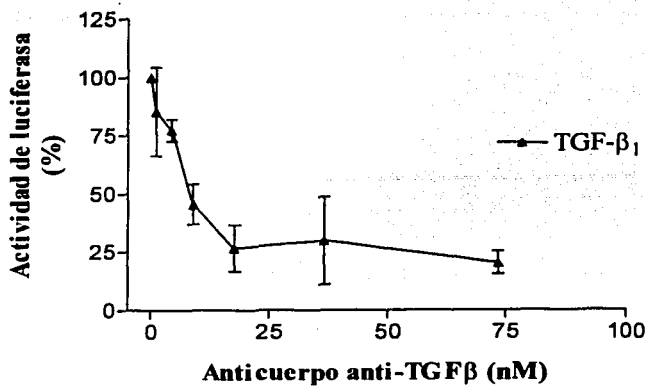


Figura 26. Neutralización de la actividad del plásmido reportero 3TPlux en respuesta al TGF-β por anticuerpo neutralizante anti-TGF-β. Las células Mv1Lu fueron transfectadas con el plásmido reportero 3TPlux e incubadas con 20 pM de TGF-β₁ (triángulos) o TGF-β₂ (cuadros) en presencia de las concentraciones indicadas de anticuerpo neutralizante anti-TGF-β. La actividad de luciferasa fue graficada contra la concentración de betaglicano soluble. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron normalizados al 100 %, el cual es el valor obtenido en la células que no se trataron con betaglicano soluble. Los resultados son el promedio ± la desviación estandar.

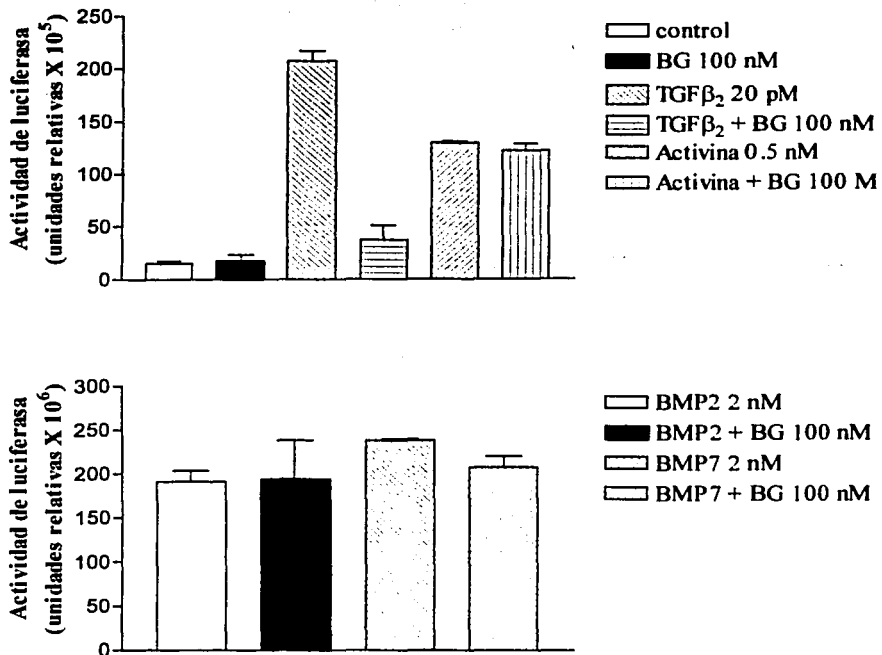


Figura 27. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre las actividades del BMP 2, BMP 7 y la activina. Las células HepG2 fueron transfectadas con el plásmido reportero C77 o 3TPlux (para BMPs y activina respectivamente). La células fueron incubadas con 2 nM de BMP2 o BMP7 o 0.5 nM de activina, en presencia o ausencia de 100 nM de betaglicano soluble recombinante (BG). Los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado y los resultados fueron graficados como el promedio \pm la desviación estandar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

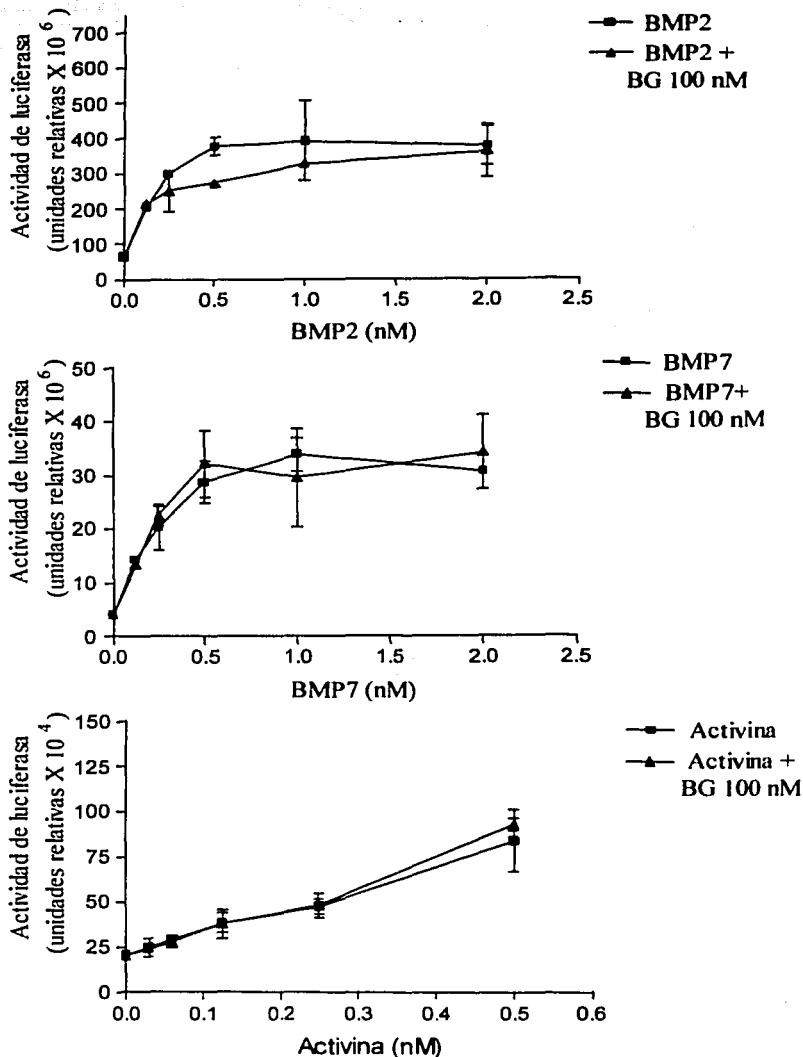
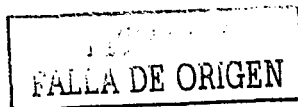


Figura 28. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la actividad de diferentes concentraciones del BMP 2, BMP 7 y la activina. Las células HepG2 fueron transfectadas con el plásmido reportero C77 o 3TPlux (para BMPs y activina respectivamente) e incubadas con diferentes concentraciones de BMP 2, BMP 7 y activina, en presencia o ausencia de 100 nM de betaglicano soluble recombinante (BG). La actividad de luciferasa fue graficada contra la concentración de BMPs o activina utilizada. Los ensayos fueron realizados por duplicado y los resultados fueron graficados como el promedio \pm la desviación estandar.



2.2. Actividad neutralizante del betaglicano soluble recombinante sobre la actividad inhibidora de la proliferación celular por TGF- β

Además del efecto del betaglicano soluble baculoviral sobre la actividad del TGF- β en ensayos transcripcionales, se analizó su capacidad de bloquear una función fisiológica importante del TGF- β que es la inhibición de la proliferación. En este ensayo, las células FBHE que son sensibles a la acción del TGF- β , fueron incubadas con diferentes concentraciones de TGF- β y se midió su proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada en su DNA. En este ensayo se observó que la concentración de TGF- β requerida para inducir una buena respuesta de inhibición de la proliferación fue 40 pM. Posteriormente, se analizó el efecto del betaglicano soluble baculoviral en estas células incubándolas con 40 pM de TGF- β y diferentes concentraciones de betaglicano. En este caso, el betaglicano soluble baculoviral fue capaz de bloquear el efecto inhibitor de la proliferación del TGF- β en células FBHE. En estos experimentos, se logró un bloqueo total del efecto inhibitor de la proliferación por TGF- β_2 , con tan solo 6 nM de betaglicano soluble recombinante. Sin embargo, en el caso del TGF- β_1 aún a la concentración de 90 nM de betaglicano soluble, no se logró bloquear completamente su efecto (figura 29). En el caso del efecto del betaglicano soluble sobre la actividad del TGF- β_1 , el análisis estadístico de los datos mostró que hay una diferencia significativa entre el efecto en la proliferación de las células FBHE incubadas con 40 pM del TGF- β_1 y las células control que se incubaron únicamente con medio de cultivo. Sin embargo, el betaglicano soluble no tuvo un efecto significativo en la proliferación con respecto al efecto del TGF- β_1 . En el caso del efecto sobre la actividad del TGF- β_2 , el análisis estadístico mostró que hay nuevamente un efecto significativo en la proliferación celular entre las células incubadas con TGF- β_2 o únicamente con medio. Además el betaglicano soluble mostró un efecto significativo sobre la proliferación de las células aún a la concentración de 5.7 nM.

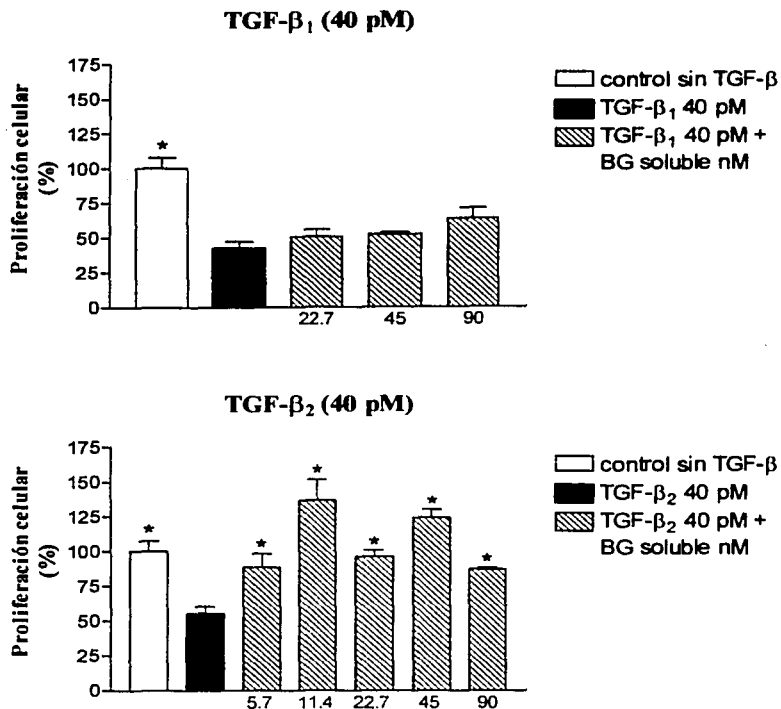


Figura 29. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la inhibición de la proliferación de células FBHE inducida por TGF- β . Las células FBHE se incubaron durante 48 horas con 40 pM de TGF- β_1 o TGF- β_2 , en presencia de diferentes concentraciones de betaglicano soluble recombinante (BG soluble). Las células se pulsaron con 0.5 μ Ci de 3H-timidina 18 horas antes de ser cosechadas y se midió la incorporación de timidina en las muestras utilizando un contador de centelleo. Los ensayos fueron realizados por duplicado y los resultados fueron graficados como el promedio de la proliferación celular % \pm la desviación estandar. Se incluye el porcentaje de la proliferación celular de células incubadas únicamente con medio (control sin TGF- β) o con 40 pM de TGF- β . La diferencia entre los grupos fue analizada por la prueba estadística t de Student. El asterisco (*) denota diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células incubadas con TGF- β y las células incubadas con medio únicamente o TGF- β más BG soluble.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la expresión de colágena I en células MMC cultivadas en alta concentración de glucosa

La capacidad del betaglicano soluble recombinante para bloquear la actividad del TGF- β también se observó inhibiendo la respuesta que las células mesangiales murinas (MMC) tiene cuando se cultivan en alta concentración de glucosa. La línea celular MMC generada a partir de células mesangiales de ratón conserva muchas de las propiedades de las células progenitoras, en particular la de incrementar la síntesis de matriz extracelular cuando son cultivadas en alta glucosa. Este efecto es mediado por TGF- β y simula la respuesta glomerular a la hiperglicemia del diabético (102).

Para el ensayo, las células MMC se incubaron en medio DMEM con baja concentración de glucosa 1 g/l (GN) y posteriormente en medio DMEM con baja (GN) o alta concentración de glucosa (GA) (1 g/l o 4.5 g/l respectivamente). Las células se incubaron además en ausencia o presencia de 100 nM de betaglicano soluble recombinante. Se extrajo el RNA de las células y se analizó por la técnica de northern blot hibridando las membranas con la sonda para una de las cadenas de la colágena I (α I) y la sonda para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La señal fue cuantificada mediante escaneo en un phosphorimager. Los datos de la densitometría mostraron que en las células cultivadas en alta concentración de glucosa la cantidad de mRNA para la cadena α I de la colágena I se incrementó en 2.2 veces (figura 30, carril 3) con respecto al mRNA de las células cultivadas en baja concentración de glucosa (figura 30, carril 1). Este incremento es neutralizado cuando las células se cultivan en presencia de 100 nM de betaglicano soluble recombinante (figura 30, carril 4).

3. El betaglicano soluble es un potente inhibidor de la actividad del TGF- β *in vivo*

3.1. El betaglicano soluble recombinante previene el daño histológico en riñón de ratas con glomerulonefritis experimental aguda inducida por suero anti-timocito (ATS)

Uno de los modelos de nefropatía experimental mejor caracterizados en los que se ha demostrado que el TGF- β tiene un papel preponderante como mediador fisiopatológico es la glomerulonefritis aguda inducida por suero anti-timocito. Una de las características de este modelo es la hipertrofia glomerular, debida a un incremento de la proliferación de las

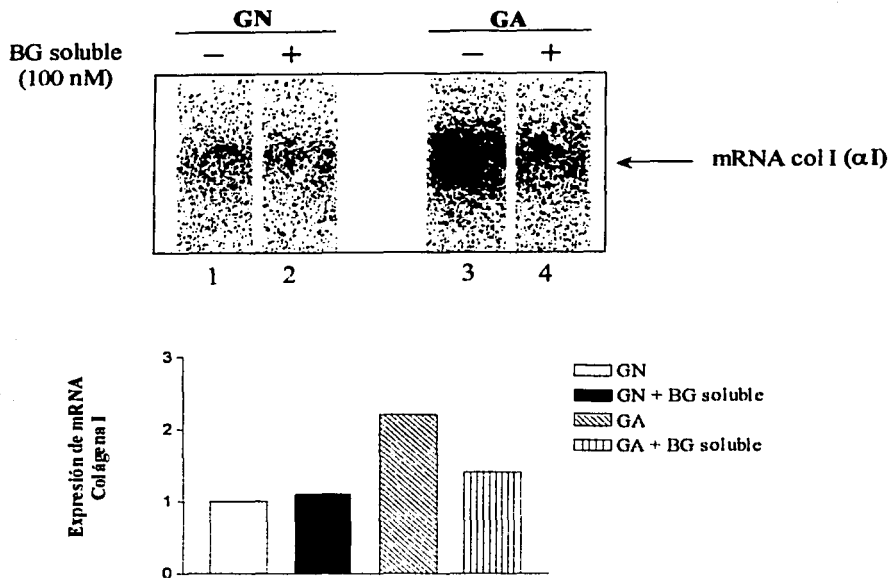


Figura 30. Efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la expresión de la colágena I en células MMC cultivada en alta concentración de glucosa. Las células MMC se incubaron en medio DMEM con baja (GN) (carriles 1 y 2) o alta concentración de glucosa (GA) (carriles 3 y 4), en ausencia (carriles 1 y 3) o presencia de 100 nM de betaglicano soluble recombinante (BG soluble) (carriles 2 y 3). El RNA de estas células se extrajo y se analizó mediante la técnica de northern blot hibridando las membranas con la sonda para la cadena $\alpha 1$ de la colágena I. La cuantificación de la señal del northern blot fue medida mediante escaneo en un Phosphorimager. La densitometría cuantitativa se llevó a cabo mediante el programa de computadora ImageQuant. Los datos fueron normalizados utilizando la expresión de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en las muestras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

células mesangiales y a una expansión de la matriz mesangial mediados por TGF- β (113, 114). Con el propósito de demostrar que la actividad anti-TGF- β del betaglicano soluble recombinante puede tener efectos terapéuticos *in vivo*, se decidió administrar al betaglicano soluble a ratas con glomerulonefritis aguda inducida con anticuerpos anti-timocito.

