



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina
Instituto de Fisiología Celular
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**LA EXPRESIÓN DEL BETAGLICANO (RECEPTOR III DEL
TGF- β) SE ELEVA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL DURANTE
LA MIOGÉNESIS ESQUELÉTICA**

Tesis que para obtener el Título de:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Presenta:
NEFTALÍ YOSHIKI PÉREZ KATO

Director de tesis: Dr. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS

La presente tesis se realizó con el patrocinio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, el Howard Hughes Medical Institute y una beca Probetel de Fundación UNAM.

México, Distrito Federal, 2005.

m. 342463



Universidad Nacional
Autónoma de México

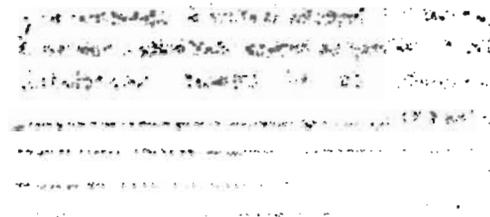


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DEDICATORIAS

A la persona que más quiero en este mundo: mi papá Neftalí. Gracias por el amor, el cariño y la paciencia que siempre me has tenido, así como por el apoyo incondicional que me has brindado para todos mis proyectos. Sé que te he quedado mal a veces, y aun así has estado ahí en cada momento dispuesto a perdonarme, a escucharme y a ayudarme. ¡Te quiero mucho papá!

A la memoria de mi mamá Alicia, de mi oliichan Hideo, de mi abuelo Agustín y de mi abuela Crescencia: su grato recuerdo estará por siempre en mi corazón.

A mi obaachan Kinuyo por todos los magníficos momentos que pasamos juntos en Coatza y por haberme brindado tanto cariño y bondad, cualidades que tu corazón desborda.

A mi hermano Naoki.

A Sumiko, por tu invaluable apoyo a pesar de que a veces hemos tenido diferencias.

A mis tíos Valdés Kato y Jiménez Kato por su cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por haberme brindado tantas experiencias hermosas a lo largo de mi vida universitaria.

A Valentín Mendoza Rodríguez, por la convivencia que hemos tenido en las buenas, pero sobre todo por hacerme el gran favor de escuchar todas las cosas buenas y malas que me suceden y aconsejarme sabiamente, por el grandísimo aliento que me has dado para seguir adelante cuando he estado devastado, incluyendo vida en el laboratorio y fuera de él. Asimismo, por los experimentos que me ayudaste a hacer, sin los cuales, esta tesis simplemente no hubiera salido adelante.

A Fernando López Casillas por haberme brindado la oportunidad de desarrollar los experimentos de esta tesis en su laboratorio, por haber confiado en mí, por haberme tenido paciencia y seguido apoyando a pesar de las decepciones que le causé; además, por haberme mandado a realizar una estancia de investigación en la "Católica" de Chile, experiencia que resultó ser sumamente enriquecedora y "abridora de ojos": definitivamente una de las mejores durante mi licenciatura y que además sobrepasó el ámbito académico.

A Enrique Brandán Siques de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile en Santiago, por haberme permitido realizar una estancia de investigación en su laboratorio para los experimentos de monitoreo de la actividad del promotor del gen del betaglicano en células C_2C_{12} y por haberme patrocinado, entre muchas otras cosas, unas increíbles clases de esquí en Farellones.

A Cecilia Riquelme Illanes por haber aportado muchos datos para el logro de esta tesis. A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Enrique Brandán en Chile por haber sido muy atentos conmigo cuando estuve ahí.

A mis cuates por hacer mi vida considerablemente más agradable: Valentín Mendoza Rodríguez, Carmen Cruz Revilla, Javier González Camarillo, Oscar Enrique Salinas Santana, Rocío Alcántara Hernández, Dayana Torres Rodríguez, Enrique Espinosa Arciniega, Fabiola Méndez, Yazmín Escobedo, Adam Sonabend, Alejandro García, Takahiro Endo Martínez, Mario Bernal Ladrón de Guevara, Jessica Guzmán, Verónica Jarrín, Susana García, Diana Espinoza, Alejandra González Guadarrama, Italiví Miranda Pérez, Aline García Pérez, Julio César Carrero, Lenin Domínguez, Paulina Cortés, Hara sensei (de Soka Gakkai), José Ignacio Zayas Jaramillo, Isela Mendoza Cervantes, Karla Asúnsolo Vargas, Aldo Gelover Escamilla, Rita Orozco, Ximena Martínez, José Luis García Morales, Annika Alberti, Claudia Escobedo Arriaga, Cynthia Sánchez, Ariadna Islas, Eduardo Martínez, Bernardo Franco, Andrés Bendesky e Ivette (creadores del "Oncoclub"), Luis Ramírez Trejo, Tania Jiménez, Said Pérez Rubio, etc. (disculpas por si se me escapan algunos).

A la mamá de Carmen Cruz, por el apoyo que me brindó en momentos de fragilidad emocional y por ayudarme a asimilar sin rencor cosas que pasan en la vida y a despejar algunas de mis dudas existenciales.

A mis profesores cuyas clases fueron altamente inspiradoras: Luis Mendoza Sierra, María Elena Álvarez Buylla, Edmundo Lamoyi Velázquez, Leticia Rocha Zavaleta, Fernando López Casillas, Federico Bermúdez Rattoni, Martha Lilia Escobar, Lino Díaz de León, Irma

Villalpando Fierro, Alfonso León del Río, Claudia González Espinosa, Luis Padilla Noriega, Marina Macías Silva, Yolanda Caballero Arroyo, Martha Menes Arzate y Julio Morán; Ludivina Herrera Luque, Guadalupe Carrera Dorantes e Irma López Saura; Marco Perilli y Cecilia Méndez Nájera.

A mi profesora Esther de las Nieves Paz Pérez Farca por haber abierto mis ojos al fascinante mundo de la biología en quinto de prepa, hecho que considero clave para haber tomado la decisión de estudiar investigación biomédica básica.

A la licenciatura en investigación biomédica básica por haberme hecho crecer, por haberme dado una preparación académica sólida, por haberme hecho pasar momentos de éxtasis y por qué no decirlo, también de desilusión en el laboratorio.

A mis cuates de generación: Rodolfo García, Paula Licon, Ileana Licon, Naika Rueda y Gabriel por la convivencia durante el inicio de nuestra travesía por "IBB", por haber vivido juntos un sinfín de momentos felices en clase y afuera de ella, y cómo no recordarlo, por nuestras discusiones a muerte, al fin y al cabo estériles, sobre mil aspectos de la ciencia. A mis cuates del lab: Gerardo González Núñez, Dulce Mata Espinosa, Paty Juárez Camacho, Verónica Ponce, Gaby Velasco, Adverqueydi Zúñiga, Pepe Esparza y Male Vilchis, por haber compartido momentos de júbilo y de derrota.

A todos los miembros de mi jurado de examen profesional: Marina Macías Silva, Adolfo García Sáinz, Jesús Chimal Monroy, Fernando López Casillas y Alfonso León del Río por haber revisado mi tesis con esmero y haberle corregido errores que creo que yo nunca hubiera notado, sinceramente muchas gracias.

A Juan Manuel Barbosa e Ivette Rosas de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular por haberme ayudado a darle un buen formato de presentación a esta tesis, hurgando en los misterios (al menos para mí) de Word, de Adobe y de mil programas más.

A Edmundo Lamoyi y a Ada Méndez por su eficiente apoyo para los trámites de mi titulación. A Edmundo Lamoyi además por defenderme de una mala persona que quiso perjudicarme abusando de su posición como coordinador de una materia.

A mis tíos Valdés Kato y Jiménez Kato por haberme apoyado económicamente, por haberme "arreado" para que me titulara cuando tenía abandonada esa meta y por no haber perdido la esperanza de que algún día lo lograría.

A Claudia Dixon y Dimitris Georgellis por haber corregido el resumen en inglés de esta tesis con mucha amabilidad y celeridad.

A Benjamín Guerrero, Diego Barona, Ángel Franco, Lenin Reyes, Fernando Ortiz Monasterio y Fernando Molina por fomentar en gran medida mi ego y seguridad.

A tantas personas cuyo apoyo ya sea de compañerismo, académico, técnico, o de cualquier otra índole fue valioso para salir adelante en estos años que duró mi licenciatura.

ÍNDICE

1. Resumen	
I. en español	1
II. en inglés	2
2. Abreviaturas	3
3. Antecedentes	
I. COMUNICACIÓN INTERCELULAR	6
<i>Principales sistemas de señalización</i> <i>intercelular en vertebrados</i>	10
II. EI TGF- β	14
<i>El betaglicano</i>	21
III. MIOGÉNESIS ESQUELÉTICA	50
IV. ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL PRESENTE TRABAJO EXPERIMENTAL	58
4. Hipótesis	59
5. Objetivos	
I. generales	59
II. particulares	59
6. Resultados	60
7. Discusión	84
8. Conclusiones	94
9. Perspectivas	95
10. Procedimientos experimentales	101
11. Referencias	120

Figuras en antecedentes

1. Tipos de señalización y ojo de *Drosophila*
2. Principales sistemas de comunicación intercelular en vertebrados
3. Estructura cristalográfica del TGF- β 2 y de T β RII con TGF- β 3 unido
4. Mecanismo de activación de los receptores del TGF- β
5. Estructura modular del proteoglicano del betaglicano
6. Distribución de los exones en el gen del betaglicano murino
7. Funciones a nivel celular del betaglicano
8. Estructura de los Smads
9. Vía integrada de la señalización por TGF- β de la membrana plasmática al núcleo
10. Regulación molecular de la formación de miotubos a partir de mioblastos

Figuras en resultados

1. Durante la miogénesis se incrementa la cantidad del proteoglicano del betaglicano
2. El nivel del ARNm del betaglicano aumenta durante la miogénesis
3. Translocación de una porción del betaglicano a la matriz extracelular en miotubos
4. Patrón de digestión de los BACps e identificación de los fragmentos de digestión en donde se localiza el promotor
5. Clonación del fragmento *HindIII*—*HindIII* de ~6.5 kb
6. Alineamiento de los promotores del betaglicano de ratón y de rata
7. Estructura de la región promotora, del exón 1 y parte del intrón 1 del gen del betaglicano murino, localización de algunos sitios potenciales de regulación en *cis* y contexto genómico en el que están inmersos
8. Construcciones del promotor del betaglicano – luciferasa
9. Actividad del promotor del betaglicano murino en mioblastos L₆E₉ de rata y en fibroblastos Rat-1 de rata
10. Incremento de la actividad del promotor del betaglicano murino en la miogénesis esquelética
11. Modulación de la actividad del promotor del betaglicano por diversos agentes
12. Transactivación del promotor del gen del betaglicano por MyoD pero no por miogenina
13. Presentación de TGF- β a sus receptores señalizadores a través del betaglicano en mioblastos

Figura en procedimientos experimentales

1. Mapa del plásmido B70 –en el vector pBSII-KS(+)-, cuya secuencia ensamblada se denominó Contig 6.5

Tablas

- I. Reguladores de la expresión o de las propiedades del betaglicano
- II. Nombre de los BACps
- III. *Cluster* de sitios MEF2-MyoD-Myf5
- IV. Ensamble de la secuencia de la clona B70

Anexos

- I. Listado completo de los elementos de regulación en *cis* potenciales hallados con el software "*Professional MatInspector*"
- II. *Reprint* del artículo en la revista *The Journal of Biological Chemistry* donde quedaron reportados los resultados de esta tesis

1. I. Resumen en español

El término factor transformante del crecimiento β (TGF- β) se refiere a una familia de polipéptidos multifuncionales que controlan la proliferación y la diferenciación celular, entre otras funciones. Existen 3 isoformas de TGF- β que ejercen sus acciones a través de tres receptores de alta afinidad localizados en la superficie celular llamados tipo I (T β RI), tipo II (T β RII) y tipo III (T β RIII), conocido este último también como betaglicano. El betaglicano es un proteoglicano de sulfatos de heparano y de condroitina que no posee actividad catalítica –a diferencia de T β RII y T β RI– y que une las 3 isoformas de TGF- β , modulando ya sea positiva o negativamente la interacción de estos ligandos con T β RII. Estas funciones del betaglicano contrarias entre sí pueden estar en función de su nivel de glicanación, de su cantidad relativa con respecto a los receptores señalizadores y de su ubicación extra o pericelular. En la presente tesis se reporta que la expresión del proteoglicano del betaglicano aumenta considerablemente durante la diferenciación de mioblastos C₂C₁₂ en miotubos, un modelo *in vitro* de la formación de músculo esquelético. La elevación de la expresión del proteoglicano del betaglicano en los miotubos se correlaciona con una elevación de su ARNm. Con tal de determinar si la subida en la cantidad del ARNm tiene su origen –al menos en parte– en una mayor transcripción del gen del betaglicano, clonamos y secuenciamos la región promotora del gen y observamos que en los miotubos la actividad del promotor aumenta aproximadamente un orden de magnitud con respecto a la que tiene en los mioblastos. Notablemente, observamos que el comportamiento de un gen reportero fusionado con la región promotora mimetiza *grosso modo* el del ARNm, lo cual sugiere que el segmento que clonamos posee información necesaria para recapitular la actividad del promotor endógeno al menos en las líneas celulares en que fue probado. Asimismo, observamos que en los mioblastos, la región promotora es regulable positivamente por ácido retinoico, un inductor de la miogénesis, y negativamente por TGF- β , un inhibidor de la miogénesis, pero no por bFGF, otro inhibidor de la miogénesis. Encontramos también que MyoD, un factor de transcripción miogénico maestro, capaz de transdiferenciar fibroblastos en mioblastos, incrementa 3 veces la actividad del promotor. El análisis estructural del promotor revela sitios potenciales de regulación por transactivadores importantes durante el desarrollo muscular como MyoD, MEF2, GATA4, NF-ATc y Smad3 y 4. También encontramos que en los miotubos, una parte de la masiva población de las moléculas de betaglicano se transloca a la matriz extracelular, donde podría secuestrar a factores de crecimiento como TGF- β y/o bFGF. Mioblastos transducidos con un adenovirus que expresa al betaglicano silvestre muestran una mayor sensibilidad al TGF- β , lo cual sugiere que en los mioblastos el betaglicano potencia la unión del TGF- β a sus receptores señalizadores y también sugiere que lo hace durante la conversión de estas células en miotubos.

1. II. Resumen en inglés

The term type β transforming growth factor (TGF- β) refers to a family of multifunctional polypeptides that control cell proliferation and differentiation, among other cell functions. There are three TGF- β isoforms that exert their effects through three high affinity cell surface receptors, types I (T β RI), II (T β RII), and III (T β RIII); T β RIII is also called betaglycan. Betaglycan is a heparan- and chondroitin-sulphate proteoglycan that has no known signaling motifs, in contrast to T β RII and T β RI. T β RIII is believed to be a co-receptor that either enhances or restrains TGF- β signaling through modulation of the contact between T β RII and TGF- β . Three aspects of betaglycan could be responsible for its dual function: i) its degree of glycosylation, ii) its ratio with regard to the signaling receptors, and iii) its extra- or pericellular localization.

In this thesis, we report that expression of betaglycan increases considerably during differentiation of C₂C₁₂ myoblasts into myotubes, a model of skeletal muscle formation *in vitro*. Augmented expression of betaglycan in myotubes is correlated with elevated levels of its mRNA. To determine whether the rise in the betaglycan mRNA is the consequence of transcriptional upregulation, we cloned the promoter region of the murine betaglycan gene and fused it to the luciferase gene to create a reporter. Using this construct, we demonstrated that the activity of the cloned promoter is about one order of magnitude higher in myotubes than in myoblasts. Furthermore, we observed that the behavior of the reporter-fusion mimics approximately that of the actual betaglycan mRNA, suggesting that the stretch of promoter we cloned possesses necessary information to carry out the function of the endogenous gene promoter, at least in the cell lines we tested (L₆E₉, Rat-1 and C₂C₁₂).

In addition, we observed that in myoblasts, the cloned promoter is regulated positively by retinoic acid, an inducer of myogenesis, and negatively by TGF- β , an inhibitor of myogenesis. It is noteworthy that bFGF, another inhibitor of myogenesis, has no effect on the activity of this promoter. We also found that MyoD, a master myogenic transcription factor capable of trans-differentiating fibroblasts into myoblasts, increased by 3-fold the activity of the betaglycan promoter. Structural analysis of the promoter region revealed several potential DNA targets of *trans*-acting factors that are important during muscle development such as MyoD, MEF2, GATA4, NF-ATc, and Smads 3 & 4.

Moreover, we observed that during myogenesis, some betaglycan molecules become translocated into the extracellular matrix, where they could function as a reservoir of growth factors such as TGF- β and/or bFGF. This in turn, if true, could provide an additional step for fine-tuning the signaling capability of one or both ligands.

Finally, we demonstrate that myoblasts transduced with an adenovirus-encoding betaglycan have an increased sensitivity to TGF- β , suggesting that betaglycan functions as an enhancer of TGF- β binding to its signaling receptors in proliferating myoblasts. This finding also suggests that betaglycan has the same function when these cells undergo differentiation.

2. Abreviaturas

5'-NT	región 5' no traducida de un ARNm
3'-NT	región 3' no traducida de un ARNm
[Ca ²⁺] _i	concentración intracelular de calcio
a.a.	aminoácidos
ActR-IB	receptor IB de activina
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Adv-BG	adenovirus que expresa al betaglicano silvestre de rata
aFGF	<i>acidic FGF</i>
ANF	factor natriurético auricular
Ants	antisocial
APC	<i>anaphase promoting complex</i> o ciclosoma
AraC	β-D-arabino-furanósido de citosina
ARN	ácido ribonucleico
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BACgs	BACs que contienen al gen del betaglicano sin incluir al promotor
BACps	BACs que contienen al promotor y parte del gen del betaglicano
BAMBI	<i>BMP, activin, and TGF-β membrane-bound inhibitor</i>
bFGF	<i>basic FGF</i>
BG	betaglicano o receptor tipo III del TGF-β
bHLH	dominio básico seguido de uno hélice-asa-hélice
Blow	<i>blown fuse</i>
BMPR-I	receptor I de BMPs
BMPs	proteínas morfogenéticas óseas
Brn-2	<i>brain-2</i>
BSA	albúmina de suero bovino
c-Ski	<i>cellular transforming protein of the Sloan Kettering Institute virus</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CaMKII	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
Cak	<i>cdk activating-kinase complex</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD	<i>clusters of differentiation</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
Ci	curie
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CK	cinasa de creatina
CMV	citomegalovirus
CPBP	<i>core promoter-binding protein</i> ó ZF9
CREB	<i>cAMP-responsive element binding protein</i>
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
Dhh	<i>desert hedgehog</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxinucleótidos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP
DPC4	<i>deleted in pancreatic carcinoma 4</i> , también conocido como Smad4
DSS	suberato de disuccinimidilo

Duf	<i>dumbfounded</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EFP	extracto de embrión de pollo
ELF	<i>embryonic liver fodrin</i>
e.g.	<i>exempli gratia</i>
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
et al.	<i>et alii</i>
FCM	mioblasto competente para la fusión
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FKBP12	proteína de 12 kDa que bloquea la actividad basal de TβRI
FKHR	<i>forkhead in human rhabdomyosarcoma</i>
Freac-1	<i>forkhead-related activator 1</i> , también conocido como HFH-8
Freac-2	<i>forkhead-related activator 2</i> , también conocido como LUN ó FoxF2
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>
GAGs	glicosaminoglicanos
GFI-1	<i>growth factor independence-1</i>
HAT	<i>histone acetyltransferase</i>
HBSS	sales balanceadas de Hanks
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HGF/SF	<i>hepatocyte growth factor / scatter factor</i>
HLH	dominio hélice-asa-hélice
Id	<i>inhibitor of differentiation</i>
i.e.	<i>id est</i>
IgG	inmunoglobulina de isotipo G
Ihh	<i>indian hedgehog</i>
IFN-γ	interferón γ
IP	inmunoprecipitación
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
kb	kilobases
K _D	constante de disociación
λ	longitud de onda en algunos casos, nombre de un bacteriófago en otros
LAP	<i>latency-associated polypeptide</i>
LB	medio Luria Bertani
Lef1/Tcf	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1 / T cell-specific factor</i>
LTBP	<i>latent TGF-β binding protein</i>
Lux	luciferasa
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mbc	<i>myoblast city</i>
MEF2s	<i>myocyte-specific enhancer-binding factors 2</i>
MEKK1	<i>MAPK/ERK kinase kinase 1</i>
MH	<i>mad-homology region</i>
MIP-1α	proteína 1α inflamatoria de macrófagos
Miz-1	<i>myc-interacting zinc-finger protein 1</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MRFs	<i>muscle regulatory factors</i>
MZF1	<i>myeloid zinc finger 1</i>
N-CAM	<i>neural cell-adhesion molecule</i>
N-CoR	<i>nuclear receptor co-repressor</i>

NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
nt	nucleótidos
PAI-1	<i>plasminogen-activator inhibitor 1</i>
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pCAF	<i>p300/CBP-associated factor</i>
PKC	proteína cinasa C
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PP	fosfatasa
rpm	revoluciones por minuto
SARA	<i>smad anchor for receptor activation</i>
SBE	<i>smad-binding element</i>
SC	suero de caballo
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero de feto bovino
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
Smad	de sma + mad, factor transcripcional de la vía del TGF- β /activina/BMPs
Smurf	<i>smad ubiquitination-regulatory factors</i>
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
Sns	<i>sticks and stones</i>
Sp1	<i>stimulating protein 1</i> , factor transcripcional general
SRE	elemento de respuesta a suero
SRF	factor de respuesta a suero
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAB1	<i>TAK-binding protein 1</i>
TAK1	<i>TGF-β-activated kinase 1</i>
T β RI	receptor tipo I del TGF- β
T β RII	receptor tipo II del TGF- β
T β RIII	receptor tipo III del TGF- β o betaglicano
TB	<i>terrific broth</i>
TGF- β	factor transformante del crecimiento β
T _m	temperatura de fusión
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
TRIP-1	<i>TGF-β receptor interacting protein-1</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
V-CAM	<i>vascular cell-adhesion molecule</i>
v.g.	<i>verbi gratia</i>
vs.	<i>versus</i>
WB	<i>western blot</i>
Wnt	<i>wingless / integration region</i>
WT-1	<i>Wilms' tumors</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
ZO-1	<i>zona occludens 1</i>

3. Antecedentes

3.1. COMUNICACIÓN INTERCELULAR

Las células se comunican entre sí a través de señales que liberan o que exhiben en su superficie. Tanto las células eucarióticas como las procarióticas poseen sistemas para dar señales a las demás células en su entorno, además de contar con sistemas para recibirlos; las señales emitidas son indicaciones de la más variada índole: detener la división de una célula, contraerla en caso de que sea de tipo muscular, detonar su diferenciación para modificar sus propiedades funcionales, hacerla secretar sustancias como en el caso de una neurona, etc., que en un contexto global, conducen a que el organismo mantenga su homeostasis, se desarrolle, se reproduzca, escape de situaciones que atentan contra su supervivencia o bienestar, etc.

En el caso de las bacterias, se conoce un mecanismo por el cual bacterias de diversas especies se asocian entre sí para formar "biopelículas", cápsulas que se pueden formar en prótesis artificiales dentro del cuerpo humano para evitar ser atacadas por el sistema inmune. Para formar este tipo de agrupaciones, las bacterias liberan señales que por ejemplo, inducen la diferenciación de las células que se quedaron en la capa más externa de la biopelícula para convertirlas en una especie de escudo protector.

Las células de los organismos superiores también se comunican entre sí: lo hacen por medio de moléculas de señalización entre las que se incluyen: proteínas, péptidos pequeños, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos e incluso gases disueltos como óxido nítrico, etileno (en el caso de las plantas) y monóxido de carbono. Como ejemplos tenemos:

Proteínas:	Factor transformante del crecimiento β (TGF- β), Hedgehogs (Shh, Ihh, Dhh), Wnts
Péptidos pequeños:	Angiotensina II
Derivados de aminoácidos:	Glutamato, serotonina, acetilcolina, dopamina, adrenalina
Nucleósidos:	Adenosina
Esteroides:	Testosterona, progesterona, cortisol, estradiol
Retinoides:	Ácido retinoico
Derivados de ácidos grasos:	Prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos

Las moléculas de señalización pueden ser secretadas mediante exocitosis; liberadas y dispersadas mediante difusión; o simplemente estar embebidas en la membrana celular y afectar sólo a las células vecinas que tienen contacto con estas moléculas. A la célula que emite la señal se le conoce como célula *señalizadora*. La célula *blanco* (o célula *diana*), que es la que captura a la molécula señalizadora, lo hace por medio de una proteína específica llamada **receptor**, el cual, acto seguido, inicia una serie de eventos adentro de la célula que conducen a que ésta dé una respuesta. En la mayoría de los casos, los receptores son proteínas transmembranales situadas en la superficie de la célula blanco; cuando unen la molécula señalizadora (el **ligando**) se activan y generan cascadas de señalización intracelular. No obstante, en algunos casos los receptores están dentro de la célula blanco y por ende el ligando debe pasar a través de la membrana celular para activarlos. El receptor y su ligando pueden establecer contacto gracias a que sus respectivas formas se acoplan entre sí; las fuerzas que hacen posibles

las interacciones entre sus respectivas superficies son no covalentes y pueden incluir: fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals; la afinidad de la unión del receptor con su ligando es un reflejo de la fuerza con que se acoplan. La actividad, por su parte, se define como la capacidad de la señal para producir un efecto determinado. El efecto que una señal ejerce en una célula blanco depende del tipo de receptores que para esa señal posea y de la maquinaria intracelular a la que se acoplen dichos receptores, de modo que células blanco diferentes entre sí pueden responder de manera diferente ante una misma señal. Por ejemplo, el neurotransmisor acetilcolina induce la contracción de músculo esquelético, pero disminuye la tasa y fuerza de contracción de músculo cardíaco. Esto se debe a que ambos tipos de músculo poseen receptores de acetilcolina diferentes. Más aún, aunque células secretoras poseen el mismo receptor de acetilcolina que las células musculares cardíacas, en ellas el neurotransmisor no induce relajación sino secreción, lo cual refleja diferencias en la maquinaria interna a la que están acoplados dichos receptores. Comúnmente, la señal, luego de unirse a su receptor, hace que éste se active y realice sus funciones, como ya se mencionó, en cuyo caso se conoce a la señal como agonista (de la palabra griega *agonistes*, que significa campeón, guerrero). Sin embargo, hay veces en que el ligando se pega al receptor pero no permite que éste se active, y por ende, que produzca efectos; es decir, posee afinidad por el receptor pero carece de actividad, en cuyo caso se llama a la señal, antagonista. ¿Por qué el uno sí y el otro no? La diferencia estriba en que el uno induce un cambio tal en la estructura tridimensional del receptor, que lo activa, mientras que el otro, no.

El comportamiento de las células en el interior de un organismo animal es regulado por lo general de manera altamente específica por un repertorio inmenso de conjuntos de señales –heterogéneas entre sí– que surgen de la combinación de señales homogéneas –de una variedad comparativamente menor. Los diferentes tipos celulares adentro de un organismo animal requieren de diferentes señales para sobrevivir y por lo tanto están restringidos a ambientes particulares dentro del cuerpo. En los animales operan comúnmente seis sistemas para ejecutar y coordinar dentro del organismo la comunicación intercelular, los cuales se se ilustran en la Figura A1 y se describen someramente a continuación:

1. Señalización paracrina

Se presenta cuando una célula secreta o libera al medio extracelular señales que captan las células vecinas a la célula emisora. A manera de analogía, es como la señal radiofónica de una emisora local, que se logra captar bien hasta cierta distancia de ésta. Como ejemplo, tenemos un evento que ocurre durante la formación del ojo de *Drosophila*. El ojo de esta mosquita surge a partir del disco imagal ocular, compuesto por una capa epitelial monoestratificada. Como no hay células inmediatamente arriba o debajo de esta capa, las interacciones quedan restringidas a las células vecinas en dos dimensiones. La región posterior del disco imagal ocular es la primera en experimentar los efectos de una ola de señales secretadas conocida como surco morfogenético que induce los primeros eventos que llevan a la formación de los omatidios, órganos fotorreceptores del ojo compuesto de este insecto (figura A1). Las células localizadas justo detrás del surco secretan la proteína Hedgehog (Hh), la cual se difunde a las células indiferenciadas localizadas en el surco y en ellas induce la expresión y secreción de la proteína Decapentaplegic (Dpp); ésta se difunde anteriormente abarcando unas cuantas hileras celulares y se une a receptores específicos en las células vírgenes. La señal Dpp induce la morfogénesis y

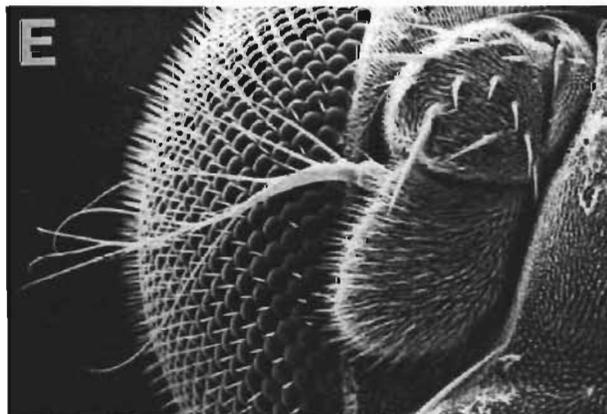
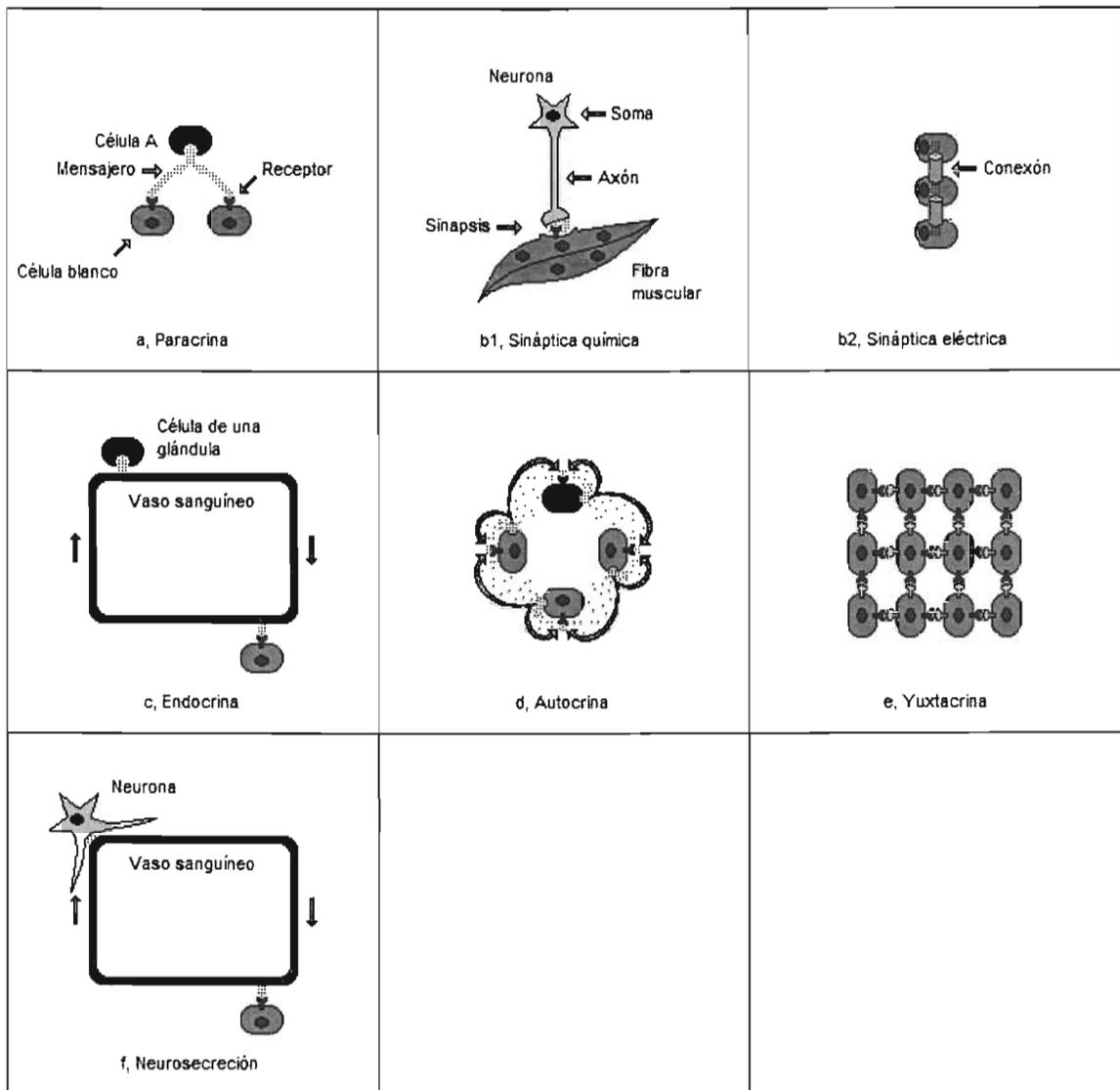


Figura A1. Tipos de señalización. a, paracrina; b1, sináptica química; b2, sináptica eléctrica; c, endocrina; d, autocrina; e, yuxtacrina; f, neurosecreción. E, Fotografía de microscopía electrónica de barrido del ojo compuesto de *Drosophila*, formado por aproximadamente 800 órganos fotorreceptores idénticos, los omatidios.

diferenciación de los omatidios, pero también, la producción y secreción de Hh. Dado que Hh induce a Dpp y éste a su vez a Hh, la ola de señalización se autoinduce y se propaga anteriormente en el disco, dejando una estela de diferenciación a su paso.

2. Señalización sináptica

Existen dos modalidades de señalización sináptica: la química y la eléctrica. La *química* ocurre cuando una neurona envía un impulso eléctrico —conocido como potencial de acción— a lo largo de su axón (un proceso largo), que al llegar al extremo de éste, la terminal nerviosa, produce la descarga de neurotransmisores (e.g., serotonina, glutamato, acetilcolina) al soma o a las dendritas de las células blanco (e.g., otras neuronas, células musculares esqueléticas). Las terminales nerviosas contactan a su célula blanco en uniones celulares especializadas denominadas sinapsis químicas, que poseen un diseño que asegura una llegada rápida y específica del neurotransmisor a la célula blanco. A la transmisión sináptica química también se le conoce como neurotransmisión. El sentido en el que viaja el neurotransmisor es unidireccional, siendo sólo de la célula presináptica (la neurona) a la postsináptica (la célula blanco). Sin embargo, la célula postsináptica puede en algunos casos, una vez que se descargó sobre sí el neurotransmisor y a manera de reacción, señalar a la presináptica con óxido nítrico, al que se conoce entonces como mensajero retrógrado. La señalización sináptica química suele ser de largo alcance, dado que las neuronas extienden sus axones hasta células blanco lejanas. En el caso de la señalización sináptica *eléctrica*, las señales (e.g., Ca^{2+} , AMP cíclico) pasan de una célula a otra a través de *gap junctions* (estructuras especializadas a modo de túneles que intercomunican citoplasma) y a diferencia de la química, estas señales pueden viajar en cualquier dirección.

3. Señalización endocrina

Se lleva a cabo cuando hormonas (e.g., insulina, adrenalina) liberadas por glándulas inductoras o de secreción interna (e.g., hipófisis, glándula pineal, glándulas suprarrenales, glándulas genitales: testículos y ovarios) viajan por el torrente circulatorio para luego establecer contacto con sus células blanco a través de receptores y así transmitirles una señal. Las señalizaciones paracrina y endocrina, a diferencia de la sináptica, son relativamente más lentas y además las células sobre las que inciden sus mensajeros son varias y no una sola. Considerando que la interacción entre los sistemas endocrino y nervioso es muy cercana, ambos sistemas se pueden considerar como el sistema neuroendocrino.

4. Señalización autocrina

Se da cuando los mensajes que salen de una célula tienen como destino la misma célula que los emanó, o bien, células idénticas a ella, ya que éstas poseen los receptores adecuados para retenerlos. Como ejemplo tenemos que durante la embriogénesis, una vez que un grupo de células idénticas empieza a atravesar por una etapa de diferenciación, puede secretar señales que actúan sobre el mismo grupo para promover el proceso de diferenciación, de modo que una célula que emite una señal es capaz de recibirla pero también son capaces de recibirla las demás células del grupo. A manera de analogía, es como un equipo de futbolistas que se alientan echándose porras a sí mismos: cualquiera que lance la porra se alienta a sí mismo, pero también lo hacen los demás jugadores que la escuchan.

5. Señalización yuxtacrina

Acontece cuando dos células establecen comunicación entre sí mediante el contacto físico directo de ambas células. Receptores integrales de membrana (*i.e.*, transmembranales o vinculados a ella a través de enlaces como el de glicosilfosfatidilinositol) en una célula se unen a ligandos también integrales de membrana de la otra célula, de manera que quedan pegadas en una región, en la cual los planos de las superficies celulares de ambas células quedan paralelos.

6. Señalización por neurosecreción

Conocida también como secreción neuroendocrina, sucede cuando neuronas vierten sus hormonas al torrente circulatorio para luego incidir en células blanco. Como ejemplos de hormonas neurosecretadas tenemos a la oxitocina, importante durante el proceso de parto, y a la hormona antidiurética.

Cabe mencionar que una sola molécula de señalización puede participar en dos o más de las señalizaciones mencionadas; pero también, una sola célula puede estar sujeta a más de uno de estos tipos de señalización.

Principales sistemas de señalización intercelular en vertebrados

Las respuestas ante las señales extracelulares en general están determinadas por la naturaleza de la célula diana así como por la naturaleza de la molécula señalizadora. Aun cuando diferentes tipos de células tengan un receptor idéntico, el conjunto de efectores intracelulares, llámense proteínas y genes regulados por él, es diferente. Esto se debe a que cada tipo de célula posee un conjunto único de proteínas que determina la respuesta que emerge ante la llegada de la señal; cabe hacer notar que para activar la transcripción de un gen eucariote no es suficiente la unión de un solo factor transcripcional (*e.g.*, un receptor intracelular) al promotor del gen, sino que se necesita que cooperen más factores transcripcionales para lograr activarlo, algunos de los cuales son específicos de ciertos tipos celulares. Así, por ejemplo, un receptor intracelular –una vez activado por la unión de su ligando– regulará la transcripción de genes sólo en los tipos celulares que lo expresen, pero el conjunto de genes regulados será un reflejo de las colaboraciones que haya establecido el receptor intracelular con los demás factores transcripcionales que cada tipo celular exprese.

Los receptores se pueden clasificar con base en su localización celular en receptores de la superficie celular y en receptores intracelulares. Los receptores de la superficie celular que transmiten señales al interior de la célula lo hacen fungiendo como canales iónicos o como enzimas; o bien, vinculándose a proteínas G ó a enzimas. Se dice que estos receptores actúan como transductores, es decir, capturan extracelularmente un tipo de señal (el ligando), que les da la indicación de transmitir intracelularmente otro tipo de señal(es). Los receptores que funcionan como canales iónicos están involucrados en la señalización sináptica eléctrica, se abren o se cierran momentáneamente ante la llegada de su ligando, un neurotransmisor, con lo cual modifican la permeabilidad iónica de la membrana plasmática y, por lo tanto, la excitabilidad de la célula postsináptica. Los receptores con actividad de canal iónico pertenecen a una familia de proteínas homólogas transmembranales que atraviesan varias veces la membrana.

Los receptores que actúan como enzimas son en su mayoría proteínas que atraviesan una sola vez la membrana celular, unen al ligando afuera de la célula y catalizan

reacciones adentro. Constituyen un grupo muy heterogéneo donde la mayoría de sus integrantes son cinasas. Estas cinasas pueden ser de serinas y treoninas, o de tirosinas.

Los receptores que se vinculan a proteínas G regulan indirectamente la actividad de otras proteínas integrales de membrana, como enzimas o canales iónicos. Lo hacen a través de mediadores llamados *proteínas reguladoras triméricas que unen GTP (proteínas G)*. Si son enzimas las que resultan reguladas, cambia la concentración de mediadores intracelulares como AMP cíclico ó inositol trifosfato (IP₃) y Ca²⁺, mientras que si son canales iónicos se altera la permeabilidad iónica de la membrana celular. Los mediadores intracelulares a su vez promueven o restringen la actividad de otras proteínas en la célula. Todos los receptores vinculados a proteínas G pertenecen a una superfamilia de proteínas homólogas que atraviesan 7 veces la membrana celular.

Existe otra variedad de receptores, los que se vinculan a enzimas pero que no lo son *per se*. Como ejemplo tenemos al receptor de la hormona del crecimiento, que posee asociada una cinasa de tirosina que propaga la señal al interior de la célula.

Las señales que son captadas en la superficie celular por receptores con actividad enzimática o por aquéllos vinculados a proteínas G comúnmente llegan hasta el núcleo donde alteran la expresión de genes específicos. Para que estas señales puedan llegar al núcleo, existen sistemas de relevo conformados por proteínas intracelulares. La mayoría de estas proteínas son fosforiladas por proteínas cinasas o forzadas a unir GTP ante la llegada de la señal. En ambos casos, las proteínas de relevo adquieren uno o más grupos fosfato cuando llega la señal, y los pierden cuando se va. Estas proteínas *fosforiladas*, a su vez, causan la fosforilación de otras proteínas, de modo que se crea una *cascada de fosforilaciones* cuyo destino final es el núcleo. Como la emergencia de conductas celulares complejas –como sobrevivencia, proliferación o diferenciación– depende de un conjunto de múltiples señales como se mencionó anteriormente, las células cuentan con mecanismos que les permiten integrarlas para luego dar una respuesta global altamente ajustada que resultó de la integración de las señales.

Los receptores intracelulares pertenecen a la superfamilia del mismo nombre, dado que están estructuralmente relacionados entre sí. Se localizan en el citosol –el espacio del citoplasma sin contar a los organelos delimitados por membrana– o en el núcleo; una vez activados por su ligando, regulan directamente la transcripción de genes específicos en forma de hetero u homodímeros. Los ligandos de los receptores intracelulares resultan ser hidrofóbicos y pequeños, y dado que son prácticamente insolubles en medios acuosos, deben ser transportados en el torrente sanguíneo y en otros fluidos extracelulares unidos a proteínas acarreadoras, de las que se disocian antes de entrar a la célula blanco.

En la Figura A2 se ilustran 16 vías de señalización comunes que emplean diferentes mecanismos bioquímicos.

(Referencias de libros: Alberts *et al.*, 1994; García Sáinz, 1998; Gerhart *et al.*, 1998; Guyton y Hall, 2001. Referencias de artículos originales: i. del receptor de Hedgehogs: Deneff *et al.*, 2000, Lewis *et al.*, 2001, Taipale *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2003; ii. del receptor de Wnts: Pinson *et al.*, 2000, Tamai *et al.*, 2000, Wehrli *et al.*, 2000).

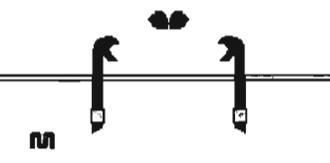
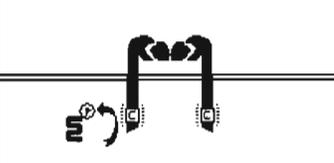
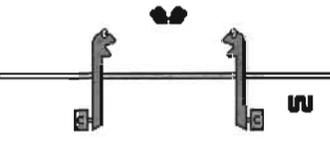
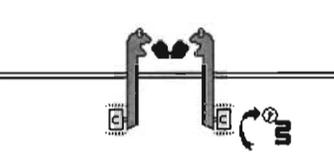
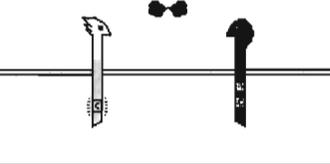
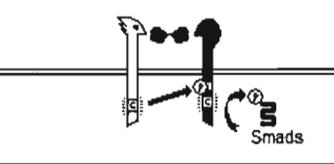
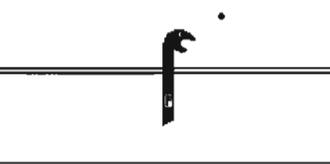
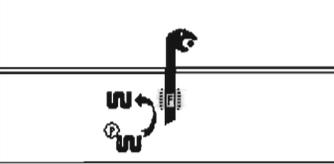
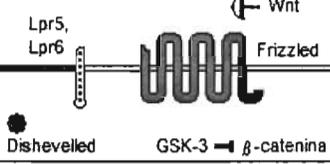
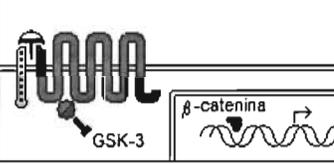
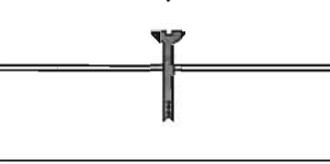
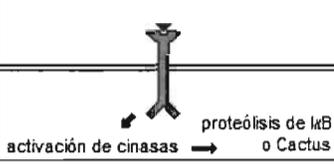
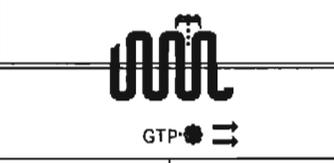
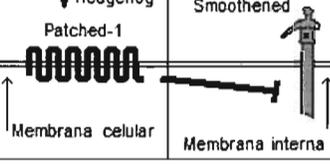
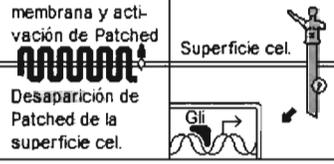
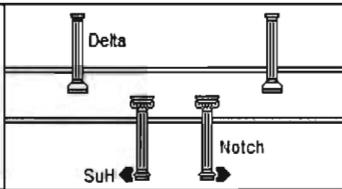
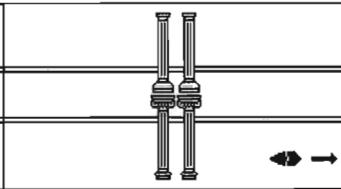
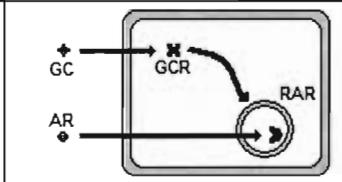
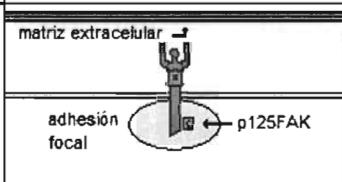
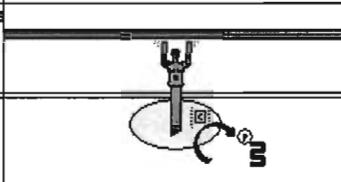
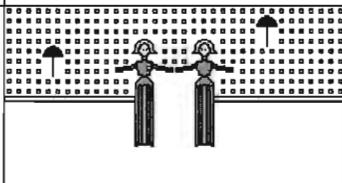
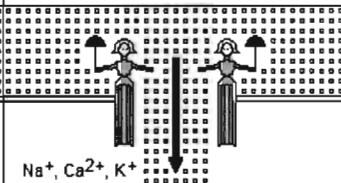
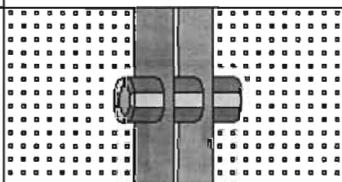
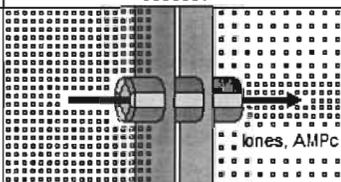
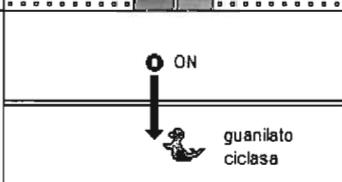
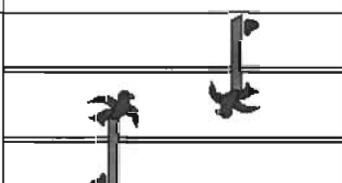
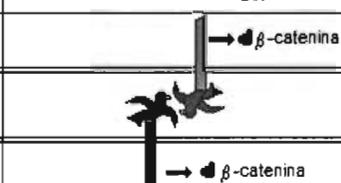
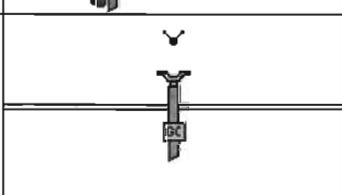
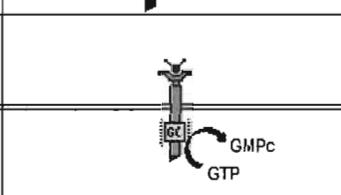
<p>1. Cinasas transmembranales de tirosina.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Factor de crecimiento epidérmico - Insulina</p>		
<p>2. Receptores asociados a cinasas citoplásmicas de tirosina.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Hormona del crecimiento - Interleucina 2</p>		
<p>3. Cinasas transmembranales de serina y treonina.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - TGF-β2 - BMP-7</p>		
<p>4. Fosfatasa transmembranales.</p> <p>Ejemplos de ligandos: Se desconocen, pero pueden ser proteínas de la matriz extracelular</p>		
<p>5. Receptor de Wnts.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Proteínas Wnt en vertebrados - Proteína Wingless en <i>Drosophila</i></p>		
<p>6. Receptores Toll y de IL-1.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Interleucina 1 - Spätzle</p>		
<p>7. Receptores acoplados a proteínas G, de 7 dominios transmembranales.</p> <p>Ejemplos de ligandos: Odorantes y sabores</p>		
<p>8. Receptor de Hedgehogs (de "puercos espinos").</p> <p>Ejemplos de ligandos: Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog</p>		

Figura A2. Principales sistemas de comunicación intercelular en vertebrados. En la parte de en medio (de cada fila) se muestra el receptor antes de la llegada de su ligando, mientras que en la parte de la derecha se muestra lo que sucede cuando éste llega. Hedgehog se puede anclar a la membrana por el colesterol que covalentemente se le une en una reacción de autoprosesamiento. Abreviaturas: Cel: celular; GSK-3 β : *Glycogen synthase-kinase-3 β* ; Hh: *Hedgehog*; ON: óxido

<p>9. Notch / Delta.</p> <p>Ligando: Delta</p>		
<p>10. Receptores nucleares de hormonas.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Ácido retinoico - Glucocorticoides - Estrógenos - Tiroxina</p>		
<p>11. Integrinas.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Otras integrinas - Fibronectina - Laminina</p>	<p>matriz extracelular →</p>  <p>adhesión focal ← p125FAK</p>	
<p>12. Canales catiónicos abiertos por ligando.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Glutamato - Acetilcolina</p>		 <p>Na⁺, Ca²⁺, K⁺</p>
<p>13. Uniones comunicantes.</p>		 <p>iones, AMPc</p>
<p>14. Receptor de óxido nítrico.</p> <p>Ligando: Óxido nítrico</p>	 <p>ON → guanilato ciclasa</p>	 <p>GMPc GTP</p>
<p>15. Cadherinas.</p> <p>Ejemplos: - N-Cadherina - L-Cadherina</p>		 <p>β-catenina</p>
<p>16. Receptores guanilato ciclasa.</p> <p>Ejemplos de ligandos: - Péptido natriurético auricular - Guanilato ciclasa del esperma de erizo</p>		 <p>GMPc GTP</p>

nítrico; p125^{FAK}: *Focal adhesion kinase* de 125 kDa; SuH: *Suppressor of Hairless*; TGF- β2: Factor transformante del crecimiento β2; Lpr5 y 6: *Low density-lipoprotein receptor related proteins 5 y 6*; Wnt: proteínas Wingless-Int (de *integrated*).

3. II. EL TGF- β

Descubrimiento del TGF- β

En 1981, el grupo de Michael Sporn y Anita Roberts en los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos purificó un polipéptido de plaquetas que al ser aplicado a fibroblastos normales de riñón de rata –cuyo crecimiento era estrictamente dependiente del anclaje al sustrato–, adquirirían la capacidad de crecer y formar colonias en agar suave (en presencia del factor de crecimiento epidérmico), *i.e.*, se transformaban temporalmente perdiendo su dependencia al anclaje (Roberts *et al.*, 1981). Así, el **factor transformante del crecimiento β** (TGF- β) fue descubierto originalmente como un factor secretado que inducía una transformación maligna reversible *in vitro*. Ahora es reconocido como un miembro prototípico de una superfamilia de polipéptidos homo o heterodiméricos secretados. Estos factores inciden sobre una variedad de procesos biológicos tanto en células transformadas como normales, incluyendo la regulación de la proliferación celular y la diferenciación.

Superfamilia del TGF- β

La superfamilia del TGF- β está integrada en humanos por 42 citocinas pleiotrópicas estructuralmente relacionadas entre sí que se clasifican en familias de acuerdo a su homología en secuencia. En función de la vía de señalización que emplean, podemos agrupar por un lado a las familias de TGF- β , activinas y nodales, y por otra parte, a las familias de BMPs (proteínas morfogenéticas óseas, llamadas así por su capacidad de promover la formación de hueso y también de cartilago), GDFs (*growth and differentiation factors*) y MIS (sustancia inhibidora de Mueller). La familia del TGF- β está integrada a su vez por los miembros TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (Shi y Massagué, 2003); la de activinas por activinas *per se* e inhibinas. Uno de los primeros miembros de la superfamilia de TGF- β en ser descubierto fue Decapentaplegic, originario de *Drosophila* y nombrado así porque mutaciones en su gen le causan a esta mosquita deficiencias y duplicaciones de estructuras derivadas de sus 15 discos imagales principales (Spencer *et al.*, 1982). Decapentaplegic forma parte de la familia de BMPs, dado que su mayor parecido es con BMP2 y con BMP4. En un artículo de revisión de David Kingsley de 1994 se pueden encontrar clasificados a varios de los miembros de esta superfamilia (Kingsley, 1994).

Estructura del TGF- β

TGF- β 1 fue el primer miembro de la familia del TGF- β en ser descubierto, habiéndose purificado de placenta (Frolik *et al.*, 1983) y de plaquetas (Assoian *et al.*, 1983). Luego vino la identificación del TGF- β 2 y del TGF- β 3, y se determinó que las tres isoformas de TGF- β que existen en los mamíferos están codificadas por sendos genes. Las tres isoformas de TGF- β provienen de precursores: TGF- β 1 de uno de 390 aminoácidos (a.a.) y TGF- β 2 y TGF- β 3, ambos, de unos de 412 a.a. Cada precursor contiene una señal secretora en el extremo amino, un presegmento llamado “polipéptido asociado con la latencia” (LAP, de *latency-associated polypeptide*) y un polipéptido de 112 a.a. en el extremo carboxilo que constituye el monómero maduro y bioactivo del TGF- β . La identidad en estructura primaria de los monómeros maduros de las tres isoformas de TGF- β es del 70 al 80% (Derynck *et al.*, 1985; de Martin *et al.*, 1987; Derynck *et al.*, 1988; ten Dijke *et al.*, 1988). Un corte proteolítico hecho en sucesión a un motivo tetrabásico (R-H-R-R) libera al monómero del LAP; la proteasa responsable de este corte es furina, una

convertasa que hidroliza péptidos secretados en sitios multibásicos (Dubois *et al.*, 1995, 2001).

La forma biológicamente activa del TGF- β es un homodímero hidrofóbico cuyos monómeros (segmentos maduros de TGF- β) están unidos entre sí por un puente disulfuro, y aunque también se han hallado heterodímeros de TGF- β 1 y TGF- β 2, la relevancia biológica de éstos no se conoce (Assoian *et al.*, 1983; Derynck *et al.*, 1985; Cheifetz *et al.*, 1987).

El polipéptido maduro de 112 a.a. de TGF- β cuenta con nueve cisteínas –conservadas entre especies–, ocho de las cuales están apareadas. La estructura tridimensional del homodímero de TGF- β 2 se asemeja a un camastro visto de perfil (Figura A3); revela además que las ocho cisteínas forman puentes disulfuro intramoleculares que en conjunto constituyen un “nudo de cisteínas”, mientras que la novena restante forma parte del enlace de cistina intermolecular que media la dimerización. Cada monómero contiene cuatro láminas β antiparalelas y una hélice α larga separada (Daopin *et al.*, 1992; Schlunegger y Grütter, 1992). Dadas las semejanzas en secuencia –incluyendo el número y la ubicación de las cisteínas– entre los miembros de la superfamilia del TGF- β , es probable que éstos adopten conformaciones estructurales parecidas, como lo ha demostrado la estructura de BMP-7 (Griffith *et al.*, 1996). La secuencia de aminoácidos entre la cisteína cinco y la seis, que es la más divergente entre las isoformas de TGF- β y entre los demás miembros de la superfamilia del TGF- β , queda expuesta en la superficie de la molécula y puede tener un papel importante en la determinación de la especificidad del reconocimiento ligando-receptor.

Los presegmentos de los precursores de las tres especies de TGF- β tienen algunos elementos estructurales importantes para su actividad y/o plegamiento: a) tres residuos de cisteína, dos de ellos involucrados en la formación de puentes disulfuro intercatenarios; b) dos sitios de *N*-glicosilación en donde se adiciona manosa-6-fosfato, la cual media la unión del presegmento con el receptor de manosa-6-fosfato; y c) un segmento de aminoácidos hidrofóbicos que sucede al péptido señal que posiblemente participa en el plegamiento del presegmento (Derynck *et al.*, 1988; ten Dijke *et al.*, 1988; Miyazono *et al.*, 1988, 1991; Purchio *et al.*, 1988; Kovacina *et al.*, 1989; López *et al.*, 1992).

La caracterización bioquímica del TGF- β ha demostrado que éste se secreta normalmente como un complejo proteico constituido por el homodímero maduro del TGF- β y dos presegmentos que interactúan de manera no covalente con el dímero. Los presegmentos impiden que el TGF- β maduro active a sus receptores, por lo que se dice que lo mantienen en un estado inactivo o “latente” (Miyazono *et al.*, 1988; Wakefield *et al.*, 1988). Además, los presegmentos se pueden requerir para la secreción del TGF- β y para el direccionamiento del TGF- β latente (Gray y Mason, 1990; López *et al.*, 1992). Considerando la amplia distribución de los receptores del TGF- β y los potentes efectos biológicos del mismo, es de relevancia fisiológica que el TGF- β se mantenga inactivo hasta que se requiera de su activación en los sitios blanco. Con base en estudios de reconocimiento por anticuerpos, se puede afirmar que es probable que la interacción del TGF- β con los presegmentos –de mucho mayor tamaño– deja poco del TGF- β maduro expuesto en la superficie de este complejo. El complejo de TGF- β aislado de plaquetas incluye un quinto componente denominado proteína de unión al TGF- β latente (LTBP, de *latent TGF- β binding protein*) (Miyazono *et al.*, 1988, 1991; Wakefield *et al.*, 1988). LTBP es una proteína de 125-160 kDa que se enlaza –a través de un puente disulfuro– con al

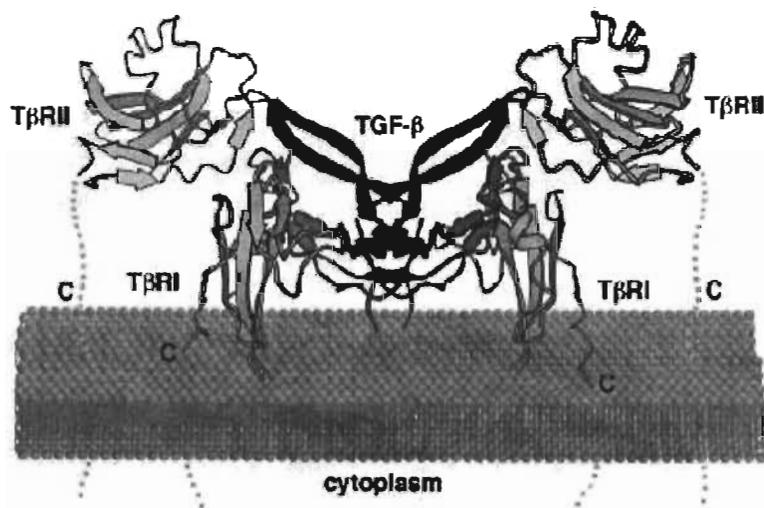
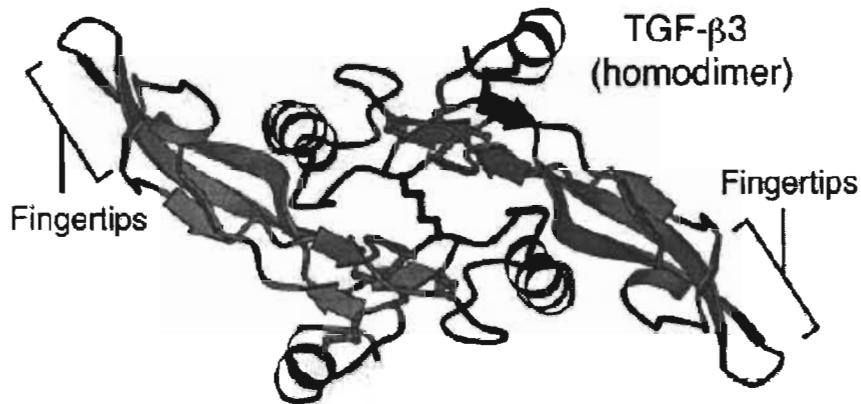


Figura A3. Estructura del TGF- β y de sus receptores. *Arriba*, Estructura del TGF- β . Los dos monómeros están iluminados de azul y verde, respectivamente. Las cadenas laterales de cisteína y los puentes disulfuro se ilustran con líneas rojas. *Abajo*, Estructura tridimensional del T β RII con TGF- β unido. Se usó la estructura del BMPR-IA para modelar el dominio extracelular de unión al ligando del T β RI. El extremo carboxilo de los receptores se representa con líneas punteadas que atraviesan la membrana plasmática (Hart *et al.*, 2002; figura 4C de Shi y Massagué, 2003).

menos uno de los segmentos pre-TGF- β en el complejo latente (Kanzaki *et al.*, 1990; Miyazono *et al.*, 1991). Además de LTBP, que ahora se llama LTBP-1, ya se han identificado tres proteínas relacionadas: LTBP-2 (Moren *et al.*, 1994), LTBP-3 (Yin *et al.*, 1995) y LTBP-4 (Saharinen *et al.*, 1998), codificadas por genes distintos. Los LTBPs no se requieren para mantener en estado latente al TGF- β , pero en cambio facilitan la secreción, la localización y la activación del complejo LAP-TGF- β principalmente en la matriz extracelular (Taipale *et al.*, 1994). Ya se han esclarecido algunas de las diferencias en función de estas cuatro LTBPs: mientras que el ratón *knock-out* de LTBP-3 presenta malformaciones craneofaciales, osteoesclerosis y osteoartritis (Dabovic *et al.*, 2002), el de LTBP-4 presenta enfisema pulmonar, cardiomiopatías y cáncer colorrectal que se correlaciona con un depósito escaso de TGF- β en el espacio extracelular (Sternier-Kock *et al.*, 2002). Las fibrilinas, proteínas relacionadas estructuralmente con los LTBPs, retienen al complejo LTBP-LAP-TGF- β en la matriz celular limitando la activación del TGF- β ; en ausencia de *fibrilina-1*, se activa masivamente el TGF- β en la matriz, lo cual conlleva a una inhibición de la formación de alveolos que eventualmente desemboca en enfisema pulmonar genético, caracterizado por un agrandamiento del espacio aéreo distal (Neptune *et al.*, 2003).

El patrón característico e independiente de regulación transcripcional de las tres isoformas de TGF- β está dictado por elementos de control distintos en los promotores de estos genes: mientras que el promotor de TGF- β 1 no tiene cajas TATA y está regulado principalmente por sitios AP-1, los promotores de TGF- β 2 y de TGF- β 3 sí las tienen, además de contar con sitios AP-2 y elementos de respuesta a AMPc. Consistentemente, los ésteres de forbol activan la transcripción TGF- β 1, mientras que la forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, activa la de TGF- β 2 y TGF- β 3. En general, la expresión genética de TGF- β 2 está coordinada con la de TGF- β 3, en un patrón distinto del de TGF- β 1 (revisado en Kim *et al.*, 1990). Además, el tratamiento de fibroblastos y queratinocitos con TGF- β 1 o TGF- β 2 resulta en cambios diferenciados en la síntesis de las tres isoformas de TGF- β (Bascom *et al.*, 1989). Asimismo, el tratamiento con ácido retinoico resulta en una fuerte inducción de la síntesis de TGF- β 2 pero no de TGF- β 1 (Glick *et al.*, 1989). Los mensajeros de las tres isoformas de TGF- β varían en tamaño de 1.7 a 6.5 kb, siendo esta divergencia debida a las regiones 5' y 3' no traducidas; sus secuencias 5' no traducidas son muy largas y se encargan de regular la eficiencia con que se traducen (Derynck *et al.*, 1985; Arrick *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1992; Romeo *et al.*, 1993). Los genes humanos de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 poseen 7 exones, habiéndose originado presuntamente de un evento ancestral de duplicación genética.

Activación del TGF- β

El mecanismo de activación fisiológica del TGF- β latente se estudió al inicio principalmente en cocultivos de células musculares lisas y células endoteliales, en los que la plasmina actúa como la proteasa responsable de la activación del TGF- β 1 (Antonelli-Orlidge *et al.*, 1989; Sato y Rifkin, 1989). No obstante, *in vivo*, el TGF- β 1 latente se activa debido principalmente a la acción de la trombospondina 1 (Crawford *et al.*, 1998) y secundariamente debido a la acción de la integrina $\alpha_v\beta_6$ (el LAP de TGF- β 1 es un ligando de esta integrina) (Munger *et al.*, 1997, 1999). Proteasas como la plasmina, las catepsinas y las metaloproteinasas 9 y 2 de matriz (MMP-9 y -2) también participan en el proceso de activación de TGF- β (Lyons *et al.*, 1988, 1990; Harpel *et al.*, 1992; Yu y

Stamenkovic, 2000). La trombospondina 1 es una proteína homotrimérica que al aislarla de plaquetas se le encuentra asociada con TGF- β (Murphy-Ullrich, *et al.*, 1992); es capaz de activar al TGF- β latente mediante un mecanismo que no involucra proteólisis sino una modificación conformacional del LAP (Schultz-Cherry y Murphy-Ullrich, 1993; Schultz-Cherry *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 1998). La plasmina puede activar al TGF- β latente de dos maneras: mediante la degradación de los presegmentos y de este modo permitiendo la liberación del dímero de TGF- β (Lyons *et al.*, 1990) y mediante la liberación del TGF- β latente de la matriz extracelular, un lugar donde se almacena (Taipale *et al.*, 1995). La inducción de activadores del plasminógeno, por ejemplo durante angiogénesis e invasión, resulta en la conversión del plasminógeno en plasmina, que a su vez activa al TGF- β latente. Fuentes celulares como células tumorales, macrófagos activados, osteoclastos y osteoblastos liberan TGF- β activo (Twardzik *et al.*, 1990; Flaumenhaft *et al.*, 1993a, b; Oursler *et al.*, 1993, 1994). En ellas se requiere la participación de proteasas para activar al TGF- β , siendo la plasmina en muchos casos la proteasa efectora (Munger *et al.*, 1997). Las metaloproteinasas de matriz MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*) y MMP-2, ancladas a la superficie celular de queratinocitos a través del receptor de hialuronano CD44, están involucradas en invasión tumoral y angiogénesis y activan al TGF- β latente mediante un corte proteolítico (Yu y Stamenkovic, 2000).

Es probable que la activación ocurra en la superficie celular, donde se observa que quedan retenidos los presegmentos del TGF- β latente unidos a través de sus carbohidratos manosa-6-fosfato con los receptores de manosa-6-fosfato celulares (Dennis y Rifkin, 1991).

Hasta ahora se conoce poco sobre cómo TGF- β 2 y TGF- β 3 se activan. Considerando la naturaleza similar de sus respectivos complejos latentes, es probable que entren en acción mecanismos proteolíticos, pero las extensas diferencias en secuencia de los presegmentos sugieren diferencias mecánicas, posiblemente incluso en la participación de proteasas diferentes.

Una vez liberados de las células, el TGF- β latente y el activo interactúan con proteínas en el medio extracelular, especialmente con varios componentes de la matriz extracelular o de la membrana basal. Estas interacciones conducen a otro tipo de mecanismo de control que gobierna la disponibilidad biológica y la actividad del TGF- β . Una de las proteínas con gran afinidad por el TGF- β es la α 2-macroglobulina, que se encuentra presente en grandes cantidades en circulación e interactúa con otros factores de crecimiento y citocinas (James, 1990). La interacción del TGF- β con la α 2-macroglobulina secuestra al TGF- β de forma que queda inactivo al no poder unirse a sus receptores. Por lo tanto, la α 2-macroglobulina puede funcionar como un "recogedor" (del inglés *scavenger*) eficiente que une todo el TGF- β activo libre, especialmente considerando que casi todo el TGF- β en plasma forma este tipo de complejo (O'Connor-McCourt y Wakefield, 1987; Huang *et al.*, 1988). Una vez que llega al hígado, la interacción del complejo con el receptor de α 2-macroglobulina conduce a la degradación del TGF- β (LaMarre *et al.*, 1991). La heparina (un glicosaminoglicano liberado en la desgranulación de células cebadas activadas) y sulfatos de heparano altamente sulfatados del hígado son capaces de mantener a TGF- β 1 –pero no a las otras isoformas– en estado activo por más tiempo al interferir con la unión de la α 2-macroglobulina a TGF- β 1 (Lyon *et al.*, 1997). Otras proteínas solubles que se encargan de interactuar con alta afinidad con el TGF- β son decorina y biglicano, dos proteoglicanos secretados que son parte de la matriz

extracelular. La interacción del TGF- β con estas proteínas neutraliza en algunos casos la actividad del TGF- β , y por lo tanto, podrían funcionar como desactivadores fisiológicos del TGF- β en la matriz extracelular (Yamaguchi *et al.*, 1990). Asimismo, la fibronectina (Fava y McClure, 1987) y varias colágenas, entre ellas la tipo IV (Paralkar *et al.*, 1991) también son capaces de unir TGF- β con gran afinidad. Las interacciones de estos componentes de la matriz extracelular con el TGF- β pueden resultar en la retención de TGF- β activo en la matriz extracelular, que por tanto puede ser considerada como un lugar de almacenamiento de TGF- β (y de otros factores de crecimiento y de diferenciación). Importantemente, las interacciones del TGF- β con la trombospondina y la colágena IV mantienen al TGF- β en una forma activa (Murphy-Ullrich *et al.*, 1992). El TGF- β es capaz de formar complejos con anticuerpos IgG. El TGF- β unido a ciertos IgGs tiene una actividad considerablemente mayor (de 50 a 100 veces) que el TGF- β libre, lo cual sugiere que esta forma de entrega de TGF- β resulta en una presentación eficiente ante sus receptores (Stach y Rowley, 1993; Caver *et al.*, 1996). Cabe aclarar, no obstante, que la mayoría de los demás anticuerpos que se unen al TGF- β tienen un efecto distinto: lo neutralizan.

Receptores del TGF- β

Inicialmente se identificaron tres receptores principales del TGF- β mediante la técnica de entrecruzamiento químico del TGF- β marcado con ^{125}I a proteínas de la superficie celular. Estos receptores, denominados tipo I, II y III, con base en su movilidad electroforética decreciente (Cheifetz *et al.*, 1986, 1987), se observan comúnmente en la mayoría de las células en cultivo y son los receptores mejor caracterizados. Aunque al inicio se supuso que las actividades biológicas del TGF- β estaban mediadas por el receptor tipo III (Cheifetz *et al.*, 1987, 1988), estudios ulteriores demostraron que los receptores tipo I y II median probablemente todas las actividades de señalización del TGF- β . Estos estudios consistieron en establecer una correlación entre el tipo de receptores de TGF- β en la membrana plasmática y la sensibilidad a este factor de crecimiento en las células Mv1Lu de epitelio pulmonar de visón. Mientras que las células silvestres poseen los 3 tipos de receptores y dejan de proliferar totalmente por acción del TGF- β , dos clonas mutantes de estas células crecían aun con TGF- β presente en su medio de cultivo: por un lado las R, que unían TGF- β a través del receptor II pero no del I, y por otro las DR, que no lo unían a través del II ni del I (Laiho *et al.*, 1990b). La complementación entre células R y DR mediante hibridación somática restauró por completo la unión del TGF- β al receptor I y la sensibilidad de las células a este factor –reflejada por la inhibición de la síntesis de ADN y la producción de proteínas de matriz extracelular–. Dado que no se detectaba unión de TGF- β al receptor I en las células R ni en las DR, su presencia en los híbridos resultó inquietante. Por lo tanto, se concluyó que el receptor I requiere del II para que se le una el ligando y que los receptores I y II eran requeridos ambos para que las células pudieran responder a TGF- β ; el receptor III, que seguía uniendo TGF- β en las clonas insensibles a TGF- β , no resultaba tener un papel primordial en este contexto (Laiho *et al.*, 1991; Geiser *et al.*, 1992; Chen, *et al.*, 1993). Además de estos tres tipos de receptores, se han reportado otros con diferentes movilidades electroforéticas o con distintas propiedades (Massagué, 1992). No obstante, estos receptores, llamados tipo IV a IX, no han sido bien caracterizados, y se tiene en algunos casos poca y en otros no se tiene evidencia de que estén involucrados en la señalización por TGF- β .