Para ello, se indujo glomerulonefritis en 6 ratas inyectando por vía intravenosa 1 ml de suero anti-timocito (ATS), lo cual es suficiente para inducir un daño renal demostrable histopatológicamente 8 días después de la inyección. Las ratas inyectadas se dividieron en 2 grupos de 2 ratas cada uno y se trataron durante 6 días (iniciando un día después de la inoculación del ATS) con el vehículo solo (PBS) o con 500 μ g de betaglicano soluble baculoviral. Al octavo día del experimento, las ratas se sacrificaron y se evaluó el daño renal mediante estudio histológico utilizando la tinción de ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) que tiñe selectivamente las membranas glomerulares y tubulares y destaca la matriz mesangial. En el experimento se incluyó un tercer grupo de ratas como control, que no fueron tratadas con el suero anti-timocito ni con el betaglicano, únicamente con PBS.

Los cortes histológicos de los riñones de las ratas inoculadas con el suero anti-timocito y tratadas con PBS (ATS + PBS) teñidos con la tinción de PAS, mostraron un incremento en la acumulación de matriz mesangial que se muestra como un material amorfo color magenta, comparado con los glomérulos de las ratas control (PBS) (figura 31, panel A y B). Esto indica que el suero anti-timocito (ATS) fue capaz de inducir la glomerulonefritis en las ratas. Por otro lado, las ratas inoculadas con el ATS y tratadas con el betaglicano soluble baculoviral (ATS + BG sol) presentaron glomérulos con apariencia normal, con mínima acumulación de matriz mesangial comparada con los animales con glomerulonefritis (ATS + PBS) (figura 31, panel A y C). Estos resultados indican que la administración de betaglicano soluble baculoviral evitó casi completamente el daño histopatológico causado por el suero anti-timocito (ATS) en las ratas.

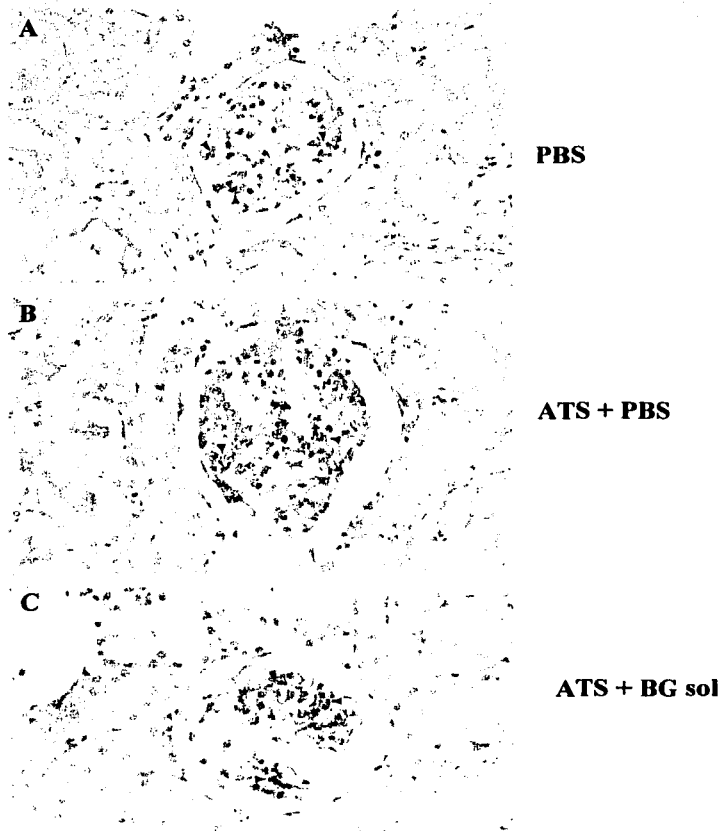


Figura 31. Análisis histológico de glomerulos de ratas con glomerulonefritis tratadas con el betaglicano soluble recombinante. Se inyectaron ratas en forma intravenosa con una dosis única de suero anti-timocito (ATS). Las ratas fueron tratadas con el vehículo solo (PBS) (panel B) o con 500 µg/dosis de betaglicano soluble recombinante (BG sol) (panel C). Se incluyó un grupo control que solo fue inoculado con PBS (panel A). Después del tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones. Se muestra el análisis histológico de los glomerulos teñidos por tinción de PAS. La matriz extracelular se observa como un material amorfo de color magenta en los glomerulos (▲)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2. Dosis mínima de betaglicano soluble recombinante requerida para prevenir la acumulación de proteínas de matriz extracelular causada por el suero anti-timocito

Una vez demostrada la efectividad del betaglicano soluble baculoviral en la prevención de la glomerulonefritis en ratas, se procedió a determinar la concentración mínima de betaglicano soluble baculoviral requerida para prevenir la acumulación de proteínas de MEC como la fibronectina, la colágena I y la colágena IV. Para ello, se inyectaron por vía intravenosa 12 ratas con 1 ml de ATS. Las ratas inyectadas se dividieron en 4 grupos de 3 ratas cada uno y se trataron durante 6 días (iniciando un día después de la inoculación del ATS) con PBS o con diferentes concentraciones de betaglicano soluble baculoviral (125, 250 y 500 µg por dosis). Como control se incluyó un grupo de 3 ratas que no fueron tratadas ni con el suero anti-timocito ni con el betaglicano, únicamente con inocularon con PBS. Al octavo día, las ratas fueron sacrificadas y sus riñones se analizaron mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-fibronectina, colágena I y colágena IV.

El análisis inmunohistológico de los riñones de las ratas inoculadas con el ATS mostró un aumento en el depósito de proteínas de MEC como la fibronectina (FN), colágena I (Col I) y colágena IV (Col IV) (figura 32, panel D, E y F respectivamente) en comparación a lo observado en los animales control (PBS) (figura 32, panel A, B y C). Este depósito de proteínas de MEC se observa como un precipitado de color café en el glomérulo. El tratamiento de las ratas con 125 µg/ dosis de betaglicano soluble recombinante fue capaz de reducir la acumulación en el glomérulo de las proteínas de MEC mencionadas anteriormente (figura 32, panel G, H e I). El análisis morfométrico de los glomérulos teñidos con los diferentes anticuerpos mostró que el ATS aumentó en forma significativa el depósito de proteínas de MEC como la fibronectina (FN), colágena I (Col I) y colágena IV (Col IV) (figura 33). Este ATS aumentó en 2.1, 5.7 y 1.9 veces la cantidad de fibronectina, colágena I y colágena IV depositada en el glomérulo. El betaglicano soluble fue capaz de disminuir este depósito de proteínas de matriz utilizando una concentración de 125 µg por día. Este efecto fue mayor que el obtenido con la dosis de 250 µg por día (figura 33). La fibronectina y la colágena IV fueron disminuidas a valores comparables a los de animales control, mientras que la colágena I fue disminuida un 63 % y 33 % con 125 y 250 µg de betaglicano soluble respectivamente (figura 33).

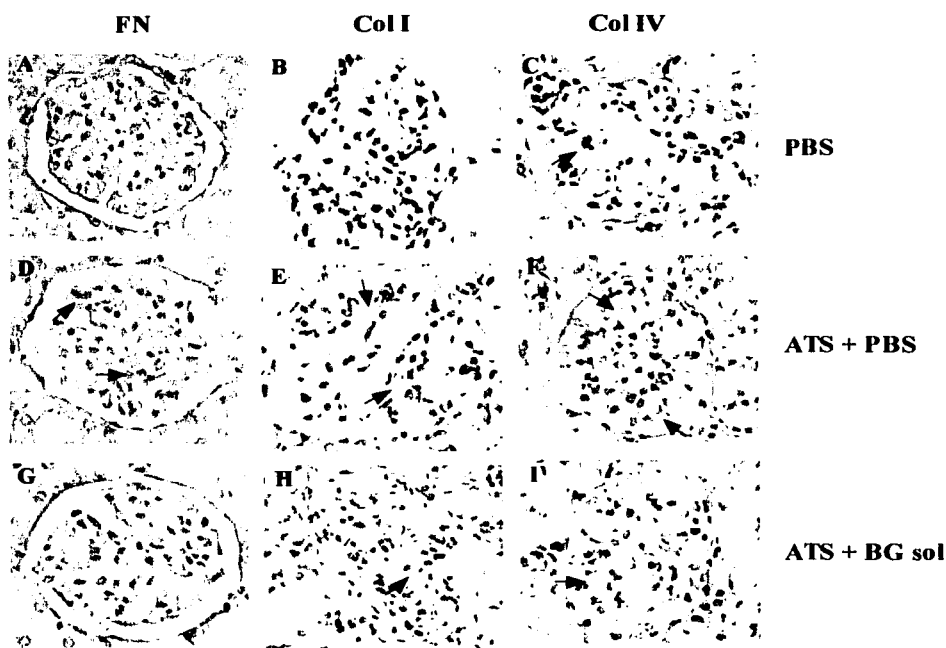


Figura 32. Depósito de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis tratadas con el betaglicano soluble recombinante. Se inyectaron ratas por vía intravenosa con una dosis única de suero anti-tímocito (ATS). Las ratas fueron tratadas con el vehículo solo (PBS) o con 125, 250 o 500 µg/dosis de betaglicano soluble recombinante (BG sol). Se incluyó un grupo control inoculado con PBS. Después del tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones. Los glomérulos de estos riñones fueron teñidos con anticuerpos anti-fibronectina (FN), anti-colágena I (Col-I) y anti-Col IV (Col-IV). La tinción se contratiñó con hematoxilina. Se muestran los glomérulos de las ratas de los grupos PBS (panel A; B Y C), ATS + PBS (panel D, E y F) y ATS + 125 µg/ día de BG sol. (panel G, H e I). Las zonas teñidas con los anticuerpos se observan como un precipitado de color café (↑) en el glomérulo y los núcleos de las células se tiñen de color azul.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BOLSINFERIA

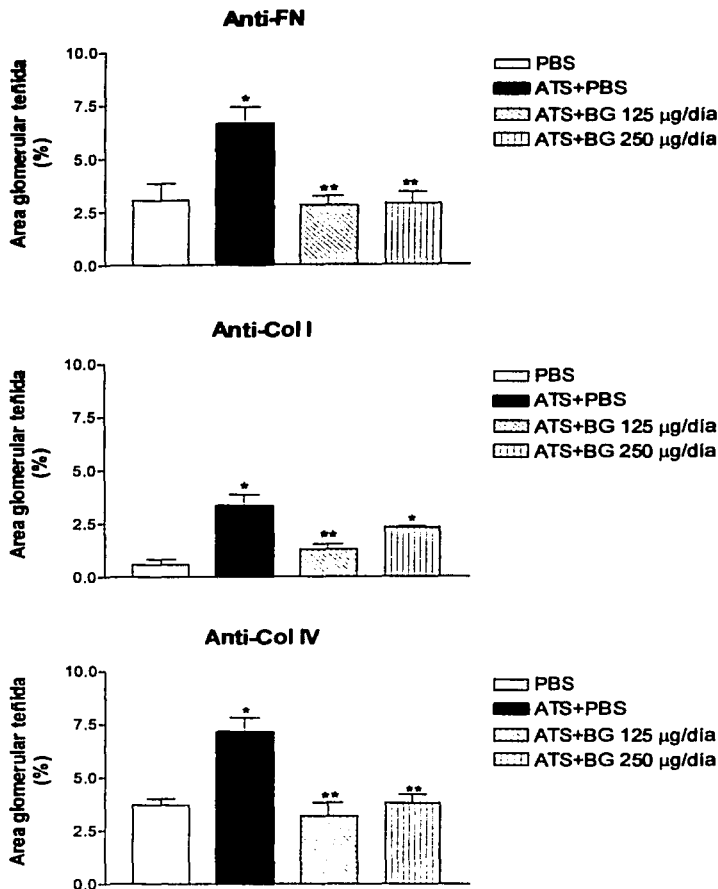


Figura 33. Cuantificación de las proteínas de matriz extracelular acumuladas en los glomérulos de ratas con glomerulonefritis aguda tratadas con diferentes concentraciones del betaglicano soluble recombinante. Se inyectaron ratas por vía intravenosa con una dosis única de suero anti-timocito (ATS). Las ratas fueron tratadas con el vehículo solo (PBS) o con 125, 250 o 500 µg/dosis de betaglicano soluble recombinante (BG). Se incluyó un grupo control que sólo fue inoculado con PBS. Después del tratamiento las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones. Los glomérulos de estos riñones fueron teñidos con anticuerpos anti-fibronectina (anti-FN), anti-colágena I (anti-Col I) y anti-colágena IV (anti-Col IV). La cuantificación se hizo mediante análisis morfométrico de 40 glomérulos por rata utilizando el programa de computadora LeikaQwin. Los datos se graficaron como el porcentaje del área del glomérulo teñida por el anticuerpo. La diferencia entre los grupos fue analizada por la prueba estadística t de Student. El asterisco (*) denota diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo control y los grupos con los diferentes tratamientos. El doble asterisco (**) denota diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo ATS y los grupos tratados con BG.

Estos resultados demuestran que el betaglicano soluble baculoviral fue capaz de prevenir el depósito de proteínas de MEC como fibronectina, colágena I y colágena IV en el riñón de ratas con glomerulonefritis inducida con suero anti-timocito (ATS).

3.3. La glomerulonefritis inducida por el anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7) también es prevenida por el tratamiento con el betaglicano soluble recombinante

Debido a que la cantidad de suero anti-timocito era limitada, se decidió probar la capacidad de un anticuerpo monoclonal OX-7 anti-timocito para inducir glomerulonefritis en ratas y analizar en este sistema el efecto del betaglicano soluble. El anticuerpo monoclonal OX-7 se purificó de medio condicionado de células de hibridoma productoras de anticuerpo anti-timocito. La purificación se llevó a cabo mediante precipitación del anticuerpo con sulfato de amonio. La preparación se dializó contra PBS y se determinó la concentración de proteínas.

Utilizando este anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7), se indujo la glomerulonefritis en 12 ratas. Las ratas se inyectaron por vía intravenosa con 300 μ g de anticuerpo monoclonal OX-7. Estas ratas se dividieron en 3 grupos de 4 animales cada uno y se trataron durante 6 días con el vehículo solo (PBS) o con 250 μ g de betaglicano soluble baculoviral un día después de la inoculación del anticuerpo OX-7. Al octavo día del experimento, las ratas se sacrificaron y se evaluó el daño renal mediante estudio histológico utilizando la tinción de PAS. El análisis histológico de los riñones de las ratas mostró que el anticuerpo OX-7 indujo un incremento en la matriz mesangial de los glomérulos que se observa como un material amorfo de color magenta en los glomérulos (figura 34, panel B) con respecto a los animales control (figura 34, panel A). En este caso también se observó un incremento aparente en el número de células presentes en el glomérulo (figura 34, panel B). Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal OX-7 fue capaz de inducir glomerulonefritis en las ratas demostrada por incremento en la matriz mesangial de glomérulos e hiper celularidad glomerular. Los glomérulos de las ratas tratadas con 250 μ g de betaglicano soluble recombinante presentaron una apariencia normal con disminución en la acumulación de matriz extracelular y en el número de células en el glomérulo (figura 34, panel C) con respecto a los animales con glomerulonefritis (figura 34, panel B).



PBS

OX-7 + PBS

OX-7 + BG sol

Figura 34. Acumulación de matriz mesangial en los glomérulos de ratas con glomerulonefritis inducida por el anticuerpo OX-7 y tratadas con el betaglicano soluble recombinante. Se inyectaron ratas en forma intravenosa con una dosis única de anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7). Las ratas fueron tratadas con el vehículo solo (PBS) (panel B) o con 250 µg/dosis de betaglicano soluble recombinante (BG sol) (panel C). Se incluyó un grupo control inoculado únicamente con PBS (panel A) Cada dosis se administró diariamente por vía intraperitoneal por 6 días, iniciando un día después de la inyección del anticuerpo anti-timocito. Al octavo día las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones. Se hizo el análisis histológico de los glomérulos utilizando tinción de ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). Las laminillas se contratiñeron con hematoxilina. La matriz mesangial se observa como un material amorfo de color magenta en el glomérulo y los núcleos de las células se tiñen de color azul. Las flechas indican zonas de hiper celularidad mesangial.

3.4. El betaglicano soluble disminuye la acumulación de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis causada por anticuerpo OX-7

Se analizó la capacidad del betaglicano soluble recombinante para disminuir la acumulación de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis causada por anticuerpo monoclonal anti-timocito OX-7. El análisis inmunohistológico de los riñones de las ratas mostró que el anticuerpo OX-7 incrementó el depósito de colágena I y IV en los glomérulos (figura 35, panel C y D) con respecto a los animales control inoculados únicamente con PBS (figura 35, panel A y B). Este depósito se observa como un precipitado de color café en el glomérulo. El tratamiento de las ratas con 250 µg/dosis de betaglicano soluble disminuyó el depósito de colágena I y colágena IV en los glomérulos (figura 35, panel E y F). Los glomérulos de las ratas tratadas con el betaglicano soluble muestran una apariencia semejante a los glomérulos de las ratas control.

El análisis morfométrico de los glomerulos teñidos con los anticuerpos anti-colágena I (Col I) y anti-colágena IV (Col IV) mostró un incremento significativo de 5 veces la cantidad de colágena IV (Col IV) y 9 veces la cantidad de colágena I (Col I) en los animales inoculados con el anticuerpo OX-7 con respecto a la expresión de estas proteínas en los animales control (figura 36). En los animales inoculados con el anticuerpo OX-7 y tratados con el betaglicano soluble recombinante se observó una disminución del 65 % y 55 % en la cantidad de Col IV y Col I respectivamente, con respecto a los animales inoculados con el anticuerpo OX-7 que no recibieron betaglicano soluble (figura 36). Esta disminución fue significativa con una $P < 0.05$.

3.5. El betaglicano soluble recombinante disminuye la expresión genética de la cinasa SGK causada por el anticuerpo OX-7

Además de estudiar el depósito de proteínas de la MEC en los glomérulos de las ratas, se analizó la presencia de mRNA para la SGK en los riñones de estos animales. La SGK es una cinasa que regula la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ del asa de Henle y del canal epitelial de sodio del túbulo colector. Esta cinasa se encuentra aumentada en pacientes con nefropatía diabética y en cultivos celulares expuestos a TGF- β o alta

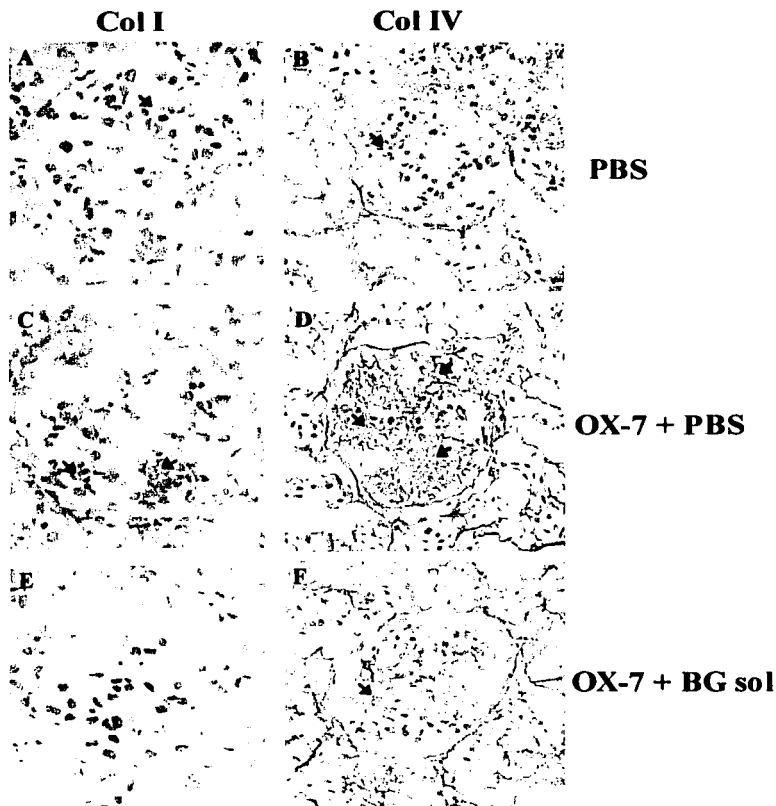


Figura 35. Acumulación de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis inducida por el anticuerpo OX-7 y tratadas con el betaglicano soluble recombinante. Se inyectaron ratas por vía intravenosa con una dosis única de anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7). Las ratas fueron tratadas con el vehículo solo (PBS) (panel C y D) o con 250 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ de betaglicano soluble recombinante (BG sol) (panel E y F). Se incluyó un grupo control inoculado únicamente con PBS (panel A y B). Cada dosis se administró diariamente por vía intraperitoneal, iniciando un día después de la inyección del anticuerpo anti-timocito. Al octavo día las ratas fueron sacrificadas y se hizo el análisis de los glomérulos mediante inmunotinción con los anticuerpos anti-colágena I (Col I) y anti-colágena IV (Col IV). Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina. Las zonas teñidas con los anticuerpos se observan como un precipitado de color café en el glomérulo están señaladas con una flecha y los núcleos de las células se tiñen de color azul.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

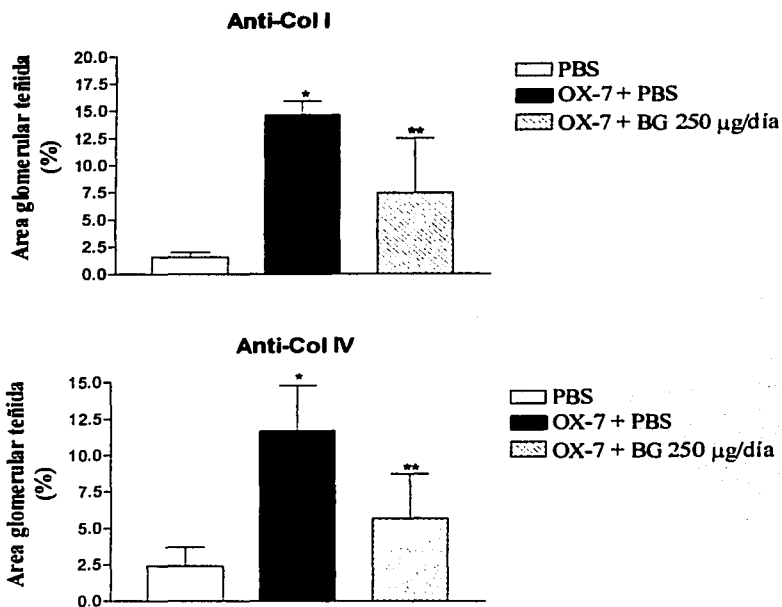


Figura 36. Expresión de proteínas de matriz extracelular en glomérulos de ratas con glomerulonefritis inducida por anticuerpo OX-7 y tratadas con el betaglicano soluble recombinante. Se inyectaron 8 ratas en forma intravenosa con una dosis única de anticuerpo monoclonal anti-timocito. Las ratas se dividieron en 2 grupos de 4 ratas cada uno y fueron tratadas con el vehículo solo (PBS) o con 250 µg/día (dosis) de betaglicano soluble recombinante (BG). Cada dosis se administró diariamente por vía intraperitoneal por 6 días, iniciando un día después de la inyección del anticuerpo anti-timocito. Al octavo día las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones. Se incluyó un grupo control que solo fue inoculado con PBS. Se hizo el análisis inmunohistoquímico de los glomérulos utilizando anticuerpos anti-Col I (anti-Col I) y Col IV (anti-Col IV). Se realizó el análisis morfométrico de 20 glomérulos por rata mediante el programa de computadora LeikaQwin. Los datos se graficaron como el porcentaje del área del glomérulo teñida por el anticuerpo. La diferencia entre los grupos fue analizada por la prueba estadística t de Student. El asterisco (*) denota diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo control y los grupos con diferentes tratamientos. El doble asterisco (**) denota diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo ATS y los grupos tratados con BG.

concentración de glucosa. Debido a la importancia que esta cinasa puede tener en el mantenimiento de la tasa de filtración glomerular y en las alteraciones funcionales de la nefropatía diabética, fue importante estudiar el efecto del betaglicano soluble baculoviral sobre la expresión de la cinasa SGK.

El análisis por northern blot de los riñones mostró un aumento en la cantidad del mRNA para SGK en los animales inoculados con el anticuerpo OX-7. Este incremento fue de 3 veces la cantidad del mRNA para SGK en los animales inoculados con el anticuerpo OX-7 con respecto a los animales control inoculados con PBS. Los animales inoculados con el anticuerpo y tratados con el betaglicano soluble recombinante mostraron menor cantidad de mRNA para SGK que los animales inoculados únicamente con el anticuerpo OX-7. Esta disminución fue del 72 % (figura 37).

Estos resultados demuestran por primera vez, que el betaglicano soluble recombinante, un agente anti-TGF- β es capaz de inhibir la síntesis del mRNA para la cinasa SGK.

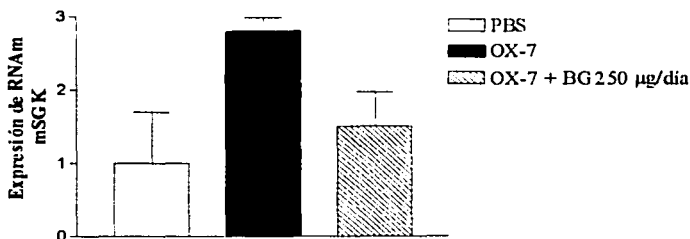
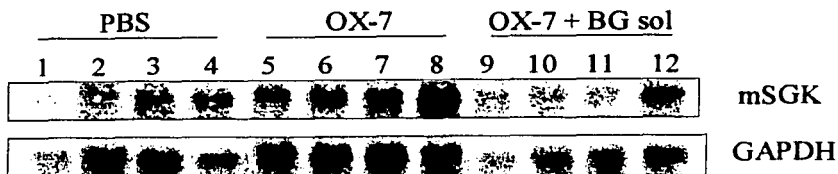


Figura 37. Expresión genética de la cinasa SGK en ratas con glomerulonefritis tratadas con el betaglicano soluble recombinante. Se inyectaron 8 ratas en forma intravenosa con una dosis única de anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7). Las ratas se dividieron en 2 grupos de 4 ratas cada uno y se trataron con el vehículo solo (PBS) o con 250 µg/día (dosis) de betaglicano soluble recombinante (BG). Cada dosis se administró diariamente por vía intraperitoneal por 6 días, iniciando un día después de la inyección del anticuerpo anti-timocito. Se incluyó un grupo control de 4 ratas que solo se inoculó con PBS. Al octavo día las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones. Los riñones se analizaron por northern blot con sondas para mSGK y GAPDH marcadas con (α^{32}) dCTP. Se muestra la señal para el RNA de cada rata (1 a 12). La hibridación con las sondas se detectó mediante escaneo en un Phosphorimager (Molecular Dynamics) y se analizó utilizando el programa de computadora ImageQuant. La gráfica representa la relación SGK/GAPDH. A esta relación en los animales inoculados con PBS se le asignó el valor de 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSION

No obstante que el TGF- β es necesario para la reparación tisular, su exceso ha sido identificado como el mediador de la fibrosis que se observa en un considerable número de enfermedades fibróticas. A este efecto nocivo se la ha denominado como "el lado oscuro" del TGF- β en la reparación tisular y tiene su origen en la producción excesiva de matriz extracelular (152). El TGF- β es una citocina productora de matriz extracelular por excelencia, ya que estimula la expresión de los genes cuyos productos protéicos constituyen la matriz extracelular como son las colágenas, fibronectina y proteoglicanos, y a la vez estimula la producción de proteínas inhibitoras de las proteasas que degradan los componentes de la matriz extracelular (1). Normalmente estos efectos son de gran utilidad en la reparación de las heridas ya sean cutáneas o de otros órganos. En el animal intacto se ha observado que estos efectos del TGF- β aparecen y desaparecen exactamente cuando se les requiere, actuando en concierto con otros factores autócrinos en la reparación de heridas. La pérdida de esta regulación, por mecanismos aún no bien esclarecidos, da lugar a un aumento exagerado de la matriz, ocasionando procesos fibróticos que acaban por dañar los tejidos en que ocurren (153). Dentro de las enfermedades fibróticas en las que el TGF- β juega un papel importante en la fisiopatología encontramos a la diabetes que lleva al daño renal, una complicación con serias consecuencias médicas y socioeconómicas (154). La diabetes es uno de los muchos ejemplos en el cual agentes capaces de neutralizar al TGF- β pueden ser de gran valor farmacológico (72, 96). En este trabajo, se demostró que la forma soluble del betaglicano producido en células de insecto usando el sistema de expresión en baculovirus, tiene las propiedades bioquímicas y funcionales necesarias para llegar a ser un potente agente anti-TGF- β .

El betaglicano soluble es expresado eficientemente en células de insecto H5

El betaglicano soluble recombinante es expresado como una glicoproteína secretora en la cual el péptido señal es cortado con la especificidad esperada para mamíferos. Este resultado apoya el hecho de que las proteínas sintetizadas utilizando vectores baculovirales son procesadas en la célula de insecto como se espera para la proteína en la célula original. Por ejemplo, muchos péptidos señales son reconocidos y procesados en el retículo

endoplásmico y la proteína resultante es dirigida a la membrana o secretada apropiadamente. Se ha reportado por análisis de la secuencia amino-terminal, el correcto procesamiento del péptido señal para el interferón- α humano, interleucina-2 humana y otras proteínas en las células de insecto (143).

En contraste al betaglicano soluble encontrado en fuentes naturales (55), el betaglicano soluble recombinante producido en células de insecto no tiene cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) y presenta menor grado de glicosilación. Esto ocurre a pesar de que el betaglicano soluble recombinante tiene los residuos de serina que son modificados con cadenas de GAGs en los receptores silvestres de rata y ratón (49). Este cDNA cuando se expresa en células de epitelio renal de mono (COS-1), produce un receptor soluble que contiene cadenas de GAGs. Además, el betaglicano soluble recombinante tiene una masa molecular ligeramente menor que el betaglicano sin cadenas de GAGs expresado en células de mamífero. La masa molecular de la proteína viral indica la incapacidad de las células de insecto de adicionar cadenas de GAG a la proteína y también una disminución en la capacidad de adicionar otro tipo de oligosacáridos. Estos resultados muestran que hay diferencias en la glicosilación entre las células de insecto y las células de mamífero. Anteriormente ha sido reportado que la comparación de glicoproteínas derivadas de células de mamífero y de insecto, revela varias diferencias en la naturaleza de los oligosacáridos adicionados. Las células de mamífero modifican los oligosacáridos en eventos de glicosilación terminal. Estos eventos usualmente resultan en la adición de fucosa, glucosamino-galactosa y residuos de ácido siálico para formar un oligosacárido complejo y ramificado. Las células de insecto al parecer no tiene o tienen muy pocos niveles de transferasas de fucosa, galactosa y ácido siálico, por lo que no tiene la capacidad de procesar oligosacáridos. Una consecuencia de estas diferencias en glicosilación es que las proteínas recombinantes obtenidas en células de insecto tienen una aparente masa molecular menor que su contraparte en células de mamífero (143).

Como se mencionará posteriormente, a pesar de las diferencias en glicosilación entre el betaglicano soluble producido en células de mamífero y células de insecto, el betaglicano soluble producido en células de insecto tiene características funcionales semejantes a las observadas en el betaglicano soluble obtenido de fuentes naturales. El hecho de que el betaglicano soluble recombinante tenga menor grado de glicosilación,

puede ser ventajoso para su distribución sistémica cuando se administre en el animal intacto.