Receptores II y I (*TβRII* y *TβRI*)

El receptor II de TGF-β es una proteína transmembranal de 567 a.a. de masa molecular de 70 - 85 kDa. (Lin *et al.*, 1992). Su dominio intracelular es pequeño y posee actividad constitutiva de cinasa de serinas y treoninas (Wrana *et al.*, 1992). El receptor II une por sí mismo TGF-β1 y TGF-β3 con gran afinidad, pero requiere del receptor I ó del III para unir TGF-β2 (Lin *et al.*, 1992, 1995; López Casillas *et al.*, 1993; Lawler *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1995). La propiedad del receptor II de no unir TGF-β2, junto con la observación de que aquél no se produce en sitios de expresión de TGF-β2 durante el desarrollo embrionario, infundió la sospecha de que existían receptores II adicionales (Lawler *et al.*, 1994), y esto se confirmó al descubrirse TβRII-B, que sí une TGF-β2 (Rotzer *et al.*, 2001).

El receptor II existe como un homodímero constitutivo aún sin tener al ligando unido (Chen y Derynck, 1994; Henis *et al.*, 1994) y se autofosforila constitutivamente (Wrana *et al.*, 1994). *In vivo*, la autofosforilación ocurre principalmente en cinco serinas: tres en el dominio yuxtamembranal, y dos en la cola carboxilo, debajo del dominio de cinasa (Souchelnytskyi *et al.*, 1996). La autofosforilación de las serinas 213 y 409 es esencial para que el TβRII tenga actividad de cinasa, pero por el contrario, la autofosforilación de la Ser416 inhibe la función de este receptor, dado que una versión S416A del TβRII es hiperactiva. Las serinas 409 y 416 no pueden fosforilarse simultáneamente, y mientras que la autofosforilación de la Ser213 es intramolecular, la de la Ser409 ó 416 puede ser intermolecular, dado que se favorece ante la dimerización del receptor (Luo y Lodish, 1997).

El sustrato de la cinasa del receptor II es el receptor I TβRI (Wrana *et al.*, 1994). El receptor I de TGF-β llamado TβRI/ALK-5 (Franzén *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1994), es también un miembro de la familia de receptores transmembranales con actividad de cinasa de serina y treonina. Aunque al principio se sospechó que los receptores tipo I ALK2/Tsk7L/ActRI (Ebner *et al.*, 1993a, b) y ALK1/TSR-1 (Attisano *et al.*, 1993) transducían señales de TGF-β y activina debido a que unen ambos, posteriormente se demostró que en realidad transducen señales de BMPs (Armes y Smith, 1997; Macías Silva *et al.*, 1998). La masa molecular del TβRI es de 53 kDa. Su dominio citoplásmico se extiende un poco más allá del dominio de cinasa y su tamaño es relativamente pequeño. Este receptor I de TGF-β porta una secuencia distintiva: TTSGSGSGLP (el dominio GS) que precede inmediatamente al dominio de cinasa y que tapa el centro catalítico del dominio de cinasa en condiciones basales (Franzén *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1994; Ebner *et al.*, 1993a; Attisano *et al.*, 1993; Huse *et al.*, 1999). El dominio extracelular del receptor I de TGF-β tiene una similitud discreta con el del receptor II. El receptor I no une TGF-β independientemente, requiere del receptor II para poder unir TGF-β en la superficie (Ebner *et al.*, 1993a, b). Empero, otros miembros de la superfamilia del TGF-β, concretamente BMP-2, BMP-4 y BMP-7, se unen a sus receptores I directamente, ALK3/BMP-RIA o ALK6/BMP-RIB, aunque un complejo heteromérico proporciona mayor afinidad para el ligando (Derynck y Zhang, 2003). El receptor II también es importante para determinar qué ligando específico se une al receptor I. Así, ALK2 y ALK1 unen activina o TGF-β, dependiendo de qué receptor II esté coexpresado (Attisano *et al.*, 1993; Ebner *et al.*, 1993a, b), aunque como ya vimos, ambos receptores I no transducen en realidad señales de TGF-β/activinas sino de BMPs. Se sabe que TβRI une TGF-β con mayor eficiencia que los otros receptores I, que es frecuentemente el principal receptor I presente y que media varias de las respuestas a TGF-β en las células Mv1Lu (Franzén *et al.*, 1993; Bassing *et al.*, 1994; ten Dijke *et al.*, 1994).

A semejanza del receptor II, el receptor I forma homodímeros independientemente de la presencia del ligando (Gilboa *et al.*, 1998), y está constitutivamente fosforilado por cinasas citoplásmicas (Wrana *et al.*, 1994). Un complejo heterotetramérico que consiste de dos receptores II y de dos receptores I es la unidad efectora de la señalización disparada por el ligando (Wrana *et al.*, 1992; Chen y Derynck, 1994; Yamashita *et al.*, 1994b; Luo y Lodish, 1996; Weis-García y Massagué, 1996). Los receptores I y II se asocian entre sí independientemente de la presencia del ligando (Ventura *et al.*, 1994; Chen y Weinberg, 1995; Chen *et al.*, 1995a), aun con los niveles endógenos de expresión de los receptores (Wu *et al.*, 1996). Por esto, es probable que el receptor I y el II tengan una afinidad inherente el uno por el otro, y que la unión del ligando refuerce al heterotetrámero (Figura A3).

El receptor I es fosforilado por el receptor II en serinas y treoninas al unir ambos el ligando (Wrana *et al.*, 1994) (ver Figura A4). Se han identificado en T β RI cinco sitios de fosforilación catalizada por T β RII inducida por el ligando: cuatro en el dominio GS y uno en la región yuxtamembranal (Massagué, 1998; Souchelnitskyi *et al.*, 1996). La fosforilación por el receptor II inicia la activación del receptor I y posteriormente el complejo de receptor señala (Wrana *et al.*, 1994). El receptor II hace que se active el receptor I fosforilándolo, y así, el receptor I empieza a su vez a fosforilar a sustratos encargados de relevar el mensaje del TGF- β al interior de la célula. No obstante, si se elimina la participación del T β RII en la señalización por TGF- β –mediante la sobreexpresión de un T β RII mutante con actividad dominante negativa–, el efecto antiproliferativo del TGF- β queda eliminado, pero no la inducción de la síntesis de proteínas de matriz extracelular (Chen *et al.*, 1993). Por lo tanto, aunque el receptor I sí tiene un papel efector corriente abajo del receptor II, no puede asumirse que el receptor II funciona exclusivamente como la cinasa que activa al receptor I. Una evidencia de señalización directa por un receptor II la ha provisto BMPRII: a través de su dominio citoplásmico y ante la estimulación por BMPs, BMPRII regula la actividad de la cinasa LIMK1, cuya función es regular al citoesqueleto (Foletta *et al.*, 2003). Por otra parte, cuando el betaglicano está virtualmente ausente en osteoblastos, el TGF- β no es capaz de estimular la síntesis de ADN, presuntamente debido a la falta de unión del TGF- β a T β RII; sin embargo, la inducción de la síntesis de proteínas de matriz extracelular como la colágena es muy alta (Centrella *et al.*, 1995). Por lo tanto, hay efectos del TGF- β que requieren de T β RII y T β RI, pero hay otros que se siguen dando aun en ausencia del betaglicano y/o T β RII.

Receptor III (T β RIII) o betaglicano

(La descripción del betaglicano se hará con mayor profundidad dado que esta tesis gira alrededor de él).

El receptor III, también llamado betaglicano, está presente en una gran variedad de tipos y líneas celulares, y es el receptor de los miembros de la familia del TGF- β más abundante, habiendo hasta 200,000 moléculas por célula, aunque en promedio hay 10,000 (Cheifetz *et al.*, 1987). Aunque en un inicio el betaglicano y la endogлина –una glicoproteína no señalizadora homóloga al betaglicano– fueron ambos considerados receptores III del TGF- β , la designación de receptor III ha quedado gradualmente destinada al betaglicano, dadas sus funciones más extensas.

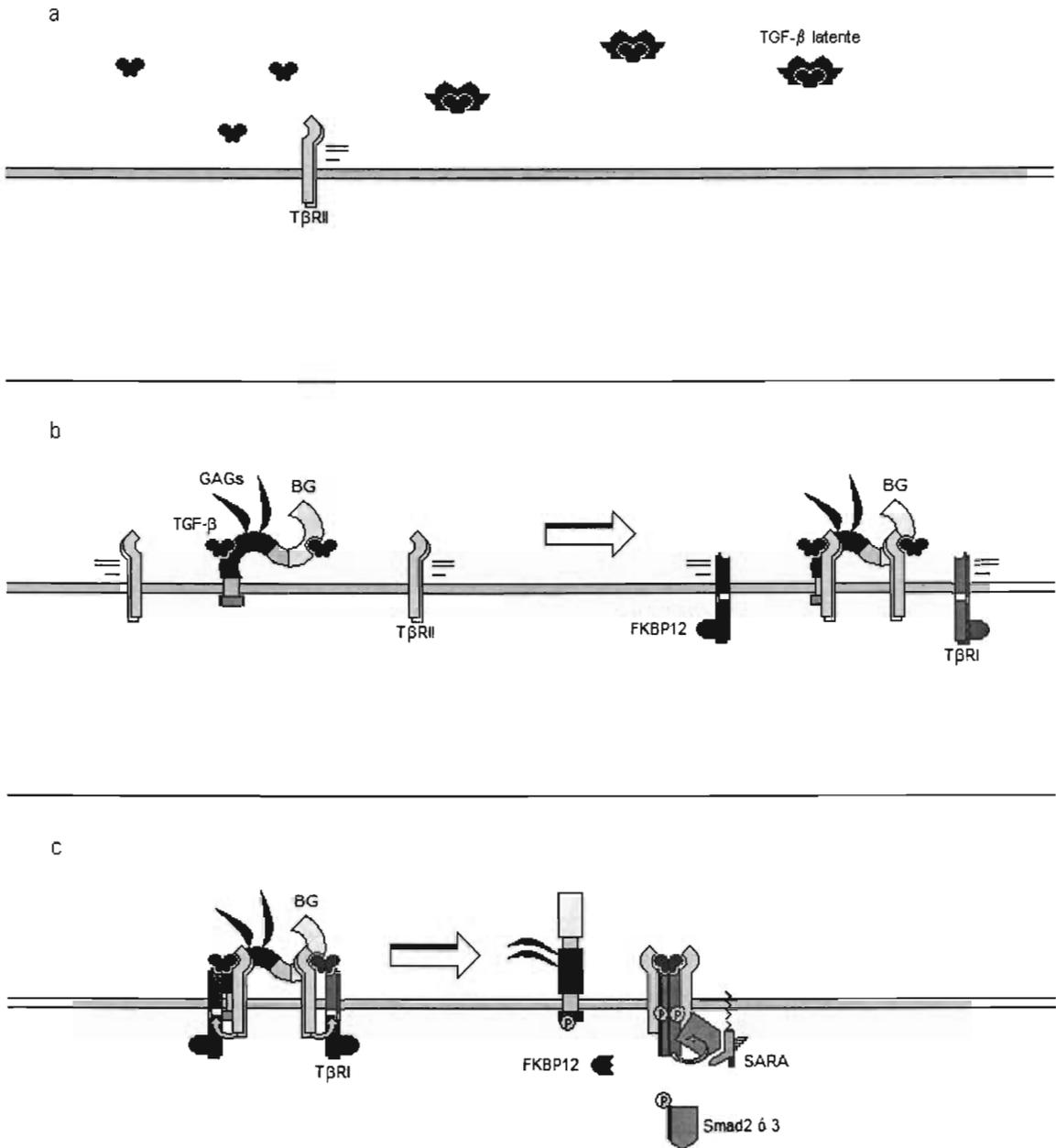


Figura A4. **Mecanismo de activación de los receptores de TGF-β.** a, El TGF-β se une por sí mismo al receptor II (una cinasa constitutiva de serinas y treoninas) e induce el ensamblaje de un complejo de señalización heterotetramérico (cuya formación puede estar auxiliada por el betaglicano, b) que incluye a un dímero de TβRII y a uno de TβRI. c, En este complejo, TβRII transfosforila y consecuentemente activa a TβRI, con lo cual se libera FKBP12 del dominio GS de TβRI, quedando este dominio libre para ser ocupado por los Smads 2 y 3, quienes son empujados a TβRI por SARA y posteriormente fosforilados por TβRI. El betaglicano es fosforilado por TβRII y separado del complejo señalizador una vez que cumplió con su función como presentador de TGF-β a TβRII.

Estructura del proteoglicano

De los receptores de TGF- β situados en la superficie celular, el betaglicano fue reconocido por ser el de mayor tamaño y mayor heterogeneidad al usar como sonda ^{125}I -TGF- β . El betaglicano es una proteína que lleva enlazados covalentemente glicosaminoglicanos ó GAGs (lo que la hace ser un proteoglicano): en uno de sus residuos de serina se polimeriza preferentemente sulfato de heparano, y en otro, de condroitina, lo que le confiere una masa molecular global de 250-300 kDa (López-Casillas *et al.*, 1994). El betaglicano fue bautizado con este nombre por tratarse de un proteoglicano que une TGF-*beta*. La proteína (conocida como *core*, o “núcleo”, haciendo alusión a la proteína *per se* sin contar a los glicosaminoglicanos) del betaglicano de ratón es una proteína transmembranal de 850 aminoácidos y ~100 kDa que atraviesa una sola vez la membrana plasmática; posee dos dominios extracelulares, el E, con parecido a endoglina y situado en la mitad amino, y el U, con parecido a uromodulina (proteína de orina) y situado en la mitad carboxilo (Ponce Castañeda *et al.*, 1998). El dominio U, de 260 aminoácidos, tiene además homología con las proteínas de la zona pelúcida Zp2 y Zp3 –involucradas en el reconocimiento ovocito-espermatozoide– y con la glicoproteína pancreática Gp2, e incluye 8 cisteínas estrictamente conservadas (Bork y Sander, 1992) (Figura A5). El betaglicano intracelularmente posee un dominio pequeño de 43 aminoácidos, constituido en un 42% por serinas y treoninas y sin motivos de señalización evidentes, lo cual ha conducido a la creencia actual de que este receptor no media directamente ninguna actividad de señalización. Los dominios transmembranal e intracelular del betaglicano son también muy parecidos a los de la endoglina (López Casillas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Se han detectado formas tanto transmembranales como solubles del betaglicano (Andres *et al.*, 1989). El betaglicano está provisto también de *N*-glucósidos, que comprenden 10 kDa del peso de la proteína medular y que se añaden en residuos de asparagina.

Estructura del ARNm o del ADNc

La estructura del ADNc del betaglicano de rata, la primera en conocerse, fue descrita por dos laboratorios en 1991 (López Casillas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Posteriormente se dio a conocer la estructura del betaglicano de otras especies: humano, cerdo (Moren *et al.*, 1992), pollo (Barnett *et al.*, 1994) y ratón (Ponce Castañeda *et al.*, 1998), y mediante herramientas bioinformáticas, se ha predicho la estructura del de chimpancé, perro, *fugu* (pez globo), pez cebra y otro pez del género *Tetraodon* (secuencias ensambladas por The Wellcome Trust Sanger Institute, ensembl.org). Es de interés hacer notar que el betaglicano de los mamíferos tiene un patrón particular de distribución de las serinas en las que se añaden glicosaminoglicanos, mientras que el betaglicano de los ovíparos (pollo y peces) en que se ha clonado muestra otro patrón de la distribución de dichas serinas. Los ADNcs de los betaglicanos de diferentes especies muestran una gran similitud en secuencia, evidente sobre todo en la región codificante y en menor grado en las regiones 5' y 3' no traducidas. Por otro lado, se han vislumbrado tanto en la literatura como en bancos de ESTs (de *expressed sequence tags*) transcritos alternos de menor y mayor tamaño, que se expresan junto con la versión más conocida de ~6 kb, aunque ninguno de ellos ha sido clonado ni reportado formalmente aún como transcrito alternativo del betaglicano. En la literatura, se han detectado transcritos alternos en: cardiocitos auriculares de corazón de pollo del día embrionario 10 (Barnett *et al.*, 1994), células preosteoblásticas de rata (3.7 kb, Centrella *et al.*, 1995), testículo de rata madura sexualmente (3.5-3.7 kb, Le Magueresse-Battistoni *et al.*, 1995; Bernard y Woodruff, 2001), glándulas suprarrenales (Bernard y Woodruff, 2001) e hipófisis y células foliculares de la teca (Sweeney y Johnson, 2004). En las bases de datos de ESTs, se puede apreciar que los transcritos alternos se generan por inclusión de exones novedosos y/o

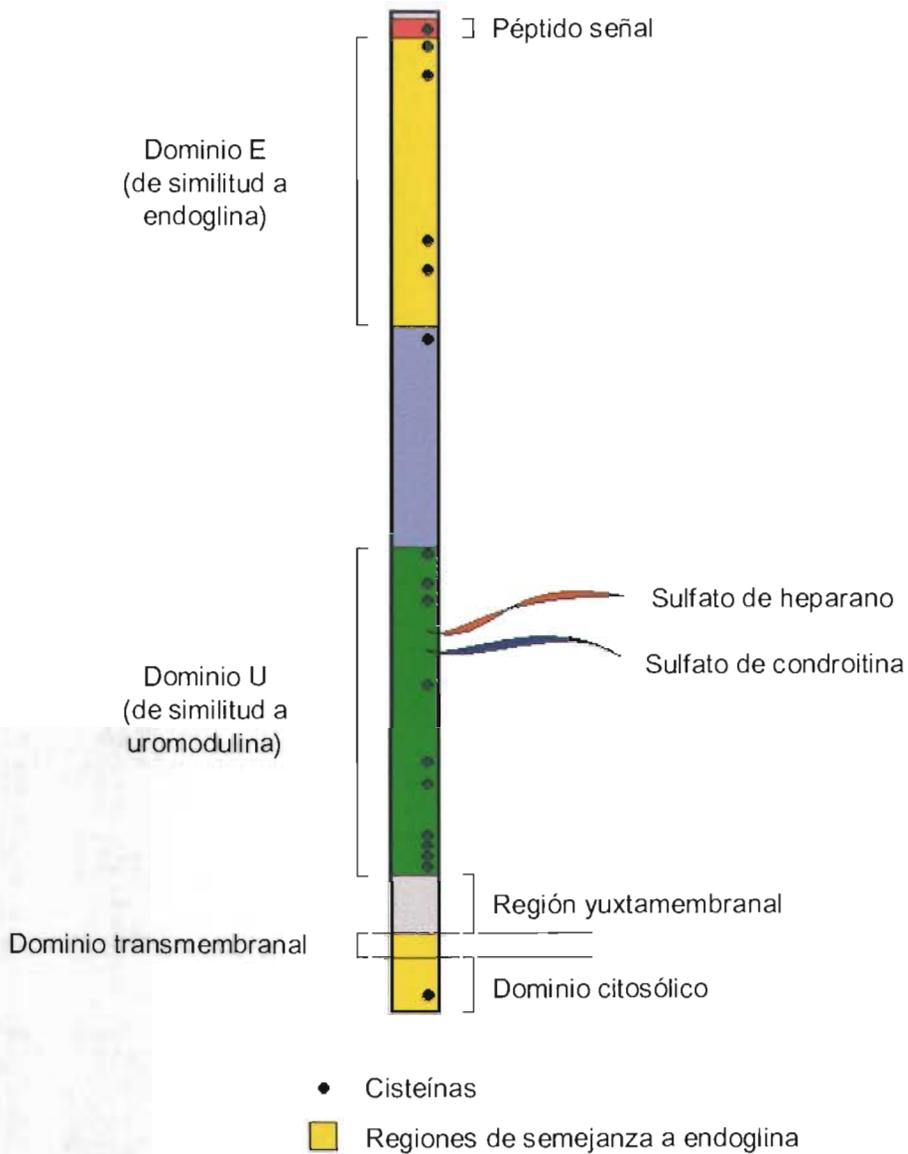


Figura A5. Estructura modular del proteoglicano del betaglicano. El betaglicano posee en su ectodominio el dominio E, de parecido a endoglina, y el U, de parecido a uromodulina; una región que conecta ambos dominios, 16 cisteínas, dos serinas en el dominio U donde se insertan sendos sulfatos de heparano y de condroitina y una región yuxtamembranal que es sustrato de proteasas que lo cortan generando un ectodominio soluble. Su región transmembranal y citosólica es semejante a la región correspondiente de la endoglina, no poseyendo patrones enzimáticos.

exclusión de exones conocidos. Algunos, al parecer, codifican sólo el ectodominio (versiones potencialmente solubles), y otros, versiones transmembranales con una cola citoplásmica diferente o bien, sin cola citoplásmica. En el ADNc humano del betaglicano, se han detectado 11 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) y una inserción de 3 nucleótidos, aunque no se conoce su relevancia (Zippert *et al.*, 2000).

Estructura del gen

El gen del betaglicano murino se localiza en el cromosoma 5, mientras que el humano se localiza en el 1 en la región 1p32-33 (Johnson *et al.*, 1995). El gen abarca una región de ~190 kb y está compuesto por 17 exones y 16 intrones. En la figura A6 se ilustra esquemáticamente la distribución de exones del gen del betaglicano murino.

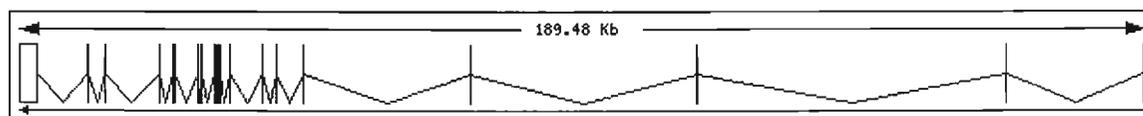


Figura A6. Distribución de los exones en el gen del betaglicano murino. Se muestra la distribución de los exones en el gen: las líneas verticales representan exones y las inclinadas intrones. El orden de los exones es de derecha a izquierda, de modo que el exón 1 es el de extrema derecha (tomado de *ensembl.org*).

Patrón de expresión espacio-temporal del betaglicano y cambios naturales en él a nivel celular o tisular

Grosso modo, la mayoría de los órganos y tejidos expresan betaglicano, entre los que se incluyen: corazón, pulmones, riñones, músculo esquelético, ojos (córnea y retina) (Wang *et al.*, 1991; Barnett *et al.*, 1994; Joyce y Zieske, 1997; Roelen *et al.*, 1998), estómago, intestinos (Stenvers *et al.*, 2003), mama (Chakravarthy *et al.*, 1999; Jeruss *et al.*, 2003), cerebro (motoneuronas, núcleo hipogloso, médula espinal lumbar (Jiang *et al.*, 2000); corteza olfatoria, *septum*, hipotálamo y tallo cerebral), hipófisis (preferencialmente células gonadotrópicas –del lóbulo anterior y blanco principal de las inhibinas circulantes– y melanotrópicas –del lóbulo intermedio–), testículos (células de Leydig expresan niveles altos; células de Sertoli no lo expresan; ontogénicamente, la expresión del betaglicano se da así: células germinales de etapas tempranas del ciclo epitelial seminífero: niveles altos; espermatogonias: no lo expresan; espermatoцитos primarios –en etapa de leptoteno y paquiteno–: niveles moderados; espermátides redondeadas: niveles altos; espermátides elongadas: no lo expresan; espermatozoides: sin determinar), ovarios (ovocitos, células de la granulosa y de la teca de folículos primordiales, primarios, secundarios y de Graaf) (MacConell *et al.*, 2002), glándulas suprarrenales (Bernard y Woodruff, 2001), endometrio uterino (Lewis *et al.*, 2000), encías (Gao *et al.*, 1999; Worapamorn *et al.*, 2000a, b), condrocitos (Grover y Roughley, 1995), megacariocitos (Schick y Jacoby, 1995) y células microvasculares pero no macrovasculares (Morello *et al.*, 1995). Asimismo, linfocitos B y T y células dendríticas en la lámina propia del intestino delgado de rata postnatal expresan betaglicano sin expresar los receptores I y II (Zhang *et al.*, 1999). Muy temprano en el desarrollo murino, a los 7.5 dpc (a los 6.75 dpc comienza la gastrulación), ya es posible detectar intensamente la expresión de betaglicano mediante RT-PCR en ectodermo, mesodermo y endodermo, y de nuevo, no se detectan transcritos de T β RII ni de T β RI en este estadio (Roelen *et al.*, 1994).

No se detecta mediante *northern blot* el ARNm de betaglicano en el hígado adulto normal (Wang *et al.*, 1991; Nishikawa *et al.*, 1998) *grosso modo*. Al analizar tipos celulares del

hígado individualmente, se comprueba que los hepatocitos recién aislados y las células de Kupffer no expresan el ARNm del betaglicano; empero, a los pocos días de estar en cultivo, los hepatocitos empiezan a expresarlo cuantiosamente, dándose un pico a los 3 días (Weiner *et al.*, 1996). En contraste, otro tipo celular presente en el hígado, el lipocito –también llamado célula almacenadora de grasa, estelar hepática o de Ito–, lo sintetiza abundantemente aun apenas aislado (Weiner *et al.*, 1996). Durante la regeneración hepática después de hepatectomizar o de administrar tetracloruro de carbono, se da un disparo transitorio en la expresión del betaglicano por hepatocitos y por lipocitos, respectivamente (Nishikawa *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 1994). Por el contrario, durante la transdiferenciación de lipocitos en miofibroblastos (la fuente principal de matriz extracelular durante el desarrollo de la cirrosis hepática), su expresión baja un orden de magnitud (Weiner *et al.*, 1996). En endotelios microvasculares experimentando angiogénesis *in vitro* en tres dimensiones, su expresión también baja (Sankar *et al.*, 1996). Durante la fusión entre sí de las placas palatinas, proceso sin el cual se hiende el paladar, el betaglicano se expresa exclusivamente en el *mid-edge epithelium* (MEE) de aquéllas, lo cual, al parecer, podría concentrar la señalización autocrina por TGF- β 3 en dos epitelios contiguos previo a su intercontacto, y con ello permitir que ambos se fusionen a través de la transformación epitelio-mesenquimatosa que induce tal isoforma y así conseguir la fusión palatina (Cui y Shuler, 2000). En tejido de neuroblastoma avanzado, hay una disminución significativa en la expresión del betaglicano tanto a nivel de ARNm como de proteína, a la vez que los niveles de TGF- β 1, T β RI y T β RII resultan ser normales en los neuroblastomas de todos los estadios, lo cual sugiere que la ausencia de betaglicano es un mecanismo para escapar de la inhibición de la proliferación impuesta por TGF- β en estas células (Iolascon *et al.*, 2000). En carcinomas ováricos, también se observa una pérdida en la expresión de betaglicano a nivel de ARNm (Bristow *et al.*, 1999).

Regulación de la expresión del betaglicano por agentes particulares

En la literatura ya se han reportado hasta el momento algunos casos de regulación transcripcional y postranscripcional del gen del betaglicano, los cuales se enlistan en la tabla I. En células periodontales, su expresión se incrementa por TGF- β 1 pero disminuye por suero (Worapamorn *et al.*, 2001); en monocitos también aumenta por TGF- β 1 (Lastres *et al.*, 1996); en osteoblastos se eleva por ácido retinoico (Nakayama *et al.*, 1994), por glucocorticoides (*e.g.*, cortisol y dexametasona) (Centrella *et al.*, 1991; Nakayama *et al.*, 1994) y por agentes que inducen AMPc, como la hormona paratiroidea (PTH) (Centrella *et al.*, 1988), y se suprime por BMP-2, un potenciador de la diferenciación ósea (Centrella *et al.*, 1995). En la porción ventral de la próstata, su expresión sube después de la castración y es aplacada de nuevo por la administración de andrógenos (Kyprianou e Isaacs, 1988), posiblemente en particular 5 α -dihidrotestosterona (Evangelou *et al.*, 2000); de manera similar, el tamoxifeno, un antagonista del receptor de estrógenos, origina una mayor cantidad de betaglicano en la superficie de las células MCF-7, lo cual indica que los estrógenos regulan negativamente su expresión (Koli *et al.*, 1997; Findlay *et al.*, 2001). Asimismo, en células de la corteza suprarrenal, la expresión del proteoglicano del betaglicano aumenta en la superficie celular por acción específica de la adrenocorticotropina (ACTH, hormona trófica principal de tejido adrenocortical *in vivo*), vía un aumento de AMPc y sin necesidad de síntesis proteica (Cochet *et al.*, 1988). En células humanas HeLa, el betaglicano es regulado positivamente por TNF α presuntamente a través de NF- κ B (Zhou *et al.*, 2003), mientras que en células de cáncer mamario MCF-7, es regulado positivamente por la vitamina D3 (Wu *et al.*, 1998). La prostaglandina E2 también incrementa significativamente el ARNm del betaglicano,

posiblemente a nivel transcripcional, además de que disminuye la unión de TGF- β a T β RI y a T β RII y la incrementa a T β RIII (Fine *et al.*, 1995). Por otra parte, en células MERAkt, su expresión baja a la mitad cuando es activada la cinasa PKB/Akt (Kuhn *et al.*, 2001). Se sabe también que en células epiteliales de pulmón de visón, la expresión del proteoglicano es suprimida por radiación ultravioleta (Quan *et al.*, 2001).

Tabla I. Reguladores de la expresión o de las propiedades del betaglicano

<i>Regulador</i>	<i>Molécula del BG estudiada</i>	<i>Efecto</i>	<i>Línea y/o tipo celular y especie</i>
Ácido retinoico	ARNm	Aumento	Osteoblastos de rata
Adrenocorticotropina (ACTH)	Proteoglicano	Aumento en la superficie celular sin necesidad de síntesis <i>de novo</i>	Células adrenocorticales
Andrógenos	Proteoglicano	Disminución	Epitelio prostático de rata
bFGF	Proteoglicano	Acortamiento de las cadenas de sulfato de heparano	Osteoblastos de rata
BMP-2	ARNm, proteoglicano	Disminución	Osteoblastos de rata
Cortisol	Proteoglicano	Aumento en expresión y mayor afinidad por TGF- β 1	Osteoblastos de rata
Dexametasona	ARNm, promotor del gen	Aumento	Osteoblastos de rata
Luz ultravioleta	Proteoglicano	Disminución	MLEC, <i>Mink lung epithelial cells</i>
Parathormona u hormona paratiroidea (PTH)	Proteoglicano	Aumento	Osteoblastos de rata
PKB/Akt	ARNm	Disminución de ~2X	MERAKT (derivadas de NIH3T3)
Prostaglandina E2	ARNm	Aumento	Fibroblastos pulmonares de embrión humano
Tamoxifeno (antagonista del receptor de estrógenos)	Proteoglicano	Aumento	MCF-7 (Células humanas de cáncer mamario)
TGF- β 1	ARNm	Aumento	Células gingivales y monocitos
TNF- α	ARNm	Aumento de 2.5X	HeLa (humanas)
Vitamina D3	Proteoglicano	Aumento	MCF-7E

BG: betaglicano

Funciones a nivel celular

Presentación de TGF- β a sus receptores señalizadores

Este receptor une las tres isoformas de TGF- β con afinidades semejantes (K_D de 50 a 300 pM), pero la mayor es para con TGF- β 2. No obstante, la afinidad del betaglicano por ellas es 3-5 veces menor que la de T β RI y T β RII. Ninguno de los glicosaminoglicanos del betaglicano es necesario para la unión de TGF- β , para su correcto plegamiento ni para su llegada a la superficie celular (Andres *et al.*, 1991; Cheifetz *et al.*, 1987, 1988; Cheifetz y

Massagué, 1989; López Casillas *et al.*, 1994; Massagué *et al.*, 1994; Segarini *et al.*, 1987; Segarini y Seyedin, 1988). La mayor parte de las moléculas del betaglicano se encuentra en forma de homooligómeros, presumiblemente homodímeros no covalentes, tanto en presencia como en ausencia de TGF- β 1 ó 2 (Henis *et al.*, 1994). En presencia de estos ligandos, se forman transitoriamente heterooligómeros de betaglicano-T β RII (López Casillas *et al.*, 1993; Moustakas *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1994a). La expresión del betaglicano anclado a la membrana incrementa la unión de TGF- β a T β RII, función conocida como de presentación de TGF- β a T β RII (Letamendía *et al.*, 1998; López Casillas *et al.*, 1993). El favorecimiento de la unión del ligando es particularmente significativo para TGF- β 2, cuya afinidad por T β RII es muy baja. Cuando el betaglicano se coexpresa con el receptor II, las respuestas celulares a TGF- β 2 se incrementan considerablemente, como la inhibición de la proliferación, que aumenta 10 veces en los mioblastos L₆E₉; así, el betaglicano hace posible que la isoforma TGF- β 2, que no posee una afinidad alta por T β RII, se una tan eficientemente ante este receptor como lo hacen TGF- β 1 y TGF- β 3, que despliegan por sí mismos una alta afinidad hacia él (López Casillas *et al.*, 1993; Sankar *et al.*, 1995). Esta situación hace recordar lo que sucede con el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), cuya presentación al receptor de FGF es propiciada por sulfatos de heparano (Yayon *et al.*, 1991). El TGF- β se une al betaglicano en el dominio E-segmento previo al dominio U (de acuerdo con lo esquematizado en la figura A5) (López Casillas *et al.*, 1994) y además en el dominio U (Pepin *et al.*, 1994) cuando éstos son expresados individualmente, y cada uno es capaz de ocasionar la fosforilación de Smad2 en respuesta a TGF- β 2 –al mismo nivel que el betaglicano completo– en mioblastos L₆E₉, reacción que ante esta isoforma no se da en ausencia del betaglicano (Esparza López *et al.*, 2001). Sin embargo, no sabemos si en la molécula completa del betaglicano ambos dominios están uniendo cada uno por su cuenta TGF- β , o si entre los dos unen una sola molécula de este factor. En células humanas MCF-7, de cáncer de mama y con baja expresión de betaglicano, un aumento forzado en la expresión de éste restituye la señalización autocrina por TGF- β 1, con lo cual disminuye la clonogenicidad de estas células (Chen *et al.*, 1997).

La endoglina, otro receptor III, comparte cierta homología con el betaglicano, y une TGF- β 1 y TGF- β 3 pero no TGF- β 2 (Gougos y Letarte, 1990; Yamashita *et al.*, 1994a). La expresión de esta glicoproteína transmembranal está restringida principalmente a células endoteliales y hematopoyéticas de varios tipos (Cheifetz *et al.*, 1992). En condrocitos y células vasculares endoteliales, el betaglicano se asocia con la endoglina –independientemente de la presencia de TGF- β – en complejos que pueden incluir además al receptor II y/o al I, lo cual sugiere que la endoglina puede modificar la señalización por TGF- β al interactuar con los T β Rs I, II y III (Wong *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 2003).

Inhibición de la presentación de TGF- β a sus receptores señalizadores

El betaglicano también puede impedir la presentación de TGF- β a T β RII. En células humanas MDA-MB-231 de cáncer mamario y con baja expresión de betaglicano, la sobreexpresión artificial de éste detiene la señalización por TGF- β (Sun y Chen, 1997). Al parecer, el cambio de papel de presentador a alejador de TGF- β a sus receptores depende de la longitud de las cadenas de glicosaminoglicanos que se polimerizan en el betaglicano (Eickelberg *et al.*, 2002). Así, la función presentadora o anti-presentadora del betaglicano puede depender del tipo y estado celular, mismos que reflejarían el nivel de glicosaminoglicanación del betaglicano. Otro mecanismo por el que el betaglicano puede impedir la señalización por TGF- β está en función de la tasa que exista de betaglicano/receptores señalizadores –más que de la cantidad absoluta de cada uno, al menos en osteoblastos–;

así, mientras mayor sea la proporción de betaglicano con respecto a T β RII y T β RI, especialmente del segundo, la respuesta a TGF- β tenderá a ser menor. Este fenómeno ha recibido el nombre de efecto esponja o efecto tina, dado que la relativamente alta cantidad de betaglicano hace que el TGF- β se “hunda” en éste, no permitiéndole ejercer acciones (Centrella *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1999); así, si se sobreexpresa el T β RI en células preosteoblásticas –donde endógenamente hay altos niveles de betaglicano–, se vuelven más sensibles a TGF- β 1 (comunicación personal al Dr. López Casillas por parte del Dr. Michael Centrella en 1999). Aún más, otro mecanismo por el que el betaglicano puede contrarrestar la señalización por TGF- β es a través de su versión soluble –ectodominio del betaglicano, librado de su conexión con la membrana gracias a un corte proteolítico hecho en la versión transmembranal (Velasco Loyden *et al.*, 2004) y posiblemente generado también por empalme alternativo del ARN primario–, que se encarga de secuestrarlo e impedir que se una a sus receptores de señalización (López Casillas *et al.*, 1994). Empero, hay un reporte que indica que una versión soluble del betaglicano producida en bacterias es capaz de potenciar –no de suprimir– el efecto inhibitorio del crecimiento del TGF- β en células Mv1Lu (Kaname y Ruoslahti, 1996). Es interesante hacer notar que la decorina –otro proteoglicano que une TGF- β y además soluble–, a semejanza del betaglicano soluble, se le ha visto favorecer la presentación de TGF- β a sus receptores señalizadores y su bioactividad (Takeuchi *et al.*, 1994) y en otros sistemas, neutralizar su actividad (Border *et al.*, 1992). En otro orden de ideas, unas líneas de células mucosas caliciformes de colon, al parecer, son insensibles a TGF- β 1 por las características *sui generis* del betaglicano que expresan (Deng *et al.*, 1999). En el artículo donde viene descrito este fenómeno, no es posible discernir si en estas células la insensibilidad a TGF- β se debe a una expresión pobre del betaglicano *glicanado* en la superficie celular –lo cual levantaría la sospecha de que en este tipo celular los GAGs del betaglicano son requeridos para presentar TGF- β –, a una incapacidad del proteoglicano del betaglicano expresado en la superficie de unir TGF- β impidiendo a la vez la unión de éste a sus receptores transductores, debido tal vez a un patrón de glicanación particular –a semejanza de lo que sucede en las células LLC-PK₁, donde el betaglicano también tiene un papel inhibitorio de la señalización por TGF- β , pero con la salvedad de que el betaglicano de estas células sí une TGF- β (Eickelberg *et al.*, 2001)–, a una producción preferencial del betaglicano soluble sobre el transmembranal, o a otra causa.

Unión de bFGF

Interesantemente, el betaglicano también une bFGF (también conocido como FGF-2) a través de sus sulfatos de heparano (Andres *et al.*, 1992), y por lo tanto, podría tener un papel en la presentación de este factor de crecimiento a sus receptores FGFR1-4, análogamente a como presenta TGF- β ante T β RII (Andres *et al.*, 1992; López Casillas *et al.*, 1994). En ausencia de sulfatos de heparano en la superficie de sus células blanco, o de heparina libre en la vecindad de sus receptores, miembros de la familia de FGFs no pueden ejercer acciones biológicas y son degradados fácilmente por proteasas (Yoneda *et al.*, 2000). A pesar de que no se conoce la relevancia de la unión de bFGF a las cadenas de sulfato de heparano del betaglicano, sí se sabe que en osteoblastos el tratamiento con bFGF ocasiona un acortamiento de estas cadenas (Andres *et al.*, 1992), lo cual podría alterar la función del betaglicano con respecto a TGF- β (Eickelberg *et al.*, 2002). Ácido retinoico (Nakayama *et al.*, 1994), cortisol (Centrella *et al.*, 1991) y dexametasona (Nakayama *et al.*, 1994) también modifican la movilidad electroforética del betaglicano y por ende, quizás, la presentación de TGF- β al T β RII. Cortisol, además de modificar esta movilidad, aumenta la afinidad de la unión entre TGF- β 1 y betaglicano, no requiriéndose de la síntesis *de novo* de betaglicano –posiblemente mediante la

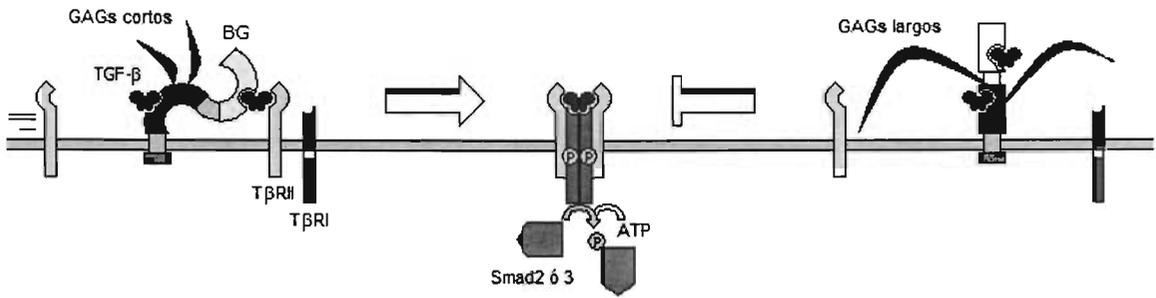
modificación de los glicosaminoglicanos de éste, según los autores del hallazgo, impidiendo paralelamente la unión de esta isoforma a T β RII y T β RI (Centrella *et al.*, 1991).

Unión de inhibina con el consecuente antagonismo de la señalización por activina

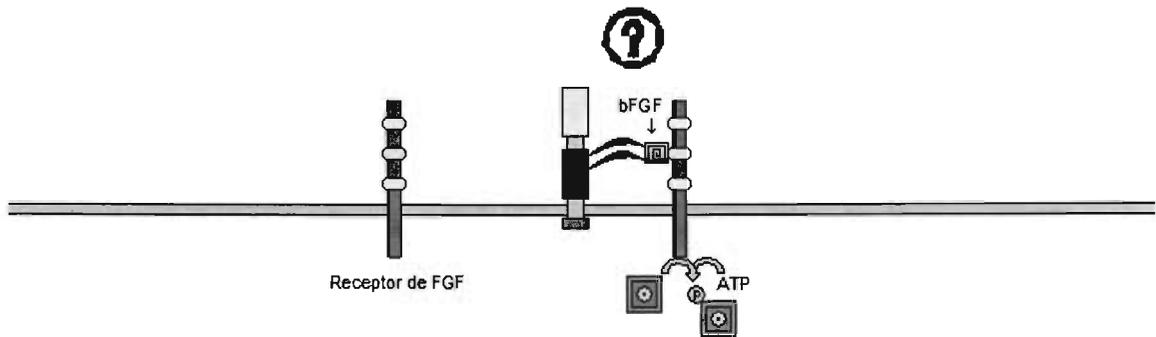
La activina y la inhibina son miembros muy semejantes entre sí de la superfamilia del TGF- β , encargados de regular de manera contraria funciones gonadales e hipofisarias, entre otras. Por ejemplo, en las células gonadotrópicas de la hipófisis anterior, la activina induce la liberación de FSH (hormona estimulante de folículos), mientras que la inhibina la suprime; en los testículos, la inhibina secretada por las células de Sertoli estimula localmente la esteroidogénesis de las células de Leydig e inhibe la espermatogénesis, y en los ovarios, la inhibina bloquea la maduración de los ovocitos. Tanto la activina como la inhibina son hormonas diméricas; las activinas están compuestas por dos subunidades β , y las inhibinas, por una α y otra β . Dentro de las subunidades β , existen las isoformas A y B, de modo que existen las inhibinas A y B en función de la subunidad β que posean, mientras que la activina es un heterodímero β A β B. La activina se une a su receptor II (ActRIIA ó ActRIIB2) y posteriormente viene al complejo su receptor I, ALK4, ambos con actividad de cinasa de serinas. Posteriormente, ALK4 activa las Smads 2 ó 3. Por su parte, la inhibina también se une al receptor II pero no recluta a ALK4, antagonizando entonces las acciones de la activina de manera competitiva. El betaglicano, además de mostrar una gran afinidad por ambas isoformas de inhibina, las faculta para salir victoriosas en la competencia por ganarse al receptor II (aunque no potencia la unión de la inhibina B a ActRIIB2) y lograr excluir de él a la activina y a ALK4. Aunque es cierto que el complejo ternario betaglicano/ActRIIA/inhibina es resistente al intento de intromisión de la activina (Lewis *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2002), también es cierto que si aparece TGF- β (especialmente TGF- β 2) en la escena, puede verse favorecida la activina en el sentido de que aquél sale adelante cuando compite contra la inhibina por ocupar al betaglicano (inhibina y TGF- β se pegan al betaglicano en una misma región del dominio U, de modo que no la pueden ocupar simultáneamente), y una vez que lo consigue, deja en libertad a ActRII, pudiéndolo utilizar ahora la activina (Esparza López *et al.*, 2001; Ethier *et al.*, 2002). Aunque también se identificó a la proteína InhBP/p120 como otro correceptor de la inhibina, la desactivación dirigida de su gen en ratones no afecta las funciones reproductoras (Bernard *et al.*, 2003). Sin embargo, la desactivación dirigida del betaglicano en ratones genera ratones escasamente fértiles (Stenvers *et al.*, 2003), lo cual sugiere que el betaglicano regula de manera importante las acciones de la inhibina *in vivo*. Asimismo, se ha propuesto la posibilidad de que la inhibina posea una vía de señalización propia y que no sólo antagonice la señalización por activina (Bernard *et al.*, 2002; Farnworth *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2001; Matzuk, 2000).

Unión de inhibina con el consecuente antagonismo de la señalización por BMPs

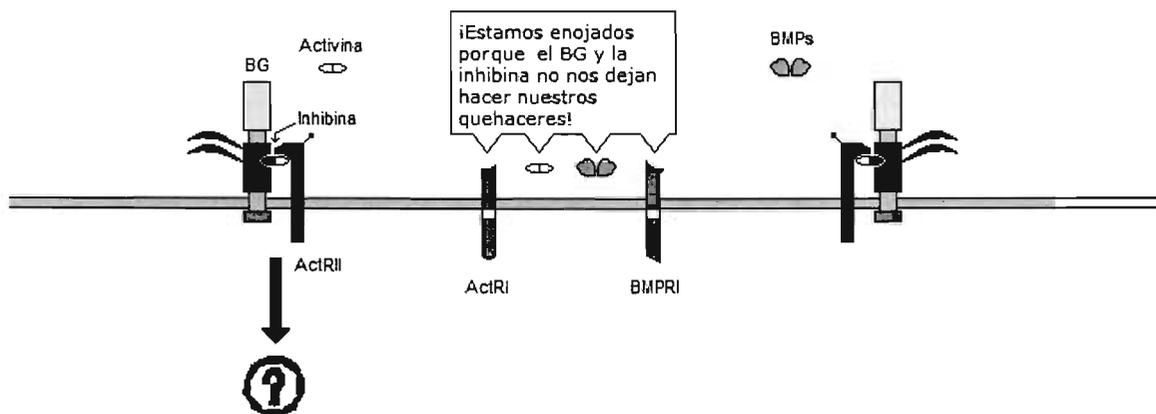
Dado que las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), al igual que la inhibina, utilizan los receptores II de activina, el complejo betaglicano/ActRII/inhibina también es capaz de antagonizar la señalización por BMPs. El betaglicano además le confiere a la inhibina la capacidad para unirse al receptor II específico de BMPs, BMPRII, y competir en contra de las BMPs por su ocupación. Como las BMPs requieren del receptor I de BMPs, las Smads cuya activación se impide son la 1, la 5 y la 8, a diferencia de lo que sucede cuando se inhibe la activación del receptor I de inhibina, en cuyo caso se impide la activación de las Smads 2 y 3. Este hallazgo ilustra que la terna betaglicano, ActRII ó BMPRII, e inhibina tiene la potencialidad para delimitar las células en las que incide la señalización por activina y/o BMPs (Wiater *et al.*, 2003).



a. Presentación u ocultamiento de TGF- β a T β RII según tenga el BG glicosaminoglicanos cortos o largos, respectivamente



b. Unión de bFGF a través de sus GAGs; no se sabe si lo presenta a los receptores señaladores de FGF (FGFR1-4)



c. Unión de inhibina con la ayuda de ActRII con el consecuente antagonismo de la señalización por activina y por BMPs

Figura A7. Funciones a nivel celular del betaglicano. El betaglicano puede a, presentar TGF- β a T β RII si sus GAGs son cortos o impedir que se contacten si sus GAGs son largos; b, unir bFGF; y c, unir inhibina con el consecuente antagonismo hacia activina y BMPs. No se ilustra el papel como secuestrador de TGF- β que tiene el betaglicano soluble.

En la figura A7 se esquematizan las funciones celulares del betaglicano.

Regulación de la presencia del proteoglicano del betaglicano en la superficie celular

Luego de la consolidación de un complejo señalizador de T β R orquestado por el TGF- β , el betaglicano es fosforilado en la cola citosólica –al parecer en la treonina 841– por el T β RII. A la cola citoplásmica fosforilada se le une la β -arrestina 2, con lo cual son endocitados el betaglicano y el receptor II, abatiéndose así la señalización por TGF- β . Las β -arrestinas cumplen un papel análogo con los receptores de 7 dominios transmembranales y con el receptor Frizzled 4 de Wnt5a, también de 7 dominios transmembranales: después de ser activados por sus ligandos y haber sido fosforilados por GRKs (*G protein-coupled receptor kinases*) o habérsele pegado la proteína citoplásmica Dishevelled, respectivamente, las β -arrestinas se unen a estos receptores, regulando subsecuentemente su señalización e internalización (Chen *et al.*, 2003a, b).

Funciones a nivel tisular

Desarrollo de las válvulas cardíacas del corazón

Unas válvulas cardíacas bien desarrolladas son indispensables para el buen funcionamiento del corazón, ya que permiten que el flujo de sangre sea unidireccional. En los mamíferos, el corazón cuenta con cuatro válvulas: la aórtica, la pulmonar, la mitral y la tricúspide. La sangre del torrente sanguíneo entra a la aurícula derecha y pasa a través de la válvula tricúspide hacia el ventrículo derecho, que bombea sangre a través de la válvula pulmonar hacia los pulmones; la sangre oxigenada regresa de los pulmones a la aurícula izquierda y pasa por la válvula mitral hacia el ventrículo izquierdo. Desde aquí, este ventrículo bombea la sangre a través de la válvula aórtica hacia la circulación sistémica.

La morfogénesis de las válvulas cardíacas depende de la señalización por isoformas de TGF- β producidas por el miocardio y que actúan en abultamientos del endocardio –una capa delgada de células que recubre por adentro las cámaras cardíacas– conocidos como cojines cardíacos. Estas células endocárdicas experimentan una transformación epiteliomesenquimatosa (para convertirse en válvulas cardíacas) y expresan betaglicano, y si se inhibe la función de éste con un antisuero α -betaglicano se evita la formación de mesénquima y la migración en explantes de cojín aurículoventricular. La expresión forzada de betaglicano en células endoteliales ventriculares que normalmente no se transforman confiere la transformación en respuesta a TGF- β 2, pero no a TGF- β 1 (Brown *et al.*, 1999). Por tanto, los autores de este trabajo han propuesto que TGF- β 2 altera la composición o la actividad de los complejos T β RII-T β RI, lo cual presuntamente resulta en la activación de un conjunto único de moléculas de señalización corriente abajo que redundan en una respuesta específica de las células ante esta isoforma de TGF- β .

Morfogénesis de estructuras ramificadas como el pulmón

El TGF- β inhibe la ramificación en explantes de pulmón. Si se suprime la expresión del betaglicano, aumenta dicha ramificación, debido presuntamente a una señalización defectuosa por TGF- β , lo cual sugiere que la función presentadora de TGF- β del betaglicano es importante *in vivo* para el desarrollo del pulmón (Zhao *et al.*, 1998).

Funciones a nivel orgánico (Stenvers *et al.*, 2003)

La estrategia para desactivar dirigidamente el gen del betaglicano en ratones fue la introducción de un *cassette* de resistencia a neomicina en su exón "2" (si los autores de tal reporte hubieran leído el nuestro (anexo II, al final de esta tesis), hubieran sabido que en realidad interrumpieron el exón 3). Además de haber desactivado al gen, los investigadores determinaron el patrón de expresión espacio-temporal del mismo: el betaglicano se expresa ampliamente a lo largo de la gestación, pero durante la gestación media –cuando se empiezan a apreciar malformaciones en los ratones *knock-out*–, los órganos que más expresan betaglicano son el corazón y el hígado. Al día embrionario 9.5 (E9.5), la expresión se localiza en el miocardio de los ventrículos y en el *septum transversum*, el *amnion* y el intestino posterior. Al día E11.5, la expresión se aprecia ahora en el miocardio de ventrículos –concretamente en los cardiomiocitos que están formando el tejido trabecular en el lumen del ventrículo– y de aurículas, así como en el hígado –en la mayoría de sus tipos celulares– y en el estómago, pero no en el cojín endocardiaco –donde sin embargo al bloquear la función del betaglicano se impidió la formación de las válvulas cardiacas en explantes cardiacos de pollo (Brown *et al.*, 1999)–.

Habiendo identificado al hígado y al corazón como los sitios prevalentes de expresión del betaglicano durante la gestación intermedia, los autores del trabajo determinaron que el tener desactivado al gen del betaglicano es letal para los ratones: ellos mueren por defectos en la organogénesis del corazón y por apoptosis en el hígado –al día E13.5–. Al ratón *knock-out* se le desarrolla pobremente la pared miocárdica de los ventrículos del corazón (detectado a los días E14.5-18.5), lo cual se asocia con un *septum* interventricular patológicamente delgado; la red trabecular también es de masa reducida. La morfología de sus cardiomiocitos es anormal, además de que proliferan menos, aunque no atraviesan por apoptosis como en el caso de los hepatocitos. Cabe mencionar que el corazón de los ratones *knock-out* de TGF- β 2 presenta paredes miocárdicas esponjosas y una zona compacta aminorada, rasgos que comparte con el mutante de betaglicano. En este caso, la menor sensibilidad de los cardiomiocitos a TGF- β 2 puede ser la causa del fenotipo ventricular en los mutantes de betaglicano. Por otra parte, TGF- β 1 se expresa en el endocardio, y si se desactiva su gen, la progenie de madres mutantes homocigóticas exhibe defectos ventriculares severos, lo cual sugiere que la señalización por esta isoforma también puede estar afectada en el *knock-out* de betaglicano.

El 50% de los embriones *knock-out* presenta una reducción generalizada en tamaño y osificación al día E18.5 de los esqueletos craneofacial, axial y apendicular. Como la gran mayoría de los ratones *knock-out* de betaglicano se han muerto al día E18.5, se dificulta mucho el análisis del papel de este gen en eventos posteriores de desarrollo.

Los autores mencionan que en hepatocitos fetales de rata, el TGF- β tiene un efecto apoptótico y muestran que la cinasa antiapoptótica Akt/PKB tiene un nivel menor de expresión en los hepatocitos del ratón *knock-out* que en los del silvestre, lo cual puede subyacer la considerable muerte apoptótica de hepatocitos. Sin embargo, el hecho de que los ratones *knock-out* de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, inhibina y compuesto Smad2-Smad3 (doble heterocigoto, Weinstein *et al.*, 2001) no presenten un defecto hepático comparable al del betaglicano, sugiere que hay al menos una vía de señalización –que no es la de TGF- β ni de activina– en la que el betaglicano está incidiendo de manera crucial. A este punto, cabe decir que hay una correlación entre betaglicano y Akt: en el *knock-out* de betaglicano la expresión de Akt/PKB está disminuida, mientras que en la línea celular MERAkt, la activación de Akt conlleva a la disminución del ARNm del betaglicano (Kuhn *et*

al., 2001). Vías alternas candidatas de señalización por el betaglicano podrían ser la del Wnt ó la del bFGF (o de los 22 FGFs restantes en ratones). En sustento de estas hipótesis tenemos que los Wnts requieren de sulfatos de heparano para señalizar (Dhoot *et al.*, 2001; Ai *et al.*, 2003); la desactivación dirigida de GSK-3, un componente de regulación negativa de la vía de Wnt, resulta específicamente en un severo daño hepático debido a apoptosis (Hoeflich *et al.*, 2000), mientras que en el carcinoma hepatocelular está mutada la β -catenina, factor transcripcional activador en la vía de Wnts (de La Coste *et al.*, 1998); los Wnts activan a Akt, incrementando los niveles de β -catenina libre (Fukumoto *et al.*, 2001) e inhiben la apoptosis de fibroblastos (Chen *et al.*, 2001); además, una forma constitutivamente activa de la β -catenina promueve potentemente la proliferación de hepatocitos –sin apoptosis compensatoria–, conduciendo a hepatomegalia (Cadoret *et al.*, 2001); y por último, en el promotor del betaglicano hay dos elementos potenciales de unión de Tcf/Lef1, efector transcripcional de Wnts; asimismo, el receptor Frizzled 4 es internalizado por la β -arrestina 2 ante la unión de su ligando Wnt5A (Chen *et al.*, 2003a), recapitulando lo que sucede cuando el betaglicano une TGF- β (Chen *et al.*, 2003b). Por su parte, bFGF activa a Akt (Ong *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000), se pega a los GAGs del betaglicano –aunque su unión a la superficie celular no aumenta significativamente ante la sobreexpresión de betaglicano– (Andres *et al.*, 1992) y es un partícipe vital en hepatogénesis (Zaret, 2002). Otra posibilidad es que la función del betaglicano que se está produciendo en el hígado embrionario sea la de impedir la señalización por TGF- β , de modo que al no estar presente el betaglicano se exacerbe el efecto apoptótico del TGF- β . Cabe señalar que en los mamíferos adultos, el hígado es uno de los pocos órganos donde virtualmente no se detecta la expresión del betaglicano (Wang *et al.*, 1991; Nishikawa *et al.*, 1998). No obstante, la expresión del ARNm del betaglicano en hepatocitos se llega a detectar y en grandes cantidades cuando hay regeneración hepática en respuesta a hepatectomía (Nishikawa *et al.*, 1998) e *in vitro* cuando se hacen cultivos primarios de hepatocitos (Weiner *et al.*, 1996).

El *knock-out* también presenta eritropoyesis –pero no leucopoyesis– incompleta, dado que en el ratón mutante homocigótico predominan los eritrocitos nucleados con respecto a los no nucleados, a diferencia del silvestre, donde la situación se invierte, al menos hasta el día E13.5. Al día E15.5, hay una muerte masiva y generalizada de hematocitos.

Con respecto al otro receptor III, la endoglina, ha sido implicada una mutación en su gen como la causa de la telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I en humanos, una condición caracterizada por vasos sangrantes debido a malformación (McAllister *et al.*, 1994).

A pesar de que se sabe que el betaglicano ayuda a presentar TGF- β , particularmente la isoforma TGF- β 2, a T β RII, se ha descubierto una variante de este receptor conocida como T β RII-B, la cual se genera por la inclusión de un exón encriptado en lo que el ARN primario de T β RII corresponde a un intrón. T β RII-B, en contubernio con T β RI, es capaz de unir TGF- β 2 con gran afinidad, dispensando de la función del betaglicano para dicha tarea (Rotzer *et al.*, 2001; del Re *et al.*, 2004). Los tipos celulares que expresan T β RII-B son menos que los que expresan T β RII, siendo principalmente osteoblastos y células de origen mesenquimatoso como mioblastos C₂C_{12i}; aunque no hay aún reportes al respecto, es muy probable que betaglicano y T β RII-B se coexpresen en una misma célula, *e.g.*, en miotubos C₂C₁₂ o en osteoblastos, por lo que se sospecharía que la función del betaglicano no sería simplemente la de presentar TGF- β 2 a T β RII, sino que podría conferir efectos adicionales a los de T β RII-B o T β RII. Así lo sugiere la observación de que

el bloqueo de la función del T β RII conduce a alteraciones diferentes de las que ocasiona el bloqueo del betaglicano (T β RIII): carencia de dispersión de células endoteliales vs. carencia de invasión epitelio-mesenquimatosa; ambos son eventos de transdiferenciación epitelio-mesenquimatosa que generan a los cojinetes del canal aurículoventricular y del tracto de salida del corazón, los cuales a su vez generan a las válvulas cardíacas (Boyer *et al.*, 2001). Confiera o no una vía de señalización adicional, lo que sí se puede afirmar es que una función del betaglicano a nivel tisular es capturar y presentar TGF- β (Brown *et al.*, 1999). La visión actual es que se trata de un modulador compartido por varias vías de señalización, incluyendo la del propio TGF- β , la de activina y la de BMPs y quizá de otra(s).

Smads: factores de transcripción que transmiten la señal del TGF- β al núcleo a partir de los T β Rs

Para identificar a las proteínas encargadas de propagar intracelularmente la señal proveniente de los receptores del TGF- β , las investigaciones se encaminaron a la búsqueda de proteínas que se asociaran con los mismos. Se lograron identificar varias proteínas asociadas con los receptores mediante el sistema de “dos-híbrido” en levaduras, utilizando los dominios citoplásmicos de los receptores como anzuelos. Cuando se usó el dominio citoplásmico del T β RI como anzuelo, fueron capturadas la proteína FKBP-12 (Wang *et al.*, 1994), la cadena α de la farnesil transferasa (Kawabata *et al.*, 1995) y la apolipoproteína J (Reddy *et al.*, 1996); cuando se usó el dominio citoplásmico del T β RII, fue capturada una proteína que se bautizó como proteína 1 de interacción con el receptor de TGF- β (TRIP-1, de *TGF- β receptor interacting protein-1*) (Chen *et al.*, 1995b).

No obstante, ninguna de estas proteínas asociadas con los receptores –identificadas porque interactúan prolongadamente con ellos– resultó tener una función de relevo de la señal del TGF- β desde los receptores. Los abordajes genéticos de la señalización por factores de la superfamilia del TGF- β en *Drosophila melanogaster* y en *Caenorhabditis elegans* demostraron ser mucho más útiles a este respecto: condujeron a la identificación de los genes *mad* (de *mothers against decapentaplegic*) y *sma*, respectivamente. Ciertas mutaciones de efecto materno en el gen *mad* exacerbaban los defectos fenotípicos que produce un alelo *dpp* recesivo débil en mosquitas heterocigóticas (Rafferty *et al.*, 1995), mientras que mutaciones en los genes *sma-2*, *sma-3* y *sma-4* de *C. elegans* causan un fenotipo similar al que causan mutaciones en el gen de un receptor semejante a T β Rs llamado *daf-4* y que incluye tamaño corporal pequeño (de ahí el nombre *sma*, de *small*) y colas deformes en los machos (Savage *et al.*, 1996). La búsqueda subsecuente de genes homólogos en vertebrados llevó al hallazgo de la familia de factores transcripcionales Smad, cuyo nombre proviene de la conjunción de Sma con Mad (Derynck *et al.*, 1996).

Smads

Los Smads se pueden clasificar en R-Smads, Co-Smad e I-Smads. Los R-Smads actúan corriente abajo de receptores tipo I de BMPs, TGF- β y activina (BMPRI, T β RI y ActRII, respectivamente). Las BMPs causan la activación de los Smads 1, 5 y 8, mientras que TGF- β y activina la de los Smads 2 y 3, aunque las respuestas transcripcionales a TGF- β están mediadas primordialmente por Smad3 y las de activina por Smad2 (Graff *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Macías Silva *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Smad4/DPC4 (*Deleted in pancreatic carcinoma 4*) es el Co-Smad de los vertebrados, y se le llama así porque lo comparten las vías de TGF- β , activina y BMPs (Lagna *et al.*, 1996). En la figura

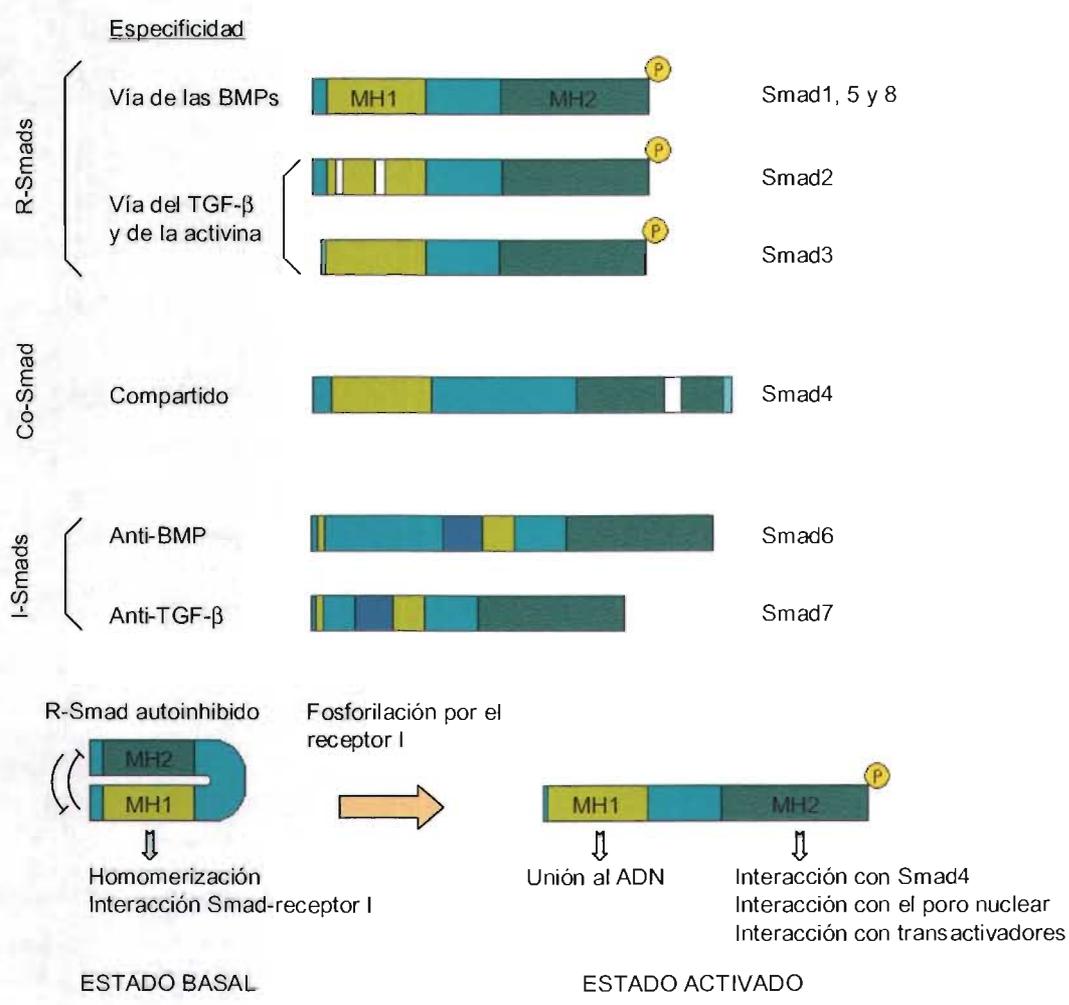


Figura A8. Estructura de los Smads. Las tres clases de Smads son los R-Smads, regulados por receptores tipo I específicos, el Co-Smad, cuyo representante en vertebrados es Smad4, y los I-Smads, o Smads inhibitorios. En orden progresivo desde el extremo amino se localiza el dominio MH1 (de *Mad-homology region*), una región conectora, y el dominio MH2. Dentro del grupo de los R-Smads, Smad1, 5 y 8 responden a BMPs y Smad2 y 3 responden a TGF- β y a activina. Los R-Smads se fosforilan en la secuencia SXS, localizada en el extremo carboxilo. Smad2 y 4 presentan algunas inserciones pequeñas en el dominio MH1. Los Smads inhibitorios carecen de gran parte del dominio MH1 y su dominio MH2 es muy diferente del de otros miembros de la familia. Antes de ser fosforilados en la secuencia SSXS, los R-Smads forman homooligómeros; sus dominios MH1 –de unión al ADN– y MH2 –de interacción con factores de transcripción– se interinhiben, lo que mantiene a los R-Smads inactivos. Una vez que son fosforilados por su receptor tipo I particular (BMPs vía BMPR-I, TGF- β vía T β R-I y activina vía ActR-IB), se asocian con Smad4 y se translocan al núcleo (redibujado de Hata *et al.*, 1998).

A8 se ilustra la estructura de los Smads y su especificidad. Los Smads poseen un dominio MH1 (de *Mad-homology 1*) en el tercio amino, uno MH2 en el carboxilo, y entre éstos dos, la región conectora. La forma como se activan los R-Smads es mediante fosforilación por sus receptores I respectivos en la secuencia SXS localizada en el dominio MH2 (Kretzschmar *et al.*, 1997); una vez activados, se asocian con Smad4 y se translocan al núcleo donde funcionan como factores de transcripción. El dominio MH1 de los R-Smads tiene la capacidad de unirse al ADN (aunque no el de Smad2), mientras que el MH2 tiene propiedades transactivadoras. Los R-Smads se mantienen inactivos en condiciones basales gracias a que sus dominios MH1 y MH2 se interinhiben. Smad4 forma homotrimeros constitutivamente (Shi *et al.*, 1997). Al ser activados, los R-Smads forman homotrimeros y heterómeros sumamente estables. Existe controversia en cuanto a la estequiometría de los complejos heteroméricos de Smads: hay evidencia tanto a favor de un heterotrimerio (dos R-Smads y un Smad4) como de un heterodímero, pero al parecer, ambas combinatorias son factibles y dependen del contexto del promotor a regular; por ejemplo: en el promotor de *c-jun* se pega un heterodímero Smad3-Smad4, pero en el promotor de *mix.2* se agrupan dos Smads2 y un Smad4 con la proteína de hélice alada Fast-1 o Fast-3 ante la estimulación por activina (Chen *et al.*, 1996; Shi y Massagué, 2003; Inman y Hill, 2002).

El grupo de los Smads inhibitorios, o I-Smads, está constituido por Smad6 y Smad7. Estos Smads carecen de gran parte del dominio MH1 y su dominio MH2 es muy diferente del de otros miembros de la familia, además de que no poseen un motivo SXS en el término carboxilo. La localización de estos Smads en condiciones basales es preponderantemente nuclear. Smad6 se une a Smad1 fosforilado por el receptor, compitiendo contra Smad4, y el complejo resultante es aparentemente inactivo (Hata *et al.*, 1998a); asimismo, Smad6 se asocia en el núcleo con el correpresor transcripcional CtBP (de *C-terminal binding protein*) para reprimir la transcripción del gen *Id1*, impulsada por BMPs (Lin *et al.*, 2003). Smad7 no es fosforilado ante la estimulación por TGF- β ; no obstante, TGF- β induce rápidamente la expresión del ARNm de Smad7 y la translocación a la membrana celular de las proteínas Smad7 que ya estaban presentes en el núcleo (Itoh *et al.*, 1998; Nakao *et al.*, 1997). La proteína Smad7 se une establemente al receptor T β RI activado, impidiendo que éste fosforile a los Smads 2 y 3 (Hayashi *et al.*, 1997). Smad7, además, con el apoyo de SARA, induce la agregación al receptor I activado de la proteína fosfatasa 1 (PP1), que lo desfosforila (Shi *et al.*, 2004), y de las ligasas E3 de ubiquitina Smurf1 y Smurf2 (de *Smad ubiquitination-regulatory factors*) que lo ubiquitinan para que sea degradado por el proteosoma 26S, proceso en el cual el mismo Smad7 resulta degradado (Shi y Massagué, 2003). La proteína Arkadia se encarga de que no se apague la señalización por TGF- β *ab initio*: causa la degradación de Smad7 a través de ubiquitinación (Koinuma *et al.*, 2003). Estas observaciones indican que Smad7 es parte de un mecanismo de retroalimentación negativa que se encarga de extinguir la señal del TGF- β después de haber sido recibida. Smurf1 reconoce a los Smads 1 y 5, pero no a los 2, 3 ni 4, causando su ubiquitinación y posterior degradación (Massagué y Chen, 2000).

Translocación de los Smads al núcleo

Los Smads se encuentran en constante desplazamiento aun en ausencia de señalización por TGF- β : viajan continuamente del citoplasma al núcleo y de regreso, aunque cabe aclarar que la localización primordial de Smad2 y 3 es citoplásmica, mientras que la de Smad4 es citoplásmica y nuclear (Pierreux *et al.*, 2000). A partir de que el receptor I los activa, los R-Smads son translocados al núcleo. Smad4 no se requiere para la translocación al interior del núcleo de los R-Smads, aunque sí los acompaña en su travesía. Hay controversia sobre si este transporte es mediado por transportadores

nucleares o no. Los hallazgos del laboratorio del Dr. Joan Massagué apuntan a que no, pero hay hallazgos de otros laboratorios que indican que Smad4 es llevado al núcleo por las importinas α y β , y al parecer, Smad3 por la importina β . En su travesía al núcleo, los Smads interactúan con las nucleoporinas Nup214 y Nup153 –componentes del poro nuclear–, quienes les permiten el acceso al interior del núcleo (ten Dijke y Hill, 2004).

Es de interés mencionar que en el dominio MH2 –concretamente en el así llamado “corredor hidrofóbico”– de los Smads se localizan las superficies involucradas en los contactos proteína-proteína requeridos para mediar secuencialmente la interacción de los Smads con las proteínas que causan su direccionamiento hacia el núcleo (T β RI, SARA, nucleoporinas, etc.); el corredor hidrofóbico no permite el contacto simultáneo de más de una de estas proteínas, lo cual permite que las interacciones de dichas proteínas con los Smads sean sucesorias (ten Dijke y Hill, 2004).