El betaglicano soluble recombinante es una molécula dimérica estabilizada por interacciones no covalentes

Por otro lado, se ha reportado que el betaglicano membranal forma homo-oligómeros. Estos homo-oligómeros existen en la superficie celular en ausencia o presencia del TGF- β_1 o TGF- β_2 . El hecho de que estos complejos se hayan detectado por ensayos de inmunofluorescencia y no por ensayos de inmunoprecipitación hace suponer que estos homo-oligómeros no son estables en presencia de detergentes (155). Además, se sabe que los receptores I y II para el TGF- β son moléculas diméricas. En relación a esto, en este trabajo se muestra que el betaglicano soluble recombinante nativo se asocia como un dímero formado por monómeros de 110 kDa. El tratamiento con agentes no reductores disocia al dímero de betaglicano soluble, indicando que esta asociación ocurre a través de interacciones no-covalentes. Esto es inesperado debido al número impar de cisteínas en cada monómero del betaglicano soluble que sugieren que la dimerización podría requerir un enlace disulfuro intercadena entre los monómeros como ocurre en el caso de la endogлина (68).

Las afinidades del betaglicano soluble recombinante para el TGF- β son semejantes al receptor silvestre

El betaglicano soluble recombinante une TGF- β_1 con alta afinidad (K_d aproximada de 3.5 nM) que es comparable a la del betaglicano soluble obtenido de fuentes naturales (55). Este betaglicano también une a las isoformas TGF- β_2 y TGF- β_3 con mayor afinidad relativa, mostrando al menos 5 veces mayor afinidad para TGF- β_2 que para TGF- β_1 . La mayor afinidad del betaglicano soluble por el TGF- β_2 es igual a la del receptor silvestre membranal (1).

Los experimentos de unión a saturación con ^{125}I -TGF- β indican una estequiometría de una molécula de TGF- β por molécula dimérica de betaglicano soluble. Dada la naturaleza dimérica del TGF- β se podría pensar que una molécula de TGF- β se une a un dímero de betaglicano. sin embargo este hallazgo es difícil de explicar, ya que

experimentos previos de mutagénesis muestran que hay dos sitios de unión al ligando en el ectodominio del betaglicano (49, 56, 156).

El betaglicano soluble recombinante tiene la capacidad de bloquear el efecto del TGF- β *in vitro*

En este trabajo, se analizó *in vitro* la capacidad del betaglicano soluble recombinante purificado a homogeneidad para bloquear la actividad del TGF- β . Se encontró que el betaglicano soluble recombinante es capaz de bloquear al TGF- β_1 y al TGF- β_2 en ensayos utilizando el plásmido reportero p3TPLux. Estos estudios muestran la misma especificidad de isoforma que la observada en los ensayos de competencia de unión del ligando, esto es, el betaglicano tiene mayor efecto bloqueador sobre la isoforma TGF- β_2 que la isoforma TGF- β_1 . Este efecto bloqueador es al menos un orden de magnitud más efectivo contra TGF- β_2 .

El betaglicano soluble baculoviral también mostró mayor efecto sobre la isoforma TGF- β_2 en ensayos de inhibición de la proliferación celular usando células endoteliales de corazón bovino fetal. En este caso, se requieren concentraciones de betaglicano soluble alrededor de 5 nM para bloquear la actividad del TGF- β_2 . El efecto del betaglicano soluble es mayor al que se observa con otros inhibidores del TGF- β como los péptidos de la α_2 -macroglobulina, de los cuales se requiere una concentración de 200 nM para inhibir el efecto del TGF- β_2 sobre el crecimiento de estas células (134).

Se ha reportado que los anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β son capaces de disminuir la producción de MEC en el glomérulo y atenuar dramáticamente las manifestaciones histológicas de la glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-timocito. Además, los anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β disminuyen la producción de TGF- β_1 , colágena IV ($\alpha 1$) y fibronectina en el riñón de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (130). Ya que la capacidad del betaglicano soluble recombinante para bloquear la actividad del TGF- β en ensayos de luciferasa es comparable o mayor (en el caso del TGF- β_2) que la capacidad del anticuerpo neutralizante anti-TGF- β , podríamos pensar que el betaglicano soluble recombinante puede tener un potente efecto bloqueador del TGF- β en padecimientos fibróticos como los mencionados anteriormente.

El hecho de que el betaglicano soluble baculoviral tenga una actividad neutralizante anti-TGF- β está en contraste con la actividad potenciadora observada por otros investigadores, al utilizar el betaglicano producido en bacterias (156). El betaglicano producido en bacterias es expresado como una proteína de fusión. Este betaglicano es capaz de inhibir la unión del TGF- β a las células Mv1Lu, sin embargo tiene la capacidad de aumentar la actividad del TGF- β medida por inhibición de la proliferación de estas células. La diferencia en función encontrada entre el betaglicano producido en células de insecto y el producido en bacterias puede deberse a que el betaglicano producido en bacterias requiere de un proceso de desnaturalización y renaturalización para su purificación. Este procedimiento puede conferir un plegamiento diferente con respecto al betaglicano baculoviral. Sin embargo, se requieren más estudios para establecer y comparar las estructuras tridimensionales del betaglicano soluble bacteriano y el betaglicano baculoviral. Estos estudios pueden proporcionar información útil en porque el mismo polipéptido puede comportarse como un agente neutralizante o promotor del efecto del TGF- β .

El betaglicano soluble baculoviral bloquea en forma específica al TGF- β , ya que en células transfectadas con plásmidos que contiene elementos de respuesta a BMPs y activina, el betaglicano soluble no fue capaz de bloquear la actividad de BMP 2, BMP 7 y activina. Este hecho es de gran importancia ya que apoya el uso del betaglicano soluble baculoviral como un agente anti-TGF- β específico, útil en el tratamiento de padecimientos en los que el TGF- β es un mediador fisiopatológico importante. Este hecho nos indica además, que es poco probable que el betaglicano soluble baculoviral pueda bloquear los efectos de los BMPs y la activina *in vivo*.

La afinidad del betaglicano soluble recombinante para diversas isoformas del TGF- β es similar o mayor que la de otros agentes neutralizantes del TGF- β *in vivo* (113, 120, 130, 157). El betaglicano soluble recombinante une TGF- β_1 con una K_d aproximada de 3.5 nM. Las K_{ds} de una forma recombinante de un LAP-TGF- β_1 y de un T β RII soluble recombinante para el TGF- β_1 fueron 8 nM y 120 nM respectivamente (158). Las afinidades estimadas del proteoglicano intersticial que une TGF- β_1 , biglicano, decorina y fibromodulina están en el intervalo de 1-20 nM (17, 159). La K_d calculada de α_2 -macroglobulina para el TGF- β es de 300 nM (134).

Estos valores predicen que el betaglicano soluble recombinante puede tener un potente efecto neutralizante del TGF- β *in vivo*. Además, ya que el betaglicano soluble se encuentra en forma natural, se puede esperar que la administración sistémica no induzca una respuesta inmune adversa en modelos animales de experimentación.

El betaglicano soluble recombinante tiene un efecto protector del daño renal en un modelo de glomerulonefritis experimental

En los últimos años ha habido una búsqueda intensa de moléculas inhibitoras del TGF- β que permitan disminuir la síntesis exagerada de matriz extracelular dependiente de TGF- β que es común en varias enfermedades renales, hepáticas y pulmonares. En el caso de la fibrosis renal, se han reportado varios métodos y proteínas blanco para prevenir este daño a través de la inhibición de la vía de señalamiento del TGF- β . Estos métodos comprenden: a) la inhibición de la síntesis del TGF- β utilizando oligonucleótidos antisentido (137), b) la inhibición del TGF- β por anticuerpos neutralizantes (113) o por inhibidores naturales del TGF- β como la decorina (120), y receptores tipo II quiméricos, los cuales bloquean la unión del TGF- β a los receptores membranales (125) y c) el bloqueo de los receptores de señalamiento utilizando anticuerpos anti-receptor II de TGF- β (131).

En este trabajo se ha demostrado mediante varios ensayos *in vitro*, que el betaglicano soluble baculoviral es capaz de bloquear el efecto del TGF- β . Estos ensayos comprenden expresión del gen reportero del plásmido p3Tplux en la línea celular Mv1Lu (epitelio pulmonar de bisón), ensayos de inhibición de la proliferación en la línea celular FBHE (epitelio de corazón fetal bovino) y expresión de proteínas de matriz extracelular en células MMC (células mesangiales de ratón) cultivadas en alta concentración de glucosa. Los resultados obtenidos en estos experimentos permiten predecir que el betaglicano soluble recombinante puede tener un efecto terapéutico *in vivo*, al menos comparable al de los anticuerpos neutralizantes del TGF- β que han sido usados en el tratamiento de nefropatías experimentales, con la ventaja de que se trata de un inhibidor natural (55) que posiblemente no induzca una respuesta inmune adversa si se utilizan concentraciones bajas del betaglicano soluble. Para comprobar esto, se analizó el efecto del betaglicano soluble recombinante sobre la actividad del TGF- β en un modelo de glomerulonefritis experimental

en ratas inducida por anticuerpos anti-timocito. En la glomerulonefritis inducida por suero anti-timocito (ATS) o por anticuerpo monoclonal anti-timocito (OX-7), el tratamiento con betaglicano soluble recombinante redujo la acumulación de proteínas de matriz extracelular como la fibronectina, colágena I y colágena IV en el glomérulo.

Además se ha demostrado por primera vez que un agente anti-TGF- β como lo es el betaglicano soluble baculoviral es capaz de disminuir la síntesis de la cinasa SGK en el riñón de ratas inoculadas con anticuerpo anti-timocito (OX-7). La cinasa SGK es capaz de regular la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a furosemida del asa ascendente de Henle y del canal epitelial de sodio del túbulo colector. Por lo tanto, el tratamiento con betaglicano soluble baculoviral posiblemente pueda regular la hiperfiltración glomerular y la hipertensión sistémica que se observan en las nefropatías.

El efecto bloqueador del TGF- β por el betaglicano soluble baculoviral es comparable al obtenido con los anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β empleados hasta el momento (113, 157). El efecto del betaglicano soluble en el tratamiento de la glomerulonefritis es mayor al que se obtiene con el anticuerpo anti-receptor II (131), ya que la cantidad de anticuerpo anti-receptor II que se requiere para disminuir el depósito de proteínas de matriz extracelular en el glomérulo es de 9 mg/dosis durante 4 días, comparada con 250 μg de betaglicano soluble que se administran a la rata durante 6 días.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el betaglicano soluble recombinante producido en células de insecto fue capaz de bloquear la actividad del TGF- β en ensayos *in vitro* y previno la acumulación de proteínas de matriz extracelular en el glomérulo de ratas con glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-timocito, por lo que es un potente agente anti-TGF- β . Sin embargo, sería muy importante analizar si el betaglicano soluble recombinante es capaz de revertir o detener el daño producido por el TGF- β en padecimientos crónicos en los cuales la desregulación de la actividad del TGF- β induce fibrosis en diferentes órganos.

CONCLUSIONES

1. El betaglicano soluble recombinante es un homodímero formado por 2 monómeros de 110 kDa asociados por interacciones no covalentes.
2. Esta proteína no presenta cadenas de glicosaminoglicanos, sin embargo, posee carbohidratos que representan 20 kDa de la masa molecular de cada monómero.
3. El análisis de secuencia amino-terminal del betaglicano soluble recombinante muestra que su péptido señal es procesado apropiadamente en las células de insecto.
4. El betaglicano soluble recombinante tiene una constante de disociación en el equilibrio (K_d) de 3.5 nM para el TGF- β_1 .
5. La afinidad relativa del betaglicano soluble para las isoformas de TGF- β es TGF- β_2 > TGF- β_3 > TGF- β_1 .
6. El betaglicano soluble es capaz de bloquear en efecto del TGF- β_1 y TGF- β_2 en ensayos *in vitro* utilizando el plásmido reportero p3TPlux y en ensayos de inhibición de la proliferación de células FBHE. El efecto es 10 veces mayor para TGF- β_1 que para TGF- β_2 . Este efecto es comparable o mayor (en el caso del TGF- β_2) que el obtenido con anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β .
7. Este betaglicano bloquea en forma específica al TGF- β ya que en ensayos *in vitro* utilizando el plásmido reportero p3TPlux, no fue capaz de inhibir el efecto de BMP2, BMP7 o activina.
8. El betaglicano soluble tiene un efecto protector del daño renal en el modelo de glomerulonefritis experimental en ratas. Es capaz de disminuir el depósito de fibronectina, colágena I y IV en el glomérulo y la síntesis de la cinasa SGK en el riñón. Por lo tanto, puede funcionar como potente un agente anti-TGF- β *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. Massague, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597.
2. Massague, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753.
3. Assoian, R. K., A. Komoriya, C. A. Meyers, D. M. Miller, and M. B. Sporn. 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 258:7155.
4. Derynck, R., J. A. Jarrett, E. Y. Chen, D. H. Eaton, J. R. Bell, R. K. Assoian, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and D. V. Goeddel. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316:701.
5. Kingsley, D. M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133.
6. Derynck, R., P. B. Lindquist, A. Lee, D. Wen, J. Tamm, J. L. Graycar, L. Rhee, A. J. Mason, D. A. Miller, R. J. Coffey, and et al. 1988. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* 7:3737.
7. Dubois, C. M., M. H. Laprise, F. Blanchette, L. E. Gentry, and R. Leduc. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270:10618.
8. Munger, J. S., J. G. Harpel, P. E. Gleizes, R. Mazziere, I. Nunes, and D. B. Rifkin. 1997. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51:1376.
9. Kanzaki, T., A. Olofsson, A. Moren, C. Wernstedt, U. Hellman, K. Miyazono, L. Claesson-Welsh, and C. H. Heldin. 1990. TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61:1051.
10. Saharinen, J., M. Hyytiainen, J. Taipale, and J. Keski-Oja. 1999. Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)-- structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:99.
11. Oklu, R., and R. Hesketh. 2000. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J* 352 Pt 3:601.
12. Dallas, S. L., S. Park-Snyder, K. Miyazono, D. Twardzik, G. R. Mundy, and L. F. Bonewald. 1994. Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. *J Biol Chem* 269:6815.
13. Ando T. O. S., Tamaki K, Yoshimi K, Fujishima M. 1995. Localization of transforming growth factor-beta and latent transforming growth factor-beta binding protein in rat kidney. *Kidney Int* 47:733.
14. Crawford, S. E., V. Stellmach, J. E. Murphy-Ullrich, S. M. Ribeiro, J. Lawler, R. O. Hynes, G. P. Boivin, and N. Bouck. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93:1159.
15. Murphy-Ullrich, J. E., and M. Poczatek. 2000. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:59.

16. O'Connor-McCourt, M. D., and L. M. Wakefield. 1987. Latent transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 262:14090.
17. Yamaguchi, Y., D. M. Mann, and E. Ruoslahti. 1990. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281.
18. Clark, D. A., and R. Coker. 1998. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30:293.
19. McDonald, N. Q., and W. A. Hendrickson. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73:421.
20. Daopin, S., K. A. Piez, Y. Ogawa, and D. R. Davies. 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257:369.
21. Schlunegger, M. P., and M. G. Grutter. 1992. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* 358:430.
22. McPherron, A. C., and S. J. Lee. 1993. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268:3444.
23. Cheifetz, S., H. Hernandez, M. Laiho, P. ten Dijke, K. K. Iwata, and J. Massague. 1990. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 265:20533.
24. Wrana, J. L., L. Attisano, J. Carcamo, A. Zentella, J. Doody, M. Laiho, X. F. Wang, and J. Massague. 1992. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003.
25. Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura, and J. Massague. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341.
26. Laiho, M., J. A. DeCaprio, J. W. Ludlow, D. M. Livingston, and J. Massague. 1990. Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62:175.
27. Wells, R. G., H. Yankelev, H. Y. Lin, and H. F. Lodish. 1997. Biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implications for complex formation. *J Biol Chem* 272:11444.
28. Franzen, P., C. H. Heldin, and K. Miyazono. 1995. The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 207:682.
29. Chen, Y. G., F. Liu, and J. Massague. 1997. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 16:3866.
30. Lou, K. X., and H. F. Lodish. 1997. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J* 16:1970.
31. Massague, J. 1996. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85:947.
32. Rafferty, L. A., V. Twombly, K. Wharton, and W. M. Gelbart. 1995. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 139:241.

33. Sekelsky, J. J., S. J. Newfeld, L. A. Raftery, E. H. Chartoff, and W. M. Gelbart. 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139:1347.
34. Savage, C., P. Das, A. L. Finelli, S. R. Townsend, C. Y. Sun, S. E. Baird, and R. W. Padgett. 1996. *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* 93:790.
35. Massague, J., and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19:1745.
36. Macias-Silva, M., S. Abdollah, P. A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano, and J. L. Wrana. 1996. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87:1215.
37. Zhang, Y., X. Feng, R. We, and R. Derynck. 1996. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- beta response. *Nature* 383:168.
38. Lo, R. S., and J. Massague. 1999. Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol* 1:472.
39. Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169.
40. Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano, and J. L. Wrana. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95:779.
41. Xu, L., Y. G. Chen, and J. Massague. 2000. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2:559.
42. Chen, X., M. J. Rubock, and M. Whitman. 1996. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* 383:691.
43. Hayashi, H., S. Abdollah, Y. Qiu, J. Cai, Y. Y. Xu, B. W. Grinnell, M. A. Richardson, J. N. Topper, M. A. Gimbrone, Jr., J. L. Wrana, and D. Falb. 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89:1165.
44. Hata, A., G. Lagna, J. Massague, and A. Hemmati-Brivanlou. 1998. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12:186.
45. Ishisaki, A., K. Yamato, S. Hashimoto, A. Nakao, K. Tamaki, K. Nonaka, P. ten Dijke, H. Sugino, and T. Nishihara. 1999. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem* 274:13637.
46. Lopez-Casillas, F., S. Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane, and J. Massague. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67:785.
47. Bork, P., and C. Sander. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett* 300:237.
48. Cheifetz, S., T. Bellon, C. Cales, S. Vera, C. Bernabeu, J. Massague, and M. Letarte. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027.
49. Lopez-Casillas, F., H. M. Payne, J. L. Andres, and J. Massague. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124:557.

50. Andres, J. L., D. DeFalcis, M. Noda, and J. Massague. 1992. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 267:5927.
51. Segarini, P. R., A. B. Roberts, D. M. Rosen, and S. M. Seyedin. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 262:14655.
52. Cheifetz, S., and J. Massague. 1991. Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem* 266:20767.
53. Lopez-Casillas, F., J. L. Wrana, and J. Massague. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73:1435.
54. Ohta, M., J. S. Greenberger, P. Anklesaria, A. Bassols, and J. Massague. 1987. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329:539.
55. Andres, J. L., K. Stanley, S. Cheifetz, and J. Massague. 1989. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 109:3137.
56. Pepin, M. C., M. Beauchemin, J. Plamondon, and M. D. O'Connor-McCourt. 1994. 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* 91:997.
57. Lamarre, J., J. Vasudevan, and S. L. Gonias. 1994. Plasmin cleaves betaglycan and releases a 60 kDa transforming growth factor-beta complex from the cell surface. *Biochem J* 302:199.
58. Montiel, J. L. En preparaci3n.
59. Lewis, K. A., P. C. Gray, A. L. Blount, L. A. MacConell, E. Wiater, L. M. Bilezikjian, and W. Vale. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404:411.
60. Esparza-Lopez, J., J. L. Montiel, M. M. Vilchis-Landeros, T. Okadome, K. Miyazono, and F. Lopez-Casillas. 2001. 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. *J Biol Chem* 276:14588.
61. Brown, C. B., A. S. Boyer, R. B. Runyan, and J. V. Barnett. 1999. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283:2080.
62. Boyer, A. S., and R. B. Runyan. 2001. TGFbeta Type III and TGFbeta Type II receptors have distinct activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev Dyn* 221:454.
63. Crossin, K. L., and S. Hoffman. 1991. Expression of adhesion molecules during the formation and differentiation of the avian endocardial cushion tissue. *Dev Biol* 145:277.
64. Boyer, A. S., Ayerinkas, II, E. B. Vincent, L. A. McKinney, D. L. Weeks, and R. B. Runyan. 1999. TGFbeta2 and TGFbeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev Biol* 208:530.
65. Cui, X. M., and C. F. Shuler. 2000. The TGF-beta type III receptor is localized to the medial edge epithelium during palatal fusion. *Int J Dev Biol* 44:397.

66. Brunet, C. L., P. M. Sharpe, and M. W. Ferguson. 1995. Inhibition of TGF-beta 3 (but not TGF-beta 1 or TGF-beta 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol* 39:345.
67. Eickelberg, O., M. Centrella, M. Reiss, M. Kashgarian, and R. G. Wells. 2002. Betaglycan Inhibits TGF-beta Signaling by Preventing Type I-Type II Receptor Complex Formation. glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 277:823.
68. Gougos, A., and M. Letarte. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265:8361.
69. McAllister, K. A., M. A. Baldwin, A. K. Thukkani, C. J. Gallione, J. N. Berg, M. E. Porteous, A. E. Guttmacher, and D. A. Marchuk. 1995. Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function. *Hum Mol Genet* 4:1983.
70. Wang, X. F., H. Y. Lin, E. Ng-Eaton, J. Downward, H. F. Lodish, and R. A. Weinberg. 1991. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 67:797.
71. Lastres, P., A. Letamendia, H. Zhang, C. Rius, N. Almendro, U. Raab, L. A. Lopez, C. Langa, A. Fabra, M. Letarte, and C. Bernabeu. 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 133:1109.
72. Roberts, A. B., and M. B. Sporn. 1993. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8:1.
73. Kulkarni, A. B., C. G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K. C. Flanders, A. B. Roberts, M. B. Sporn, J. M. Ward, and S. Karlsson. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770.
74. Sanford, L. P., I. Ormsby, A. C. Gittenberger-de Groot, H. Sariola, R. Friedman, G. P. Boivin, E. L. Cardell, and T. Doetschman. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124:2659.
75. Kaartinen, V., J. W. Voncken, C. Shuler, D. Warburton, D. Bu, N. Heisterkamp, and J. Groffen. 1995. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11:415.
76. Proetzel, G., S. A. Pawlowski, M. V. Wiles, M. Yin, G. P. Boivin, P. N. Howles, J. Ding, M. W. Ferguson, and T. Doetschman. 1995. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 11:409.
77. Oshima, M., H. Oshima, and M. M. Taketo. 1996. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179:297.
78. Larsson, J., M. J. Goumans, L. J. Sjostrand, M. A. van Rooijen, D. Ward, P. Leveen, X. Xu, P. ten Dijke, C. L. Mummery, and S. Karlsson. 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J* 20:1663.
79. Tucker, R. F., E. L. Branum, G. D. Shipley, R. J. Ryan, and H. L. Moses. 1984. Specific binding to cultured cells of 125I-labeled type beta transforming growth factor from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6757.
80. Hata, A. 2001. TGFbeta signaling and cancer. *Exp Cell Res* 264:111.
81. Massague, J., S. W. Blain, and R. S. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103:295.

82. Leof, E. B., J. A. Proper, A. S. Goustin, G. D. Shipley, P. E. DiCorleto, and H. L. Moses. 1986. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2453.
83. Igarashi, A., H. Okochi, D. M. Bradham, and G. R. Grotendorst. 1993. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637.
84. Assoian, R. K., C. A. Frolik, A. B. Roberts, D. M. Miller, and M. B. Sporn. 1984. Transforming growth factor-beta controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts. *Cell* 36:35.
85. Ellingsworth, L. R., J. E. Brennan, K. Fok, D. M. Rosen, H. Bentz, K. A. Piez, and S. M. Seyedin. 1986. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and transforming growth factor beta. Immunohistochemical localization and association with differentiating cells. *J Biol Chem* 261:12362.
86. Letterio, J. J., and A. B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16:137.
87. Ignatz, R. A., and J. Massague. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337.
88. Wrana, J. L., M. Maeno, B. Hawrylyshyn, K. L. Yao, C. Domenicucci, and J. Sodek. 1988. Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol* 106:915.
89. Laiho, M., O. Saksela, and J. Keski-Oja. 1986. Transforming growth factor beta alters plasminogen activator activity in human skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 164:399.
90. Edwards, D. R., G. Murphy, J. J. Reynolds, S. E. Whitham, A. J. Docherty, P. Angel, and J. K. Heath. 1987. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6:1899.
91. Thompson, N. L., F. Bazoberry, E. H. Speir, W. Casscells, V. J. Ferrans, K. C. Flanders, P. Kondaiah, A. G. Geiser, and M. B. Sporn. 1988. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors* 1:91.
92. Lefter, A. M., P. Tsao, N. Aoki, and M. A. Palladino, Jr. 1990. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science* 249:61.
93. Gamble, J. R., and M. A. Vadas. 1988. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 242:97.
94. Gamble, J. R., and M. A. Vadas. 1991. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* 146:1149.
95. Border, W. A., and N. A. Noble. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286.
96. Blobe, G. C., W. P. Schiemann, and H. F. Lodish. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350.
97. Cotran R. S., K. V. a. R. S. L. 1990. *Patología estructural y funcional*, Vol II, 4ª. Ed., Ed. Interamericana, Madrid.

98. Brenner, B. M., and F. C. Rector. 1991. *The Kidney*. 6a. Ed., Saunders, Philadelphia.
99. Yamamoto, T., N. A. Noble, A. H. Cohen, C. C. Nast, A. Hishida, L. I. Gold, and W. A. Border. 1996. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 49:461.
100. Yamamoto, T., N. A. Noble, D. E. Miller, L. I. Gold, A. Hishida, M. Nagase, A. H. Cohen, and W. A. Border. 1999. Increased levels of transforming growth factor-beta in HIV-associated nephropathy. *Kidney Int* 55:579.
101. MacKay, K., L. J. Striker, J. W. Stauffer, T. Doi, L. Y. Agodoa, and G. E. Striker. 1989. Transforming growth factor-beta. Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. *J Clin Invest* 83:1160.
102. Ziyadeh, F. N., K. Sharma, M. Ericksen, and G. Wolf. 1994. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 93:536.
103. Hansch, G. M., C. Wagner, A. Burger, W. Dong, G. Staehler, and M. Stoeck. 1995. Matrix protein synthesis by glomerular mesangial cells in culture: effects of transforming growth factor beta (TGF beta) and platelet- derived growth factor (PDGF) on fibronectin and collagen type IV mRNA. *J Cell Physiol* 163:451.
104. Border, W. A., S. Okuda, L. R. Languino, and E. Ruoslahti. 1990. Transforming growth factor-beta regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int* 37:689.
105. Matrisian, L. M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14:455.
106. Alvarez, R. J., M. J. Sun, T. P. Haverty, R. V. Iozzo, J. C. Myers, and E. G. Neilson. 1992. Biosynthetic and proliferative characteristics of tubulointerstitial fibroblasts probed with paracrine cytokines. *Kidney Int* 41:14.
107. Humes, H. D., T. Nakamura, D. A. Cieslinski, D. Miller, R. V. Emmons, and W. A. Border. 1993. Role of proteoglycans and cytoskeleton in the effects of TGF-beta 1 on renal proximal tubule cells. *Kidney Int* 43:575.
108. Okuda, S., L. R. Languino, E. Ruoslahti, and W. A. Border. 1990. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 86:453.
109. Coimbra, T., R. Wiggins, J. W. Noh, S. Merritt, and S. H. Phan. 1991. Transforming growth factor-beta production in anti-glomerular basement membrane disease in the rabbit. *Am J Pathol* 138:223.
110. Bitzer, M., R. B. Sterzel, and E. P. Bottinger. 1998. Transforming growth factor-beta in renal disease. *Kidney Blood Press Res* 21:1.
111. Kopp, J. B., V. M. Factor, M. Mozes, P. Nagy, N. Sanderson, E. P. Bottinger, P. E. Klotman, and S. S. Thorgeirsson. 1996. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 74:991.
112. Shankland, S. J., and R. J. Johnson. 1998. TGF-beta in glomerular disease. *Miner Electrolyte Metab* 24:168.
113. Border, W. A., S. Okuda, L. R. Languino, M. B. Sporn, and E. Ruoslahti. 1990. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 346:371.

114. Sharma, K., and F. N. Ziyadeh. 1994. The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. *Am J Physiol* 266:F829.
115. Yamamoto, T., T. Nakamura, N. A. Noble, E. Ruoslahti, and W. A. Border. 1993. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1814.
116. Lang, F., K. Klingel, C. A. Wagner, C. Stegen, S. Warntges, B. Friedrich, M. Lanzendorfer, J. Melzig, I. Moschen, S. Steuer, S. Waldegger, M. Sauter, M. Paulmichl, V. Gerke, T. Risler, G. Gamba, G. Capasso, R. Kandolf, S. C. Hebert, S. G. Massry, and S. Broer. 2000. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8157.
117. Lopez-Casillas, F. 2000. [Transforming growth factor-beta (TGF-beta), keystone in diabetic nephropathy]. *Rev Invest Clin* 52:487.
118. Takeuchi, Y., Y. Kodama, and T. Matsumoto. 1994. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem* 269:32634.
119. Iozzo, R. V., D. K. Moscatello, D. J. McQuillan, and I. Eichstetter. 1999. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 274:4489.
120. Border, W. A., N. A. Noble, T. Yamamoto, J. R. Harper, Y. Yamaguchi, M. D. Pierschbacher, and E. Ruoslahti. 1992. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360:361.
121. Isaka, Y., D. K. Brees, K. Ikegaya, Y. Kaneda, E. Imai, N. A. Noble, and W. A. Border. 1996. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 2:418.
122. Hirsch, C. S., J. J. Ellner, R. Blinkhorn, and Z. Toossi. 1997. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3926.
123. Kolb, M., P. J. Margetts, T. Galt, P. J. Sime, Z. Xing, M. Schmidt, and J. Gauldie. 2001. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* 163:770.
124. Lin, H. Y., A. Moustakas, P. Knaus, R. G. Wells, Y. I. Henis, and H. F. Lodish. 1995. The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *J Biol Chem* 270:2747.
125. Isaka, Y., Y. Akagi, Y. Ando, M. Tsujie, T. Sudo, N. Ohno, W. A. Border, N. A. Noble, Y. Kaneda, M. Hori, and E. Imai. 1999. Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 55:465.
126. George, J., D. Roulot, V. E. Koteliensky, and D. M. Bissell. 1999. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12719.
127. Rowland-Goldsmith, M. A., H. Maruyama, T. Kusama, S. Ralli, and M. Korc. 2001. Soluble type II transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor inhibits TGF-beta signaling in COLO-357 pancreatic cancer cells in vitro and attenuates tumor formation. *Clin Cancer Res* 7:2931.

128. Bottinger, E. P., V. M. Factor, M. L. Tsang, J. A. Weatherbee, J. B. Kopp, S. W. Qian, L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. S. Thorgeirsson, and M. B. Sporn. 1996. The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5877.
129. Border, W. A., and N. A. Noble. 1998. Evidence that TGF-beta should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 54:1390.
130. Sharma, K., Y. Jin, J. Guo, and F. N. Ziyadeh. 1996. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 45:522.
131. Kasuga, H., Y. Ito, S. Sakamoto, H. Kawachi, F. Shimizu, Y. Yuzawa, and S. Matsuo. 2001. Effects of anti-TGF-beta type II receptor antibody on experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 60:1745.
132. Sottrup-Jensen, L., T. M. Stepanik, T. Kristensen, D. M. Wierzbicki, C. M. Jones, P. B. Lonblad, S. Magnusson, and T. E. Petersen. 1984. Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. V. The complete structure. *J Biol Chem* 259:8318.
133. Swenson, R. P., and J. B. Howard. 1979. Structural characterization of human alpha2-macroglobulin subunits. *J Biol Chem* 254:4452.
134. Webb, D. J., J. Wen, L. R. Karns, M. G. Kurilla, and S. L. Gonias. 1998. Localization of the binding site for transforming growth factor-beta in human alpha2-macroglobulin to a 20-kDa peptide that also contains the bait region. *J Biol Chem* 273:13339.
135. Huang, S. S., Q. Liu, F. E. Johnson, Y. Konish, and J. S. Huang. 1997. Transforming growth factor beta peptide antagonists and their conversion to partial agonists. *J Biol Chem* 272:27155.
136. Hugo, C. P., R. P. Pichler, E. Schulze-Lohoff, F. Prols, S. Adler, H. C. Krutsch, J. E. Murphy-Ullrich, W. G. Couser, D. D. Roberts, and R. J. Johnson. 1999. Thrombospondin peptides are potent inhibitors of mesangial and glomerular endothelial cell proliferation in vitro and in vivo. *Kidney Int* 55:2236.
137. Akagi, Y., Y. Isaka, M. Arai, T. Kaneko, M. Takenaka, T. Moriyama, Y. Kaneda, A. Ando, Y. Orita, T. Kamada, N. Ueda, and E. Imai. 1996. Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 50:148.
138. Armendariz-Borunda, J., L. LeGros, Jr., O. Campollo, A. Panduro, and A. R. Rincon. 1997. Antisense S-oligodeoxynucleotides down-regulate TGFbeta-production by Kupffer cells from CCl4-injured rat livers. *Biochim Biophys Acta* 1353:241.
139. Han, D. C., B. B. Hoffman, S. W. Hong, J. Guo, and F. N. Ziyadeh. 2000. Therapy with antisense TGF-beta 1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F628.
140. Nakao, A., M. Fujii, R. Matsumura, K. Kumano, Y. Saito, K. Miyazono, and I. Iwamoto. 1999. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 104:5.
141. Seed, B., and A. Aruffo. 1987. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3365.
142. Kingston, R. E., C. A. Chen, and H. Okayama. 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, New York.