Mecanismo de activación de la transcripción por Smads: cooperación con HATs, HDACs y factores transcripcionales

Una vez en el núcleo, los Smads regulan la transcripción de varios centenares de genes tanto positiva como negativamente (Kang *et al.*, 2003). Smad3 y Smad4 pueden unirse al ADN por sí mismos en el SBE (*Smad-binding element*), cuya secuencia es 5'-AGAC-3'. Smad2, por el contrario, carece de esta capacidad. No obstante, la afinidad de los Smads 3 y 4 por el SBE es muy baja; por esta razón, se asocian con otros factores de transcripción. Muchos de los factores con los que interactúan los Smads son específicos de los tipos celulares en los que se recibe la señal del TGF- β (e.g., Fast, OAZ, Mixer, Milk) y otros son generales (e.g., AP1), y por lo tanto, las alianzas que estos factores establecen con los Smads determinan los genes cuya expresión habrá de ser regulada. Los factores ubicuos generalmente median la misma respuesta en todos los tipos celulares, mientras que los específicos por lo general conducen a regulación genética dependiente del tipo celular. El dominio MH2 de los R-Smads y Smad4 interactúa con el coactivador esencial CBP (*CREB-binding protein*)/p300 (con actividad de acetiltransferasa de histonas, HAT, de *histone acetyltransferase*) y con otros como Arc105, Msg1 y Smif, los cuales remodelan la estructura de los nucleosomas. Smad4 funciona como coactivador para los R-Smads ya que robustece la interacción de ellos con CBP/p300, que los vincula directamente con la maquinaria general de transcripción. Los Smads también pueden asociarse con los corresponsores TGIF, c-Ski y SnoN, que reclutan a desacetilasas de histonas (HDACs, de *histone deacetylases*). Cabe mencionar que los Smads inhiben la activación de la transcripción y en otros casos reprimen la transcripción. El dominio MH1 de Smad3 puede interactuar con desacetilasas de histonas, lo cual reprime transcripción (revisado en Massagué y Wotton, 2000).

No requerimiento de Smad4 para todas las respuestas a TGF- β

Aunque en un inicio se había propuesto que Smad4 funcionaba como el mediador de los R-Smads en las respuestas transcripcionales inducidas por miembros de la superfamilia del TGF- β , cuando se desactivó su gen por recombinación homóloga en fibroblastos –un tipo celular vastamente explorado en cuando a las funciones del TGF- β –, se observó que al estimularlos con TGF- β , la detención del crecimiento, la inducción del gen endógeno de *PAI-1* (*plasminogen-activator inhibitor 1*) y de otros componentes de la matriz extracelular eran iguales con respecto a las células silvestres. En cambio, la activación del promotor de *mix.2* de *Xenopus* ante TGF- β o activina y la de genes homeóticos de la familia *Mx* ante BMPs sí se vieron gravemente afectadas. Por lo tanto, Smad4 es dispensable para algunas de las respuestas clave de las células ante TGF- β (Sirard *et al.*, 2000).

Salida de los R-Smads y Smad4 del núcleo

Después de ponerse a trabajar en regulación transcripcional, la mayoría de los Smads son eventualmente desfosforilados por alguna fosfatasa constitutiva todavía no identificada que los disocia de Smad4 y regresados al citoplasma para ser reciclados (Xu *et al.*, 2002; Inman *et al.*, 2002). No obstante, una pequeña porción de la población de los Smads fosforilados experimenta ubiquitinación y consecuente degradación dentro del núcleo, como es el caso de Smad2. Para que se lleve a cabo el proceso de ubiquitinación, es necesario que los Smads estén fosforilados en el motivo SXS (Massagué y Chen, 2000). Smad3 nuclear fosforilado ante la estimulación por TGF- β es ubiquitinado por el complejo de ligasa de ubiquitina ROC1-SCF (Fukuchi *et al.*, 2001), mientras que Smad2 lo es por la ligasa E2 de ubiquitina UbcH5 (Lo y Massagué, 1999). Aunque inicialmente fue reportado que Smad4 no se ubiquitinaba en condiciones normales y que sólo mutaciones en su gen asociadas a cáncer hacían que admitiera ubiquitinación (Xu y Attisano, 2000), posteriormente fue descubierto que aun en condiciones normales es ubiquitinado por Jab1, conduciendo a su degradación (Wan *et al.*, 2002). Smad4 es translocado fuera del núcleo por el exportador nuclear Crm-1; empero, Smad2 y 3 son excluidos del núcleo por otro transportador –dependiente de ATP– que hasta el momento no ha sido identificado (ten Dijke y Hill, 2004). En la figura A9 se ilustra esquemáticamente la vía de transducción del TGF- β con varios de sus componentes de regulación positiva o negativa incorporados.

Regulación de la señalización por TGF- β por proteínas que interactúan con los T β Rs o con los Smads

Además del betaglicano, cuyas funciones ya fueron descritas arriba, CTGF, FKBP-12, BAMBI, SARA, SnoN, c-Ski, TGIF, Hgs, Disabled, axina, β -espectrina, caveolina 1, entre otros, regulan la señalización por TGF- β mediante la interacción con los T β Rs o con los Smads. CTGF (*connective-tissue growth factor*) incrementa la unión de TGF- β a sus receptores a la vez que inhibe la unión de BMP4 a los suyos (Abreu *et al.*, 2002). FKBP-12 es una proteína citosólica de 12 kDa que además de asociarse con T β RI se asocia con receptores I de otros miembros de la superfamilia del TGF- β , con receptores de rianodina (canales de liberación de calcio de músculo cardíaco) y de inositol trifosfato (Massagué y Chen, 2000). FKBP-12 sella el dominio GS no fosforilado de T β RI al pegársele, impidiendo así que T β RII transfosforile a T β RI en condiciones basales, a la vez que mantiene el centro catalítico de la cinasa de T β RI en una conformación inactiva (Huse *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996). BAMBI (de *BMP, activin, and TGF- β membrane-bound inhibitor*) es una proteína transmembranal con parecido a receptores I pero con un dominio intracelular pequeño y sin actividad de cinasa; no obstante, éste se asemeja a las asas E6 y catalítica de los receptores I. El asa E6 es importante para los contactos homodiméricos entre receptores I que permiten la activación de su cinasa. Así, BAMBI promueve la formación de heterodímeros inactivos de BAMBI-receptores I, impidiendo que haya señalización por la mayoría de los receptores I, aunque en embriones de *Xenopus* su expresión se colocaliza con la de *bmp4* (Onichtchouk *et al.*, 1999). SARA (de *Smad anchor for receptor activation*) es una proteína anclada a la membrana que favorece la interacción de Smad2 y Smad3 con T β RI. Smad2 contacta a SARA a través de su dominio MH2, y luego de ser fosforilado, se disocia de SARA para formar complejos con Smad4 que se translocan al núcleo (Tsukazaki *et al.*, 1998). Las protooncoproteínas nucleares SnoN y c-Ski (*cellular transforming protein of the Sloan Kettering Institute virus*) se asocian con Smad2, 3 ó 4 en condiciones basales y en respuesta a la señalización por TGF- β se potencia esta asociación. SnoN reprime la actividad transcripcional de Smad2 y

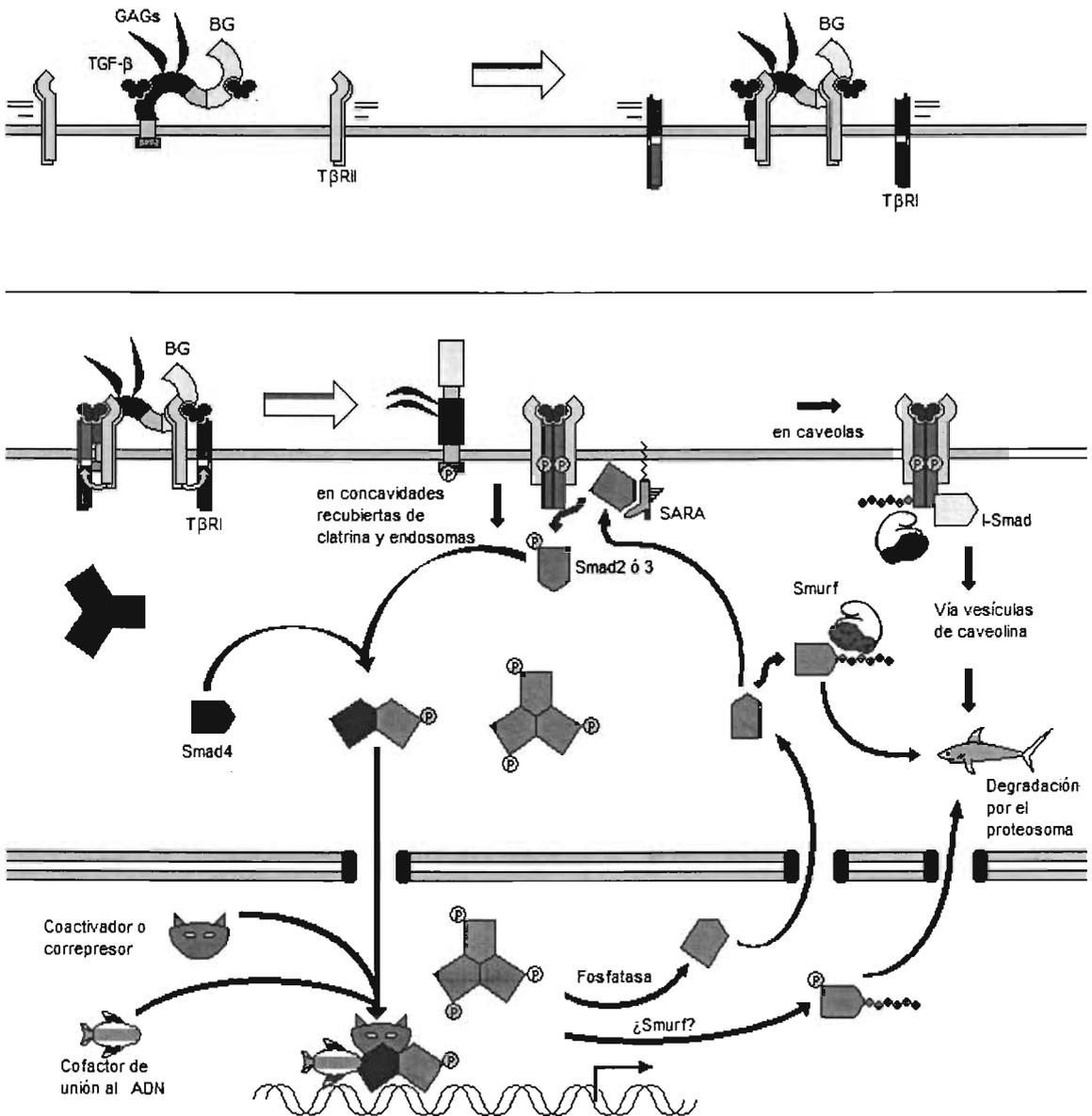


Figura A9. Vía integrada de la señalización por TGF-β de la membrana plasmática al núcleo. Una vez que el BG ha promovido la formación de un complejo de TβRs con TGF-β, TβRII fosforila al BG y éste es excluido del complejo, dejando libre al tetrámero TβRII-TβRI. TβRI fosforila a los Smads 2 y 3, los cuales llegan a él empujados por SARA. Smad2 ó 3 fosforilados se asocian con Smad4 y juntos viajan al núcleo, donde regulan la expresión de centenares de genes con la ayuda de cofactores y coactivadores o correpresores. Tanto Smad4 como los R-Smads activados forman homotrímeros estables. Los Smads son eventualmente desfosforilados y devueltos al citosol para luego ser reaprovechados o ubiquitinados y degradados por el proteosoma. Las flechas de color azul indican activación de la vía, mientras que las de color rojo indican desactivación. Como parte de la desactivación de la vía, el complejo de TβRs-Smad7-Smurfs es dirigido a caveolas, dominios membranales ricos en caveolina, endocitado y puesto en contacto con el proteosoma para su degradación. Como parte de su activación, el complejo de TβRs activados-SARA es endocitado a concavidades recubiertas de clatrina que favorecen la señalización (redibujado de Shi y Massagué, 2003).

de Smad4 a través del reclutamiento del correpresor N-CoR (*nuclear receptor co-repressor*) (Stroschein *et al.*, 1999). No obstante, la activación de la vía del TGF- β también conduce a la degradación rápida de SnoN, y en menor grado, a la de c-Ski (Sun *et al.*, 1999a, b). El mecanismo de degradación de SnoN es el siguiente: TGF- β induce el ensamblaje de un complejo de APC (*anaphase promoting complex*, o cicloso) ó de Smurf2 (una ligasa E3 de ubiquitina) con Smad2 ó 3. Smad2, cuya asociación con SnoN se afianza ante la estimulación con TGF- β , remite a SnoN al complejo APC (de 11 subunidades en mamíferos) ó a Smurf2 para que éstos lo ubiquitinen y sea así marcado para su degradación por el proteosoma (Bonni *et al.*, 2001; Stroschein *et al.*, 2001; Want *et al.*, 2001). Empero, TGF- β induce –a las dos horas de haber sido aplicado– la síntesis *de novo* de SnoN, dándole fin a la oleada de señalización por TGF- β y regresando a Smad2 y 4 a su estado reprimido (Stroschein *et al.*, 1999). Ski puede formar complejos del que forman parte Smad2, Smad3 y Smad4 en un elemento de respuesta a Smad (SBE) en un promotor y suprimir su potencial transactivador a través del reclutamiento de N-CoR, y posiblemente a través del reclutamiento de su complejo de HDACs asociado. La propiedad de SnoN y de c-Ski de hacer a una célula resistente al efecto inhibitor del crecimiento del TGF- β cuando aquéllos son sobreexpresados artificialmente puede ser la responsable de que SnoN y Ski sean protooncoproteínas (Luo *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000). TGIF es un correpresor transcripcional activado por la vía Ras-MEK-MAPK que se une a los Smads impidiendo que funcionen; recluta al correpresor HDAC para llevar a cabo esta función (Wotton *et al.*, 1999a, b, 2001). Hgs, Disabled, axina y ELF (*Embryonic liver fodrin*, una β -espectrina) son proteínas adaptadoras que asisten la presentación de los Smads2 y 3 a T β RI (Shi y Massagué, 2003). La caveolina 1 es una proteína marcadora de las caveolas, microdominios de la membrana celular ricos en colesterol, que interactúa con T β RI un tiempo después de ser éste activado para impedir la fosforilación de Smad2 (Razani *et al.*, 2001). Tanto T β RI como T β RII y Smad2 –no así Smad4– se localizan en caveolas, pero la ubicación en estos microdominios es independiente de la caveolina 1 (Razani *et al.*, 2001).

Interacción con otras vías de señalización

La señalización por TGF- β se integra con y es modulable por otras vías de señalización como la de Ras/Erk1/2, Jak1/Stat y Akt/PKB. Por ejemplo, al ser activada por factores como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o el factor de crecimiento epidérmico (EGF) –cuyos receptores tienen cinasas de tirosina–, la cinasa Erk1/2 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), corriente abajo de Ras, causa la fosforilación de Smad2 y Smad3 en la región conectora y con ello impide su acumulación nuclear en algunos casos (Kretzschmar *et al.*, 1999). La activación de la cinasa CaMKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) también resulta en la fosforilación de los Smads 2, 3 y 4 en la región conectora y el dominio MH1, y en una translocación reducida de Smad2 al núcleo ante la estimulación con TGF- β ; la proteína cinasa C (PKC) fosforila a Smad2 y Smad3 en su dominio MH1, lo cual resulta en la abolición de la unión al ADN de Smad3. Contrariamente, MEKK1 (*MAPK/Erk kinase kinase 1*), que actúa corriente abajo de Ras y corriente arriba de Erk MAPK y de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), al ser activada, potencia las funciones transactivadoras de Smad2. Asimismo, JNK fosforila a Smad3 –no en el motivo SXS– y promueve la transcripción inducida por TGF- β . Esto concuerda con el hecho de que TGF- β induce la señalización por Erk MAPK y JNK (revisado en Derynck y Zhang, 2003). Interferón γ (IFN- γ), por su parte, tiene un receptor asociado con la cinasa de tirosinas Jak1, la cual, a su vez, media la fosforilación y activación del factor de transcripción Stat1. IFN- γ , actuando a través de Jak1/Stat1, y TNF- α , a través de NF-

κ B/RelA, inducen la expresión de Smad7, un Smad inhibitorio que impide la interacción de Smad3 con T β RI, con lo cual impiden la fosforilación de aquél en respuesta a TGF- β . Es así como IFN- γ y TNF- α inhiben la vía del TGF- β . Estas observaciones proporcionan una base mecánica de las acciones contrarias de TGF- β e IFN- γ en la regulación de las funciones linfocitarias (Bitzer *et al.*, 2000; Ulloa *et al.*, 1999). Las vías de Ras y de TGF- β no siempre son antagonicas. De hecho, durante embriogénesis, cooperan Ras y señalización de tipo activina en la inducción del mesodermo en *Xenopus* (Whitman, 1998). Induciendo genes del organizador de Spemann de *Xenopus*, un centro de señalización dorsal, la vía del Wnt y la de los Smads pueden cooperar: Smad2 puede potenciar la capacidad de Wnt de inducir a *siamosis*, mientras que Wnt puede potenciar la inducción de *gooseoid* y de *cordina* por Smad2 (Massagué y Chen, 2000); por su parte, el complejo Smad3-Smad4 puede interactuar directamente con Lef1/Tcf (*Lymphoid enhancer-binding factor 1 / T cell-specific factor*), factor transcripcional de la vía del Wnt e inducir a *twin* (Labbé *et al.*, 2000; Nishita *et al.*, 2000). Insulina e IGF-I contrarrestan los efectos transcripcionales del TGF- β a través de la inhibición de la activación de Smad3 pero no de Smad2; es posible que la responsable de ejecutar dicha inhibición sea la cinasa PI3K (cinasa de fosfatidilinositol 3-OH), dado que el inhibidor de la misma, LY294002, es capaz de contrarrestar los efectos de la insulina y del IGF-I, que la activan (Chen *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2003). Smad3, en su estado basal, se asocia en algunas líneas celulares con la cinasa de serinas y treoninas Akt/PKB –que está corriente arriba de PI3K– sin ser requerida la actividad de cinasa de Akt para que haya tal asociación; Akt secuestra a Smad3 e impide que sea fosforilado, redundando en un impedimento de la apoptosis causada por TGF- β (Conery *et al.*, 2004). En contraste, durante la transición epitelio-mesenquimatosa (ver párrafos más abajo su defición), al parecer, se requiere como parte de la señalización por TGF- β , la activación de las cinasas Akt/PKB y PI3K para lograr la remoción de la proteína ZO-1 (*Zona Occludens 1*) de uniones oclusivas, la fosforilación de Smad2 en su extremo carboxilo y la activación de genes reporteros respondientes a TGF- β (Bakin *et al.*, 2000).

Señalización por TGF- β independiente de Smads

TGF- β activa –independientemente de los Smads– a las cinasas JNK y p38, ambas cinasas MAP; se sabe que lo hace con rapidez (5 a 15 minutos) y que a través de ellas puede –al menos– regular positivamente la función de los Smads mediante fosforilación en la región conectora. Se ha propuesto que T β RI activa a la cinasa TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) –que interactúa con el cofactor TAB1 (*TAK-binding protein 1*)– a través de la cinasa HPK-1; TAK1 presuntamente fosforilaría a enzimas MKK que a su vez fosforilan a JNK ó a p38 (Massagué y Chen, 2000); se ha propuesto también la posibilidad de que estas activaciones tengan consecuencias no transcripcionales. TAK1 además es un regulador negativo de la vía de la β -catenina/TCF. La activación de JNK en algunas líneas celulares conduce a la fosforilación de c-Jun y a la consecuente activación del factor AP-1 (Jun-Fos) (Massagué y Chen, 2000). El TGF- β también puede activar rápidamente a las GTPasas tipo Rho: RhoA, Rac y Cdc2, las cuales están involucradas en la reorganización del citoesqueleto ante la estimulación por TGF- β y en la activación de JNK y p38 (Engel *et al.*, 1999). PKC y PI3K también son activadas rápidamente ante la estimulación por TGF- β (Romero Ávila *et al.*, 2002).

Respuestas de las células ante la estimulación por TGF- β

Las células muestran múltiples respuestas cuando son estimuladas por TGF- β . Casi todas las células en cultivo poseen receptores de TGF- β en su superficie, y por ende, son potenciales células blanco de este factor. La clase de respuesta depende del tipo celular, del estadio de diferenciación, de la presencia de otros factores de crecimiento, del entorno celular, etc., en suma, de su contexto fisiológico particular.

La manera como las células responden al TGF- β es regulando:

- i. su proliferación
- ii. su diferenciación
- iii. la abundancia y naturaleza de su matriz extracelular
- iv. su migración (a través de quimiotaxis)
- v. su supervivencia (a través de apoptosis)

Regulación por TGF- β de la proliferación celular

El TGF- β induce o impide proliferación en una célula dependiendo del tipo celular y de la línea celular de ésta. Promueve la proliferación de tipos celulares provenientes de mesénquima como fibroblastos (Leof *et al.*, 1986), osteoblastos (Centrella *et al.*, 1987), células musculares lisas (Battegay *et al.*, 1990) y células de Schwann (Ridley *et al.*, 1989). Detiene la proliferación de tipos celulares como células epiteliales y queratinocitos (Massagué y Polyak, 1995).

Mecanismo de estimulación de la proliferación

En fibroblastos, células musculares lisas y condrocitos, el TGF- β induce mitosis indirectamente, dado que primero estimula la producción de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas, de *platelet derived-growth factor*) y después, éste, a su vez, es el que promueve la proliferación de manera autocrina (Leof *et al.*, 1986; Soma y Grotendorst, 1989; Battegay *et al.*, 1990). Asimismo, en otras células, el TGF- β puede inducir otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), que también estimula mitosis autocrinamente (Igarashi *et al.*, 1993) y favorece la unión del TGF- β a sus receptores a la vez que impide la unión de BMP4 a los suyos (Abreu *et al.*, 2002).

Mecanismo de inhibición de la proliferación

El mecanismo por el cual el TGF- β inhibe la proliferación celular se ha estudiado principalmente en las líneas celulares Mv1Lu, proveniente de epitelio de pulmón de visón, y HaCat, proveniente de queratinocitos (Massagué y Polyak, 1995). El TGF- β tiene la propiedad de congelar el ciclo celular en la fase G1 tardía, siempre y cuando la célula lo reciba en los inicios de G1, debido a que a partir de la transición de G1 a S, la célula se vuelve insensible ante el efecto antiproliferativo del TGF- β (Laiho *et al.*, 1990a; Geng y Weinberg, 1993). Durante el ciclo celular, la proteína retinoblastoma (pRB) es hiperfosforilada poco antes de la transición de G1 a S y es devuelta a su estado hipofosforilado al terminar la mitosis. El TGF- β ocasiona que pRB se mantenga hipofosforilado; pRB en este estado es el que impide que el ciclo celular progrese de G1 a S, y la manera como lo hace es uniendo y desactivando a factores de transcripción como E2F y desactivando por ejemplo la expresión de *c-fos*. Si la célula se ha de dividir, pRB es hiperfosforilado y en consecuencia E2F queda libre para activar transcripcionalmente a

una serie de genes necesarios para entrar a la fase S, para el avance del ciclo celular y para la replicación del ADN como *c-myc* (Weinberg *et al.*, 1995, 1996). La forma como el TGF- β mantiene a pRB en un estado hipofosforilado es regulando la expresión y la actividad de ciclinas de la fase G1, de sus respectivas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks, de *cyclin-dependent kinases*) y de inhibidores de éstas. Cdk4 y Cdk6 se asocian con las ciclinas D, y a su vez, Cdk2 se asocia con la ciclina E. Durante la fase G1 tardía, la expresión de la *ciclina E* y de *cdk2* se induce fuertemente. Se piensa que los complejos Cdk4-ciclina D y Cdk2-ciclina E fosforilan a pRB (Sherr y Roberts, 1999; Weinberg *et al.*, 1995). En las células Mv1Lu, el TGF- β impide que se incremente la expresión de *cdk4* pero no la de *ciclina D* al término de G1; concordantemente, la sobreexpresión de *cdk4* pero no la de *cdk2* resulta en la fosforilación de pRB al término de G1 y en el consecuente ingreso a la fase S aun en presencia de TGF- β ; en las células HaCat, el TGF- β impide que se incremente la expresión de *cdk2* y la de *ciclina E*. Asimismo, inhibe el incremento de *ciclina A* que se da tardíamente en G1 (Ewen *et al.*, 1993; Geng y Weinberg, 1993; Koff *et al.*, 1993). El TGF- β también incide positivamente en la expresión de inhibidores de Cdks. Los inhibidores de una clase, donde se incluyen p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, suprimen la actividad de cinasa de los complejos Cdk4-ciclina D, Cdk6-ciclina D y Cdk2-ciclina E, al unírseles directamente. Estos inhibidores también impiden que Cak (de *Cdk activating-kinase complex*) active a las Cdks. Inhibidores de Cdks de una segunda clase, concretamente p16^{Ink4} y p15^{Ink4B}, se unen a Cdk4 y a Cdk6 para evitar la interacción de éstos con la ciclina D; de este modo, impiden que se activen estas Cdks (Sherr y Roberts, 1999). Se piensa que el alto que el TGF- β pone a la proliferación celular necesita de la participación de ambas clases de inhibidores de Cdks. En las células Mv1Lu, el aumento en la síntesis de p15^{Ink4B} inducido por TGF- β hace que p27^{Kip1} se desplace del complejo Cdk4-ciclina D al complejo Cdk2-ciclina E, al que también inhibe. Por lo tanto, el aumento en la acción de p27^{Kip1} contra los complejos de Cdk2 es consecuencia no de una síntesis mayor de p27^{Kip1}, sino de un evento de desplazamiento originado por una mayor síntesis de p15^{Ink4B}. En las células HaCat el TGF- β detiene el ciclo celular de manera similar que en las células Mv1Lu, pero en ellas hace que aumente además la síntesis de p21^{Cip1} (Reynisdóttir *et al.*, 1995; Datto *et al.*, 1995; Hannon y Beach, 1994). El complejo transcripcional orquestado por TGF- β responsable del incremento de la síntesis de p15^{Ink4B} y de p21^{Cip1} incluye a los Smads 2, 3 y 4, que al reclutar a CPB/p300, potencian la actividad transcripcional de Sp1 (Feng *et al.*, 2000; Pardali *et al.*, 2000). El TGF- β también suprime la expresión de *c-myc*, un gen cuyo producto es un activador transcripcional potente de genes necesarios para el crecimiento y la proliferación. La forma como TGF- β abate a este gen es induciendo la translocación al núcleo de un complejo Smad3-E2F4/5-DP1-correpressor p107 preensamblado en el citoplasma. Ya estando en el núcleo, el complejo se asocia con Smad4 y se pega a un sitio compuesto Smad-E2F en el promotor del gen *c-myc*, frenando su transcripción.

En otro rubro, Miz-1 (*Myc-interacting zinc-finger protein 1*) es un factor transcripcional que aumenta la transcripción de p15^{Ink4B} al unirse a un elemento iniciador en su promotor. No obstante, mientras no haya estimulación por TGF- β , Myc, junto con Max, forma un complejo con Miz-1 en dicho elemento iniciador e inhibe la activación transcripcional por Miz-1, pero en cuanto la hay, Myc deja de ser reclutado a este complejo y en su lugar se pega un complejo de Smads (Staller *et al.*, 2001; Seoane *et al.*, 2001). Al ser detenida la expresión de *c-myc*, p15^{Ink4B} también se libera de la represión de que era objeto por parte de Myc (Shi y Massagué, 2003). Otra forma como el TGF- β contribuye a detener el ciclo celular es inhibiendo a la cinasa p70^{S6}. La proteína fosfatasa 2A (PP2A) –a través de su subunidad B α – se une al dominio intracelular del T β RI de manera dependiente de TGF- β .

PP2A resulta fosforilada por T β RI, facultándose así para desfosforilar y desactivar a p70^{S6}, una cinasa clave para el avance del ciclo celular (Griswold-Prenner *et al.*, 1998; Petritsch *et al.*, 2000). En resumen, el aumento de la expresión de p15^{Ink4B} y de p21^{Cip1} y la disminución de la expresión de c-Myc y la desactivación de p70^{S6} son parte del mecanismo mediante el cual el TGF- β para el ciclo celular.

Regulación por el TGF- β de la diferenciación celular

La regulación que el TGF- β ejerce sobre la diferenciación celular se ha estudiado en células en cultivo e *in vivo* en modelos de inyección de la proteína y más recientemente en modelos de expresión transgénica en ratones del ADNc del TGF- β o de sus receptores mutantes de actividad constitutiva o dominante negativa. Un modelo importante de diferenciación celular en el que el TGF- β es un actor fundamental es el de la conversión de mioblastos a miotubos *in vitro*, que a grandes rasgos recrea la formación de músculo esquelético *in vivo*. El TGF- β tiene una función dual en este modelo: por una parte, inhibe tal conversión, y por otra, la promueve. Acorde con lo segundo, la exposición de células estaminales embrionarias (*embryonic stem cells*) al TGF- β resulta en un fenotipo muscular (Slager *et al.*, 1993). Asimismo, ha quedado de manifiesto que si se anula la señalización por TGF- β en mioblastos, haciéndolos sobreexpresar un receptor II sin cola citoplásmica, éstos ya no son capaces de diferenciarse a miotubos, y al parecer, debido a que no hay inducción de los factores de transcripción miogénicos (Filvaroff *et al.*, 1994). Es posible que el TGF- β evoque una respuesta en los mioblastos, que sería la de impedir una diferenciación precoz, y una muy diferente una vez que se ha ido un tiempo y regresa, que sería la de promover la diferenciación, siendo indispensable el que regrese para que haya diferenciación.

El TGF- β también inhibe *in vitro* la diferenciación de células mesenquimatosas en adipocitos (Ignatz y Massagué, 1985; Choy *et al.*, 2000). Las células mesenquimatosas pueden asimismo diferenciarse en condrocitos, que dan lugar al cartílago, y en osteoblastos, que depositan matriz ósea. Parece ser que el TGF- β promueve la diferenciación de células mesenquimatosas a condrocitos o a osteoblastos dependiendo de las condiciones de cultivo, aunque cabe mencionar que el TGF- β impide la maduración de osteoblastos una vez que éstos ya están plenamente establecidos como tales (Centrella *et al.*, 1994). El TGF- β , para inhibir la diferenciación hacia osteoblastos y hacia adipocitos, se vale de la represión funcional de factores de transcripción esenciales para que ocurran tales procesos. Así, Smad3 inhibe la diferenciación osteoblástica bloqueando la capacidad transactivadora de Runx2/CBFA1 (Alliston *et al.*, 2001) y la adipocítica inhibiendo la de C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*) (Choy y Derynck, 2003), sin bloquear sus respectivas capacidades de unirse al ADN.

In vivo, si se inyecta TGF- β por debajo del pericondrio, sus células mesenquimatosas responden al principio proliferando y después diferenciándose en condrocitos. El cartílago así formado es sustituido posteriormente con tejido óseo (Joyce *et al.*, 1990). Por otra parte, la sobreexpresión transgénica de TGF- β 2 en osteoblastos de ratones trae consigo un fenotipo esquelético: los preosteoblastos proliferan más y se da una mayor densidad de osteocitos, así como una osificación retardada; existe una pérdida gradual de hueso que se incrementa con la edad, como en la osteoporosis de tasa de recambio rápida, donde hay un desbalance entre el aumento en el depósito de hueso por parte de osteoblastos y el aumento en su reabsorción por parte de osteoclastos (Erlebacher *et al.*, 1996). No obstante, en ratones, la supresión transgénica de la señalización por los

receptores de TGF- β en tejido esquelético promueve una diferenciación terminal de condrocitos que eventualmente conduce a la degeneración del cartilago articular a semejanza de lo que sucede en la osteoartritis humana (Serra *et al.*, 1997).

El TGF- β participa en eventos de transformación o transdiferenciación epitelio-mesenquimatosas. Esta transición se caracteriza por cambios drásticos en la expresión de moléculas de adhesión celular y por un viraje en la composición de los filamentos intermedios del citoesqueleto: de citoqueratina a vimentina. Así, el TGF- β induce cambios en morfología; aminora la expresión de la E-cadherina, de ZO-1, vinculina y queratina, mientras que induce la de vimentina y N-cadherina, lo cual conduce a una mayor motilidad y dispersión celular (Derynck *et al.*, 2001). Durante el desarrollo cardiaco (Potts *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1999), palatino (Proetzel *et al.*, 1995; Kaartinen *et al.*, 1995), renal, de ductos mamarios, epidérmico (Plisov *et al.*, 2001; Zeisberg *et al.*, 2003; Zavadil *et al.*, 2004) y de folículos pilosos (Dohrmann *et al.*, 1999), el TGF- β opera como inductor esencial de transiciones epitelio-mesenquimatosas.

El TGF- β puede también incidir importantemente en la morfogénesis de estructuras epiteliales ramificadas como lo son el pulmón y la glándula mamaria en desarrollo. *Ex vivo*, el TGF- β inhibe la ramificación de ductos y promueve su involución en explantes de pulmón fetal (Serra *et al.*, 1994). Asimismo, la sobreexpresión transgénica de TGF- β 1 en células epiteliales del tracto respiratorio bajo el control del promotor de la proteína surfactante C bloquea en el pulmón la gemación de ácinos y la morfogénesis sacular, así como la diferenciación epitelial (Zhou *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 2001).

Regulación por TGF- β de la síntesis de proteínas de matriz extracelular

El TGF- β modifica la matriz extracelular de la mayoría de las células que no tienen un origen hematopoyético. Induce la síntesis y la secreción de muchas proteínas de la matriz extracelular, como colágenas, fibronectina, trombospondina, osteopontina y proteoglicanos. Asimismo, el TGF- β incrementa la expresión de varias integrinas. Las integrinas son receptores transmembranales que conectan la matriz extracelular con la red de filamentos de actina, gracias a lo cual funcionan como adhesivos para las células. El aumento en la expresión de integrinas resulta frecuentemente en una adhesión mayor de las células a la matriz. Asimismo, el TGF- β disminuye la secreción de proteasas –*v.g.*, colagenasas–, a la vez que aumenta la síntesis de inhibidores de proteasas como el PAI-1. El efecto neto del aumento en el depósito de proteínas de matriz extracelular en combinación con el impedimento de su degradación es una matriz más abundante y dependiendo del contexto, podría incluso ser una variación en su composición (Tabibzadeh, 2002).

Regulación por TGF- β de la quimiotaxis

El TGF- β es un potente quimioatrayente de algunos tipos celulares como monocitos y fibroblastos (Wahl *et al.*, 1987; Postlethwaite *et al.*, 1987). Esta actividad puede ser muy importante en sitios de reparación de heridas o en otros procesos de reparación, donde el TGF- β activado localmente estimula la llegada de monocitos, macrófagos y fibroblastos.

Regulación por TGF- β de la supervivencia

El TGF- β induce apoptosis en una variedad de tipos celulares como hepatocitos y en células epiteliales normales de pulmón humano. Se ha encontrado que la proteína adaptadora Daxx, asociada con el receptor de Fas y mediadora de la activación de JNK durante la apoptosis inducida por Fas, se pega al T β RII. Notablemente, TGF- β también es capaz de activar a JNK, por lo que es probable que el vínculo entre la maquinaria apoptótica y los receptores de TGF- β sea Daxx (Perlman *et al.*, 2001). Los Smads también son partícipes en la apoptosis inducida por TGF- β . Se ha hallado que cuando los Smads 3 y 4 son sobreexpresados inducen muerte celular programada (Yanagisawa *et al.*, 1998; Atfi *et al.*, 1997). Por el contrario, el TGF- β 1 promueve *in vitro* la generación de células dendríticas al impedir que los progenitores de éstas expresen Fas y por ende se mueran debido a apoptosis (Riedl *et al.*, 1997).

Papel del TGF- β en la embriogénesis

Las acciones del TGF- β administrando la proteína *in vitro* o *in vivo* resultaron ser variadas y de gran potencia. Sin embargo, aún quedaban por ser esclarecidas interrogantes esenciales como el saber cuáles serían las acciones del TGF- β durante la embriogénesis, en la homeostasis del organismo adulto, etc.; saber si las tres isoformas desempeñarían papeles redundantes; saber si el TGF- β sería un partícipe primordial en ciertos estados patológicos y muchas más. Fue entonces que se procedió a desactivar o a sobreexpresar los genes de los componentes de la vía de señalización del TGF- β en ratones y determinar el efecto que se produce en su organismo; asimismo, a determinar el patrón de expresión espacio-temporal de estos genes.

Patrón de expresión de las isoformas de TGF- β

El TGF- β juega un papel importante en el desarrollo de tejidos mesenquimatosos (el mesénquima hace referencia a células laxamente agrupadas, inconexas físicamente, derivadas del mesodermo o de la cresta neural –de origen ectodérmico– (Gilbert, 2000)). La mayoría, si no es que todos los órganos, expresan una o más de las isoformas de TGF- β en alguna etapa durante organogénesis; los dominios y tiempos de expresión de las isoformas se superponen entre sí en parte y coinciden regularmente con eventos de diferenciación tisular y morfogénesis; en algunos de estos eventos, se depositan además componentes de matriz extracelular como colágenas, fibronectina y glicosaminoglicanos, y por lo tanto, es posible que el TGF- β esté incidiendo en ellos mediante la alteración de las interacciones célula-matriz. Entre los órganos que presentan estadios de expresión abundante de las isoformas están el cerebro, el corazón, el riñón, la piel, así como los sistemas vascular y hematopoyético, y en tejidos de origen mesenquimatoso, particularmente cartílago y hueso. El TGF- β también se sintetiza en células mesenquimatosas que interactúan con epitelios, relaciones conocidas como interacciones epitelio-mesenquimatosas; éstas son vitales dado que están involucradas en la generación del riñón y de las válvulas cardíacas, por ejemplo (Heine *et al.*, 1987; Lehnert *et al.*, 1988; Fitzpatrick *et al.*, 1990; Pelton *et al.*, 1990a, b, 1991; Heikinheimo *et al.*, 1993; Lawler *et al.*, 1994).

Fenotipo de los ratones knock-out de algunos de los componentes de la vía del TGF- β

La función de las isoformas de TGF- β y la de otros componentes del sistema de señalización del TGF- β durante el desarrollo embrionario se ha estudiado mediante el análisis de los efectos que produce la desactivación de los genes de dichos componentes

en el desarrollo normal de un embrión de ratón. Estos ratones “*knock-out*” de las isoformas de TGF- β tienen fenotipos muy diferentes entre sí, lo cual significa que cada una tiene su propia función durante la embriogénesis.

tgf- β 1^{-/-}

El 50% de estos ratones sufren de inflamaciones multifocales mixtas con infiltraciones rápidas y masivas de linfocitos en varios tejidos que los conducen a la muerte a las pocas semanas de haber nacido. Esta disfunción en los sistemas inmune e inflamatorio está acompañada de una sobreproducción de citocinas proinflamatorias como interferón γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y proteína 1 α inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α). Estos ratones también presentan un aumento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, de *major-histocompatibility complex*) clases I y II, de anticuerpos circulantes contra antígenos nucleares y de depósitos glomerulares patogénicos de IgGs, a semejanza de lo que sucede en enfermedades autoinmunes humanas. El aumento en la síntesis del MHC clase II es consistente con la capacidad del TGF- β de suprimir su expresión (Czarniecki *et al.*, 1988). También carecen de células de Langerhans en la epidermis, debido a que el TGF- β 1 se requiere para su diferenciación y para proteger su viabilidad.

El restante 50% muere *in utero* a los 10.5 dpc (días *post-coitum*) debido a deficiencias en los tubos capilares de la vasculatura del saco vitelino (propio del embrión) como consecuencia de una diferenciación pobre de células endoteliales; y a una cantidad baja de eritrocitos en el saco vitelino como consecuencia de una hematopoyesis defectuosa (Shull *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1993; Dickson *et al.*, 1995; Borkowski *et al.*, 1996, 1997; Christ *et al.*, 1994; Dang *et al.*, 1995). Es interesante hacer notar que aunque el TGF- β 1 inhibe el crecimiento de células endoteliales (Heimark *et al.*, 1986; Muller *et al.*, 1987) y hematopoyéticas (Ohta *et al.*, 1987; Ottman *et al.*, 1988; Keller *et al.*, 1990) en cultivo, su papel principal *in vivo* puede ser el de regular la diferenciación de estos tipos celulares, lo cual es consistente con la elevada expresión de TGF- β 1 en estas células durante el desarrollo temprano del ratón (Wilcox *et al.*, 1988; Akhurst *et al.*, 1990).

tgf- β 2^{-/-}

Tienen defectos cardiacos, pulmonares, oftálmicos, óticos, renales, urogenitales y esqueléticos incluyendo paladar hendido y huesos craneofaciales, axiales y apendiculares deformes debido a que crecen menos y se osifican menos. Todo esto apunta hacia la participación del TGF- β 2 en interacciones epitelio-mesenquimatosas (Sanford *et al.*, 1997).

tgf- β 3^{-/-}

Tienen paladar hendido, lo cual indica que esta isoforma se requiere para la fusión de las placas palatinas, y con esto concuerda la expresión de esta isoforma en el epitelio del surco medio (Pelton *et al.*, 1990b). Además, tienen pulmones defectuosos, por lo cual mueren poco después del nacimiento (Kartinen *et al.*, 1995; Proetzel *et al.*, 1995).

tβⁱⁱ^{-/-}

Tienen defectos en la hematopoyesis y vasculogénesis del saco vitelino; su fenotipo es el mismo que el de los ratones *TGF-β1*^{-/-} (Oshima *et al.*, 1996).

tβⁱⁱⁱ^{-/-}

Ya fue descrito el fenotipo líneas arriba (ver página 33).

smad2^{-/-}

La región anterior de su epiblasto (del que se derivan ectodermo, mesodermo y endodermo durante la gastrulación) –normalmente destinada a convertirse en neuroectodermo– se convierte en mesodermo posterior, careciendo así de polaridad próximo-distal y dándose un defecto en el establecimiento de la identidad antero-posterior. Los embriones tienen además defectos en la inducción del mesodermo, en su patrón derecha-izquierda y en estructuras craneofaciales; mueren antes del día 8.5 de desarrollo (Attisano y Tuen Lee-Hoeflich, 2001).

smad3^{-/-}

Son viables, aunque presentan cicatrización acelerada, una respuesta inflamatoria local empobrecida, una menor respuesta de células T a TGF-β, adenocarcinoma colorectal metastático y enfermedad degenerativa del cartílago articular debido a diferenciación hipertrófica de condrocitos, semejando osteoartritis (Attisano y Tuen Lee-Hoeflich, 2001).

smad4^{-/-}

Presentan defectos en la gastrulación (proliferación de células del epiblasto e inducción del mesodermo) y en el desarrollo de estructuras anteriores. Se mueren al día 7 *post-coitum*. Los ratones heterocigotos desarrollan tumores gástricos e intestinales (Attisano y Tuen Lee-Hoeflich, 2001).

smad6^{-/-}

Estos ratones presentan múltiples defectos en el desarrollo y la homeostasis del sistema cardiovascular, *v.g.*, se les osifica la aorta, posiblemente debido a señalización irrestricta por BMPs (Galvin *et al.*, 2000).

¿Cómo explicar que sean tan diferentes los fenotipos de los ratones *knock-out* de las 3 isoformas de TGF-β?, ¿sería posible, por ejemplo, evitar los defectos fenotípicos que ocasiona la desactivación del gen de TGF-β2 si se colocara la secuencia codificante de TGF-β1 o TGF-β3 bajo el control de las secuencias reguladoras de TGF-β2, como lo son región promotora, *enhancers* corriente arriba, secuencias 5' y 3' no traducidas, etc.? Hasta el momento se sabe que por lo general, las respuestas ante la estimulación con cualquiera de las 3 isoformas de TGF-β activo –*e.g.*, inhibición de la proliferación, síntesis de proteínas de matriz extracelular– es comparable en las células en que se han estudiado, asumiendo que está expresado el betaglicano para tener respuesta también hacia TGF-β2 (López Casillas *et al.*, 1993). Sin embargo, existe la posibilidad de que en otros sistemas celulares, o incluso en los mismos, cada isoforma ejerza efectos únicos,

además de los comunes a las tres. Al respecto, se ha vislumbrado, aunque no demostrado con certeza, que TGF- β 1 no es capaz de disparar procesos de transformación epitelio-mesenquimatosa en el corazón embrionario que conducen a la formación de válvulas cardíacas, mientras que TGF- β 2 sí (Brown *et al.*, 1999). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que en solución cada isoforma adopte una conformación espacial diferente, que conlleve a que cada una sea contactada en diferentes áreas de su superficie por los receptores, por ejemplo. Esto podría hipotéticamente conllevar a que el complejo que forma cada isoforma con los receptores de TGF- β adopte una estructura diferente –incluso una composición estequiométrica diferente– y con ello una estabilidad diferente, lo cual determine la intensidad y/o duración del estímulo al interior de la célula, y que de ello dependa la respuesta que emerge; a manera de analogía, BMP4, activina y posiblemente otros miembros de la superfamilia del TGF- β , pueden funcionar como morfógenos durante el desarrollo embrionario e inducir destinos celulares variados en función de gradientes de concentración: a través de una ocupación diferencial de sus receptores, activan de forma disímil Smads, lo cual redundante en la inducción de diferentes conjuntos de genes (Wilson *et al.*, 1997; Dyson y Gurdon, 1998). Otra posibilidad es que cada isoforma se valga además de receptores alternos que también tengan efectores intracelulares propios. Además, se han detectado *in vivo* heterodímeros TGF- β 1.2 y TGF- β 2.3, lo cual lanza la posibilidad de señalización combinatoria (Cheifetz *et al.*, 1987; Ogawa *et al.*, 1992). Otro apoyo del uso de más receptores de señalización es el hecho de que el ratón *t β rii^{-/-}* recapitula sólo el fenotipo del ratón *tgf- β 1^{-/-}* (Oshima *et al.*, 1996), es decir, no se caracteriza por acumular los defectos que traería el no tener las 3 isoformas de TGF- β , que sería lo esperado si estas isoformas únicamente señalizaran a través de T β RII, por lo que probablemente, TGF- β 2 y TGF- β 3, aun en presencia de T β RII, pueden hacer uso de otros receptores señalizadores. Esta hipótesis podría estar respaldada por dos artículos que reportan receptores específicos de isoforma anclados por enlaces de glicosilfosfatidilinositol (Cheifetz y Massagué, 1991; Tam *et al.*, 2003).

Dado que esta tesis versa sobre la expresión del betaglicano en un modelo *in vitro* de la formación de músculo esquelético, se dará una descripción de este proceso.

3. III. MIOGÉNESIS ESQUELÉTICA

La miogénesis esquelética es un evento de diferenciación celular que conduce a la formación de músculo esquelético a partir de precursores dermomiótómicos. La diferenciación comprende la represión de genes asociados con el progreso del ciclo celular, la activación transcripcional de cientos de genes específicos de músculo y la fusión de mioblastos mononucleados entre sí para formar miotubos multinucleados. Durante la embriogénesis, las somitas, estructuras epiteliales que se forman en el mesodermo paraxial, generan el dermomiótomo epitelial –que da lugar al músculo esquelético del tronco y extremidades y a la dermis– y el esclerotomo mesenquimatoso – que da lugar a hueso y cartílago de vértebras y costillas–.

El desarrollo del músculo esquelético está orquestado por los factores reguladores de músculo (MRFs) de baja redundancia funcional MyoD, Myf5, miogenina y MRF4, los cuales son considerados factores transcripcionales maestros debido a que la transfección de sus ADNcs convierte varios tipos celulares como fibroblastos en células musculares (Davis *et al.*, 1987; Wright *et al.*, 1989; Rhodes y Konieczny, 1989). Por tal motivo, se piensa que los MRFs establecen y mantienen un fenotipo muscular en las células que

endógenamente los expresan (Weintraub *et al.*, 1991). Estos cuatro factores transcripcionales se originaron al parecer de un solo gen miogénico ancestral que experimentó dos rondas de duplicación genética (Atchley *et al.*, 1994). Los MRFs comparten un dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*) –compuesto de una región básica y de una región contigua hélice-asa-hélice– necesario para unirse al ADN y para dimerizarse con factores transcripcionales E como E12 y E47. Los heterodímeros MRF–E12/47 y los monómeros de MRFs se unen a cajas E, localizadas en los promotores de varios genes específicos de músculo. Los MEF2s (de *myocyte-specific enhancer-binding factors 2*) son miembros de otra familia importante de transactivadores miogénicos; potencian la expresión de genes musculares llevada a cabo por los MRFs. Además de activar la transcripción de decenas de genes estructurales de músculo, varios de los miembros de las familias bHLH y MEF2 se auto e interactúan, lo cual resulta en un circuito autorregulador encargado de mantener el fenotipo muscular.

Contribución de los factores miogénicos maestros individuales *in vivo*

Los precursores miogénicos migran desde las somitas hasta las extremidades y el tronco, donde fundan masas musculares esqueléticas. Wnt3A se encarga de inducir en los precursores miogénicos la expresión de Pax3, un factor de transcripción homeótico que los especifica irreversiblemente como tales en las somitas (en los ratones sin Pax3, la formación de músculo esquelético queda abolida); en tiempos posteriores, los precursores miogénicos experimentan la inducción en cascada de más transactivadores maestros que los conducen a un grado de diferenciación cada vez mayor: Six1-Eya2-Dach2 (Six: **S**ine oculis; Eya: **E**yes absent; Dach: **D**achshund) → Myf5 ↔ MyoD → miogenina. Durante su trayecto y aun estando en las somitas, estos precursores no expresan genes de la familia de MyoD: su programa de diferenciación queda temporalmente desactivado hasta que llegan a su hogar final. BMP4 se encarga de inhibir la expresión de *MyoD* y de *Myf5* para impedir una diferenciación prematura, mientras que Noguina (una proteína que impide que BMP4 se una a sus receptores de la superficie celular), inducida por Wnts, puede contrarrestar esta inhibición (ver la figura A2 para una descripción somera de la naturaleza de los receptores de BMPs, de Wnts y de Hedgehogs). *MyoD* es activado finalmente por Wnt3A y Wnt7A, de forma dependiente de la β -catenina y de proteínas G/PKC, respectivamente, y por Pax3. Por su parte, *Myf5* es activado por Sonic Hedgehog (Shh), Wnt1, MyoD y Pax3. En los ratones *Shh*^{-/-}, la formación de los músculos epaxiales (de la espalda) queda abolida. Los ratones *MyoD*^{-/-}; *Myf5*^{-/-} carecen totalmente de músculo esquelético, y en ellos, las células precursoras de músculo adquieren destinos no musculares, lo cual ilustra que MyoD y Myf5 son esenciales en la especificación de músculo. Aunque ha habido controversia en cuanto a la diferencia de función entre MyoD y Myf5 en vista de que el ratón *knock-out* de *MyoD* se desarrolla normalmente gracias a que *Myf5* es capaz de compensar su función, viendo elevada su expresión 3.5 veces (Mohun, 1992), *Myf5*, al parecer, promueve proliferación, mientras que MyoD preponderantemente detiene el ciclo celular e induce la diferenciación de los mioblastos postnatales. Una vez que las células miogénicas han sido determinadas por MyoD y Myf5 –conocidas ahora como mioblastos–, se requiere que se diferencien y se fusionen de forma dependiente de miogenina y MRF4 para formar miotubos y miofibras multinucleadas. Los ratones que carecen de *miogenina* mueren perinatalmente como resultado de una pérdida grave de fibras musculares diferenciadas, aunque poseen cantidades normales de mioblastos indiferenciados, lo cual indica que miogenina es importante para la diferenciación de los mioblastos, más que para su especificación. Los ratones carentes de *Mrf4* indican un requerimiento de este factor en diferenciación terminal, fusión y mantenimiento de miofibras. A pesar de no ser factores transcripcionales miogénicos sino un factor de crecimiento y su receptor, HGF/SF

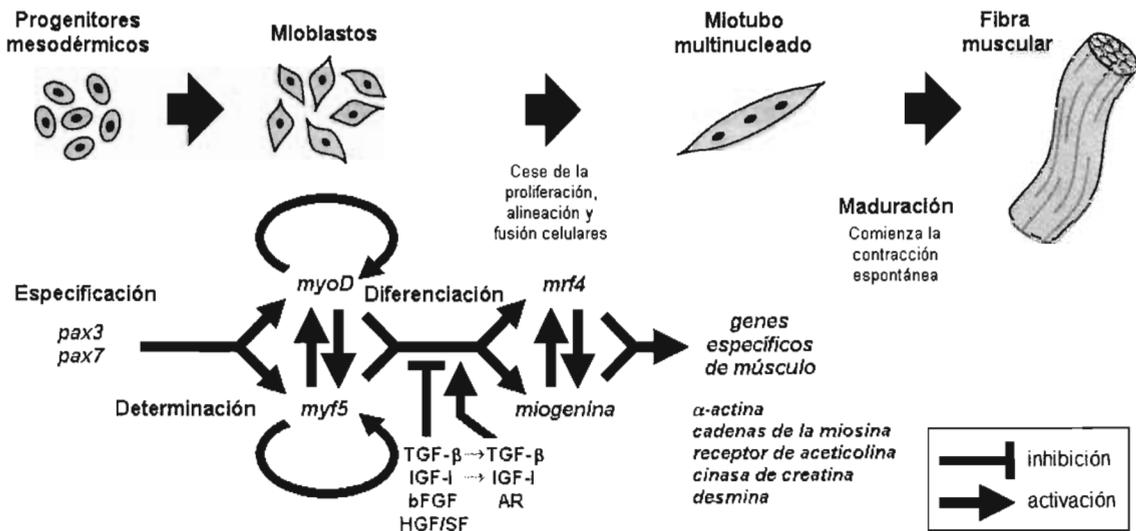


Figura A10. Regulación molecular de la formación de miotubos a partir de mioblastos. Los progenitores mesodérmicos son especificados como mioblastos por el factor transcripcional Pax3 durante la miogénesis embrionaria o por Pax7 durante la miogénesis postnatal. En cualquier caso se induce la expresión de MyoD y/o de Myf5, que especifican a los mioblastos como tales. *In vivo*, éstos pueden permanecer en un estado silencioso o bien ser activados ante daño muscular, el cual detona su proliferación y posterior diferenciación y fusión entre sí o incorporación a miotubos preexistentes. *In vitro*, factores de crecimiento como TGF- β , IGF-I, bFGF y HGF/SF impiden la conversión de mioblastos en miotubos, mientras que factores como el ácido retinoico la promueven. No obstante, tanto el TGF- β como el IGF-I tienen un rol adicional en este proceso: luego de que se dispara la diferenciación de los mioblastos, dichos ligandos son necesarios para que la miogénesis acontezca normalmente. Durante el proceso de maduración de los miotubos, éstos constituyen miofibras que al ser inervadas, adquieren identidad como de contracción rápida, intermedia o lenta (figura redibujada de Wolpert *et al.*, 1998).

(*Hepatocyte growth factor / Scatter factor*) y su receptor c-Met juegan un papel crucial en la miogénesis, dado que el *knock-out* de *HGF/SF* y el de *c-Met* carecen de músculos en las extremidades. Luego de que se han formado las fibras musculares, viene una segunda ola miogénica en la que comienzan a ser inervadas y que les da identidad como fibras de contracción rápida, intermedia o lenta. Al madurar, las miofibras quedan envueltas en una capa de tejido conectivo por donde atraviesan vasos sanguíneos y nervios.

Miogénesis *in vitro*

El estudio del proceso de la diferenciación miogénica se ha llevado a cabo en explantes de somitas y en embriones, pero más comúnmente en cultivos primarios y líneas celulares de mioblastos, pudiendo los mioblastos fusionarse entre sí *in vitro* para formar miotubos; como dato interesante, tenemos que otros tipos celulares que se fusionan entre sí son los macrófagos para generar osteoclastos, y los gametos para generar cigotos. La conversión *in vitro* de mioblastos a miotubos se caracteriza morfológicamente por el estiramiento y alineamiento de mioblastos y su posterior fusión entre sí, originando de este modo miotubos, células que al microscopio se aprecian multinucleadas y gigantes. Mientras que los miotubos son células diferenciadas terminalmente e incapaces de proliferar (aunque se puede forzar su desdiferenciación transfectándoles el ADNc del factor de transcripción homeótico *msx1*, Odelberg *et al.*, 2000), los mioblastos son células no diferenciadas por completo que sí proliferan cuando están expuestos a un medio rico en suero (10-20% de suero de feto bovino). Entre las líneas celulares de mioblastos que se han empleado como modelo de la miogénesis están la C₂C₁₂ (proveniente de mioblastos satélite –un tipo de células estaminales miogénicas esenciales para el mantenimiento postnatal del músculo– de músculo esquelético de contracción rápida de la pata de un ratón), la C₂ (progenitora de la C₂C₁₂), la Sol-8 (proveniente de músculo esquelético de contracción lenta de ratón), la L₆E₉ (de rata), etc., aunque la más usada actualmente es la C₂C₁₂.

Los programas genéticos que conducen a la formación de miotubos pueden dissociarse entre sí, es decir, por un lado está el programa de detención de la proliferación, por otro el de la diferenciación, y por otro aún, el de la fusión, ejecutándose coordinada y secuencialmente los tres durante el transcurso normal de la miogénesis. Por tal motivo, durante el proceso de diferenciación de mioblastos a miotubos tienen lugar cambios positivos y negativos en el nivel de expresión de centenares de genes, dando por resultado modificaciones en la naturaleza de las proteínas que desde entonces produce la célula muscular, todo lo cual conlleva a cambios en su fisiología, como el hacerla contráctil. Hay proteínas cuya expresión se eleva drásticamente –vía MRFs y MEF2C activando los promotores de sus genes–: α actina (habiendo habido β y γ), cadenas ligera y pesada de la miosina, tropomiosina, troponina (proteínas integrantes del aparato contráctil), receptor de acetilcolina nicotínico, acetilcolinesterasa (presentes en las sinapsis colinérgicas que desencadenan la contracción), desmina (filamento intermedio específico de músculo), transportador de glucosa Glut4, cinasa de creatina específica de músculo, etc. (figura A10).

Cese de la proliferación

En los mioblastos, la proteína pRB es hiperfosforilada por el complejo Cdk4-ciclina D1 poco antes de la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular, dejándola incapaz de detener el ciclo celular mediante el impedimento de su interacción con factores de transcripción de la familia E2F, necesarios para el progreso del ciclo celular. Cuando la

célula se empieza a diferenciar, pRB es mantenida en un estado hipofosforilado, pudiendo así capturar a E2F e inhibir el ciclo celular (Shin *et al.*, 1995; Corbeil *et al.*, 1995). MyoD, en niveles elevados, induce la expresión de p21^{Cip1}, un inhibidor de ciertos complejos de Cdk-ciclinas, deteniendo así el ciclo celular (Halevy *et al.*, 1995; Puri *et al.*, 1997).

Diferenciación

MyoD y miogenina son dos factores de transcripción maestros que se expresan sólo en células musculares esqueléticas. Una hélice α en el término carboxilo de MyoD es importante para iniciar la transcripción de genes normalmente silenciados, mientras que el dominio equivalente de miogenina funciona como transactivador general potenciando el nivel de expresión de genes que ya se expresan, y que por lo tanto, poseen una estructura de cromatina abierta. Aunque la expresión de MyoD y de Myf5 es ya detectable en los mioblastos en división activa, no lo es la de la miogenina: ésta se eleva notablemente sólo al haber diferenciación miogénica (Buckingham, 2001; Davis *et al.*, 1987; Edmondson y Olson, 1989; Weintraub *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989). En los mioblastos, MyoD y MEF2 ocupan promotores de genes blanco musculares como el de la *miogenina*, pero al estar asociados con HDACs (*histone deacetylases*), reprimen la transcripción de estos genes (Mal y Harter, 2003). Cuando se inicia la diferenciación, se disocian las HDACs de MyoD y de MEF2, siendo sustituidas por p300/CBP y otros coactivadores con actividad de HAT (*histone acetyltransferase*) como pCAF (*p300/CBP-associated factor*), conduciendo a la activación transcripcional de las regiones reguladoras de genes musculares. Esta es una explicación potencial de por qué MyoD y MEF2, aunque expresados en niveles bajos en mioblastos, no activan genes blanco en ellos. Al iniciarse la diferenciación miogénica, se incrementa la expresión y la actividad del canal de K⁺ Kir2.1, el cual eventualmente induce la hiperpolarización de la membrana de -10 a -70 mV, con la consecuente elevación de la concentración intracelular de Ca²⁺. El aumento en [Ca²⁺]_i modifica la actividad de CaMKII y de la fosfatasa calcineurina, haciendo que se dispare la expresión y la activación de la miogenina y de MEF2C (Konig *et al.*, 2004). La cinasa CaMKII es activada al inicio de la miogénesis como se indicó y fosforila entonces a HDACs, haciéndolas susceptibles al reconocimiento por la chaperona 14-3-3; juntas se translocan del núcleo al citoplasma, dejando a MEF2 libre para asociarse con HATs. Dicha transición de represión a activación transcripcional se sustenta mecánicamente en que la acetilación de las histonas les resta carga positiva, lo cual conlleva a un debilitamiento de la atracción entre las histonas y los grupos fosfato del ADN cargados negativamente, resultando en una estructura nucleosomal laxa que tolera el ingreso de activadores transcripcionales (McKinsey *et al.*, 2001).

Regulación negativa de la miogénesis *in vitro*

Los mioblastos en proliferación expresan la proteína Id, un inhibidor de la diferenciación (Benezra *et al.*, 1990). En un medio con un alto nivel de suero, Id impide que MyoD active genes efectores secuestrando a las proteínas HLH E12 y E47, codificadas por el gen *E2A*, con quienes MyoD y miogenina se heterodimerizan para unirse al ADN con alta afinidad y llevar a cabo sus funciones transactivadoras (Murre *et al.*, 1989a, b; Lassar *et al.*, 1991; Chakraborty *et al.*, 1991). Cuando los mioblastos en cultivo experimentan la transición a un medio bajo en suero, la expresión de Id queda abatida considerablemente (Benezra *et al.*, 1990), lo cual es necesario para que la miogénesis proceda normalmente (Jen *et al.*, 1992). Por su parte, el factor de transcripción homeótico AREB6/ZEB bloquea específicamente la actividad transcripcional de MEF2C uniéndose a cajas E, inhibiendo así la diferenciación muscular (Postigo y Dean, 1999). De forma parecida, la proteína bHLH Twist secuestra a proteínas E impidiendo que MyoD y MEF2 se puedan

heterodimerizar con ellas y de esta forma evita que se una al ADN y que transactive, respectivamente (Spiecer *et al.*, 1996).

Los factores de crecimiento TGF- β , bFGF, aFGF (*acidic Fibroblast growth factor*) y HGF/SF inhiben la conversión de mioblastos a miotubos, aunque *per se* no son mitogénicos –a diferencia del suero, que además de suprimir la diferenciación, es mitogénico– (Olson *et al.*, 1986; Spizz *et al.*, 1986). No obstante, tanto el TGF- β como el suero pierden la capacidad de suprimir la expresión de genes específicos de músculo en miotubos diferenciados terminalmente, concretamente después de la fusión (Massagué *et al.*, 1986; Olson *et al.*, 1986; Florini *et al.*, 1986).

La inhibición de la diferenciación muscular esquelética ejercida por TGF- β se sustenta mecanísticamente en la represión transcripcional de *myoD1* por TGF- β (Vaidya *et al.*, 1989) y en que su efector Smad3, pero no Smad2, reprime la actividad de la familia de factores transcripcionales MyoD en mioblastos C₂C₁₂. Smad3, mediante interacción física directa con el dominio bHLH de MyoD, impide que este factor miogénico se heterodimerice con proteínas E como E12 y E47, y así, evita que se unan complejos de MyoD a secuencias “E-box”, presentes en *enhancers* de genes musculares (Liu *et al.*, 2001). Además, TGF- β induce la translocación de MEF2A y MEF2C, pero no de MyoD, miogenina o p21^{Cip1}, al citoplasma de mioblastos C₂C₁₂, con lo cual se impide que MEF2A y C formen parte de complejos transcripcionales activos y transactiven genes como el de la *miogenina* (De Angelis *et al.*, 1998). Asimismo, el TGF- β inhibe la función de la miogenina (Brennan *et al.*, 1991), y junto con bFGF, induce la síntesis de la ciclina D1 (Rao *et al.*, 1994).

bFGF inhibe la diferenciación muscular esquelética mediante la desactivación funcional de las proteínas miogénicas bHLH como la miogenina. Al activarse ante la estimulación por bFGF, la proteína cinasa C (PKC) fosforila a la miogenina en un sitio conservado en su dominio de unión al ADN, dejándolo inhabilitado (Li *et al.*, 1992). Además, al igual que el TGF- β , el bFGF inhibe transcripcionalmente la expresión de *myoD1* (Vaidya *et al.*, 1989).

Como se mencionó, los genes específicos de músculo son inmunes ante las acciones represoras del TGF- β una vez que el mioblasto pasó a ser miotubo. En los miotubos L₆E₉, los niveles de receptores de TGF- β no cambian con respecto a los que había en mioblastos, sin embargo, aun habiendo receptores de TGF- β en los miotubos L₆E₉, estas células ya no acatan las órdenes del TGF- β en el sentido de no reprimir la expresión de genes específicos de músculo, lo cual indica que algunos componentes de la vía de señalización del TGF- β pueden dejar de operar después de la fusión (Massagué *et al.*, 1986). Tanto bFGF y aFGF como sus receptores ven disminuida su expresión –a nivel transcripcional– durante la diferenciación miogénica de células Sol-8 y L₆ (Moore *et al.*, 1991), de forma semejante a como sucede con los receptores de TGF- β en mioblastos C₂ (Hu y Olson, 1990). Sin embargo, mioblastos C₂ puestos en un medio pobre en suero pero con EGTA, un quelante de Ca²⁺, se diferencian bioquímicamente pero nunca se fusionan, dando lugar a miocitos mononucleares, los cuales retienen los receptores de TGF- β de la superficie celular aún acoplados a las cascadas de señalización que reprimen el fenotipo muscular (Hu y Olson, 1990).

Regulación positiva de la miogénesis *in vitro*

El TGF- β , además de tener un papel como modulador negativo de la miogénesis, tiene paradójicamente un papel como modulador positivo: promueve la miogénesis en un medio

de cultivo con niveles altos de mitógenos, lo cual logra disminuyendo la expresión de *c-myc* y retardando el avance a través de la fase G1 del ciclo celular (Zentella y Massagué, 1992); también es capaz de inducir la diferenciación de células estaminales embrionarias (*embryonic stem cells*) hacia un destino primordialmente muscular (Slager *et al.*, 1993). El TGF- β induce los genes de: MyoD, miogenina, cadenas pesada y ligeras de la miosina y troponina T (del programa de diferenciación), pero no afecta la inducción de la cadena α del receptor de acetilcolina, la caída de Id (del programa de diferenciación) ni la hipofosforilación de pRB (del programa de detención del crecimiento) (Filvaroff *et al.*, 1994).

La insulina e IGF-I y II, producidos por el tubo neural y por las somitas, actúan sinérgicamente con Shh, bFGF y TGF- β 1 para promover la miogénesis en cultivos de somitas (Pirskanen *et al.*, 2000). El mecanismo por el cual IGF-II –secretado autocrinamente– promueve la miogénesis en cultivos de mioblastos es mediante la elevación de la expresión del gen de la miogenina (Florini *et al.*, 1991). Es importante mencionar que los IGFs tienen efectos duales opuestos durante la miogénesis al igual que el TGF- β : inicialmente inhiben la expresión del ARNm de miogenina y son exclusivamente mitogénicos, pero subsecuentemente promueven la conversión de mioblastos a miotubos. El mecanismo por el cual promueven mitosis está asociado con una expresión elevada de Cdk4 y de ciclina D1, componentes de una holoenzima que al mantener a pRB en un estado hiperfosforilado –i.e., inactivo–, favorece el avance del ciclo celular (Rosenthal y Cheng, 1995). IGF-II funciona también como un factor de supervivencia para los mioblastos en diferenciación, dado que si se suprime el aumento que experimenta la expresión de IGF-II durante miogénesis mediante un ADNc en contrasentido, en vez de diferenciarse al ser expuestas a un medio bajo en suero, las células se mueren por apoptosis (Stewart y Rotwein, 1996).

Fusión de mioblastos

Los genes que controlan la fusión de mioblastos actúan de manera secuencial y algunos se identificaron y se siguen identificando inicialmente en *Drosophila*. Luego de ser disparada la diferenciación en ellos, los mioblastos se atraen entre sí, se alinean en un eje común, yuxtaponen sus membranas, se adhieren, se conectan a través de parches de intercomunicación citoplásmica y se fusionan. La fusión es un proceso estrictamente dependiente de Ca^{2+} : mientras que el quelante de calcio extracelular EGTA bloquea la fusión de los mioblastos, el ionóforo de calcio A23187 provoca su fusión precoz (Bar-Sagi y Prives, 1983). Participan en el proceso de fusión proteínas de la superficie celular como cadherinas, N-CAM, V-CAM (*neural y vascular cell-adhesion molecules*, respectivamente), las tetraspaninas CD9 y CD81, ADAMs y receptores de proteínas de matriz extracelular como integrinas β 1 (Schwander *et al.*, 2003; Nishiyama *et al.*, 2004). El factor transcripcional FKHR (*Forkhead in human rhabdomyosarcoma*) induce la expresión de genes requeridos para la fusión celular como *prosaposina*, *frizzled 4*, *cadena pesada β de la miosina lenta*, además de genes involucrados en la cuantiosa remodelación de la matriz extracelular que se da previamente a la fusión como *procolágenas α 1 y α 2*, *fibulina 2*, *tenascina C* y *anquirina 3* (Bois y Grosveld, 2003). Durante la miogénesis, la actividad de la GTPasa pequeña RhoA y la de su proteína efectora Rock es abatida para que FKHR se pueda translocar al núcleo; si se mantiene artificialmente, se inhibe la fusión sin ser impedida la expresión de marcadores miogénicos tempranos como MyoD y miogenina (Nishiyama *et al.*, 2004). El factor transcripcional NF-ATc2 también es necesario para la fusión: induce la expresión de IL-4, citocina que incide en mioblastos para hacerlos incorporarse a miotubos preexistentes y así hacer que crezca el músculo (Horsley *et al.*, 2003). También, durante la fusión se

induce la proteína folistatina, que promueve la fusión al parecer mediante la represión de la actividad de la miostatina (Iezzi *et al.*, 2004). La miostatina es una proteína secretada producida por el músculo esquelético que funciona como un regulador negativo de la masa de las fibras musculares esqueléticas al limitar su crecimiento (Lee, 2004).

Drosophila ha constituido un modelo valioso para el estudio de la fusión de los mioblastos, habiéndose logrado clonar inicialmente de ella genes que son críticos para este proceso aun en los mamíferos, no obstante la existencia de diferencias en el *modus operandi* de la fusión. Revisemos brevemente cómo funcionan algunas de las proteínas involucradas en este proceso en *Drosophila*. Los progenitores musculares derivados del mesodermo somático proliferan y dan lugar a células conocidas como “fundadoras”. Una célula fundadora provee al músculo en desarrollo los genes de identidad muscular; una fundadora individual atrae a otro tipo de célula –también derivada del mesodermo somático– llamada “mioblasto competente para la fusión” (FCM), se fusiona con ella y la hace expresar genes del patrón muscular. Al principio, los precursores musculares están constituidos por dos o tres núcleos, pero al incorporárseles más mioblastos se desarrollan hasta generar miotubos maduros más grandes. La fusión es heteróloga: las fundadoras sólo se fusionan con los FCMs, pero ninguno de los dos tipos celulares se fusiona consigo mismo. Los mioblastos fundadores expresan en su superficie la proteína transmembranal Dumbfounded (Duf), que intracelularmente contacta a las proteínas Antisocial (Ants) y Loner (específicas de fundadoras), mientras que los FCMs expresan en su superficie la proteína transmembranal Sticks and Stones (Sns). Más aún, Ants y Loner se asocian respectivamente con las GTPasas Myoblast City (Mbc) y ARF6-Rac, encargadas de reorganizar el citoesqueleto. Luego de que Duf contacta a Sns (gracias a lo cual Duf funciona como atrayente de FCMs), se da la fusión de manera dependiente de proteínas asociadas a la membrana o citosólicas yuxtapuestas a la membrana como Mbc, Mef2, Blown Fuse (Blow) y Titina, las cuales, a diferencia de Duf y Sns, se localizan en ambos tipos celulares (Taylor, 2002; Chen *et al.*, 2003).

Células satélite y homeostasis postnatal del músculo

Durante el desarrollo postnatal, las células satélite, una población de células miogénicas estaminales, y otras células estaminales en músculo (CD45⁺) (Polesskaya *et al.*, 2003), médula ósea (también CD45⁺) (Musaro *et al.*, 2004; Camargo *et al.*, 2003; LaBarge y Blau, 2002) y aorta dorsal (De Angelis *et al.*, 1999), contribuyen al mantenimiento de miotubos. Las células satélite emergen durante la embriogénesis tardía y son altamente activas durante el crecimiento postnatal del músculo, siendo su contribución al músculo adulto significativa; empero, pueden diferenciarse también en adipocitos y en osteocitos. Estas células están intercaladas en fibras musculares adyacentes. El origen ontogénico de las células satélite son las somitas, aunque pueden establecerse en la vasculatura embrionaria, y ser ella quien las provea al músculo maduro. La proteína RhoGAP activada corriente abajo de IGF-I, se encarga de dirigir la diferenciación de precursores mesenquimatosos hacia el linaje miogénico cuando éstos pueden generar aún tanto adipocitos como miocitos. Las células satélite silenciosas comparten un programa de desarrollo con los linajes musculares embrionarios: sus niveles de expresión de MRFs son indetectables, pero ante daño muscular, se activan y empiezan a expresar ya sea MyoD o Myf5 antes de entrar al ciclo celular. Sin embargo, en vez de ser Pax3 su factor transcripcional especificador, lo es Pax7, inducido por los Wnts 5A, 5B, 7A y 7B. Posteriormente, expresan MRFs corriente abajo como miogenina y MRF4, lo cual está asociado a diferenciación terminal y a fusión a fibras nuevas o preexistentes. Las células satélite se autorrenuevan: luego de ser activadas –proceso en el cual es indispensable la señalización por HGF/c-Met–, se dividen asimétricamente para generar células hijas

distintas entre sí: una mantiene constante el número de células satélite y la otra se diferencia.