143. King, L. A. 1992. *The baculovirus expression system. A laboratory guide*. Chapman & Hall, London.
144. Sambrook, J., T. Maniatis, and E. F. Fritsch. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
145. Evan, G. I., G. K. Lewis, G. Ramsay, and J. M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product. *Mol Cell Biol* 5:3610.
146. Ornstein, L. 1964. *Disc electrophoresis I. Background and theory*, N.Y.
147. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:404.
148. Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelman. 1996. *Protein methods*. Wiley-Liss, New York.
149. Sojar, H. T., and O. P. Bahl. 1987. Chemical deglycosylation of glycoproteins. *Methods Enzymol* 138:341.
150. Andres, J. L., L. Ronnstrand, S. Cheifetz, and J. Massague. 1991. Purification of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 266:23282.
151. Ailor, E., and M. J. Betenbaugh. 1999. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr Opin Biotechnol* 10:142.
152. Border, W. A., and E. Ruoslahti. 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90:1.
153. Wahl, S. M. 1992. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* 12:61.
154. Reeves, W. B., and T. E. Andreoli. 2000. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7667.
155. Henis, Y. I., A. Moustakas, H. Y. Lin, and H. F. Lodish. 1994. The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers. *J Cell Biol* 126:139.
156. Kaname, S., and E. Ruoslahti. 1996. Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor- beta 1. *Biochem J* 315:815.
157. Ziyadeh, F. N., B. B. Hoffman, D. C. Han, M. C. Iglesias-De La Cruz, S. W. Hong, M. Isono, S. Chen, T. A. McGowan, and K. Sharma. 2000. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8015.
158. O'Connor-McCourt, M. D., O. Segarubu, S. Grothe, M. Tsang, and J. A. Weatherbee. 1995. Analysis of the interaction between two TGF-beta-binding proteins and three TGF-beta isoforms using surface plasmon resonance. *Ann N Y Acad Sci* 766:300.
159. Hildebrand, A., M. Romaris, L. M. Rasmussen, D. Heinegard, D. R. Twardzik, W. A. Border, and E. Ruoslahti. 1994. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 302:527.

Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- β neutralizing agent

M. Magdalena Vilchis-Landeros, José L. Montiel, Valentín Mendoza, Guillermo Mendoza-Hernández and Fernando López-Casillas.

Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- β neutralizing agent

M. Magdalena VILCHIS-LANDEROS*, José L. MONTIEL*, Valentín MENDOZA*, Guillermo MENDOZA-HERNÁNDEZ† and Fernando LÓPEZ-CASILLAS*¹

*Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-246, Mexico City, D.F. 04510, México, and †Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, Mexico City, D.F. 04510, México

Betaglycan is an accessory receptor of members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, which regulates their actions through ligand-dependent interactions with type II receptors. A natural soluble form of betaglycan is found in serum and extracellular matrices. Soluble betaglycan, prepared as a recombinant protein using the baculoviral expression system, inhibits the actions of TGF- β . Because of its potential use as an anti-TGF- β therapeutic agent, we have purified and characterized baculoviral recombinant soluble betaglycan. Baculoviral soluble betaglycan is a homodimer formed by two 110 kDa monomers associated by non-covalent interactions. This protein is devoid of glycosaminoglycan chains, although it contains the serine residues, which, in vertebrate cells, are modified by these carbohydrates. On the other hand, mannose-rich carbohydrates account for approximately 20 kDa of the mass of the monomer. End-terminal sequence analysis of the soluble betaglycan showed that Gly²⁴ is the first residue of the mature protein. Similarly to

the natural soluble betaglycan, baculoviral soluble betaglycan has an equilibrium dissociation constant (K_d) of 3.5 nM for TGF- β 1. Ligand competition assays indicate that the relative affinities of recombinant soluble betaglycan for the TGF- β isoforms are TGF- β 2 > TGF- β 3 > TGF- β 1. The anti-TGF- β potency of recombinant soluble betaglycan *in vitro* is 10-fold higher for TGF- β 2 than for TGF- β 1. Compared with a commercial pan-specific anti-TGF- β neutralizing antibody, recombinant soluble betaglycan is more potent against TGF- β 2 and similar against TGF- β 1. These results indicate that baculoviral soluble betaglycan has the biochemical and functional properties that would make it a suitable agent for the treatment of the diseases in which excess TGF- β plays a central physiological role.

Key words: insect cell protein processing, soluble receptors, transforming growth factor- β antagonists.

INTRODUCTION

Transforming growth factor- β (TGF- β) is the prototype of a superfamily of autocrine and paracrine factors that are involved in development, cell differentiation and proliferation [1,2]. TGF- β controls many physiological processes and, thus, disturbances in its regulation or signalling pathway can lead to disease [3,4]. TGF- β is central to the control of extracellular-matrix production and, thereby, in wound repair [5]. TGF- β promotes the accumulation of extracellular matrix by increasing its synthesis and decreasing its degradation [1]. TGF- β is necessary for proper wound healing; however, excess TGF- β leads to the fibrosis that is observed in various diseases; a deleterious effect that has been called the 'dark side' of TGF- β in tissue repair [6]. The dark side of TGF- β includes diseases of relevance to humans, such as hepatic cirrhosis, nephropathies of diverse aetiologies and many lung fibrotic diseases [7–9]. Therefore it is important to identify pharmacological agents that neutralize TGF- β activity, and thus prevent its deleterious effects. To this end, a rational approach would be to find targets for anti-TGF- β intervention in the TGF- β signalling pathway.

TGF- β signals through type I and II receptors; these are single spanning membrane proteins with extracellular regions that bind TGF- β , and cytoplasmic regions that contain serine/threonine protein kinases. When associated in a ligand-induced heteromeric complex, the constitutively active type II receptor kinase phosphorylates the glycine/serine-rich regulatory ('GS') domain

in the cytoplasmic region of the type I receptor, leading to the activation of its kinase domain. Active type I receptor kinase phosphorylates Smad2 or Smad3, permitting its association with Smad4 into a complex that migrates to cell nuclei and mediates the transcriptional regulation of TGF- β target genes [4,10,11].

In addition to the signalling type I and II receptors, other membrane proteins bind TGF- β with high affinity [12]. Betaglycan and endoglin (type III class of TGF- β receptors) are transmembrane glycoproteins with large extracellular regions that bind TGF- β , and small cytoplasmic regions, with no clearly identifiable signalling motif. The type III receptors are considered 'accessory' receptors, since they regulate the interaction of TGF- β with the signalling receptors, and thus determine the outcome of the TGF- β stimulation [13–16]. Recently, it has been demonstrated that betaglycan also binds and regulates the actions of other members of the TGF- β superfamily [17]. Betaglycan and the type II activin receptor form a complex that binds inhibin A with high affinity and prevents the formation of the functional activin type I and II receptor complex; it has been proposed that this accounts for the anti-activin effect of inhibin [17]. Betaglycan is a membrane proteoglycan containing heparan and chondroitin sulphate chains, whose core protein binds all three TGF- β isoforms and associates with type II receptor in a ligand-dependent manner, thereby modulating the effects of TGF- β [13,18]. However, because of its required participation in the epithelial-mesenchymal transition of cardiac endothelial cells that leads to heart valve formation, the possibility of a direct

Abbreviations used: TGF- β , transforming growth factor- β ; GAG, glycosaminoglycan chains; TFMS, trifluoromethanesulphonic acid; IMAC, immobilized metal-ion affinity chromatography; K_d , equilibrium dissociation constant; DTT, dithiothreitol.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail lcasillas@iitisiol.unam.mx).

TGF- β signalling function for betaglycan has not been rejected [19].

A naturally occurring soluble form of betaglycan is found in serum and extracellular matrices [20]. This form is generated by a still uncharacterized proteolytic cleavage of the extracellular portion of the membrane betaglycan [21]. In contrast to its membrane counterpart, soluble betaglycan produced in insect cells by cDNA recombinant methods, is a TGF- β antagonist [22]. As the first step to determine if this recombinant soluble betaglycan could be a useful therapeutic anti-TGF- β agent, we have purified it and characterized its biochemical and functional properties. Our data indicate that recombinant soluble betaglycan is a dimeric glycoprotein that binds TGF- β with high affinity and isoform selectivity. In addition, we found that in the *in vitro* assays tested, baculoviral soluble betaglycan neutralizes TGF- β with high potency, opening up the possibility of its use as a therapeutic anti-TGF- β agent.

EXPERIMENTAL

Reagents and cell cultures

COS-1 and Mv1Lu (CCL-64; American Type Culture Collection) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal-bovine serum (Gibco/BRL, Grand Island, NY, U.S.A.). Sf9 cells were grown in Grace's medium supplemented with 10% fetal-calf serum, yeastolate and lactalbumin hydrolysate. High five cells (H5; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) were grown in spinner flasks at 27 °C at 100 rev/min, using Express Five (Gibco/BRL) serum-free medium supplemented with 4 mM glutamine. TGF- β 1 and pan-specific anti-TGF- β neutralizing antibody (AB-100-NA) (R & D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.), TGF- β 2 and TGF- β 3 were gifts from Dr N. Cerletti (Ciba Geigy, Basel, Switzerland). The anti-c-myc monoclonal antibody (9E10) has been described previously [23]. Unless otherwise specified, all other biochemicals were from Sigma-Aldrich Co.

Cell transfection and luciferase assay

Transient transfections were performed by the diethylaminoethyl-dextran method [24]. For the anti-c-myc Western blot, 72-h conditioned media from the COS-1 cells transfected with the soluble betaglycan or the glycosaminoglycan chain (GAG)-less soluble betaglycan vectors (the LS or LS gag⁻ constructs reported in [22]) were transferred to nitrocellulose and probed with the 9E10 monoclonal antibody. For the luciferase assay, Mv1Lu cells transfected with the p3TP-lux reporter plasmid [25], were seeded in 24-well multicluster wells (5 × 10⁴ per well) for assay. On the following day, the transfected cells were supplemented with 20 pM TGF- β [dissolved in Dulbecco's modified Eagle medium containing 0.2% (v/v) fetal-bovine serum] and 0–400 nM soluble betaglycan (or neutralizing antibody) (see the legend to Figure 6) and incubated for 18 h. After incubation, cells were washed twice with PBS and lysed in 25 mM Tris/phosphate (pH 7.8), 2 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM 1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid, 10% (v/v) glycerol and 1% (v/v) Triton X-100, for 15 min at room temperature. Luciferase activity was measured in the clear lysates using the Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, U.S.A.) in a Berthold luminometer (Lumat LB9501).

Purification of recombinant soluble betaglycan

High five cells at a density of 2 × 10⁶/ml were infected, at a multiplicity of infection of 10, with a high titre stock of the

soluble betaglycan baculovirus. The conditioned media were harvested 48 h post-infection and immediately processed. Conditioned media were supplemented with 1 mM PMSF, centrifuged at 18000 g for 20 min at 4 °C to remove debris, concentrated × 10 using the Minitan Ultrafiltration System (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.), and subjected to immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) with fast-flow chelating Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Bucks., U.K.). Chelating Sepharose (a 60 ml bead-column) was loaded with 50 mM NiCl₂ and then equilibrated in washing buffer (25 mM Hepes, pH 7.5/1 M KCl/20 mM imidazole/1 mM PMSF). 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. Fractions (5 ml) were collected and analysed for the presence of soluble betaglycan by SDS/PAGE and detected with silver staining. Fractions containing soluble betaglycan were pooled, concentrated in an Amicon Ultrafiltration chamber (Millipore), dialysed against PBS containing 1% (v/v) glycerol and 1 mM PMSF and stored at –70 °C.

Gel filtration and native/denaturing gels

For gel filtration, 30–50 µg of purified baculoviral soluble betaglycan were subjected to HPLC (Beckman Gold 126) on a BioSep Sec-S3000 (300 mm × 7.8 mm) column. The column buffer was 25 mM NaH₂PO₄/150 mM NaCl (pH 6.8) and the flow rate was 1 ml/min. Protein in the eluate was monitored at 280 nm; fractions were collected and analysed by SDS/PAGE and silver staining. Native PAGE was as described previously [26,27] and protein bands were revealed by silver staining. For titration of denaturing and reducing reagents (urea, guanidine HCl, DTT, 2-mercaptoethanol, SDS, Triton X-100 and Nonidet P40), the protein samples were incubated for 30 min at 37 °C in 59 mM Tris/HCl (pH 6.9)/8% (v/v) glycerol/0.025% Bromophenol Blue and SDS or DTT at the concentrations indicated in Figure 3(B). The samples were then loaded on to the gel and subjected to PAGE. Calculation of protein mass was according to the Ferguson method, using molecular mass standards of catalase and a set of monomers, dimers, trimers and tetramers of BSA [28].

Deglycosylation experiments

Chemical deglycosylation of soluble betaglycan was performed as described by Sojar and Bahl [29]. Briefly, 50 µg of alkylated, lyophilized protein was incubated at 4 °C for 2 h, in the dark, with 100 µl of trifluoromethanesulphonic acid (TFMS) in glass tubing saturated with N₂. The reaction was stopped by the addition of 60% (v/v) pyridine at –20 °C. The protein was extensively dialysed against water, and concentrated in a Speed Vac (Savant Instruments). For analysis, the deglycosylated protein was subjected to IMAC using chelating Sepharose, as described above for the purification of recombinant soluble betaglycan. The proteins eluted were separated by SDS/PAGE and bands were detected by Western blot using the anti-c-myc antibody and concanavalin A.

N-terminal sequencing

For N-terminal sequencing, baculoviral soluble betaglycan was first resolved by SDS/PAGE and electroblotted on to PVDF membranes (Millipore). The transferred protein was revealed by Coomassie-blue staining and subjected to automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (LF 3000;

Beckman Instruments) equipped with an on-line HPLC system (Beckman Gold). The HPLC equipment included a model 126 pump and a 168 diode-array detector set at 268 nm and 293 nm for signal and reference respectively.

Affinity labelling in solution

TGF- β 1 was labelled with 125 I by the chloramine T method, as described previously [30]. For affinity labelling in solution, 10 ng of soluble betaglycan and 100 pM of 125 I-labelled TGF- β 1 (in the absence or presence of 0–4 nM of non-radioactive TGF- β) were incubated for 3 h at 4 °C in PBS supplemented with 0.05% (v/v) Triton-X 100. Cross-linking was started by the addition of 0.1 mg/ml disuccinimidyl suberate (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) and stopped after 15 min by the addition of Tris/HCl (pH 7.5) to a final concentration of 10 mM. The reaction mixture was immunoprecipitated with the anti-c-myc antibody 9E10, separated by SDS/PAGE and bands were revealed by PhosphorImager (Molecular Dynamics). Quantitative densitometry of radiolabelled soluble betaglycan was carried out using the ImageQuant software; data were analysed using the Prism software.