(Referencias generales de la miogénesis esquelética: Anastasi *et al.*, 1997; Bladt *et al.*, 1995; Cossu y Borello, 1999; Edmondson *et al.*, 1992; Heanue *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2003; Ridgeway y Skerjanc, 2001; Sordella *et al.*, 2003).

Hipertrofia muscular

La hipertrofia muscular es una respuesta adaptativa importante al ejercicio físico. Se sabe que la expresión estable de IGF-I en células C₂C₁₂ conduce a la hipertrofia de miotubos diferenciados y a una transición hacia el metabolismo glucolítico. El IGF-I produce un aumento en el calcio intracelular, activa a la fosfatasa calcineurina e induce la translocación al núcleo del factor de transcripción NF-ATc1 (Semsarian *et al.*, 1999).

3. IV. ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL PRESENTE TRABAJO EXPERIMENTAL

Gracias al modelo *in vitro* de formación de músculo esquelético a partir de mioblastos C₂C₁₂ se han logrado describir las cascadas progresivas de señalización que conllevan a la génesis de músculo –así como la manera en que son reguladas–, ya sea durante el desarrollo embrionario, durante la hipertrofia muscular inducida por ejercicio, o bien, durante la regeneración muscular. Este modelo presenta las siguientes características con respecto a TGF- β y a bFGF:

- Tanto TGF- β como bFGF impiden que los mioblastos se diferencien, manteniéndolos en un estado proliferativo.
- Aunque el TGF- β inhibe etapas tempranas de la diferenciación miogénica, si en mioblastos se bloquea su vía de señalización –mediante la sobreexpresión de un receptor II con actividad dominante negativa– y luego se induce la diferenciación de los mismos, la formación de miotubos nunca acontece, de lo cual se desprende que la vía de señalización del TGF- β , una vez disparado el proceso de diferenciación, es indispensable para permitir que los mioblastos pasen a ser miotubos (Filvaroff *et al.*, 1994; Zentella y Massagué, 1992), y por lo tanto, TGF- β tiene efectos tanto positivos como negativos en este sistema de diferenciación celular (ver las páginas 54-56 para una descripción más a fondo de este papel dual).
- Durante el proceso de conversión, cambia el nivel de expresión de algunos proteoglicanos; de los que regulan la unión de TGF- β , aumenta el de decorina –de sulfatos de condroitina y dermatano– (Brandán *et al.*, 1991); mientras que de los que favorecen la señalización por bFGF –de sulfatos de heparano–, disminuye el de sindecano 1 (Larraín *et al.*, 1997a; Larraín *et al.*, 1998), el de sindecano 3 (Fuentealba *et al.*, 1999) y el de perlecano (Larraín *et al.*, 1997b), a la vez que aumenta el de glicano (Brandán *et al.*, 1996). No todos los proteoglicanos sufren cambios en su expresión durante el proceso de conversión, y a manera de ejemplo, tenemos uno de 250-310 kDa de sulfatos de condroitina y dermatano (que no es decorina) (Brandán *et al.*, 1991). Pero, ¿cuál es la relevancia fisiológica de las fluctuaciones en los niveles de estos proteoglicanos? Múltiples observaciones sugieren que estas variaciones modulan tanto el momento preciso

en que se dispara la miogénesis como los eventos subsecuentes que conducen a ella, dada su capacidad para regular la señalización por TGF- β y bFGF.

- Al monitorear la expresión de los receptores de TGF- β usando como sonda ^{125}I -TGF- β en mioblastos y en miotubos C₂ (no C₂C₁₂) extensamente diferenciados, se observa que los miotubos pierden la expresión de los receptores de TGF- β – incluyendo la del betaglicano– (Hu y Olson, 1990).
- Durante la miogénesis, aumenta drásticamente la expresión de TGF- β 3 y menos notoriamente la de TGF- β 2, a la vez que disminuye la de TGF- β 1 (Lafyatis *et al.*, 1991).

Siendo el betaglicano un correceptor de TGF- β (y tal vez también de bFGF, dado que aunque no se ha determinado si el betaglicano favorece la interacción de bFGF con sus receptores de señalización FGFRs, lo une a través de sus glicosaminoglicanos), y considerando que ambos factores de crecimiento son reguladores importantes de la miogénesis –requiriéndose una vía intacta de señalización de TGF- β para que la conversión miogénica ocurra–, nos propusimos estudiar la regulación de la expresión del betaglicano y estimar la posible función de éste durante la formación de músculo esquelético *in vitro*.

4. Hipótesis

“En mioblastos esqueléticos experimentando diferenciación terminal a miotubos, fluctúa (se induce o se reprime) la expresión del betaglicano; esta fluctuación comienza a nivel transcripcional y la regulan factores transcripcionales del programa de la miogénesis esquelética.”

5. I. Objetivos generales del trabajo experimental

- i. Determinar si fluctúa el nivel de expresión de betaglicano a lo largo de la diferenciación miogénica en células C₂C₁₂.
- ii. Conocer la estructura del promotor del betaglicano murino.
- iii. Determinar reguladores de la expresión del betaglicano.

5. II. Objetivos particulares del trabajo experimental

- i. Determinar si en el transcurso de la conversión miogénica de células C₂C₁₂ varía la expresión del betaglicano en la superficie celular, teniendo esta variación su origen a nivel transcripcional (para tal fin, medir a distintos tiempos los niveles del proteoglicano, de la proteína, del ARNm y de la actividad del promotor del gen del betaglicano).
- ii. Clonar la región promotora del betaglicano, conocer su secuencia nucleotídica e identificar sitios probables de regulación en *cis*.
- iii. Detectar probables reguladores en *trans* del promotor del gen del betaglicano.

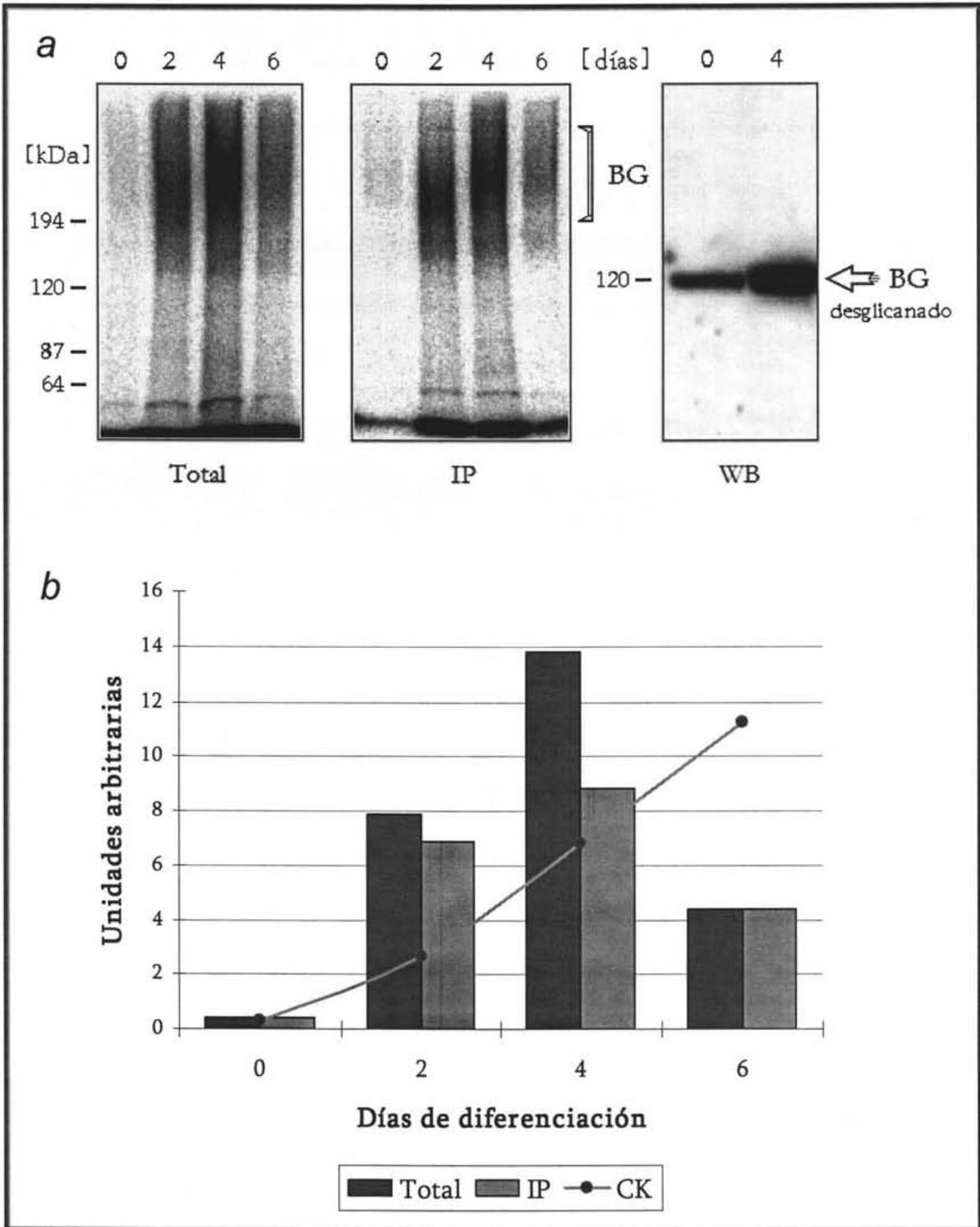
6. Resultados

1. El nivel del proteoglicano del betaglicano aumenta durante la miogénesis

Con el propósito de saber si la expresión del betaglicano fluctúa a lo largo del proceso de la miogénesis, se monitoreó en la superficie celular la expresión de este proteoglicano a los 0, 2, 4 y 6 días de diferenciación miogénica de mioblastos C₂C₁₂. Al día 0 las células son mioblastos propiamente, dado que están en un medio de crecimiento que permite su proliferación e impide su diferenciación. Para disparar la diferenciación a miotubos, el medio de crecimiento se retira y se sustituye con uno que induce la diferenciación, y así, durante los siguientes días, los mioblastos maduran hasta convertirse finalmente en miotubos, pudiéndose observar miotubos desde los 3-4 días de diferenciación. Las células fueron marcadas por afinidad con ¹²⁵I-TGF-β₂, el cual se une sólo a sus receptores localizados en la membrana celular. Posteriormente, se analizó el extracto proteico total o la fracción inmunoprecipitada – con un anticuerpo específico contra betaglicano– en un gel de acrilamida. Se halló que los mioblastos prácticamente no unen ¹²⁵I-TGF-β₂, pero esta situación cambia drásticamente conforme se van diferenciando (figura R1). Así, al día 2 la unión de TGF-β al betaglicano ya es considerablemente mayor con respecto al día 0, pero la mayor se tiene al día 4, aunque al día 6 decae, pero no al nivel del día 0. Cabe señalar que se observa un retraso en la movilidad del betaglicano del día 4 en relación al 2, lo cual refleja una mayor glicanación del proteoglicano al día 4. La mayor unión de TGF-β₂ al betaglicano durante la miogénesis podría deberse a que la cantidad de betaglicano esté aumentando durante la diferenciación muscular; a que otras proteínas que unen TGF-β estén dejando de hacerlo (como en el caso de la decorina, el proteoglicano más abundante en la matriz extracelular de músculo y cuya expresión fluctúa durante la miogénesis, tesis doctoral de la Dra. Cecilia Riquelme, Universidad Católica de Chile, 2001), permitiendo que otras proteínas lo hagan, entre ellas el betaglicano; etc. Para ver si opera el primer mecanismo, el lisado celular del día 0 y del día 4 de diferenciación miogénica fue sometido a un tratamiento con condroitinasa ABC y heparitinasa, fraccionado en un gel de acrilamida, transferido a nitrocelulosa y analizado mediante *western blot* con un anticuerpo diferente del que se usó para la inmunoprecipitación. Suponiendo que la digestión con estas glicanasas haya sido completa, la cantidad de proteína desnuda del betaglicano aumenta claramente al día 4. No se hizo inmunoprecipitación y luego *western blot* porque no se consigue una tasa buena ni uniforme de transferencia de las diferentes especies de betaglicano glicanado del gel a la membrana de nitrocelulosa. En la parte de abajo de la figura R1 se muestra un análisis densitométrico del nivel de expresión del proteoglicano del betaglicano a lo largo de la miogénesis. El nivel relativo de unión de TGF-β al proteoglicano del betaglicano es: día 0 (D0): 1X (valor basal); D2: 16X (dieciséis veces el valor basal); D4: 21X; D6: 10X. Como referencia, se muestra el aumento en expresión que la cinasa de creatina experimenta durante la formación de miotubos.

2. El nivel del ARNm del betaglicano aumenta durante la miogénesis

Una vez hallada una mayor expresión del proteoglicano del betaglicano en la superficie celular de los miotubos en formación, se decidió explorar si ésta se correlaciona con un nivel mayor del ARNm de este proteoglicano, dado que, comúnmente, cuando se eleva un ARNm cualquiera, también se eleva la proteína que



BG: betaglicano; CK: cinasa de creatina

Figura R1. Durante la miogénesis, la unión de TGF- β 2 al proteoglicano del betaglicano se incrementa debido al menos en parte a una mayor síntesis del betaglicano. a, Se monitoreó la unión de TGF- β 2 a sus receptores de la superficie celular (*Total*) y al betaglicano (*IP*, i.e., *immunoprecipitado*) a los 0, 2, 4 y 6 días de diferenciación mediante marcado por afinidad con ^{125}I -

TGF- β 2. También, se halló un aumento en la expresión del betaglicano al día 4 mediante *western blot* (WB). *b*, Análisis densitométrico de la intensidad de los barridos del proteoglicano del betaglicano, y como referencia, el nivel de expresión de la enzima cinasa de creatina durante el mismo periodo (las unidades de esta enzima están dadas en [UI/mg ADN]).

codifica, aunque el ARNm también podría haber estado teniendo una mayor tasa de traducción. Se extrajo ARN total de las células a los 0, 2, 4 y 6 días de diferenciación, los mismos en los que se monitoreó la expresión del proteoglicano. 10 μ g de ARN total se fraccionaron electroforéticamente y se transfirieron a una membrana de nailon. Posteriormente la membrana se sondeó con el ADNc de betaglicano murino proveniente de la construcción CII-2 (Ponce Castañeda *et al.*, 1998). Como se observa en la figura R2, también el ARNm del betaglicano experimenta un aumento considerable durante miogénesis, aunque como se observa en el análisis densitométrico, no tiene un patrón de expresión correlativo al del proteoglicano. A los días 0 y 4, la expresión de proteína y ARNm es similar, pero al día 2, hay más proteína que ARNm y al día 6, esta situación se invierte. El nivel relativo de expresión del ARNm del betaglicano es: D0: 1X; D2: 6X; D4: 33X; D6: 24X. Cabe mencionar que una mayor cantidad de la proteína del betaglicano en la superficie celular no necesariamente tiene su origen en una mayor cantidad de su ARNm, debido a que pueden entrar en operación mecanismos adicionales de regulación como la tasa con la que la proteína es retirada de la membrana celular o degradada, *e.g.*, en un momento dado, la proteína puede estar teniendo una menor tasa de recambio en la superficie celular y por eso haber más ahí.

3. En los miotubos, una parte de la población de las moléculas de betaglicano se transloca a la matriz extracelular

El betaglicano se presenta de dos formas: una embebida en la membrana celular correspondiente a la forma insoluble y otra presente en el medio extracelular correspondiente a la forma soluble. Con el propósito de averiguar si el betaglicano permanece en la membrana celular una vez que comienza a producirse a gran escala al convertirse los mioblastos en miotubos, se estudió su distribución celular mediante inmunocitoquímica. La localización del betaglicano se infirió al tener como puntos de referencia la ubicación del perlecano, un proteoglicano sabidamente de matriz extracelular, y la de la miosina, una proteína motora que se desliza a través de filamentos de actina. Ambos proteoglicanos fueron sondeados en mioblastos y miotubos (de 6 días) vivos con anticuerpos primarios y éstos a su vez con anticuerpos secundarios acoplados al cromóforo de emisión verde isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las células luego fueron permeabilizadas con Tritón X-100 e incubadas con un anticuerpo contra la miosina, mismo que fue detectado con otro acoplado al cromóforo de emisión roja TRITC. Si la emisión verde proviene de la misma fuente que la roja, la emisión resultante es amarilla. En la figura R3 se muestra el patrón de distribución de las proteínas citadas; las imágenes de la fila de hasta abajo muestran el *merge* (fusión) de las respectivas dos imágenes de arriba, y como se puede ver, el betaglicano se localiza intensamente tanto en regiones discretas de la superficie de los miotubos (emisión amarilla) como en su matriz extracelular (emisión verde), en contraste con el perlecano, cuya localización prevalece sólo en la matriz extracelular. Sin embargo, algunos de los miotubos emiten únicamente la fluorescencia roja, lo cual

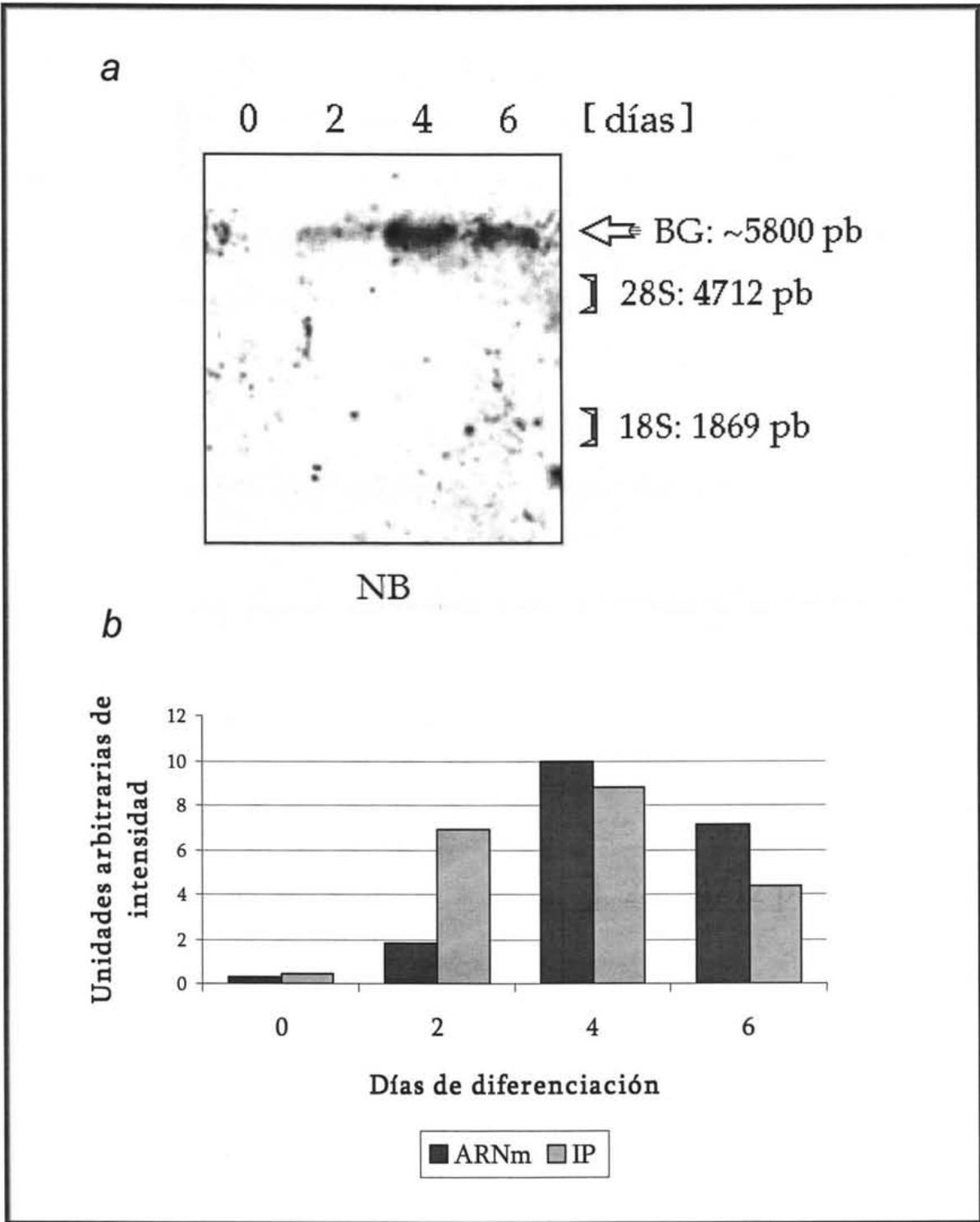


Figura R2. El nivel del ARNm del betagalactano aumenta durante la miogénesis. *a*, Se monitoreó la expresión del ARNm del betagalactano a los 0, 2, 4 y 6 días de diferenciación mediante *northern blot* (NB) usando como sonda el ADNc del betagalactano murino. *b*, Análisis densitométrico de la intensidad de las bandas del ARNm de betagalactano, en conjunción con las del proteoglicano. La longitud precisa del ARNr murino 28S fue averiguada en Hassouna *et al.*, 1988 y la del 18S en Raynal *et al.*, 1984.

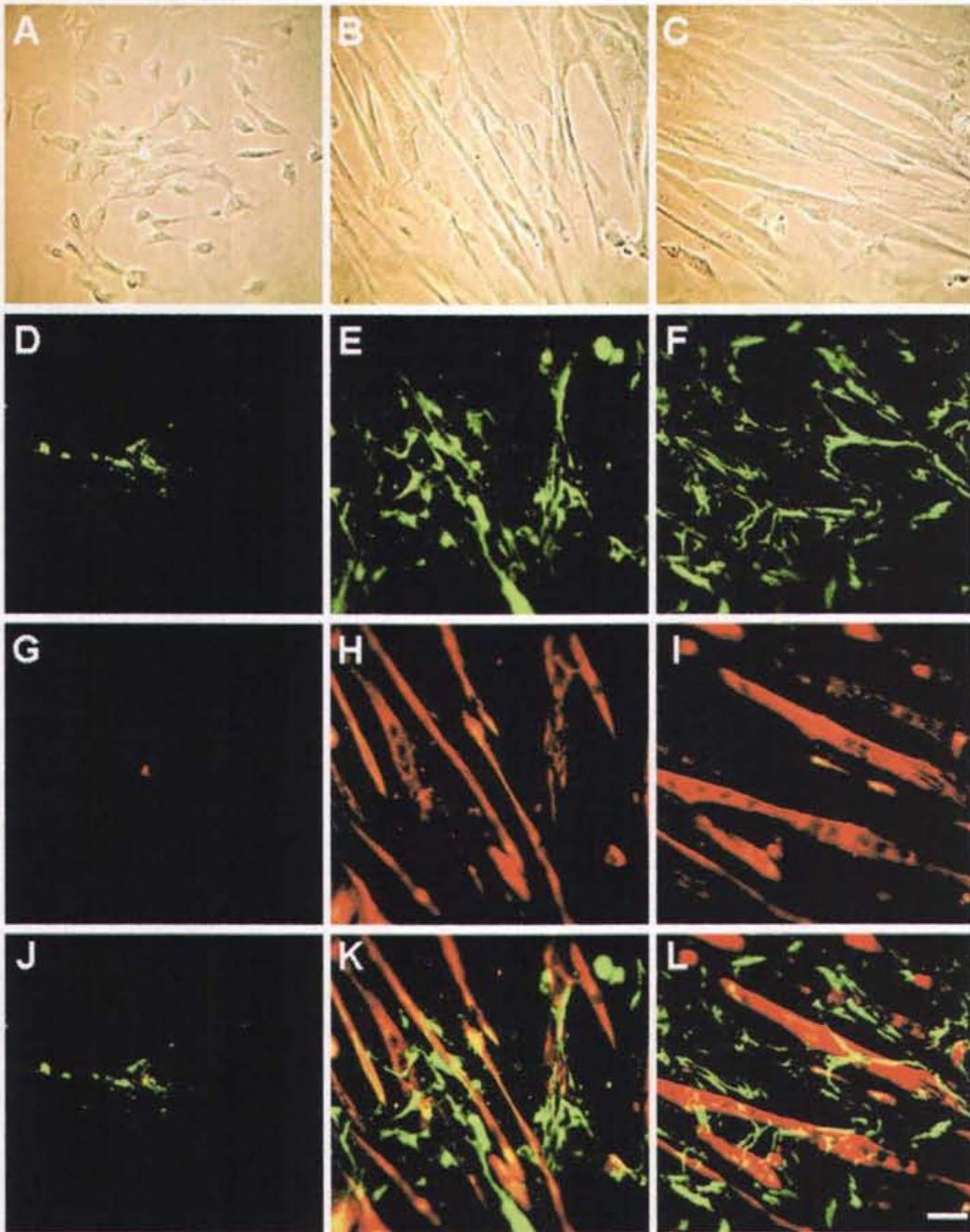


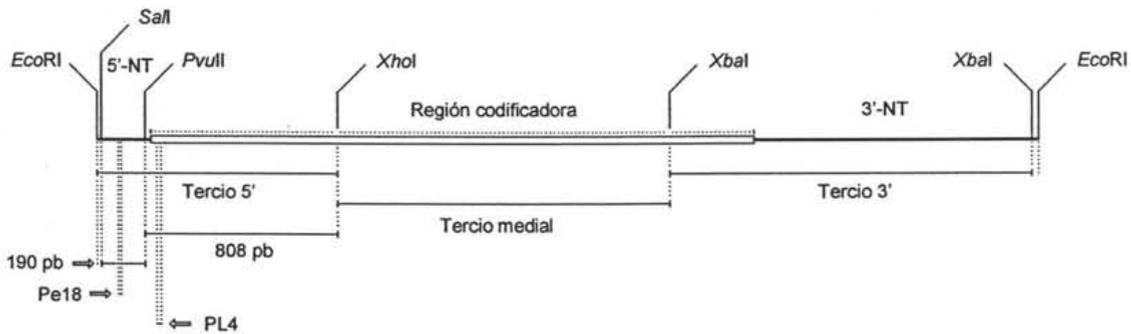
Figura R3. **Translocación de una porción del betaglicano a la matriz extracelular en miotubos.** Se determinó la localización celular del betaglicano en células C_2C_{12} en fase de mioblastos (A, D y G) o dejadas diferenciar por 6 días (B, C, E, F, H e I). Las células sin permeabilizar fueron incubadas con anticuerpos α -betaglicano (D y E) ó α -perleciano (F). Luego se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (emisión verde). Las mismas células fueron permeabilizadas e incubadas con anticuerpos α -miosina (G-I) y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a (TRITC) (emisión roja). Las imágenes de

la fila inferior resultan del *merge* (fusión) de las imágenes de sus respectivas columnas de las dos filas superiores. Así, las imágenes J, K y L corresponden a la fusión de las imágenes D+G, E+H y F+I, respectivamente. La emisión amarilla surge de la conjugación de las emisiones roja y verde. El betaglicano se localiza en la superficie de los miotubos y en su matriz extracelular. Los campos fueron fotografiados e impresos bajo condiciones idénticas. Las imágenes de contraste de fases se muestran en la fila superior (A–C). La barra representa una longitud de 50 μm .

sugiere que no están expresando betaglicano en su superficie. El hecho de haber hallado una mayor expresión del betaglicano en los miotubos que en los mioblastos concuerda con el resultado del *western blot* mostrado en la figura 1a; no obstante, también es cierto que en dicho *western blot* no se observó una banda que pudiera corresponder al betaglicano que se ha ido a la matriz extracelular, intuitivamente de menor masa molecular en vista de ser generado presuntamente por un corte proteolítico del betaglicano embebido en la membrana; esto se puede deber a que las correspondientes bandas no se hayan resuelto bien en el gel de acrilamida en el que fueron electroforadas, dado que la diferencia en su movilidad relativa es mínima: 120 kDa del betaglicano transmembranal *versus* 110 kDa del betaglicano soluble (comunicación personal de la Dra. Gabriela Velasco Loyden en el 2005).

4. Clonación y secuenciación del promotor del gen del betaglicano murino

El incremento de la cantidad de ARNm de betaglicano durante la formación de miotubos (figura R2) puede tener su origen en una mayor estabilidad del ARNm (*i.e.*, que se degrade menos) y/o en una mayor transcripción del gen del betaglicano. Para dilucidar si opera el segundo mecanismo –habiendo postulado que sería el más probable–, se decidió clonar la región promotora del gen para el posterior análisis de su actividad durante la miogénesis. Como antecedente, en nuestro laboratorio fue clonado el ADNc del betaglicano murino, cuya molécula completa está contenida en la construcción CII-2 (Ponce Castañeda *et al.*, 1998). El ADNc completo del betaglicano –de 3977 pb, liberado con *EcoRI* de dicha construcción– se mandó a la compañía Research Genetics en Huntsville, Alabama, Estados Unidos, para que usado como sonda sirviera para identificar clonas de ADN genómico de ratón que posiblemente contuvieran al promotor del betaglicano. Para hallar dichas clonas, se tamizó la biblioteca CT7, compuesta por cromosomas artificiales bacterianos (BACs, de *bacterial artificial chromosomes*). Éstos, a su vez, están integrados por fragmentos de ~130 kb de ADN genómico de ratón macho de la cepa CJ7/129Sv, ensamblados en el vector pBeloBAC11 –derivado del factor F de *Escherichia coli* (*E. coli*)–. Fueron 8 clonas las que dieron una señal intensa de hibridación. Una vez que recibimos en nuestro laboratorio microtubos (*stab cultures*) con bacterias *E. coli* DH10B transformadas con las 8 clonas de BACs, las bacterias fueron estriadas en LB con agar y cloranfenicol a 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de la plétora de colonias se reestriaron 10 de cada clona de BACs. Se hizo una hibridación de las 80 colonias individuales usando como sonda el ADNc del betaglicano para comprobar que realmente fueran positivas y para contar con poblaciones clonales, sólo que esta vez se usó la sonda fragmentada en tres partes: un juego de las 8 colonias se sondeó con el tercio 5' del ADNc, otro con el tercio medial y otro con el tercio 3' (ver siguiente figura y "procedimientos experimentales").



Mapa esquemático del ADNc del betaglicano murino. El segmento *EcoRI-EcoRI* es de 3,977 pb y corresponde al ADNc completo del betaglicano de ratón, contenido en la construcción CII-2. Se ilustra además el origen de las sondas tercio 5', tercio medial y tercio 3', el de los fragmentos de 190 y 808 pb, así como el de los oligos Pe18 y PL4. La caja representa región codificante, y la barra, regiones no traducidas.

De las colonias que dieron señal positiva de hibridación se seleccionó una de cada clona de BACs y con ésta se siguió trabajando en lo subsecuente. Observamos que con cada una de las sondas se obtiene una señal positiva de hibridación, lo cual sugiere que se tiene el gen completo. Para saber si teníamos la región promotora del gen, decidimos fragmentar la sonda del tercio 5'. Para tal fin, se digirió el tercio 5' – que abarca del sitio *EcoRI* al *XhoI*– con *SalI* y *PvuII* para generar dos segmentos: uno de 190 pb (*SalI*–*PvuII*, bases 16 a 205 del ADNc –segmento que sólo abarca región no traducida–) y otro de 808 pb (*PvuII*–*XhoI*, bases 206 a 1,013 –segmento que abarca una parte de la región no traducida y una de la codificadora–). Ambos segmentos fueron subclonados en el vector pBlueScript II KS(+) (pBSII-KS(+), Stratagene) y la identidad de los insertos fue comprobada mediante digestión y secuenciación. Cuando estos fragmentos se usaron para sondear las colonias, observamos que aunque la sonda de 808 pb daba señal de hibridación, la sonda *SalI-PvuII* de 190 pb (región 5' no traducida, 5'-NT) no la daba. Este resultado indicó que ninguna clona de las que nos habían enviado de Research Genetics contenía la región promotora. Por tal motivo, se les mandó ahora la sonda de 190 pb (región 5'-NT) y nos volvieron a enviar 8 nuevas clonas BAC, de la biblioteca murina RP22, construida por Kazutoyo Osoegawa (Osoegawa *et al.*, 2000). Esta biblioteca es de ADN genómico de bazo de ratón hembra de la cepa 129S6/SvEvTac digerido parcialmente con *EcoRI* y metilasa *EcoRI*; está inserta en el vector pBACe3.6 en los sitios *EcoRI* y su hospedero es la cepa DH10B. Según la información que nos proporcionaron sobre las clonas, su estabilidad es alta y su quimerismo es de no existente a bajo. El tamaño promedio del inserto de cada clona es de 154 kb.

En la tabla II se indican los nombres asignados por Research Genetics a las clonas nuevas y los nombres que les dimos en el laboratorio para su más fácil identificación, así como la clona aislada –a partir de una población heterogénea– con la que se siguió trabajando (se les designó clonas BACp, la “p” es de promotor).

Tabla II. Nombres de los BACps.

Nombre dado por Research Genetics	Nombre asignado en el laboratorio	Clona aislada
RPCI.22 110 E 12	BACp1	BACp1.7
RPCI.22 139 N 10	BACp2	BACp2.11
RPCI.22 194 D 11	BACp3	BACp3.3
RPCI.22 189 H 16	BACp4	BACp4.1
RPCI.22 274 K 12	BACp5	BACp5.8
RPCI.22 268 E 18	BACp6	BACp6.12
RPCI.22 320 N 02	BACp7	BACp7.10
RPCI.22 510 H 18	BACp8	BACp8.5

Al igual que con los BACs iniciales –que no contienen la región promotora–, se aseguró la obtención de poblaciones clonales de los BACps, sólo que esta vez se sondearon 12 colonias aisladas (en vez de 10, como en el caso de los BACs iniciales) de cada clona BACp con la región 5'-NT de 190 pb. De las que dieron señal positiva de hibridación, se eligió solamente una colonia de cada BACp para su análisis; sus denominaciones se muestran en la tabla II. Con la finalidad de encontrar un fragmento –que presuntamente contuviera al promotor– de tamaño adecuado para su clonación y análisis, se hicieron midipreps de las 8 clonas BACp aisladas. Se digirieron con *HindIII* o con *XhoI* 10 μ L de las midipreps de BACps y los productos digeridos se separaron en un gel de agarosa al 1.2%, se transfirieron a una membrana de nailon y se procedió a hacer la hibridación con el fragmento correspondiente a la región 5'-NT. 3 Bandas fueron las que se hibridaron en la digestión con *HindIII*: una de 6,440 pb, otra de 7,460 pb y otra de 3,870 pb (figura R4). Los productos de digestión que obtuvimos con *XhoI* son relativamente más difíciles de clonar con respecto a los de *HindIII* –debido al mayor tamaño de aquéllos–, por lo que decidimos seguir trabajando con los fragmentos generados por *HindIII*.

Para caracterizar las bandas más finamente, procedimos a sondearlas con oligos. Se sintetizó el oligo Pe30 (de 30 nucleótidos en contrasentido; bases 126 a 155 del ADNc de betaglicano murino, pertenecientes a la región 5'-NT y diseñado para luego hacer experimentos de *primer-extension*) y con él se intentó hibridar. La hibridación usando condiciones para sondas de ADN de doble cadena no permitió obtener señal alguna de hibridación. Por este motivo, procedimos a hacer una hibridación usando condiciones para oligos. Esta estrategia también resultó ser infructífera. Al hacer un análisis energético de este oligo, se encontró que su secuencia favorecía la formación de estructuras secundarias y dímeros, pero la razón fundamental por la que este oligo no se hibrida –que después descubrimos–, es que en el ADN genómico, su secuencia complementaria está partida a la mitad por un intrón. A continuación, se hizo una hibridación con el oligo PL4, que está a pocos nucleótidos corriente abajo desde donde inicia la traducción del ADNc (20 bases: 251 a 270 del ADNc). La hibridación con el oligo PL4 marcó las bandas de ~7.5 (e.g., BACp1.7) y de ~3.9 kb (e.g., BACp7.10), pero no la de ~6.5 kb (figura R4). Puede ser que haya un dimorfismo en la región aledaña al exón 2, el del inicio de la traducción, dado que el oligo ³²P-PL4 marca la banda de ~7.5 kb en algunos BACps y la de ~3.9 kb en otros (de los digeridos por *HindIII*), a la vez que se hibrida con una banda de ~17.3 kb o de ~9 kb

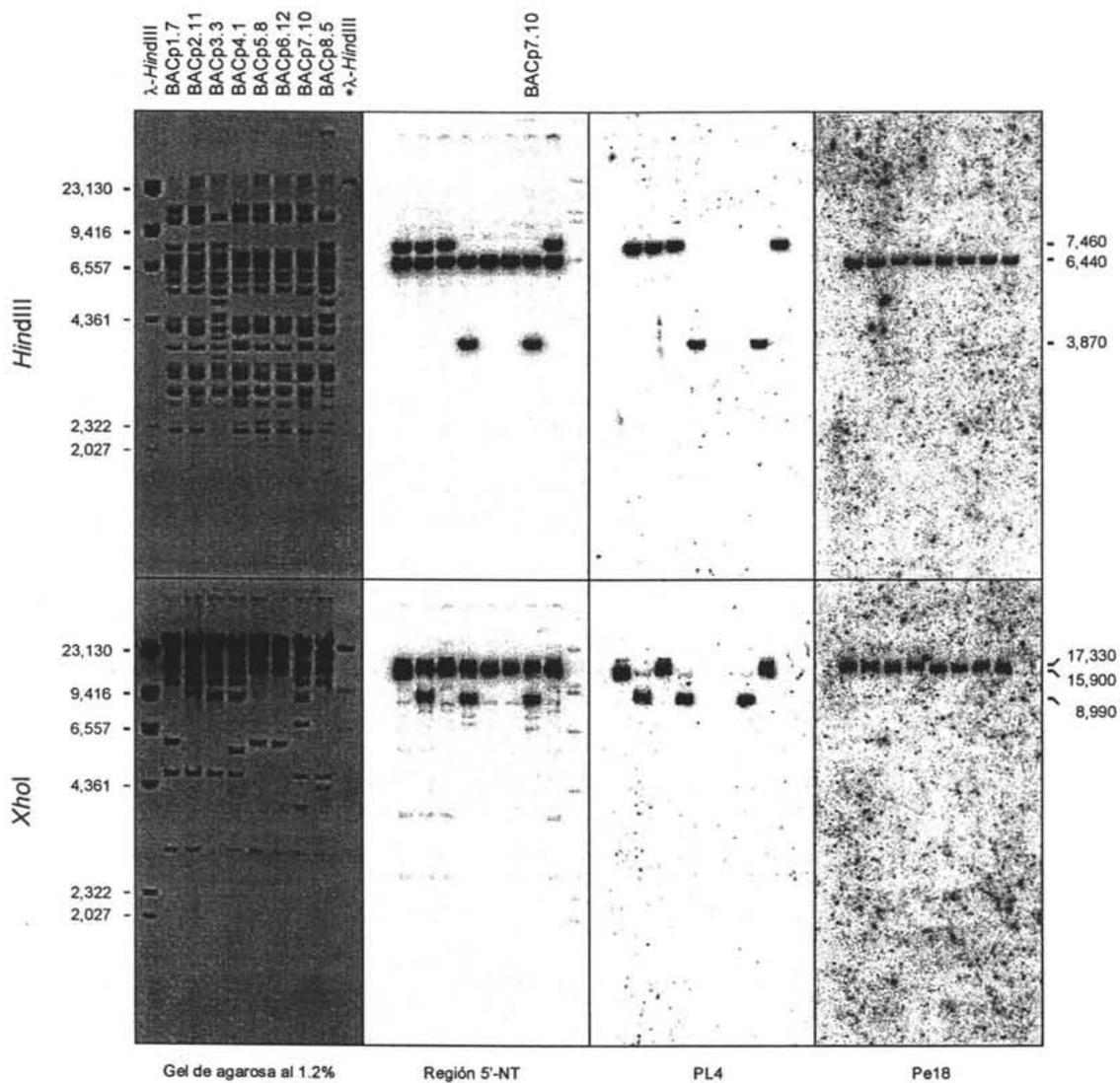


Figura R4. Patrón de digestión de los BACps e identificación de fragmentos de digestión en donde se localiza el promotor. Las clonas BACp1 a 8 fueron digeridas con *HindIII* o con *XhoI*; los fragmentos generados fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.2%, transferidos a una membrana de nailon, y sondeados con la región 5'-NT, el oligo PL4 y el oligo Pe18. En los flancos de los BACs digeridos está el marcador de peso molecular λ -*HindIII*, 1 μ g a la izquierda y \sim 100 ng a la derecha, este último marcado con 32 P y señalado arriba del carril con un asterisco.

(de los digeridos por *Xho*I). Posteriormente se diseñó el oligo Pe18 —esta vez usando el programa computacional “Oligo”—, de 18 bases y en contrasentido; la primera base de su extremo 5' se localiza a 127 pb corriente arriba de la adenina del codón de inicio de la traducción. La hibridación con este oligo marcó solamente la banda de ~6.5 kb, sin marcar las bandas de ~7.5 ó de ~3.9 kb (figura R4).

De este modo, concluimos que la región 5' no traducida está distribuida en el ADN genómico en dos exones, dado que en el ADNc no hay ningún sitio *Hind*III entre las secuencias de Pe18 y PL4.

Se eligió al BACp7.10 para clonar de ahí al promotor. La banda *Hind*III—*Hind*III de ~6.5 kb se clonó en el sitio *Hind*III del vector pBR322pl (provisto por la Dra. Kornelia Polyak del Dana-Farber Cancer Institute), un vector de bajo número de copias que evita pérdidas eventuales de insertos grandes, como el de ~6.5 kb. La estrategia para obtener el segmento de 6.5 kb fue ligar todos los fragmentos del BACp7.10 generados por *Hind*III en pBR322pl, transformar bacterias y tamizarlas para detectar las que hubieran capturado el segmento de 6.5 kb. En el tamiz se detectó que las colonias que en las membranas ocupaban las posiciones B70, B94, C63, D19 y D29 dieron señal positiva de hibridación (figura R5a). Para verificar la presencia e integridad del inserto de 6.5 kb en dichas colonias, sus plásmidos se digirieron con *Hind*III y luego se corrieron en un gel de agarosa. Como se puede ver en la figura R5b, el inserto de 6.5 kb no venía solo en las construcciones en el vector pBR322pl, sino que durante el proceso de ligación se insertaron segmentos *Hind*III-*Hind*III intrusos. Los productos de digestión se analizaron por *southern blot* con el oligo Pe18 y como era de esperarse, la banda de 6.5 kb dio señal positiva de hibridación (figura R5c). Posteriormente, se secuenció el inserto de 6.5 kb con el oligo Pe18 y se encontró que la secuencia de nucleótidos era la esperada dado que se obtuvo la secuencia que hay corriente arriba del oligo en el ADNc. Se eligió trabajar en lo subsecuente con la clona de la posición B70 (figura R5).

El inserto de 6.5 kb se transfirió al vector pBSII-KS(+), de mayor número de copias y con más sitios de restricción en su *multicloning site* para librarlo de los fragmentos *Hind*III-*Hind*III invasores; la construcción pBSII-KS(+):inserto de 6.5 kb también se denominó B70. Con el fin de obtener información sobre la estructura del segmento de 6.5 kb, se decidió obtener fragmentos traslapados de él, secuenciarlos y luego ensamblarlos para conocer su estructura global. Se digirió con las endonucleasas de restricción que cortan al vector una sola vez en el sitio de multiclonación: *Ap*I, *Bam*HI, *Bst*XI, *Cl*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Xba*I y *Xho*I y se observó que no posee sitios de restricción *Cl*I, *Eco*RV, *Sal*I ni *Xho*I. En el gel en el que se vieron los fragmentos generados, se recuperaron aquéllos con un tamaño mayor de 2961 pb, dado que el vector pBSII-KS tiene 2961 pb; por lo tanto, en cada uno de los distintos carriles, una banda de >2961 pb debía constar de vector más una fracción del inserto de 6.5 kb. Se procedió a autoligar dichos fragmentos y a transformar en *Escherichia coli* DH5 α los productos de ligación. Algunos fragmentos generaron colonias resistentes a ampicilina y se recuperó el plásmido de 2 colonias de cada reacción de ligación. Los fragmentos así generados sirvieron para secuenciar el inserto con los oligos T3 y T7, cuyos sitios están presentes en el vector a los flancos del inserto. Con esta estrategia y con el diseño de oligos sintetizados conforme se obtenía más secuencia, se obtuvieron subsecuencias que al final fueron ensambladas para tener la secuencia completa del segmento de 6.5 kb, cuya estructura se ilustra con detalle en la figura PE1 (de procedimientos experimentales en la página 110).

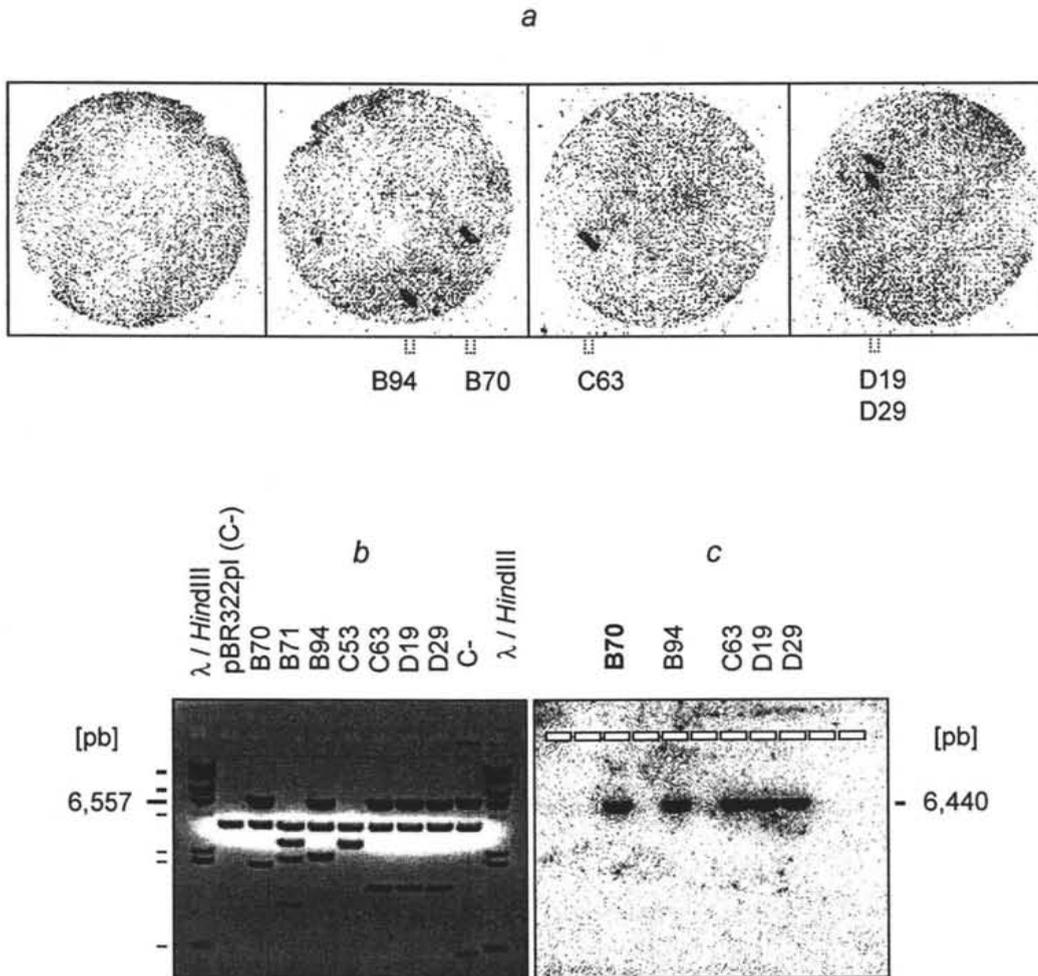


Figura R5. Clonación del fragmento *HindIII*—*HindIII* de ~6.5 kb. a, Se muestra la hibridación de colonias con el oligo Pe18; b, los plásmidos digeridos con *HindIII* provenientes de las colonias que dieron señal positiva de hibridación con sus respectivos controles negativos; y c, la hibridación tipo *southern* con el oligo Pe18. Se siguió trabajando con la clona B70 (se le llamó así porque provino de la posición 70 en la cuadrícula de la membrana).

Estructura del promotor, del exón 1 y del intrón 1

La secuencia completa del segmento de 6.5 kb se comparó con las secuencias ingresadas en la base de datos *GenBank* de los National Institutes of Health y se observó que tiene una identidad del 82% con el promotor del gen del betaglicano de rata, reportado en 1999 por el grupo de Michael Centrella (Ji *et al.*, 1999). En la figura R6 se muestra el alineamiento de los promotores de ratón y rata hecho con el programa GCG.

Los extremos 5' de ratón y de rata, aunque tienen semejanza, no son del mismo tamaño con respecto a la distancia que hay hacia el inicio de la traducción; esto se puede deber a que el extremo 5' reportado en la literatura por Ponce Castañeda *et al.* (1998) esté incompleto. Asumimos que el extremo 5' de ratón en realidad comprende más bases que las reportadas con base en dos criterios: 1. la secuencia genómica corriente arriba del ADNc de ratón es prácticamente idéntica a la secuencia del extremo 5' del ADNc de rata, ya caracterizada con precisión; 2. las clonas de tipo EST de ratón BB850008 y BB871466, de oído y de tejidos varios, respectivamente, poseen una secuencia 5' no traducida de longitud y secuencia similares al extremo 5' no traducido de rata. Tomando en cuenta esta corrección teórica sustentada, la clona B70 consiste de 2265 pb arriba de la base 20 del ADNc del betaglicano murino (las bases 1-19 del ADNc reportado no se alinean con secuencia genómica ni de tipo EST de betaglicano), 2140 pb propiamente de promotor, 251 pb del primer exón –del cual forman parte las bases 20 a 141 del ADNc– y una porción de 4 kb del intrón 1. Al igual que el promotor de rata, el de ratón no posee cajas TATA, pero posee una isla CpG –de la base 1758 a la 2345, compuesta por 68% de GC–, la cual presuntamente dicta el inicio de la transcripción. Por analogía con el gen de rata, podemos decir que los sitios de unión del factor Sp1, uno de ellos una caja GC, se encuentran a 83 y 177 bases, respectivamente, del sitio de inicio de transcripción del gen murino. Se halló una secuencia consenso de un sitio de empalme 5' en la separación del exón 1 y el intrón 1. Así, aunque no se hayan hecho experimentos de *primer extension*, de *S1-nuclease protection* o de *5' rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE)*, hay evidencias de que el segmento de ADN que presumimos es el promotor, realmente lo es.

Una vez que se tuvieron puntos a favor de que efectivamente la secuencia de ADN clonada se trataba del promotor del gen del betaglicano, gracias a la comparación con el promotor homólogo de rata (*accession number* en *GenBank* AF117811), se llevó a cabo un análisis predictivo de los sitios de regulación en *cis* inmersos en el segmento de 2265 pb usando el software especializado en detección de sitios putativos de unión de factores de transcripción "MatInspector" (Quandt *et al.*, 1995) en su versión profesional. La secuencia del promotor, del exón 1 y del intrón 1, junto con algunos de los probables elementos de control en *cis* importantes durante la miogénesis están ilustrados en la figura R7a. El listado completo de elementos potenciales de regulación en *cis* de "*matrix similarity*" ≥ 0.875 y "*core similarity*" ≥ 0.9 del promotor del betaglicano murino se muestra en el anexo I. La estructura del promotor, del exón 1 y del intrón 1 se ilustra esquemáticamente en la figura R7b, mientras que en la figura R7c se da una visión más amplia de la región genómica en la que están inmersos el promotor y el primer exón, obtenida mediante *chromosome walking* de las clonas BACp. El intrón 1 del gen es sumamente extenso, y es posible que en él también haya elementos reguladores en *cis*, a semejanza de lo que sucede con el gen de la α -actina –por citar un ejemplo–, cuyo intrón 1 de 2.7 kb posee *enhancers* esenciales para expresar el gen en músculo liso (Mack y Owens, 1999).

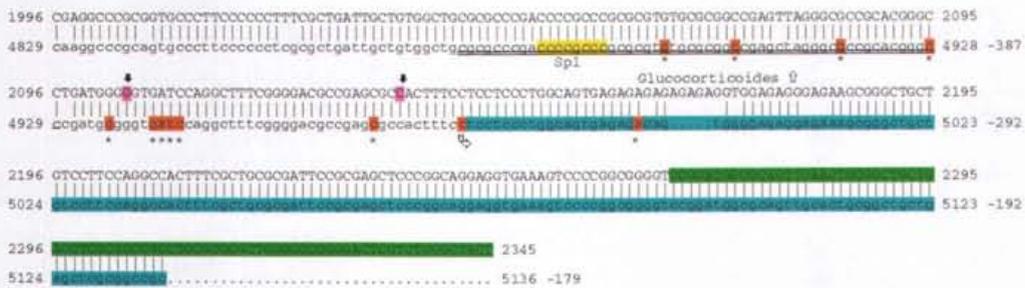


Figura R6. Alineamiento de los promotores del betagalactano de ratón y de rata. Se utilizó el método de Needleman y Munsch que viene en el paquete de Wisconsin University Genetics Computer Group (GCG) para comparar ambas secuencias. El porcentaje de identidad es del 82%. La secuencia de ratón se muestra en mayúsculas y la de la rata en minúsculas. Las secuencias sombreadas en el término 3' corresponden al exón 1 de ratón y de rata (secuencia parcial), según sea el caso. Como se puede ver en la figura, la secuencia del extremo 5' del ADNc es de menor tamaño en el ratón que en la rata. Esto se puede deber a que el extremo 5' no traducido reportado de ratón esté incompleto. Las secuencias sombreadas en el promotor de ratón corresponden a potenciales reguladores en *cis* ausentes en el de rata debido a inserciones o pérdidas de ADN, entre ellos, un sitio Smad4. Las secuencias sombreadas en el promotor de rata corresponden a sitios ya mapeados experimentalmente, mientras que las secuencias doblemente subrayadas son regiones amplias también ya mapeadas experimentalmente: de sensibilidad a glucocorticoides y a BMP-2. La flecha vacía curvada marca el sitio principal de inicio de la transcripción en el gen de rata, mientras que los asteriscos marcan sitios secundarios. Por su parte, dos flechas negras encima de la secuencia murina indican el extremo 5' de dos clonas de tipo *expressed sequence tags* de ratón, la primera de oído y la segunda de tejidos varios. C/EBP: factor nuclear CCAAT/*enhancer-binding protein*; Sp1: *stimulating protein 1*.

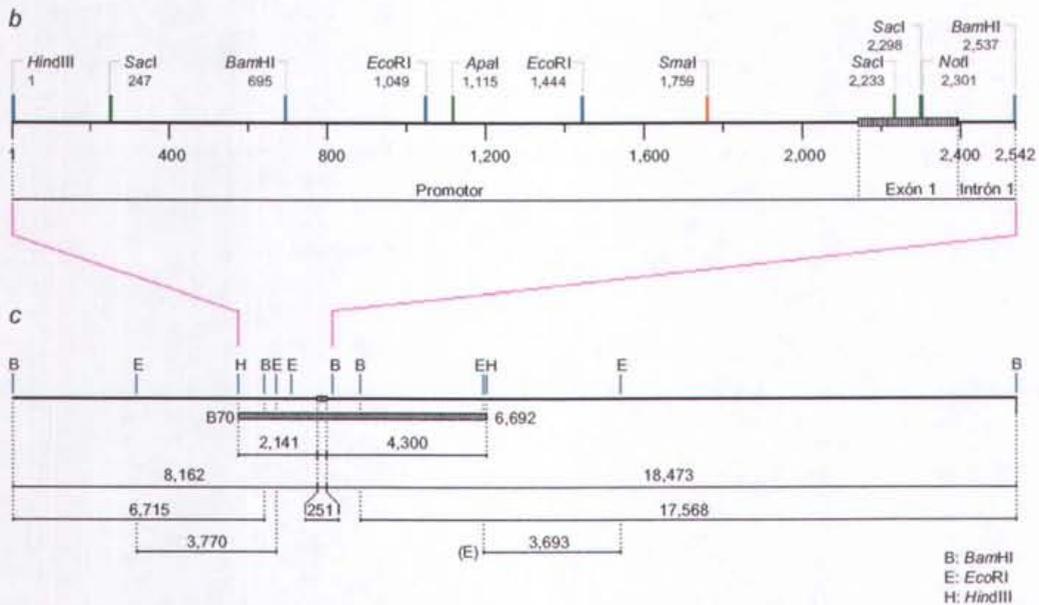
5. Fusiones de versiones de distinta longitud del promotor del betagalactano con *luciferasa*, un gen reportero

En el plásmido B70 (cuyo inserto es el segmento de 6.5 kb *HindIII—HindIII*) hay un sitio digerible por *NotI* a 159 pb corriente abajo del sitio probable de inicio de la transcripción. Este plásmido fue digerido con *HindIII* y *NotI*; los extremos “rezagados” del segmento correspondiente al promotor fueron rellenados con el fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I, generándose así una hebra de extremos rasos *HindIII—NotI* de 2301 pb. El inserto de extremos rasos fue subclonado en el vector pGL3-Basic (diseñado para expresar el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor que uno le inserte) digerido con *SmaI*. El inserto fue subclonado de tal forma que el promotor en secuencia directa quedara corriente arriba del gen de la luciferasa (construcción pBG-Lux, también llamada HN, de *HindIII—NotI*). La naturaleza y la orientación del inserto fueron confirmadas mediante digestión y mediante secuenciación. También se hicieron las construcciones *BamHI—NotI* (BN) y *EcoRI—NotI* (EN), mostradas junto con la *HindIII—NotI* en la figura R8.

		<i>HindIII</i>					
-2481		AAGCTT AAGG	GTTCTTTCGA	AAGTCAGTTG	TGTTAAGTGG -2442 40		
-2441	TGTTTTGCTG	GGCAAACAT	GTGAAGGAGT	GTTCCTCTGA	AGCAGACACA	GGTGTACGTT	TAAGGCAGTG -2372 110
				NF-AT	E47		
-2371	AAAGGAACAT	TCCACTGAAG	CAGACACAAG	TGAGAGGATG	TTCTGCTAAA	GCAAGCACGT	GAAAGGACAT -2302 180
							<i>SacI</i>
-2301	GTGATAAAG	ATTCTTTGCT	AGTGACAGAC	ACATATATTG	GTCGCGCTTC	CATTGCATAG	TTGAGCTCCA -2232 250
	GATA-1						
-2231	TTTGTCAAGG	CTTCAAAGAG	AGAAACACAC	CAAGAAACTT	AGGTGGCGTG	ACACAGTTTC	TTGTGGCTTC -2162 320
-2161	CATGGACTCG	GGCTGATTGA	CAGAGTGATG	TCAGCTGAGA	CAGACTCACG	TGCTG AGGCA	AGAC CTGTGG -2092 390
							<i>Smad4</i>
-2091	GG AGCAAGA	CCCGCAGAGG	ACATAAGGCG	TTTGAAGGTT	ATAAGTAAAA	CTCCATGGAC	AGTAACAGAG -2022 460
	<i>Smad4</i>						
-2021	TATAGCTAGG	ATTGTTTATA	GAGCTAGCGG	TGTAATGCTG	GTCGGTTTGG	AATCTTTGCT	GATCTTCGCT -1952 530
		MEF2					
-1951	TCTCAGAGGG	GCATAGCTGA	GAGCTTCTCC	TGACATTCCCT	GTTGGTCCCT	GCTGCTGCTG	AGGCTGAGGC -1882 600
-1881	CTGGCTGTTT	CTGCTACGTA	GTGCCACCGC	TGTTGATTTG	TGTTGACTAT	CCTGACTCTA	CTGAACITCA -1812 670
							<i>BamHI</i>
-1811	TATATCTGTG	AAGTGTTCG	GAGTGGATCC	AACGTCTCTC	TCAAA CCTGT	GAACT GAACT	ACAG ATTCC -1742 740
							<i>RAR</i>
-1741	AGACAACACA	GATGGGAGTT	GCTCCAAGA	ACC TTTCTAA	ACAGGTCTAC	TCCCCATAT	CCTTTGCTTC -1672 810
	E47			MEF2		GATA-1	
-1671	TTTCTACTC	TC TGGAGGGT	G TGGGCAAG	AAGGGAGGTT	AAAGTGTTTA	AGAAACATCA	TTRAAAATAG -1602 880
	NF-AT						
-1601	GCTTTAAAAA	CTTAAAAATTA	CAAAAGTCTA	GCTGGGCTAC	TCATTTGTGC	AAAGGTTCCG	TGACGATCCA -1532 950
	MEF2						
-1531	GCAGCTCTCA	AGACTGGAAA	CTTGTCTTTG	AACCAGACAC	TTCAGTCACT	CCATCTGTGG	TGGCACCTGT -1462 1020
	<i>MyoD</i>	<i>Smad4</i>	NF-AT	<i>EcoRI</i>			<i>MyoD</i>
-1461	AGAGTTTCCC	GTGAAGTAAC	TGGTGACAGA	ATTCCATGGA	TAAAGGTGCT	TCCTGCCAAC	CCTGAAGAAA -1392 1090
			<i>ApaI</i>	GATA-1			
-1391	TGCACCAAG	ATGGATTCTT	GGGCCCTACT	TGAGAAAGGG	AGAAAGTTGT	CTTCTGACCT	CTACTCTGCC -1322 1160
							<i>RAR</i>
-1321	CAAGGCTGGT	TCTGAACCTG	TGATTCTTCT	GCCGTACTTG	GTTGTA TGTG	GTGCTG GGGC	TCAAACCTAG -1252 1230
							<i>AML-1</i>
-1251	GGCTCTGTGT	ATGCTGGGCA	AATACATTAC	TACCGAGCTA	TAGCCCCAAT	GGGCAATTCA	CCTTTTAATA -1182 1300
-1181	GAAAGTGAAG	CGTAAACAGT	GCCAGATTTG	TGTTGGTGAC	TGAAGTAGCT	GCATTCAACT	CTTGCAAAGC -1112 1370
	<i>Pax6</i>						
-1111	ACATTTCATGC	AGGCAGGACC	CTGTGTGCTC	GCCTATCCTG	TGTTTCAGAGG	GCCGCGGGGA	AACCGTAGGA -1042 1440
	<i>EcoRI</i>			GATA-1			
-1041	AT GGAATTC A	GCAGCTGGAG	AAGGCACCTT	AATTCAGCAG	CTGGAGAARG	CACTTTGAGC	TAGGCTGTAG -972 1510
-971	AAAGTAAGAG	ACCGT ACCA	CACCA CAGA	GCATAT CTTT	AGATAACCGA	AACTGGAGAA	AAACAAAAC -902 1580
		<i>AML-1</i>	<i>AML-1</i>	GATA-1			
-901	GGGCAGAAT	GAATGTGTGC	ATGGGCTTTC	GATGTGGGAA	TGGGTTTCTC	TGAGATTT TT	TTTAAAGAAA -832 1650
						MEF2	<i>STAT</i>
-831	TTTTTATATC	AACAACCAGG	AATCCAATAA	AATATCTTTC	TCCTAAGGCC	CTGGTAGTTT	GAAGGATCTA -762 1720
	MEF2			<i>SmaI</i>			
-761	GGAAAGGCA	GCGAGTCTTC	GAGTGGCGG	CCACAT CCCC	GGTACTCCAC	ACTTCTTCCA	GGCC GGGGAT -692 1790
							NF-KB
-691	GGCCAGCTGT	CATCCCATCT	CGGGCCGAAC	CCCCCCCCCC	CCCACACACA	CACACACACC	CGACTTCCCT -622 1860
-621	TCTATCTTTA	CAGCTCCAGC	CTTCTCTGCC	CGAAGGGAAG	CACAGGCTGG	AGCAAAGCTCT	CTAGGCTCAT -552 1930
-551	CCATCAGCAG	TGGAGGAGGA	GGAGAGGAGG	GGCAGGAGGA	GGAGTTTCTA	GCCGCGCGAG	CCCCCGAAGC -482 2000
-481	CGCGGTGCC	CTTCCCCCTT	TTGCTGATT	GCTGTGGCTG	CGCGCC CGAC	CCCCCGCGG	CGTGTCCCGG -412 2070
							<i>Sp1</i>
-411	GCCGAGTTAG	GCCGCGCAC	GGCCTGATG	GGGTGATCC	AGGCTTTCGG	GGACGCGCAG	CGCCACTTTC -342 2140
-341	CTCTCCCTG	GAGTGAGAG	AGAGAGAGAG	GTGAGAGGG	AGAAGCGGGC	TGCTGTCCCT	CCAGGCCACT -272 2210
							<i>SacI</i>
-271	TTGCTCCGCG	GATCCCGGA	GCTCCCGGCA	GGAGGTGAAA	GTCCCCGGCG	GGGTCCCGAT	GGCGAGTTG -202 2280
		<i>SacI</i>	<i>NotI</i>				
-201	AACTGCGCT	GCTGAGCTC	CGGCTCTG	CGCGCGCTGG	CGCGGGGAC	TGCTTGGGC	TACTCCCCCA -132 2350
							<i>Smad3</i>
-131	CCTCGCGTTG	GACGACCGGT	CCTGGACACA	CCGCTTGGCA	Ggtacgtgag	gtttggogcc	ctatcagagg -91 2420
	ctgtgcacgc	tgegtagtgc	gggtcggtgc	ctgctttgag	gggttgcctc	ggccatccag	gaccccgagg 2490
							<i>BamHI</i>
	ctgggacctg	gctttggtcc	cgcagggttg	acgctgagcg	gaaccgggat	cc	2542

Figura R7a. Estructura de la región promotora, del exón 1 y parte del intrón 1 del gen del betaglicano murino. Algunos de los presuntos elementos reguladores importantes durante miogénesis (en negritas y subrayados) fueron hallados con el programa *Professional MatInspector*

y se indican por debajo de la secuencia. Se muestra una selección de presuntos elementos reguladores que tienen una similitud a sus respectivas secuencias consenso mayor o igual a 0.9. Si dos secuencias reguladoras se traslapan, una de ellas se muestra sombreada en vez de subrayada. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción están en negritas y se indican por encima de la secuencia. La secuencia del exón 1 putativo (tomando como modelo el exón 1 del ADNc de rata) está subrayada. La secuencia parcial del primer intrón está en minúsculas. El puntero (►, encima de una C) marca el extremo 5' de la secuencia del ADNc de ratón. Se muestran 2542 pb. La numeración se estableció al tomar como la base +1 la adenina (A) del codón de inicio de traducción del betaglicano murino. Esta secuencia se puede bajar del GenBank con la clave AF537325.



Figuras R7b y R7c. **b**, Mapa esquemático de la región promotora. Se muestran el promotor, el exón 1 (caja con rayas verticales) y parte del intrón 1, así como sitios de restricción importantes. **c**, Mapa esquemático de la región genómica aledaña al promotor.

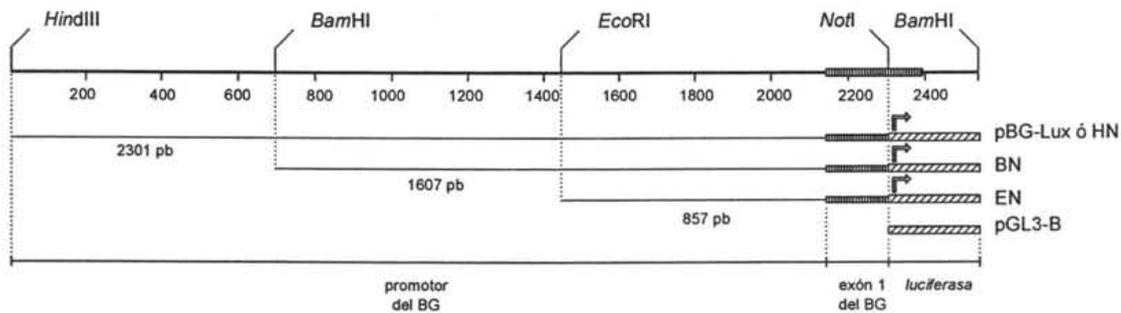


Figura R8. Construcciones del promotor del betaglicano – luciferasa. El número de bases que se indica debajo de cada construcción hace referencia a la extensión desde el sitio *HindIII*, *BamHI* ó *EcoRI* hasta el sitio *NotI*. El vector en el que se insertaron dichos segmentos del promotor del BG es pGL3-Basic (pGL3-B).

6. El promotor del betaglicano tiene un nivel de actividad contrastante en células Rat-1 versus L₆E₉

Endógenamente, los mioblastos de rata L₆E₉ sintetizan muy poco ARNm de betaglicano, mientras que los fibroblastos de rata Rat-1 sintetizan mucho ARNm de betaglicano (López Casillas *et al.*, 1991). La construcción HN fue la que se usó para los experimentos subsecuentes y es a la que en lo subsecuente se conoce como pBG-Lux. La construcción pBG-Lux se transfectó en ambas líneas celulares y se observó que la expresión de luciferasa era muy baja en las células L₆E₉ y muy alta en las células Rat-1 (figura R9). Los niveles contrastantes de actividad del promotor en estas dos líneas celulares concuerdan con sus correspondientes niveles de expresión del ARNm de betaglicano.

7. La actividad del promotor del betaglicano aumenta dramáticamente durante la diferenciación de los mioblastos C₂C₁₂ a miotubos

Como se mencionó anteriormente, observamos que durante la diferenciación miogénica la cantidad de ARNm del betaglicano aumenta notoriamente. Para poner a prueba la hipótesis de que esta elevación se origina al menos en parte a una mayor transcripción del gen del betaglicano, transfectamos mioblastos C₂C₁₂ con la construcción pBG-Lux, con la pMygn-Lux (promotor de la miogenina en pGL3-B como control positivo) ó con el vector vacío pGL3-Basic (como control negativo), y en todos los casos con el plásmido pRL-SV40 –para normalizar la eficacia de transfección–. Las células se dejaron diferenciar por 0, 2, 4 ó 6 días. En cada punto fueron lisadas las células y se midió la actividad de luciferasa. De este modo encontramos que la actividad del promotor del betaglicano, reflejada en la cantidad de luciferasa, aumenta gradual pero fuertemente durante la miogénesis (figura R10). Los valores de la luciferasa de luciérnaga fueron normalizados con los valores de la luciferasa de *Renilla reniformis*, cuya expresión está a cargo del promotor SV40. El aumento en la actividad del promotor del betaglicano es drástico al día 4 de diferenciación, siendo prácticamente de un orden de magnitud, mismo que se mantiene al día 6. Como

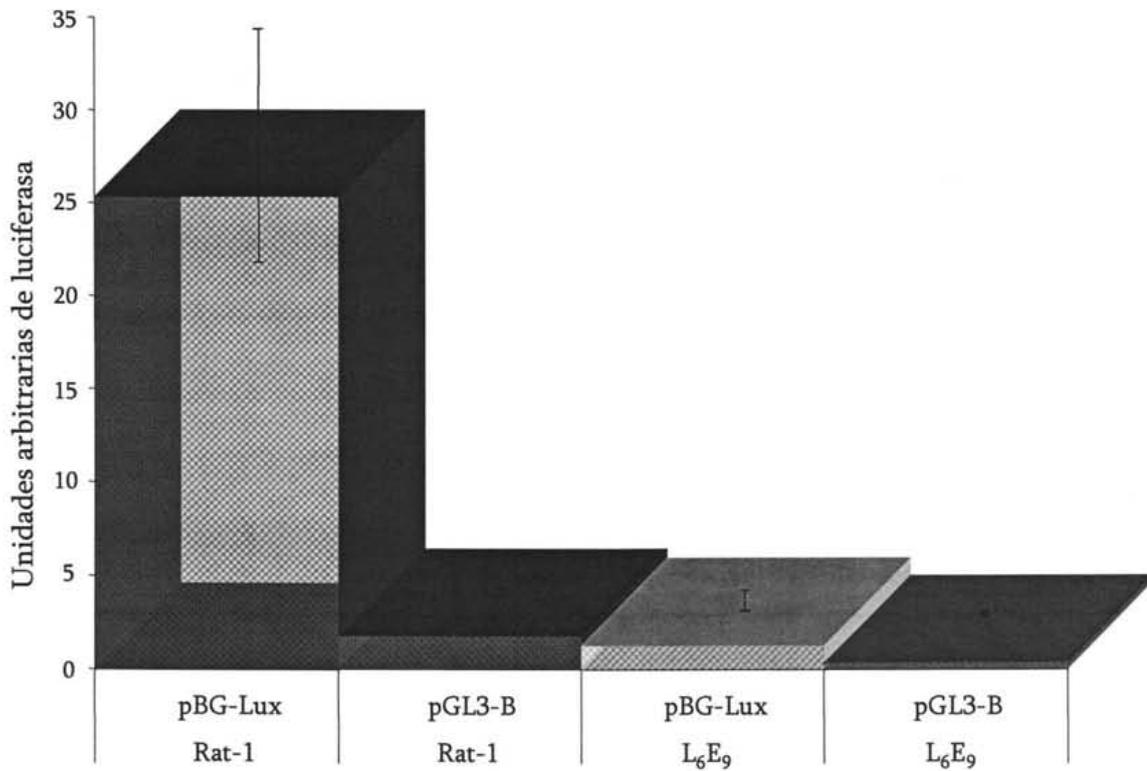


Figura R9. Actividad del promotor del betaglicano murino en mioblastos L₆E₉ de rata y en fibroblastos Rat-1 de rata. La actividad del promotor se midió a través del reportero luciferasa. Los cocientes de los niveles relativos de luciferasa del betaglicano (pBG-Lux) con respecto a los del vector vacío (pGL3-B) en L₆E₉ son de 3.4X : 1X y en Rat-1 son de 14.2X : 1X.