RESULTS

Expression and purification of baculoviral recombinant soluble betaglycan

We have described the preparation of recombinant soluble betaglycan by mutagenesis of the rat wild-type betaglycan cDNA (the LS mutant described in [22]). Briefly, the modified cDNA encoded a secretory protein with engineered epitopes designed to facilitate its immunodetection and purification. A human c-myc epitope was placed at the N-terminus, with a stop codon, preceded by a His₆ sequence, inserted immediately before the code for the transmembrane region of the receptor (Figure 1A). Expression of this modified cDNA in COS-1 cells resulted in the secretion of proteins, detected by the anti-c-myc antibody, that exhibited the migration pattern of a 'part-time' proteoglycan; that is, the smeared, high molecular mass (approx. 200 kDa), GAG-containing proteoglycan along with its core protein (Figure 1B, lane 1). However, the expression of the modified cDNA in Sf9 insect cells, using the baculovirus system, yielded only a core protein with a molecular mass of 110 kDa (Figure 1B, lane 3). Baculoviral soluble betaglycan migrated slightly faster than the GAG-less soluble betaglycan expressed in mammalian cells (Figure 1B, compare lanes 2 and 3). The mobility of the baculoviral protein indicated the inability of the insect cells to add GAG to the core protein, and also a decreased capacity to add other types of oligosaccharides (see below). The bands observed around and below 69 kDa most likely correspond to degradation products derived from the secreted proteins. High five (H5) cells were used to prepare larger amounts of baculoviral soluble betaglycan because this cell line produced at least five times more of this protein than the Sf9 cells (results not shown). Soluble betaglycan was purified from conditioned media from H5 cells infected for 2 days, using IMAC, with yields in the range 6–10 mg/litre of conditioned media. As shown in Figure 1(C), this single affinity-chromatography step allowed the purification to homogeneity of baculoviral soluble betaglycan.

N-terminal sequence and glycosylation of baculoviral soluble betaglycan

Post-translational processing of mammalian membrane and secretory proteins in insect cells often is defective, and results in proteins with abnormal properties [31]. Thus the N-terminal end

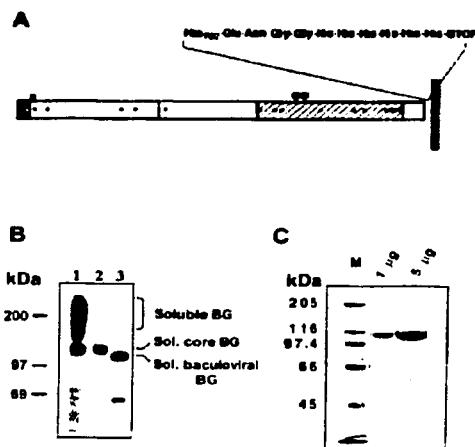


Figure 1 Expression and purification of baculoviral soluble betaglycan

(A) Cartoon of the modified cDNA encoding recombinant soluble betaglycan. A double-stranded oligonucleotide was inserted between the *AcoI* and the *AvrII* sites of the rat wild-type betaglycan cDNA [22]. This oligonucleotide encodes the shown sequence, in which His⁷⁶² is the last authentic residue of the wild-type receptor [51]. The modified cDNA encodes a secreted protein constituted by the betaglycan ectodomain. GAG attachment sites at Ser³³⁵ and Ser³⁴⁶ (circles), the position of cysteine residues (black dots), the signal peptide (black box, including one cysteine, white dot), and the c-myc epitope tag (asterisks) are indicated; the cell plasma membrane is shown as a hatched bar to the right. Regions of sequence similarity to endoglin and uromodulin are indicated as grey shadowed and cross-hatched boxes respectively. (B) Conditioned media of COS-1 cells transfected with the cDNA encoding the soluble betaglycan (lane 1) or its GAG-less version (lane 2) and conditioned media of Sf9 cells infected with the baculovirus encoding the soluble betaglycan (lane 3), were analysed by Western blot with the anti-c-myc monoclonal antibody 9E10. The GAG-less soluble betaglycan vector used in lane 2 corresponds to the LS gap double mutant Ser^{335,346} → Ala described previously [22]. (C) Samples of 1 and 5 μ g of IMAC-purified soluble betaglycan were separated by reducing SDS/PAGE and gels were stained with Coomassie Blue. The migration of molecular mass standards is shown in lane M. Molecular masses (kDa) are shown on the left of the panels.

sequence and degree of glycosylation of our preparation was determined. The first 16 cycles of the Edman degradation of purified baculoviral soluble betaglycan revealed the amino acid sequence shown in Figure 2(A). This sequence confirmed the identity of our recombinant protein and indicated that its signal peptide was properly processed in H5 cells. The signal peptide cleavage occurred between Ala²³-Gly²⁴ of the pro-peptide (Figure 2A), exactly as predicted by the von Heijne rules [32]. Based on the conceptual translation of its cDNA, the predicted mass of recombinant soluble betaglycan was 87252 Da. Thus, from the molecular mass deduced in SDS/PAGE, we predicted a substantial degree of glycosylation in baculoviral soluble betaglycan. Indeed, Western blot and detection with concanavalin A (Figure 2B, lane 3) revealed the presence of mannose-rich oligosaccharides, most likely belonging to the class that are linked to asparagine. Chemical deglycosylation of baculoviral soluble betaglycan with TFMS resulted in the generation of an 87 kDa protein that could be purified by IMAC (Figure 2B). The deglycosylated product was still recognized by the anti-c-myc antibody, but became negative to concanavalin A (Figure 2B, lanes 2 and 4). These findings indicated that TFMS completely

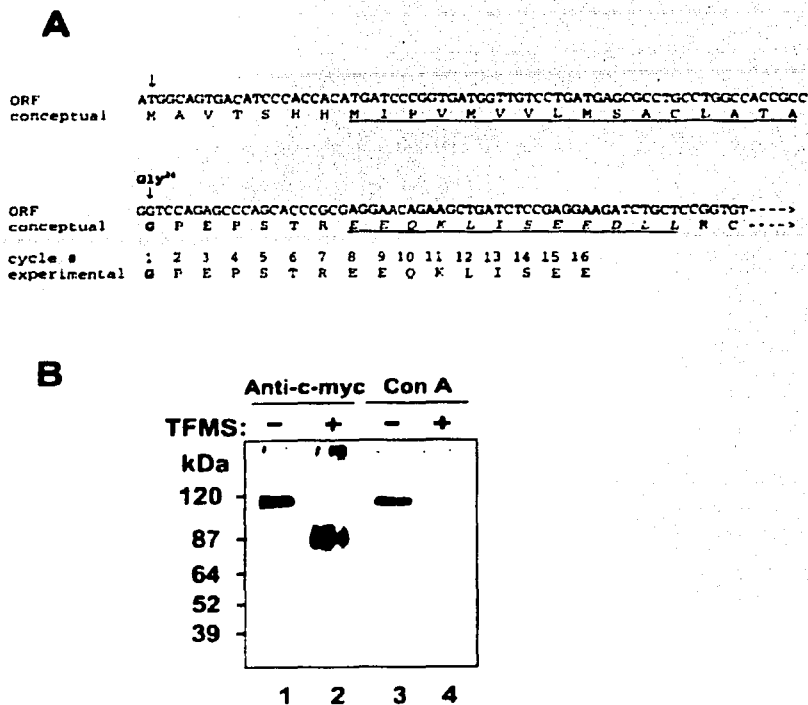


Figure 2 N-terminal sequence and glycosylation state of baculoviral soluble betaglycan

(A) N-terminal sequence of baculoviral soluble betaglycan was determined. The residues identified are indicated and aligned with the conceptual translation deduced from the open reading frame (ORF) of its encoding cDNA. The first residue of the mature protein corresponds to Gly²⁴ (bold). The predicted signal peptide is underlined and the engineered c-myc epitope is shown in underlined italics. (B) Baculoviral soluble betaglycan was chemically deglycosylated with TFMS (+) as described in the Experimental section and then purified by IMAC. The TFMS-treated sample was divided into equal volumes, and separated by SDS/PAGE (lanes 2 and 4), and blotted for concanavalin A (Con A) or anti-c-myc (Anti-c-myc). As a control (-), an equivalent sample of baculoviral soluble betaglycan was not treated with TFMS but was subjected to same purification and detection procedure as the TFMS-treated sample (lanes 1 and 3).

deglycosylated the protein, removing approx. 20 kDa of its mass, as determined by SDS/PAGE.

Baculoviral soluble betaglycan is a non-covalent dimer

Gel-filtration chromatography and gel electrophoresis, under native conditions of baculoviral soluble betaglycan, indicated that it is a dimeric protein. Purified baculoviral soluble betaglycan, subjected to HPLC with a BioSep Sec-S3000 column, eluted as a protein with a calculated mass of 220 kDa, which migrated as a 110 kDa protein under reducing conditions in SDS/PAGE (Figure 3A). Gel electrophoresis under native conditions, which confirmed the mass estimated by gel-filtration chromatography, was also used to titrate the stability of the dimer against several denaturing and reducing reagents. Figure 3(B) shows that the lowest concentration of SDS and DTT required to completely dissociate the dimer was 350 mM and 10 mM respectively. Similar experiments demonstrated that treatment with 5 M urea or 2 M guanidinium hydrochloride

caused dissociation of the dimer (results not shown). When chaotropic and reducing agents were combined, their individual concentrations required to dissociate the dimer were significantly reduced. For example, when urea and DTT were used together, the lowest concentrations needed for dissociation was 2 M and 1 mM respectively. These results suggest that, despite the odd number of cysteine residues per monomer (see Figure 1A), the baculoviral soluble betaglycan dimer is sustained by non-covalent interactions.

Baculoviral soluble betaglycan binds TGF- β with high affinity and isoform selectivity

Soluble betaglycan, found in natural sources, exhibits high affinity for TGF- β [20]; therefore, it was important to evaluate the affinities of recombinant soluble betaglycan for the three mammalian TGF- β isoforms. Scatchard plots of saturation binding experiments indicated that purified baculoviral soluble betaglycan binds one molecule of ¹²⁵I-labelled TGF- β per

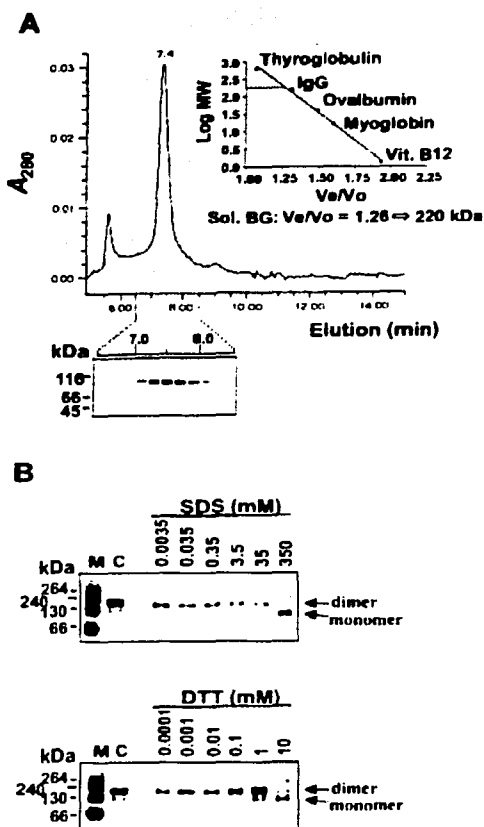


Figure 3 Determination of the oligomeric state of baculoviral soluble betaglycan

(A) Purified soluble betaglycan was subjected to gel filtration as described in the Experimental section. Aliquots of the chromatography eluate were analysed by SDS/PAGE and stained with silver. The fractions corresponding to the major peak (7.4 min) are shown. The inset is a plot of the elution void volume ratios versus the log of the mass of soluble betaglycan and the standards used to calibrate the column. (B) Purified soluble betaglycan, subjected to denaturation (SDS) and reduction (DTT), was analysed by native gel electrophoresis as described in the Experimental section. The migration of an intact sample of soluble betaglycan (C) and the molecular mass standards (M, kDa) are shown. The dimers and monomers of baculoviral soluble betaglycan are indicated with arrows.

molecule of dimer, with a K_d of 3.5 nM (Figure 4). This K_d value is in good agreement with the value of 1.9 nM reported by Andres et al. [20] for soluble betaglycan produced by 3T3-L1 fibroblasts.

In order to establish the relative affinity of recombinant soluble betaglycan for the other TGF- β isoforms, we performed ligand binding competition experiments. For this purpose, affinity labelling in solution was carried out with a constant amount of

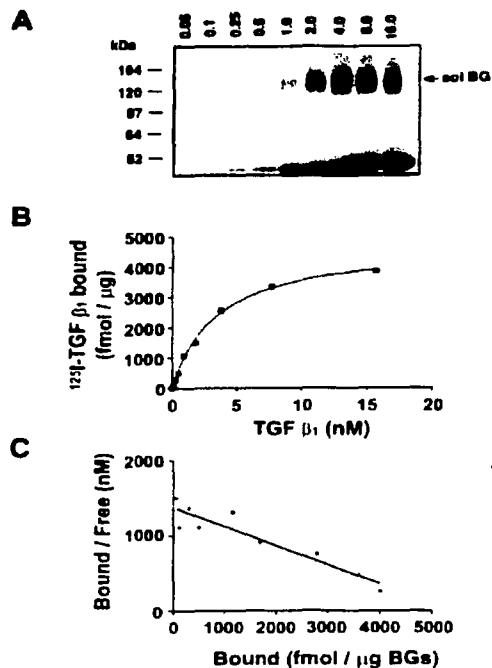


Figure 4 TGF- β 1 saturation binding of baculoviral soluble betaglycan

(A) Baculoviral soluble betaglycan (10 ng) was subjected to affinity labelling in solution (as described in the Experimental section) with the indicated concentrations of 125 I-labelled TGF- β 1. Anti-c-myc immunoprecipitates of the reaction mixtures were resolved by SDS/PAGE and revealed by exposure to a phosphor screen (Storm; Molecular Dynamics). The location of the labelled soluble betaglycan (sol BG) is indicated with an arrow. Molecular masses are indicated on the left. (B) The level of binding was estimated from densitometric analysis of the labelled soluble betaglycan (sol BG from (A)) using the ImageQuant Software, and was plotted against the 125 I-labelled TGF- β 1 concentration. (C) Scatchard transformation of the data shown in (B) using the Prism software package.

125 I-labelled TGF- β 1 and increasing amounts (from 0–4 nM) of competing non-radioactively labelled TGF- β 1, TGF- β 2 or TGF- β 3 (Figure 5). The amount of 125 I-labelled TGF- β 1 cross-linked to soluble betaglycan was quantified from the PhosphorImager scans of SDS/PAGE gels (Figures 5A, 5B and 5C) and plotted as the percentage of labelled TGF- β bound against the concentration of the unlabelled competitor. Similar to the results observed for natural soluble betaglycan [20], the half-maximal homologous competition for TGF- β 1 labelling was approximately 0.5 nM. However, the other TGF- β isoforms exhibited a higher degree of competition. In the presence of 0.5 nM TGF- β 3, the 125 I-TGF- β 1 affinity labelling of baculoviral soluble betaglycan was only ~25%, whereas, with the same concentration of TGF- β 2, 125 I-TGF- β 1 affinity labelling of baculoviral soluble betaglycan was ~90%. Taken together, the data suggested that the relative affinities of baculoviral soluble betaglycan for the three mammalian TGF- β isoforms were, TGF- β 2 > TGF- β 3 > TGF- β 1.

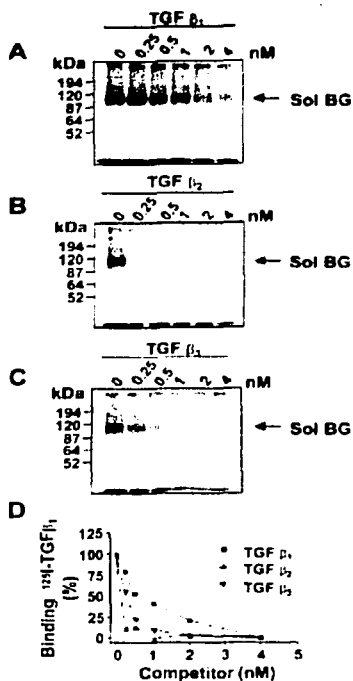


Figure 5 TGF- β isoform-specific competition for the TGF- β 1 binding of baculoviral soluble betaglycan

Baculoviral soluble betaglycan was subjected to affinity labelling in solution with 100 pM [¹²⁵I]-labelled TGF- β 1 and the indicated concentrations of competing unlabelled (A) TGF- β 1, (B) TGF- β 2 or (C) TGF- β 3. The location of soluble betaglycan (Sol BG) is indicated with arrows. Molecular mass markers are shown on the left of the panels. (D) The percentage competition was estimated from densitometric analysis of the labelled soluble betaglycan [Sol BG from (A), (B) and (C)], using the ImageQuant Software, and was plotted against the competitor TGF- β concentration.