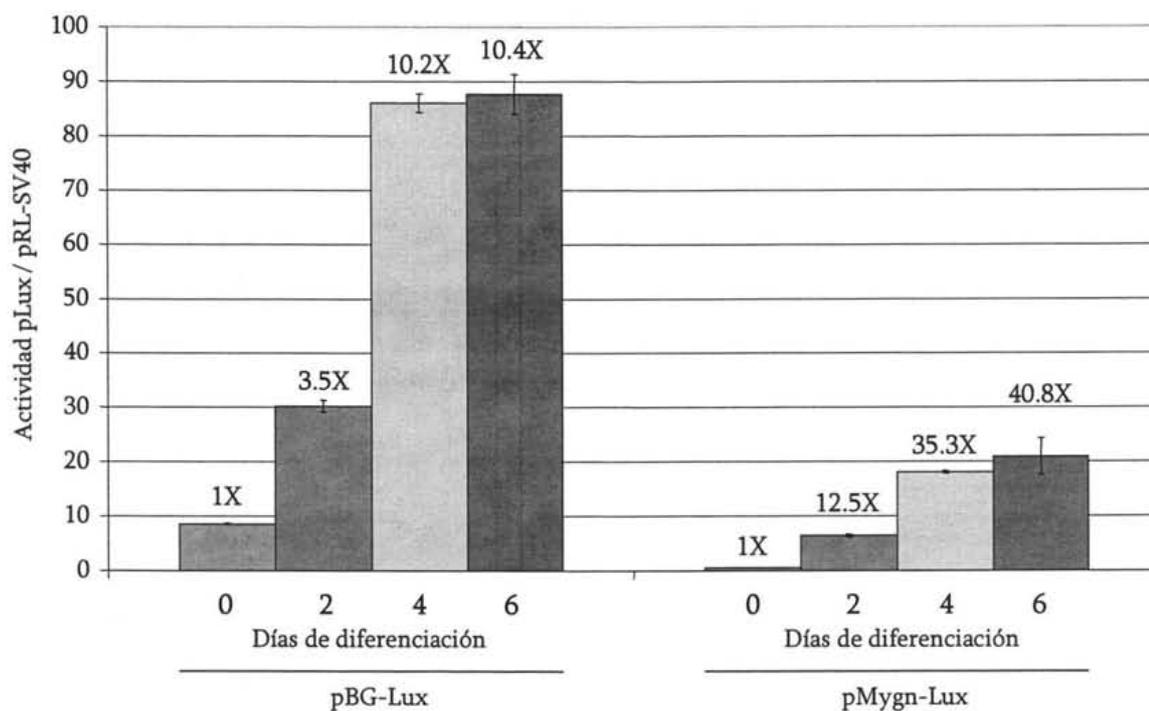


Figura R10. Incremento de la actividad del promotor del betaglicano murino en la miogénesis esquelética. Las células C_2C_{12} transfectadas con el plásmido pBG-Lux (que contiene al promotor del betaglicano murino), con el plásmido pMygn-Lux (promotor de la miogenina en el vector pGL3-B) o con el vector vacío pGL3-B se dejaron diferenciar y la actividad de luciferasa se monitoreó en cuatro puntos temporales. La actividad relativa del promotor del betaglicano en cada día del proceso de diferenciación está indicada por los números seguidos de una X encima de las barras. Los valores de la luciferasa de luciérnaga (pLux) fueron normalizados a los de la luciferasa de *Renilla* (pRL-SV40). La transfección con el vector vacío pGL3-B dio valores promedio de 0.59 ± 0.05 , 0.71 ± 0.01 , 1.32 ± 0.03 y 1.94 ± 0.11 unidades arbitrarias durante los días 0, 2, 4 y 6 de diferenciación, respectivamente.

punto de comparación, la actividad del promotor de la miogenina aumenta 40.8 veces al día 6 de diferenciación. Estos resultados sugieren que durante la miogénesis, la subida en los niveles del ARNm del betaglicano se debe al menos en parte a la elevación de la transcripción del gen del betaglicano, si bien es cierto que el ARNm podría también poseer una estabilidad mayor. Cabe mencionar que aunque el incremento de la actividad del promotor de la miogenina es más dramático que el del betaglicano durante la miogénesis, aun el aumento de 40.8X en la actividad del promotor de la miogenina al día 6 de diferenciación no llega a alcanzar en términos de unidades de luciferasa al aumento de 3.5X en la del betaglicano al día 2 de diferenciación. A pesar de que la construcción pBG-Lux despliega una actividad relativamente alta (en comparación con la construcción pMygn-Lux) en los mioblastos, en ellos el ARNm del betaglicano es prácticamente indetectable mediante *northern blot*, por lo que es posible que a la construcción pBG-Lux le hagan falta elementos represores que abatan el nivel basal de transcripción del gen endógeno en los mioblastos.

8. TGF- β , ácido retinoico y butirato modulan la actividad del promotor en las células C₂C₁₂

La conversión de mioblastos a miotubos está estricta y negativamente regulada por TGF- β , bFGF, HGF/SF y butirato; por su parte, el ácido retinoico promueve potentemente esta conversión, además de inducir el ARNm de miogenina (Halevy y Lerman, 1993); BMP2, si incide sobre mioblastos C₂C₁₂, induce su conversión reversible a osteoblastos (Katagiri *et al.*, 1994), y en éstos, regula negativamente la expresión del betaglicano (Centrella *et al.*, 1995); bFGF inhabilita la capacidad transactivadora de la miogenina (Li *et al.*, 1992) e inhibe transcripcionalmente la expresión de *myoD1* (Vaidya *et al.*, 1989), y aunque también se pega a los sulfatos de heparano del betaglicano, no se ha descrito alguna relevancia fisiológica de ello (Andres *et al.*, 1992). Habiendo observado que la inducción del betaglicano es concomitante al avance de la miogénesis, propusimos la hipótesis de que factores de crecimiento extracelulares que regulan el programa miogénico cuentan también con la capacidad de regular al gen del betaglicano. Como sustento *a priori* de esta hipótesis está el que las isoformas de TGF- β tienen como correceptor al betaglicano, en especial TGF- β 2, por lo que parecía concebible que estos ligandos pudieran regular la transcripción del gen de su correceptor; además, se probaron las tres isoformas por la posibilidad de que alguna pudiera tener un efecto diferenciado. Aún más, el ácido retinoico aumenta la expresión del ARNm del betaglicano en osteoblastos (Nakayama *et al.*, 1994); el butirato –además de ejercer otros efectos en los mioblastos– inhibe la actividad transactivadora de MyoD y de miogenina, dos factores de transcripción miogénicos maestros (Johnston *et al.*, 1992); así que si lográbamos observar inhibición de la actividad del promotor del betaglicano por el butirato, podríamos sospechar que uno o ambos de los transactivadores maestros ejercían acciones directas o indirectas sobre el promotor del betaglicano. Los tratamientos hormonales se aplicaron a concentraciones ligeramente suprafisiológicas (en el caso de TGF- β , 40 pM *versus* 20 pM, la fisiológica) y se dejaron actuar durante 24 horas; los resultados se muestran en la figura R11a. Así determinamos que TGF- β , ácido retinoico y butirato tienen un efecto sobre la actividad del promotor del betaglicano. No así bFGF, HGF/SF ni BMP2. Como punto de referencia se muestra el efecto que tienen algunos de estos agentes sobre el promotor de la miogenina (figura R11b).

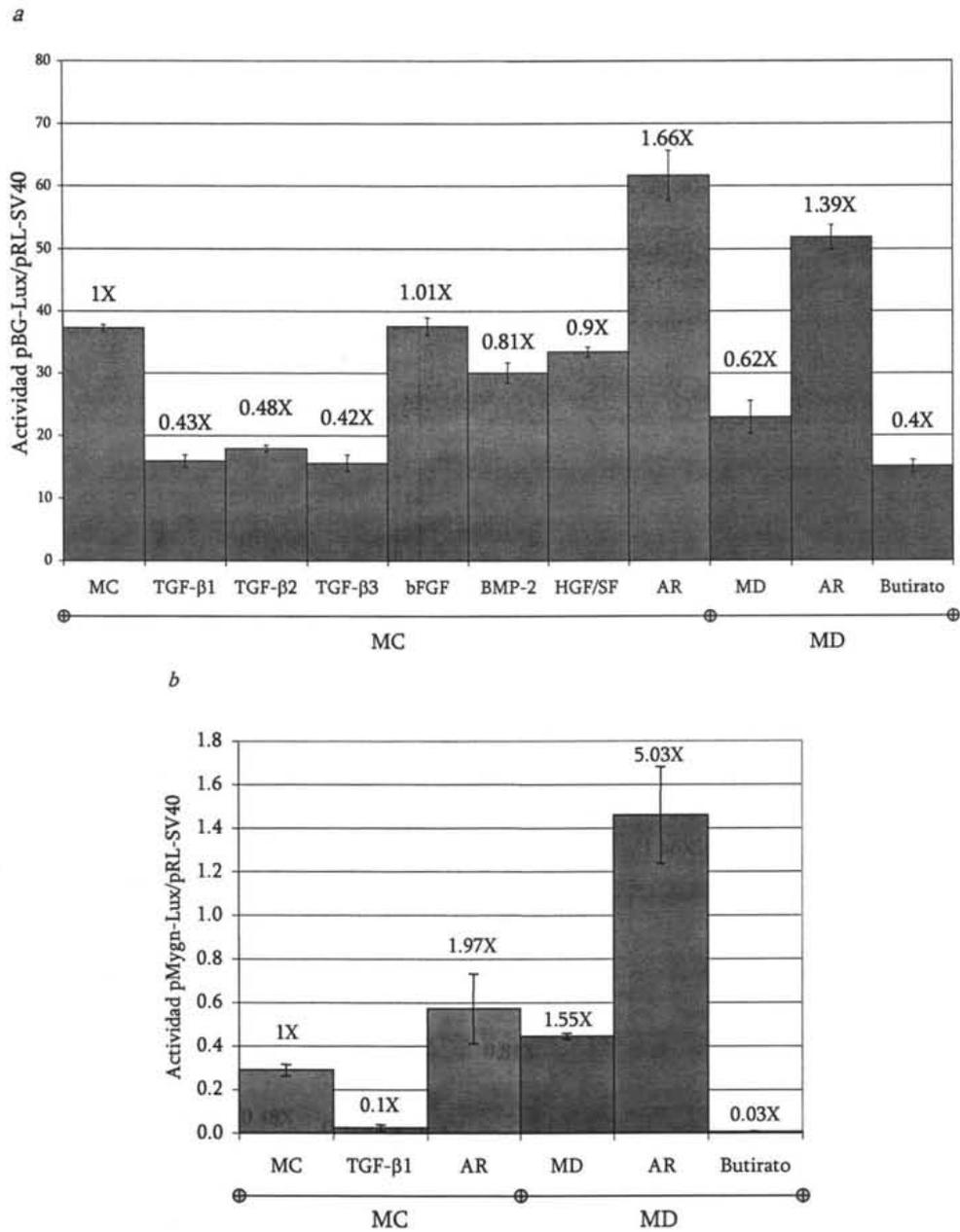


Figura R11. Modulación de la actividad del promotor del betaglicano por diversos agentes. Los mioblastos C_2C_{12} fueron crecidos en medio de proliferación y transfectados con el promotor del betaglicano fusionado con la luciferasa (pBG-Lux) (a) o con el plásmido pMygn-Lux (b). Posteriormente se les aplicó el agente indicado y se dejó actuar durante 24 horas, para luego lisar las células y medir la actividad de luciferasa. MC: medio de crecimiento; TGF-β1, -β2, -β3: *transforming growth factor-β1, -β2, -β3*; bFGF: *basic fibroblast growth factor*; BMP-2: *bone morphogenetic protein-2*; HGF/SF: *hepatocyte growth factor-scatter factor*; AR: ácido retinoico; MD: medio de diferenciación. Las 3 barras de la extrema derecha corresponden a células en medio de diferenciación. Concentraciones usadas: TGF-βs: 40 pM (1 ng/mL); bFGF: 3 ng/mL; BMP-2: 1 nM; HGF/SF: 3 ng/mL; AR: 1 μM; butirato: 2 mM.

9. En búsqueda de elementos en *trans* que regulen al promotor del betaglicano

El butirato de sodio inhibe específicamente las funciones transactivadoras de MyoD y de miogenina –no su capacidad para unirse al ADN, siendo necesario su dominio bHLH para ser blanco de tal inhibición–, aunque sus efectos en las células no se restringen a esos dos, sino que también inhibe desacetilasas de histonas, conduciendo a la hiperacetilación de las histonas (Johnston *et al.*, 1992). Habiendo visto que el butirato tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad del promotor del betaglicano, decidimos explorar si alguno de los transactivadores bloqueados por el butirato –MyoD y miogenina– podía transactivar al promotor del betaglicano. Para tal fin, se cotransfectaron mioblastos C₂C₁₂ con los plásmidos pBG-Lux o pMygn-Lux y un plásmido de sobreexpresión solo (pEMSV), con el ADNc de MyoD (Davis *et al.*, 1987) o con el ADNc de miogenina (Wright *et al.*, 1989). El experimento de cotransfección indicó que MyoD aumenta la actividad del promotor del betaglicano 3 veces y miogenina 1.5X (figura R12). El análisis teórico de los sitios de unión de transactivadores demuestra que hay 2 sitios potenciales de unión de MyoD (figura R7c y anexo I). Acordemente, al parecer no hay sitios de unión de miogenina en el promotor. Como se puede ver, aunque ambos promotores responden a TGF- β , a ácido retinoico y a butirato en la misma dirección (positiva o negativa), la magnitud del efecto es contrastante: el promotor de la miogenina resulta ser mucho más sensible ante estos agentes. No obstante, la actividad de ambos promotores difiere cuando los mioblastos son puestos en un medio bajo en suero: mientras que la del betaglicano se cae, la de la miogenina sube. Esto sugiere que en los mioblastos, la actividad basal del promotor del betaglicano está sostenida por factores séricos.

De nuevo, aunque MyoD sólo aumentó ~3X la actividad del promotor del betaglicano, hay que tomar en cuenta que la actividad del promotor en condiciones basales era de por sí alta. Desde un punto de vista personal, me permito hacer la siguiente analogía: el promotor de la miogenina es como un parcela x que da 1 zanahoria a la semana, mientras que el promotor del betaglicano es como una parcela y que da 20 por semana. Ante la aplicación de un fertilizante (MyoD), la parcela x que daba 1 zanahoria semanal llega a dar 27 (27 veces de aumento), pero la parcela y que daba 20 llega a dar 60 (3 veces de aumento). Así, aunque las veces que aumenta el rendimiento de la parcela y (betaglicano) sean menos que las de la parcela x (miogenina), el rendimiento neto de la parcela y es mayor. Tendríamos una situación semejante si consideramos que el fertilizante es la diferenciación miogénica.

10. En mioblastos, el betaglicano presenta TGF- β a sus receptores de señalización

Para tener una idea de la posible función que el betaglicano desempeña una vez que se empieza a producir abundantemente cuando inicia el proceso de diferenciación miogénica, se transdujeron mioblastos con adenovirus que expresan betaglicano silvestre (Adv-BG) de rata bajo el control del promotor CMV, y como control negativo, el adenovirus solo. Se halló que al estimular con TGF- β a los mioblastos, aquéllos inducidos a expresar betaglicano tienen una mayor inducción del gen reportero p3TP-Lux –regulado por elementos de respuesta a TGF- β – (figura R13). Aunque no se hizo el experimento inverso de suprimir la expresión del betaglicano –v.g., mediante ARN de interferencia–, los hallazgos sugieren fuertemente que en los mioblastos el betaglicano funciona como presentador de TGF- β a T β RII.

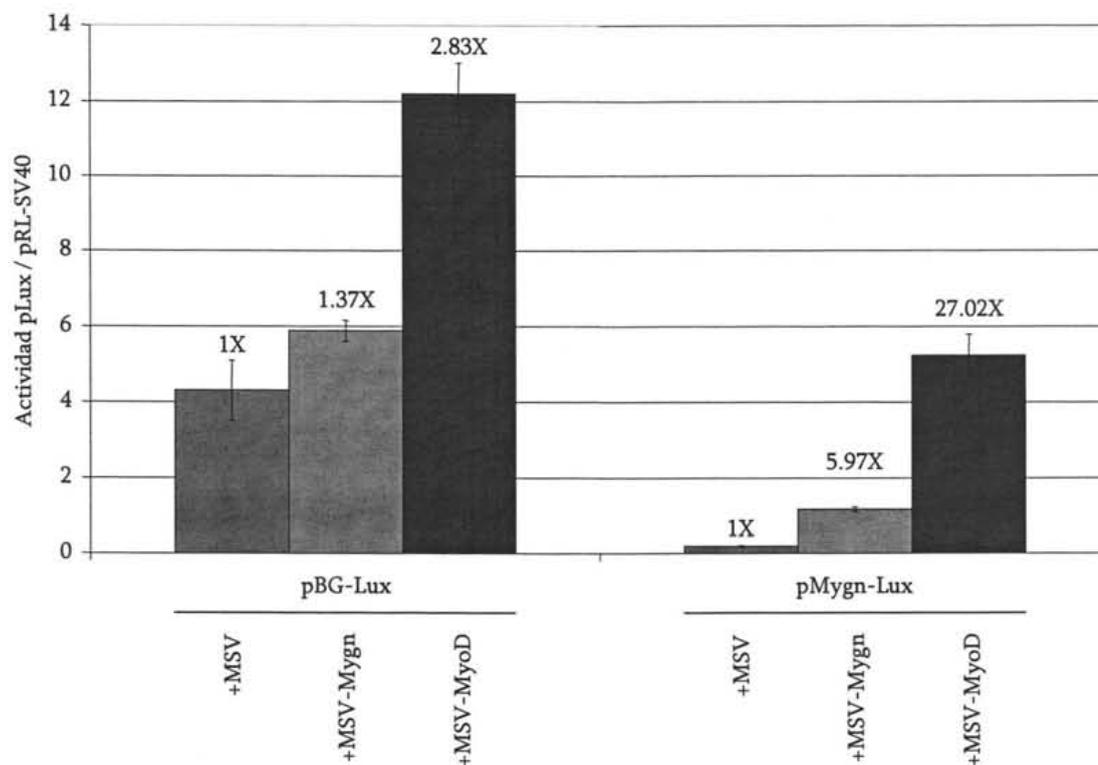
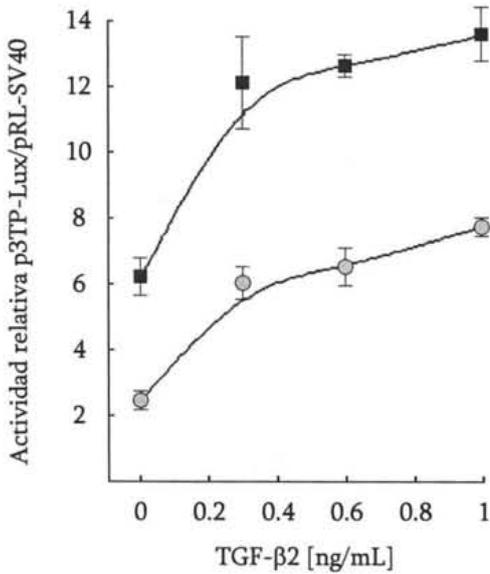


Figura R12. Transactivación del promotor del gen del betaglicano por MyoD pero no por miogenina. Se cotransfectaron la construcción pBG-Lux o pMygn-Lux (como control positivo) y los vectores de sobreexpresión de los factores de transcripción MyoD, miogenina (Mygn), o sin inserto (MSV) en mioblastos C₂C₁₂ puestos en medio de crecimiento. 48 horas después de la transfección se lisaron las células para medir la actividad de luciferasa. MyoD aumentó la actividad del promotor del betaglicano ~3X y miogenina ~1.5X.

a



b

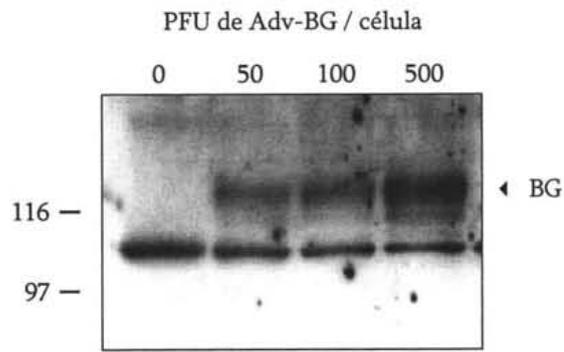


Figura R13. Presentación de TGF-β a sus receptores señalizadores a través del betaglicano en mioblastos. *a*, Se transdujeron mioblastos C₂C₁₂ con 100 unidades formadoras de placas (pfu)/célula de Adv-BG (cuadrados) o del vector vacío (círculos). Luego de 24 horas, los mioblastos fueron transfectados transitoriamente con los plásmidos p3TP-Lux y pRL-SV40. Después de ser transfectadas, las células fueron incubadas en medio de crecimiento por 24 horas y les fue añadido TGF-β2 en diferentes concentraciones; se escogió esta isoforma porque es la que más requiere de betaglicano para señalizar. Después de 24 horas, se lisaron las células y se les midió la actividad de ambas luciferasas. Los resultados muestran la media de dos experimentos independientes con muestras por triplicado. *b*, Mioblastos C₂C₁₂ fueron transducidos con cantidades crecientes de pfus/célula de Adv-BG. Luego de 48 horas se colectaron las células, se trató el extracto celular con heparitinasa y condroitinasa ABC y se determinó la expresión del BG mediante *western blot*. La flecha indica la posición de la proteína sin GAGs del BG. No sabemos de qué proteína sea la banda que aparece por debajo de la del betaglicano en todos los carriles.

7. Discusión

Aumento de la expresión del betaglicano durante la diferenciación de mioblastos C₂C₁₂ a miotubos

Habiendo partido de la hipótesis de que el betaglicano estaría sujeto a regulación durante la conversión de mioblastos C₂C₁₂ a miotubos (un modelo *in vitro* de la formación de músculo esquelético), al igual que lo están otros proteoglicanos de los mioblastos C₂C₁₂, decidimos analizar si existían a lo largo de la miogénesis fluctuaciones en varios de los pasos que conducen a la biosíntesis del betaglicano. En el presente trabajo de tesis se describe que durante la diferenciación miogénica aumenta el nivel de expresión del betaglicano en la superficie celular y que una porción considerable de estas moléculas en la superficie celular es desplazada a la matriz extracelular. El incremento del betaglicano en la superficie celular se correlaciona con una mayor cantidad de su ARNm y con una mayor actividad del promotor de su gen, mismo que clonamos. Además, encontramos que también aumenta la unión de TGF- β al betaglicano durante la miogénesis.

Es necesario aclarar que el aumento en la unión de TGF- β al betaglicano conforme avanza la miogénesis no podíamos adjudicarlo *a priori* a un incremento en la expresión del betaglicano en la superficie celular. En mioblastos C₂C₁₂ que no expresan decorina –debido a la transfección estable del ADNc de la decorina en contrasentido–, la unión de ¹²⁵I-TGF- β al betaglicano es patentemente mayor que en los mioblastos silvestres (Tesis doctoral de la Dra. Cecilia Riquelme, Universidad Católica de Chile, 2001); por tal razón, era concebible que la falta de marcado por afinidad del betaglicano al día 0 de diferenciación se debiera a que la decorina –el proteoglicano más abundante de la matriz extracelular de músculo esquelético– estuviera uniendo un gran porcentaje de ¹²⁵I-TGF- β y que por lo tanto se estuviera ensombreciendo la unión de ¹²⁵I-TGF- β al betaglicano. Conforme transcurre la miogénesis, se modifica la producción de la decorina (Brandán *et al.*, 1991), lo que podría hacer que durante dicho transcurso empiece a elevarse la unión de ¹²⁵I-TGF- β al betaglicano. Así, decidimos simplemente analizar mediante *western blot* la expresión de la proteína del betaglicano (habiéndole quitado los GAGs con heparitinasa y condroitinasa ABC) para averiguar si hay más cantidad de proteína del betaglicano en los miotubos y no solamente más unión de ¹²⁵I-TGF- β al mismo en ellos: el resultado nos indicó que además de que los mioblastos producen betaglicano en cantidades bien detectables –lo cual fue sorprendente, dado que el marcado por afinidad había hecho sospechar que casi no se produce–, su cantidad sí es notoriamente mayor en los miotubos. No obstante, no podemos aseverar que la mayor producción de betaglicano en los miotubos sea la única causa de una mayor unión de TGF- β al betaglicano. En respaldo de que hay síntesis de betaglicano en los mioblastos está un artículo del laboratorio del Dr. Rik Derynck (Filvaroff *et al.*, 1994), donde se observa en una figura que el betaglicano de mioblastos C₂C₁₂ une moderadamente ¹²⁵I-TGF- β , es decir, aun cuando no se ha inducido diferenciación. Sin embargo, en dicha figura sí se detecta la expresión de los receptores señalizadores del TGF- β T β RII y T β RI. ¿Cómo explicar esta incongruencia? Una explicación posible es que hayan usado una concentración más alta de ¹²⁵I-TGF- β en el marcado por afinidad de los receptores (no mencionan qué concentración de ¹²⁵I-TGF- β usaron) y/o que los mioblastos que utilizaron hayan estado muy confluentes. Para que la expresión de los genes musculares sea suprimida al máximo en presencia de suero, se requiere que las células estén a baja densidad (a menos del 20% de confluencia); a mayores densidades, los efectos del suero y del TGF- β se hacen menos evidentes, y en cultivos altamente densos, se dispara la expresión de

marcadores de diferenciación miogénica debido a la diferenciación espontánea de una fracción de las células. Esto se debe al rápido consumo de los factores de crecimiento del medio (Lassar *et al.*, 1989). En nuestros cultivos, en cambio, la confluencia de células no pasó del 70%. Como se puede sospechar al ver la figura 2A(-) de Filvaroff *et al.* de 1994, la medición de los receptores de TGF- β en la superficie la hicieron en cultivos de mioblastos C₂C₁₂ confluentes y eso es lo que pudo haber disparado la expresión del betaglicano.

Sin embargo, existen dos artículos del laboratorio del Dr. Eric Olson con los cuales nuestro trabajo podría estar en contradicción. En ellos se reporta que la unión de TGF- β a sus receptores de la superficie celular T β RIII, T β RII y T β RI disminuye una vez que mioblastos C₂ (progenitores de los mioblastos C₂C₁₂) ó L₆A₁ (de rata, parientes de los L₆E₉) se han diferenciado a miotubos (es interesante mencionar que en estos artículos se detalla que al contrario de lo que sucede en mioblastos, en miotubos la expresión de genes musculares ya es inmune a la inhibición por TGF- β ; sin embargo, si se impide sólo la fusión de los mioblastos al añadir EGTA a su medio de diferenciación, la unión de TGF- β a sus receptores no decae y aunque se expresan normalmente genes musculares, siguen siendo blanco fácil de inhibición por TGF- β , de modo que la fusión viene acompañada de un bloqueo permanente de las acciones inhibitorias del TGF- β hacia los genes musculares; Ewton *et al.*, 1988; Hu y Olson, 1990). Según sus hallazgos, la unión de TGF- β al betaglicano con GAGs disminuye un 40%, mientras que al betaglicano sin GAGs un 93%. Acordemente con lo observado en cuanto a T β RII y T β RI, la Dra. Cecilia Riquelme halló que la unión de ¹²⁵I-TGF- β a estos receptores disminuye durante la miogénesis en mioblastos C₂C₁₂, no así la síntesis de T β RI, que muy por el contrario, sube. El Dr. Joan Massagué, por su parte, observó que T β RII y T β RI no pierden la unión de TGF- β en los miocitos L₆E₉ de rata durante la miogénesis (Massagué *et al.*, 1986). Cabe mencionar que nosotros no pudimos detectar mediante marcado por afinidad a T β RIII sin GAGs (*i.e.*, la *core protein* endógena del betaglicano), a T β RII ni a T β RI en mioblastos ni en miotubos. La disensión es entonces que, según el Dr. Olson, la unión de TGF- β al betaglicano disminuye, y según nosotros, aumenta durante la miogénesis. Estas observaciones discordantes sobre si la unión de TGF- β al betaglicano aumenta o disminuye durante la miogénesis se podrían explicar por diferencias en las condiciones de cultivo y al considerar que Olson empleó mioblastos C₂ y nosotros C₂C₁₂. ¿Qué sustento se tiene para creer que el comportamiento de los miocitos C₂C₁₂ constituye un modelo más confiable de miogénesis que el de los C₂? La respuesta estriba en que los mioblastos C₂ no poseen propiedades de diferenciación altamente reproducibles, por lo que de ellos se aisló la población clonal C₂C₁₂, despojada de este defecto, además de que se diferencia rápidamente y produce extensamente miotubos contráctiles (Yaffe y Saxel, 1977). Por tal motivo, los mioblastos C₂C₁₂ son actualmente preferidos no sólo por encima de los C₂, sino también de los L₆ y Sol-8 para hacer estudios del proceso de miogénesis esquelética. En cuanto a las condiciones de cultivo, el grupo del Dr. Olson usó para sus mioblastos medio con suero de feto bovino al 20% y nosotros al 10% (con extracto de embrión de pollo al 0.5%); las condiciones para detonar la diferenciación también fueron distintas: mientras que su grupo empleó medio con suero de caballo al 10%, nosotros lo empleamos al 5%. Además, detallan haberles puesto medio con suero de feto bovino al 20% (con AraC) a sus cultivos de miotubos para eliminar a los mioblastos sobrevivientes, lo cual nosotros no hicimos. Otro detalle que podría ayudar a explicar las diferencias es que el grupo de Eric Olson midió los sitios de unión de TGF- β en mioblastos y en miotubos "extensamente" diferenciados (sin mencionar cuántos días llevaban en el medio de diferenciación), mas no durante el trance de un estadio al otro.

En cambio, nosotros sí determinamos el nivel de unión del TGF- β al betaglicano a lo largo del proceso de diferenciación y observamos que este nivel aumenta sin lugar a dudas y se mantiene alto al menos desde el día 2 hasta el 4, aunque al día 6, este nivel cae moderadamente, pero no por debajo del que había en mioblastos, como lo reporta el Dr. Eric Olson. ¿Por qué confiamos en que el aumento durante la miogénesis en la expresión del betaglicano es un evento fisiológico, quizá generalizable a músculo maduro normal y no un mero artificio de la línea celular C₂C₁₂? Porque determinamos que el factor de transcripción miogénico maestro MyoD, cuya actividad transactivadora de genes musculares se eleva durante la miogénesis, es capaz de regular positivamente la actividad del promotor del gen del betaglicano, lo cual conduce a elevaciones en su ARNm y proteína y a una mayor unión del TGF- β al proteoglicano. Además, en el artículo de Wang *et al.* de 1991 de la clonación inicial del ADNc del betaglicano, los autores examinan los tejidos de rata donde se sintetiza el ARNm del betaglicano y encuentran que lo hace fuertemente en músculo, lo cual sugiere que las miofibras *in vivo* sí expresan notablemente betaglicano en la membrana plasmática. Empero, es necesario decir que existe también la posibilidad de que la divergencia genética de los mioblastos C₂C₁₂ de los mioblastos silvestres de la pata de un ratón, de donde provienen, sea la responsable de la elevación en la expresión del betaglicano.

La magnitud del aumento en los niveles de la actividad del promotor, la cantidad de ARNm y la cantidad de proteoglicano del betaglicano (suponiendo que la unión de ¹²⁵I-TGF- β al betaglicano refleje fielmente la cantidad de betaglicano en la superficie y en la matriz) no se correlacionan perfectamente a lo largo de la diferenciación miogénica. Esto probablemente se debe a que el ARNm y la proteína del betaglicano estén siendo objeto de mecanismos de regulación postranscripcional. En la literatura podemos ver casos semejantes de expresión dispar del ARNm *versus* la proteína: en el lóbulo intermedio de la hipófisis no se detecta la expresión del ARNm del betaglicano –intentada medir mediante hibridación *in situ*–, pero la tinción con el anticuerpo α -betaglicano revela una expresión intensa en el citoplasma de las mismas células (MacConell *et al.*, 2002). Asimismo, aunque se observa que hay ARNm del betaglicano en células germinales testiculares, éstas no muestran inmunorreactividad hacia la proteína (MacConell *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2000), lo cual podría atribuirse a una traducción lenta del mensajero, a una degradación rápida de la proteína o la liberación de una forma soluble del betaglicano. Una situación semejante se presenta en lipocitos hepáticos: al activarse como parte del proceso de regeneración hepática, expresan altísimas cantidades del proteoglicano del betaglicano con respecto a los hepatocitos quiescentes donde apenas es detectable, y sin embargo, éstos expresan 4 veces más de ARNm de betaglicano que aquéllos (Friedman *et al.*, 1994). Es posible que al día 6 de diferenciación de los miotubos C₂C₁₂, donde hay menos ARNm de betaglicano con respecto al día 4, el ARNm esté siendo menos protegido de la degradación y por eso haya una menor cantidad, dado que la actividad del promotor al día 6 es tan alta como al día 4.

Estructura y regulación de la actividad del promotor del betaglicano murino. Sitios ya mapeados en el promotor de rata, regulación por agentes y factores de transcripción, sitios potenciales detectados por MatInspector.

¿Por qué es importante el estudio de un promotor, en general? El promotor de un gen contiene los elementos de control (elementos en “*cis*”) que permiten que la transcripción del gen sea regulada por una plétora de estímulos. Por ejemplo, si observamos que una célula responde ante una hormona incrementando la cantidad del ARNm de cierto gen,

podemos inmediatamente sospechar que la hormona causa la llegada de un efector suyo –un factor de transcripción activado, elemento en “*trans*”– al promotor de dicho gen, lo cual ocasionaría eventualmente una transcripción mayor del gen al estabilizar en el promotor el ensamblaje del aparato basal de transcripción que contiene a la ARN polimerasa II. Visto de una manera más global, el conjunto de elementos de control en el promotor es el medio que el gen tiene para saber en qué momento y en qué célula debe transcribirse, o bien, modificar su tasa de transcripción, y con ello atender los requerimientos de la célula. El patrón de manchas en las alas de *Drosophila* es un ejemplo interesantísimo de la importancia de la región promotora: mientras que la especie *D. biarmipes* tiene manchas –que sirven para atraer pareja–, *D. melanogaster* no, y la base genética reside en la adición de elementos en *cis*, incluyendo uno para el transactivador Engrailed, al promotor del gen de pigmentación *yellow* de *D. biarmipes* pero no al de *D. melanogaster* hace millones de años (Gompel *et al.*, 2005). Otro ejemplo es la morfología del pico de diversas especies de pinzones de Darwin: existe la posibilidad de que los elementos de regulación en *cis* del gen de *bmp4*, presuntamente diferentes en cada especie de pinzón, sean los responsables de moldear la anatomía *sui generis* del pico de estas aves y quizá también el de otros géneros de aves (Abzhanov *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004).

El promotor del betaglicano de ratón presenta un alto nivel de homología con su contraparte de rata: globalmente, son idénticos en un 82%. El análisis de la secuencia del promotor basal murino, en gran parte por homología con el promotor de rata (Ji *et al.*, 1999), indica que carece de cajas TATA y de cajas CCAAT, pero contiene dos sitios de unión del factor ubicuo Sp1 cercanos entre sí en una isla CpG. Probablemente también posea varios sitios de inicio de la transcripción, situación asociada con genes que no contienen cajas TATA ni CCAAT. De forma semejante, los promotores de los genes de T β RI y de T β RII no poseen cajas TATA sino islotes CpG (Bae *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1996). Los sitios Sp1 vecinos entre sí presumiblemente funcionan de manera cooperativa, formando complejos que inician la transcripción desde varios puntos (referencia 43 de Ji *et al.*, 1999). Ji *et al.* reportan haber hallado elementos de respuesta a glucocorticoides en el promotor de rata en las posiciones –687 a –495 y –440 a –386, indicados en la figura R6: el primero, un sitio de unión de C/EBP, cuyo gen es estimulado por glucocorticoides, y el segundo, regulado en cooperación con otros transactivadores, dado que no posee sitios consenso de unión de glucocorticoides ni de C/EBP. A pesar de que Ji *et al.* (1999) no lo mencionan en su discusión, el sitio silenciador descubierto por ellos en el promotor de rata que comapea con una región de regulación negativa por BMP-2, se localiza en una zona donde hay un elemento de unión de Smad4 –dos en el promotor de ratón–. Es muy probable que el sitio de Smad4 sea a donde llegue un complejo efector de BMP-2 compuesto por Smad1, 5 u 8 con Smad4. Es posible que la supresión que nosotros observamos de la actividad del reportero pBG-Lux por TGF- β –seguramente a través de Smad2 ó 3 con Smad4– converja también en este sitio.

El análisis de la secuencia del promotor del betaglicano con el software *MatInspector* versión profesional (Quandt *et al.*, 1995) reveló que hay múltiples elementos putativos de regulación en *cis* a lo largo de todo el promotor. Entre éstos, algunos de los elementos en *cis* relevantes durante la miogénesis son: MyoD, MEF2, Smad3, Smad4 y RAR.

Veamos qué agentes probados por nosotros pueden conducir a la regulación en *trans* de algunos de los elementos reguladores potenciales en el promotor del betaglicano. El ácido retinoico causa una elevación en la actividad del promotor del betaglicano en los mioblastos C₂C₁₂. Este hallazgo concuerda con que el ácido retinoico hace lo mismo pero

en osteoblastos (Nakayama *et al.*, 1994). Los efectos del ácido retinoico en mioblastos C₂C₁₂ están mediados por el receptor X de retinoides (RXR) principalmente y por el receptor de ácido retinoico (RAR) secundariamente, encargándose cada uno al parecer de regular un subconjunto diferente de genes respondientes a ácido retinoico (Alric *et al.*, 1998). El ácido retinoico induce miogénesis sólo en células que expresan MyoD, debido posiblemente a que MyoD y RXR interactúan física y funcionalmente en promotores de genes musculares (Froeschle *et al.*, 1998). El promotor del betaglicano cuenta con sitios potenciales de unión tanto del RAR como del RXR, por lo que será interesante averiguar cuál de ellos regula al gen del betaglicano, si no es que los dos. TGF- β , por su parte, causa una disminución en la actividad del promotor del betaglicano. Esto se puede explicar al menos en parte considerando que TGF- β induce la asociación de Smad3 –pero no de Smad2– con MyoD, impidiendo de esta manera que MyoD forme heterodímeros con E12 y E47 y active *enhancers* de genes musculares pegándose a secuencias “E-box” (Liu *et al.*, 2001). Así, es congruente que al recibir el mioblasto señalización por TGF- β , la actividad de MyoD se inhiba y entonces disminuya la transcripción del gen del betaglicano, dado que MyoD promueve ésta. Asimismo, el TGF- β reprime transcripcionalmente a *myoD1* (Vaidya *et al.*, 1989), de modo que la inhibición que el TGF- β ejerce sobre MyoD es tanto a nivel transcripcional como a nivel postraduccional. Además, existe también la posibilidad de que la represión del promotor por parte de TGF- β sea directa. En contraste, en células gingivales humanas, TGF- β 1 aumenta la cantidad del ARNm de betaglicano, mientras que el suero de becerro la disminuye (Worapamorn *et al.*, 2001), justo al revés de como sucede en los mioblastos esqueléticos. Estos hechos ilustran cómo el gen del betaglicano responde de manera opuesta ante un mismo estímulo en células diferentes. Los autores recién citados, en concordancia con nuestros hallazgos, tampoco encontraron modulación por bFGF del gen del betaglicano. TGF- β 1 incrementa los niveles del ARNm de betaglicano también en monocitos en cultivo (Lastres *et al.*, 1996). Por otro lado, BMP-2 disminuye ligeramente la actividad del promotor, lo cual puede deberse a que este factor inhibe la expresión del ARNm de MyoD y promueve la del ARNm de Id1, un secuestrador de las proteínas E12 y E47, con quienes MyoD se heterodimeriza para transactivar (Katagiri *et al.*, 1994).

Nuestros experimentos de cotransfección indican que el factor de transcripción miogénico maestro MyoD aumenta 3 veces la actividad del promotor del betaglicano, mientras que otro factor maestro relacionado, miogenina, sólo es capaz de aumentar su actividad 1.5 veces. Los mioblastos L₆E₉ no expresan MyoD1 (Heino y Massagué, 1990), y la posibilidad de que por esta causa no expresen betaglicano resulta factible. En lo que respecta a MyoD, empero, aún no sabemos si es un regulador en *trans* del promotor, pero tenemos indicios de que así es por la existencia de secuencias en *cis* en el promotor que cuadran casi perfectamente con la secuencia consenso de ADN a la que se pega MyoD. De todos modos, considerando que medimos la actividad del reportero 24 horas después de la cotransfección, existe la posibilidad de que MyoD regule a otro gen, ya sea positiva o negativamente, cuyo producto sea el que directamente regule en *trans* al promotor. Será interesante en un futuro usar versiones sucesivamente más cortas del promotor para determinar si a partir de alguna versión recortada se pierde la regulación positiva por MyoD, y mapear así *grosso modo* una región del promotor responsable de la estimulación por este regulador miogénico, situada en el segmento que perdió en relación con su antecesora inmediata que aún responde a MyoD. Sin embargo, luego habrá que mapear finamente la región y determinar si es MyoD quien directamente se pega a esa zona – mediante experimentos de retardo de la movilidad electroforética (EMSAs)–, dado que aún cabe la posibilidad de que sea esa región la secuencia efectora de otro factor de

transcripción regulado por MyoD. Luego habrá que mutar puntualmente la secuencia regulada por MyoD en el promotor y verificar que se pierda la estimulación que este factor ejerce. Entonces, de pegarse y transactivar al promotor, se podrá afirmar que MyoD es un regulador en *trans* del gen del betaglicano.

En promotores de genes musculares –como el de la cadena ligera de la miosina, la desmina, la miogenina, la cinasa de creatina, etc.– los sitios MEF2 se presentan a una separación precisa de los sitios de miogenina: el residuo que resulta al dividir entre 10.5 (el número de bases en una vuelta de la cadena de ADN en solución) las bases del “centro” de una secuencia consenso a la otra es de 3.25 ± 0.25 –en cuyo caso ambos factores de transcripción ven hacia una misma cara– ó de 8.25 ± 0.75 –en cuyo caso ven hacia caras opuestas– (Fickett, 1996). Dado que se parecen –mas no se confunden– las secuencias de ADN reguladoras reconocidas por miogenina, MyoD y Myf5, se determinó si había la coordinación geométrica entre los sitios MEF2-MyoD y MEF2-Myf5 en el promotor del betaglicano según dicho artículo y no se encontró, habiéndose obtenido valores de 4.0 a 5.5. Esto no necesariamente indica que dichos sitios no puedan actuar sinérgicamente, dado que no sabemos si tal coordinación geométrica existe también entre sitios MEF2-MyoD o MEF2-Myf5 –o si se restringe a sitios MEF2-miogenina– (ver tabla III).

Tabla III. *Cluster* de sitios MEF2-MyoD-Myf5

Transactivador	Posición	Hebra	Semejanza a la matriz	Secuencia
MEF2	864 - 886	+	0.932	aacatcat T AAA aataggcttta
MEF2	875 - 897	+	1.000	aaataggctt T A AAaacttaaaa
Myf5	947 - 961	-	0.932	ttga C AG Ctgtctgga
MyoD	948 - 962	+	0.986	ccag C AG Ctgtcaag

Nota: La línea vertical que divide nucleótidos corresponde al “centro” de la secuencia consenso, mientras que los nucleótidos en negritas son de capital importancia para el reconocimiento por transactivadores (Fickett *et al.*, 1996).

Con respecto a la miogenina, el promotor del betaglicano cuenta con sitios de unión de bajo potencial (“*core similarity*” = ~0.7) para este factor, por lo que ésta puede ser la causa de que casi no se observe regulación por este factor. Además, la diferencia entre MyoD y miogenina en su capacidad para transactivar al promotor del betaglicano en realidad puede ser más acentuada en vista de que los mioblastos ya expresan MyoD pero no miogenina (Hu y Olson, 1990), de tal suerte que la inducción de ~3 veces de la actividad del promotor por MyoD quizá sería mayor en células que no expresaran MyoD. No obstante, la miogenina requiere heterodimerizarse con E12 o con E47 –productos del gen *E2A*– para funcionar como transactivador (Becker *et al.*, 2001), a diferencia de MyoD, que funciona preferentemente como homodímero (Li *et al.*, 1996). Por lo tanto, dado que no se cotransfectó E12 ó E47, es posible que la cantidad de éstos haya sido limitada y por ende, la miogenina cotransfectada no haya podido establecer suficientes heterodímeros, explicando quizás así la falta de regulación por este factor. Además, el hecho de que el promotor del betaglicano y el de la miogenina (capaz de autoinducir su expresión) muestren un patrón similar de inducción a partir del día 2 de diferenciación apoya la noción de que es posible que la miogenina sí regule al gen del betaglicano.

En cuanto a la relevancia de haber hallado regulación del promotor del betaglicano en miogénesis por MyoD (y posiblemente por otros transactivadores miogénicos), es

importante mencionar que aunque el ratón con el gen del betaglicano desactivado no presenta al parecer defectos musculares esqueléticos, sí presenta, entre otros, defectos musculares cardíacos. Como algunos de los factores de transcripción que le proveen al músculo esquelético su fenotipo son compartidos por el músculo cardíaco (no así MyoD (Weintraub *et al.*, 1991)), es probable que algunos de ellos sean responsables de potenciar la expresión del betaglicano también en músculo cardíaco.

Es posible la regulación del promotor del betaglicano por factores de transcripción importantes en la cardiogénesis como NF-ATc, MEF2, Nkx-2.5, SRF (*serum response factor*) y GATA-4, todos ellos con sitios potenciales de unión en el promotor del betaglicano, según el programa *MatInspector*. Las células endoteliales cardíacas que experimentan la transformación epitelio-mesenquimatosa para convertirse en válvulas y *septa* membranosos cardíacos expresan betaglicano, a diferencia de las células aledañas que no se sufren esta transformación. Si en este sistema se inhibe la función del betaglicano mediante un antisuero, la formación de las válvulas cardíacas no ocurre (Brown *et al.*, 1999). Asimismo, el fenotipo de los ratones *knock-out* de NF-ATc consiste en la carencia absoluta y específica de las válvulas aórtica y pulmonar, y en una afectación menos severa de la tricúspide y la mitral, además de defectos en la formación del *septum* (de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998). Dado que los dominios y momentos de expresión de NF-ATc y betaglicano sugieren interacción durante el desarrollo de las válvulas cardíacas, es posible que este factor de transcripción regule *in trans* la expresión del betaglicano; esta suposición se respalda por la existencia de elementos *in cis* en el promotor del betaglicano que se asemejan bastante a la secuencia consenso reconocida por NF-ATc (figura R7c y anexo I). NF-ATc se activa por desfosforilación: un incremento sostenido en la concentración de calcio intracelular activa a la fosfatasa calcineurina, que entonces desfosforila a NF-ATc. NF-ATc desfosforilado se transloca desde el citoplasma al núcleo y regresa inmediatamente al citoplasma cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular decaen; la proteína cinasa A activada fosforila a NF-ATc, lo cual rubrica a este transactivador para ser objeto de una fosforilación más extensa por la cinasa de la sintasa de glucógeno (GSK-3) (se piensa que la salida rápida desde el núcleo de NF-ATc es un mecanismo por el que las células distinguen las señales de calcio sostenidas de las transitorias (Klemm *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 2002)); así, es posible que también el Ca^{2+} sea necesario para elevar los niveles de betaglicano. GATA-4/5/6 y SRF interactúan físicamente y activan sinérgicamente el promotor de la α -actina uniéndose a un elemento de respuesta a suero (SRE) (Belaguli *et al.*, 2000). Los factores GATA también interactúan física y funcionalmente con factores MEF2 en promotores cardíacos: los MEF2 potencian la capacidad transactivadora de los GATAs luego de ser reclutados por éstos (Morin *et al.*, 2000). Asimismo, GATA-4/5 interactúa con Nkx-2.5 en la activación del factor natriurético auricular (ANF) (Durocher *et al.*, 1997).

Sitios potencialmente efectores de agentes que sabidamente regulan al betaglicano

Hay un sitio del receptor de estrógenos en el promotor, el cual podría ser el responsable de la regulación negativa por estrógenos del betaglicano (Koli *et al.*, 1997; Findlay *et al.*, 2001). Los dos sitios NF- κ B en el promotor posiblemente sean los que medien la modulación positiva del betaglicano por TNF- α en células HeLa (Zhou *et al.*, 2003). El sitio CREB (*cAMP-responsive element binding protein*) puede ser el efector responsable de elevar la cantidad de ARNm de betaglicano en osteoblastos por acción de la parathormona vía un aumento de AMPc (Centrella *et al.*, 1988).

En organogénesis, la expresión del gen del betaglicano podría estar regulada por los siguientes elementos *in cis* inmersos en su promotor:

- a. en miogénesis esquelética: MyoD, Myf5, NF-AT, MEF2, E47 (E47 forma heterodímeros con MyoD), RAR, Smad3, Smad4, Tcf/Lef1, AREB6/ZEB;
- b. en desarrollo cardiaco: NF-AT, MEF2, Nkx-2.5, RAR, GATA, Smad3, Smad4, SRF, WT-1;
- c. en desarrollo hepático: HNF-3 (*hepatocyte nuclear factor 3*);
- d. en desarrollo pulmonar: HNF-3, Freac-2, WT-1;
- e. en desarrollo renal: WT1;
- f. en desarrollo ocular: Pax6, Freac-2;
- g. en desarrollo cerebral: Brn-2, Freac-2;
- h. en desarrollo testicular: WT-1, GFI-1;
- i. en desarrollo intestinal: Cdx-1, Cdx-2, GKLf (*Gut-enriched Krüppel-like factor*).

Asimismo, los siguientes elementos podrían ser los blancos a donde arriban efectores de vías de señalización particulares:

- a. vía del TGF- β : Smad3, Smad4, Fast-1;
- b. vía del bFGF: NF- κ B y c-Rel;
- c. vía del Wnt: Tcf/Lef-1.

A continuación se incluye una descripción breve del patrón de expresión y/o función de algunos de los factores de transcripción recién mencionados y del anexo I:

Brn-2, **Brain-2**, es específico del sistema nervioso central, se requiere para la formación de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo –donde se detecta intensamente el betaglicano (MacConell *et al.*, 2002)–, así como de la hipófisis posterior (Schreiber *et al.*, 1992; Fujii y Hamada, 1993; Schonemann *et al.*, 1995; Nakai *et al.*, 1995). WT-1 (*Wilms' tumors*): su desactivación en ratones produce malformaciones en riñón, gónadas, mesotelio, pulmones y corazón (Kreidberg *et al.*, 1993). MZF1 (*Myeloid zinc finger 1*) regula la granulopoyesis y puede tener un papel regulador en la proliferación celular y en cáncer (Peterson y Morris, 2000). Los factores STAT (*Signal transducers and activators of transcription*) funcionan como transductores de los receptores de citocinas. La expresión del proto-oncogén GFI-1 (*Growth factor independence-1*) en animales adultos se restringe al timo, al bazo y a los testículos (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996). Freac-2, **Forkhead-related activator 2**, LUN ó FoxF2 es un factor de transcripción *forkhead* (cabeza de tenedor o de rastrillo) que se expresa en el mesénquima adyacente al epitelio en los tractos alimentario, respiratorio y urinario, de forma similar a como lo hace Freac-1/HFH-8), pero también en el sistema nervioso central, ojo, oído y yemas de las extremidades (Aitola *et al.*, 2000). ZF9 ó CPBP (*Core promoter-binding protein*) es un factor de transcripción con dedos de zinc tipo Krüppel inducido tempranamente en la activación de células estelares hepáticas (también llamadas lipocitos, células almacenadoras de grasa o células de Ito) que tiene lugar durante la regeneración del hígado; transactiva los genes de TGF- β 1, T β RII y T β RI pegándose a cajas GC en sus respectivos promotores (Kim *et al.*, 1998); en vista de que hay varios sitios ZF9 potenciales en el promotor del betaglicano –en las cercanías del presunto inicio de transcripción–, es posible que este factor también regule al gen del betaglicano.

La región promotora de 2,265 pb estudiada en este trabajo parece contener elementos en *cis* necesarios para mimetizar el comportamiento del promotor endógeno, dado que hay una correlación, si bien no del todo perfecta, entre dicho comportamiento y la cantidad de ARNm de betaglicano, al menos en las tres líneas celulares en las que se averiguó el comportamiento del promotor: fibroblastos de rata Rat-1, mioblastos de rata L₆E₉ y

mioblastos de ratón C₂C₁₂, aunque en estos últimos no se averiguó si los cambios en la actividad del promotor inducidos por diversos agentes son paralelos a cambios en los niveles del ARNm del betaglicano.

Función del betaglicano en los mioblastos C₂C₁₂ y estimación de su función en los miotubos con respecto a TGF- β

En mioblastos, el betaglicano favorece la señalización por TGF- β , dado que al transducirlos con un adenovirus que los hace expresar betaglicano y tratarlos con TGF- β , estas células tienen una mayor inducción del reportero p3TP-Lux, respondiente a TGF- β , en relación con las que portan el adenovirus vacío. Pero, ¿cómo conciliar que durante la miogénesis esté aumentando la expresión del betaglicano en la superficie y por ende, que el TGF- β , siendo un potente regulador negativo de la miogénesis, esté siendo presentado más intensamente a sus receptores cuando aparentemente se requeriría de su ausencia para que se lleve a cabo la diferenciación miogénica? Una situación parecida ocurre con la decorina: aunque ésta se encarga de favorecer la presentación de TGF- β a sus receptores señalizadores en mioblastos, su expresión durante la miogénesis aumenta, a pesar de que se podría pensar que su función debería ser mermada. La expresión de la decorina por mioblastos es relevante, dado que si se inhibe su expresión, empiezan a producir el ARNm de la miogenina aun en medio de crecimiento (Riquelme *et al.*, 2001).

Al respecto, se sabe, sin embargo, que la señalización por TGF- β es *conditio sine qua non* la formación de músculo esquelético no ocurre. Mioblastos C₂C₁₂ transfectados establemente con una versión dominante negativa del receptor II de TGF- β no se diferencian morfológica ni bioquímicamente, ya que son incapaces de formar eficientemente miotubos, además de que en ellos no se induce la expresión de los marcadores de diferenciación MyoD, miogenina, cadenas ligeras 1, 2 y 3 y pesada de la miosina y troponina T ante la incubación en medio bajo en suero; empero, hay algunos marcadores cuya inducción o supresión no se ve afectada, como la de la cadena α del receptor de acetilcolina y la de la proteína Id, respectivamente, lo cual indica que hay varias vías de señalización involucradas en la diferenciación mioblástica, una de las cuales es modulada por TGF- β . La vía de señalización de TGF- β se requiere no sólo para que pueda subir la expresión de marcadores de diferenciación miogénica, sino también para mantener la expresión basal de MyoD y de miogenina en mioblastos. Además, los mioblastos con T β RII dominante negativo son incapaces de incorporarse a fibras musculares *in vivo*, lo cual indica que la magnitud del bloqueo en su programa de diferenciación es tal que el ambiente *in vivo* no alcanza a contrarrestarlo (Filvaroff *et al.*, 1994). De forma semejante, la señalización por FGFs a través del receptor FGFR4 se requiere para que haya diferenciación miogénica *in vivo*, a pesar de ser bFGF un supresor de este proceso *in vitro* (Marics *et al.*, 2002). Es posible que las tres isoformas de TGF- β estén involucradas en el proceso de diferenciación, dado que existe una compleja regulación de la expresión de las mismas durante la miogénesis: mientras que aumenta la expresión del ARNm de TGF- β 3 (8.7 veces) y la de TGF- β 2, la de TGF- β 1, prominente en mioblastos, disminuye un 50% (Lafyatis *et al.*, 1991). El IGF-I, un promotor de la diferenciación miogénica una vez que ésta se ha disparado, baja la expresión de TGF- β 1 y de TGF- β 3 a las 48 horas de haberlo aplicado a mioblastos L₆A₁ (Bosche *et al.*, 1995). Esta regulación de la expresión de las isoformas de TGF- β probablemente conduce una estimulación autocrina a lo largo de diversos estadios de este proceso de diferenciación celular.

Durante la miogénesis, el betaglicano, además de expresarse abundantemente en la membrana celular de miotubos, se transloca abundantemente hacia la matriz extracelular. Es posible que parte del TGF- β que producen los miotubos quede retenido en la matriz extracelular en parte por el betaglicano y que no necesariamente se active para señalar, ¿será posible que a medida que los mioblastos se comienzan a diferenciar y que empiezan a expresar betaglicano, éste tenga un papel más bien como ocultador de TGF- β , a diferencia de la actividad que se encontró en los mioblastos?

Otra observación que encontramos interesante es el cambio en la movilidad del proteoglicano del betaglicano al día 6. Aunque no se les ha asignado una función a las cadenas de glicosaminoglicanos del betaglicano, se encuentra un par de artículos que provee pistas sobre las posibles funciones de estas cadenas. En células de cáncer de colon, se observó que el betaglicano pobremente modificado postraduccionalmente se modifica grandemente cuando estas células se transfectan con una versión mutante de Ki-Ras, y además, estas células, que inicialmente eran insensibles a TGF- β 1, se vuelven sensibles a este factor de crecimiento. Es posible que este betaglicano abundantemente modificado sea el que restaure la sensibilidad de las células de cáncer de colon al TGF- β 1 (Yan *et al.*, 2001). Aunque los autores especulan sobre la posibilidad de que la naturaleza de estas modificaciones sea glicosilación, no se descarta la posibilidad de que sea glicanación, de acuerdo a lo que se aprecia en la movilidad de las bandas del betaglicano en geles, que no se ve grandemente afectada cuando tratan a las células con glicosilasas. Por otra parte, se observó en células epiteliales de riñón que una forma abundantemente glicanada –aunque no se sabe si de cadenas más largas de sulfato de heparano, de condrotina o de ambos– del betaglicano inhibe, a diferencia de la forma pobremente glicanada, la formación del complejo T β RII-T β RI, y por lo tanto bloquea la señalización corriente abajo por TGF- β (Eickelberg *et al.*, 2002). El betaglicano se presenta altamente glicanado también en células preosteoblásticas de hueso parietal de rata, pero una vez que se diferencian a osteoblastos, la población de moléculas de betaglicano disminuye y vira hacia una forma menos glicanada, todo lo cual, al parecer, es responsable en parte de la sensibilización de los osteoblastos al TGF- β (Centrella *et al.*, 1995). Por lo tanto, es posible que el cambio en la movilidad del proteoglicano del betaglicano durante la miogénesis tenga un significado fisiológico con relación al TGF- β . Se cuenta con ejemplos de otros proteoglicanos cuyos glicosaminoglicanos (GAGs) experimentan cambios en su longitud: en células de músculo liso arterial, los GAGs de la decorina –de sulfatos de condroitina y dermatano– aumentan de tamaño ante la estimulación con ácido linoleico, un ácido graso que circula en grandes cantidades en personas con resistencia a la insulina y en personas con diabetes tipo 2 (Olsson *et al.*, 1999). Durante el desarrollo neuronal, un proteoglicano particular de sulfatos de heparano potencia a FGF-2 mientras se da la proliferación neuronal, pero le concede rápidamente esta potenciación a FGF-1 una vez que comienza la diferenciación neuronal (Brickman *et al.*, 1998). En células endoteliales de córnea, bFGF –específicamente– induce cambios en la estructura de moléculas de sulfato de heparano (Schmidt *et al.*, 1995), mientras que en cartílago articular, TGF- β 1 e IL-1 β modifican el grado de sulfatación de GAGs de condroitina, lo cual sugiere que dichas citocinas interfieren con la actividad o la síntesis de sulfotransferasas involucradas en el recambio de GAGs (Zanni *et al.*, 1995).

Por lo tanto, en la miogénesis, cuando se eleva su expresión, el betaglicano podría funcionar como potenciador de la señalización por TGF- β 2 o TGF- β 3. No obstante, la presencia en mioblastos C₂C₁₂ de T β RII-B, la isoforma de T β RII capaz de unir TGF- β 2 –

sin necesidad de betaglicano—, TGF- β 1 y TGF- β 3 y transducir sus señales a través de Smads, complica más el panorama, dado que este receptor generado por empalme alterno también ve elevada su expresión durante la miogénesis (Rotzer *et al.*, 2001), al igual que la ve elevada la decorina, que también potencia la señalización por TGF- β (Riquelme *et al.*, 2001). Por otro lado, en la miogénesis, el betaglicano podría actuar como represor de la señalización por TGF- β 1, cuya expresión decae un 50% (Lafyatis *et al.*, 1991), en función de la longitud de las cadenas de glicosaminoglicanos que posee, considerando que si la proteína de TGF- β 1 se añade a los mioblastos, inhibe su diferenciación bioquímica y su fusión. Sin embargo, es difícil sostener que el betaglicano pueda tener funciones particulares, contrarias entre sí, en función de la isoforma de TGF- β que esté uniendo. No obstante, experimentos de saturación por marcado por afinidad y de competencia han arrojado que en células trofoblásticas en cultivo primario hay dos poblaciones de betaglicano: una de capacidad baja y afinidad alta que une TGF- β 1 y TGF- β 2, aunque prefiere unir TGF- β 2, y otra de mayor capacidad y menor afinidad que une solamente TGF- β 1, en contraste con la población homogénea que existe en células mesenquimatosas de placenta, que despliega capacidad y afinidad similares para ambas isoformas (Mitchell *et al.*, 1992). Se ha hallado que bFGF, un factor de crecimiento que se une a las cadenas de sulfato de heparano del betaglicano, tiene la facultad de acortar, en un periodo de 48 horas, la longitud de estas cadenas en osteoblastos (Andres *et al.*, 1992). En concordancia con estas observaciones, durante la miogénesis, el cese de la señalización por bFGF podría, además de dejar de impedir la diferenciación, ocasionar el alargamiento de las cadenas de sulfato de heparano del betaglicano, con lo cual se podría estar entorpeciendo la señalización por TGF- β , aunque también es cierto que no se sabe aún si son cadenas más largas de sulfato de heparano, de condroitina o de ambas en el betaglicano las que impiden esta señalización. Otra posibilidad es que el betaglicano forme parte de un mecanismo “dosificador” encargado de mantener la señalización por TGF- β debajo de un umbral, de modo que no llegue a ser tan abrumadora ni tan escasa que en cualquiera de los casos llegue a impedir la diferenciación miogénica.

Por lo tanto, aunque el betaglicano esté funcionando como presentador de TGF- β ante sus receptores de señalización en mioblastos, no podemos extrapolar esta función a miotubos, ya que en ellos no solamente hay más betaglicano transmembranal y con un patrón de glicanación diferente, sino que también hay más betaglicano soluble en la matriz extracelular. En vista de que el *knock-out* del betaglicano aparentemente no tiene defectos musculares esqueléticos, es probable que la ausencia del betaglicano en dicho tejido esté siendo compensada por otras moléculas, posiblemente otros proteoglicanos, cuya función sea redundante a la del betaglicano.

8. Conclusiones

1. La diferenciación de los mioblastos C₂C₁₂ a miotubos está acompañada de una elevación en la expresión de betaglicano en la superficie celular (con un patrón de glicanación mayor) y en la matriz extracelular.
2. Esta elevación es detectable también a nivel de ARNm.
3. Se logró clonar el promotor del betaglicano y conocer su secuencia.

4. La elevación en el nivel de ARNm del betaglicano se debe al menos en parte a una actividad incrementada del promotor del gen.
5. Se logró demostrar la actividad del promotor del betaglicano en células Rat-1 y L₆E₉, habiéndose encontrado un nivel de actividad paralelo al nivel de expresión del ARNm, por lo que es probable que el fragmento promotor de 2.3 kb mimetice el comportamiento del gen endógeno.
6. Se logró demostrar que el TGF- β y el ácido retinoico regulan la actividad del promotor del betaglicano. Consistentemente, mediante el uso del *software MatInspector*, se lograron detectar elementos en *cis* en el promotor que presuntamente unen los factores Smad3, Smad4 y RAR.
7. MyoD incrementa la actividad del promotor, probablemente de manera directa, lo cual puede ser en parte responsable del gran aumento que sufre la expresión del betaglicano durante la miogénesis.

9. Perspectivas

Las perspectivas de los resultados del presente trabajo de tesis son:

1. Determinar la función del betaglicano a lo largo de la miogénesis. Esto se puede lograr potenciando o inhibiendo la expresión del betaglicano en mioblastos. Con la potenciación (*e.g.*, con la construcción Adv-BG), se vería cuál es la consecuencia de la expresión abundante y *ab origine* de betaglicano en mioblastos al diferenciarse. Con la inhibición (*v.g.*, con el uso de una construcción que exprese bajo el control de un promotor regulable por tetraciclina un ARNm en contrasentido de betaglicano), ver si esto altera el proceso de diferenciación de los mioblastos o la viabilidad de los miotubos.
2. Gracias a la clonación del promotor del betaglicano, se facilitaría sobremanera el esclarecimiento de cuestiones como las siguientes. Durante el desarrollo cardiaco murino, la expresión del betaglicano aumenta dramáticamente en el miocardio ventricular del E8.5 al E11.5, concretamente en los cardiomiocitos trabeculantes y no en los miocitos subepicardiacos. Cuando hay ausencia del betaglicano en este tejido, sobrevienen paredes ventriculares patológicamente delgadas y defectos en el tabique interventricular (Stenvers *et al.*, 2003). Por lo tanto, sería interesante ver qué elementos en el promotor del betaglicano causan una elevación drástica en la expresión del betaglicano durante este proceso de desarrollo.
3. El hígado en formación es otro de los órganos en los que súbitamente la expresión del betaglicano se dispara notablemente (Stenvers *et al.*, 2003), pero en animales adultos queda silenciada (salvo contingencias como daño hepático). Por tanto, en este modelo de desarrollo también sería interesante ver qué elementos del promotor se encargan de prender repentina y fuertemente la expresión del betaglicano y luego de apagarla permanentemente.

Pero además, a título personal, hay otras perspectivas que no se derivan de los resultados de esta tesis pero que constituyen interrogantes importantes con respecto a la biología de esta molécula *affascinante*:

1. Dado que la evidencia sugiere que no es la vía de TGF- β ni la de la activina-BMPs-inhibina la que está afectada en el defecto hepático que abruma a los ratones *knock-out* de betaglicano, sería importante precisar en qué vía de señalización está involucrado de manera crucial el betaglicano.
2. Determinar la función de los evasivos GAGs del betaglicano durante organogénesis.
4. En cuanto a los transcritos alternos misteriosos, ¿cuál es su función?; el de testículo y/o el de hipófisis: ¿podrían ser receptores señalizadores de inhibina sobre los que tanta expectativa se tiene de su existencia (Bernard *et al.*, 2002; Farnworth *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2001; Matzuk, 2000)?
5. Determinar si el betaglicano es necesario –posteriormente a su papel crítico en hepatogénesis y cardiogénesis– en más eventos de desarrollo.

ANEXO I.

Familia/matriz	Factor de transcripción	Posición	Matrix similarity	Subsecuencia del promotor y hebra
c-Myb	c-Myb, importante en hematopoyesis	20 - 32	0.959	caCAACtgcactt-
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	70 - 80	0.970	tcagGAAaaca-
MyoD/E47	Dímeros TAL1/E47	85 - 99	0.939	gacaCAGGtgactg+
AREB6	AREB6 (<i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i>)	86 - 98	0.964	cgtaCACCTgtg-
HEAT/HSF1	<i>Heat shock factor 1</i>	113 - 123	0.963	GGAAgttct-
HEAT/HSF1	<i>Heat shock factor 1</i>	114 - 124	0.952	GGAAcattcca+
Stat6	Stat6: <i>signal transducer and activator of transcription 6</i>	115 - 133	0.885	gaacaTTCactgaagcag+
TEAF/TEF1	Factor muscular relacionado con TEF-1	116 - 128	0.968	aaCATTccactga+
NKXH/HMX3	HMX3 de homeodominio H6/Nkx5.1	134 - 146	0.923	acacAAGTgagag+
GREF/PRE	<i>Progesterone response element</i>	138 - 156	0.902	aagtgagaggaTGTTctgc+
CP2	CP2	149 - 167	0.912	tgCTTccttagcagaaca-
EBOX/USF	<i>Upstream stimulating factor</i>	161 - 175	0.988	cttCACGtgcctgc-
HIFF/ARNT	Homodímeros del translocador nuclear AhR	161 - 175	0.956	gcaagcaCGTGaaag+
EBOX/USF	<i>Upstream stimulating factor</i>	162 - 176	0.988	caagCACGgaaagg+
HIFF/ARNT	Homodímeros del translocador nuclear AhR	162 - 176	0.955	ccttcaCGTgctg-
MIT	<i>Microphthalmia</i> , factor de transcripción de melanocitos	171 - 189	0.877	gaaaggaCATGtataaaa+
p53	Supresor de tumores p53 (hemisito 5')	174 - 194	0.911	gaatctttatcaCATGtct-
Cdx-2	Factor de transcripción intestinal Cdx-2 de mamíferos relacionado con Caudal	177 - 195	0.899	agaatctTTTAtcacatg-
GATA1	Factor 1 de unión a GATA	179 - 191	0.952	atgtGATAaaaaga+
ECAT/NFY	<i>Nuclear factor Y (Y-box binding factor)</i>	214 - 224	0.903	ggaCCAAtata-
OCT1P	Factor 1 de unión al octámero con dominio específico POU	232 - 244	0.883	tcaactATGCAat-
NEUROG	Sitios de unión de neurogeninas 1 y 3 (ngn1/3)	245 - 257	0.934	gctCCATttgca+
LEF1	TCF/LEF-1, involucrado en la vía de señalización de Wnts	257 - 273	0.994	aggacttCAAAGagagaga+
CHR	<i>Cell cycle gene homology region</i> (elementos CDE/CHR contiguos regulan la represión dependiente del ciclo celular)	258 - 270	0.930	ctctTTGAagtc-
AREB6	AREB6 (<i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i>)	270 - 278	0.976	gtGTTTct-
MyT1	Factor MyT1 con dedos de zinc, involucrado en neurogénesis primaria	281 - 293	0.881	cctAAGTttctg-
AHRARNT	Heterodímero <i>Aryl hydrocarbon receptor / Ahr1</i>	286 - 308	0.941	aaactaggtggCGTGacacagtt+
PBX1/MEIS1	Heterodímero Pbx1/Meis1	330 - 346	0.978	gggcTGATgacagagtt+
TALE/TGIF	Factor de interacción con TG y perteneciente a la clase TALE de factores homeóticos	336 - 342	1.000	tGTCaat-
AP4	<i>Activator protein 4</i>	346 - 362	0.977	tgctCAGCtgacatca-
AP4	<i>Activator protein 4</i>	347 - 363	0.974	gatgtCAGCtgagacag+
EBOX/USF	<i>Upstream stimulating factor</i>	362 - 376	0.988	tcagCACGtgactgct-
HIF1	<i>Hypoxia inducible factor</i> , de la familia proteica bHLH / PAS	362 - 376	0.991	agactcaCGTGctga+
EBOX/USF	<i>Upstream stimulating factor</i>	363 - 377	0.988	gactCACGtgctgag+
HIFF/ARNT	Homodímeros del translocador nuclear AhR	363 - 377	0.944	ctcagcaCGTGagtc-
AP1R/NFE2	NF-E2 p45	365 - 389	0.895	cacaggtctgctccTCAGCacgtgag-
CEBP	CCAAT/enhancer binding protein	370 - 384	0.922	gtgctgagGCAAgac+
Smad4	Factor Smad4, involucrado en la señalización por TGF-β	376 - 384	0.947	GTCtTgct-
MZF1	<i>Myeloid zinc finger protein</i>	387 - 393	1.000	gtGGGGa+
MAZ	<i>Myc-associated zinc finger protein</i>	388 - 400	0.900	tgggGAGGcaaga+
Smad4	Factor Smad4, involucrado en la señalización por TGF-β	393 - 401	0.947	GTCtTgct-
CHR	<i>Cell cycle gene homology region</i> (elementos CDE/CHR contiguos regulan la represión dependiente del ciclo celular)	418 - 430	0.953	gcgtTTGAagggt+
Nkxh/Nkx3.1	Homeoproteína específica de próstata Nkx3.1	429 - 441	0.935	gtataAGTaaaac+
SORY/Sox5	Sox-5	463 - 479	0.987	ataaaCAATcctagcta-
MEF2/MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>	466 - 488	0.979	gctagctctaTAAcaatcctag-
TBPF/TATA	Elementos celulares y virales tipo caja TATA	467 - 483	0.921	ctctaTAAcaatccta-
FKHD/XFD2	<i>Xenopus fork head domain factor 2 (Foxl1a)</i>	468 - 484	0.978	gctctaTAAcaatcct-
HFN/HFH8	HNF-3 (<i>hepatocyte-nuclear factor-3</i>) / <i>Fkh homolog-8</i>	470 - 482	0.959	gatTGTtataga+
MyT1L	<i>Myelin transcription factor 1-like</i> , factor 1 neuronal C2HC con dedos de zinc	548 - 560	0.921	tgagAGCTtctcc+
TEAF/TEF1	Factor muscular relacionado con TEF-1	562 - 574	0.934	gaCATTcctgttg+
MyoD/Myf5	Proteína bHLH miogénica Myf5	577 - 591	0.957	tcagCAGCagcaggg-
AREB6	AREB6 (<i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i>)	602 - 614	1.000	tggctGTTTctgc+
E2TF/E2	Regulador E2 del virus del Papiloma	623 - 639	0.902	aatcaacagCGGTggc-
FAST1	FAST-1: proteína de interacción con Smad2	628 - 642	0.891	cgctgtGATTgtg+
FKHD/XFD3	<i>Xenopus fork head domain factor 3 (FoxA2a)</i>	636 - 652	0.884	ggatagtcAACaacaat-

PXRF/PXRCAR	Hemisitio del heterodímero PXR (<i>pregnane X receptor</i>)/RXR ó sitio del CAR (<i>constitutive androstane receptor</i>)/RXR	660 - 670	0.992	acTGAActca+
Pax8	Pax 2/5/8	676 - 688	0.929	ctgTGAAGgttt+
MyT1L	<i>Myelin transcription factor 1-like</i> , factor 1 neuronal C2HC con dedos de zinc	696 - 708	0.930	agacAGTTggal-
c-Myb	c-Myb, importante en hematopoyesis	698 - 710	0.988	tcCAACTgtctct+
CHR	<i>Cell cycle gene homology region</i> (elementos CDE/CHR contiguos regulan la represión dependiente del ciclo celular)	706 - 718	0.931	aggtTTGAagaga-
RAR β /RAR	Receptor de ácido retinoico	716 - 725	0.964	agtTCACagg-
AP4R/TH1E47	Heterodímero Thing1/E47, TH1 es de dominio bHLH y se expresa específicamente en varios tejidos embrionarios	732 - 748	0.942	cagattCCAGacaaca+
AP4R/TAL1 β /E47	Heterodímero Tal-1 β /E47	744 - 760	0.885	caacaCAGAtgggagtt+
NEUROG	Sitios de unión de neurogeninas 1 y 3 (<i>ngn1/3</i>)	746 - 758	0.945	ctcCCAATctgtgt-
MOK2	Proteína humana de dedos de zinc asociada a ribonucleoproteínas	759 - 779	0.985	ttgtccaaagaaCCTTtcta+
MEF2/MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>	768 - 790	0.961	agaaccttcTAAAcaggctact+
CEBP β	CCAAT/enhancer binding protein β	771 - 785	0.941	cctgttaGAAAaggt-
GATA1	Factor 1 de unión a GATA	793 - 806	0.953	caaagGATAtgggg-
BARBIE	<i>Barbiturate-inducible element</i>	795 - 809	0.891	aaccAAAGgataagg-
LEF1	TCF/LEF-1, involucrado en la vía de señalización de Wnts	797 - 813	0.885	gaaaaccCAAAGgatat-
NF κ B/c-Rel	c-Rel	803 - 817	0.952	ttggttTTCctac+
CIZF/NMP4	NMP4 (<i>nuclear matrix protein 4</i>) / CIZ (<i>Cas-interacting zinc finger protein</i>)	804 - 814	0.985	ggAAAaaccaa-
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	807 - 817	0.982	glagGAAAaac-
FKHD/Freac-2	<i>Fork head related activator-2 (FOXF2)</i>	850 - 866	0.888	gttctTAAAcactta-
AREB6	AREB6 (<i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i>)	859 - 871	0.983	atgatGTTTctta-
MEF2/MMEF2	<i>Myocyte enhancer factor</i>	864 - 886	0.932	aacatcatTAAaAataggctta+
BRN2	Brain-2 (N-Oct 3), específico de neuroectodermo	867 - 883	0.962	atcataaAAATaggct+
MEF2/MEF2	<i>Myocyte enhancer factor</i>	875 - 897	1.000	aaataggctTAAAaactaaaa+
TBPF/TATA	Caja TATA tipo LTR-C de mamíferos	880 - 896	0.908	ggctTAAAaactaaa+
MyT1	Factor de transcripción MyT1 con dedos de zinc involucrado en neurogénesis primaria	884 - 896	0.889	tttAAGTtttaa-
NKXH/Nkx3.1	Homeoproteína específica de próstata Nkx3.1	885 - 897	0.877	ttttAAGTttta-
CEBP β	CCAAT/enhancer binding protein β	895 - 909	0.948	agactttGTAAtti-
MOK2	Proteína humana de dedos de zinc asociada a ribonucleoproteínas	928 - 948	0.985	gatcgtcagggaaCCTTtgca-
AP4	<i>Activator protein 4</i>	946 - 962	0.970	cttgaCAGCtgctggat-
MyoD/Myf5	Proteína bHLH miogénica Myf5	947 - 961	0.932	ttgaCAGCtgctgga-
MyoD/MyoD	<i>Myoblast determining factor</i>	948 - 962	0.986	ccagCAGCtgctcaag+
MEIS1	Homeoproteína Meis1 monomérica	953 - 961	0.998	ttGACAgct-
Pax8	Pax 2/5/8	955 - 967	0.900	ctgTCAAgactgg+
Smad4	Factor Smad4, involucrado en la señalización por TGF- β	956 - 964	0.940	GTCTTgaca-
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	963 - 973	0.970	actgGAAActt+
MyT1	Factor de transcripción MyT1 con dedos de zinc involucrado en neurogénesis primaria	964 - 976	0.880	gacAAGTtccag-
p53	Supresor de tumores p53 (hemisitio 3')	967 - 987	0.954	tctgggtcaaagaCAAGtttc-
LEF1	TCF/LEF-1, involucrado en la vía de señalización de Wnts	971 - 987	0.978	tctgggtCAAAGacaag-
CHR	<i>Cell cycle gene homology region</i> (elementos CDE/CHR contiguos regulan la represión dependiente del ciclo celular)	974 - 986	0.934	gtctTTGAaccag+
AP4R/TH1E47	Heterodímero Thing1/E47, TH1 es de dominio bHLH y se expresa específicamente en varios tejidos embrionarios	976 - 992	0.935	cttgaaCCAGacactt+
Smad3	Factor Smad3, involucrado en la señalización por TGF- β	980 - 988	0.997	GTCTgggttc-
AP1	<i>Activator protein 1 (Jun-Fos)</i>	990 - 1000	0.986	agTGACTgaag-
AP4R/TAL1 β /ITF2	Heterodímero Tal-1 β /ITF-2	996 - 1012	0.929	cacaaCAGAtggagtgga-
NEUROG	Sitios de unión de neurogeninas 1 y 3 (<i>ngn1/3</i>)	998 - 1010	0.970	actCCATctgtgtg+
MyoD/MyoD	<i>Myoblast determination gene product</i>	1009 - 1023	0.923	tctaCAGGtggcaca-
Stat6	Stat6: <i>signal transducer and activator of transcription 6</i>	1021 - 1039	0.952	agagtTTCcgtgaaagtaa+
VBP	<i>Vitellogenin promoter-binding protein</i> tipo PAR de pollo	1030 - 1040	0.903	gTTACTtcacg-
AP1	<i>Activator protein 1 (Jun-Fos)</i>	1043 - 1053	0.962	ggTGACagaat+
GATA	Factor de unión a la secuencia GATA	1055 - 1067	0.930	catgGATAaaggt+
MOK2	Proteína humana de dedos de zinc asociada a ribonucleoproteínas	1059 - 1079	0.985	ttggcagcaagcaCCTTtact-
NF1	<i>Nuclear factor 1</i>	1063 - 1081	0.947	ggtTGGCagcaagcacctt-
SRF	<i>Serum response factor</i>	1091 - 1109	0.900	tgcaCCAAagatggattct+
TTF1	Thyroid transcription factor-1 (TTF1) binding site	1113 - 1127	0.933	ttctCAAGtagggc-
MyT1L	<i>Myelin transcription factor 1-like</i> , factor 1 neuronal C2HC con dedos de zinc	1131 - 1143	0.986	agaaAGTgtctt+

RORA/ROR α 1	<i>RAR-related orphan receptor α1</i>	1140 - 1156	0.940	gagtagaGGTCagaaga-
RARF/RAR	Receptor de ácido retinoico	1142- 1151	0.961	aggTCAGaag-
PXR/PXRCAR	Hemisitio del heterodimero PXR (<i>pregnane X receptor</i>)/RXR ó sitio del CAR (<i>constitutive androstane receptor</i>)/RXR	1171 - 1181	0.993	tcTGAActgt+
HAML/AML1	Acute myeloid leukemia-1 (Runx-1), factor hemapoyético	1208 - 1213	1.000	tgTGGT+
ECAT/NFY	<i>Nuclear factor Y (Y-box binding factor)</i>	1272 - 1286	0.907	agccCAAatgggcaa+
AREB6	AREB6 (<i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i>)	1285 - 1297	0.972	aattCACcttta+
BARBIE	<i>Barbiturate-inducible element</i>	1285 - 1299	0.881	attaAAAGgtgaatt-
Cdx-1	Homeoproteína específica de intestino Cdx-1	1287 - 1305	0.953	ttcacctTTTAtagaaag+
Pax6	Pax-6, inductor de ojos	1300 - 1318	0.951	tgttACGCctcattct-
FKHD/Freac-2	<i>Fork head related activator-2 (FOXF2)</i>	1307 - 1323	0.957	gaagcgTAAAcagtgcc+
Pax6	Se requiere del dominio apareado de Pax6 y de un homeodominio para la unión a este sitio	1313 - 1331	0.893	taaacagtgCCAGattgt+
AP1	<i>Activator protein 1 (Jun-Fos)</i>	1335 - 1345	0.987	ggTGACTgaag+
EKLF	<i>Erythroid Krüppel-like factor</i>	1386 - 1398	0.925	gcacacaGGGTcc-
GATA1	Factor 1 de unión a GATA	1399 - 1411	0.961	acagGATAgggca-
MZF1	<i>Myeloid zinc finger protein</i>	1424 - 1430	0.985	gcGGGGa+
AREB6	AREB6 (<i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i>)	1426 - 1438	0.982	ctacgGTTTcccc-
TEAF/TEF1	Factor muscular relacionado con TEF-1	1433 - 1445	0.896	tcCATTCctcagcg-
OCTB/TST1	Factor POU Tst-1/Oct-6	1438 - 1452	0.877	gctgAATTccattcc-
AP4	<i>Activator protein 4</i>	1447 - 1463	0.970	ttcagCAGCtggagaag+
MyoD/Myf5	Proteína bHLH miogénica Myf5	1447 - 1461	0.920	ttctCAGCtgcgtgaa-
MyoD/Myf5	Proteína bHLH miogénica Myf5	1448 - 1462	0.957	tcagCAGCtggagaag+
OCTB/TST1	Factor POU Tst-1/Oct-6	1464 - 1478	0.979	gctgAATTaaagtg-
RBIT/BRIGHT	<i>Bright</i> , regulador de la transcripción de IgH en linfocitos B	1466 - 1478	0.952	gctgaATTAaagt-
NKXH/Msx	Homeoproteínas Msx-1 y Msx-2	1467 - 1479	0.977	cttTAATcagca+
HMYO/Nkx2.5	Homeoproteína Nkx2.5/Csx, homólogo de Tinman	1469 - 1476	0.874	gaATTAaa-
AP4	<i>Activator protein 4</i>	1473 - 1489	0.970	ttcagCAGCtggagaag+
MyoD/Myf5	Proteína bHLH miogénica Myf5	1473 - 1487	0.920	ttctCAGCtgcgtgaa-
MyoD/Myf5	Proteína bHLH miogénica Myf5	1474 - 1488	0.957	tcagCAGCtggagaag+
LEF1	TCF/LEF-1, involucrado en la vía de señalización de Wnts	1488 - 1504	0.950	cctagctCAAAGtgcc-
RORA/ER	Receptor de estrógenos	1515 - 1533	0.898	tgTGTCAGggctcttac-
HAML/AML1	Acute myeloid leukemia-1 (Runx-1), factor hemapoyético	1528 - 1533	1.000	tgTGGT-
HAML/AML1	Acute myeloid leukemia-1 (Runx-1), factor hemapoyético	1533 - 1538	1.000	tgTGGT-
GATA1	Factor 1 de unión a GATA	1548 - 1560	0.998	tttaGATaaccga+
IRFF1/SRE	<i>Interferon-stimulated response element</i>	1551 - 1569	0.882	agataaccGAAActggaga+
RBPf/RBPJk	Represor transcripcional de mamíferos RBP-Jk/CBF1	1611 - 1625	0.957	gatgTGGGaatgggt+
IKRS/IK2	Ikaros 2, regulador potencial de la diferenciación linfocitaria	1612 - 1624	0.983	atgtGGGAatggg+
GFI1	<i>Growth factor independence 1</i>	1623 - 1646	0.937	ttaaaaaaAATCtcagagaaccc-
AREB6	AREB6 (<i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i>)	1623 - 1631	0.970	ggGTTTctc+
MEF2/MEF2	<i>Myocyte enhancer factor</i>	1632 - 1654	0.967	aaaatcctTAAaaaaaatct-
TBPF/TATA	Caja TATA tipo LTR-C de mamíferos	1633 - 1649	0.910	tcctTAAaaaaaatct-
Stat	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>	1637 - 1655	0.914	ttttttaaGGAAtttt+
MEF2/MEF2	<i>Myocyte enhancer factor</i>	1644 - 1666	0.968	gttggtgataTAAaaatctt-
TBPF/TATA	Elementos celulares y virales tipo caja TATA	1645 - 1661	0.960	tgataTAAaaatctt-
FKHD/XFD2	<i>Xenopus fork head domain factor 2 (Foxl1a)</i>	1646 - 1662	0.890	ttgataTAAaaatctt-
HMTB/MTBF	Sitio de unión de MT específico de músculo	1646 - 1654	0.901	aggaATTT+
Cdx-2	Factor de transcripción intestinal Cdx-2 de mamíferos relacionado con Caudal	1670 - 1688	0.900	agatagtTTTAttggattc-
ECAT/NFY	<i>Nuclear factor Y (Y-box binding factor)</i>	1670 - 1684	0.910	gaatCCAAtaaact+
PCAT/CAAT	Caja CCAAT celular y viral	1670 - 1680	0.924	gaatCCAAtaa+
TBPF/TATA	Caja TATA tipo LTR-C de mamíferos	1673 - 1689	0.925	tccaaTAAaactatctt+
MyT1L	<i>Myelin transcription factor 1-like</i> , factor 1 neuronal C2HC con dedos de zinc	1676 - 1688	0.944	agatAGTTttatt-
EVI1	<i>Ecotropic viral integration site 1 encoded factor</i>	1682 - 1698	0.900	ccttaggagAAGAtagt-
MOK2	Proteína humana de dedos de zinc asociada a ribonucleoproteínas	1691 - 1711	0.992	caaactaccagggCCTtagga-
CHR	<i>Cell cycle gene homology region</i> (elementos CDE/CHR contiguos regulan la represión dependiente del ciclo celular)	1705 - 1717	0.930	tagtTTGAaggat+
ZF5	Factor de transcripción de dedos de zinc y dominio POZ	1744 - 1754	0.996	gtgcGCGCcac+
Pax6	Se requiere del dominio apareado de Pax6 y de un homeodominio para la unión a este sitio	1769 - 1787	0.905	acactcttCCAGgccggg+
NF κ B/NF κ B50	NF- κ B (p50)	1783 - 1797	0.969	ccGGGGatgccagc+
AP4	<i>Activator protein 4</i>	1788 - 1804	0.976	gatgaCAGCtgggcatc-
MEIS1	Homeoproteína Meis1 monomérica	1795 - 1803	0.997	atGACAgct-

ZBP89	Zinc finger transcription factor ZBP-89	1815 - 1837	0.981	ccgaacccccCCCccccacac+
MAZR	MAZ-related transcription factor	1817 - 1829	0.963	ggggggGGGGttc-
ZBP89	Zinc finger transcription factor ZBP-89	1818 - 1840	0.984	aaccccccccCCCccccacaca+
MAZR	MAZ-related transcription factor	1821 - 1833	0.947	ggggggGGGGggg-
EGRF/WT1	Wilms Tumor Suppressor	1825 - 1839	0.945	gtgtGTGGGggggg-
ETS1	c-Ets-1	1848 - 1864	0.950	tagaaAGGAagtcgggt-
CDPCR3HD	Cut-like homeodomain protein	1927 - 1936	0.939	gatgGATGag-
VDRF/VDR RXR	Sitio del heterodimero VDR/RXR	1942 - 1956	0.884	tggaggagGAGGaga+
MAZ	Myc-associated zinc finger protein	1945 - 1957	0.939	ggagGAGGagagg+
MAZ	Myc-associated zinc finger protein	1953 - 1965	0.909	agagGAGGggcag+
ZBP89	Zinc finger transcription factor ZBP-89	2004 - 2026	0.940	cggtgccttCCCCcttctgct+
ETSF/GABP	GA binding protein	2005 - 2021	0.904	aaggggGAAagggcacc-
GKLF	Gut-enriched Krüppel-like factor	2008 - 2022	0.938	aaaggggggaAGGGc-
MZF1	Myeloid zinc finger protein	2013 - 2019	0.990	ggGGGga-
ZF5	Factor de transcripción de dedos de zinc y dominio POZ	2037 - 2047	0.950	gggcGCGCagc-
ZF5	Factor de transcripción de dedos de zinc y dominio POZ	2038 - 2048	0.965	ctgcGCGCccg+
ZBPF/ZF9	Core promoter-binding protein (CPBP) con 3 dedos de zinc tipo Krüppel	2045 - 2067	0.882	cccgaccCGCcccgcggtgct+
MAZR	MAZ-related transcription factor	2047 - 2059	0.901	gcgggcGGGtGc-
SP1F/SP1	Stimulating protein 1, factor de transcripción con dedos de zinc ubicuo	2047 - 2061	0.953	gcgcgGGCGgggtcg-
EBOX/NMYC	N-Myc	2057 - 2068	0.891	ccgcgCGTGtgc+
ZF5	Factor de transcripción de dedos de zinc y dominio POZ	2062 - 2072	0.994	gtgtGCGCggc+
GABF/GAGA	Caja GAGA	2158 - 2182	0.923	gagagAGAGagaggtggagaggag+
NKXH/HMX3	HMX3 de homeodominio H6/Nkx5.1	2203 - 2215	0.890	gcgaAAGTggcct-
CDEF/CDE	Cell cycle-dependent element, CDF-1 binding site (elementos CDE/CHR contiguos regulan la represión dependiente del ciclo celular)	2214 - 2226	0.898	gctgCGCGattcc+
NFκB/NFκB	NF-κB	2243 - 2257	0.894	cgGGGActttcacct-
EKLF	Erythroid Krüppel-like factor	2254 - 2266	0.901	cccggcgGGGTcc+
MyoD/Myf5	Proteína bHLH miogénica Myf5	2281 - 2295	0.924	tcagCAGCcgagtt-
ZF5	Factor de transcripción de dedos de zinc y dominio POZ	2307 - 2317	0.950	gcgcGCGCagc-
ZF5	Factor de transcripción de dedos de zinc y dominio POZ	2308 - 2318	0.968	ctgcGCGCgct+
ZBPF/ZF9	Core promoter-binding protein (CPBP) con 3 dedos de zinc tipo Krüppel	2311 - 2333	0.890	cgagtccCGCgcccgcgcg-
ZF5	Factor de transcripción de dedos de zinc y dominio POZ	2317 - 2327	0.957	ctggGCGCggg+
MZF1	Myeloid zinc finger protein	2323 - 2329	0.985	gcGGGga+
Smad3	Factor Smad3, involucrado en la señalización por TGF-β	2333 - 2341	0.993	GTCTgggct+
ZBP89	Zinc finger transcription factor ZBP-89	2335 - 2357	0.942	ctgggctactCCCCcacctcgcg+
SP1F/BTEB3	Basic transcription element (BTE) binding protein ó FKLf-2	2337 - 2351	0.951	gtgggGGAGtagccc-
Pax6	Se requiere del dominio apareado de Pax6 y de un homeodominio para la unión a este sitio	2366 - 2384	0.898	gcggtgtgtCCAGgaccgg-
HIF1	Hypoxia induced factor-1 (HIF-1)	2389 - 2403	0.886	aaccgcACGTacctc-
E2F	E2F, factor involucrado en la regulación del ciclo celular, interactúa con la proteína Rb p107	2398 - 2412	1.000	agggcgcCAAaccgc-
GATA/LMO2COM	Complejo de Lmo2 unido a Tal-1, proteínas E2A y GATA-1, hemisítio 2	2407 - 2419	0.980	ctctGATAgggcg-
AHRARNT	Heterodimero Aryl hydrocarbon receptor / Arnt	2418 - 2440	0.922	gcactacgagCGTGcacagcct-
MTF-1	Metal transcription factor 1, MRE	2421 - 2435	0.885	ctgtGCACgctgctg+
XBBF/RFX1	X-box binding factor RFX1	2460 - 2478	0.913	ggatggccagaGCAcccc-
EKLF	Erythroid Krüppel-like factor	2508 - 2520	0.970	tcccgaGGGTtg+
CREB	cAMP-responsive element binding protein	2513 - 2533	0.942	cagggTGTACgctgagcggaa+
WHZF/WHN	Proteína winged helix, involucrada en la queratinización del pelo y en la diferenciación del epitelio úmico	2518 - 2528	0.962	ttgACGctgag+

Anexo I. Listado completo de los elementos potenciales de control en cis del promotor del betaglicano predichos por el software “Professional MatInspector” –de “matrix similarity” ≥0.875 y “core similarity” ≥0.9–. En la tabla, el término familia se refiere a un conjunto de matrices (secuencias) funcionalmente similares; los nucleótidos en mayúsculas (llamados globalmente core sequence) –usualmente 4– corresponden a las posiciones más conservadas de la matriz.

10. Procedimientos experimentales

Cultivo celular

Los fibroblastos Rat-1 de rata y los mioblastos L₆E₉ de rata y C₂C₁₂ de ratón se compraron a American Type Culture Collection (ATCC). Las células Rat-1 y L₆E₉ se cultivaron en una incubadora a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO₂ (las C₂C₁₂ con CO₂ al 8%).

Medio de crecimiento para fibroblastos de rata Rat-1

DMEM

Suero de feto bovino al 10% descomplementado 30' a 56 °C

Mezcla de antibióticos y antimicóticos 1X

Medio de crecimiento para mioblastos de rata L₆E₉

DMEM

Suero de feto bovino al 20% descomplementado 30' a 56 °C

Mezcla de antibióticos y antimicóticos 1X

Medio de crecimiento para mioblastos de ratón C₂C₁₂

DMEM/F-12 (1:1)

Suero de feto bovino al 10% descomplementado 30' a 56 °C

Extracto de embrión de pollo filtrado a 60 Å al 0.5%

Mezcla de antibióticos y antimicóticos 1X

El DMEM/F-12 se prepara mezclando 1 sobre de este medio en polvo para 1 L en un litro de agua con 1.2 g de NaHCO₃ y ajustando el pH a 7. Luego se esteriliza filtrándolo al vacío a través de un filtro Steritop de poros de 0.22 µm. El medio de crecimiento se les debe reemplazar a las células cada 2 días; se debe vigilar que las células no alcancen una confluencia del 70% o más, ya que si esto sucede una fracción se diferencia a miotubos y la restante queda disminuida en su capacidad para diferenciarse posteriormente. Para tener cultivos de reserva de estos mioblastos, éstos deben ser cultivados a una densidad de 5,000 células/cm² en cajas petri de 6 cm de diámetro (21 cm² de área) con 3 mL de medio o de 10 cm de diámetro (55 cm² de área) con 6 mL de medio.

Dilución de los cultivos de células (*split*)

Cuando se requiera diluir mioblastos cultivados en cajas de 6 cm de diámetro, se deben lavar las células 2X con 5 mL cada vez de HBSS, añadirles 1 mL de tripsina 1X (diluida en HBSS a partir de una solución madre 10X), dejarlas a 37 °C ~10 minutos, añadirles 5 mL de medio de crecimiento, pipetearlas para disgregarlas a totalidad y añadir 2 mL de la suspensión de células a otra caja de 6 cm de diámetro en la que ya haya 6 mL de medio de crecimiento. Se esparcen bien las células y se regresan a la incubadora. Si se requiere sembrar células en cantidades específicas, la suspensión de células se transfiere íntegra a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifuga a 2,500 rpm 10 minutos. Se aspira el sobrenadante y se añaden 5 mL de medio de crecimiento por cada placa de 21 cm² de área de la que provengan los mioblastos. Las células se succionan a través de una aguja 21G1½ de Plastipak con una jeringa Plastipak de 10 mL y se toma una muestra de 50 µL para contar las células en la Cámara de Neubauer: se cuentan las células que hay en cada uno de los 4 cuadrantes, se saca un promedio y se multiplica por 10,000 para conocer el número de células por mL. Sembrar 4,000 ó 6,000 células/cm² para tener un confluencia del 70 al 80% en 3 ó

2 días, respectivamente. También se pueden hacer cultivos en cajas de 10 cm de diámetro si se requieren de muchas más células para un experimento.

Medio de diferenciación para mioblastos C₂C₁₂

DMEM/F-12

Suero de caballo al 5% descomplementado 30' a 56 °C

Mezcla de antibióticos y antimicóticos 1X

Cuando los mioblastos hayan alcanzado un 60% de confluencia, se les aspira el medio de crecimiento, se enjuagan 3X con DMEM/F-12 y se les añade el medio de diferenciación. El medio de diferenciación se debe cambiar al segundo día de haberlo provisto, añadiendo esta vez AraC (β -D-arabinofuranósido de citosina) a una concentración final de 1 mM (a partir de una solución 100 mM protegida de la luz), y así cada 2 días, añadiendo siempre AraC. El AraC es un análogo de citosina que al incorporarse a una cadena naciente de ADN durante la replicación impide que ésta se extienda, por lo que este compuesto se añade para matar a las células que aun en condiciones de diferenciación sigan proliferando, con el fin de tener en el cultivo una población primordialmente de miotubos y no una mixta. Cabe mencionar que no se consigue obtener miotubos cuando se ponen a diferenciar mioblastos en pozos de la placa de 24 de pozos.

Congelación de células

Procesar las células como si se fueran a diluir, pero después de centrifugarlas y aspirarles el sobrenadante, adicionarles 3 mL de medio de cultivo por cada placa de 21 cm² de la que procedan. Disociar las células con jeringa, contarlas y ajustarlas a una densidad de 600-700 mil células/mL. Disociar las células 5 veces de nuevo con jeringa y colocar 1 mL de la suspensión por criovial que se quiera congelar; añadir 100 μ L de DMSO, mezclar por inversión, congelar de 3 a 15 horas en el congelador a -20 °C y luego pasar al tanque de nitrógeno.

Medición del proteoglicano, proteína desglicanada y ARNm del betaglicano en células C₂C₁₂

Yodinación del TGF- β por el método de la cloramina T

1 μ g de TGF- β 2 fue disuelto en 5 μ L de acetonitrilo y mezclado con amortiguador fosfato y 500 μ Ci de ¹²⁵I-Nal. La reacción fue iniciada con la adición de 2 μ L de cloramina T; a los 2 minutos se agregaron otros 2 μ L de cloramina T; después de 1.5 minutos se agregaron 2 μ L más y después de 1 minuto se detiene la reacción con un exceso de yoduro de sodio frío. El TGF- β yodinado fue separado del yodo libre mediante una cromatografía de exclusión con Sephadex G-50 (López Casillas *et al.*, 1993; Hunter, 1970).

Marcado por afinidad e inmunoprecipitación

Para los ensayos de entrecruzamiento fueron plaqueados mioblastos C₂C₁₂ a una densidad de 8,000 células/cm² en placas de 10 cm² en medio de crecimiento; dos días después, cuando habían alcanzado una confluencia de ~70%, se marcaron por afinidad los mioblastos del día 0 de diferenciación con ¹²⁵I-TGF- β 2 100 pM y se indujo la diferenciación de las células de los cultivos de los días 2, 4 y 6 de diferenciación, mismas que en los referidos días se marcaron por afinidad. Las células se incuban en 2 mL del amortiguador KRH 1X (Krebs-Ringer-Hepes; KRH 10X: NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 5 mM, CaCl₂ 1.3 mM y Hepes 50 mM) con BSA al 0.5% a 37 °C por 30 minutos en una

plataforma rotatoria. Luego se incuban en 1 mL de KRH 1X con ^{125}I -TGF- β 2 100 pM y BSA al 0.5% a 4 °C por 3 horas en la plataforma rotatoria. Al terminar las incubaciones, las células se enjuagan para quitar el ^{125}I -TGF- β 2 libre y la BSA. Se agrega la solución de entrecruzamiento (6 μL de DSS a 1 mg/mL) por 15 minutos a 4 °C en la plataforma rotatoria y se detiene la reacción mediante lavados con el amortiguador STE. Las proteínas membranales fueron solubilizadas con el amortiguador Tris-Tritón-EDTA en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas por 30 minutos a 4 °C en la plataforma rotatoria. Los lisados celulares fueron centrifugados y los sobrenadantes transferidos a tubos eppendorf para ser inmunoprecipitados o analizados directamente en geles de acrilamida. El anticuerpo policlonal que se utilizó para inmunoprecipitar al betaglicano fue el denominado 822.

Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó el método para cuantificar proteínas con ácido bicinconínico descrito por Smith *et al.* en 1985. La sal sódica del ácido bicinconínico es un compuesto hidrosoluble capaz de formar un complejo púrpura intenso con el ion cuproso (Cu^{1+}), mismo que se forma al hacer reaccionar proteínas con Cu^{2+} en un ambiente alcalino (reacción de Biuret). 10 a 20 μL de extractos celulares fueron llevados a 150 μL con más amortiguador con Tritón X-100 (ver sección "Detección de la actividad de la cinasa de creatina") y alicuotados en pozos de 0.32 cm^2 ; luego fueron mezclados con 150 μL del reactivo de trabajo (Smith *et al.*, 1985). Después de mezclar agitando suavemente durante 30 segundos, la placa multipozos fue incubada por 2 horas a 37 °C. Se cuantificó la absorbancia a 562 nm de λ de cada pozo en un lector de ELISA 960 Metertech y así se determinó la concentración de proteínas totales sobre la base de una curva estándar elaborada con albúmina de suero bovino en un rango de 0 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Degradación de los glicosaminoglicanos del betaglicano

Para degradar las cadenas de sulfatos de heparano y de condroitina del betaglicano, 95 μL de extractos de células C_2C_{12} en Tritón X-100 (ver sección "Detección de la actividad de la cinasa de creatina") fueron incubados con 5 mU de heparitinasa (Seikagaku) previamente liofilizada con todo y su amortiguador (Tris HCl 100 mM pH 7.5 y NaCl 50 mM), condroitinasa ABC (Sigma) a una concentración final de 100 mU/mL y 5 μL de CaCl_2 20 mM. La digestión se dejó transcurrir por espacio de 12 horas a 37 °C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Alicuotas de los extractos celulares (marcados por afinidad o digeridos) se mezclaron con el amortiguador de carga (Tris HCl 125 mM pH 6.8, SDS al 6%, glicerol al 20%, β -mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0.07%), se hirvieron por 5 minutos y se fraccionaron electroforéticamente en un geles de poliacrilamida preparados en vidrios de 20 cm x 14 cm x 1.5 mm al 3% (gel concentrador) y de gradiente 4-12% (gel separador) usando como amortiguador de corrida Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%, aplicándoseles voltajes constantes de 50 V (concentrador) y 150 V (separador).

Transferencia de proteínas desde geles de acrilamida a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon (Millipore) luego de ser electroforadas en geles de acrilamida: la membrana y el gel, yuxtapuestos, se colocaron entre cuatro pedazos de papel Whatman 3MM, una esponja y un soporte plástico perforado a cada lado; el ensamble se colocó en una cámara de transferencia con la membrana viendo hacia el polo positivo. Para geles de 20 cm x 14 cm x 1.5 mm la electrotransferencia se llevó a cabo por 2 horas a 70 V en Tris HCl 25 mM pH 8.4 y glicina

192 mM. Como control de transferencia, las proteínas en la membrana se tñieron con una solución de Rojo Ponceau-S al 0.1% en ácido acético al 5%.

Western blot

Los sitios de unión inespecífica en la membrana de nitrocelulosa ya con las proteínas transferidas fueron bloqueados al incubarla 1 hora a temperatura ambiente en Tris-Blotto-Tween (Tris HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, leche descremada al 5% y Tween-20 al 1%). Luego se adicionó el suero C6-3 de conejo α -dominio E del betaglicano (codificado por la construcción $\Delta 10$) (1/2000) diluido en Tris-Blotto-Tween y luego de una hora, la membrana se enjuagó 3 veces por 10 minutos cada vez en el mismo amortiguador y se incubó por una hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (α -IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante 1/10,000) diluido en Tris-Blotto-Tween. Después de 6 lavados similares a los del primer anticuerpo, el betaglicano se visualizó mediante ECL (*enhanced chemiluminescence*) (Pierce).

Detección de la actividad de la cinasa de creatina

Mioblastos y miotubos dejados diferenciar por 2, 4 ó 6 días en placas de 21 cm² fueron lavados 3 veces por 5 minutos cada vez con PBS (*phosphate-buffered saline*) 1X, CaCl₂ 0.1 mM y MgCl₂ 1 mM y lisados mediante incubación con 400 μ L de Tritón X-100 al 0.5%, Tris HCl 50 mM pH 7.4 y NaCl 150 mM por 10 min sobre hielo. El lisado se restregó con un raspador, se homogeneizó mediante 20 pasajes por una jeringa de 1 mL (con aguja de calibre 25) y se clarificó mediante centrifugación a 11,000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Se utilizó una alícuota de 10 a 100 μ L para determinar la actividad de la enzima fosfoquinasasa de creatina con el *kit* CK-NAC (Valtek) que cuantifica indirectamente la actividad de esta enzima al detectar la cinética de formación de NADPH en la reacción de fosfocreatina a gluconato-6-fosfato, cuyo primer paso está catalizado por la enzima. Dicha alícuota se mezcló con 750 μ L del amortiguador de ensayo del *kit* y se midió la absorbancia de la mezcla a 340 nm de λ en un espectrofotómetro UV-1601PC de Shimadzu, con un tiempo de preincubación de 2 minutos y una cinética de aparición de NADPH de 4 minutos, determinando la absorbancia a intervalos de 1 minuto. La actividad se expresó en UI/mL según la siguiente fórmula: UI/mL = Pendiente (densidad óptica / minuto) \cdot (Vr / 6.22Vm), donde Vr = volumen total de la reacción; Vm = volumen de la muestra; y 6.22 = coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm de λ . El ADN en los extractos celulares se cuantificó con bis-benzimida o reactivo de Hoechst 33258; este reactivo cambia su espectro de emisión de fluorescencia al formar un complejo con el ADN (Labarca y Paigen, 1980). Alícuotas de 20 a 50 μ L de extractos totales fueron mezcladas con 2 mL del amortiguador de ensayo (NaCl 2 M, EDTA 10 mM, bis-benzimida 0.1 μ g/mL y PBS 1X) y se midió la emisión de fluorescencia a 458 nm de λ a una excitación de 365 nm de λ en un fluorímetro DyNA Quant200 de Hoefer.

Extracción de ARN total

Los mioblastos C₂C₁₂ fueron plaqueados en medio de crecimiento a una densidad de 6,000 células/cm² y dos días después fue inducida su diferenciación a miotubos. El ARN fue extraído de células dejadas diferenciar 0, 2, 4 y 6 días. Se utiliza la solución de Trizol para extraerlo siguiendo el protocolo que proporciona Gibco. Se adiciona a los cultivos 1 mL (placas de 21 cm²) ó 2 mL (de 55 cm²) de Trizol, se obtiene un extracto restregando la superficie de la placa con un raspador de células y luego éste se homogeneiza con la micropipeta P-1000 (los extractos que no vayan a ser procesados de inmediato se guardan a -80 °C; cuando vayan a serlo, se descongelan en un baño de agua al tiempo durante unos 10 minutos). Se agregan 200 μ L de cloroformo por cada mililitro de extracto,

se agita por inversión 15 segundos y se incuba a 4 °C durante 10 minutos. Después de centrifugar a 11,500 rpm por 10 minutos a 4 °C en microcentrífuga, se transfieren 400-500 μL de la fase acuosa (la superior) a un nuevo tubo estéril, se adiciona un volumen de isopropanol y se incuba a -20 °C por 2 horas. Se centrifuga en las mismas condiciones, sólo que a 9,500 rpm, y se lava el precipitado resultante con 1 mL de etanol al 75% frío (se invierte el tubo muy suavemente). El precipitado de ARN se seca en el SpeedVac 5 minutos sin calor y luego se redissuelve en un volumen de 20 μL de formamida, se desnaturaliza incubándolo 10 minutos a 65 °C, se coloca 10 minutos a 4 °C y se cuantifica una alícuota de 2 μL disuelta en un volumen final de 500 μL de agua tratada con DEPC midiendo la absorbancia a 260 nm.

Electroforesis de ARN en geles de agarosa y transferencia a membranas de Nytran

10 μg of ARN total de cada punto temporal de miogénesis fueron electroforados en un gel de agarosa al 1.2% en amortiguador MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico 0.04 M pH 7, acetato de sodio 10 mM y EDTA 1 mM) y formaldehído 0.66 M. En un matraz horneado se agregan el agua y la agarosa; se pone el matraz sobre una balanza que se tara a cero, se añade agua (100 mL, compensatoria de la que se evaporará), se derrite la agarosa en el horno de microondas y se evapora agua hasta que el matraz pese cero en la balanza tarada; inmediatamente se añade MOPS 10X y luego el formaldehído (en un ambiente estéril). Se agita suavemente para no formarle burbujas y se vierte en el molde del gel, equilibrado previamente con una "burbuja" libre de ARNasas por haberla tratado con RNaseZap. Antes de cargarle las muestras de ARN, el gel se precorre durante una hora a 70 V en MOPS. El ARN disuelto en formamida se desnaturaliza como se mencionó arriba, se coloca en hielo después, se toman los 10 μg y se mezclan con 15 μL de amortiguador de carga (750 μL de formamida desionizada, 150 μL de MOPS 10X, 240 μL de formaldehído al 37%, 100 μL de H_2O tratada con DEPC, 100 μL de glicerol y 80 μL de una solución de azul de bromofenol al 10%) y 3 μL de bromuro de etidio 1 mg/mL, todo en hielo. El ARN se carga en los pozos del gel y se corre a un voltaje constante de 70 V (geles de ~ 10 cm de largo) hasta que el frente de azul de bromofenol llegue al final del gel. Se le toma una fotografía al gel y se enjuaga con H_2O tratada con DEPC. El ARN se despurina con NaOH 0.05 N (a partir de una solución de NaOH 2 N) y se transfiere así: el gel y la membrana de Nytran se sumergen por separado en SSC 10X (NaCl 1.5 M, citrato de sodio 0.15 M pH 7) durante 20 minutos con agitación suave (la membrana primero se hidrata con H_2O). Se arma un dispositivo de transferencia con SSC 10X; el gel se coloca sobre un trozo de papel Whatman 3MM, encima del gel se coloca una membrana de Nytran de Schleicher & Schuell y arriba de ella otro pedazo de papel filtro (ambos de la misma superficie del gel) y hasta arriba pliegos de papel absorbente. La transferencia por capilaridad se deja transcurrir 12 horas, luego de las cuales la membrana se remoja en SSC 6X 5 minutos y se deja secar bien. Luego, el ARN se fija a la membrana con luz ultravioleta haciendo uso de un entrecruzador Stratagene.

Northern blot

Como sonda se utilizaron 100 ng del ADNc entero del betaglicano murino, previamente liberado del plásmido CII-2 con *EcoRI*, purificado a través de un gel y marcado con 50 μCi de [α - ^{32}P]-dCTP (~ 3000 Ci/mmol de NEN) durante 20 minutos mediante un *kit* de marcaje con oligos hexaméricos de secuencia aleatoria de Boehringer Mannheim. La membrana se prehibrida en cilindros de hibridación HybAid durante 20 minutos a 65 °C con el amortiguador de hibridación Rapid-hyb con 0.1 mg/mL de ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado. Luego se agrega la sonda radiactiva (desnaturalizada 10 minutos a 100 °C y enfriada en hielo) y se deja hibridar 1 hora a 65 °C. La membrana se

lava una vez con SSC 2X y SDS al 0.1% durante 30 minutos y dos veces con SSC 0.1X y SDS al 0.1% por 15 minutos cada vez a 65 °C. La imagen se obtuvo mediante autoradiografía en una película de rayos X de Kodak dejada a -80 °C.

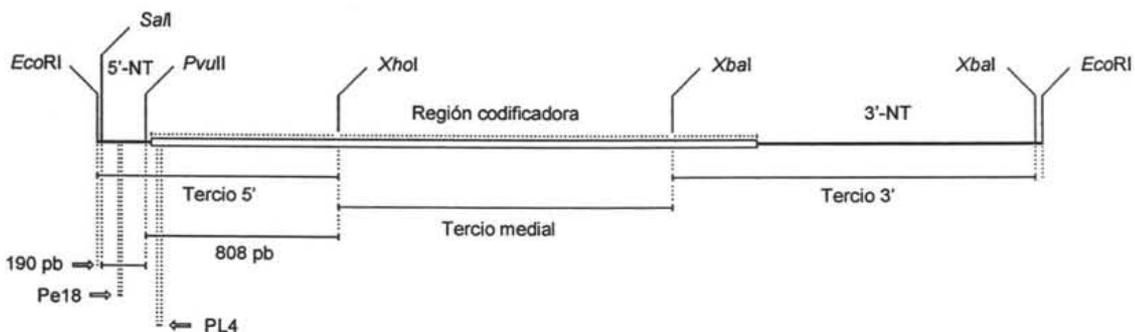
Inmunofluorescencia indirecta

Se cultivaron células C_2C_{12} en cubreobjetos de vidrio. Antes de procesar las células, se les aspiró el medio y se enjuagaron tres veces con PBS y dos veces con TSB (Tris HCl 50 mM pH 7.7, NaCl 0.1 M, BSA al 2%), siendo de 15 minutos cada enjuague. Para tinción de antígenos de la superficie celular, las células vivas fueron incubadas con el suero hiperinmune C6-3 (*i.e.*, correspondiente a la tercera extracción sanguínea del animal 6) obtenido de conejos inmunizados con la proteína codificada por la construcción $\Delta 10$ (dominio E) del betaglicano de rata (1/200) o con el anticuerpo de conejo α -perlecano murino (1/1000) diluidos en TSB por 1 h en hielo. Después de retirar esta solución y enjuagar 2 veces con TSB y 3 con PBS, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3% en PBS por media hora a temperatura ambiente; después se retiró el fijador y se enjuagó las células 3 veces con PBS y 3 con TSB. Luego las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.05% e incubadas con un anticuerpo murino α -miosina monoclonal (1/100) (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa). Posteriormente, se retiró el anticuerpo no unido enjuagando las células con Blotto (leche descremada al 5% en PBS) y se añadió un anticuerpo IgG secundario de cabra α -Fc de conejo acoplado a FITC (1/100) y otro IgG α -ratón acoplado a TRITC (1/100) (Pierce) diluidos en Blotto. Después de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, los cubreobjetos fueron enjuagados y vistos en un microscopio vertical Diaphot de Nikon de epifluorescencia.

Clonación del promotor

Sondas del ADNc del betaglicano murino para hibridación de colonias.

- del tercio 5': *EcoRI*-*XhoI*, bases: 2 a 1,013 (1,012 pb)
- del tercio medial: *XhoI*-*XbaI*, bases: 1,014 a 2,421 (1,408 pb)
- del tercio 3': *XbaI*-*XbaI*, bases: 2,422 a 3,948 (1,527 pb)



Clonación de fragmentos de 190 y 808 pb.

El fragmento de 190 pb *SalI*-*PvuII* se insertó en el vector pBS-KSII(+) en los extremos dejados por *SalI* y *EcoRV* (*PvuII* y *EcoRV* generan extremos compatibles entre sí). El fragmento de 808 pb *PvuII*-*XhoI* se insertó en el mismo vector en los mismos extremos

(*Xho*I y *Sal*I también generan extremos compatibles entre sí). Se verificó la identidad de los insertos mediante su secuenciación con los oligos T3 (17 bases: 5'- att aac cct cac taa ag -3'; T_m : 46 °C) y T7 (22 bases: 5'- gta ata cga ctc act ata ggg c -3'; T_m : 64 °C), en sendos flancos del *polylinker* del vector.

Preparación de membranas para hibridación de colonias

De una membrana de nailon se recortan círculos que quepan en cajas petri convencionales (la circunferencia de las membranas debe quedar circunscrita al área plana de la cama de LB-agar de estas cajas —en su perímetro se curva dicha cama—), se les traza con un plumón de tinta indeleble una cuadrícula de 100 cuadritos (vélgase la redundancia), se numeran los cuadritos y se esterilizan las membranas. Luego, se vierten 10 mL de LB solo en una caja petri estéril y en este medio se sumerge una membrana a la vez con pinzas esterilizadas al fuego. Se transfiere esta membrana a una caja petri con LB-antibiótico-agar y se retiran las burbujas que le hayan quedado por debajo a la membrana. Con un palillo estéril de madera se toma una colonia de bacterias y se "parcha" (traza) en forma de diagonal en un cuadrito de la membrana y paralelamente en la superficie de LB sólido de una caja petri gemela que por debajo tenga la plantilla de la cuadrícula, la cual se sujeta con cinta adhesiva para que no se mueva. Se repite la operación con todas las colonias y después se incuban a 37 °C. Se deja que las colonias adquieran la forma de costras pequeñas y luego se refrigeran a 4 °C. La membrana de nailon se procesa como se describe en Berent *et al.*, 1985.

Midipreps de BACs con *kit* de Clontech

Se hace un precultivo de las bacterias DH10B::BACs en 2 mL de LB con cloranfenicol a 15 µg/mL durante 8 horas. Luego se hace el cultivo preparativo en 50 mL del mismo medio en matraces de 1 L durante 16 horas, diluyendo 1/500 el precultivo. Se centrifugan las bacterias en frascos de 250 mL a 6,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en el rotor JA-10 de Beckman. Se resuspende la pastilla en 8 mL del amortiguador S1 frío pipeteando arriba y abajo, tratando de no hacer burbujas. El volumen resultante se transfiere a un tubo de polipropileno de 30 mL. Se añaden 8 mL del amortiguador S2 y se mezcla por inversión 8 veces. Se incuba a temperatura ambiente por 3 minutos y hasta un máximo de 5 (no mezclar en el vórtex). Se añaden 8 mL del amortiguador S3 frío. Se mezcla por inversión 8 veces y se incuba en hielo 5 minutos. Se coloca un filtro predoblado del *kit* en un embudo, se humedece en su totalidad con 2 mL de H₂O ultrapura, se le vierte la suspensión para su filtración y el líquido filtrado se recupera en un tubo de polipropileno de 30 mL. Se distribuyen 1.5 mL de H₂O ultrapura en el filtro y se cambia el punto de goteo para drenar lo más posible de líquido. Se equilibra una columna AX100 con 2 mL de amortiguador N2. Tirar el flujo. Verter el líquido donde vienen los BACs a la columna. Si este líquido se ve con material particulado, se puede centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en el rotor SS-34 de Sorvall. El cartucho se lava 3 veces con 4 mL del amortiguador N3. El ADN se eluye del cartucho con 2 X 2 mL del amortiguador N5 precalentado a 45 °C. El eluato se reparte así: 1 mL en cada uno de 4 microtubos de 2 mL de capacidad. Añadir a cada microtubo 2 µL de glucógeno 20 µg/µL y 0.7 mL de isopropanol a temperatura ambiente para precipitar el ADN. Invertir los tubos varias veces para mezclar; centrifugar 20 minutos a 14,000 rpm a temperatura ambiente en microcentrífuga. Lavar las pastillas 2 veces con etanol al 70% a temperatura ambiente (1 mL cada vez). Dar un golpe de microcentrífuga, retirar el EtOH residual y dejar secar la pastilla al aire durante 10 minutos. Disolver las pastillas de una misma preparación en un volumen total de 100 µL de Tris HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM. Nota: el ADN no se disuelve bien en amortiguadores ácidos. Se digirieron 10 µL de la midiprep con 15 unidades de endonucleasa de restricción en un volumen final de 20 µL; las muestras

digeridas se concentraron mediante evaporación a un volumen de ~5 μL para luego ser fraccionadas electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2%. A veces, hubo que teñir el ADN luego de haberlo electroforado en el gel con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio. Luego, se despurinó el ADN y se transfirió a una membrana de nailon.

Southern blots

Las hibridaciones de colonias y las tipo *southern* se llevaron a cabo en esencia como se describe en Berent *et al.*, 1985. Las hibridaciones fueron realizadas en cilindros de vidrio en un horno Hybaid. Las temperaturas de hibridación fueron de 42 °C para la sonda de 190 pb, de 55 °C para el oligo PL4 y de 61.2 °C para el oligo Pe18. Se utilizaron 15 mL de solución de hibridación, se hibridó durante 16 horas, se lavó 4X con 200 mL de la solución NET 6X y SDS al 0.5% precalentada a 50 °C (se deben agregar las soluciones concentradas de NET y de SDS a H₂O de esta temperatura, dado que conforme esta dilución se enfría, se van precipitando sus componentes). La sonda fue llevada a un volumen de 100 μL , desnaturalizada a 94 °C 1 minuto, enfriada en hielo, centrifugada y añadida después de la prehibridación. Para remover una sonda de una membrana y rehibridar, la sonda debe ser retirada tan pronto como sea posible de la membrana y ésta nunca se debe dejar secar. La membrana se debe lavar 2 veces por 20 minutos cada vez en un volumen grande (500 mL) de SSC 0.1X, SDS al 0.5% a 95 °C. Alternativamente, y sólo para hibridaciones de ADN, se coloca la membrana con el ADN viendo hacia arriba sobre papel filtro empapado de NaOH 0.4 N 5 minutos. Se enjuaga con SSC 2X y se repite la operación.

Preparación del marcador de peso molecular λ – *Hind*III radiactivo

Se digiere 1 μg del ADN del bacteriófago λ con *Hind*III, se desfosforila en 100 μL con 1 unidad de la fosfatasa intestinal de becerro (CIP), se limpia con fenol y cloroformo, se redisuelve en 5 μL , se fosforila con [γ -³²P]-ATP y 10 unidades de la cinasa de polinucleótidos y se purifica en una columna de Sephadex G50. En el gel, se cargan 250 ng por carril.

Ligación de fragmentos *Hind*III—*Hind*III en el vector pBR322pl

Se digieron 20 μL (~3.7 μg) de la midiprep de BACp7.10 con 30 U de *Hind*III en un volumen de 50 μL . Luego, los fragmentos resultantes de la digestión fueron precipitados con 60 μg de glucógeno, 5.6 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 111.2 μL de etanol absoluto. Se incubó a -20 °C 20 minutos, se lavó 2X con 1 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó cada vez 5 minutos. La pastilla se disolvió en 21 μL de H₂O pH 8 y se analizaron en un gel de agarosa 3 μL para ver el rendimiento de la recuperación. El vector pBR322pl (~3 μg) (nota: para hacer maxipreps de este vector, se debe seguir el protocolo para plásmidos de bajo número de copias del *kit* de Qiagen) se digirió con *Hind*III, se desfosforiló en un volumen de 100 μL con 1 U de CIP, se limpió meticulosamente con fenol y cloroformo para retirar la CIP, se corrió en un gel para rescatar sólo la población de plásmidos digeridos y descartar la de los no digeridos y se redisolvió en 15 μL de H₂O pH 8. Antes de mezclar todos los componentes de la ligación, se calentaron sólo el inserto y el vector juntos 1 minuto a 37 °C para despegar los extremos cohesivos adheridos y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente (este paso, si se hace sin NaCl, ocasiona la desnaturalización del ADN, así que no se hace por más tiempo ni a más temperatura). Se incubaron las siguientes reacciones de ligación a 16 °C toda la noche (las unidades son μL):

	Reacción 1 (control negativo)	Reacción 2	Reacción 3
BACp7.10- <i>Hind</i> III	0	3	6.8
pBR322pl- <i>Hind</i> III-CIP	3	3	3
Amortiguador 10X de ligasa T4	1.2	1.2	1.2
Ligasa T4	1	1	1
H ₂ O	6.8	3.8	0
Total	12	12	12

Secuenciación

Los plásmidos en que están contenidos diferentes segmentos del promotor del betaglicano fueron secuenciados en un secuenciador Abi Prism de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Ensamble de la secuencia del inserto de ~6,692 pb de la clona B70

Para ensamblar la secuencia completa del promotor, del primer exón y parte de la del primer intrón (en este orden) de la clona B70 *Hind*III—*Hind*III, se integraron manualmente las secuencias que se muestran en la tabla IV y que se ilustran en la figura PE1. A esta secuencia se le denominó Contig 6.5. La clona B70, a menos que se especifique lo contrario, hace referencia a la que tiene como vector a pBlueScript.

Tabla IV. Ensamble de la secuencia del inserto de ~6,692 pb de la clona B70

Construcción	Nombre alterno	Oligo	Sentido de la secuencia	
B70 (1er. sitio <i>Hind</i> III)	-	T7	Directa	Traslapadas entre sí
B70/1115: <i>Apal</i> — <i>Hind</i> III	Banda 1 de <i>Apal</i>	T3	Inv. compl.	
B70/1842: <i>Bam</i> HI— <i>Bam</i> HI	Banda 2 de <i>Bam</i> HI	T3	Directa	Traslapadas entre sí
B70/1118: <i>Sac</i> I— <i>Apal</i>	-	T3	Directa	
B70	-	Bgp5	Directa	Traslapadas entre sí
B70/1118: <i>Sac</i> I— <i>Apal</i>	-	T7	Inv. compl.	
B70	-	Pe18	Inv. compl.	Integradas entre sí
pBR322pl-B70	-	Pe18	Inv. compl.	
Oligo Pe18	-	-	Inv. compl.	Traslapadas entre sí
B70/1842: <i>Bam</i> HI— <i>Bam</i> HI	Banda 2 de <i>Bam</i> HI	T7	Inv. compl.	
B70/755: <i>Bam</i> HI— <i>Bam</i> HI	Banda 3a de <i>Bam</i> HI	T7	Inv. compl.	Traslapadas entre sí
B70	-	Bgp4	Inv. compl.	
B70/3395: <i>Bam</i> HI— <i>Hind</i> III *	Banda 1 de <i>Bam</i> HI	T7	Directa	Traslapadas entre sí
B70/2323: <i>Xba</i> I— <i>Hind</i> III*°	Banda 1 de <i>Xba</i> I	T7	Directa	
B70/1669: <i>Pst</i> I— <i>Hind</i> III°	Banda 1 de <i>Pst</i> I	T7	Directa	Traslapadas entre sí
B70	-	Bgp1	Inv. compl.	
B70 (2do. sitio <i>Hind</i> III)	-	T3	Inv. compl.	

*: secuencias separadas entre sí por ~240 nucleótidos no secuenciados del primer intrón

°: secuencias separadas entre sí por ~480 nucleótidos no secuenciados del primer intrón

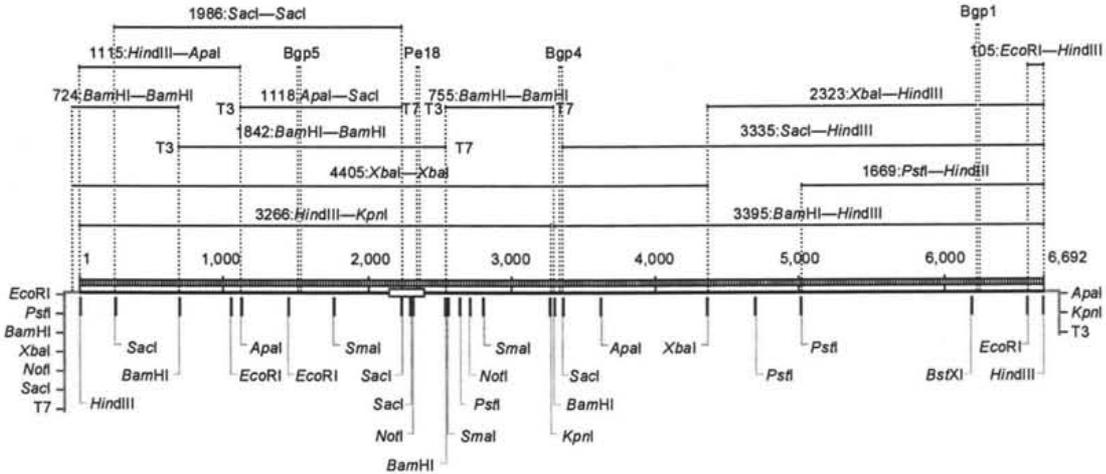


Figura PE1. Mapa del plásmido B70 –en el vector pBSII-KS(+), cuya secuencia ensamblada se denominó Contig 6.5. Las secuencias de los segmentos de restricción y oligos que se muestran por encima de la secuencia completa de B70 se ensamblaron entre sí para obtener ésta. En la barra que está arriba de la secuencia completa, las rayas verticales representan regiones secuenciadas, mientras que las dos porciones coloreadas representan regiones que no lo están. El segmento *BamHI*–*BamHI* de 724 pb comprende 30 pb del sitio de multiclonación, de modo que de promotor contiene 694 pb. Análogamente, el segmento *XbaI*–*XbaI* de 4405 pb comprende de promotor 4363 pb. Del fragmento *SacI*–*SacI* de 1986 pb, es la clona #4 la que tiene dicha orientación; del fragmento 724:*BamHI*–*BamHI*, la clona #5; los fragmentos 1118:*ApaI*–*SacI*, 1842:*BamHI*–*BamHI* (clona #2) y 755:*BamHI*–*BamHI* quedaron insertados en orientación T3 → T7 –con respecto al sentido del promotor– en pBSII-KS(+). Nombres alternos: 4405:*XbaI*–*XbaI*: banda 2 de *XbaI*; 3266:*HindIII*–*KpnI*: banda 1 de *KpnI*; 3335:*SacI*–*HindIII*: clona L; 724:*BamHI*–*BamHI* y 755:*BamHI*–*BamHI*: banda 3 de *BamHI* (estas dos bandas migran en un gel de agarosa al 1% como una sola); 1115:*HindIII*–*ApaI*: banda 1 de *ApaI*.

Bgp1: Bases 452-469 (desde el sitio *HindIII* del intrón), o bien, bases ~6223-6241 en contrasentido del promotor, 5'- caa atg ctg agt caa acc c -3' (19 nt, T_m : 56.63 °C)

Bgp4: Bases 3328-3347 en contrasentido del promotor, 5'- tcc cta aaa tta ccc gct ac -3' (20 nt, T_m : 56 °C)

Bgp5: Bases 1515-1534 en sentido del promotor, 5'- taa gag acc ctg acc aca cc -3' (20 nt, T_m : 57.5 °C)

Pe18: Bases 88-105 en contrasentido del ADNc, 5'- cga ggt ggg gga gta gcc -3' (18 nt, T_m : 66.2 °C); la primera citosina de su extremo 5' se localiza a 127 pb corriente arriba de la adenina del codón de inicio.

La secuencia del fragmento *HindIII*–*HindIII* de 6550 pb está parcialmente armada en el Contig 6.5. Desde el sitio *HindIII* del extremo 5' del promotor hasta la última G de CACACCGCTTGCGAG, donde termina el primer exón, hay: 2392 pb. El primer exón tiene presuntamente (según el alineamiento con el promotor del betaglicano de rata y con el ADNc del betaglicano de ratón) 251 pb.

Construcciones promotor del BG – luciferasa

Se obtuvieron mediante digestión del plásmido B70(4250:*HindIII*–*KpnI*) los fragmentos *HindIII*–*NotI* (HN) de 2301 pb, *BamHI*–*NotI* (BN) de 1607 pb y *EcoRI*–*NotI* (EN) de 857 pb. Como estos tres fragmentos tienen extremos 5' protuberantes en ambos lados, las hebras sencillas se rellenaron con dNTPs bajo la acción del fragmento Klenow de la ADN

polimerasa I. Estos segmentos con extremos ahora rasos se insertaron en el vector pGL3-Basic de Promega (ilustrado en la última parte de los "procedimientos experimentales") previamente linearizado con *SmaI* (que también genera extremos rasos). Se confirmó el tamaño de los insertos mediante digestión con *KpnI* + *HindIII*, se definió cuáles tenían la orientación 5'→3' (i.e., la correcta) con *KpnI* + *SmaI* (HN: bandas de 1781 y 5337 pb; BN: bandas de 1087 y 5337 pb; EN: bandas de 337 y 5337 pb), y se verificó la identidad de los mismos mediante secuenciación con los oligos RV3 (corriente arriba del sitio *KpnI*; 20 bases: 5'- cta gca aaa tag gct gtc cc -3'; T_m: 52 °C) y GL2 (corriente abajo del sitio *HindIII*; 23 bases: 5'- ctt tat gtt ttt ggc gtc ttc ca -3'; T_m: 52 °C). Así, se generaron las construcciones HN-16 (clona 16 *HindIII*—*NotI*), BN-4 (clona 4 *BamHI*—*NotI*) y EN-2 (clona 2 *EcoRI*—*NotI*).

Relleno de extremos 5' protuberantes con Klenow para dejarlos rasos

Al ADN digerido se le adiciona dATP, dCTP, dGTP y dTTP a concentración final de 200 μM cada uno y 2 U de la polimerasa Klenow en el amortiguador B 1X de Boehringer en un volumen de 50 μL. La reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

Métodos generales de biología molecular

Transformación

Bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α (GIBCO BRL) fueron las que se emplearon para ser transformadas con la mayoría de los plásmidos descritos en el presente trabajo para recuperar y obtener éstos en cantidades útiles. El procedimiento de la transformación es el siguiente: se saca un microtubo de bacterias DH5α del congelador de -70 °C, se dejan derretir en hielo, se agitan suavemente, se pone en otro microtubo una alícuota de ellas de 50 μL y se le adiciona un volumen de 5 μL de plásmidos (e.g., de una reacción de ligación). Las bacterias se incuban en hielo media hora y se someten luego a un choque térmico de 42 °C durante 2 minutos. Se transfieren a hielo, se dejan reposar 2 minutos y se les añade 1 mL de medio de cultivo SOC a temperatura ambiente. El microtubo con las bacterias se coloca acostado en una incubadora con agitación a 250 rpm a 37 °C durante 1 hora. Luego, se centrifuga el tubo con las bacterias 5 segundos, se quita el sobrenadante con una pipeta P-1000, se añaden 500 μL de medio nuevo, se resuspenden las células y se plaquean 100 μL en una caja petri con LB sólido y 400 μL en otra (si se sospecha que habrá muchas bacterias transformantes y se quiere que sus colonias estén aisladas unas de otras). Este LB sólido contiene 200 μg/mL de ampicilina y si se requiere –para discriminación de colonias blancas y azules–, se le añade X-Gal e IPTG antes de echarle las bacterias. Después de plaquear las bacterias, se dejan incubando a 37 °C toda la noche.

Minipreps de plásmidos convencionales

Se toma una colonia aislada y se inocula en 2 mL de LB o TB líquido con 150 μg/mL de ampicilina en un tubo de 50 mL. Se deja crecer durante 8-12 horas a 37 °C con agitación de 250 rpm. Se toman 1.5 mL del cultivo bacteriano y se transfieren a un tubo eppendorf de 1.5 mL; se centrifugan las bacterias a 3,500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se aspira el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en 200 μL de Sol I con 0.1 mg/mL de RNasa A (2 μL de la solución a 10 μg/μL), se agita bien en el vórtex. A la mezcla se le añaden 200 μL de Sol II y se invierte el tubo varias veces. Se añaden ahora 200 μL de Sol III y de nuevo se mezcla por inversión. Centrifugar a 14,000 rpm 5 minutos. (Opcional: Recuperar 0.5 mL de sobrenadante, añadir 200 μL de fenol

(equilibrado a pH 8.0 y teñido con hidroxiquinolina) y mezclar en el vórtex; añadir 200 μL de cloroformo, mezclar en el vórtex, centrifugar a 14,000 rpm 3 minutos, recuperar 400 μL y precipitar con un volumen igual de isopropanol). Transferir 0.5 mL de sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y precipitar el ADN con un volumen igual de isopropanol. Centrifugar de nuevo a 14,000 rpm 10 minutos. Lavar la pastilla de ADN (casi no se ve y se queda embarrada en la pared interna del tubo) una vez con 1 mL de etanol al 70%. Secar la pastilla en el SpeedVac aproximadamente 3 minutos y disolverla en 30 μL de H_2O pH \sim 8.0. Usar 5 μL de la miniprep para analizar por restricción. Sol I: Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM. Sol II: NaOH 0.2 M, SDS al 1%. Sol III: Acetato de potasio 1.32 M pH 5.2 (llevar a este pH con ácido acético). H_2O pH \sim 8.0: Tris 100 μM pH 8.0.

Desfosforilaciones

La reacción de desfosforilación se lleva a cabo con 1 U de la fosfatasa intestinal de becerro, CIP (no poner más de esta enzima, dado que de poner, por ejemplo, 2 U, se forma una nata muy grande de ella difícil de sortear al extraer con fenol y cloroformo), en un volumen de 100 μL durante 1 hora. (En caso de vectores digeridos con *EcoRI*, esta endonucleasa debe ser desactivada previamente a la desfosforilación, dado que en el amortiguador de la fosfatasa alcalina puede presentar actividad de estrella).

Extracción de ADN con fenol y cloroformo

A los 100 μL de ADN (e.g., de la reacción de desfosforilación) se le añaden 100 μL de fenol-cloroformo 1:1 y se mezcla en el vórtex. Se centrifuga a 14,000 rpm 3 minutos. Se recuperan 80 μL de fase acuosa. Se añaden 80 μL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) pH 8 a la fase orgánica. Se mezcla y se centrifuga. Se recuperan 80 μL de fase acuosa. Se añaden 160 μL de fenol:cloroformo a la fase acuosa. Se recuperan 140 μL de ella. Se añaden 140 μL de TE pH 8 a la fase orgánica. Se recuperan 140 μL de fase acuosa. Se añaden 280 μL de cloroformo a la fase acuosa. Se recuperan 260 μL de fase acuosa. Se añaden 260 μL de TE pH 8 a la fase orgánica. Se recuperan 260 μL de fase acuosa. En total se tienen 520 μL de TE con el ADN, los cuales se colocan en un tubo de 2 mL. A éste se le añaden 1 μL de glucógeno 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 52 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1144 μL de etanol absoluto (volumen total de 1717 μL). Se deja precipitando a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 1 hora, se centrifuga a $4\text{ }^\circ\text{C}$ 10 minutos, se lava 2X con 1 mL de etanol al 70% y se resuelve en 30 μL de Tris 100 μM pH 8. Luego, si se trata de un vector de clonación, el ADN desfosforilado y limpio se corre en un gel de agarosa y se recupera su banda, con la finalidad de no acarrear vectores no digeridos. Nota: el fenol debe estar equilibrado a un pH de 8.0 y haber sido teñido con hidroxiquinolina al 0.1%; el ADN se va hacia la fase orgánica si el pH es bajo.

Recuperación de bandas de ADN electroforadas en geles de agarosa

Se utilizó el *kit* QIAEx II Gel extraction de Qiagen para este propósito. No se deben utilizar tubos eppendorf de 2 sino de 1.5 mL para recuperar eficientemente el eluato con el ADN (en tubos de 2 mL, la resina no queda bien separada espacialmente del eluato).

Marcaje radiactivo de sondas de ADN

- a. ADN de cadena doble: Se usó un kit de marcaje de ADN con oligos hexaméricos de secuencia aleatoria (Boehringer Mannheim) y [α - ^{32}P]-dCTP, generalmente 10 μCi (\sim 3000 Ci/mmol) para marcar 100 ng de ADN bicatenario. El isótopo no incorporado se removió con columnas de Sephadex Gel-Spin SS⁵⁰ (Worthington Biochemical Corporation).

- b. Oligos: Se marcaron generalmente 100 ng de oligos con 10 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ ($\sim 3000 \text{ Ci/mmol}$) y 10 unidades de la cinasa de polinucleótidos (PNK, sin actividad de fosfatasa de 3' de Boehringer Mannheim) en un volumen de 20 μL . La reacción se incubó a 37 °C 1 hora. El isótopo no incorporado se removió con columnas de Sephadex Gel-Spin SS²⁵ (Worthington Biochemical Corporation).

Medición de la actividad del promotor

Transfección con CaPO_4

Las células Rat-1 ó L_6E_9 fueron plaqueadas a una densidad de 20,000 células/ cm^2 en placas circulares de 100 mm de diámetro y transfectadas un día después con 5 μg de ADN siguiendo el protocolo estándar de fosfato de calcio (Ausubel *et al.*, 1996). Otro día después, las células fueron lisadas para medirles la actividad de luciferasa.

Transfección con LipofectAMINA-Plus

Se sembraron células C_2C_{12} a una densidad de 6,000 células/ cm^2 en placas de 6 pozos (10 cm^2 de área c/pozo; a cada uno se le añaden 2 mL de medio de crecimiento) de la marca Corning –las de la marca Nunc no sirven para generar miotubos, dado que éstos no se adhieren bien al sustrato– en medio de crecimiento. En total, se usaron 4 placas de 6 pozos cada una, la mitad de los pozos de una placa para medir el reportero de betaglicano y la otra para medir el de miogenina, y una placa por día de diferenciación par, hasta el sexto. Dos días después, las células se lavaron 2 veces con 2 mL de OptiMEM I y se dejaron en 1 mL de este medio para su transfección. Las células de cada pozo se transfectaron con 5 μg del plásmido pBG-Lux, pMygn-Lux (que contiene un segmento de 670 pb correspondiente al promotor de la miogenina, bases +55 a -615, y subclonado en pGL3-B, Riquelme *et al.*, 2001) ó vector vacío (pGL3-B), y 10 ng del vector pRL-SV40 (que expresa a la luciferasa de *Renilla* bajo el control del promotor SV40 y permite normalizar la eficacia de transfección). Cada dueto de plásmidos se mezcló con 125 μL de OptiMEM I (por pozo) en un tubo Falcon de 15 mL estéril mediante la formación de un remolino en el interior del tubo; la mezcla resultante se transfirió a una jeringa estéril de la marca Plastipak de 3 mL (una vez que se tomó la mayor cantidad posible de volumen, se puso la jeringa con la aguja viendo hacia arriba y se succionó aire para recuperar la mezcla que quedó en la aguja) y se filtró con un filtro de pirinola Schleicher & Schuell de 0.22 μm de tamaño de poro. Cada solución filtrada se virtió en tubos estériles de 15 mL. Luego se añadieron 4 μL del reactivo Plus a los >125 μL de (OptiMEM I + ADN) / pozo, la mezcla se agitó manualmente sin invertir el tubo y se dejó incubar 15 minutos. Mientras, se preparó la mezcla de LipofectAMINA con OptiMEM I: se mezclaron 6 μL de LipofectAMINA con 125 μL de OptiMEM I por pozo a transfectar en un tubo de 15 mL mediante agitación manual. Después de transcurridos los 15 minutos mencionados arriba, se mezclaron en tubos de 15 mL el ADN+Plus con la LipofectAMINA (simplemente se virtió el contenido de un tubo en el otro) y de nuevo se dejó incubar durante 15 minutos. Se añadió lentamente la mezcla de transfección (240 μL) al centro de los pozos con agitación manual, circular y suave, y luego se pusieron las células en un ambiente de CO_2 al 5%. Transcurridas 5 horas en ese ambiente, se añadieron 139 μL de SFB y 7 μL de EEP para tenerlos en concentraciones finales de 10 y 0.5%, respectivamente, y se regresaron a un ambiente de CO_2 al 8%. Después de ~ 15 horas, las células fueron lavadas 3X2 mL con una solución de sales balanceadas de Hanks; el medio de crecimiento les fue devuelto (2 mL) a las células del día 0 de diferenciación (estas células se cosechan en realidad al día 1, pero se pueden considerar como del día 0 de

diferenciación dado que permanecen en medio de crecimiento y su confluencia es como del 60-70%), mientras que a las de los días 2, 4 y 6 se les añadieron 2 mL (por pozo) de medio de diferenciación. Un día después, las células del día 0 fueron lisadas, mientras que dos días después de haber añadido el medio de diferenciación se lisaron las del día 2, a la vez que se añadió medio nuevo de diferenciación a las de los días 4 y 6, pero esta vez con AraC a una concentración final de 1 mM, y así hasta el día 6. Cabe señalar que no se procede a transfectar miotubos porque no se transfectan bien. Para lisar las células, éstas se deben lavar una vez con 2 mL de PBS a 4 °C. En particular con los miotubos, se debe tener mucho cuidado de no desprender las células de su sustrato cuando se les añade el PBS: éste se debe añadir por la pared del pozo con una pipeta. Luego de haber lavado las células con PBS, se les añaden 200 µL del *passive lysis buffer* (PLB) y se dejan agitando 15 minutos en el aparato "sube y baja", luego de los cuales se aprecia una masa blanca insoluble de consistencia chiclosa. Todo el lisado, incluyendo el "chicle", se pasa a un tubo eppendorf y se almacena a -20 °C hasta su uso.

Tratamiento con hormonas

Los mioblastos C₂C₁₂ se sembraron a una densidad de 6,000 células/cm² en pozos de placas de 6 de éstos en medio de crecimiento. Dos días después, se transfectaron como se describió en el párrafo anterior con los plásmidos pBG-Lux o pMygn-Lux. Un día después de haberlos transfectado, los mioblastos de cada pozo se lavaron con 2X2 mL de HBSS, se tripsinizaron con 200 µL de tripsina 1X, se les añadieron 3 mL de medio de crecimiento, se pipetearon varias veces para despegarlos bien de la placa y se colectaron los que se transfectaron con un mismo plásmido en un tubo Falcon de 50 mL, se disgregaron unos de otros pasándolos por una jeringa con aguja 3 veces y se resembraron en placas de 24 pozos con 1 mL de medio de crecimiento en cada pozo (las células de un pozo de la placa de 6 pozos –a una confluencia como del 95%–, alcanzan para 6 pozos de la placa de 24 pozos). Al día siguiente, se aspiró el mililitro de medio de crecimiento de los pozos, se lavaron las células con 3X1 mL de HBSS, se adicionaron 300 µL de medio de crecimiento o de diferenciación, se aplicaron varios tratamientos hormonales a las células y luego de 24 horas se añadieron 200 µL de PLB para lisar las células y medir la actividad de luciferasa. Concentraciones finales de las hormonas: ácido retinoico: 1 µM; TGF-β1, -β2 y -β3: 40 pM (1 ng/mL); bFGF: 3 ng/mL; vehículo de TGF-β: BSA en HCl; HGF/SF: 3 ng/mL; BMP-2: 1 nM; butirato: 2 mM.

Cotransfecciones

Los mioblastos C₂C₁₂ se sembraron a una densidad de 6,000 células/cm² en placas de 6 pozos en medio de crecimiento. Dos días después, las células de cada pozo fueron transfectadas con 4 µg de pBG-Lux o pGL3-Basic; 4 µg de los plásmidos de expresión dirigida por el promotor MSV pEMSV-MyoD, pEMSV-miogenina o pEMSVα2-scribe (el vector de los dos insertos anteriores, autoligado después de haberle quitado el inserto de los sitios *EcoRI*; éstos tres fueron obsequios del Dr. Stephen Konieczny de la Universidad de Purdue); y 10 ng del plásmido pRL-SV40. Después de la transfección, se procedió a manipular las células como se describió antes.

Medición de la actividad de luciferasa de luciérnaga y de *Renilla*

La actividad de las luciferasas de luciérnaga y de *Renilla* se midió con el *Dual-luciferase reporter assay kit* de Promega. Se colocan en un tubo de vidrio 20 µL del lisado celular en *passive lysis buffer* (PLB) (en caso de que se requiera diluir la muestra, se debe hacer también en PLB 1X) y se les añaden 100 µL de la solución LARII 0.5X, se mezcla con la micropipeta 7 veces –teniendo el tubo en posición vertical, no inclinada– y se mide en el

luminómetro la intensidad de luz durante 10 segundos. Luego, se añaden 100 μL del *stop & glow buffer* (S&G) a una concentración 0.5X, se mezcla en el vórtex 3 segundos y se mide de nuevo la intensidad de luz, sólo que esta vez durante 5 segundos. Tanto el PLB como el S&G son sensibles a la luz, por lo que su manipulación debe hacerse en oscuridad. Para normalizar la actividad de la luciferasa de luciérnaga a la de *Renilla* se dividió el valor de la primera entre la segunda. Cada experimento se llevó a cabo una sola vez con tres réplicas por condición y en las barras se presenta la desviación estándar de las mediciones. Nota importante: En una muestra, la medición de la actividad de luciferasa debe hacerse cuando aún la totalidad del sustrato presente no ha sido transformada en producto, sino cuando el sustrato está apenas en vías hacia esa conversión total. Dado que el producto generado va aumentando conforme transcurre el tiempo desde el momento en que se mezclan luciferasa y luciferina, una misma muestra daría valores gradualmente mayores de actividad en función del tiempo que uno tarde en meter la muestra al luminómetro. Por eso, la actividad de luciferasa debe medirse inmediatamente después de haber mezclado los componentes de cada reacción, de modo que la lectura sea un reflejo *bona fide* de la cantidad de luciferasa presente en la muestra.

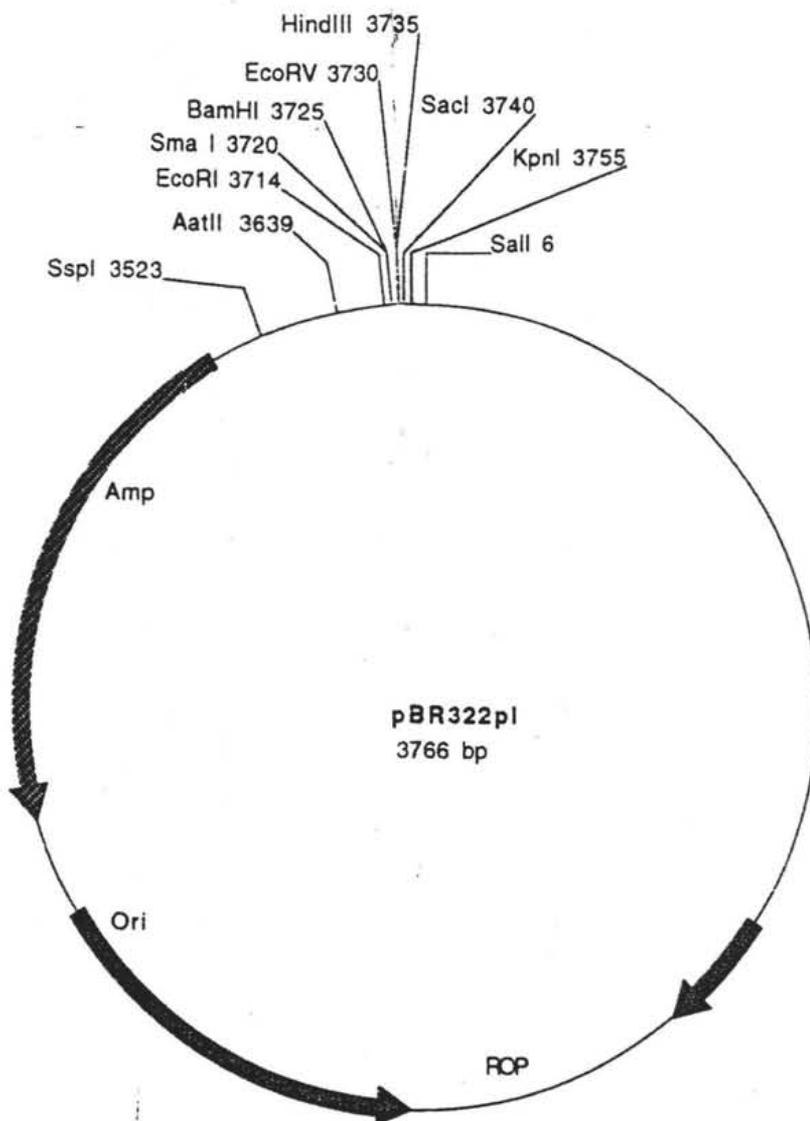
Transducción con adenovirus

Se utilizó el adenovirus Adv-BG –que expresa al betaglicano silvestre de rata– generado por el LIBB Gerardo Núñez González. Brevemente, la estrategia para la construcción de este adenovirus fue subclonar un segmento continuo del ADNc de betaglicano de rata que comprende 186 bases de la región 5'-NT, la región codificante completa y 513 bases de la región 3'-NT en los sitios *NotI*–*HindIII* de pAdenoTrack. El vector de transferencia resultante se recombinó con pAdenoEasy1 y el genoma adenoviral recombinante fue transfectado a células 293, de donde se recuperó el virus recombinante (Adv-BG). Los vectores adenovirales y las cepas celulares para ellos fueron obsequios del Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University Oncology Center); el método empleado se describe en He *et al.*, 1998. Para transducir mioblastos con el Adv-BG o con el adenovirus vacío, se plaquearon mioblastos a una densidad de 8,000 células/cm² en botellas de 25 cm². Ambos adenovirus expresan además la proteína verde fluorescente (GFP). Después de 24 horas, las células se incubaron con 2×10^7 unidades formadoras de placas (pfu) de los genomas adenovirales (100 pfu/célula) en 1.3 mL de DMEM/F-12 con SFB al 2% descomplementado 30' a 56 °C. Los mioblastos se dejaron transduciendo durante 1.5 horas a 37 °C con CO₂ al 8% y humedad al 95%, y luego de este tiempo se les agregaron 4 mL de medio de crecimiento a las botellas para finalizar la transducción. Después de 24 horas, se retiró el medio de crecimiento y se añadió nuevo (4 mL). Luego de ser transducidos con los adenovirus Adv-BG o con el adenovirus vacío como control negativo, mioblastos cultivados en pozos de 10 cm² de área (8,000 células/cm²) fueron transfectados con 2 μg de la construcción p3TP-Lux –que contiene parte de la región promotora del gen del inhibidor del activador del plasminógeno I (PAI-I) fusionada con el ADNc de la luciferasa de luciérnaga– y 10 ng de pRL-SV40 por pozo.

Marcas de los reactivos

El HGF/SF y las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 recombinantes fueron obtenidas de R&D Systems (Minneapolis, Minnesota). Las sales balanceadas de Hanks (HBSS), el AraC y el ácido retinoico todo en *trans* fueron comprados a Sigma (Saint Louis, Missouri). El BMP-2 fue un obsequio del Genetic Institute en Cambridge, Massachusetts. El

proveedor del bFGF humano, del DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), del DMEM/F-12 (1:1) (*Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F-12 (Ham)*), del OptiMEM I, del suero de feto bovino (SFB), del suero de caballo (SC), del extracto de embrión de pollo filtrado a 60 Å (EEP), de la mezcla de antibióticos y antimicóticos 100X, del Trizol y de la LipofectAMINA-Plus fue Gibco (Grand Island, NuevaYork). En caso de contar con OptiMEM I en polvo, se mezclan 6.8 g de éste con 1.2 g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) en ~500 mL de H₂O ultrapura, se ajusta el pH a 7.1 y se esteriliza por filtración con vacío. Los vectores pGL3-Basic y pRL-SV40 y el *Dual-luciferase reporter assay system* fueron comprados a Promega (Madison, Wisconsin).



Plasmid name: pBR322pl

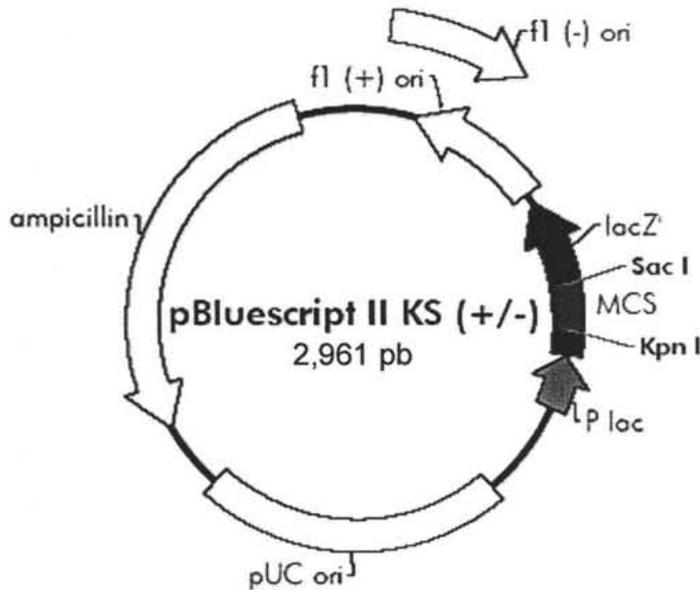
Plasmid size: 3766 bp

Constructed by: Kornelia Polyak

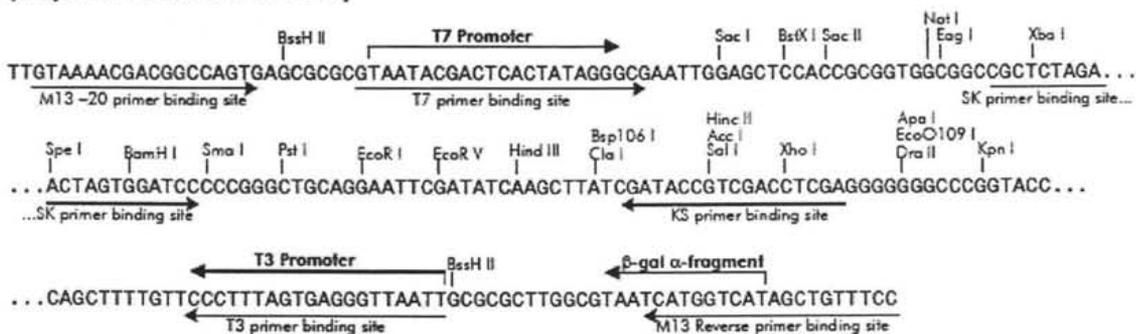
Construction date: 1/97

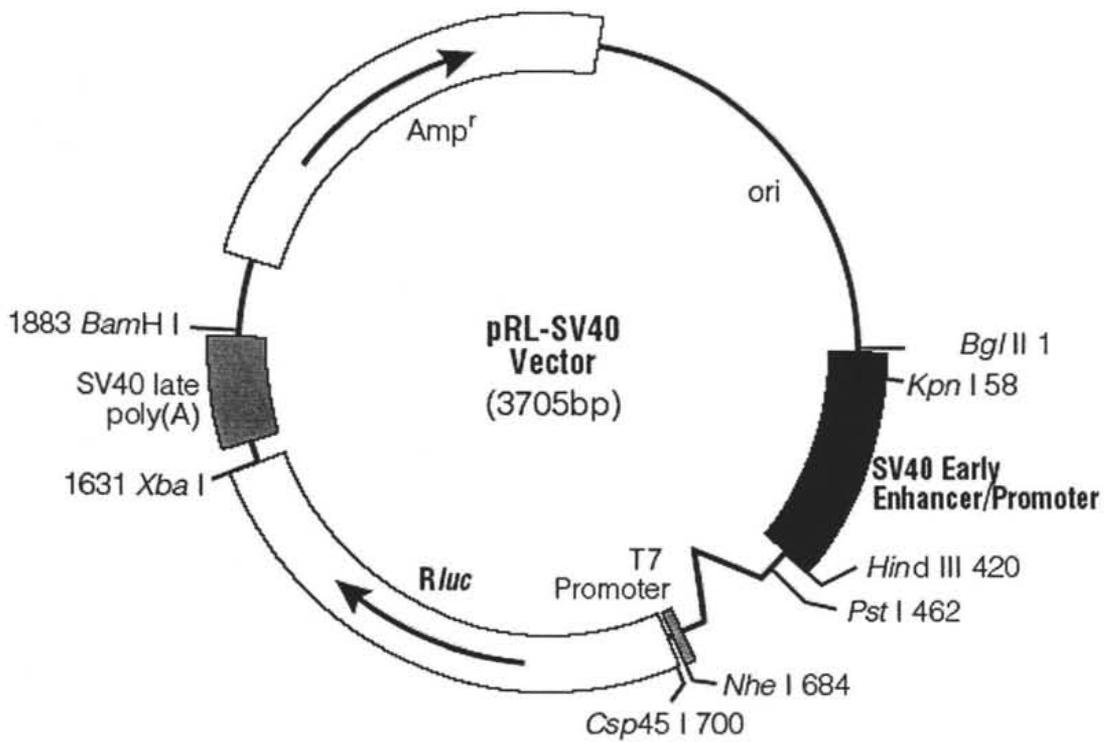
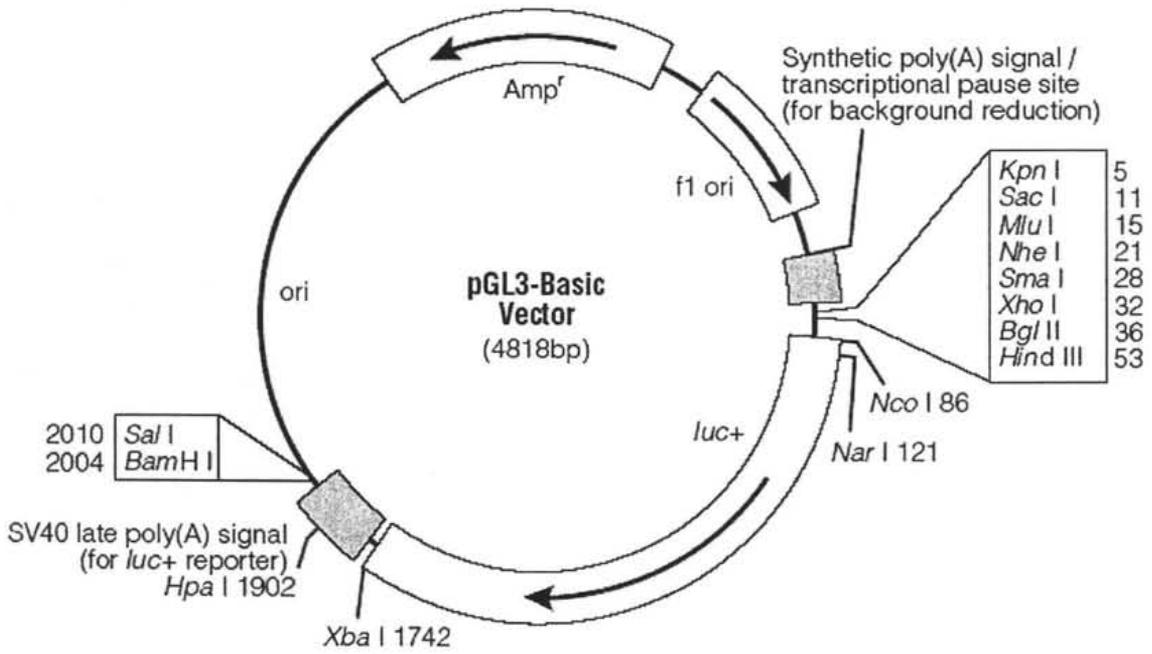
Comments/References: Generated from pBR322 by replacing EcoRI-Sall fragment with a -50bp oligo containing MCS. All sites in MCS are unique.

pBlueScript II KS(+): GenBank #52327



pBlueScript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)





11. Referencias

- Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF- β . *Nat Cell Biol* 2002 Aug; **4**(8): 599-604.
- Abzhanov A, Protas M, Grant BR, Grant PR, Tabin CJ. Bmp4 and morphological variation of beaks in Darwin's finches. *Science* 2004 Sep 3; **305**(5689): 1462-5.
- Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP Jr. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J Cell Biol* 2003 Jul 21; **162**(2): 341-51.
- Aitola M, Carlsson P, Mahlapuu M, Enerback S, Pelto-Huikko M. Forkhead transcription factor FoxF2 is expressed in mesodermal tissues involved in epithelio-mesenchymal interactions. *Dev Dyn* 2000 May; **218**(1): 136-49.
- Akhurst RJ, Lehnert SA, Faissner A, Duffie E. TGF β in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* 1990 Apr; **108**(4): 645-56.
- Alberts, Bruce, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson. Molecular Biology of the Cell. 3rd. ed. New York: Garland Publishing, 1994.
- Alliston T, Choy L, Ducey P, Karsenty G, Derynck R. TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases *cbfa1* and *osteocalcin* expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001 May 1; **20**(9): 2254-72.
- Alric S, Froeschle A, Piquemal D, Carnac G, Bonniou A. Functional specificity of the two retinoic acid receptor RAR and RXR families in myogenesis. *Oncogene* 1998 Jan 15; **16**(2): 273-82.
- Anastasi S, Giordano S, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio P, Amati P. A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. *J Cell Biol* 1997 Jun 2; **137**(5): 1057-68.
- Andres JL, Stanley K, Cheifetz S, Massagué J. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol* 1989 Dec; **109**(6 Pt 1): 3137-45.
- Andres JL, Ronnstrand L, Cheifetz S, Massagué J. Purification of the transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 1991 Dec 5; **266**(34): 23282-7.
- Andres JL, DeFalcois D, Noda M, Massagué J. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 1992 Mar 25; **267**(9): 5927-30.
- Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Jun; **86**(12): 4544-8.
- Armes NA, Smith JC. The ALK-2 and ALK-4 activin receptors transduce distinct mesoderm-inducing signals during early *Xenopus* development but do not co-operate to establish thresholds. *Development* 1997 Oct; **124**(19): 3797-804.
- Arrick BA, Lee AL, Grendell RL, Derynck R. Inhibition of translation of transforming growth factor- β 3 mRNA by its 5' untranslated region. *Mol Cell Biol* 1991 Sep; **11**(9): 4306-13.
- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983 Jun 10; **258**(11): 7155-60.
- Atchley WR, Fitch WM, Bronner-Fraser M. Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Nov 22; **91**(24): 11522-6.
- Atfi A, Buisine M, Mazars A, Gespach C. Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor- β through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem* 1997 Oct 3; **272**(40): 24731-4.
- Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL. Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 1993 Nov 19; **75**(4): 671-80.
- Attisano L, Tuen Lee-Hoeflich S. The Smads. *Genome Biol* 2001; **2**(8): REVIEWS3010.
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.). Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- Bae HW, Geiser AG, Kim DH, Chung MT, Burmester JK, Sporn MB, Roberts AB, Kim SJ. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor- β type II receptor gene. *J Biol Chem* 1995 Dec 8; **270**(49): 29460-8.
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 2000 Nov 24; **275**(47): 36803-10.

11. Referencias

- Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF- β . *Nat Cell Biol* 2002 Aug; **4**(8): 599-604.
- Abzhanov A, Protas M, Grant BR, Grant PR, Tabin CJ. Bmp4 and morphological variation of beaks in Darwin's finches. *Science* 2004 Sep 3; **305**(5689): 1462-5.
- Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP Jr. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J Cell Biol* 2003 Jul 21; **162**(2): 341-51.
- Aitola M, Carlsson P, Mahlapuu M, Enerback S, Pelto-Huikko M. Forkhead transcription factor FoxF2 is expressed in mesodermal tissues involved in epithelio-mesenchymal interactions. *Dev Dyn* 2000 May; **218**(1): 136-49.
- Akhurst RJ, Lehnert SA, Faissner A, Duffie E. TGF β in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* 1990 Apr; **108**(4): 645-56.
- Alberts, Bruce, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson. Molecular Biology of the Cell. 3rd. ed. New York: Garland Publishing, 1994.
- Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases *cbfa1* and *osteocalcin* expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001 May 1; **20**(9): 2254-72.
- Alric S, Froeschle A, Piquemal D, Carnac G, Bonniou A. Functional specificity of the two retinoic acid receptor RAR and RXR families in myogenesis. *Oncogene* 1998 Jan 15; **16**(2): 273-82.
- Anastasi S, Giordano S, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio P, Amati P. A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. *J Cell Biol* 1997 Jun 2; **137**(5): 1057-68.
- Andres JL, Stanley K, Cheifetz S, Massagué J. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol* 1989 Dec; **109**(6 Pt 1): 3137-45.
- Andres JL, Ronnstrand L, Cheifetz S, Massagué J. Purification of the transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 1991 Dec 5; **266**(34): 23282-7.
- Andres JL, DeFalcois D, Noda M, Massagué J. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 1992 Mar 25; **267**(9): 5927-30.
- Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Jun; **86**(12): 4544-8.
- Armes NA, Smith JC. The ALK-2 and ALK-4 activin receptors transduce distinct mesoderm-inducing signals during early *Xenopus* development but do not co-operate to establish thresholds. *Development* 1997 Oct; **124**(19): 3797-804.
- Arrick BA, Lee AL, Grendell RL, Derynck R. Inhibition of translation of transforming growth factor- β 3 mRNA by its 5' untranslated region. *Mol Cell Biol* 1991 Sep; **11**(9): 4306-13.
- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983 Jun 10; **258**(11): 7155-60.
- Atchley WR, Fitch WM, Bronner-Fraser M. Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Nov 22; **91**(24): 11522-6.
- Atfi A, Buisine M, Mazars A, Gespach C. Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor- β through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem* 1997 Oct 3; **272**(40): 24731-4.
- Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL. Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 1993 Nov 19; **75**(4): 671-80.
- Attisano L, Tuen Lee-Hoeflich S. The Smads. *Genome Biol* 2001; **2**(8): REVIEWS3010.
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.). Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- Bae HW, Geiser AG, Kim DH, Chung MT, Burmester JK, Sporn MB, Roberts AB, Kim SJ. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor- β type II receptor gene. *J Biol Chem* 1995 Dec 8; **270**(49): 29460-8.
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 2000 Nov 24; **275**(47): 36803-10.

- Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 1999 Mar 26; **283**(5410): 2080-2.
- Buckingham M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 2001 Aug; **11**(4): 440-8.
- Cadoret A, Ovejero C, Saadi-Kheddouci S, Souil E, Fabre M, Romagnolo B, Kahn A, Perret C. Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of β -catenin. *Cancer Res* 2001 Apr 15; **61**(8): 3245-9.
- Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 2003 Dec; **9**(12): 1520-7.
- Caver TE, O'Sullivan FX, Gold LI, Gresham HD. Intracellular demonstration of active TGF β 1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice. IgG-bound TGF β 1 suppresses neutrophil function and host defense against *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Invest* 1996 Dec 1; **98**(11): 2496-506.
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987 Feb 25; **262**(6): 2869-74.
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Parathyroid hormone modulates transforming growth factor β activity and binding in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat parietal bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Aug; **85**(16): 5889-93.
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Glucocorticoid regulation of transforming growth factor β 1 activity and binding in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Mol Cell Biol* 1991 Sep; **11**(9): 4490-6.
- Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor- β gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994 Feb; **15**(1): 27-39.
- Centrella M, Casinghino S, Kim J, Pham T, Rosen V, Wozney J, McCarthy TL. Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor β induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype. *Mol Cell Biol* 1995 Jun; **15**(6): 3273-81.
- Chakraborty T, Brennan TJ, Li L, Edmondson D, Olson EN. Inefficient homooligomerization contributes to the dependence of myogenin on E2A products for efficient DNA binding. *Mol Cell Biol* 1991 Jul; **11**(7): 3633-41.
- Chakravarthy D, Green AR, Green VL, Kerin MJ, Speirs V. Expression and secretion of TGF- β isoforms and expression of TGF- β -receptors I, II and III in normal and neoplastic human breast. *Int J Oncol* 1999 Jul; **15**(1): 187-94.
- Chapman SC, Bernard DJ, Jelen J, Woodruff TK. Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2002 Oct 31; **196**(1-2): 79-93.
- Cheifetz S, Like B, Massagué J. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1986 Jul 25; **261**(21): 9972-8.
- Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 1987 Feb 13; **48**(3): 409-15.
- Cheifetz S, Andres JL, Massagué J. The transforming growth factor- β receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem* 1988 Nov 15; **263**(32): 16984-91.
- Cheifetz S, Massagué J. Transforming growth factor- β (TGF- β) receptor proteoglycan. Cell surface expression and ligand binding in the absence of glycosaminoglycan chains. *J Biol Chem* 1989 Jul 15; **264**(20): 12025-8.
- Cheifetz S, Massagué J. Isoform-specific transforming growth factor- β binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem* 1991 Nov 5; **266**(31): 20767-72.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992 Sep 25; **267**(27): 19027-30.
- Chen C, Wang XF, Sun L. Expression of transforming growth factor β (TGF β) type III receptor restores autocrine TGF β 1 activity in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 1997 May 9; **272**(19): 12862-7.
- Chen EH, Pryce BA, Tzeng JA, González GA, Olson EN. Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell* 2003 Sep 19; **114**(6): 751-62.
- Chen F, Weinberg RA. Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth factor β receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 28; **92**(5): 1565-9.
- Chen RH, Ebner R, Derynck R. Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- β activities. *Science* 1993 May 28; **260**(5112): 1335-8.
- Chen RH, Derynck R. Homomeric interactions between type II transforming growth factor- β receptors. *J Biol Chem* 1994 Sep 9; **269**(36): 22868-74.
- Chen RH, Moses HL, Maruoka EM, Derynck R, Kawabata M. Phosphorylation-dependent interaction of the cytoplasmic domains of the type I and type II transforming growth factor- β receptors. *J Biol Chem* 1995a May 19; **270**(20): 12235-41.

- Chen RH, Miettinen PJ, Maruoka EM, Choy L, Derynck R. A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF- β receptor. *Nature* 1995b Oct 12; **377**(6549): 548-52.
- Chen RH, Su YH, Chuang RL, Chang TY. Suppression of transforming growth factor- β -induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* 1998 Oct 15; **17**(15): 1959-68.
- Chen S, Guttridge DC, You Z, Zhang Z, Fribley A, Mayo MW, Kitajewski J, Wang CY. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating β -catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 2001 Jan 8; **152**(1): 87-96.
- Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ. Dishevelled 2 recruits β -arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 2003a Sep 5; **301**(5638): 1391-4.
- Chen W, Kirkbride KC, How T, Nelson CD, Mo J, Frederick JP, Wang XF, Lefkowitz RJ, Blobe GC. β -arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- β receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 2003b Sep 5; **301**(5638): 1394-7.
- Chen X, Rubock MJ, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature* 1996 Oct 24; **383**(6602): 691-6. *Erratum in: Nature* 1996 Dec 19-26; **384**(6610): 648.
- Chen Y, Li X, Eswarakumar VP, Seger R, Lonai P. Fibroblast growth factor (FGF) signaling through PI 3-kinase and Akt/PKB is required for embryoid body differentiation. *Oncogene* 2000 Aug 3; **19**(33): 3750-6.
- Choy L, Skillington J, Derynck R. Roles of autocrine TGF- β receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* 2000 May 1; **149**(3): 667-82.
- Choy L, Derynck R. Transforming growth factor- β inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* 2003 Mar 14; **278**(11): 9609-19.
- Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, Ward JM, Mizel DE, Mackall CL, Gress RE, Hines KL, Tian H, Karlsson S. Immune dysregulation in TGF- β 1-deficient mice. *J Immunol* 1994 Sep 1; **153**(5): 1936-46.
- Cochet C, Feige JJ, Chambaz EM. Bovine adrenocortical cells exhibit high affinity transforming growth factor- β receptors which are regulated by adrenocorticotropin. *J Biol Chem* 1988 Apr 25; **263**(12): 5707-13.
- Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM Jr, Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 2004 Apr; **6**(4): 366-72.
- Corbeil HB, Whyte P, Branton PE. Characterization of transcription factor E2F complexes during muscle and neuronal differentiation. *Oncogene* 1995 Sep 7; **11**(5): 909-20.
- Cossu G, Borello U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J* 1999 Dec 15; **18**(24): 6867-72.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell* 1998 Jun 26; **93**(7): 1159-70.
- Cui XM, Shuler CF. The TGF- β type III receptor is localized to the medial edge epithelium during palatal fusion. *Int J Dev Biol* 2000 Jun; **44**(4): 397-402.
- Czarnecki CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor- β 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol* 1988 Jun 15; **140**(12): 4217-23.
- Dabovic B, Chen Y, Colarossi C, Obata H, Zambuto L, Perle MA, Rifkin DB. Bone abnormalities in *latent TGF- β binding protein (Ltbp)-3*-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF- β bioavailability. *J Cell Biol* 2002 Jan 21; **156**(2): 227-32.
- Dang H, Geiser AG, Letterio JJ, Nakabayashi T, Kong L, Fernández G, Talal N. SLE-like autoantibodies and Sjögren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF- β knockout mice. *J Immunol* 1995 Sep 15; **155**(6): 3205-12.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. Crystal structure of transforming growth factor- β 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 1992 Jul 17; **257**(5068): 369-73.
- Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Sakitani K, Shibano K, Okajima A, Yamamoto C, Ogata N, Okumura T, Seki T, Kubota Y, Kan M, McKeenan WL, Inoue K. Differential expression of transforming growth factor- β and its receptors in hepatocytes and nonparenchymal cells of rat liver after CCl₄ administration. *J Hepatol* 1998 Apr; **28**(4): 572-81.
- Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor β induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Jun 6; **92**(12): 5545-9.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987 Dec 24; **51**(6): 987-1000.
- De Angelis L, Borghi S, Melchionna R, Berghella L, Baccarani-Contri M, Parise F, Ferrari S, Cossu G. Inhibition of myogenesis by transforming growth factor β is density-dependent and related to the translocation of transcription factor MEF2 to the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Oct 13; **95**(21): 12358-63.

- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999 Nov 15; **147**(4): 869-78.
- de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jul 21; **95**(15): 8847-51.
- de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, Crabtree GR, Mak TW. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 1998 Mar 12; **392**(6672): 182-6.
- de Martin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schlusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor- β gene family. *EMBO J* 1987 Dec 1; **6**(12): 3673-7.
- del Re E, Babbitt JL, Pirani A, Schneyer AL, Lin HY. In the absence of type III receptor, the transforming growth factor (TGF)- β type II-B receptor requires the type I receptor to bind TGF- β 2. *J Biol Chem* 2004 May 21; **279**(21): 22765-72.
- Denef N, Neubuser D, Pérez L, Cohen SM. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 2000 Aug 18; **102**(4): 521-31.
- Deng X, Bellis S, Yan Z, Friedman E. Differential responsiveness to autocrine and exogenous transforming growth factor (TGF) β 1 in cells with nonfunctional TGF- β receptor type III. *Cell Growth Differ* 1999 Jan; **10**(1): 11-8.
- Dennis PA, Rifkin DB. Cellular activation of latent transforming growth factor β requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jan 15; **88**(2): 580-4.
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985 Aug 22-28; **316**(6030): 701-5.
- Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ, et al. A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. *EMBO J* 1988 Dec 1; **7**(12): 3737-43.
- Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF β family signals. *Cell* 1996 Oct 18; **87**(2): 173.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001 Oct; **29**(2): 117-29. *Erratum in Nat Genet* 2001 Nov; **29**(3): 351.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 2003 Oct 9; **425**(6958): 577-84.
- Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM, Emerson CP Jr. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* 2001 Aug 31; **293**(5535): 1663-6.
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knock out mice. *Development* 1995 Jun; **121**(6): 1845-54.
- Dohmann CE, Belaoussoff M, Raftery LA. Dynamic expression of TSC-22 at sites of epithelial-mesenchymal interactions during mouse development. *Mech Dev* 1999 Jun; **84**(1-2): 147-51.
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor β 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 1995 May 5; **270**(18): 10618-24.
- Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, Seidah NG. Evidence that furin is an authentic transforming growth factor- β 1-converting enzyme. *Am J Pathol* 2001 Jan; **158**(1): 305-16.
- Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 1997 Sep 15; **16**(18): 5687-96.
- Dyson S, Gurdon JB. The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors. *Cell* 1998 May 15; **93**(4): 557-68.
- Ebner R, Chen RH, Shum L, Lawler S, Zioncheck TF, Lee A, López AR, Derynck R. Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β binding to the type II receptor. *Science* 1993a May 28; **260**(5112): 1344-8.
- Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R. Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 1993b Nov 5; **262**(5135): 900-2.
- Edmondson DG, Olson EN. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* 1989 May; **3**(5): 628-40. *Erratum in Genes Dev* 1990 Aug; **4**(8): 1450.

- Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN. Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol Cell Biol* 1992 Sep; **12**(9): 3665-77.
- Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells RG. Betaglycan inhibits TGF- β signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 2002 Jan 4; **277**(1): 823-9.
- Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- β -mediated transcription. *J Biol Chem* 1999 Dec 24; **274**(52): 37413-20.
- Erlebacher A, Derynck R. Increased expression of TGF- β 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 1996 Jan; **132**(1-2): 195-210.
- Esparza López J, Montiel JL, Vilchis Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, López Casillas F. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor- β superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor- β and inhibin A. *J Biol Chem* 2001 May 4; **276**(18): 14588-96.
- Ethier JF, Farnworth PG, Findlay JK, Ooi GT. Transforming growth factor- β modulates inhibin A bioactivity in the L β T2 gonadotrope cell line by competing for binding to betaglycan. *Mol Endocrinol* 2002 Dec; **16**(12): 2754-63.
- Evangelou A, Jindal SK, Brown TJ, Letarte M. Down-regulation of transforming growth factor β receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2000 Feb 15; **60**(4): 929-35.
- Ewen ME, Sluss HK, Whitehouse LL, Livingston DM. TGF β inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 1993 Sep 24; **74**(6): 1009-20.
- Ewton DZ, Spizz G, Olson EN, Florini JR. Decrease in transforming growth factor- β binding and action during differentiation in muscle cells. *J Biol Chem* 1988 Mar 15; **263**(8): 4029-32.
- Farnworth PG, Harrison CA, Leembruggen P, Chan KL, Stanton PG, Ooi GT, Rahman NA, Huhtaniemi IT, Findlay JK, Robertson DM. Inhibin binding sites and proteins in pituitary, gonadal, adrenal and bone cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001 Jun 30; **180**(1-2): 63-71.
- Fava RA, McClure DB. Fibronectin-associated transforming growth factor. *J Cell Physiol* 1987 May; **131**(2): 184-9.
- Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce $p15^{Ink4B}$ transcription in response to TGF- β . *EMBO J* 2000 Oct 2; **19**(19): 5178-93.
- Fickett JW. Coordinate positioning of MEF2 and myogenin binding sites. *Gene* 1996 Jun 12; **172**(1): GC19-32.
- Filvaroff EH, Ebner R, Derynck R. Inhibition of myogenic differentiation in myoblasts expressing a truncated type II TGF- β receptor. *Development* 1994 May; **120**(5): 1085-95.
- Findlay JK, Drummond AE, Dyson M, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2001 Jun 30; **180**(1-2): 139-44.
- Fine A, Panchenko MP, Smith BD, Yu Q, Goldstein RH. Discordant regulation of transforming growth factor- β receptors by prostaglandin E2. *Biochim Biophys Acta* 1995 Mar 14; **1261**(1): 19-24.
- Fitzpatrick DR, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. Differential expression of TGF β isoforms in murine palatogenesis. *Development* 1990 Jul; **109**(3): 585-95.
- Flaumenhaft R, Kojima S, Abe M, Rifkin DB. Activation of latent transforming growth factor β . *Adv Pharmacol* 1993a; **24**: 51-76.
- Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y, Miyazono K, Harpel J, Heldin CH, Rifkin DB. Role of the latent TGF- β binding protein in the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1993b Feb; **120**(4): 995-1002.
- Florini JR, Roberts AB, Ewton DZ, Falen SL, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor- β . A very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the differentiation inhibitor secreted by Buffalo rat liver cells. *J Biol Chem* 1986 Dec 15; **261**(35): 16509-13.
- Florini JR, Magri KA, Ewton DZ, James PL, Grindstaff K, Rotwein PS. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem* 1991 Aug 25; **266**(24): 15917-23.
- Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massagué J, Bernard O, Soosairajah J. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* 2003 Sep 15; **162**(6): 1089-98.
- Franzén P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K. Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor. *Cell* 1993 Nov 19; **75**(4): 681-92.
- Friedman SL, Yamasaki G, Wong L. Modulation of transforming growth factor β receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. Enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and *in vivo*. *J Biol Chem* 1994 Apr 8; **269**(14): 10551-8.

- Froeschle A, Alric S, Kitzmann M, Carnac G, Aurade F, Rochette-Egly C, Bonniou A. Retinoic acid receptors and muscle b-HLH proteins: partners in retinoid-induced myogenesis. *Oncogene* 1998 Jul 2; **16**(26): 3369-78. *Erratum in: Oncogene* 1998 Dec 10; **17**(23): 3071.
- Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type β transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Jun; **80**(12): 3676-80.
- Fuentealba L, Carey DJ, Brandán E. Antisense inhibition of syndecan-3 expression during skeletal muscle differentiation accelerates myogenesis through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1999 Dec 31; **274**(53): 37876-84.
- Fujii H, Hamada H. A CNS-specific POU transcription factor, Brn-2, is required for establishing mammalian neural cell lineages. *Neuron* 1993 Dec; **11**(6): 1197-206.
- Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, Miyazono K. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 2001 May; **12**(5): 1431-43.
- Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T, Rosenzweig A, Taylor WG, Rubin JS, Perrella MA, Lee ME. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem* 2001 May 18; **276**(20): 17479-83.
- Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone MA Jr, Falb D, Huszar D. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000 Feb; **24**(2): 171-4.
- Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor- β receptors types II and III within various cells in the rat periodontium. *J Periodontol Res* 1999 Feb; **34**(2): 113-22.
- García Sáinz, Jesús Adolfo. Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular. 3era. edición. Tomo 28 de la colección "La ciencia para todos". México, D.F.: Fondo de Cultura Económica, 1998.
- Geiser AG, Burmester JK, Webbink R, Roberts AB, Sporn MB. Inhibition of growth by transforming growth factor- β following fusion of two nonresponsive human carcinoma cell lines. Implication of the type II receptor in growth inhibitory responses. *J Biol Chem* 1992 Feb 5; **267**(4): 2588-93.
- Geng Y, Weinberg RA. Transforming growth factor β effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Nov 1; **90**(21): 10315-9.
- Gerhart, John and Marc Kirschner. Cells, embryos, and evolution. Toward a cellular and developmental understanding of phenotypic variation and evolutionary adaptability. Malden, Massachusetts: Blackwell Science, 1998.
- Gilbert, Scott F. Developmental biology. 6th. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2000.
- Gilboa L, Wells RG, Lodish HF, Henis YI. Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor β receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* 1998 Feb 23; **140**(4): 767-77.
- Glick AB, Flanders KC, Danielpour D, Yuspa SH, Sporn MB. Retinoic acid induces transforming growth factor- β 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regul* 1989 Nov; **1**(1): 87-97.
- Gompel N, Prud'homme B, Wittkopp PJ, Kassner VA, Carroll SB. Chance caught on the wing: cis-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*. *Nature* 2005 Feb 3; **433**(7025): 481-7.
- Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990 May 25; **265**(15): 8361-4.
- Graff JM, Bansal A, Melton DA. *Xenopus* Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF β superfamily. *Cell* 1996 May 17; **85**(4): 479-87.
- Gray AM, Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor- β 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 1990 Mar 16; **247**(4948): 1328-30.
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jan 23; **93**(2): 878-83.
- Griswold-Prenner I, Kamibayashi C, Maruoka EM, Mumby MC, Derynck R. Physical and functional interactions between type I transforming growth factor β receptors and β α , a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* 1998 Nov; **18**(11): 6595-604.
- Grover J, Roughley PJ. Expression of cell-surface proteoglycan mRNA by human articular chondrocytes. *Biochem J* 1995 Aug 1; **309**(Pt 3): 963-8.
- Guyton, Arthur C. y John E. Hall. Tratado de Fisiología Médica. 10ma. edición. México, D.F.: McGraw-Hill, 2001.
- Halevy O, Lerman O. Retinoic acid induces adult muscle cell differentiation mediated by the retinoic acid receptor- α . *J Cell Physiol* 1993 Mar; **154**(3): 566-72.
- Halevy O, Novitsch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 1995 Feb 17; **267**(5200): 1018-21.
- Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994 Sep 15; **371**(6494): 257-61.

- Harpel JG, Metz CN, Kojima S, Rifkin DB. Control of transforming growth factor- β activity: latency vs. activation. *Prog Growth Factor Res* 1992; **4**(4): 321-35.
- Harrison CA, Farnworth PG, Chan KL, Stanton PG, Ooi GT, Findlay JK, Robertson DM. Identification of specific inhibin A-binding proteins on mouse Leydig (TM3) and sertoli (TM4) cell lines. *Endocrinology* 2001 Apr; **142**(4): 1393-402.
- Hart PJ, Deep S, Taylor AB, Shu Z, Hinck CS, Hinck AP. Crystal structure of the human T β R2 ectodomain—TGF- β 3 complex. *Nat Struct Biol* 2002 Mar; **9**(3): 203-8.
- Hassouna N, Michot B, Bachellerie JP. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1984 Apr 25; **12**(8): 3563-83.
- Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 1998a Jan 15; **12**(2): 186-97.
- Hata A, Shi Y, Massagué J. TGF- β signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 1998b Jun; **4**(6): 257-62.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* 1997 Jun 27; **89**(7): 1165-73.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 3; **95**(5): 2509-14.
- Heanue TA, Reshef R, Davis RJ, Mardon G, Oliver G, Tomarev S, Lassar AB, Tabin CJ. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev* 1999 Dec 15; **13**(24): 3231-43.
- Heikinheimo K, Happonen RP, Miettinen PJ, Ritvos O. Transforming growth factor β 2 in epithelial differentiation of developing teeth and odontogenic tumors. *J Clin Invest* 1993 Mar; **91**(3): 1019-27.
- Heimark RL, Twardzik DR, Schwartz SM. Inhibition of endothelial regeneration by type- β transforming growth factor from platelets. *Science* 1986 Sep 5; **233**(4768): 1078-80.
- Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB. Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1987 Dec; **105**(6 Pt 2): 2861-76.
- Heino J, Massagué J. Cell adhesion to collagen and decreased myogenic gene expression implicated in the control of myogenesis by transforming growth factor β . *J Biol Chem* 1990 Jun 25; **265**(18): 10181-4.
- Henis YI, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF. The types II and III transforming growth factor- β receptors form homo-oligomers. *J Cell Biol* 1994 Jul; **126**(1): 139-54.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 2000 Jul 6; **406**(6791): 86-90.
- Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 2003 May 16; **113**(4): 483-94.
- Hu JS, Olson EN. Functional receptors for transforming growth factor- β are retained by biochemically differentiated C₂ myocytes in growth factor-deficient medium containing EGTA but down-regulated during terminal differentiation. *J Biol Chem* 1990 May 15; **265**(14): 7914-9.
- Huang SS, O'Grady P, Huang JS. Human transforming growth factor β : α 2-macroglobulin complex is a latent form of transforming growth factor β . *J Biol Chem* 1988 Jan 25; **263**(3): 1535-41.
- Hunter R. Standardization of the chloramine-T method of protein iodination. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970 Mar; **133**(3): 989-92.
- Huse M, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF β receptor in complex with FKBP12. *Cell* 1999 Feb 5; **96**(3): 425-36.
- Iezzi S, Di Padova M, Serra C, Caretti G, Simone C, Maklan E, Minetti G, Zhao P, Hoffman EP, Puri PL, Sartorelli V. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev Cell* 2004 May; **6**(5): 673-84.
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993 Jun; **4**(6): 637-45.
- Ignotz RA, Massagué J. Type β transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Dec; **82**(24): 8530-4.
- Inman GJ, Hill CS. Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem* 2002 Dec 27; **277**(52): 51008-16.
- Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- β receptor activity. *Mol Cell* 2002 Aug; **10**(2): 283-94.
- Iolascon A, Giordani L, Borriello A, Carbone R, Izzo A, Tonini GP, Gambini C, Della Ragione F. Reduced expression of transforming growth factor- β receptor type III in high stage neuroblastomas. *Br J Cancer* 2000 Mar; **82**(6): 1171-6.

- Itoh S, Landstrom M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P. Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* 1998 Oct 30; **273**(44): 29195-201.
- James K. Interactions between cytokines and α 2-macroglobulin. *Immunol Today* 1990 May; **11**(5): 163-6.
- Jen Y, Weintraub H, Benezra R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: *in vivo* association of Id with E2A proteins. *Genes Dev* 1992 Aug; **6**(8): 1466-79.
- Jeruss JS, Santiago JY, Woodruff TK. Localization of activin and inhibin subunits, receptors and SMADs in the mouse mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* 2003 May 30; **203**(1-2): 185-96.
- Ji C, Casinighino S, McCarthy TL, Centrella M. Cloning, characterization, and expression of the transforming growth factor- β type I receptor promoter in fetal rat bone cells. *J Cell Biochem* 1996 Dec 15; **63**(4): 478-90.
- Ji C, Chen Y, McCarthy TL, Centrella M. Cloning the promoter for transforming growth factor- β type III receptor. Basal and conditional expression in fetal rat osteoblasts. *J Biol Chem* 1999 Oct 22; **274**(43): 30487-94.
- Jiang Y, McLennan IS, Koishi K, Hendry IA. Transforming growth factor- β 2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve injury. *Neuroscience* 2000; **97**(4): 735-42.
- Johnson DW, Qumsiyeh M, Benkhalifa M, Marchuk DA. Assignment of human transforming growth factor- β type I and type III receptor genes (TGFBR1 and TGFBR3) to 9q33-q34 and 1p32-p33, respectively. *Genomics* 1995 Jul 20; **28**(2): 356-7.
- Johnston LA, Tapscott SJ, Eisen H. Sodium butyrate inhibits myogenesis by interfering with the transcriptional activation function of MyoD and myogenin. *Mol Cell Biol* 1992 Nov; **12**(11): 5123-30.
- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990 Jun; **110**(6): 2195-207.
- Joyce NC, Zieske JD. Transforming growth factor- β receptor expression in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997 Sep; **38**(10): 1922-8.
- Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995 Dec; **11**(4): 415-21.
- Kaname S, Ruoslahti E. Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor- β 1. *Biochem J* 1996 May 1; **315**(Pt 3): 815-20.
- Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF β response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003 Apr; **11**(4): 915-26.
- Kanzaki T, Olofsson A, Moren A, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L, Heldin CH. TGF- β 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF- β 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 1990 Jun 15; **61**(6): 1051-61.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C₂C₁₂ myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994 Dec; **127**(6 Pt 1): 1755-66. *Erratum in: J Cell Biol* 1995 Feb; **128**(4): following 713.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Engel ME, Moses HL. Interaction of the transforming growth factor- β type I receptor with farnesyl-protein transferase- α . *J Biol Chem* 1995 Dec 15; **270**(50): 29628-31.
- Keller JR, McNiece IK, Sill KT, Ellingsworth LR, Quesenberry PJ, Sing GK, Ruscetti FW. Transforming growth factor β directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. *Blood* 1990 Feb 1; **75**(3): 596-602.
- Kim, Seong-Jin, Anita B. Roberts and Michael B. Sporn. Transcriptional regulation of TGF- β s 1, 2 and 3. *Cell Biology International Reports*, Volume 14, Supplement 1, September 1990, Page 16.
- Kim SJ, Park K, Koeller D, Kim KY, Wakefield LM, Sporn MB, Roberts AB. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor- β 1 gene. *J Biol Chem* 1992 Jul 5; **267**(19): 13702-7.
- Kim Y, Ratzliff V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL. Transcriptional activation of transforming growth factor β 1 and its receptors by the Krüppel-like factor Zfp9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 1998 Dec 11; **273**(50): 33750-8.
- Kingsley DM. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994 Jan; **8**(2): 133-46.
- Klemm JD, Beals CR, Crabtree GR. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol* 1997 Sep 1; **7**(9): 638-44.
- Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massagué J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF- β . *Science* 1993 Apr 23; **260**(5107): 536-9.
- Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, Ebina M, Nukiwa T, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. Arkadia amplifies TGF- β superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J* 2003 Dec 15; **22**(24): 6458-70.

- Koli KM, Ramsey TT, Ko Y, Dugger TC, Brattain MG, Arteaga CL. Blockade of transforming growth factor- β signaling does not abrogate antiestrogen-induced growth inhibition of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1997 Mar 28; **272**(13): 8296-302.
- Konig S, Hinard V, Arnaudeau S, Holzer N, Potter G, Bader CR, Bernheim L. Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. *J Biol Chem* 2004 Jul 2; **279**(27): 28187-96.
- Kovacina KS, Steele-Perkins G, Purchio AF, Lioubin M, Miyazono K, Heldin CH, Roth RA. Interactions of recombinant and platelet transforming growth factor- β 1 precursor with the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Apr 14; **160**(1): 393-403.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993 Aug 27; **74**(4): 679-91.
- Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massagué J. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997 Apr 15; **11**(8): 984-95.
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. A mechanism of repression of TGF β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999 Apr 1; **13**(7): 804-16.
- Kuhn I, Bartholdi MF, Salamon H, Feldman RI, Roth RA, Johnson PH. Identification of AKT-regulated genes in inducible MERAkt cells. *Physiol Genomics* 2001 Dec 21; **7**(2): 105-14.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jan 15; **90**(2): 770-4.
- Kyprianou N, Isaacs JT. Identification of a cellular receptor for transforming growth factor- β in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* 1988 Oct; **123**(4):2124-31.
- Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980 Mar 1; **102**(2): 344-52.
- LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002 Nov 15; **111**(4): 589-601.
- Labbé E, Letamendía A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jul 18; **97**(15): 8358-63.
- Lafyatis R, Lechleider R, Roberts AB, Sporn MB. Secretion and transcriptional regulation of transforming growth factor- β 3 during myogenesis. *Mol Cell Biol* 1991 Jul; **11**(7): 3795-803.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- β signalling pathways. *Nature* 1996 Oct 31; **383**(6603): 832-6.
- Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM, Massagué J. Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 1990a Jul 13; **62**(1): 175-85.
- Laiho M, Weis MB, Massagué J. Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)- β receptor types I and II in TGF- β -resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. *J Biol Chem* 1990b Oct 25; **265**(30): 18518-24.
- Laiho M, Weis FM, Boyd FT, Ignatz RA, Massagué J. Responsiveness to transforming growth factor- β (TGF- β) restored by genetic complementation between cells defective in TGF- β receptors I and II. *J Biol Chem* 1991 May 15; **266**(14): 9108-12.
- LaMarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, Hussaini I, Hall SW, Gonias SL. An α 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor- β 1 in mice. *J Clin Invest* 1991 Jan; **87**(1): 39-44.
- Larraín J, Cizmeci-Smith G, Troncoso V, Stahl RC, Carey DJ, Brandán E. Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. Modulation by growth factors and retinoic acid. *J Biol Chem* 1997a Jul 18; **272**(29): 18418-24.
- Larraín J, Álvarez J, Hassell JR, Brandán E. Expression of perlecan, a proteoglycan that binds myogenic inhibitory basic fibroblast growth factor, is down regulated during skeletal muscle differentiation. *Exp Cell Res* 1997b Aug 1; **234**(2): 405-12.
- Larraín J, Carey DJ, Brandán E. Syndecan-1 expression inhibits myoblast differentiation through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1998 Nov 27; **273**(48): 32288-96.
- Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins *in vivo*. *Cell* 1991 Jul 26; **66**(2): 305-15.
- Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, López LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabeu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J Cell Biol* 1996 Jun; **133**(5): 1109-21.
- Lawler S, Candia AF, Ebner R, Shum L, López AR, Moses HL, Wright CV, Derynck R. The murine type II TGF- β receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF- β 1. *Development* 1994 Jan; **120**(1): 165-75.

- Le Magueresse-Battistoni B, Morera AM, Goddard I, Benahmed M. Expression of mRNAs for transforming growth factor- β receptors in the rat testis. *Endocrinology* 1995 Jun; **136**(6): 2788-91.
- Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 61-86.
- Lehnert SA, Akhurst RJ. Embryonic expression pattern of TGF β type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development* 1988 Oct; **104**(2): 263-73.
- Leof EB, Proper JA, Goustin AS, Shipley GD, DiCorleto PE, Moses HL. Induction of *c-sis* mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor β : a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Apr; **83**(8): 2453-7.
- Letamendía A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- β . A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998 Dec 4; **273**(49): 33011-9.
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 2000 Mar 23; **404**(6776): 411-4.
- Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 2001 Jun 1; **105**(5): 599-612.
- Li FQ, Coonrod A, Horwitz M. Preferential MyoD homodimer formation demonstrated by a general method of dominant negative mutation employing fusion with a lysosomal protease. *J Cell Biol* 1996 Nov; **135**(4): 1043-57.
- Li L, Zhou J, James G, Heller-Harrison R, Czech MP, Olson EN. FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains. *Cell* 1992 Dec 24; **71**(7): 1181-94.
- Li X, Oghi KA, Zhang J, Kronen A, Bush KT, Glass CK, Nigam SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 2003 Nov 20; **426**(6964): 247-54.
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992 Feb 21; **68**(4): 775-85. *Erratum in: Cell* 1992 Sep 18; **70**(6): following 1068.
- Lin HY, Moustakas A, Knaus P, Wells RG, Henis YI, Lodish HF. The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)- β receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF- β ligands. *J Biol Chem* 1995 Feb 10; **270**(6): 2747-54.
- Lin X, Liang YY, Sun B, Liang M, Shi Y, Brunnicardi FC, Shi Y, Feng XH. Smad6 recruits transcription corepressor CtBP to repress bone morphogenetic protein-induced transcription. *Mol Cell Biol* 2003 Dec; **23**(24): 9081-93.
- Liu D, Black BL, Derynck R. TGF- β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 2001 Nov 15; **15**(22): 2950-66.
- Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM, Massagué J. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996 Jun 13; **381**(6583): 620-3.
- Lo RS, Massagué J. Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2. *Nat Cell Biol* 1999 Dec; **1**(8): 472-8.
- López AR, Cook J, Deininger PL, Derynck R. Dominant negative mutants of transforming growth factor- β 1 inhibit the secretion of different transforming growth factor- β isoforms. *Mol Cell Biol* 1992 Apr; **12**(4): 1674-9.
- López Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 1991 Nov 15; **67**(4): 785-95.
- López Casillas F, Wrana JL, Massagué J. Betaglycan presents ligand to the TGF β signaling receptor. *Cell* 1993 Jul 2; **73**(7): 1435-44.
- López Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massagué J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 1994 Feb; **124**(4): 557-68.
- Luo K, Lodish HF. Signaling by chimeric erythropoietin-TGF- β receptors: homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF- β receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *EMBO J* 1996 Sep 2; **15**(17): 4485-96.
- Luo K, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF- β receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J* 1997 Apr 15; **16**(8): 1970-81.
- Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S, Zhou Q. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev* 1999 Sep 1; **13**(17): 2196-206.
- Lyon M, Rushton G, Gallagher JT. The interaction of the transforming growth factor- β s with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J Biol Chem* 1997 Jul 18; **272**(29): 18000-6.

- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 1988 May; **106**(5): 1659-65.
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990 Apr; **110**(4): 1361-7.
- MacConell LA, Leal AM, Vale WW. The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions. *Endocrinology* 2002 Mar; **143**(3): 1066-75.
- Macías Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 1996 Dec 27; **87**(7): 1215-24.
- Macías Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* 1998 Oct 2; **273**(40): 25628-36.
- Mack CP, Owens GK. Regulation of smooth muscle α -actin expression *in vivo* is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circ Res* 1999 Apr 16; **84**(7): 852-61.
- Mal A, Harter ML. MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Feb 18; **100**(4): 1735-9.
- Marics I, Padilla F, Guillemot JF, Scaal M, Marcelle C. FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. *Development* 2002 Oct; **129**(19): 4559-69.
- Massagué J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Nov; **83**(21): 8206-10.
- Massagué J. Receptors for the TGF- β family. *Cell* 1992 Jun 26; **69**(7): 1067-70.
- Massagué J, Attisano L, Wrana JL. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994 May; **4**(5): 172-8.
- Massagué J, Polyak K. Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr Opin Genet Dev* 1995 Feb; **5**(1): 91-6.
- Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 753-91.
- Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 2000 Mar 15; **14**(6): 627-44.
- Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J* 2000 Apr 17; **19**(8): 1745-54.
- Matzuk MM. In search of binding—identification of inhibin receptors. *Endocrinology* 2000 Jul; **141**(7): 2281-4.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, *et al.* Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994 Dec; **8**(4): 345-51.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 2001 Oct; **11**(5): 497-504.
- Mitchell EJ, Fitz-Gibbon L, O'Connor-McCourt MD. 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* 1992 Feb; **150**(2): 334-43.
- Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 1988 May 5; **263**(13): 6407-15.
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. A role of the latent TGF- β 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1. *EMBO J* 1991 May; **10**(5): 1091-101.
- Mohun T. Muscle differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1992 Dec; **4**(6): 923-8.
- Moore JW, Dionne C, Jaye M, Swain JL. The mRNAs encoding acidic FGF, basic FGF and FGF receptor are coordinately downregulated during myogenic differentiation. *Development* 1991 Mar; **111**(3): 741-8.
- Morello JP, Plamondon J, Meyrick B, Hoover R, O'Connor-McCourt MD. Transforming growth factor- β receptor expression on endothelial cells: heterogeneity of type III receptor expression. *J Cell Physiol* 1995 Oct; **165**(1): 201-11.
- Moren A, Ichijo H, Miyazono K. Molecular cloning and characterization of the human and porcine transforming growth factor- β type III receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Nov 30; **189**(1): 356-62.
- Moren A, Olofsson A, Stenman G, Sahlin P, Kanzaki T, Claesson-Welsh L, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor- β -binding protein. *J Biol Chem* 1994 Dec 23; **269**(51): 32469-78.
- Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J* 2000 May 2; **19**(9): 2046-55.
- Moustakas A, Lin HY, Henis YI, Plamondon J, O'Connor-McCourt MD, Lodish HF. The transforming growth factor β receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J Biol Chem* 1993 Oct 25; **268**(30): 22215-8.

- Muller G, Behrens J, Nussbaumer U, Bohlen P, Birchmeier W. Inhibitory action of transforming growth factor β on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Aug; **84**(16): 5600-4.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 1997 May; **51**(5): 1376-82.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin $\alpha_v\beta_6$ binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999 Feb 5; **96**(3): 319-28.
- Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Hook M. Transforming growth factor- β complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell* 1992 Feb; **3**(2): 181-8.
- Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989a Mar 10; **56**(5): 777-83.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, *et al.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 1989b Aug 11; **58**(3): 537-44.
- Musaro A, Giacinti C, Borsellino G, Dobrowolny G, Pelosi L, Cairns L, Ottolenghi S, Cossu G, Bernardi G, Battistini L, Molinaro M, Rosenthal N. Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Feb 3; **101**(5): 1206-10.
- Nakai S, Kawano H, Yudate T, Nishi M, Kuno J, Nagata A, Jishage K, Hamada H, Fujii H, Kawamura K, *et al.* The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev* 1995 Dec 15; **9**(24): 3109-21.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 1997 Oct 9; **389**(6651): 631-5.
- Nakayama H, Ichikawa F, Andres JL, Massagué J, Noda M. Dexamethasone enhancement of betaglycan (TGF- β type III receptor) gene expression in osteoblast-like cells. *Exp Cell Res* 1994 Apr; **211**(2): 301-6.
- Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2003 Mar; **33**(3): 407-11.
- Nishikawa Y, Wang M, Carr BI. Changes in TGF- β receptors of rat hepatocytes during primary culture and liver regeneration: increased expression of TGF- β receptors associated with increased sensitivity to TGF- β -mediated growth inhibition. *J Cell Physiol* 1998 Sep; **176**(3): 612-23.
- Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, Laurent MN, Ueno N, Shibuya H, Cho KW. Interaction between Wnt and TGF- β signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 2000 Feb 17; **403**(6771): 781-5.
- Nishiyama T, Kii I, Kudo A. Inactivation of Rho/ROCK signaling is crucial for the nuclear accumulation of FKHR and myoblast fusion. *J Biol Chem* 2004 Nov 5; **279**(45): 47311-9.
- O'Connor-McCourt MD, Wakefield LM. Latent transforming growth factor- β in serum. A specific complex with α 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 1987 Oct 15; **262**(29): 14090-9.
- Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell* 2000 Dec 22; **103**(7): 1099-109.
- Ogawa Y, Schmidt DK, Dasch JR, Chang RJ, Glaser CB. Purification and characterization of transforming growth factor- β 2.3 and - β 1.2 heterodimers from bovine bone. *J Biol Chem* 1992 Feb 5; **267**(4): 2325-8.
- Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massagué J. Two forms of transforming growth factor- β distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 1987 Oct 8-14; **329**(6139): 539-41.
- Olson EN, Sternberg E, Hu JS, Spizz G, Wilcox C. Regulation of myogenic differentiation by type β transforming growth factor. *J Cell Biol* 1986 Nov; **103**(5): 1799-805.
- Olsson U, Bondjers G, Camejo G. Fatty acids modulate the composition of extracellular matrix in cultured human arterial smooth muscle cells by altering the expression of genes for proteoglycan core proteins. *Diabetes* 1999 Mar; **48**(3): 616-22.
- Ong SH, Hadari YR, Gotoh N, Guy GR, Schlessinger J, Lax I. Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 May 22; **98**(11): 6074-9.
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C. Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999 Sep 30; **401**(6752): 480-5.
- Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF- β receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 1996 Oct 10; **179**(1): 297-302.
- Osoegawa K, Tateno M, Woon PY, Frengen E, Mammoser AG, Catanese JJ, Hayashizaki Y, de Jong PJ. Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res* 2000 Jan; **10**(1): 116-28.
- Ottmann OG, Pelus LM. Differential proliferative effects of transforming growth factor- β on human hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1988 Apr 15; **140**(8): 2661-5.

- Oursler MJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor- β by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1993 Nov; **133**(5): 2187-96.
- Oursler MJ. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor β . *J Bone Miner Res* 1994 Apr; **9**(4): 443-52.
- Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor β type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Dev Biol* 1991 Feb; **143**(2): 303-8.
- Pardali K, Kurisaki A, Moren A, ten Dijke P, Kardassis D, Moustakas A. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in $p21^{Waf1/Cip1}$ regulation by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 2000 Sep 22; **275**(38): 29244-56.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* 2003 Jul; **4**(7): 497-507.
- Parker WL, Goldring MB, Philip A. Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGF β receptor independent manner. *J Bone Miner Res* 2003 Feb; **18**(2): 289-302.
- Pelton RW, Dickinson ME, Moses HL, Hogan BL. *In situ* hybridization analysis of TGF β 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF β 1 and β 2. *Development* 1990a Oct; **110**(2): 609-20.
- Pelton RW, Hogan BL, Miller DA, Moses HL. Differential expression of genes encoding TGFs β 1, β 2, and β 3 during murine palate formation. *Dev Biol* 1990b Oct; **141**(2): 456-60.
- Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI. Immunohistochemical localization of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 1991 Nov; **115**(4): 1091-105.
- Pepin MC, Beauchemin M, Plamondon J, O'Connor-McCourt MD. 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* 1994 Jul 19; **91**(15): 6997-7001.
- Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 2001 Aug; **3**(8): 708-14.
- Peterson MJ, Morris JF. Human myeloid zinc finger gene MZF produces multiple transcripts and encodes a SCAN box protein. *Gene* 2000 Aug 22; **254**(1-2): 105-18.
- Petritsch C, Beug H, Balmain A, Oft M. TGF- β inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G₁ arrest. *Genes Dev* 2000 Dec 15; **14**(24): 3093-101.
- Pierreux CE, Nicolas FJ, Hill CS. Transforming growth factor β -independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol* 2000 Dec; **20**(23): 9041-54.
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000 Sep 28; **407**(6803): 535-8.
- Pirskanen A, Kiefer JC, Hauschka SD. IGFs, insulin, Shh, bFGF, and TGF- β 1 interact synergistically to promote somite myogenesis in vitro. *Dev Biol* 2000 Aug 15; **224**(2): 189-203.
- Plisov SY, Yoshino K, Dove LF, Higinbotham KG, Rubin JS, Perantoni AO. TGF β 2, LIF and FGF2 cooperate to induce nephrogenesis. *Development* 2001 Apr; **128**(7): 1045-57.
- Poleskaya A, Seale P, Rudnicki MA. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 2003 Jun 27; **113**(7): 841-52.
- Ponce Castañeda MV, Esparza López J, Vilchis Landeros MM, Mendoza V, López Casillas F. Murine betaglycan primary structure, expression and glycosaminoglycan attachment sites. *Biochim Biophys Acta* 1998 May 19; **1384**(2): 189-96.
- Postigo AA, Dean DC. Independent repressor domains in ZEB regulate muscle and T-cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1999 Dec; **19**(12): 7961-71.
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β . *J Exp Med* 1987 Jan 1; **165**(1): 251-6.
- Potts JD, Dagle JM, Walder JA, Weeks DL, Runyan RB. Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor β 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Feb 15; **88**(4): 1516-20.
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 1995 Dec; **11**(4): 409-14.
- Purchio AF, Cooper JA, Brunner AM, Lioubin MN, Gentry LE, Kovacina KS, Roth RA, Marquardt H. Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor- β 1 precursor. *J Biol Chem* 1988 Oct 5; **263**(28): 14211-5.
- Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, Sang N, Graessmann A, Giordano A, Levrero M. p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J* 1997 Jan 15; **16**(2): 369-83.

- Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor- β by down-regulating its type-II receptor and inducing Smad7. *J Biol Chem* 2001 Jul 13; **276**(28): 26349-56.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995 Dec 11; **23**(23): 4878-84. FTP disponible: genomatix.de. Página visitada en junio de 2004.
- Rafferty LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 1995 Jan; **139**(1): 241-54.
- Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 1998 Mar 12; **392**(6672): 186-90.
- Rao SS, Chu C, Kohtz DS. Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *Mol Cell Biol* 1994 Aug; **14**(8): 5259-67.
- Raynal F, Michot B, Bachellerie JP. Complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA gene: comparison with other available homologs. *FEBS Lett* 1984 Feb 27; **167**(2): 263-8.
- Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Bottinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)- β /SMAD signaling through an interaction with the TGF- β type I receptor. *J Biol Chem* 2001 Mar 2; **276**(9): 6727-38.
- Reddy KB, Karode MC, Harmony AK, Howe PH. Interaction of transforming growth factor β receptors with apolipoprotein J/clusterin. *Biochemistry* 1996 Jan 9; **35**(1): 309-14.
- Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massagué J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β . *Genes Dev* 1995 Aug 1; **9**(15): 1831-45.
- Rhodes SJ, Konieczny SF. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* 1989 Dec; **3**(12B): 2050-61.
- Ridgeway AG, Skerjanc IS. Pax3 is essential for skeletal myogenesis and the expression of Six1 and Eya2. *J Biol Chem* 2001 Jun 1; **276**(22): 19033-9.
- Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H. Transforming growth factors- β 1 and β 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 1989 Dec; **109**(6 Pt 2): 3419-24.
- Riedl E, Strobl H, Majdic O, Knapp W. TGF- β 1 promotes *in vitro* generation of dendritic cells by protecting progenitor cells from apoptosis. *J Immunol* 1997 Feb 15; **158**(4): 1591-7.
- Riquelme C, Larrain J, Schonherr E, Henríquez JP, Kresse H, Brandán E. Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor β and accelerates skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 2001 Feb 2; **276**(5): 3589-96. *Erratum in: J Biol Chem* 2001 Mar 23; **276**(12): 9580-1.
- Riquelme Illanes, Cecilia Angélica. "Modulación de la diferenciación muscular esquelética por decorina: efecto en la unión de TGF- β a sus receptores". Tesis para obtener el grado de doctora en Ciencias Biológicas por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, 2001. Director de tesis: Dr. Enrique Brandán Siques.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Sep; **78**(9): 5339-43.
- Rodríguez C, Chen F, Weinberg RA, Lodish HF. Cooperative binding of transforming growth factor (TGF)- β 2 to the types I and II TGF- β receptors. *J Biol Chem* 1995 Jul 7; **270**(27): 15919-22.
- Roelen BA, Lin HY, Knezevic V, Freund E, Mummery CL. Expression of TGF- β s and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo. *Dev Biol* 1994 Dec; **166**(2): 716-28.
- Roelen BA, Van Eijk MJ, Van Rooijen MA, Bevers MM, Larson JH, Lewin HA, Mummery CL. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of a bovine transforming growth factor β (TGF- β) type I receptor. *Mol Reprod Dev* 1998 Jan; **49**(1): 1-9.
- Romeo DS, Park K, Roberts AB, Sporn MB, Kim SJ. An element of the transforming growth factor- β 1 5'-untranslated region represses translation and specifically binds a cytosolic factor. *Mol Endocrinol* 1993 Jun; **7**(6): 759-66.
- Romero Ávila MT, Flores Jasso CF, García Sáinz JA. α_{1B} -Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor- β . *Biochem J* 2002 Dec 1; **368**(Pt 2): 581-7.
- Rosenthal SM, Cheng ZQ. Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Oct 24; **92**(22): 10307-11.
- Rotzer D, Roth M, Lutz M, Lindemann D, Sebald W, Knaus P. Type III TGF- β receptor-independent signalling of TGF- β 2 via T β RII-B, an alternatively spliced TGF- β type II receptor. *EMBO J* 2001 Feb 1; **20**(3): 480-90.
- Saharinen J, Taipale J, Monni O, Keski-Oja J. Identification and characterization of a new latent transforming growth factor- β -binding protein, LTBP-4. *J Biol Chem* 1998 Jul 17; **273**(29): 18459-69.

- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 1997 Jul; **124**(13): 2659-70.
- Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M, McCarthy TL, Madri JA. Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor β 2. *J Biol Chem* 1995 Jun 2; **270**(22): 13567-72.
- Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA. Modulation of transforming growth factor β receptor levels on microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. *J Clin Invest* 1996 Mar 15; **97**(6): 1436-46.
- Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor- β 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 1989 Jul; **109**(1): 309-15.
- Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jan 23; **93**(2): 790-4.
- Schick BP, Jacoby JA. Serglycin and betaglycan proteoglycans are expressed in the megakaryocytic cell line CHRF 288-11 and normal human megakaryocytes. *J Cell Physiol* 1995 Oct; **165**(1): 96-106.
- Schlunegger MP, Grutter MG. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor- β 2. *Nature* 1992 Jul 30; **358**(6385): 430-4.
- Schmidt A, Skaletz-Rorowski A, Buddecke E. Basic fibroblast growth factor controls the expression and molecular structure of heparan sulfate in corneal endothelial cells. *Eur J Biochem* 1995 Dec 1; **234**(2): 479-84.
- Schonemann MD, Ryan AK, McEvelly RJ, O'Connell SM, Arias CA, Kalla KA, Li P, Sawchenko PE, Rosenfeld MG. Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev* 1995 Dec 15; **9**(24): 3122-35.
- Schreiber E, Himmelmann A, Malipiero U, Tobler A, Stahel R, Fontana A. Human small cell lung cancer expresses the octamer DNA-binding and nervous system-specific transcription factor N-Oct 3 (brain-2). *Cancer Res* 1992 Nov 1; **52**(21): 6121-4.
- Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- β secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 1993 Aug; **122**(4): 923-32. *Erratum in: J Cell Biol* 1993 Sep; **122**(5): following 1143.
- Schultz-Cherry S, Ribeiro S, Gentry L, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor- β in a chemically defined system. *J Biol Chem* 1994 Oct 28; **269**(43): 26775-82.
- Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg UT, Schittny J, Muller U. β 1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell* 2003 May; **4**(5): 673-85.
- Segarini PR, Roberts AB, Rosen DM, Seyedin SM. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1987 Oct 25; **262**(30): 14655-62.
- Segarini PR, Seyedin SM. The high molecular weight receptor to transforming growth factor- β contains glycosaminoglycan chains. *J Biol Chem* 1988 Jun 15; **263**(17): 8366-70.
- Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, Marciniak T, Yeoh T, Allen DG, Harvey RP, Graham RM. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 1999 Aug 5; **400**(6744): 576-81.
- Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massagué J. TGF β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor *p15^{INK4b}*. *Nat Cell Biol* 2001 Apr; **3**(4): 400-8.
- Serra R, Pelton RW, Moses HL. TGF β 1 inhibits branching morphogenesis and *N-myc* expression in lung bud organ cultures. *Development* 1994 Aug; **120**(8): 2153-61.
- Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL. Expression of a truncated, kinase-defective TGF- β type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol* 1997 Oct 20; **139**(2): 541-52.
- Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P. Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 2002 Dec 13; **277**(50): 48664-76.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999 Jun 15; **13**(12): 1501-12.
- Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, Cao X. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF β type I receptor. *J Cell Biol* 2004 Jan 19; **164**(2): 291-300.
- Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 1997 Jul 3; **388**(6637): 87-93.
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003 Jun 13; **113**(6): 685-700.

- Shin EK, Shin A, Paulding C, Schaffhausen B, Yee AS. Multiple change in E2F function and regulation occur upon muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 1995 Apr; **15**(4): 2252-62.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, *et al*. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992 Oct 22; **359**(6397): 693-9.
- Sirard C, Kim S, Mirtsos C, Tadich P, Hoodless PA, Itie A, Maxson R, Wrana JL, Mak TW. Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor β -related signaling. *J Biol Chem* 2000 Jan 21; **275**(3): 2063-70.
- Slager HG, Van Inzen W, Freund E, Van den Eijnden-Van Raaij AJ, Mummery CL. Transforming growth factor- β in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet* 1993; **14**(3): 212-24.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenc DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985 Oct; **150**(1): 76-85. *Erratum in: Anal Biochem* 1987 May 15; **163**(1): 279.
- Soma Y, Grotendorst GR. TGF- β stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *J Cell Physiol* 1989 Aug; **140**(2): 246-53.
- Song K, Cornelius SC, Reiss M, Danielpour D. Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor- β by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent suppression of the activation of Smad3 but not Smad2. *J Biol Chem* 2003 Oct 3; **278**(40): 38342-51.
- Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003 Apr 18; **113**(2): 147-58. *Erratum in Cell* 2003 May 16; **113**(4): 547.
- Souchelnyskyi S, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Phosphorylation of Ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1-induced cellular responses. *EMBO J* 1996 Nov 15; **15**(22): 6231-40. *Erratum in: EMBO J* 1997 Oct 1; **16**(19): 6055.
- Spencer FA, Hoffmann FM, Gelbart WM. *Decapentaplegic*: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1982 Mar; **28**(3): 451-61.
- Spicer DB, Rhee J, Cheung WL, Lassar AB. Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 1996 Jun 7; **272**(5267): 1476-80.
- Spizz G, Roman D, Strauss A, Olson EN. Serum and fibroblast growth factor inhibit myogenic differentiation through a mechanism dependent on protein synthesis and independent of cell proliferation. *J Biol Chem* 1986 Jul 15; **261**(20): 9483-8.
- Stach RM, Rowley DA. A first or dominant immunization. II. Induced immunoglobulin carries transforming growth factor β and suppresses cytolytic T cell responses to unrelated alloantigens. *J Exp Med* 1993 Sep 1; **178**(3): 841-52.
- Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Moroy T, Bartek J, Massagué J, Hanel F, Eilers M. Repression of *p15^{INK4b}* expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 2001 Apr; **3**(4): 392-9.
- Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM, Zhu HJ. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor β 2 sensitivity in transforming growth factor β type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 2003 Jun; **23**(12): 4371-85.
- Sternier-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, Keski-Oja J, von Melchner H. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor- β binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev* 2002 Sep 1; **16**(17): 2264-73.
- Stewart CE, Rotwein P. Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *J Biol Chem* 1996 May 10; **271**(19): 11330-8.
- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 1999 Oct 22; **286**(5440): 771-4.
- Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL, Luo K. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* 2001 Nov 1; **15**(21): 2822-36.
- Sun L, Chen C. Expression of transforming growth factor β type III receptor suppresses tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Biol Chem* 1997 Oct 3; **272**(40): 25367-72.
- Sun Y, Liu X, Eaton EN, Lane WS, Lodish HF, Weinberg RA. Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF- β signaling. *Mol Cell* 1999a Oct; **4**(4): 499-509.
- Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999b Oct 26; **96**(22): 12442-7.
- Sweeney SA, Johnson PA. Messenger RNA and protein expression analysis of betaglycan in the pituitary and ovary of the domestic hen. *Biol Reprod* 2005 Jan; **72**(1): 172-8.
- Tabibzadeh S. Homeostasis of extracellular matrix by TGF- β and lefty. *Front Biosci* 2002 May 1; **7**: d1231-46.

- Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor- β 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF- β binding protein. *J Cell Biol* 1994 Jan; **124**(1-2): 171-81.
- Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor- β 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* 1995 Mar 3; **270**(9): 4689-96.
- Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 2002 Aug 22; **418**(6900): 892-7. *Erratum in: Nature* 2002 Nov 28; **420**(6914): 445.
- Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor- β and enhances its bioactivity. *J Biol Chem* 1994 Dec 23; **269**(51): 32634-8.
- Tam BY, Finnsen KW, Philip A. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins regulate transforming growth factor- β signaling in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2003 Dec 5; **278**(49): 49610-7.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000 Sep 28; **407**(6803): 530-5.
- Taylor MV. Muscle differentiation: how two cells become one. *Curr Biol* 2002 Mar 19; **12**(6): R224-8.
- ten Dijke P, Hansen P, Iwata KK, Pieler C, Foulkes JG. Identification of another member of the transforming growth factor type β gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Jul; **85**(13): 4715-9.
- ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH. Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science* 1994 Apr 1; **264**(5155): 101-4.
- ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004 May; **29**(5): 265-73.
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell* 1998 Dec 11; **95**(6): 779-91.
- Twardzik DR, Mikovits JA, Ranchalis JE, Purchio AF, Ellingsworth L, Ruscetti FW. γ -interferon-induced activation of latent transforming growth factor- β by human monocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1990; **593**: 276-84.
- Ulloa L, Doody J, Massagué J. Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- γ /STAT pathway. *Nature* 1999 Feb 25; **397**(6721): 710-3.
- Vaidya TB, Rhodes SJ, Taparowsky EJ, Konieczny SF. Fibroblast growth factor and transforming growth factor β repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1. *Mol Cell Biol* 1989 Aug; **9**(8): 3576-9.
- Velasco Loyden G, Arribas J, López Casillas F. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem* 2004 Feb 27; **279**(9): 7721-33.
- Ventura F, Doody J, Liu F, Wrana JL, Massagué J. Reconstitution and transphosphorylation of TGF- β receptor complexes. *EMBO J* 1994 Dec 1; **13**(23): 5581-9.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Aug; **84**(16): 5788-92.
- Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. Latent transforming growth factor- β from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* 1988 Jun 5; **263**(16): 7646-54.
- Wan M, Cao X, Wu Y, Bai S, Wu L, Shi X, Wang N, Cao X. Jab1 antagonizes TGF- β signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep* 2002 Feb; **3**(2): 171-6.
- Wan Y, Liu X, Kirschner MW. The anaphase-promoting complex mediates TGF- β signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol Cell* 2001 Nov; **8**(5): 1027-39.
- Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific interaction of type I receptors of the TGF- β family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 1994 Jul 29; **265**(5172): 674-6.
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF β family type I receptors. *Cell* 1996 Aug 9; **86**(3): 435-44.
- Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell* 1991 Nov 15; **67**(4): 797-805.
- Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S. *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 2000 Sep 28; **407**(6803): 527-30. *Erratum in: Nature* 2001 Apr 12; **410**(6830): 847.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995 May 5; **81**(3): 323-30.
- Weinberg RA. E2F and cell proliferation: a world turned upside down. *Cell* 1996 May 17; **85**(4): 457-9.
- Weiner OH, Zoremba M, Gressner AM. Gene expression of syndecans and betaglycan in isolated rat liver cells. *Cell Tissue Res* 1996 Jul; **285**(1): 11-6.
- Weinstein M, Monga SP, Liu Y, Brodie SG, Tang Y, Li C, Mishra L, Deng CX. Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on β 1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol* 2001 Aug; **21**(15): 5122-31.

- Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Jul; **86**(14): 5434-8.
- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 1991 Feb 15; **251**(4995): 761-6.
- Weis-García F, Massagué J. Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF- β receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling. *EMBO J* 1996 Jan 15; **15**(2): 276-89.
- Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily. *Genes Dev* 1998 Aug 15; **12**(16): 2445-62.
- Wiater E, Vale W. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 2003 Mar 7; **278**(10): 7934-41.
- Wilcox JN, Derynck R. Developmental expression of transforming growth factors α and β in mouse fetus. *Mol Cell Biol* 1988 Aug; **8**(8): 3415-22.
- Wilson PA, Lagna G, Suzuki A, Hemmati-Brivanlou A. Concentration-dependent patterning of the Xenopus ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development* 1997 Aug; **124**(16): 3177-84.
- Wolpert, Lewis, Rosa Beddington, Jeremy Brockes, Thomas Jessell, Peter Lawrence, and Elliot Meyerowitz. Principles of Development. London: Current Biology, 1998. Figura 9.20 de la página 288.
- Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- β signalling receptors. *Eur J Biochem* 2000 Sep; **267**(17): 5550-60.
- Worapamorn W, Li H, Pujic Z, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. Expression and distribution of cell-surface proteoglycans in the normal Lewis rat molar periodontium. *J Periodontol Res* 2000a Aug; **35**(4): 214-24.
- Worapamorn W, Li H, Haas HR, Pujic Z, Girjes AA, Bartold PM. Cell surface proteoglycan expression by human periodontal cells. *Connect Tissue Res* 2000b; **41**(1): 57-68.
- Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 2001 Mar; **186**(3): 448-56.
- Wotton D, Lo RS, Lee S, Massagué J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 1999a Apr 2; **97**(1): 29-39.
- Wotton D, Lo RS, Swaby LA, Massagué J. Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* 1999b Dec 24; **274**(52): 37105-10.
- Wotton D, Knoepfler PS, Laherty CD, Eisenman RN, Massagué J. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 2001 Sep; **12**(9): 457-63.
- Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massagué J. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992 Dec 11; **71**(6): 1003-14.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994 Aug 4; **370**(6488): 341-7.
- Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 1989 Feb 24; **56**(4): 607-17.
- Wu G, Fan RS, Li W, Srinivas V, Brattain MG. Regulation of transforming growth factor- β type II receptor expression in human breast cancer MCF-7 cells by vitamin D3 and its analogues. *J Biol Chem* 1998 Mar 27; **273**(13): 7749-56.
- Wu P, Jiang TX, Suksaweang S, Widelitz RB, Chuong CM. Molecular shaping of the beak. *Science* 2004 Sep 3; **305**(5689): 1465-6.
- Wu X, Robinson CE, Fong HW, Gimble JM. Analysis of the native murine bone morphogenetic protein serine threonine kinase type I receptor (ALK-3). *J Cell Physiol* 1996 Aug; **168**(2): 453-61.
- Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor β signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Apr 25; **97**(9): 4820-5.
- Xu L, Kang Y, Col S, Massagué J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell* 2002 Aug; **10**(2): 271-82.
- Xu W, Angelis K, Danielpour D, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Stavnezer E, Medrano EE. Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type β transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 23; **97**(11): 5924-9.
- Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 1977 Dec 22-29; **270**(5639): 725-7.
- Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990 Jul 19; **346**(6281): 281-4.
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Moren A, ten Dijke P, Miyazono K. Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1994a Jan 21; **269**(3): 1995-2001.

- Yamashita H, ten Dijke P, Franzén P, Miyazono K, Heldin CH. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1994b Aug 5; **269**(31): 20172-8.
- Yan Z, Deng X, Friedman E. Oncogenic Ki-ras confers a more aggressive colon cancer phenotype through modification of transforming growth factor- β receptor III. *J Biol Chem* 2001 Jan 12; **276**(2): 1555-63.
- Yanagisawa K, Osada H, Masuda A, Kondo M, Saito T, Yatabe Y, Takagi K, Takahashi T, Takahashi T. Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF- β in human normal lung epithelial cells. *Oncogene* 1998 Oct 1; **17**(13): 1743-7.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991 Feb 22; **64**(4): 841-8.
- Yin W, Smiley E, Germiller J, Mecham RP, Florer JB, Wenstrup RJ, Bonadio J. Isolation of a novel latent transforming growth factor- β binding protein gene (LTBP-3). *J Biol Chem* 1995 Apr 28; **270**(17): 10147-60.
- Yoneda A, Asada M, Oda Y, Suzuki M, Imamura T. Engineering of an FGF-proteoglycan fusion protein with heparin-independent, mitogenic activity. *Nat Biotechnol* 2000 Jun; **18**(6): 641-4.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000 Jan 15; **14**(2): 163-76.
- Zanni M, Tamburro A, Rotilio D. IL-1 β and TGF- β 1 modulate the sulphation grade of chondro-disaccharides in porcine articular cartilage: a capillary electrophoresis study. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995 Jul; **12**(1): 29-44.
- Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002 Jul; **3**(7): 499-512.
- Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottlinger EP. Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* 2004 Mar 10; **23**(5): 1155-65.
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003 Jul; **9**(7): 964-8.
- Zeng X, Gray M, Stahlman MT, Whitsett JA. TGF- β 1 perturbs vascular development and inhibits epithelial differentiation in fetal lung in vivo. *Dev Dyn* 2001 Jul; **221**(3): 289-301.
- Zentella A, Massagué J. Transforming growth factor β induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Jun 1; **89**(11): 5176-80.
- Zhang MF, Zola H, Read LC, Penttilä IA. Localization of transforming growth factor- β receptor types I, II, and III in the postnatal rat small intestine. *Pediatr Res* 1999 Dec; **46**(6): 657-65.
- Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* 1996 Sep 12; **383**(6596): 168-72.
- Zhao J, Tefft JD, Lee M, Smith S, Warburton D. Abrogation of betaglycan attenuates TGF- β -mediated inhibition of embryonic murine lung branching morphogenesis in culture. *Mech Dev* 1998 Jul; **75**(1-2): 67-79.
- Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS. Identification of NF- κ B-regulated genes induced by TNF α utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 2003 Apr 3; **22**(13): 2054-64.
- Zhou L, Dey CR, Wert SE, Whitsett JA. Arrested lung morphogenesis in transgenic mice bearing an SP-C-TGF- β 1 chimeric gene. *Dev Biol* 1996 May 1; **175**(2): 227-38.
- Zhu AJ, Zheng L, Suyama K, Scott MP. Altered localization of *Drosophila* Smoothed protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev* 2003 May 15; **17**(10): 1240-52.
- Zippert R, Bassler A, Holmer SR, Hengstenberg C, Schunkert H. Eleven single nucleotide polymorphisms and one triple nucleotide insertion of the human TGF- β III receptor gene. *J Hum Genet* 2000; **45**(4): 250-3.
- Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 1996 Aug; **16**(8): 4024-34.

Betaglycan Expression Is Transcriptionally Up-regulated during Skeletal Muscle Differentiation

CLONING OF MURINE BETAGLYCAN GENE PROMOTER AND ITS MODULATION BY MyoD, RETINOIC ACID, AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β *

Received for publication, August 20, 2002, and in revised form, October 8, 2002
Published, JBC Papers in Press, October 23, 2002, DOI 10.1074/jbc.M208520200

Fernando López-Casillas \ddagger §, Cecilia Riquelme \parallel , Yoshiaki Pérez-Kato \ddagger ,
M. Verónica Ponce-Castañeda \ddagger , Nelson Osses \parallel , José Esparza-López \ddagger , Gerardo González-Núñez \ddagger ,
Claudio Cabello-Verrugio \parallel , Valentín Mendoza \ddagger , Victor Troncoso \parallel , and Enrique Brandan \ddagger § \parallel

From the \ddagger Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-246, México City, D.F., 04510, México and the \parallel Centro de Regulación Celular y Patología, Facultad de Ciencias Biológicas, Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile

Betaglycan is a membrane-anchored proteoglycan co-receptor that binds transforming growth factor β (TGF- β) via its core protein and basic fibroblast growth factor through its glycosaminoglycan chains. In this study we evaluated the expression of betaglycan during the C₂C₁₂ skeletal muscle differentiation. Betaglycan expression, as determined by Northern and Western blot, was up-regulated during the conversion of myoblasts to myotubes. The mouse betaglycan gene promoter was cloned, and its sequence showed putative binding sites for SP1, Smad3, Smad4, muscle regulatory factor elements such as MyoD and MEF2, and retinoic acid receptor. Transcriptional activity of the mouse betaglycan promoter reporter was also up-regulated in differentiating C₂C₁₂ cells. We found that MyoD, but not myogenin, stimulated this transcriptional activity even in the presence of high serum. Betaglycan promoter activity was increased by RA and inhibited by the three isoforms of TGF- β . On the other hand, basic fibroblast growth factor, BMP-2, and hepatocyte growth factor/scatter factor, which are inhibitors of myogenesis, had little effect. In myotubes, up-regulated betaglycan was also detectable by TGF- β affinity labeling and immunofluorescence microscopy studies. The latter indicated that betaglycan was localized both on the cell surface and in the ECM. Forced expression of betaglycan in C₂C₁₂ myoblasts increases their responsiveness to TGF- β 2, suggesting that it performs a TGF- β presentation function in this cell lineage. These results indicate that betaglycan expression is up-regulated during myogenesis and that MyoD and RA modulate its expression by a mechanism that is independent of myogenin.

Skeletal muscle myoblasts are the precursors to skeletal muscle fibers. During development these cells are maintained in a proliferative and undifferentiated state until appropriate signals cause them to undergo conversion into multinucleated myotubes.

A network of muscle regulatory factors (MRFs),¹ some of which have been identified and characterized, governs this process. When myogenesis begins, myogenic regulatory genes encoding factors of the MyoD family are activated (myogenin, MRF4, and MRF5). These factors bind to specific DNA consensus sites called E boxes, which function as transcriptional enhancers of muscle differentiation genes (for review see Ref. 1). Factors of the MEF2 family are also required to specify muscle fate or to direct muscle differentiation (2). The expression and activity of these master regulatory genes are regulated by polypeptide growth factors, such as basic fibroblast growth factor (FGF-2) (3), transforming growth factor type β (TGF- β) (4), hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) (5), and insulin-like growth factor (6), as well as by retinoic acid (RA) (7).

The onset and progression of the differentiation process are controlled by a complex set of interactions between myoblasts and their environment. The presence of the extracellular matrix (ECM) is essential for normal myogenesis (8–11). It has been demonstrated that the activities of FGF-2, HGF, and TGF- β can be regulated by binding to proteoglycans (2–6). Cell surface heparan sulfate proteoglycans, in particular, have been suggested to play a role in modulating the activities of heparin-binding growth factors (7, 8). They modulate terminal myogenesis probably by acting as low affinity receptors for some growth factors such as FGF-2 (5, 9) and HGF (10). We have shown that constitutive expression of syndecan-1, a heparan sulfate proteoglycan whose expression is down-regulated during skeletal muscle terminal differentiation, inhibits the differentiation of myoblasts in culture (5, 11). In contrast, abolishment of the expression of syndecan-3, another heparan sulfate proteoglycan synthesized by myoblasts, results in acceleration of skeletal muscle differentiation by a mechanism being dependent on FGF-2 (9). Decorin is a dermatan sulfate proteoglycan that has the ability to bind TGF- β by its core protein (12, 13). Decorin seems to be critical in C₂C₁₂ cells to repress skel-

¹ The abbreviations used are: MRF, muscle regulatory factor; FGF-2, basic fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor/scatter factor; ECM, extracellular matrix; TGF- β , transforming growth factor β ; T β R, TGF- β receptor; RA, retinoic acid; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate.

* This work was supported in part by FONDAP-Biomedicine Grant 13980001 (to E. B.). The Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology is financed in part by the Ministerio de Planificación y Cooperación (Chile). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AF537325.

§ Supported in part by International Research Scholars grants from the Howard Hughes Medical Institute.

|| Recipient of a Presidential Chair in Science from the Chilean Government. To whom correspondence should be addressed: Dept. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile. Fax: 56-2-635-5395; E-mail: ebrandan@genes.bio.puc.cl.

etal muscle differentiation by a TGF- β -dependent mechanism (14), and its expression is up-regulated during the process (15).

Cell interaction with TGF- β is mediated by a complex group of proteins that includes the type I and II TGF- β receptors, which have signal transducing activity, and the membrane-bound proteoglycan betaglycan (16–18). Betaglycan, a heparan/chondroitin sulfate proteoglycan also known as type III TGF- β receptor (T β RIII), is present on the cell surface of several cell types (19, 20) and has the ability to bind TGF- β through the core protein and FGF-2 through the heparan sulfate chains (21). Although betaglycan is not directly involved in the intracellular TGF- β signaling, it controls its access to the T β RII receptor, thereby modulating its actions (6, 22). In this study we show that expression of betaglycan is up-regulated during skeletal muscle differentiation of C₂C₁₂ myoblasts, increasing its levels on the cell surface of the myotubes and in the ECM. Our data also indicate that the proximal region of the betaglycan gene promoter controls this process in a manner that is dependent of MyoD expression. Although it is not clear at this moment what is the function of betaglycan during the skeletal muscle differentiation process, the fact that its ectopic forced expression in myoblasts enhances their responsiveness to TGF- β 2 suggests a potential regulatory role.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—The mouse skeletal muscle cell line C₂C₁₂ (ATCC, Manassas, VA) (23) was grown and induced to differentiate as described (15). Briefly, 3 days after plating (80% confluence), the medium was changed to Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% horse serum to trigger myoblast differentiation. Two days later 0.1 mM cytosine- β -D-arabino-furanoside was added to the culture medium. Thereafter the incubation medium was changed daily. Rat1 and L6E9 cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% or 20% fetal bovine serum, respectively, as described (19).

RNA Isolation and Northern Blot Analysis—Total RNA was isolated from cell cultures at the indicated times using Trizol (Invitrogen). The RNA samples were electrophoresed in 1.2% agarose/formaldehyde gels, transferred to Nytran membranes, hybridized with probes for mouse betaglycan (24), and exposed to Kodak x-ray film.

Generation of the Adenoviral Vector for the Expression of Wild Type Betaglycan (Adv-BG)—The DNA vectors and hosts employed were generous gifts of Bert Vogelstein (Johns Hopkins University Oncology Center), and the method employed has been described by He *et al.* (25). Briefly, to generate the appropriate transfer vector, a DNA fragment containing the 186 upstream bp of the 5'-untranslated region, the complete open reading frame, and the first 513 bp of the 3'-untranslated region of the wild type rat betaglycan cDNA (19) was subcloned at the *NotI-HindIII* sites of pAdenoTrack. The created transfer vector was recombined with pAdenoEasy-1, and the recombinant adenoviral genome was transfected in 293 cells to recover the recombinant viral particle (Adv-BG). Enrichment and purification of an Adv-BG viral stock was carried out according to standard methods.

Cloning of Murine Betaglycan Gene Promoter and Construction of Betaglycan Promoter Reporter Vector—A bacterial artificial chromosome mouse genomic library (Research Genetics, Huntsville, AL) was screened with the 190 nucleotides (bases 15–205) at the 5' end of the reported mouse betaglycan cDNA (24), and eight positive clones were analyzed by restriction mapping. A 6.5-kilobase pair *HindIII* fragment that hybridized to bases 88–105 of the cDNA was recovered from bacterial artificial chromosome clone B70. A smaller *HindIII-BamHI* fragment containing the 2542 bp located at the 5' end was further isolated and fully sequenced at Instituto de Fisiologia Celular Molecular Biology Core Facility (deposited in the GenBank™ with accession number AF537325). For the construction of betaglycan reporter plasmid, pBG-Lux, the 2307-bp *HindIII-NotI* Klenow-filled-in fragment was subcloned in the *SmaI* of pGL3-basic (Promega, Madison, WI), and the proper orientation was verified by sequencing (see Fig. 2 for more details). The pMyo-Luc reporter construction was reported previously (14); pRLSV40 was from Promega; and pEMSV, pEMSV-MyoD, and pEMSV-myogenin were gifts from Dr. Stephen F. Konieczny (Purdue University).

Transient Transfection—The cells were plated at a density of 8,000 cells/cm² in 6-well plates for 48 h and transfected for 5 h using with 4

μ g of pBG-Lux or 4 μ g of pMyoLuc and 0.01 μ g of pRLSV40 in each well mixed in Opti-MEM I with 4 μ l of PLUS reagent and 6 μ l of LipofectAMINE (Promega). Following transfection, fetal bovine serum and chicken embryo extract were added to restore their complete growth medium concentrations, and the cells were cultured for a further 14 h. The cells were then trypsinized and plated in 24-well plates in normal growth medium. Under these conditions, FGF-2 (3 ng/ml) (Invitrogen), BMP-2 (1 nM) (generous gift from Genetic Institute, Cambridge, MA), HGF (3 ng/ml) (R & D Systems, Minneapolis, MN), TGF- β (1 ng/ml) (R & D Systems), and RA (1 μ M) (Sigma) were added at the indicated concentrations. After 24 h, the cells were harvested and assayed for dual luciferase activity (Promega). All of the transfections were performed at least three times.

Immunoblot Analysis—For immunoblot analysis aliquots were subjected to SDS gel electrophoresis in 4–12% polyacrylamide gels, electrophoretically transferred to Immobilon membranes (Millipore, Bedford, MA), probed with a rabbit antiserum raised against rat betaglycan ectodomain (1:2000) (22), rabbit anti-myogenin (1:500), or rabbit anti-MyoD (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce). For betaglycan core protein analysis, the samples were previously treated with heparitinase and chondroitinase ABC (Seikagaku, Tokyo, Japan) (9, 26).

TGF- β Affinity Labeling and Immunoprecipitation—TGF- β was radiolabeled with ¹²⁵I using the chloramine T, and affinity labeling and immunoprecipitations were done as described before (22).

Immunofluorescence Microscopy—Cells to be analyzed by immunofluorescence microscopy were grown on glass coverslips, as described previously (27). For cell surface staining the live unfixed cells were incubated in the first antibody solution 1:200 anti-betaglycan, 1:1000 anti-perlecan (27) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 0.1 M NaCl, 2% bovine serum albumin for 1 h on ice. After removal of this solution, the cells were fixed in 3% paraformaldehyde and permeabilized with 0.05% Triton X-100 and incubated with 1:100 monoclonal anti-myosin antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA). The bound antibodies were detected by incubating the cells with 1:100 affinity-purified fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit IgG and 1:100 TRITC anti-mouse IgG (Pierce), respectively. After rinsing, the slides were viewed with a Nikon upright microscope equipped for epifluorescence.

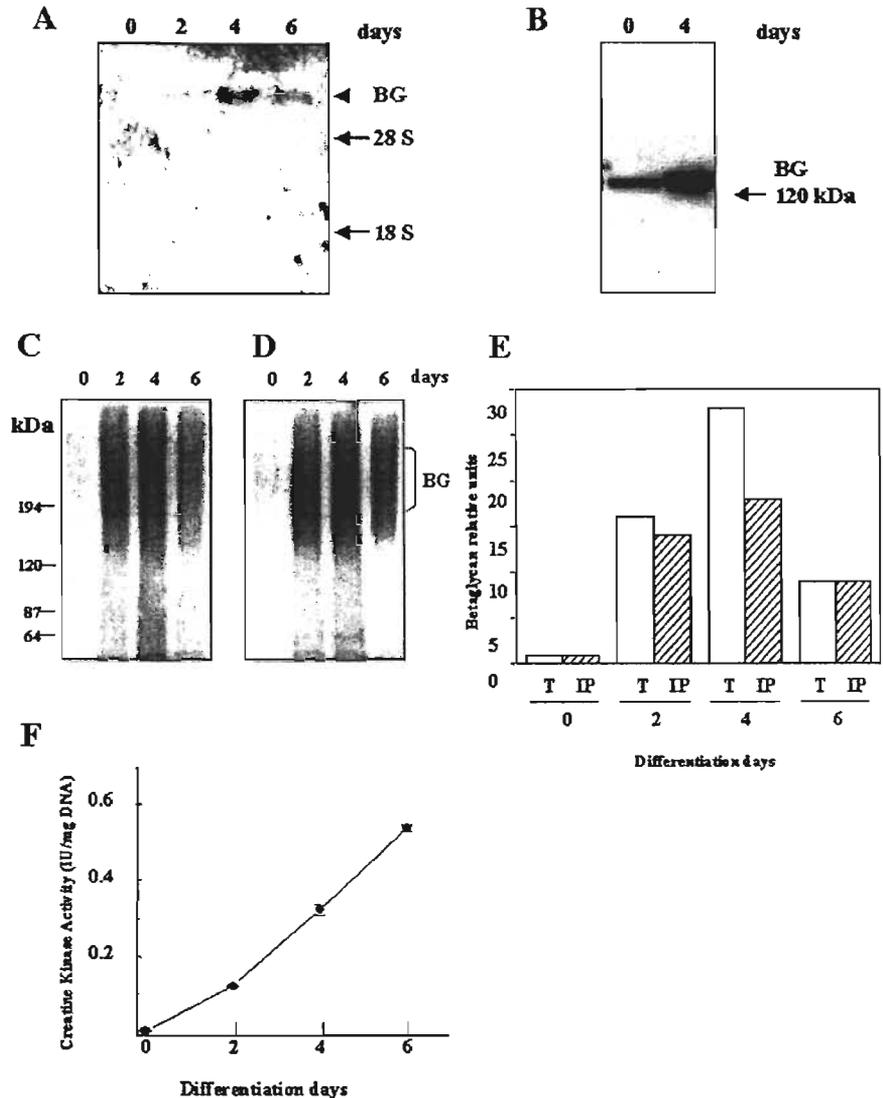
Analysis of Creatine Kinase Activity—Creatine kinase activity was determined as previously described (9).

DNA and Protein Determination—DNA (28) and protein (29) were determined in aliquots of cell extracts as described.

RESULTS

Skeletal Muscle Myoblasts Up-regulate Betaglycan Expression during Differentiation—To evaluate the expression of betaglycan during myoblast differentiation, the levels of its mRNA were determined in total RNA isolated from myoblasts and myotubes induced to differentiate for 2, 4, and 6 days. As shown in Fig. 1A, betaglycan mRNA was detected after 2 days of induced differentiation with an increase by day 4 and small decrease by day 6. At the same time, the level of cellular betaglycan during skeletal muscle differentiation was determined by Western blot analysis of detergent extracts treated previously with heparitinase and chondroitinase ABC, a procedure that reveals the total content of betaglycan as its core protein. Fig. 1B shows that cells allowed to differentiate for 4 days increased betaglycan expression significantly compared with the amount synthesized by myoblasts. Betaglycan has the ability to bind the three isoforms of TGF- β through its core protein. To evaluate this property of the betaglycan induced during muscle differentiation, affinity labeling experiments using ¹²⁵I-labeled TGF- β 2 were performed. Fig. 1C shows that the up-regulated betaglycan, displaying its characteristic pattern of migration in this kind of experiments, bound TGF- β 2 and that this binding increased during differentiation when the total extracts were analyzed. The specificity of this result was confirmed when immunoprecipitates from the total cell extract were analyzed using a specific anti-betaglycan antibody (Fig. 1D). Fig. 1E shows the densitometric analysis for the quantitative analyses of the data. As a test of concomitant differentiation, the level of creatine kinase activity, a specific skeletal

FIG. 1. Betaglycan expression is up-regulated during myoblasts differentiation. A, 15 μ g of total RNA isolated from myoblasts (lane 0) and myoblasts induced to differentiate for the indicated days were analyzed by Northern blot with 32 P-labeled betaglycan cDNA probe. The arrows indicate ribosomal RNA size, and the arrowhead indicates betaglycan mRNA (BG). B, cell extracts were prepared from myoblasts (lane 0), and cells were induced to differentiate for 4 days (lane 4) and then treated with heparinase and chondroitinase ABC. The extracts were analyzed by SDS-PAGE. Betaglycan was visualized by immunoblotting with an antibody specific for betaglycan. The arrow indicates the core protein of betaglycan. C₂C₁₂ myoblasts were culture under growth conditions for 48 h and switched to differentiate for several days. At the indicated times of differentiation the cells were affinity labeled with 100 pM of 125 I-labeled TGF- β 2. The total extracts were analyzed by SDS-PAGE (C) or by anti-betaglycan immunoprecipitation (D). Phosphorimages of the gels are shown indicating the migration of the molecular mass standards (kDa) and of the betaglycan-TGF- β 2 complex (bracket). E, the graphical representation of the phosphorimaging quantitation of the betaglycan-TGF- β 2 complex. Open bars correspond to total extracts, and striped bars correspond to the immunoprecipitates. F, cell extracts were prepared from myoblasts (0), cells were induced to differentiate for the indicated days, and creatine kinase activity was determined. For graphical representation, the enzymatic activity values were normalized by DNA content. When indicated the results are the means \pm S.D. of two independent experiments performed in triplicate.



muscle marker, was evaluated (Fig. 1F). Together, these results demonstrate that the synthesis of betaglycan increased during skeletal muscle differentiation.

Cloning of Mouse Betaglycan Gene Promoter and Construction of Mouse Betaglycan Gene Reporter—To characterize the mechanism underlying the control of up-regulation of betaglycan mRNA, the murine betaglycan gene promoter was cloned. For that purpose, a bacterial artificial chromosome library was screened with the most 5' end sequences of the murine betaglycan cDNA, and the *Hind*III-*Bam*HI 2542-nucleotide-long fragment (Fig. 2A) containing the most upstream cDNA region was isolated and sequenced (Fig. 2B). This genomic DNA fragment had 86% sequence identity with the corresponding region of its rat ortholog (1). In addition, it contained a stretch of 127 nucleotides (2265–2391) that corresponded to bases 20–141 of the published murine betaglycan cDNA and that was followed by a GT, presumably the splicing donor site of the first intron. Other relevant functional *cis*-regulatory elements, SP1 and GC boxes, including the putative BMP-2-responsive element, that have been experimentally determined in the rat gene by the Centrella and co-workers (1) were also conserved in the mouse promoter. These similarities strongly suggest that the cloned sequences contain the promoter and first exon of the mouse betaglycan gene. Importantly, the mouse sequences contained

several MRFs binding sites: two MyoD- and five MEF2-binding sites, elements that have been shown to be essential for skeletal muscle differentiation (30). In addition, they also showed the presence of one RA receptor and four Smad4- and one Smad3-binding elements, factors that mediate responses to RA and TGF- β , regulators of skeletal muscle differentiation.

To determine whether or not the isolated *Hind*III-*Bam*HI 2542-bp fragment had promoter activity, it was used to construct a luciferase reporter plasmid, which was transiently transfected in cell lines capable of expressing the endogenous betaglycan. Fig. 2C shows that, as compared with the empty vector, the cloned *Hind*III-*Not*I fragment drove the expression of luciferase in Rat1 fibroblasts. Importantly, transfected L6E9 rat myoblasts, which do not express betaglycan (22), failed to express the reporter gene. Together, these findings confirmed that the cloned region contains the *bona fide* mouse betaglycan gene promoter.

Activity of Betaglycan Reporter Increases during Myogenesis—To characterize the mechanisms controlling the up-regulation of betaglycan during the myogenic differentiation, C₂C₁₂ myoblasts were transiently transfected using the betaglycan reporter vector and induced to differentiate for 6 days. As expected from the results described above, Fig. 3 shows that the activity of the pBG-Lux increased 8.4-fold during skeletal

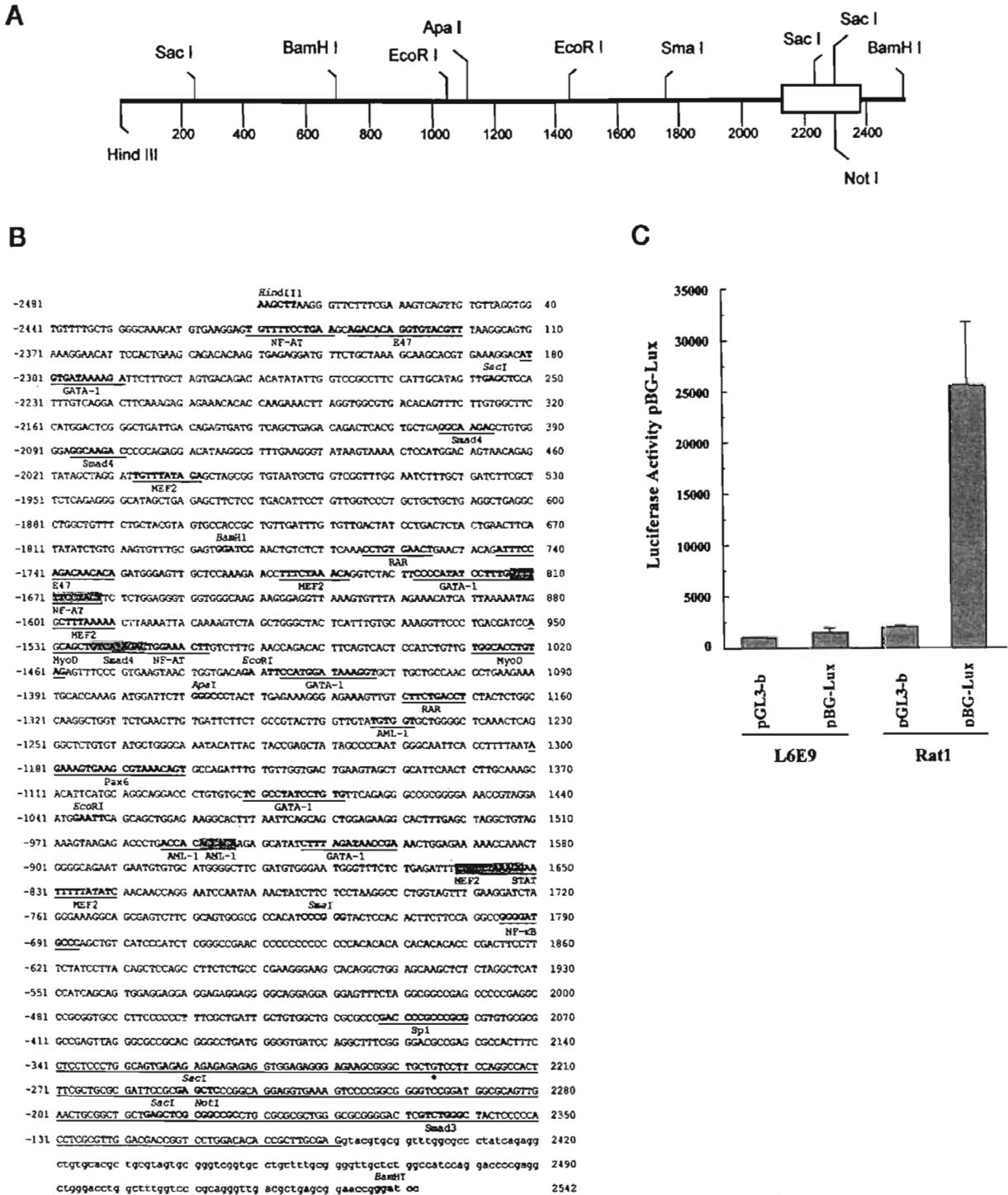


Fig. 2. Cloning of murine betaglycan gene promoter. A, schematic representation of mouse betaglycan promoter and first exon. The 2542-bp HindIII-BamHI fragment containing the betaglycan promoter and first exon are shown. Putative boundaries of first exon (box) were established by comparison with rat betaglycan initial exon as experimentally determined by Ji *et al.* (1) and by alignment to mouse betaglycan cDNA (24). B, nucleotide sequence of mouse betaglycan promoter and first exon. The positive numbers in the right margin correspond to the 2542-bp HindIII-BamHI sequence submitted to the GenBank™ (accession number AF537325). For description purposes, the nucleotide sequence of was also numbered taking the A that opens the reading frame in betaglycan cDNA as base +1 (negative numbers in the left margin). The predicted first exon in the murine betaglycan gene spans from position -341 to -91 (underlined). Thus, the G at position 2391, which corresponds to position -91 and belongs to the 5'-untranslated region, is the last base in the putative first exon. The C at position 2195 (asterisk) is the first base that aligns with the published cDNA. The partial sequence of the putative first intron is shown in lowercase letters. Sequence analysis of the 2542-bp HindIII-BamHI fragment using Professional MatInspector software identified several potential cis-regulatory elements (consensus sequences higher than 0.9). The subset of these elements as well as restriction endonuclease sites that are relevant to the present work are shown in bold type. For clarity, if there is an overlap between two cis-elements, one of them is underlined, and the other is shaded. C, transactivating activity of murine betaglycan promoter. The 2307-bp HindIII-NotI fragment was used for the construction of betaglycan reporter plasmid, pBG-Lux, as described under "Experimental Procedures." Luciferase activity was measured in total cell extracts obtained from L6E9 or Rat1 cells after 48 h of transient transfection with control empty vector (pGL3-b) or pBG-Lux.

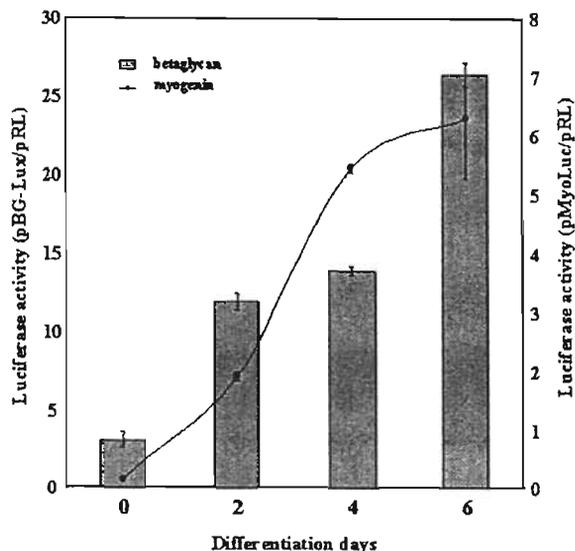


FIG. 3. Activity of betaglycan reporter plasmid increases in differentiating C_2C_{12} myoblasts. Myoblasts C_2C_{12} were transiently co-transfected with the reporter plasmid for betaglycan expression (pBG-Lux, columns) or myogenin expression (pMyoLuc, solid line) and a plasmid to normalize the transfection (pRLSV40). After transfection the cells were incubated in growth medium for 24 h and then switched to differentiation medium. The cells were harvested at 0, 2, 4, and 6 days after triggering differentiation, and dual luciferase activity was determined. The results show the means \pm S.D. of two experiments performed in triplicate.

muscle differentiation. In parallel, as a control of the differentiation process, the increase in expression of myogenin (40-fold) evaluated with pMyo-Luc reporter is shown.

Betaglycan Expression Increases during Myogenesis Are MyoD-dependent—As indicated before, betaglycan promoter contain several DNA-binding sites for MyoD and MEF2 proteins. Upon induction of muscle differentiation, these proteins bind to the regulatory regions and activate the transcription of skeletal muscle genes, such as creatine kinase. Thus, we asked whether or not by forcing the expression of myogenin or MyoD in myoblasts the transcriptional activity of the betaglycan reporter could be enhanced. For that purpose, myoblasts cells were transiently co-transfected with an expression vector containing the full-length myogenin cDNA (pEMSV-Myog) or with an expression vector containing the full-length MyoD cDNA (pEMSV-MyoD), together with pBG-Lux and pRLSV40. The transfected cells were maintained under proliferating conditions, and dual luciferase activity was measured after 24 h. Fig. 4 (open bars) shows that MyoD overexpression produced an important increase of the betaglycan reporter activity. However, no effect on the betaglycan promoter activity was observed by myogenin overexpression. The same results were observed when the cells were triggered to differentiate for 24 h (Fig. 4, dark bars). The inset of Fig. 4 shows the protein levels of MyoD or myogenin in the corresponding transfected cells, evaluated by Western blot analyses, and is compared with the induction of those MRFs in myoblasts induced to differentiate. The levels of expression of MyoD or myogenin in the transfected cells were comparable with or even higher than the levels observed during normal differentiation. These results demonstrate that betaglycan expression is under the control of MyoD but not of myogenin activity.

Betaglycan Expression Is Inhibited by TGF- β and Stimulated by Retinoic Acid—The promoter sequence for betaglycan contains putative binding sites for Smads, the major transcriptional mediators of the TGF- β responses, as well as for RA

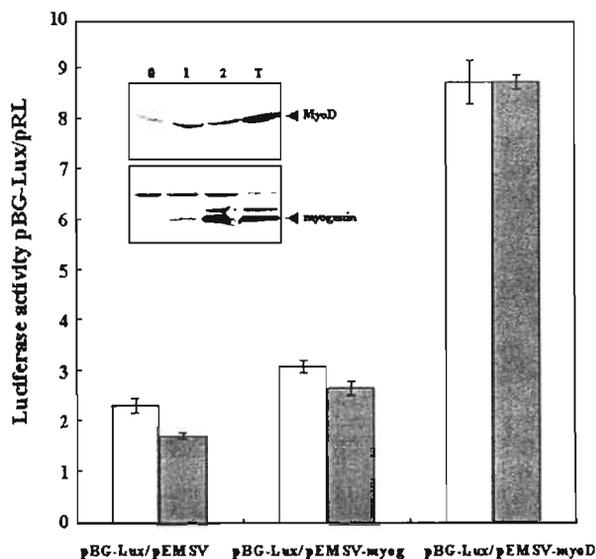


FIG. 4. Betaglycan reporter activity is under the control of MyoD expression. Myoblasts C_2C_{12} were transiently co-transfected with the reporter plasmid pBG-Lux and expression vectors containing no insert (pEMSV empty vector), the cDNA sequence for myogenin (pEMSV-myog), or MyoD (pEMSV-MyoD). Plasmid pRLSV40 was included in all the cases to normalize the transfection. Myoblasts were cultured in growth medium for 24 h (open bars) and extracted to measure dual luciferase activity. The other set of myoblasts was cultured for 24 h in differentiation media (dark bars) and processed in the same way. Luciferase activity was expressed as arbitrary units of pBG-Lux/pRLSV40, and the results show the means \pm S.D. of two independent experiments in triplicate. The inset shows as a control the MRFs expression after transfection. MyoD and myogenin expression was determined by Western blot after 0, 1, and 2 days of differentiation of untransfected myoblasts and the levels of both MRFs after 24 h of transfection (lane T) with pEMSV-MyoD or pEMSV-myogenin.

receptor. Because the induction of myoblast differentiation is modulated by removal of diverse growth factors (26) or by the addition of RA to the medium (11), we decided to evaluate their role on the activity of betaglycan promoter. For that purpose, myoblasts were transiently transfected with pBG-Lux and cultured in the presence and absence of defined growth factors FGF-2, BMP-2, HGF, and TGF- β and growth medium (10% fetal bovine serum). Fig. 5 shows that treatment of the cells for 24 h with FGF-2, BMP-2, or HGF did not modify luciferase activity compared with growth medium (10% fetal bovine serum), whereas treatment with any of the three TGF- β mammalian isoforms resulted in a 50% inhibition. These results suggest that growth factors like FGF-2, BMP-2, and HGF are not necessary to maintain the expression of betaglycan, whereas TGF- β is inhibitory. On the other hand, RA, a vitamin A metabolite that plays a major role in skeletal muscle development (31) and differentiation, strongly stimulated the transcriptional activity of pBG-Lux (Fig. 5). This stimulation is observed under growth or differentiation conditions (data not shown), indicating that RA, an inducer of skeletal muscle differentiation, stimulates the expression of betaglycan.

Betaglycan Enhances TGF- β 2 Potency in C_2C_{12} Myoblasts—Since the recent paper by Eickelberg *et al.* (32) reporting that depending on the type and quantity of the glycosaminoglycan attached to betaglycan, it may prevent the access of TGF- β to the signaling receptors, thereby acting as an inhibitor of the factor, the membrane-bound form of this co-receptor can not be assumed to be an enhancer of TGF- β . Therefore, to determine whether or not betaglycan in the C_2C_{12} myoblasts was a TGF- β enhancer or inhibitor, we analyzed its effect on a prototypical TGF- β assay. For this purpose we forced the expression of

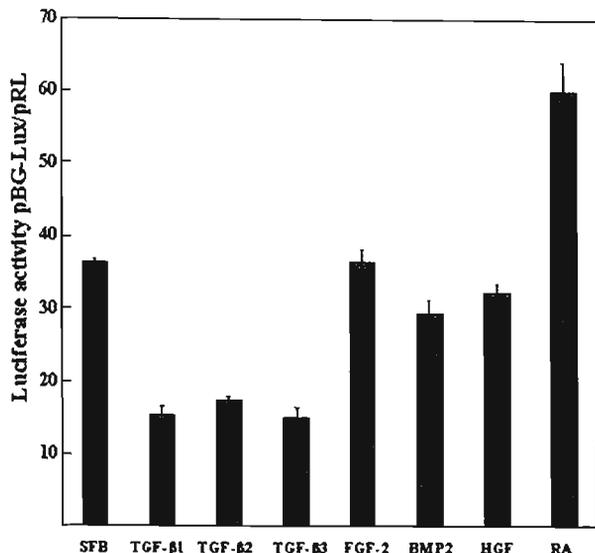
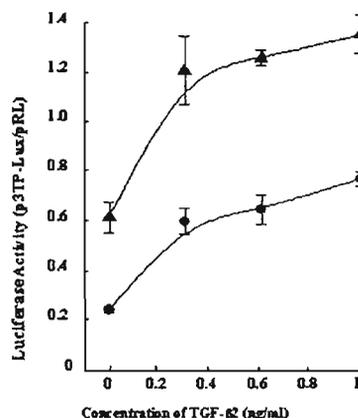


FIG. 5. Retinoic acid enhances betaglycan reporter activity, whereas TGF- β inhibits it. Myoblasts C_2C_{12} were transiently cotransfected with the pBG-Lux and a plasmid to normalize the transfection (pRLSV40). After transfection, the cells were cultured in growth medium for 24 h followed by the addition of FGF-2 (3 ng/ml), TGF- β 1 (1 ng/ml), TGF- β 2 (1 ng/ml), TGF- β 3 (1 ng/ml), BMP2 (1 nM), HGF (3 ng/ml), or RA (1 μ M). Control cells were maintained in growth medium (SFB) without additives. Myoblasts were incubated for 24 h with growth factors and extracted to measure dual luciferase activity. The luciferase activity was expressed as arbitrary units of pBG-Lux/pRLSV40. The results show the means \pm S.D. of two independent experiments performed in triplicate.

betaglycan in C_2C_{12} myoblasts using the adenoviral vector Adv-BG, which drives the expression of the wild type receptor. Cells infected with Adv-BG and a control empty vector were then transiently transfected with p3TP-lux, a well known and widely used TGF- β responsive luciferase reporter (33). After another 24 h of incubation in growth medium, TGF- β 2 was added to the cells at the concentrations indicated in Fig. 6. The luciferase activity of these cells indicated that both the magnitude and the sensitivity of the response greatly increased in the Adv-BG infected cells as compared with the control infected cells. Importantly, the presence of betaglycan in the Adv-BG-infected cells was verified by Western blot (Fig. 6B). These results clearly show that betaglycan forced expression in the C_2C_{12} cells enhances TGF- β function at least in nondifferentiated myoblasts.

Betaglycan Increases on the Extracellular Matrix and on the Surface of Myotubes during Skeletal Muscle Differentiation—To further evaluate the expression and localization of betaglycan during skeletal muscle differentiation, nonpermeabilized cell cultures were stained with anti-betaglycan antibodies. Fig. 7D shows that myoblasts express betaglycan that can be detected on the cell surface by immunofluorescent staining. However, cells stained 6 days after initiation of differentiation (Fig. 7E) showed a much higher betaglycan immunostaining on the cell surface and on fibrillar structures characteristic of ECM components (34, 35). Myotubes were revealed by staining using anti-myosin antibodies after permeabilization (Fig. 7, H and I). The ECM localization of perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, is shown in Fig. 7F. Panels K and L of Fig. 7 correspond to the merge of the immunostaining for betaglycan or perlecan, respectively, with the immunostaining for myosin. These results indicate that up-regulated betaglycan is mainly localized to the myotubes cell surface and associated to the ECM.

A



B

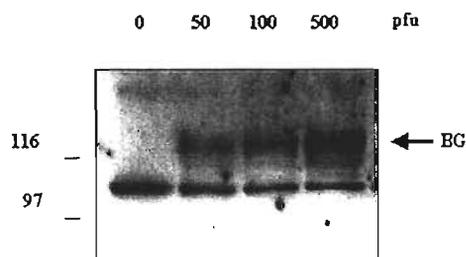


FIG. 6. Betaglycan enhances TGF- β 2 potency in C_2C_{12} myoblasts. A, C_2C_{12} myoblasts (control, closed circle) were infected with 100 plaque-forming units/cell of Adv-BG (closed triangle). After 24 h the myoblasts were transiently transfected with p3TP-Lux and pRL-SV40, an expression vector for *Renilla reniformis* luciferase, whose activity was used to normalize the transfection (pRL). After transfection the cells were incubated in growth medium for 24 h, and then increasing concentrations of TGF- β 2 were added. The cells were harvested after 24 h, and dual luciferase activity was determined. The results show the means of two independent experiments in triplicate. B, C_2C_{12} myoblasts were infected with the indicated plaque-forming units/cell (pfu) of Adv-BG. After 48 h, the cells were harvested, and betaglycan BG was determined by Western blot analyses as done for the experiment in Fig. 1B. The arrow indicates the migration position of betaglycan core protein.

DISCUSSION

The results presented in this paper demonstrate that the expression of betaglycan, a transmembrane heparan/chondroitin sulfate proteoglycan (19), increases during the differentiation of skeletal muscle cells. This conclusion is based on analysis of betaglycan mRNA and protein levels, activity of a reporter construct containing a portion of the mouse betaglycan promoter, analysis of functional betaglycan through binding, presentation of TGF- β 2 cells, and immunofluorescent staining during differentiation.

These observations are of interest in the context of the regulation of the skeletal muscle formation by proteoglycans. Skeletal muscle cell lines provide a very informative model to study the involvement of proteoglycans and growth factors in this process. Heparin-binding growth factors such as FGFs, HGF, and TGF- β are among the principal known regulators of skeletal muscle regeneration and may be normally present in muscle tissue and released upon injury or secreted auto- or paracrinally by the cells during the regeneration process (36–38). Quiescent and activated myoblasts express the c-Met receptor as well as FGF receptors (specially FGFR-1 and FGFR-4) (39,

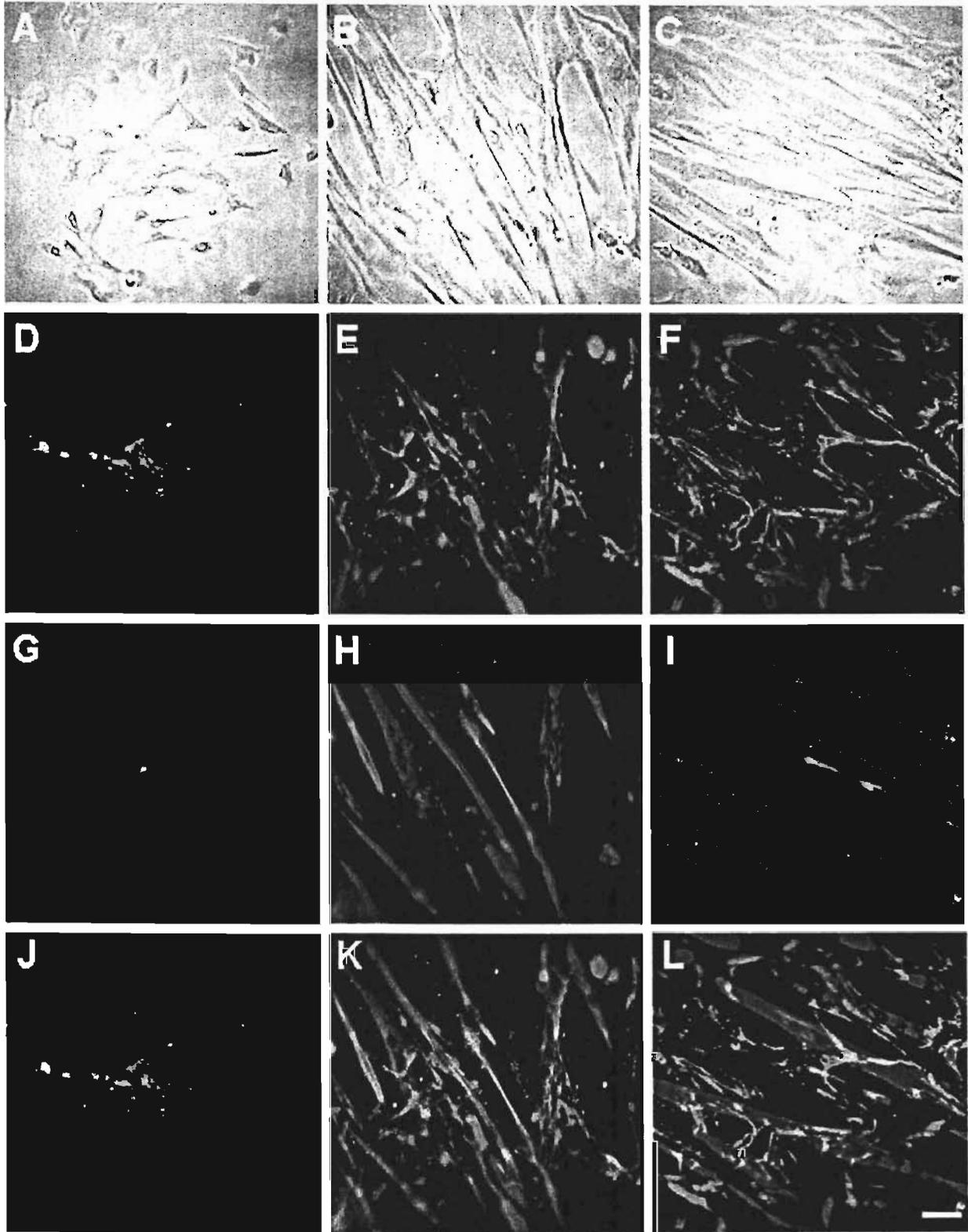


FIG. 7. **Betaglycan is located on the surface of differentiated myotubes and ECM.** Betaglycan localization was studied in C_2C_{12} cells under proliferating conditions (A, D, and G) or after induced to differentiate for 6 days (B, C, E, F, H, and I). Nonpermeabilized cells were processed for indirect immunofluorescent staining with anti-betaglycan (D and E) or anti-perlecan (F) antibodies and revealed with fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies (green). The same cells were permeabilized and processed for indirect immunofluorescent staining with anti-myosin antibodies (G-I) using TRITC-conjugated secondary antibodies (red). J-L correspond to D plus G, E plus H, and F plus I (merged images), respectively. Betaglycan localizes on the surface of myotubes and in the ECM. The fields were photographed and printed under identical conditions. Phase contrast microscopy is shown (A-C). The bar corresponds to 50 μm .

40). Growth factor responsiveness and consequently skeletal myogenesis are regulated by ligands and receptor availability (41), as well as by the presence of proteoglycans at the cell surface or at the ECM (either presenting or sequestering possible ligands). Thus, the expression, processing, and cellular localization of proteoglycans is critical to their modulatory growth factor function. As a matter of fact, we have shown before that perlecan, syndecan-1, and syndecan-3, all of them heparan sulfate proteoglycans, are regulated during *in vitro* skeletal muscle differentiation and play a role in modulating this process (5, 9, 11, 27).

In the present work we provide evidence that betaglycan, another important proteoglycan, is modulated during the myogenic differentiation. Betaglycan is a versatile co-receptor capable of regulating the effects of several members of the TGF- β superfamily (42–44). In several cell lines, including rat L6E9 myoblasts lacking endogenous betaglycan, it significantly increases the affinity of T β RII for TGF- β , thereby enhancing the responses to TGF- β (22, 45). It is postulated that this effect eliminates differences in efficacy among the three TGF- β isoforms. TGF- β 2, which binds to T β RI and T β RII with low affinity and has minimal consequence on growth inhibitory effects in the absence of betaglycan, behaves similarly to TGF- β 1 in the presence of betaglycan (22, 45). Importantly, it has been shown that betaglycan, in the presence of the type II activin receptor, binds inhibin and thereby mediates its well known activin antagonism (42, 43, 46). Another proposed function of betaglycan derives from the existence of a soluble form of the receptor that is produced by the proteolytic cleavage of its ectodomain (47–49). Soluble betaglycan binds TGF- β with the same affinities as its membrane precursor, but contrary to it, this binding sequesters and neutralizes the factor (33, 49). This capacity has been exploited therapeutically to prevent the deleterious effects of TGF- β in the progression of some kind of malignancies (50, 51). Interestingly, a novel and surprising function of betaglycan has been shown recently. Eickelberg *et al.* (32) demonstrated that membrane betaglycan may inhibit TGF- β signaling. This inhibition is not caused by enhanced secretion of soluble betaglycan. It is proposed that in some cell lines, the type and amount of the glycosaminoglycan chains attached to betaglycan core protein, may sterically prevent the access of TGF- β to the T β RI and T β RII, thereby preventing its downstream signaling (32).

In the present work we show that the expression of betaglycan is regulated during the skeletal muscle differentiation and that this up-regulation is mainly accounted for at the level of transcription. Cloning of a genomic DNA containing the first exon and the first 2140-bp upstream region of mouse betaglycan gene allowed us to test its activity during differentiation. Here we show unequivocally that the up-regulation of betaglycan is controlled at least by the expression of the MRF MyoD. In cells transiently transfected with MyoD, the activity of the betaglycan gene promoter, as measured by our reporter pBG-lux, was up-regulated, even in the presence of high serum condition where muscle differentiation is inhibited (4). Interestingly, transient expression of myogenin, another MRF, had no effect on the activation of betaglycan transcription. We also found that treatment of myoblasts with any of the TGF- β isoforms was inhibitory. On the other hand, treatment of the cells with RA, an inducer of skeletal muscle differentiation *in vivo* (52) and *in vitro* (11), increased the activity of the betaglycan reporter. Furthermore, the increase in activity mediated by RA was observed independently of the presence of serum. This effect of RA is consistent with a report by Nakayama *et al.* (53), who found that RA increases the levels of betaglycan mRNA in osteoblast-like cells. It is particularly interesting that

these growth factors and RA, which are known to be expressed in the vicinity of condensing mesenchymal cells and limb buds during early developmental stages (54–57), modulate betaglycan expression. Interestingly, it has been described that RA induces differentiation only in MyoD-expressing muscle cells by the formation of the RA receptor-MyoD complex (58). Other growth factors such as FGF-2, BMP-2, or HGF did not significantly affect the promoter activity. This lack of BMP-2 effects contrasts with the findings of Ji *et al.* (1), who, using osteoblasts, demonstrated that BMP-2 inhibited the rat betaglycan gene promoter and identified a 180-bp region responsible of this silencing. The fact that we did not observe any BMP-2 effect may be explained simply by a difference in the cell line used in our experiments. Additionally, it may be possible that to detect the activity of the BMP *cis*-acting element it has to be removed from the basal promoter to reveal its silencing activity (1). Finally, although we have emphasized on the transcriptional control of betaglycan gene expression, we are aware that other levels of regulation may exist. This is particularly possible in view of the fact that our betaglycan reporter remains fully active at day 6, even when the levels of its mRNA and cell surface protein have decreased from their levels at day 4. Additionally, the fact that some of the up-regulated betaglycan is being localized to the ECM (Fig. 7) makes it very difficult to fully account for all of the betaglycan induced during differentiation.

The function of betaglycan in skeletal muscle cells and the consequences of betaglycan up-regulation during differentiation are not known and can only be determined experimentally. However, it is reasonable to guess that they will depend on the versatile ability of betaglycan as a co-receptor of diverse growth factors. The literature on the role of TGF- β in muscle differentiation is abundant but controversial. TGF- β has been shown to be a strong inhibitor of skeletal muscle differentiation (14, 59, 60) but also to be a promoter of terminal differentiation (61). However, the fact that the expression of a truncated dominant negative T β RII receptor inhibits the C₂C₁₂ differentiation suggests the need for an active TGF- β pathway for its differentiation (62). One clue to the role of betaglycan in C₂C₁₂ differentiation can be anticipated from our finding that betaglycan performs a TGF- β presentation role in nondifferentiated C₂C₁₂ myoblasts (Fig. 6). Reasoning based on these data would lead us to conclude that betaglycan induction may be acting to promote the effects of TGF- β , and therefore it may act to promote the effects of this growth factor on the differentiation process. The regulation of TGF- β activity can be more intricate considering that TGF- β also binds to other proteoglycans. In myoblasts that do not express decorin, a proteoglycan with high affinity for TGF- β (63), we have observed an inhibition of TGF- β signaling (14) together with a significant increase in the binding of TGF- β to betaglycan, suggesting a competition between both proteoglycans for TGF- β .²

On the other hand, although it has not been demonstrated yet, the fact that betaglycan binds FGF-2 via its heparan sulfate chains makes it a candidate to regulate the association of this growth factor with its kinase receptor and therefore its actions (64). In this regard, the effects of betaglycan on muscle cell differentiation may resemble those of the other heparan sulfate proteoglycans that we have studied (5, 9, 11, 27). Another fact to consider is the localization of the up-regulated betaglycan. It is possible to speculate that betaglycan is shed from the surface and incorporated into the ECM serving there as a TGF- β and/or FGF-2 reservoir. Thus, betaglycan roles

² C. Riquelme, C. Cabello-Verrugio, and E. Brandan, manuscript in preparation.

during skeletal muscle differentiation are to be determined. Experiments to test the effects of constitutive betaglycan expression and inhibition of endogenous betaglycan expression in C₂C₁₂ myoblasts are in progress.

In summary, we have found that the expression of betaglycan is up-regulated during skeletal muscle differentiation. This phenomenon is modulated by growth factors and RA and is MyoD-dependent. The regulatory sequences responsible for this modulation are contained within a 2100-bp segment of the gene that contains consensus binding sites for several transcription factors such as SP1, Smad3, Smad4, MyoD, MEF2, and RA binding proteins. These results would help to understand the complex regulation during development and differentiation of this key integral membrane heparan/chondroitin sulfate proteoglycan.

Acknowledgments—We are indebted to Dr. Kornelia Polyak (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA) for generous advice and assistance in the generation of recombinant adenoviruses. Also, we thank Dr. Laura Ongay-Larios for technical assistance with the nucleotide sequencing.

REFERENCES

- Ji, C., Chen, Y., McCarthy, T. L., and Centrella, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 30487–30494
- Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1991) *Cell* **64**, 867–869
- Rapraeger, A. C., Krufka, A., and Olwin, B. B. (1991) *Science* **252**, 1705–1708
- Olwin, B. B., and Rapraeger, A. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 631–639
- Larrain, J., Carey, D. J., and Brandan, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32288–32296
- España-Lopez, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., and Lopez-Casillas, F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14588–14596
- Bernfield, M., Hinkes, M. T., and Gallo, R. L. (1993) *Dev. Suppl.* **205**, 205–212
- Carey, D. J. (1997) *Biochem. J.* **327**, 1–16
- Fuentealba, L., Carey, D. J., and Brandan, E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37876–37884
- Naka, D., Ishii, T., Shimomura, T., Hishida, T., and Hara, H. (1983) *Exp. Cell Res.* **209**, 317–324
- Larrain, J., Cizmeci-Smith, G., Troncoso, V., Stahl, R. C., Carey, D. J., and Brandan, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18418–18424
- Iozzo, R. V. (1997) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 141–174
- Isaka, Y., Brees, D. K., Ikegaka, K., Imai, E., Noble, N. A., and Border, W. A. (1996) *Nat. Med.* **2**, 418–423
- Riquelme, C., Larrain, J., Schönherr, E., Henriquez, J. P., Kresse, H., and Brandan, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3589–3596
- Brandan, E., Fuentes, M. E., and Andrade, W. (1991) *Eur. J. Cell Biol.* **55**, 209–216
- Cheifetz, S., Andres, J. L., and Massague, J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16984–16991
- Cheifetz, S., and Massague, J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12025–12028
- Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., ten Dijke, P., Iwata, K. K., and Massague, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20533–20538
- Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doady, J., Andres, J. L., Lane, W. S., and Massague, J. (1991) *Cell* **67**, 785–795
- Andres, J., Ronnstrand, L., Cheifetz, S., and Massague, J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23282–23287
- Andres, J., DeFalcis, D., Noda, M., and Massague, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5927–5930
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J., and Massague, J. (1993) *Cell* **73**, 1435–1444
- Yaffe, D., and Saxel, O. (1977) *Nature* **270**, 725–727
- Ponce-Castaneda, M. V., España-Lopez, J., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza, V., and Lopez-Casillas, F. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 189–196
- He, T.-C., Zhou, S., Da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2509–2514
- Brandan, E., Carey, D. J., Larrain, J., Melo, F., and Campos, A. (1996) *Eur. J. Cell Biol.* **71**, 170–176
- Larrain, J., Alvarez, J., Hassell, J. R., and Brandan, E. (1997) *Exp. Cell Res.* **234**, 405–412
- Labarca, C., and Paigen, K. (1980) *Anal. Biochem.* **102**, 344–352
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Olson, E. N. (1992) *Semin. Cell Biol.* **3**, 127–136
- Mocchetti, I., and Wrathall, J. R. (1995) *J. Cell. Biochem.* **62**, 853–870
- Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M., and Wells, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 823–829
- Vilchis-Landeros, M. M., Montiel, J. L., Mendoza, V., Mendoza-Hernandez, G., and Lopez-Casillas, F. (2001) *Biochem. J.* **355**, 215–222
- Melo, F., Carey, D. J., and Brandan, E. (1996) *J. Cell. Biochem.* **62**, 227–239
- Osses, N., and Brandan, E. (2002) *Am. J. Physiol.* **282**, C383–C394
- Jennische, E., Ekberg, S., and Matejka, G. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, C122–C128
- Sakuma, K., Watanabe, K., Sano, M., Kitajima, S., Sakamoto, K., Uramoto, I., and Totsuka, T. (2000) *Acta Neuropathol.* **99**, 177–185
- Tatsumi, R., Anderson, J., Nevoret, C., Halevy, O., and Allen, R. (1998) *Dev. Biol.* **194**, 114–128
- Cornelison, D., and Wold, B. (1997) *Dev. Biol.* **191**, 270–283
- Kastner, S., Elias, M. C., Rivera, A. J., and Yablonska-Reuveni, Z. (2000) *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 1079–1096
- Scata, K. A., Bernard, D. W., Fox, J., and Swain, J. L. (1999) *Exp. Cell Res.* **250**, 10–21
- Bernard, D. J., Chapman, S. C., and Woodruff, T. K. (2002) *Mol. Endocrinol.* **16**, 207–212
- Gray, P. C., Bilezikjian, L. M., and Vale, W. (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* **188**, 254–260
- Massague, J. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791
- Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Centrella, M., McCarthy, T. L., and Madri, J. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13567–13572
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M., and Vale, W. (2000) *Nature* **404**, 411–414
- Andres, J., Stanley, K., Cheifetz, S., and Massague, J. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 3137–3145
- Arribas, J., Lopez-Casillas, F., and Massague, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17160–17165
- Lopez-Casillas, F., Payne, H., Andres, J., and Massague, J. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 557–568
- Bandyopadhyay, A., Zhu, Y., Cibull, M. L., Bao, L., Chen, C., and Sun, L. (1999) *Cancer Res.* **59**, 5041–5046
- Bandyopadhyay, A., Lopez-Casillas, F., Malik, S. N., Montiel, J. L., Mendoza, V., Yang, J., and Sun, L. Z. (2002) *Cancer Res.* **62**, 4690–4695
- Monoi, T., Miyagawa-Tomita, S., Nakamura, S., Kimura, I., and Momoi, M. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 245–253
- Nakayama, H., Ichikawa, F., Andres, J. L., Massague, J., and Noda, M. (1994) *Exp. Cell Res.* **211**, 301–306
- Ralphs, J. R., Wylie, L., and Hill, D. J. (1990) *Development* **109**, 51–58
- Li, S., and Muneoka, K. (1999) *Dev. Biol.* **211**, 335–347
- Itoh, N., Mima, T., and Mikawa, T. (1996) *Development* **122**, 291–300
- Mollard, R., Viville, S., Ward, S. J., Decimo, D., Chambon, P., and Dolle, P. (2000) *Mech. Dev.* **94**, 223–232
- Froeschle, A., Alric, S., Kitzmann, M., Carnac, G., Aurade, F., Rochette-Egly, C., and Bonniou, A. (1998) *Oncogene* **16**, 3369–3378
- Florini, J. R., Roberts, A. B., Ewton, D. Z., Falen, S. L., Flanders, K. C., and Sporn, M. B. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 16509–16513
- Massague, J., Cheifetz, S., Endo, T., and Nadal-Ginard, B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8206–8210
- Zentella, A., and Massague, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5176–5180
- Filvaroff, E. H., Ebner, R., and Derynck, R. (1994) *Development* **120**, 1085–1095
- Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L. M., Heinegard, D., Twardzik, D. R., Border, W. A., and Ruoslahti, E. (1994) *Biochem. J.* **302**, 527–534