Baculoviral soluble betaglycan inhibition of TGF- β responses is also isoform selective

We have previously demonstrated that conditioned media containing baculoviral soluble betaglycan blocks the binding of TGF- β to type II and I receptors and inhibits the TGF- β 2 anti-proliferative effect in Mv1Lu cells [22]. To determine the precise potency of the purified preparation, we assayed its effect on the TGF- β -dependent luciferase expression exhibited by Mv1Lu cells transfected with p3TP-lux, a TGF- β -responsive reporter plasmid [25]. Purified baculoviral soluble betaglycan inhibited the luciferase response in Mv1Lu cells treated with 20 pM TGF- β (a concentration that induces the maximal luciferase activity; results not shown). This inhibition depended on the concentration of the added soluble betaglycan (Figure 6). In several experiments, the estimated EC₅₀ of baculoviral soluble betaglycan for TGF- β 1 was ~ 20 nM (Figure 6A). On the other hand, as expected from its higher affinity for TGF- β 2, the EC₅₀ for this isoform was one

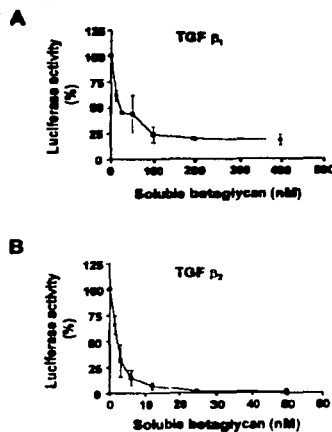


Figure 6 Neutralization of the TGF- β -responsive p3TP-lux reporter activity by soluble betaglycan

Mv1Lu cells were transfected with the p3TP-lux TGF- β -responsive reporter plasmid and incubated with 20 pM TGF- β 1 (A) or TGF- β 2 (B) in the presence of the indicated concentrations of baculoviral soluble betaglycan. The luciferase activity exhibited by these cells was plotted against the soluble betaglycan concentration. Assays were performed in triplicate and results were normalized to 100%, which is the value obtained in cells that were not exposed to soluble betaglycan. The results are means \pm S.D.

order of magnitude lower (~ 2 nM) than that of TGF- β 1 (Figure 6B). We also compared this effect with that of a widely used, commercially available, neutralizing pan-specific TGF- β antibody (AB-100-NA; R & D Systems). The antibody exhibited EC₅₀ of 20 nM and 11 nM for TGF- β 1 and TGF- β 2 respectively (results not shown). In this assay, low concentrations of baculoviral soluble betaglycan (25 nM) inhibited the response to TGF- β 2 by 100% (Figure 6B). However, at 10-fold greater concentrations (for example 400 nM), the maximal inhibition of the TGF- β 1 response was about 80% (Figure 6A), further emphasizing the notable higher affinity of betaglycan for the TGF- β 2 isoform.

DISCUSSION

In many diseases, such as diabetes mellitus, TGF- β has been identified as the major physiopathological agent leading to renal failure, a complication with serious medical and socioeconomic consequences [8]. However, this is just one of the many examples in which agents capable of neutralizing TGF- β would be of great pharmacological value [3,5,33]. In the present work, we demonstrate that a recombinant soluble form of betaglycan, produced in insect cells using the baculoviral expression system, has the biochemical and functional properties needed to become such a pharmacological anti-TGF- β agent.

Baculoviral soluble betaglycan is efficiently expressed as a secretory glycoprotein in which the signal peptide is cleaved with the specificity expected for mammalian cells. However, in contrast to the soluble betaglycan found in natural sources [20], it lacks

GAG chains and exhibits a lesser degree of glycosylation. This occurs, despite the fact that baculoviral soluble betaglycan contains the serine residues that are modified with GAG chains in the rat and mouse wild-type receptors [22,34]. This deficiency resides in the insect cells, since the same cDNA, when expressed in COS-1 cells, produces a GAG-containing soluble receptor. On the other hand, similar to results reported for other extracellular proteins expressed in insect cells [35], baculoviral soluble betaglycan has a lesser amount (when compared with the mammalian counterpart) of mannose-containing oligosaccharides. Thus baculoviral soluble betaglycan has a lower degree of glycosylation, which nonetheless, could be advantageous for its wider systemic distribution when administered into the intact animal.

The quaternary structure and the TGF- β affinities of baculoviral soluble betaglycan resemble those of the wild-type receptor. It has been reported that the membrane-bound betaglycan forms homo-oligomers [36,37]. Our present work shows that native baculoviral soluble betaglycan associates as dimers composed of 110 kDa monomers. Treatment with diverse non-reducing chaotropic agents dissociates the soluble betaglycan dimer, indicating that its association occurs through non-covalent interactions. This is unexpected, because the odd number of cysteine residues in each monomer of soluble betaglycan suggested that dimerization would require an interchain disulphide bond between the monomers.

Soluble betaglycan binds TGF- β 1 with an affinity ($K_d \sim 3.5$ nM) that is comparable to the soluble betaglycan found in natural sources [20]. It also binds the other TGF- β isoforms with even higher relative affinities, showing at least a 5-fold higher affinity for TGF- β 2 than for TGF- β 1. The higher TGF- β 2 affinity of the recombinant soluble receptor is equal to that of the wild-type membrane-bound receptor [38–40]. 125 I-labelled TGF- β 1-saturation binding experiments indicated a stoichiometry of one molecule of TGF- β 1 per molecule of soluble betaglycan dimer. This finding is difficult to explain, since previous mutagenesis experiments show that there are two ligand binding sites in the betaglycan ectodomain [22,41,42]. This could indicate that binding of TGF- β 1 requires the two ligand binding domains to be present in one monomer and that the first binding prevents further binding to the other monomer. Further studies are required to test the validity of this hypothesis.

Crude preparations of baculoviral soluble betaglycan have been used to block the growth-inhibition effect of TGF- β 2 in the highly TGF- β -sensitive Mv1Lu cells [22]. In the present study, we assayed the homogeneously purified soluble betaglycan and found that it blocked TGF- β 2 and TGF- β 1 in a TGF- β assay *in vitro*, that driven by the p3TP-lux reporter [25]. These studies also showed the same TGF- β isoform selectivity in the ligand binding competition assays, which were at least one order of magnitude more effective against TGF- β 2. Similar isoform selectivity was observed also in the TGF- β growth-inhibition assay using fetal-bovine heart endothelial cells (results not shown). It is relevant that the potency of baculoviral soluble betaglycan is comparable with that of a widely used anti-TGF- β neutralizing antibody that has been successfully used *in vivo* [43]. The fact that the baculoviral recombinant soluble betaglycan prepared by us had a consistent TGF- β neutralizing activity is in sharp contrast with the enhancement of the TGF- β bioactivity observed with a bacterially expressed, His₆-tagged, full-length betaglycan ectodomain protein, the bg1.2.3 fusion protein [42]. Despite inhibiting TGF- β 1 binding to Mv1Lu cells, the bg1.2.3 protein was able to enhance the growth inhibitory effect of TGF- β 1 in this cell line. The most likely explanation for this discrepancy is that the renaturing protocol employed to prepare the bg1.2.3

protein resulted in a folding that differs from that of baculoviral soluble betaglycan. Further experimentation is required to establish and compare the tri-dimensional structures of baculoviral and bacterial soluble betaglycans. These studies will provide useful information on what determines that the same polypeptide behaves as a TGF- β neutralizing or a TGF- β promoting agent.

The affinity of baculoviral soluble betaglycan for the diverse TGF- β isoforms is similar or higher than that of other agents that neutralize TGF- β *in vivo* [44–48]. The TGF- β 1 K_d of a recombinant form of the TGF- β 1 latency-associated peptide and of a recombinant soluble type II TGF- β receptor were 8 nM and 120 nM respectively [49]. The estimated affinities of the small interstitial proteoglycans that bind TGF- β 1, biglycan, decorin and fibromodulin are in the range 1–20 nM [50]. These values predict that baculoviral soluble betaglycan will have a potent TGF- β neutralizing action *in vivo*. Furthermore, being a soluble receptor that is found in natural sources, it would be expected that administration systemically would not elicit an immune response in experimental animal models.

We thank Dr A. Gómez-Puyou and Dr J. A. García-Sánchez for their helpful suggestions and comments, and Dr N. Cerletti (Ciba-Geigy AG) for his generous gift of TGF- β 2 and TGF- β 3. This work was supported, in part, by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, Dirección General de Apoyo al Personal Académico, U.N.A.M., the Howard Hughes Medical Institute, U.S.A. and the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy. F.L.C. is an International Research Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

- Massagué, J. (1990) The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 597–641.
- Kingsley, D. M. (1994) The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetics tests of function in different organisms. *Genes Dev.* **8**, 133–146.
- Blöbe, G. C., Schiemann, W. P. and Lodish, H. F. (2000) Role of transforming growth factor β in human disease. *New Engl. J. Med.* **342**, 1350–1358.
- Massagué, J., Blain, S. W. and Lo, R. S. (2000) TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295–309.
- Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors* **1**, 1–9.
- Border, W. A. and Ruoslahti, E. (1992) Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. *J. Clin. Invest.* **90**, 1–7.
- Sime, P. J., Xing, Z., Graham, F. L., Csaky, K. G. and Gualdie, J. (1997) Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J. Clin. Invest.* **100**, 768–776.
- Reeves, W. B. and Andreoli, T. E. (2000) Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7667–7669.
- Bussell, D. M. (1998) Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J. Gastroenterol.* **33**, 295–302.
- Massagué, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791.
- Piek, E., Heldin, C.-H. and ten Dijke, P. (1999) Specificity, diversity and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J.* **13**, 2105–2124.
- Atsano, L., Wrana, J. L., Lopez-Casillas, F. and Massagué, J. (1994) TGF- β receptors and actions. *Biochim. Biophys. Acta* **1222**, 71–80.
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L. and Massagué, J. (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* **73**, 1435–1444.
- Sankar, S., Mahooli-Brooks, N., Centrella, M., McCarthy, T. L. and Madri, J. A. (1995) Expression of transforming growth factor type II receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor β 2. *J. Biol. Chem.* **270**, 13567–13572.
- Lastres, P., Latemendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., López, L. A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1996) Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J. Cell Biol.* **133**, 1109–1121.
- Sun, L. and Chen, C. (1997) Expression of transforming growth factor β type III receptor suppresses tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 25367–25372.
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiaters, E., Bilenzikian, L. M. and Vale, W. (2000) Betaglycan binds and can mediate functional antagonism of activin signaling. *Nature (London)* **404**, 411–414.

- 18 Moustakas, A., Lin, H. Y., Henis, Y. I., Plamondon, J., O'Connor-McCourt, M. D. and Lodish, H. F. (1993) The transforming growth factor β receptors types I, II and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J. Biol. Chem.* **268**, 22215–22218
- 19 Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B. and Barnett, J. V. (1999) Requirement of type III TGF- β receptor for endothelial cell transformation in the heart. *Science* **283**, 2080–2082
- 20 Andres, J. L., Stanley, K., Cheletetz, S. and Massagué, J. (1989) Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J. Cell Biol.* **109**, 3137–3145
- 21 Arribas, J., López-Casillas, F. and Massagué, J. (1997) Role of juxtamembrane domains of the transforming growth factor- α precursor and the β -amyloid protein in the regulated ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* **272**, 17160–17165
- 22 López-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. and Massagué, J. (1994) Betaglycan can act as dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J. Cell Biol.* **124**, 557–568
- 23 Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3610–3616
- 24 Seed, B. and Aruffo, A. (1987) Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 3365–3369
- 25 Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zenitella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F. and Massagué, J. (1992) TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**, 1003–1014
- 26 Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 321–349
- 27 Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404–427
- 28 Bollag, D. M., Rozycki, M. D. and Edelman, S. J. (1996) Gel electrophoresis under non-denaturing conditions. In *Protein Methods*, pp. 155–172. Wiley-Liss Inc., New York
- 29 Sojar, H. T. and Bahl, D. M. (1987) Chemical deglycosylation of glycoproteins. *Methods Enzymol.* **138**, 341–350
- 30 Cheletetz, S., Hernandez, H., Laino, M., tenDijke, P., Iwata, K. K. and Massagué, J. (1990) Distinct transforming growth factor- β receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- β isoforms. *J. Biol. Chem.* **265**, 20533–20538
- 31 Ailor, E. and Betenbaugh, M. J. (1999) Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 142–145
- 32 Wang, X.-F., Lin, H. Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H. F. and Weinberg, R. A. (1991) Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell* **67**, 797–805
- 33 Border, W. A. and Noble, N. A. (1997) TGF- β in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int.* **51**, 1388–1396
- 34 Ponce-Castañeda, M. V., Esparza-Lopez, J., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza, V. and López-Casillas, F. (1998) Murine betaglycan primary structure, expression and glycosaminoglycan attachment sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 189–196
- 35 Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector. *Virology* **174**, 418–429
- 36 Massagué, J. (1985) The subunit structure of high-affinity receptor for type β transforming growth factor. Evidence for a disulfide-linked, glycosylated receptor complex. *J. Biol. Chem.* **260**, 7059–7066
- 37 Henis, Y. I., Moustakas, A., Lin, H. Y. and Lodish, H. F. (1994) The types II and III transforming growth factor- β receptors form homo-oligomers. *J. Cell Biol.* **126**, 139–154
- 38 Segarini, P. R., Roberts, A. B., Rosen, D. M. and Seyedin, S. M. (1987) Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* **262**, 14655–14662
- 39 Andres, J. L., Ronstrand, L., Cheletetz, S. and Massagué, J. (1991) Purification of the TGF- β binding proteoglycan betaglycan. *J. Biol. Chem.* **266**, 23282–23287
- 40 Mitchell, E. J., Fitz-Gibbon, L. and O'Connor-McCourt, M. D. (1992) Subtypes of betaglycan and of type I and type II transforming growth factor- β (TGF- β) receptors with different affinities for TGF- β 1 and TGF- β 2 are exhibited by human placental trophoblast cells. *J. Cell. Physiol.* **158**, 334–343
- 41 Pein, M.-C., Beauchemin, M., Plamondon, J. and O'Connor-McCourt, M. D. (1994) Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor β receptor type III by deletion mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6997–7001
- 42 Kaname, S. and Ruoslahti, E. (1996) Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor- β 1. *Biochem. J.* **315**, 815–820
- 43 Shah, M., Foreman, D. M. and Ferguson, M. W. J. (1992) Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β . *Lancet* **339**, 213–214
- 44 Border, W. A., Okuda, S., Languno, L. R., Sporn, M. B. and Ruoslahti, E. (1990) Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature (London)* **348**, 371–374
- 45 Border, W. A., Noble, N. A., Yamamoto, T., Harper, J. R., Yamauchi, Y., Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. (1992) Natural inhibitor of transforming growth factor- β 1 protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature (London)* **360**, 361–364
- 46 Sharma, K., Jin, Y., Guo, J. and Ziyadeh, F. N. (1996) Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* **45**, 522–530
- 47 Bottinger, E. P., Factor, V. M., Tsang, M. L. S., Weatherbee, J. A., Kopp, J. B., Qian, S. W., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Thorpeysson, S. S. and Sporn, M. B. (1996) The recombinant pro-region of transforming growth factor β 1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor β 1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5877–5882
- 48 Ziyadeh, F. N., Holtman, B. B., Han, D. C., Iglesias-de la Cruz, M. C., Hong, S. W., Isono, M., Chen, S., McGowan, T. A. and Sharma, K. (2000) Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor β antibody in *db/db* diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8015–8020
- 49 O'Connor-McCourt, M. D., Segarini, P., Grotte, S., Tsang, M. L. S. and Weatherbee, J. A. (1995) Analysis of the interaction between two TGF- β binding proteins and three TGF- β isoforms using surface plasmon resonance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **766**, 300–302
- 50 Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L. M., Heinegard, D., Twardzik, D. R., Border, W. A. and Ruoslahti, E. (1994) Interactions of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor β . *Biochem. J.* **302**, 527–534
- 51 López-Casillas, F., Cheletetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S. and Massagué, J. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* **67**, 785–795

Received 30 October 2000; accepted 23 January 2001

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN