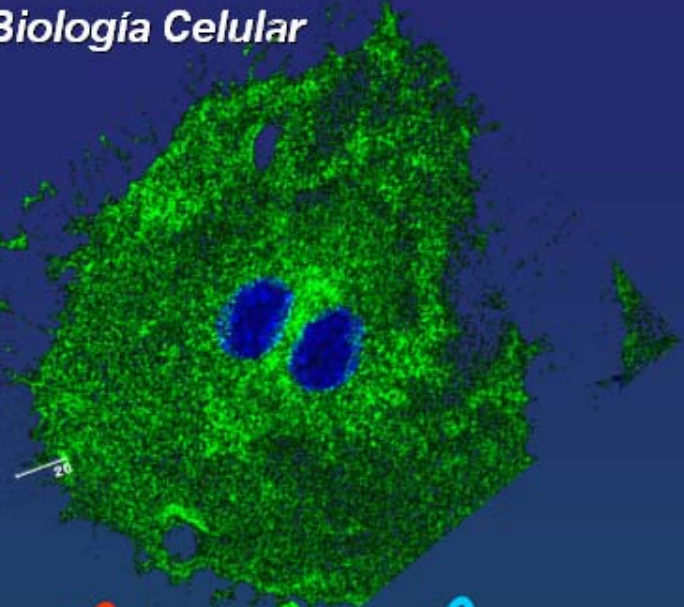
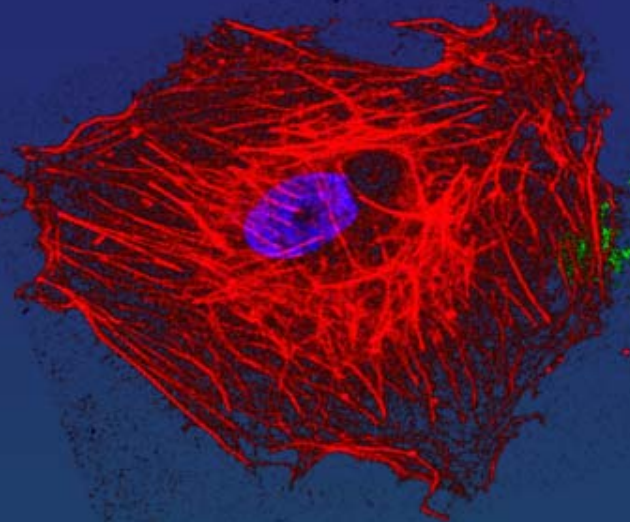
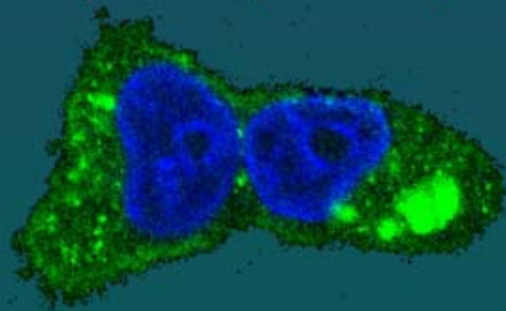


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



*Bases Moleculares y Celulares de la
Telangiectasia Hemorrágica
Hereditaria*



TESIS DOCTORAL

África Fernández López
Madrid, 2006

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

Departamento de Biología Celular



**BASES MOLECULARES Y CELULARES DE LA
TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA**

Memoria presentada por

ÁFRICA FERNÁNDEZ LÓPEZ

Para optar al grado de Doctor en Biología

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) bajo la dirección del Dr. Carmelo Bernabéu Quirante y la Dra. Luisa-María Botella Cubells.

VºBº del director de la tesis

A blue ink signature of Carmelo Bernabéu Quirante.

Carmelo Bernabéu Quirante

VºBº del director de la tesis

A blue ink signature of Luisa-María Botella Cubells.

Luisa-María Botella Cubells

VºBº del interesado

A blue ink signature of África Fernández López.

África Fernández López

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los proyectos:

PI020200 del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Bases moleculares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Detección y relevancia funcional de mutaciones en el gen de endogлина. Período 2002-2005. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

08.4/0026.1/2003 de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). Mutaciones y regulación del gen de endogлина en la HHT. Período 2003. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

SAF05-01090 del Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de I+D: Bases moleculares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I y II en España. Período 2006-2008. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Investigador Principal: Luisa-María Botella Cubells.

HHT Foundation International, Inc., Monkton, MD, USA. Primary cultures of endothelial and monocytic cells derived from HHT patients: An open window to unravel the pathogenicity of HHT. Período Julio 2005-Julio 2006. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

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

"En el fondo, los científicos somos gente con suerte, podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida". Lee Smoli, físico teórico y cosmólogo.

*A aquéllos que creyeron en mí
cuando yo dudaba.
Los que me enseñaron a no rendirme,
a pensar por mí misma,
a soñar, a inventar,
los que me dieron la ilusión
para seguir creyendo
que todo puede ser posible...*

*En definitiva, aquéllos que cada día hacéis
de mi vida el lugar perfecto
para ser feliz.*

*En memoria de aquéllos que hubiera deseado que siguieran aún aquí, a mi lado....
Y en especial a las mujeres de mi familia, por su increíble fuerza y entrega
incondicional.*

-África-

Agradecimientos

Estos años de tesis han sido, probablemente, los más intensos de mi vida, tanto profesional, como personalmente, por lo que me falta papel para agradecer a todos aquellos que, de una forma u otra, me han guiado y acompañado ayudándome a construir mi propio camino, aquellos que han sido felices con mis logros y que han luchado conmigo en los momentos más difíciles. Gracias a toda la fuerza, el cariño, el apoyo y, sobre todo, a toda la ilusión que me han regalado, estoy aquí, disfrutando de cada línea que escribo de esta tesis, donde guardo, además, momentos muy importantes de mi vida.

Parece increíble, pero hace ya siete años que te cruzaste en mi camino, Ardavín, y me contagiaste la pasión por la ciencia. Durante los tres años que estuve en tu laboratorio aprendí lo duro y, a la vez, lo adictivo que es este trabajo. He tenido mis baches, como todo el mundo, pero ahora sé que me queda ilusión y ganas de luchar para rato. Aquellos años en el 33 fuimos una piña, Sara, Gloria, Mary, Bea, Álvaro, Cris, Vero, Héctor, Pilar, con cada uno de vosotros guardo incontables momentos especiales.

Hace cuatro años que terminé la carrera y que tuve la suerte de comenzar mi tesis doctoral en este grupo, en el cual me he ido formando, no sólo como científica, sino también como persona, rodeada de un ambiente inmejorable. Carmelo, gracias por la libertad que me has dado para elegir mis caminos, la posibilidad de viajar, conocer como funciona este "mundillo" en otros lugares y de mostrar mi trabajo, por la confianza depositada en mi y la ayuda a la hora de dirigir mis pasos. Luisa, en fin, necesitaría un libro completo para poder describir tu total dedicación y entrega a los demás y al trabajo, tu perseverancia, tu fuerza e ilusión por este proyecto, a ti y a Paquillo os debo gran parte de esta tesis, además de grandes investigadores, sois increíbles amigos.

Tantas y tantas horas compartidas con Blanco, mi enciclopedia científica, ha sido un placer seguirte en este camino y, ahora más que nunca, sé que tengo un gran amigo, Juanfran y Arturo, ojala no terminaran nuestras increíbles charlas científicas y metafísicas, Carmen, gracias por tanta ayuda y cariño, Ion, a ver si logro convencerte de que te quedes en Madrid, y con mis niñas, Lu y Evita, no sé que hubiera hecho sin vosotras, sois un lujo de amigas y de compañeras, el mayor tesoro que he podido encontrar.

Por supuesto he de agradecer a los médicos con quienes hemos desarrollado este trabajo, Roberto, Alfonso y Carmelo, por su total dedicación y su lucha por dar a conocer esta enfermedad. A los pacientes, con quienes he tenido el placer y la suerte de compartir nuestro trabajo y sus experiencias, ellos son el motor que nos da fuerza para seguir luchando. A la asociación HHT España, en especial a Santiago de la Riva, por su lucha, no sólo por los pacientes directamente, sino también por nosotros, ayudándonos en todo lo que está en su mano para que la investigación continúe. Y a la asociación internacional, por toda su ayuda económica, tanto en forma de proyecto como de becas para poder asistir a los congresos.

Gracias a todos los que han colaborado activamente con nosotros, el grupo de Alicia y Jose Miguel, en Salamanca, que han realizado los experimentos en ratón, a Eliecier, Jose Ramón, Teresa, Ana y Pilar por su ayuda con la secuenciación, Jose Ramón, por las tinciones, el grupo de Manolo Guzmán y la Unidad de Genómica, por la ayuda con las PCRs cuantitativas y los *Microarrays*, Marcos Malumbres, por los vectores y el "proyecto ratón", Pedro Lastres, por la citometría, Scott Friedman, Calvin Vary y Miguel Quintanilla, con quien hemos realizado varios experimentos en colaboración. Y gracias a aquellos que además de ayudarme científicamente, han aguantado mis infinitos ruegos y preguntas, en especial Arkaitz y Marcos, mis pilares científicos.

Y ya, en la recta final de la tesis, he disfrutado de dos meses en Nueva York, en el grupo de Angel Pellicer, a él, y a todas las postdoc españolas (en especial a Martita), les debo una experiencia increíble, tanto personal como profesional y también toda la ayuda que me prestaron para que encontrara un labo fenómeno, al que espero poder incorporarme pronto.

Y, sinceramente, no hubiera sido tan feliz estos años sino fuera por el lujazo de ambiente que tenemos los becarios en el CIB, gracias a todos por hacer que llegue cada mañana sonriendo, Raquel, Laurita, Noemí, Bibi, Gaizka, Sonia, Marta, Estherilla, Carlos, Donna, Úrsula, Silvia, Marian, Asier, Jimena, Javi, Rodri, Tilman y un interminable etcétera...

Y gracias una y mil veces a mi grupo surrealista, Vero, Óscar, Héctor, Sara y David, estemos donde estemos, espero que sigamos compartiendo cada momento de felicidad o tristeza, cada logro, cada pensamiento, sensación o locura transitoria de por vida. Y a mis tesoros, Gaëlle, Gonya, Maribel, el clan, el equipo y mi rincón gaditano.

Mi familia, pilar, soporte, alas, gracias por el inagotable apoyo verdaderamente incondicional.

Y a ti, pequeño, por devolverme la ilusión, y los sueños.....

Abreviaturas

- AA-** Ácido Aminocaproico
- ADN-** Ácido Desoxirribonucleico
- ADNc-** Ácido Desoxirribonucleico complementario
- ALK, ACVRL-** *Activin Receptor-like kinase*
- AP-** Aprotinina
- ARN-** Ácido Ribonucleico
- ARNc-** Ácido Ribonucleico complementario
- ARNi-** Ácido Ribonucleico interferente
- ARNm-** Ácido Ribonucleico mensajero
- ARNr-** Ácido Ribonucleico ribosómico
- AT-** Ácido Tranexámico
- AVM-** *Arterio-venous Malformations*
- BMPs-** *Bone Morphogenetic Proteins*
- BMPRII-** *Bone Morphogenetic Protein Receptor II*
- BOEC-** *Blood Outgrowth Endothelial Cells*
- BRE-** *BMP-responsive Element*
- CAVM-** *Cerebral Arterio-venous Malformations*
- Cdc-** *Cell Division Cycle*
- CE-** Célula Endotelial
- CECs-** Células Endoteliales Circulantes
- COX-2-** Ciclooxygenasa-2
- CT-** Citoplásmico
- DMEM-** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- Dpp-** *Decapentaplegic*
- EBM-2-** *Endothelial Basal Medium 2*
- EC-** Extracelular
- EDG1-** *Endothelial Differentiation Sphingolipid G-Protein-coupled Receptor 1*
- EGF-** *Epidermic Growth Factor*
- EGM-2-** *Endothelial Growth Medium 2*
- EGFP-** *Green Fluorescent Protein*
- ELISA-** *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*
- ENG-** Endoglina
- eNOS-** *Endothelial Nitric Oxide Synthase*
- EPCs-** *Endothelial Precursor Cells*

- ERK-** *Extracellular-signal-regulated Kinase*
- ESAM-** *Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*
- FA-** *Fibroblasts-Associated Antigen*
- FITC-** *Fluorescein Isothiocyanate*
- Flk1-** *Fetal Liver Kinase 1*
- Flt1-** *Fms-Related Tyrosine Kinase 1*
- GAPDH-** *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
- GDF-** *Growth and Differentiation Factor*
- GDNF-** *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*
- HAVM-** *Hepatic Arterio-venous Malformations*
- HBSS-** *Hanks Balanced Salts Solution*
- HEK293T-** *Human Embryonic Kidney carcinoma cells*
- HHT-** *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*
- HMEC-** *Human Microvascular Endothelial Cells*
- HMGB1-** *High-mobility Group Box 1 Protein*
- HSP90-** *Heat Shock Protein 90*
- hTERT-** *human Telomerase Reverse Transcriptase*
- HUVEC-** *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
- INK4a-** *Inhibitor of Cyclin-dependent Kinase 4a*
- ITGA6-** *Integrina α 6*
- JAM-** *Junctional Adhesion Molecule*
- JNK-** *Jun N-terminal Kinase*
- LAP-** *Latency-Associated Peptide*
- LFA-1-** *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*
- LIM-** Familia a la que pertenecen los miembros **Lin-1**, **Isl-1**, **Mec-1**
- LTBP-** *Latent TGF- β Binding Protein*
- LTR-** *Long Terminal Repeat*
- MAPK-** *Mitogen-Activated Protein Kinase*
- MEEC-** *Mouse Embryonic Endothelial Cells*
- MIS-** *Müllerian Inhibiting Substance*
- MMP-** *Matrix Metalloproteinase*
- MPF-** *M-phase promoting factor*
- MTT-** *Metil Tetrazolio*
- N-WASP-** *Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*

- NO-** *Nitric Oxide*
- OMIM-** *On Line Mendelian Inheritance in Man*
- PAI-1-** *Plasminogen Activator Inhibitor-1*
- PAVM-** *Pulmonary Arterio-venous malformations*
- pb-** *Pares de bases*
- PBMCs-** *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
- PCR-** *Polymerase Chain Reaction*
- PDGF-** *Platelet-Derived Growth Factor*
- PECAM-** *Platelet/Endotelial Cell Adhesión Molecule-1*
- PI-** *Propidium Iodide*
- PPH-** *Primary Pulmonary Hypertension*
- Rb-** *Retinoblastoma*
- Rho BTB1-** *Rho BTK Binding Protein 1*
- Rho GDI 2-** *Rho GDP-dissociation inhibitor*
- RLU-** *Relative Luciferase Units*
- RT-** *Reverse Transcription*
- SD-** *Standard Deviation*
- SDS PAGE-** *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
- SEN6-** *Senescence-related 6*
- SSC-** *Sodium Chloride- Sodium Citrate*
- SV40LT-** *Simian Virus 40 Large T Antigen*
- TAM-** *Tumor-Associated Macrophage*
- TβRI-** *TGF-β Rceptor I*
- TβRII-** *TGF-β Rceptor II*
- TGF-β-** *Transforming Growth Factor β*
- Tie-2-** *Tyrosine Kinase Endothelial Receptor 2*
- TM-** *Transmembrana*
- TNT-** *Tris-Hcl, NaCl, Tween 20*
- uPA-** *Urokinase-type Plasminogen Activator*
- uPAR-** *Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*
- URL-** *Unidades Relativas de Luciferasa*
- VE-Cad 2-** *Vascular Endothelial Cadherin 2*
- VEGF-** *Vascular Endothelial Growth Factor*
- vWF-** *von Willebrand Factor*

WASL- *Wiskott-Aldrich syndrome-like*

wt- *wild type*

ZRP1- *Zyxin Related Protein 1*

ZP- *Zona Pelúcida*

Tabla de contenidos

AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS	13
TABLA DE CONTENIDOS	19
RESUMEN	25
INTRODUCCIÓN	29
1. TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA O SÍNDROME DE RENDU-OSLER-WEBER	31
1.1 Manifestaciones clínicas de la HHT	32
1.2 Tratamientos empleados en pacientes de HHT	35
2. BASE GENÉTICA DE LA HHT	36
2.1 Proteína mutada en HHT1: Endoglina	39
2.1.1 Distribución celular	39
2.1.2 Estructura y función	40
2.1.3 Funciones independientes de TGF- β	43
2.2 Proteína mutada en HHT2: ALK1	45
2.2.1 Distribución celular	45
2.2.2 Estructura y función	45
3. SEÑALIZACIÓN DE TGF-β	46
3.1 La superfamilia del TGF- β	46
3.2 El complejo receptor de TGF- β	47
3.3 Señalización de TGF- β independiente de Smads	49
3.4 Señalización de TGF- β en células endoteliales	49
4. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES VASCULARES	51
4.1. Modelos animales	51
4.1.1 Ratones <i>knock out</i> homocigotos para <i>endoglina</i> (<i>eng</i> ^{-/-})	53
4.1.2 Ratones heterocigotos para <i>endoglina</i> (<i>eng</i> ^{+/-})	54
4.1.3 Ratones <i>knock out</i> homocigotos para <i>alk1</i> (<i>alk</i> ^{-/-})	56
4.1.4 Ratones heterocigotos para <i>alk1</i> (<i>alk</i> ^{+/-})	57
4.1.5 Mutantes de <i>alk1</i> en pez cebra	58
4.2 Modelos celulares	58
4.2.1 HUVECs	58
OBJETIVOS	61
MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. Análisis de mutaciones y polimorfismos	67
1.1 Muestras de los pacientes	67
1.2 Aislamiento y amplificación de ADN genómico	67

1.3 Mutagénesis dirigida _____	68
2. Análisis de expresión de ARN _____	68
2.1 RT-PCR semicuantitativa _____	68
2.2 PCR Cuantitativa a tiempo real _____	69
3. Cultivos celulares _____	70
3.1 Aislamiento de células mononucleares _____	70
3.2 Cultivos de Células Endoteliales _____	71
3.3 Cultivos de Células no Endoteliales _____	72
4. Transfecciones y Ensayos de Luciferasa _____	72
5. Análisis de expresión de proteínas _____	74
5.1 Citometría de Flujo _____	74
5.2 <i>Western Blot</i> _____	76
5.3 ELISA _____	77
5.4 Microscopía de Inmunofluorescencia _____	77
6. Ensayos de migración, adhesión y angiogénesis _____	78
6.1 <i>Wound Healing</i> _____	78
6.2 Ensayo de adhesión a fibronectina _____	78
6.3 Ensayo de formación de tubos sobre Matrigel _____	78
7. Ensayos de ciclo celular _____	79
7.1 Ensayo de proliferación MTT _____	79
7.2 Estudio del perfil de ciclo celular en citometría de flujo _____	79
8. Tratamiento con fármacos _____	79
9. Estudio de chips de ADNc (<i>Microarrays</i>) _____	80
9.1 Hibridación y detección de la señal _____	80
9.2 Análisis estadístico de los datos _____	80
10. Inmortalización de Células Endoteliales _____	81
11. Análisis estadísticos _____	82
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	83
OBJETIVO 1. ESTUDIO DE MUTACIONES EN PACIENTES CON TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA. _____	85
1.1 Análisis de mutaciones en pacientes españoles de HHT _____	85
1.2 Estudio de polimorfismos en pacientes de HHT _____	92
OBJETIVO 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ENDOGLINA EN MACRÓFAGOS Y ESTUDIO DE SU POSIBLE UTILIDAD COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO. _____	93
2.1 Estudio de los niveles de expresión de Endogлина en monocitos diferenciados in vitro de pacientes de HHT _____	93
2.2 Expresión de ALK1 en monocitos humanos _____	99

2.3 Señalización de la vía de ALK1 en monocitos _____ 100

OBJETIVO 3. BÚSQUEDA DE UN MODELO CELULAR VÁLIDO PARA EL ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA. _____ 104

3.1 Obtención de células endoteliales derivadas de sangre periférica__ 104

3.2 Expresión de Endogлина en BOECs _____ 110

3.3 Efecto de ALK1 sobre el promotor de endogлина _____ 112

3.4 Expresión de ALK1 en BOECs _____ 114

3.5 Efecto de Endogлина sobre el promotor de ALK1 _____ 116

3.6 Análisis de las vías de señalización de TGF-β en BOECs HHT ____ 117

3.7 Efecto de Endogлина y ALK1 sobre el promotor de ALK5 _____ 124

3.8 Efecto de Endogлина sobre el promotor de TGF-β1 _____ 126

3.9 Mutagénesis dirigida in vitro _____ 128

3.10 Tratamiento de pacientes españoles de HHT con Ácido Tranexámico (AT) _____ 134

3.11 Efecto de AT sobre los niveles de Endogлина y ALK1 en células endoteliales _____ 134

3.12 Efecto de otros antifibrinolíticos sobre los niveles de Endogлина y ALK1 en células endoteliales _____ 136

3.13 Efecto del AT sobre las vías de señalización de TGF-β _____ 138

3.14 Efecto del AT, AA y AP sobre funciones biológicas de las células endoteliales _____ 141

3.15 Inmortalización de BOECs _____ 146

OBJETIVO 4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE PACIENTES CON TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA E INDIVIDUOS CONTROL. IMPLICACIÓN DE ESTOS GENES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD. _____ 150

4.1 Estudio de los genes diferencialmente expresados en células endoteliales de pacientes de HHT _____ 150

4.2 Selección de genes a validar _____ 152

4.3 Validación de los genes seleccionados _____ 154

4.4 Estudio de la angiogénesis en BOECs HHT _____ 158

4.5	Estudio de la migración de células endoteliales de pacientes de HHT	161
4.6	Estudio de la adhesión de células endoteliales de pacientes de HHT	163
4.7	Posibles alteraciones en la respuesta inflamatoria en pacientes de HHT	166
4.8	Estudio de la organización del citoesqueleto en células endoteliales de pacientes de HHT	168
4.9	Estudio del ciclo celular en células endoteliales de pacientes de HHT	172
4.10	Posibles alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico en células endoteliales de pacientes de HHT	175
DISCUSIÓN GENERAL Y MODELO		179
CONCLUSIONES		189
BIBLIOGRAFÍA		193
ANEXOS		214

Resumen

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) es una enfermedad vascular autosómica dominante caracterizada por hemorragias espontáneas y recurrentes. Mutaciones en los genes que codifican para endoglin y ALK1 son responsables de HHT1 y HHT2, respectivamente. Ambas proteínas son componentes del complejo receptor del TGF- β , expresadas fundamentalmente en células endoteliales. Identificamos la mutación responsable de la enfermedad en 35 familias, encontrando una prevalencia de HHT2 sobre HHT1. A partir de sangre periférica de pacientes de HHT, aislamos células endoteliales (BOECs) y estudiamos sus alteraciones funcionales en relación a células de individuos sanos. Las BOECs de pacientes de HHT, tanto HHT1 como HHT2, presentaban bajos niveles de Endoglin y ALK1, así como una señalización defectuosa de esta vía de TGF- β . Como consecuencia, los niveles de ALK5 disminuyen dando lugar a un defecto general de la señalización de TGF- β . La señalización defectuosa de TGF- β conduciría a alteraciones en la expresión de un gran número de genes diana, así como en las funciones en las que éstos se encuentran implicados. Así, las BOECs de pacientes presentan alteraciones a nivel de adhesión, migración, síntesis de matriz extracelular, organización del citoesqueleto, ciclo celular o fisiología vascular, dando lugar a un defecto general en angiogénesis y una fragilidad de los capilares que explican la aparición de malformaciones vasculares. En este trabajo hemos identificado en detalle los mecanismos moleculares y celulares que conducen a las manifestaciones de la HHT y describimos un modelo celular útil para el estudio de la enfermedad y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Introducción

1. TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA O SÍNDROME DE RENDU-OSLER- WEBER

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) o Síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad vascular autosómica dominante caracterizada fundamentalmente por la aparición de estructuras vasculares anormales que conducen a frecuentes hemorragias nasales, telangiectasias y malformaciones arterio-venosas viscerales (AVMs) (Shovlin and Letarte, 1999). Los estudios más recientes indican que la prevalencia media de la HHT se halla en torno a 1/5.000-1/8.000, siendo mayor en ciertas regiones como la isla de Funen en Dinamarca, la región de Jura en Francia, o la isla de Bonaire en las Antillas holandesas (Kjeldsen *et al.*, 1999; Plauchu *et al.*, 1989; Shovlin and Letarte, 1999).

La HHT fue descrita por primera vez por Henry Gawen Sutton, a mediados del siglo XIX (Sutton, 1864). Henri Rendu, años después, la reconoce como una enfermedad hemorrágica distinta de la hemofilia (Rendu, 1896). Posteriormente, ya a inicios del siglo XX, William Bart Osler (Osler, 1901) y Frederick Parks Weber (Weber, 1907) publican las primeras series de casos, aunque es Hanes (Hanes, 1909) quien le da el nombre de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. En 1986 es inscrita en la base de datos de la OMIM (*On Line Mendelian Inheritance in Man*; OMIM 187300).



Figura 1. Henri Rendu (1844-1902). Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de París. Describe por vez primera la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria como una enfermedad distinta de la Hemofilia.

1.1 Manifestaciones clínicas de la HHT

Se trata de una enfermedad con una sintomatología heterogénea entre distintas familias e incluso entre los miembros afectados de una misma familia. En un principio fue considerada una enfermedad benigna, que sólo cursaba con sangrados nasales y gastrointestinales. En la década de los 40 comenzó a observarse que algunos enfermos presentaban a su vez malformaciones arteriovenosas en pulmón, cerebro e hígado. Gracias a la mejora en la resolución de los métodos de detección y al aumento en el número de pacientes sometidos a un chequeo médico adecuado, se ha demostrado que un alto porcentaje de los pacientes de Rendu las padecen.

Debido a su complejidad genética, la HHT se diagnostica a nivel clínico. Existen cuatro criterios consenso que fueron definidos por el comité asesor científico de la Fundación Internacional de HHT en la isla de Curaçao, en 1999, y que se conocen como criterios de Curaçao (Shovlin *et al.*, 2000). Se considera que un individuo está enfermo cuando presenta al menos tres de los cuatro criterios, la presencia de dos criterios indica probabilidad y la de un único criterio, baja probabilidad de presentar la enfermedad. Estos criterios son:

1. Epistaxias o sangrados nasales espontáneos y recurrentes. Éste es el síntoma más frecuente y normalmente el primero en aparecer, suele hacerlo en la primera o segunda década de vida. La intensidad de los sangrados es muy variable entre los distintos pacientes, presentando algunos de ellos epistaxias esporádicas y poco abundantes y otros epistaxias importantes que pueden dar lugar a una anemia ferropénica crónica, precisando de repetidas transfusiones sanguíneas (Plauchu *et al.*, 1989).

2. Telangiectasias o pequeñas dilataciones de los capilares que se observan clínicamente como unas manchas o máculas de color rosado o púrpura, suelen ser múltiples y aparecen en piel y mucosas, frecuentemente en labios, cavidad oral, nariz, en la región cercana a las

uñas, palmas de las manos o en el tracto digestivo. En la mayor parte de los pacientes aparecen en torno a la tercera década de vida.

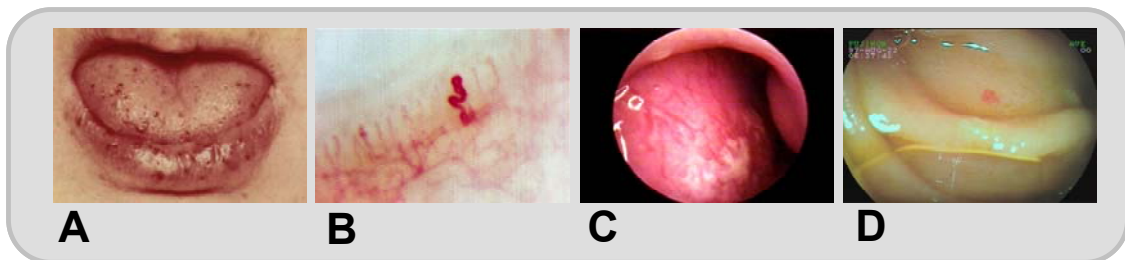


Figura 2. Telangiectasias en pacientes de HHT. A. Labios y lengua; B. Debajo de las uñas; C. Cavidad nasal y D. Mucosa digestiva.

Estas lesiones pueden sangrar, aunque en la piel los sangrados no revisten gravedad clínica. Las telangiectasias del tracto digestivo aparecen esencialmente en la mucosa gastroduodenal y su sangrado puede manifestarse como una anemia oculta, o, en algunos casos, puede darse una hemorragia digestiva súbita que podría poner en riesgo la vida del paciente (Korzenik, 1996; Vase and Grove, 1986).

3. Malformaciones arterio-venosas en órganos internos, frecuentemente en pulmones, hígado, cerebro o médula espinal. Se trata de pequeñas dilataciones postcapilares que dan lugar a una mezcla de sangre arterial y venosa, y, debido a su fragilidad, pueden romperse dando lugar a hemorragias. Pueden aparecer a cualquier edad, incluso estar presentes desde el nacimiento.

Las fístulas arterio-venosas pulmonares (PAVMs; *pulmonary arterio-venous malformations*) aparecen con una frecuencia de entre el 15 y el 35% de los enfermos. Son especialmente importantes debido a que pueden dar lugar a las manifestaciones clínicas tales como cianosis, poliapnea o hipoxia y, en el peor de los casos, pueden suprimir el papel de filtro que ejerce la barrera pulmonar, permitiendo el paso de microorganismos, con el consiguiente riesgo de que accedan al cerebro pudiendo causar abscesos cerebrales y accidentes isquémicos (Moussouttas *et al.*, 2000).

La frecuencia de las manifestaciones hepáticas (HAVMs; *hepatic arterio-venous malformations*) parece ser bastante alta, estando en torno al 70% de los enfermos (Larson, 2003). Habitualmente son asintomáticas y no aparecen alteraciones en las pruebas de función hepática. Sin embargo, en algunos casos, fístulas arterio-venosas en el hígado pueden ser causa de cuadros clínicos graves tales como insuficiencia cardiaca, hipertensión portal o afectación biliar (Buscarini *et al.*, 1997).

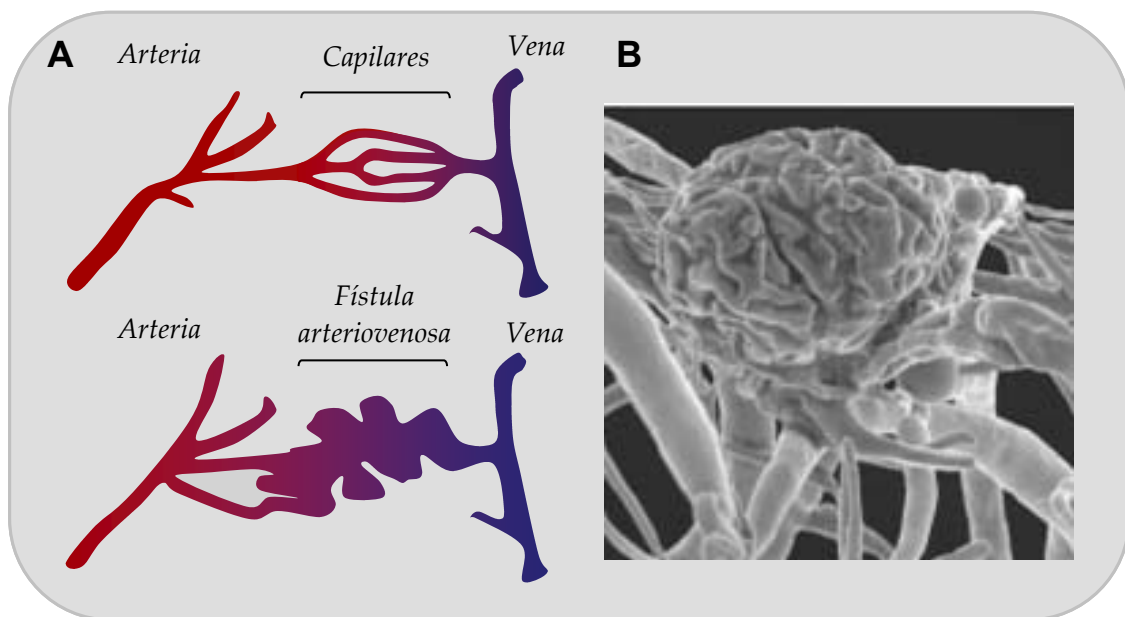


Figura 3. A. Formación de una fístula arterio-venosa o unión directa entre arteriolas y vénulas debido a una pérdida de la red capilar. **B.** Estructura de una malformación arterio-venosa vista al microscopio electrónico (imagen tomada de "Pulmonary Hypertension Association website").

Las manifestaciones clínicas debidas a fístulas arterio-venosas en el sistema nervioso (CAVMs; *cerebral arterio-venous malformations*), son menos frecuentes que las manifestaciones cerebrales secundarias a malformaciones pulmonares. Su frecuencia se encuentra entre el 10 y el 25% de los pacientes y pueden ser responsables de cefaleas, epilepsias y accidentes vasculares isquémicos o hemorrágicos, aunque en la mayor parte de los casos son asintomáticas (Fulbright *et al.*, 1998; Maher *et al.*, 2001; Willemsse *et al.*, 2000).

Aunque la frecuencia de manifestaciones en otros órganos es muy baja, se han descrito casos de malformaciones arterio-venosas en la retina (Vase and Vase, 1979), ovarios, bazo, riñón y ganglios linfáticos (Reyes-Mujica *et al.*, 1988).

4. Historia familiar de la enfermedad, debiendo existir varios miembros con síntomas entre los parientes de primer grado en una familia.

1.2 Tratamientos empleados en pacientes de HHT

Debido a que se trata de una enfermedad genética, no existen en la actualidad tratamientos que curen la enfermedad, tan sólo se emplean una serie de medidas paliativas como son la embolización de las fístulas arterio-venosas (Andersen *et al.*, 1998); la septodermoplastia o sustitución de la mucosa nasal por un injerto de piel de otra zona del cuerpo (Fiorella *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2006); terapias hormonales (Jameson and Cave, 2004), cauterización (Lund and Howard, 1999) o el uso de agentes antifibrinolíticos (Sabba *et al.*, 2001) en el tratamiento de las epistaxias y administración de hierro o transfusiones debido a la anemia que presentan un gran número de enfermos de HHT (Kjeldsen and Kjeldsen, 2000).

No existe un tratamiento óptimo para las epistaxias. Ninguna de las terapias probadas hasta el momento ha presentado resultados verdaderamente satisfactorios (Escalante *et al.*, 1988; Morais *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2000). Clásicamente se ha empleado el ácido ϵ -aminocaproico debido a su actividad antifibrinolítica, observándose una mejoría de las epistaxias y de la anemia asociada a éstas (Annichino-Bizzacchi *et al.*, 1999; Saba *et al.*, 1994).

Sin embargo, recientemente se ha demostrado un resultado más favorable cuando se emplea el ácido tranéxico en comparación con el ϵ -aminocaproico, cuyo mecanismo de acción es el mismo pero presenta una eficacia 10 veces mayor (Klepfish *et al.*, 2001; Sabba *et al.*, 2001). Ambos fármacos se unen reversiblemente al plasminógeno ocupando el lugar por el que se uniría a la fibrina, impidiendo así la acción proteolítica de la plasmina

sobre la fibrina y evitando, por tanto, la fibrinólisis o disolución del coágulo (Hoylaerts *et al.*, 1981; Thorsen, 1975).

36

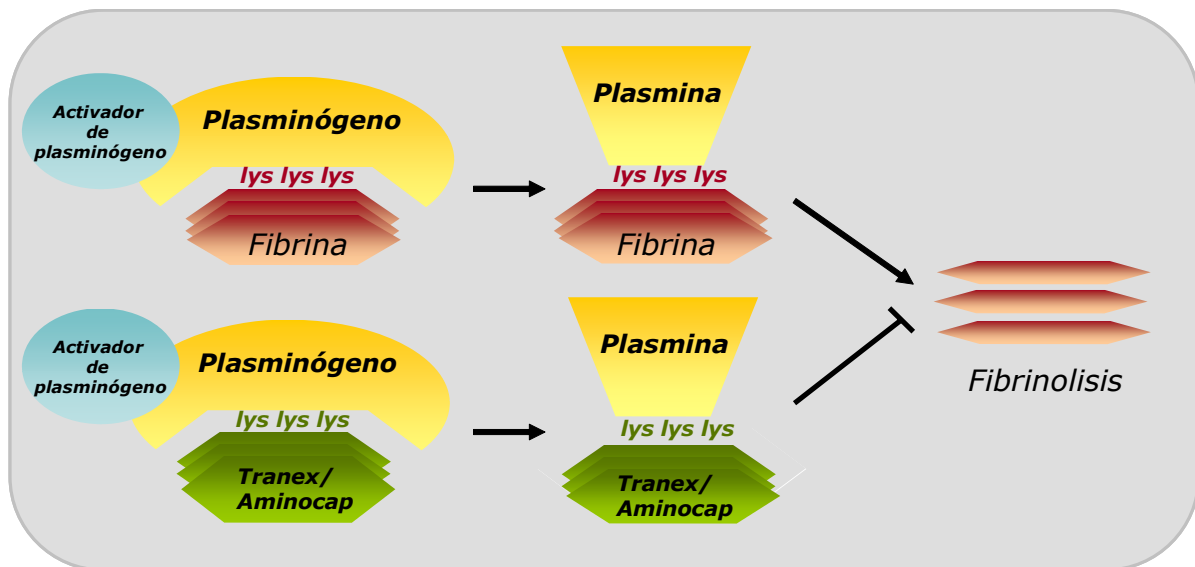


Figura 4. Mecanismo de acción de los antifibrinolíticos ácido tranexámico y ácido ϵ -aminocaproico. El fármaco, debido a su homología con la región de la fibrina que es reconocida por el plasminógeno, se une de forma competitiva desplazando a la fibrina e impidiendo su degradación.

2. BASE GENÉTICA DE LA HHT

La HHT está causada por mutaciones en al menos dos genes implicados en las vías de señalización del TGF- β . El primer gen que se encontró mutado en pacientes de HHT fue localizado, mediante estudios de ligamiento, en el cromosoma 9q33-34 (McDonald *et al.*, 1994; Shovlin *et al.*, 1994). Mediante experimentos de hibridación *in situ* se había identificado previamente *endogлина* como el gen situado en la región 9q33-34 (Fernandez-Ruiz *et al.*, 1993). Fueron McAllister y colaboradores (McAllister *et al.*, 1994), quienes demostraron finalmente que mutaciones en *endogлина* daban lugar a la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria denominada tipo 1 (HHT1; ENG OMIM 131195). Sin embargo, existían evidencias de una posible heterogeneidad genética ya que distintos grupos publicaron casos de varias familias con HHT cuya mutación no se encontraba en el gen de Endogлина. Estudios de ligamiento llevados a cabo en estas familias situaron el segundo locus relacionado con HHT en la región 12q13 (Johnson *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1995). Un gen candidato,

localizado en la región 12q11-q14, era *ALK1* (*ACVRL1*; *activin receptor-like kinase-1*; OMIM 600376) y Johnson y colaboradores (Johnson *et al.*, 1996) identificaron las primeras mutaciones en este gen, causantes, por tanto, de la HHT tipo 2.

Sin embargo, se han encontrado pacientes con características clínicas de HHT sin mutaciones en los genes de *endogлина* o *ALK1*, sugiriéndose la existencia de otros genes ligados a la enfermedad. De hecho, recientemente se han descrito un tercer y cuarto locus situados, respectivamente, en las regiones 5q31.3-5q32 (Cole *et al.*, 2005) y 7p14 (Bayrak-Toydemir *et al.*, 2006), que serían responsables de la HHT3 y HHT4 respectivamente, aunque los genes afectados aún se desconocen. A su vez, se ha visto que mutaciones en el gen *BMPRII* (*Bone morphogenetic protein receptor II*) dan lugar a la Hipertensión Pulmonar Primaria (PPH) con un fenotipo similar a la HHT (Abdalla *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2003; Trembath *et al.*, 2001) y recientemente se ha demostrado que mutaciones en el gen que codifica *Smad4* (*MADH4*; *mothers against decapentaplegic homolog 4*) pueden causar un síndrome caracterizado por síntomas de poliposis juvenil y HHT al mismo tiempo (Gallione *et al.*, 2004). El factor común a estos distintos *loci* mutados en pacientes con síntomas de HHT es su papel funcional, puesto que todos ellos son componentes de las vías de señalización de TGF- β .

La HHT1 y HHT2 se consideran clínicamente indistinguibles (Shovlin *et al.*, 2000). Existen algunos estudios que muestran una menor gravedad y una aparición de los síntomas más tardía en pacientes con HHT2, y una mayor frecuencia de fístulas arterio-venosas pulmonares en HHT1 (Abdalla *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 1997; Olivieri *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios contradicen este dato y muestran una mayor incidencia de fístulas arterio-venosas pulmonares en pacientes con HHT2 (Kjeldsen *et al.*, 2001; Trembath *et al.*, 2001). El predominio de uno u otro tipo de HHT está relacionado con la localización geográfica, siendo HHT1 más frecuente en Norteamérica, Canadá (Abdalla *et al.*, 2003; Abdalla *et al.*, 2000) o en el norte de Europa (Letteboer *et al.*, 2005), mientras que HHT2 prevalece en

países de la cuenca mediterránea como Italia (Lastella *et al.*, 2003; Olivieri *et al.*, 2002) o Francia (Lesca *et al.*, 2004).

Hasta la fecha, se han descrito 248 mutaciones distintas en el gen que codifica Endogлина, pero este número aumenta de forma continua. Todas las mutaciones se han descrito en los primeros 12 exones (Cymerman *et al.*, 2003; Lastella *et al.*, 2003; Lesca *et al.*, 2004) los cuales codifican la región extracelular de la proteína. Hasta ahora, no se han encontrado mutaciones en sus dominios transmembrana (exón 13) o citoplásmico (exón 14). Entre las mutaciones encontradas hay pequeñas deleciones e inserciones de uno o varios pares de bases, grandes deleciones que pueden incluso implicar a varios exones, sustituciones de nucleótidos y mutaciones en la región de procesamiento o *splicing* [(Abdalla and Letarte, 2006); *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia mutation database: www.hht.org*].

En el caso de ALK1 hay descritas 205 mutaciones distintas, entre las cuales predominan las sustituciones de nucleótidos en el dominio quinasa (exones 7 y 8), y con menor frecuencia se encuentran deleciones, inserciones y mutaciones en las regiones de procesamiento. Estos cambios se concentran especialmente en los exones 3, 4, 7, 8 y 9, aunque se han encontrado en los 9 exones codificantes que componen el gen [(Abdalla and Letarte, 2006); *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia mutation database: www.hht.org*].

Clásicamente se ha considerado que el mecanismo molecular causante de la enfermedad es la haploinsuficiencia, es decir, que independientemente del tipo de mutación que se produzca, el alelo mutado no da lugar a una proteína funcional. De esta forma, las células endoteliales de los enfermos cuentan únicamente con la mitad de proteína, y la proteína producida por una sola copia del gen no es suficiente para garantizar una función normal (Marchuk, 1998; Shovlin *et al.*, 1997). Sin embargo, existen trabajos recientes que demuestran que mutaciones localizadas en el dominio quinasa de ALK1, pueden dar lugar a una proteína que se exprese y que actúe como dominante negativo (Gu *et al.*, 2006). En el caso de

Endoglina, Lux y colaboradores (Lux *et al.*, 2000) encontraron varias mutaciones que, expresadas *in vitro*, no eran capaces de alcanzar la membrana celular, pero que actuaban como un dominante negativo secuestrando a la proteína silvestre en el interior de la célula.

2.1 Proteína mutada en HHT1: Endoglina

2.1.1 Distribución celular

Endoglina (CD105) es una glicoproteína homodimérica transmembrana tipo I. Se expresa fundamentalmente en células endoteliales, tanto en arterias, como en venas y capilares (Bourdeau *et al.*, 2000; Cheifetz *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 2000). Su expresión se ve aumentada en estas células en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa (Bodey *et al.*, 1998; Burrows *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003), en zonas donde hay una lesión vascular (Botella *et al.*, 2002; Conley *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1995), en el endotelio de algunas patologías de la piel (van de Kerkhof *et al.*, 1998; Westphal *et al.*, 1993), en enfermedades autoinmunes (Marazuela *et al.*, 1995) y en el endotelio de algunos tumores sólidos (Burrows *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003) como en pulmón (Miller *et al.*, 1999) o en mama (Fonsatti *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión de Endoglina en la pared vascular no se limita al endotelio, también podemos encontrarla en fibroblastos del estroma perivascular (Ma *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000) y en células de músculo liso vascular (Adam *et al.*, 1998; Conley *et al.*, 2000).

Fuera del contexto endotelial se ha demostrado expresión de Endoglina en el proceso de diferenciación de monocito a macrófago (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004a), en células del sincitiotrofoblasto (Gougos *et al.*, 1992), células estrelladas de hígado (Meurer *et al.*, 2005), células mesangiales de riñón (Diez-Marques *et al.*, 2002; Rodríguez-Barbero *et al.*, 2001; Roy-Chaudhury *et al.*, 1997), células de la capa basal de la epidermis (Perez-Gomez *et al.*, 2005; Quintanilla *et al.*, 2003), fibroblastos cardíacos (Chen *et al.*, 2004),

precursores eritroides (Buhring *et al.*, 1991) y finalmente también en ciertos tumores como melanoma (Altomonte *et al.*, 1996; Bodey *et al.*, 1998) o cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2002).

Existen también evidencias que apoyan que Endogлина tiene un papel fundamental en la remodelación vascular y desarrollo cardiovascular. Así, Endogлина se expresa en gran medida en las células mesenquimáticas del canal atrioventricular del endocardio durante la formación de las válvulas y del septo (Qu *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 1998). Además, ratones *knock out* para endogлина mueren a los 10-11.5 días *postcoitum* debido a alteraciones cardiovasculares (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

A pesar de que Endogлина es una proteína de membrana, se pueden encontrar bajos niveles de la proteína soluble en plasma, probablemente debido a un corte proteolítico, tanto libre como unida a TGF- β 1 y estos niveles pueden encontrarse aumentados en ciertas patologías. La concentración plasmática de complejos Endogлина-TGF- β 1 parece estar aumentada en pacientes con cáncer de mama (Li *et al.*, 1998), mientras que altos niveles de Endogлина soluble libre parecen correlacionarse con el riesgo de desarrollar metástasis en estos pacientes, por lo que se ha propuesto como un importante marcador pronóstico (Li *et al.*, 2000). Otros estudios muestran una elevada concentración de la proteína soluble en leucemia mieloide aguda, desórdenes mieloproliferativos crónicos (Calabro *et al.*, 2003) y en esclerosis sistémica (Fujimoto *et al.*, 2006). Recientemente, se ha descrito una nueva forma de Endogлина soluble de origen placentario, presente en el suero de mujeres embarazadas y que se encuentra aumentada en la enfermedad hipertensiva del embarazo (preeclampsia), correlacionándose con la severidad de la alteración (Levine *et al.*, 2006; Venkatesha *et al.*, 2006).

2.1.2 Estructura y función

Endogлина es un componente del complejo receptor de TGF- β capaz de unir TGF- β 1 y TGF- β 3, con gran afinidad, en presencia de los

correspondientes receptores tipo I y tipo II (Barbara *et al.*, 1999; Cheifetz *et al.*, 1992; Letamendia *et al.*, 1998). En estudios *in vitro* se ha visto que también es capaz de unir otros miembros de la superfamilia del TGF- β : Activina-A, BMP-2 y BMP-7 (*Bone morphogenetic protein 2, 7*), por lo que podría estar implicada en distintas vías de señalización (Barbara *et al.*, 1999).

Endoglina y betaglicano se consideran receptores accesorios de TGF- β , puesto que su papel en la señalización es indirecto, y se les ha denominado receptores tipo III o correceptores. Contrariamente a Endoglina, betaglicano es capaz de unir TGF- β *per se*, favoreciendo la accesibilidad del factor de crecimiento a sus receptores (Lopez-Casillas *et al.*, 1991). Betaglicano muestra una mayor afinidad por TGF- β 2, isoforma que no es reconocida por Endoglina (Andres *et al.*, 1989; Esparza-Lopez *et al.*, 2001; Letamendia *et al.*, 1998).

Endoglina y betaglicano presentan un 70% de homología en sus regiones transmembrana y citoplásmica, siendo escasa la homología en la región extracelular (Gougos and Letarte, 1990; Letamendia *et al.*, 1998; Lopez-Casillas *et al.*, 1991). Ambas proteínas presentan un corto dominio citoplásmico rico en residuos de serina y treonina que carece de actividad enzimática. En sus tres últimos residuos carboxi-terminales se encuentra un dominio de unión a motivos PDZ tipo I de otras proteínas, que, en el caso de Endoglina, parece ser importante en la regulación de su fosforilación por parte de los receptores tipo I y II (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Koleva *et al.*, 2006; Lastres *et al.*, 1994).

En su dominio extracelular, Endoglina presenta el tripéptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), el cual se postula que se encuentra implicado en adhesión celular (Cheifetz *et al.*, 1992; Gougos and Letarte, 1990). Este péptido se encuentra fundamentalmente en proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina, factor von Willebrand, colágeno tipo I y fibrinógeno, y es reconocido por integrinas de la superficie celular (Ruoslahti and Giancotti, 1989). Sin embargo, la identidad de las

proteínas de tipo integrina que potencialmente podrían interaccionar con el dominio RGD de Endogлина, se desconoce hasta la fecha. La endogлина de ratón, a pesar de presentar un 72% de homología con la humana, carece de este péptido RGD (St-Jacques *et al.*, 1994).

También en la región extracelular se encuentra la denominada zona pelúcida (ZP), designada así por estar presente en las proteínas que constituyen la zona pelúcida que envuelve al óvulo de mamíferos. Se trata de una región compartida por un gran número de proteínas extracelulares eucariotas, y cuya función se encuentra poco estudiada, habiéndose postulado su implicación en la polimerización de algunas de estas proteínas (Jovine *et al.*, 2002). El dominio ZP se localiza siempre próximo al extremo C-terminal de la proteína y está compuesto por unos 260 aminoácidos con al menos ocho residuos de cisteína conservados (Jovine *et al.*, 2005).

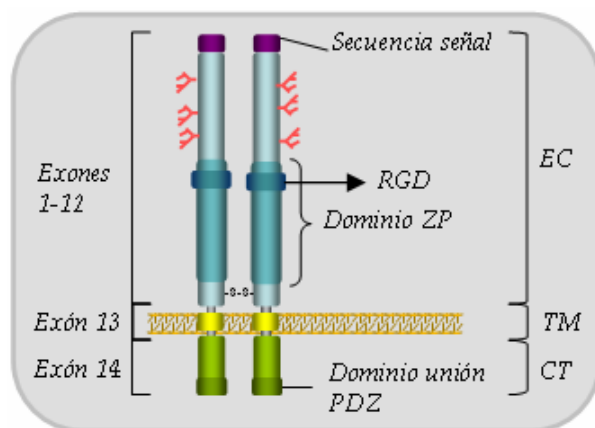


Figura 5. Representación esquemática del dímero de Endogлина. EC, región extracelular; TM, región transmembrana; CT, región citoplásmica; ZP, zona pelúcida.

Se han descrito dos isoformas distintas de Endogлина (L, *large*; S, *small*) con capacidad de unir TGF- β , que se diferencian en la composición de aminoácidos de sus colas citoplásmicas. La forma predominante es Endogлина L, formada por 633 aminoácidos de los cuales 47 forman el dominio intracelular, mientras que Endogлина S está compuesta por 600 aminoácidos, con una corta cola citoplásmica de 14 aminoácidos. Esta diferencia se debe a que en la isoforma corta el último intrón de *endogлина* no se elimina, permaneciendo en el ARN mensajero maduro. Este intrón introduce un codón de parada prematuro que conduce a la traducción de una proteína más corta (Bellon *et al.*, 1993).

No se conoce con claridad el papel que desempeña Endogлина *S in vivo*. Estudios en ratón sugieren que puede comportarse como una molécula antiangiogénica, contrariamente a la función proangiogénica que desempeña la isoforma mayoritaria (Perez-Gomez et al., 2005).

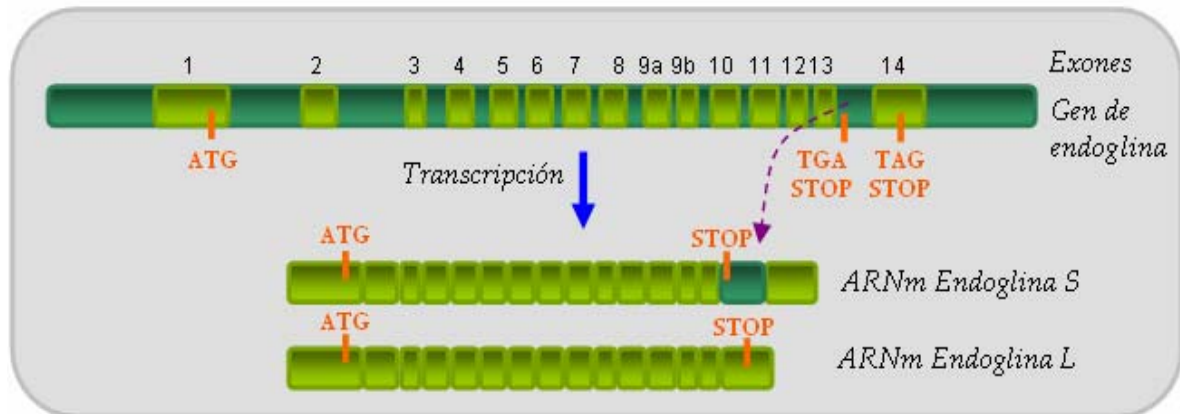


Figura 6. Procesamiento alternativo del ARN mensajero de endogлина. Cuando el último intrón de endogлина no se elimina, introduce un codón de parada prematuro que da a lugar a la isoforma corta.

2.1.3 Funciones independientes de TGF- β

Aparte del papel de Endogлина como correceptor de TGF- β , se ha propuesto que debe desempeñar funciones independientes de esta vía de señalización, basándose en el hecho de que en la superficie de la célula endotelial (CE) existen 100 veces más moléculas de Endogлина que complejos receptores de TGF- β (Cheifetz et al., 1992; Qu et al., 1998).

Se ha visto que la sobreexpresión de endogлина en fibroblastos y células de músculo liso vascular conduce a una alteración en migración, adhesión y en la morfología celular, lo que sugiere un papel en la organización del citoesqueleto (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). De hecho, en nuestro laboratorio se describió la interacción del dominio citoplásmico de Endogлина con ZRP1, proteína del citoesqueleto que se une a su vez a otras proteínas implicadas en el ensamblaje de los filamentos de actina, como son P130^{Cas} o miembros de la familia Ena/VASP (Sanz-Rodriguez et al., 2004a).

ZRP1 pertenece a la familia de proteínas con dominios LIM, familia a la que también pertenece Zyxin, la cual desempeña un papel similar al de ZRP1 uniéndose igualmente al dominio citoplásmico de Endogлина (Conley *et al.*, 2004). En ausencia de expresión de Endogлина, ZRP-1 se localiza en regiones discretas de la membrana, similares a contactos focales de adhesión. Por el contrario, cuando hay expresión de Endogлина, modifica su localización y se distribuye a lo largo de las fibras de estrés. Parece, por tanto, que Endogлина redirige la localización de ZRP1, y con ella la de las fibras de estrés, de forma paralela a la membrana donde Endogлина se encuentra anclada. Las células que expresan Endogлина, como las células endoteliales, muestran un citoesqueleto muy bien organizado, con un gran número de fibras de actina que definen el contorno de la célula, aunque se desconoce aún el mecanismo por el cual ZRP1 modula la organización del citoesqueleto de actina (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004a).

Por otro lado, Endogлина se ha descrito recientemente como un importante regulador de la función de la enzima Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS; *endothelial Nitric Oxide Synthase*), actuando como una proteína puente entre ésta y la HSP90 citoplásmica (*Heat Shock Protein 90*), chaperona fundamental en la activación de la enzima (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). Así, se ha descrito que en células endoteliales de pacientes con HHT1 la interacción entre eNOS y HSP90 se ve disminuida, conduciendo a una mayor producción de radicales libres que podrían explicar, al menos en parte, las malformaciones arterio-venosas presentes en estos pacientes (Toporsian *et al.*, 2005). Sin embargo, esto dejaría sin explicar la generación de malformaciones arterio-venosas en pacientes con HHT2, en los cuales la mutación se encuentra en *ALK1*. A su vez, otros estudios muestran una menor expresión de eNOS en ratones heterocigotos *endogлина^{+/-}* (Jerkic *et al.*, 2004). La menor producción de óxido nítrico (NO; *Nitric Oxide*) en estos ratones parece conducir a un aumento en la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2; *Cyclooxygenase 2*), posiblemente como un mecanismo de compensación, puesto que esta enzima es responsable de la síntesis de prostaglandinas y prostaciclina vasodilatadoras (Jerkic *et al.*, 2006).

2.2 Proteína mutada en HHT2: ALK1

2.2.1 Distribución celular

Los ALKs (*activin receptor-like kinases*) son un grupo de receptores transmembrana, tipo I, serina/treonina quinasa. Hasta la fecha se han descrito siete miembros pertenecientes a esta familia y todos ellos actúan como receptores de proteínas de la superfamilia del TGF- β . Estos receptores muestran una alta homología en sus secuencias, la cual es máxima en el dominio quinasa citoplásmico (ten Dijke *et al.*, 1993).

ALK1 se expresa fundamentalmente en células endoteliales (Goumans *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2000), tanto en venas como arterias (Panchenko *et al.*, 1996), aunque también se ha visto su expresión en células gigantes del trofoblasto, mesénquima, regiones específicas de interacción epitelio-mesenquimal en distintos órganos en desarrollo (Roelen *et al.*, 1997) y en macrófagos (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004a); sin embargo, únicamente se ha estudiado su función en el endotelio vascular. Estudiando la embriogénesis en ratones, se ha demostrado que ALK1 aumenta su expresión en el endotelio de regiones donde se está dando una angiogénesis activa (Goumans *et al.*, 2003b).

2.2.2 Estructura y función

ALK1 es capaz de unir TGF- β 1 y activinas en presencia tanto del receptor tipo II de TGF- β (T β R-II) como del receptor tipo II de activinas (ActRII) (Song *et al.*, 1999). Se ha postulado recientemente que BMP9 podría ser otro de sus ligandos (Brown *et al.*, 2005; David *et al.*, 2006).

Existen evidencias de que ALK1 se expresa en la célula como monómero y que forma homodímeros cuando es reclutado en el complejo receptor de TGF- β (Yamashita *et al.*, 1994). El monómero de ALK1 está formado por una región extracelular rica en cisteínas, un dominio transmembrana y la región intracelular compuesta por un dominio rico en glicina y serina (GS), el cual regula la activación del receptor, y un dominio

serina treonina quinasa compuesto por 11 subdominios (Abdalla et al., 2003; Lebrin *et al.*, 2005).

46

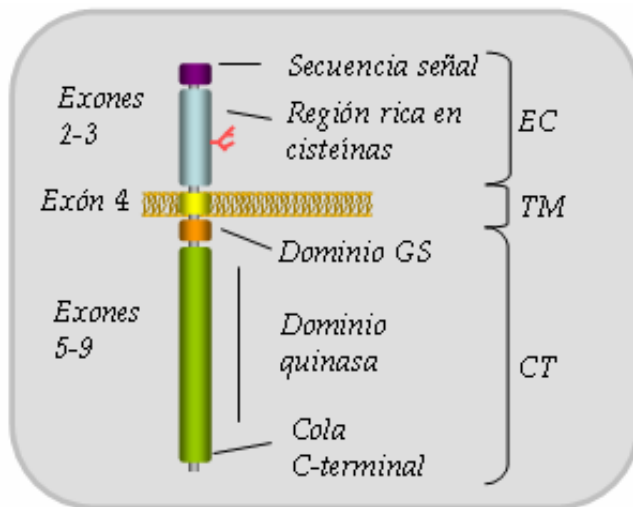


Figura 7. Representación esquemática del monómero de ALK1. EC, región extracelular; TM, región transmembrana; CT, región citoplásmica; Dominio GS, dominio rico en glicina y serina.

3. SEÑALIZACIÓN DE TGF- β

3.1 La superfamilia del TGF- β

La superfamilia del TGF- β , de la que éste es el miembro modelo, comprende un gran número de factores de crecimiento y diferenciación, relacionados estructuralmente entre sí, que están presentes en una gran variedad de organismos, desde insectos hasta humanos. Incluye miembros tales como las proteínas morfogenéticas del hueso ó BMPs y su homólogo en *Drosophila* Dpp (*Decapentaplegic complex*), activinas, inhibinas, factores de crecimiento y diferenciación o GDFs (*Growth and Differentiation Factors*), factor neurotrófico derivado de células gliales o GDNF (*Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*), dorsalina, proteína nodal y la hormona antimuleriana o MIS (*Müllerian Inhibiting Substance*). Estos factores están implicados en múltiples procesos celulares, tanto durante el desarrollo como en el organismo adulto, incluyendo proliferación, diferenciación, adhesión, producción de matriz extracelular y muerte celular (Massague, 1998).

Hasta la fecha se han descrito cinco isoformas de TGF- β , aunque únicamente tres de ellas, β 1, β 2 y β 3, se encuentran en mamíferos (Cheifetz *et al.*, 1990; Massague, 1990). El TGF- β es sintetizado como un

propéptido de alto peso molecular. Antes de su secreción, una furin-convertasa escinde el propéptido, quedando la región LAP (*Latency-Associated Peptide*) asociada de forma no covalente al TGF- β biológicamente activo (Dubois *et al.*, 1995).

En la mayoría de las células, esta forma latente del TGF- β se asocia a una tercera proteína denominada LTBP (*Latent TGF- β -Binding Protein*), proteína que se ancla, por su extremo N-terminal, a proteínas de la matriz extracelular.

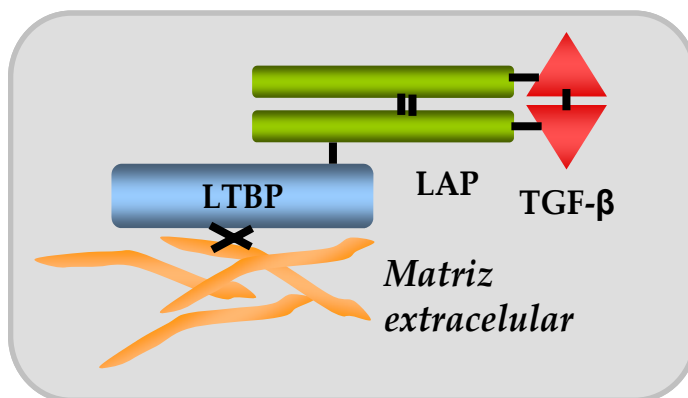


Figura 8. Esquema representativo del TGF- β latente. El TGF- β latente se une a la proteína LTBP, a través de la cual queda anclado a la matriz extracelular hasta que es activado por la acción de proteasas.

Una vez ahí, el TGF- β es liberado en su forma biológicamente activa por la acción de proteasas como plasmina, furina o trombospondina (Miyazono, 1996).

3.2 El complejo receptor de TGF- β

El complejo receptor de TGF- β está formado por dos receptores distintos (tipo I o T β RI y tipo II o T β RII) acompañados de un correceptor que modula la señal, y que puede ser betaglicano o Endogлина según el tipo celular. Ambos receptores, tipo I y II, presentan un dominio extracelular capaz de unir al ligando, una región transmembrana y un dominio citoplásmico con actividad quinasa de residuos de serina y treonina (Derynck and Feng, 1997; Miyazono *et al.*, 1994). Los receptores de tipo II son capaces de interactuar con distintas isoformas de receptor tipo I formando complejos heteroméricos y determinando así la especificidad de unión al ligando (Attisano *et al.*, 1993; Ebner *et al.*, 1993).

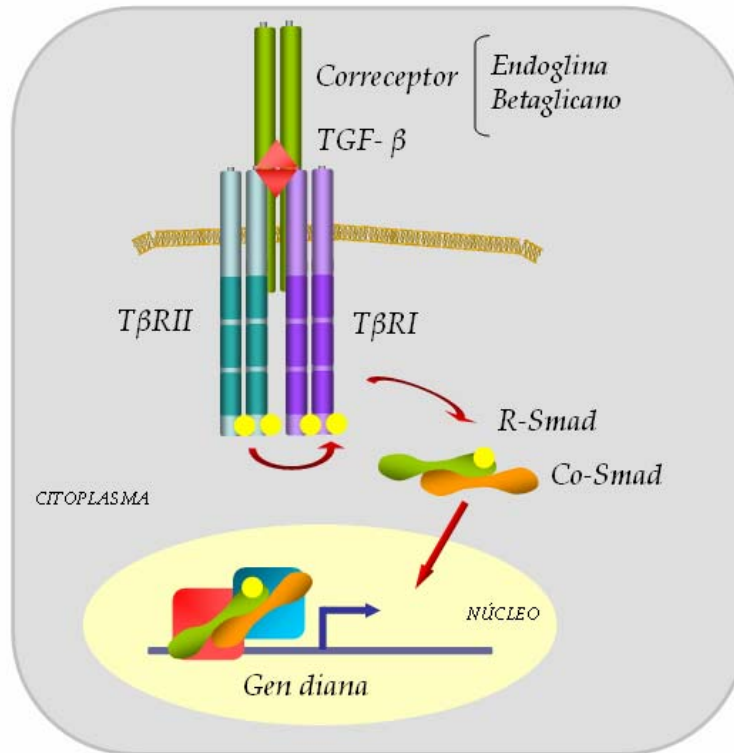


Figura 9. Modelo esquemático de la vía de señalización de TGF- β . El complejo receptor de TGF- β está formado por el receptor tipo II, el tipo I y un correceptor. La señal se transmite vía proteínas Smad, coactivadores que se translocan al núcleo y, cooperando con otros factores de transcripción, regulan la expresión de genes diana.

El receptor tipo II se encuentra constitutivamente fosforilado, incluso en ausencia de ligando, es capaz de unir TGF- β *per se*, y, cuando lo hace, recluta al receptor tipo I y lo fosforila. Éste, a su vez, fosforila a proteínas Smad dependientes de receptor (R-Smads) las cuales forman un complejo heteromérico con Smad4 (Smad cooperadora o Co-Smad). Este complejo se transloca al núcleo donde actúa como un coactivador uniéndose al ADN en secuencias consenso y a otros componentes de la maquinaria transcripcional, modulando así la expresión de genes diana (Feng and Derynck, 2005; Massague and Gomis, 2006; Massague *et al.*, 2005).

Finalmente, Smad6 y 7 (Smads inhibitorias o I-Smads), son capaces de inhibir la señal de TGF- β , tanto interaccionando con los receptores e impidiendo así la fosforilación de las R-Smads, como compitiendo con éstas por la unión a Smad4. La expresión de Smads inhibitorias está inducida por

miembros de la propia familia del TGF- β , lo que da lugar a un mecanismo de retroalimentación negativa de la vía de señalización (Christian and Nakayama, 1999; Derynck and Zhang, 2003; Miyazono, 2000; Piek *et al.*, 1999).

3.3 Señalización de TGF- β independiente de Smads

Además de la transcripción de genes mediada por las proteínas Smads, el TGF- β es capaz de activar otras cascadas, incluyendo señalización vía MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). Algunas de estas vías regulan la activación de Smads, mientras que otras son independientes de transcripción. TGF- β puede activar las vías de ERK (*Extracellular-signal-regulated Kinase*), JNK (*Jun N-terminal Kinase*) y p38 MAPK, aunque los mecanismos son poco conocidos (Derynck and Zhang, 2003; Moustakas and Heldin, 2005).

La activación de las vías de ERK y JNK, activadas por TGF- β , puede conducir a fosforilación y activación de proteínas Smads (Engel *et al.*, 1999; Kretzschmar *et al.*, 1999). También, la activación de la vía Ras/ERK mediada por TGF- β puede inducir la expresión de TGF- β 1, amplificando así la señal (Yue and Mulder, 2000). Por otro lado, se ha descrito que la fosforilación de p38 es necesaria para la síntesis de colágeno inducida por TGF- β y que en presencia de Endoglina debe ir acompañada por un descenso de la fosforilación de ERK1/2 para conseguir un máximo efecto (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2006).

En células endoteliales, el TGF- β es también capaz de inducir la fosforilación de GTP-asas de la familia de Rho, regulando así la formación del citoesqueleto (Birukova *et al.*, 2005; Derynck and Zhang, 2003).

3.4 Señalización de TGF- β en células endoteliales

En las células endoteliales existen dos receptores tipo I distintos, ALK5, que se expresa de forma ubicua y ALK1, cuya expresión está prácticamente restringida a células endoteliales, siendo éste el único tipo

celular donde se ha estudiado su función. ALK1 señala vía Smad 1 y 5 y a través de esta vía estimula procesos de proliferación y migración de la célula. ALK5, sin embargo, señala vía Smad 2 y 3 y conduce a una estimulación de la síntesis de matriz extracelular e inhibición de migración y proliferación, por lo que conduce a una estabilización de los vasos (Goumans *et al.*, 2003a; Goumans *et al.*, 2003b; Goumans *et al.*, 2002; Lebrin *et al.*, 2005).

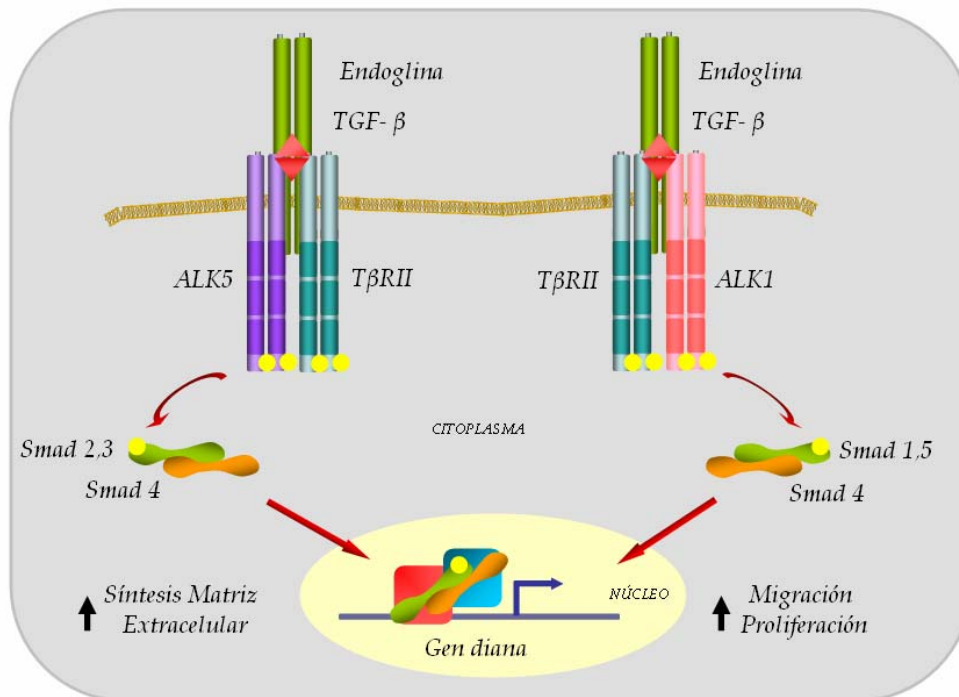


Figura 10. Vías de señalización de TGF-β en células endoteliales. En células endoteliales coexisten dos receptores de tipo I. ALK1 señala vía Smad 1/5 e induce migración y proliferación celular, mientras que ALK5 señala vía Smad 2/3 y estimula la síntesis de matriz extracelular, entre otros procesos.

Endogлина, por su parte, interacciona con ambos receptores y actúa estimulando la vía de señalización de ALK1 e inhibiendo la de ALK5, aunque el mecanismo molecular subyacente no se conoce con exactitud (Blanco *et al.*, 2005; Lebrin *et al.*, 2005; Lebrin *et al.*, 2004).

Los procesos estimulados por ambas vías de señalización son fundamentales en angiogénesis, es decir, en la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistente (Pepper, 1997). Además de su papel en el

desarrollo, la angiogénesis es fundamental en la vida adulta para el mantenimiento de la integridad de los vasos. Se considera que la angiogénesis consta de dos fases, una primera fase de activación que implica un incremento en la permeabilidad vascular, degradación de la membrana basal y proliferación y migración de las células endoteliales para poder formar los nuevos vasos. Una vez formados los vasos deben estabilizarse, hecho que implica una inhibición de la proliferación y migración, reconstitución de la membrana basal y reclutamiento de pericitos y células de músculo liso vascular, procesos que tienen lugar en la fase de resolución de la angiogénesis (Carmeliet, 2005; Folkman and Hanahan, 1991).

Aquellos factores que favorecen la formación de nuevos vasos se consideran proangiogénicos, mientras que factores antiangiogénicos son los que favorecen la resolución y estabilización de los vasos. El TGF- β presenta un papel dual en la angiogénesis, ya que, en función de los requerimientos, favorece la formación de nuevos vasos o su resolución. Este papel dual del TGF- β se puede explicar teniendo en cuenta la existencia de los dos receptores de tipo I, ALK1 y ALK5. Mientras que la vía de señalización de ALK1 favorece la expresión de genes implicados en la fase de activación de la angiogénesis, la vía de ALK5 inhibe la expresión de estos genes y estimula otros implicados en la fase de resolución (Goumans et al., 2003a; Goumans et al., 2003b; Goumans et al., 2002; Lebrin et al., 2005).

4. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES VASCULARES

4.1. Modelos animales

La señalización de TGF- β es necesaria tanto para la primera fase del desarrollo vascular, la vasculogénesis, en la cual se forma la primera red vascular (Dickson *et al.*, 1995), como para la segunda, la angiogénesis, que implica un remodelado de la red endotelial primaria para formar un sistema circulatorio maduro (Folkman and D'Amore, 1996; Pepper *et al.*, 1991). Durante el ensamblaje de los vasos, las células endoteliales reclutan progenitores mesenquimales. El contacto entre células endoteliales y células

mesenquimales induce la activación de TGF- β 1 que, a su vez, estimula la diferenciación de estos progenitores hacia pericitos o células de músculo liso vascular, estabilizando así los vasos (Folkman and D'Amore, 1996). Sin embargo, los mecanismos moleculares de esta interacción aún no se conocen en profundidad.

La diferenciación de células de músculo liso vascular y pericitos está alterada en ratones que presentan una deficiente señalización de TGF- β en células endoteliales. La activación de la vía de las Smads parece ser necesaria para la diferenciación de estos tipos celulares a partir de células de la cresta neural (Chen and Lechleider, 2004). La alteración de la señalización de TGF- β parece ser un factor común a varios modelos de ratones mutantes que presentan defectos en la vasculogénesis y/o angiogénesis del saco vitelino y embrión. La falta de T β RII, ALK5, ALK1, Endogлина ó el propio TGF- β 1 puede conducir a una menor producción de TGF- β 1 por parte de las células endoteliales y, por tanto, la diferenciación de progenitores mesenquimales se verá afectada (Carvalho *et al.*, 2004). Así, ratones deficientes en ALK5, T β RII y TGF- β 1, mueren a los 10.5 días de gestación como resultado de una inadecuada formación de la red capilar en el saco vitelino, y una adhesión pobre entre las capas endotelial y mesotelial (Dickson *et al.*, 1995; Oshima *et al.*, 1996). Entre 1999 y 2000 varios grupos generaron ratones *knock out* tanto para *endogлина* como para *alk1* y ambos resultaron también letales embrionarios a causa de problemas cardiovasculares (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Urness *et al.*, 2000).

La angiopoyetina-1 y su receptor endotelial, Tie2, están también implicados en la regulación de las interacciones entre células endoteliales y mesenquimales y la producción de la matriz extracelular (Puri *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995; Suri *et al.*, 1996). Los ratones deficientes para Tie2 mueren a los 9.5-10.5 días de gestación con una deficiencia de vasos y de células endoteliales en el saco vitelino, vasos distendidos, hemorragias y parada del desarrollo del corazón (Dumont *et al.*, 1994). Se ha propuesto un modelo por el cual la angiopoyetina-1 producida por las células

mesenquimales activa su receptor Tie2 en células endoteliales lo que conduciría a la producción y liberación de señales de reclutamiento de células mesenquimales, tales como PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) o EGF (*Epidermic Growth Factor*). Cuando las células mesenquimales se aproximan y contactan con el endotelio, se activaría TGF- β que induciría la su diferenciación en pericitos y células de músculo liso vascular, inhibiría la proliferación de células endoteliales y estimularía la deposición de matriz extracelular (Folkman and D'Amore, 1996; Hirschi *et al.*, 1999).

4.1.1 Ratones *knock out* homocigotos para *endogлина* (*eng*^{-/-})

Los ratones *knock out* de *endogлина* mueren a los 10-11.5 días de gestación debido a problemas cardiovasculares (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). La expresión de *endogлина* en células endoteliales es necesaria para que se dé correctamente la angiogénesis, la formación del corazón y el desarrollo normal de las células de músculo liso vascular (Arthur *et al.*, 2000).

Sin embargo, *Endogлина* no está implicada en la vasculogénesis. En los ratones *knock out* de *endogлина*, la primera alteración que se observa es un fallo en el remodelado de la primera red vascular, que resulta en un desarrollo anormal de los vasos del embrión y saco vitelino, donde no llegan a formarse grandes vasos. Se ha propuesto que este fallo en la angiogénesis se debe a un inadecuado reclutamiento y diferenciación de precursores mesenquimales en pericitos y células de músculo liso vascular (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1999; Torsney *et al.*, 2003).

Aparte de los defectos en angiogénesis observados en el saco vitelino, el desarrollo del corazón también se ve alterado en estos ratones. Existen evidencias que sugieren que la expresión de *Endogлина* en el endocardio es necesaria durante el desarrollo del corazón y que juega un papel importante en la formación de las válvulas y del septo (Bourdeau *et al.*, 1999).

4.1.2 Ratones heterocigotos para *endogлина* ($eng^{+/-}$)

Los primeros animales heterocigotos que expresaban una única copia de *endogлина*, se desarrollaron cruzando ratones quimeras con ratones silvestres de la cepa C57Bl/6 o 129/Ola. Estas quimeras procedían de células madres de la cepa 129/Ola donde se había interrumpido el gen de Endogлина, inyectadas en blastocistos de ratones silvestres C57Bl/6. En el caso de los ratones con un fondo genético 129/Ola, más de la mitad de los animales desarrollan síntomas de HHT, epistaxias, telangiectasias cutáneas, vasos frágiles y dilatados y fístulas arteriovenosas en pulmón, hígado o cerebro. Sin embargo, no se manifiestan síntomas en ratones con un fondo genético distinto, hecho que indica que otros genes modificadores propios de esta cepa deben de estar contribuyendo al desarrollo de la enfermedad, a su severidad y a su heterogeneidad (Bourdeau et al., 1999).

La diferencia en la edad a la que aparecen los síntomas y la heterogeneidad tanto en la aparición de telangiectasias como en la frecuencia de los sangrados recuerda a la enfermedad humana, donde existe también una gran heterogeneidad, incluso dentro de las propias familias, y sugiere que factores epigenéticos como el ambiente, oxigenación, infecciones, niveles hormonales o la presión sanguínea, deben de estar influyendo en las manifestaciones clínicas (Arthur et al., 2000; Bourdeau et al., 1999; Torsney et al., 2003).

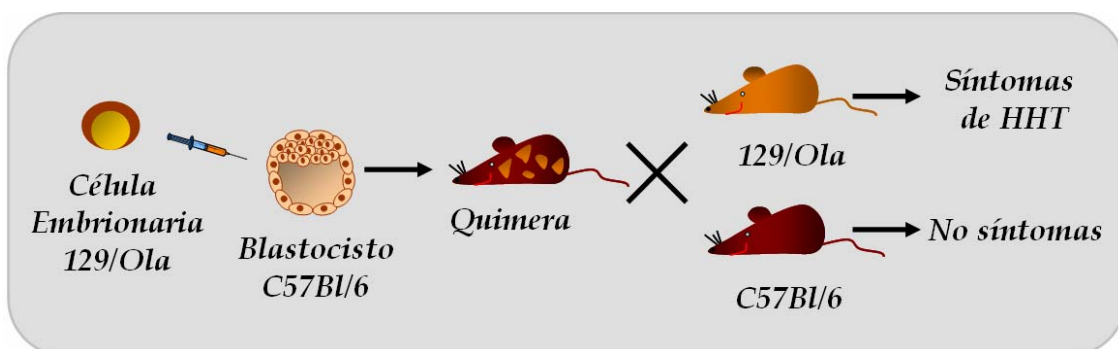


Figura 11. Generación de ratones heterocigotos para *endogлина*. Los ratones $eng^{+/-}$ se generaron a partir de cruces de quimeras con ratones silvestres 129/Ola y C57Bl/6. Únicamente en un fondo genético 129/Ola aparecieron síntomas de HHT.

La cepa 129/Ola presenta niveles bajos de TGF- β 1 circulante, hecho que podría explicar por qué esta cepa es más sensible a la aparición de los síntomas de la enfermedad (Arthur et al., 2000; Bourdeau et al., 2001; Carvalho et al., 2004; Torsney et al., 2003). El TGF- β 1, como se ha visto, es un factor que juega un papel fundamental en la homeostasis vascular mediante la regulación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular que estabilizan las interacciones entre células endoteliales y mesenquimales de la pared de los vasos. La expresión de una única copia de *endogлина* es por tanto, un factor necesario pero no suficiente para la aparición de la enfermedad.



Figura 12. Modelo murino de HHT1. Ratón heterocigoto *endogлина*^{+/-} de la cepa 129/Ola (derecha), que presenta telangiectasias visibles en el morro, junto a un ratón silvestre de la misma cepa (izquierda). Imagen tomada de Bourdeau et al., 1999.

Se ha publicado recientemente que los pacientes de HHT1 presentan bajos niveles de TGF- β 1 circulante, probablemente debido a una menor producción por parte de las células endoteliales, ya que éstas son la fuente principal de TGF- β 1 (Letarte et al., 2005). Las células endoteliales derivadas de cordón umbilical (HUVECs, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) de recién nacidos portadores de una mutación en *endogлина*, producen niveles significativamente menores de TGF- β 1, probablemente debido a la falta de Endogлина, ya que ésta estaría implicada en la autorregulación de TGF- β 1 (Bourdeau et al., 2001). Por tanto, en los ratones heterocigotos *eng*^{+/-}, a la deficiente producción de TGF- β 1 debido a la alteración en su autorregulación, habría que añadir los bajos niveles circulantes propios de la

cepa, lo que conduciría a un defecto en el reclutamiento y diferenciación de células mesenquimales y a una alteración en la estabilización de los vasos con la consecuente fragilidad de éstos.

4.1.3 Ratones *knock out* homocigotos para *alk1* (*alk^{-/-}*)

Los ratones *knock out* de *alk1* mueren también en estado embrionario. A los 8.5 días de gestación se observa una fusión entre la aorta dorsal y la vena cardinal y a los 9.5 días existen ya un gran número de uniones directas entre arterias y venas por todo el embrión. En este momento de la gestación se observa una alteración en la formación de la red vascular del saco vitelino, permaneciendo una red de tubos endoteliales del mismo tamaño interconectados en lugar de ramificarse en vasos de menor grosor como ocurre en los ratones silvestres. A los 10.5 días sufren una parada generalizada del desarrollo y ninguno sobrevive más allá del día 11.5 (Urness et al., 2000).

La diferenciación de las células de músculo liso vascular está alterada en estos ratones y su desarrollo se encuentra bloqueado a los 9.5 días de gestación. En esa etapa de la gestación, la aorta dorsal comienza a rodearse de células de músculo liso, hecho que no sucede en los ratones *knock out*, donde dichas células se encuentran ausentes (Urness et al., 2000).

Existen diversas evidencias de que *Alk1* juega un papel fundamental en la distinción estructural, funcional y molecular entre venas y arterias. Efrina B2 es el único marcador endotelial de mamíferos que distingue ambos tipos de vasos, expresándose específicamente en arterias. Sin embargo, este marcador no se detecta en el saco vitelino ni en la aorta de los ratones *alk1^{-/-}*. Un indicador de que se está dando una arteriolización funcional normal es la formación de agrupaciones de células hematopoyéticas en la arteria aorta a partir de células progenitoras. Por el contrario, en los ratones *knock out* se encuentran estas agrupaciones celulares tanto en arterias como en venas, siendo ambas fuente de

hematopoyesis intravascular, lo que indica que existe una pérdida de identidad funcional (Urness et al., 2000).

4.1.4 Ratones heterocigotos para *alk1* (*alk1*^{+/-})

El ratón heterocigoto *alk1*^{+/-} recuerda al fenotipo HHT humano en numerosas características, como son la gran similitud histológica de las lesiones, la penetrancia dependiente de la edad y, de nuevo, la heterogeneidad en la gravedad de los síntomas, lo que lo convierte en un modelo muy útil para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la HHT2.

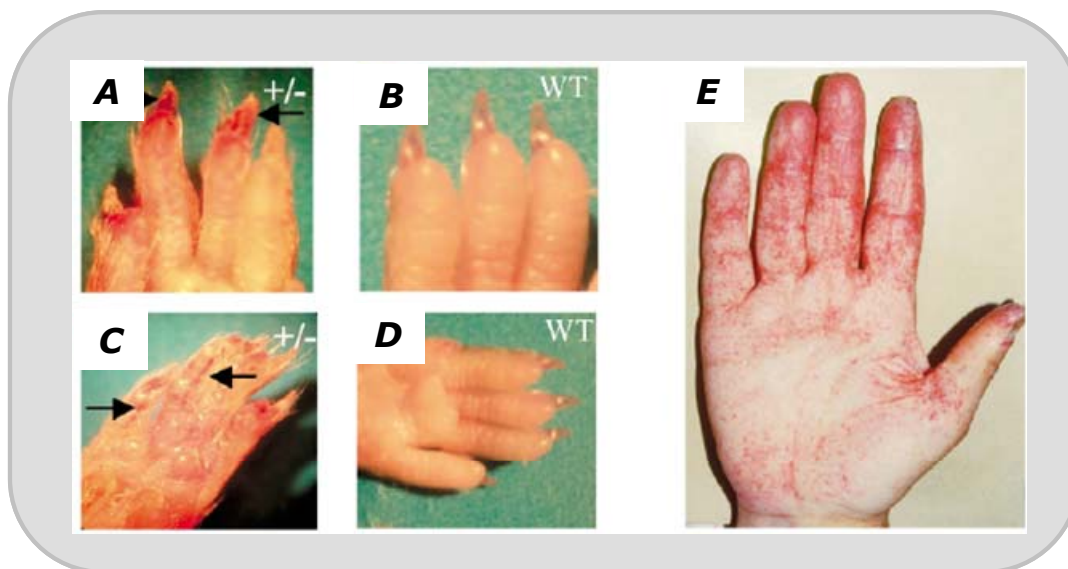


Figura 13. Comparación de lesiones vasculares cutáneas presentes en ratones *alk1*^{+/-} y pacientes HHT2. A, C. Extremidad anterior de un ratón *alk1*^{+/-}. B, D. Extremidad anterior de un ratón *alk1*^{+/+}. E. Palma de la mano de un paciente HHT2. Imagen tomada de Srinivasan et al., 2003.

Estos ratones presentan lesiones vasculares en la piel, cavidad oral, hígado, bazo, pulmón, intestino y cerebro. La primera manifestación externa que se observa son hemorragias en la región de las uñas. Tienen vasos dilatados con paredes a menudo muy delgadas y algunos de ellos se rompen dando lugar a sangrados. También se ha visto en algunos de estos ratones, tal como sucede en humanos, la aparición de fallo cardíaco de forma secundaria a grandes fístulas arterio-venosas hepáticas. El fenotipo de estos ratones se estudió en un fondo genético C57BL/6, aunque,

contrariamente a lo que sucedía en el caso de los heterocigotos para *endogлина*, este modelo se desarrolló en varias cepas (C57BL/6, Balb/C, 129/Ola) encontrando en todas ellas un fenotipo similar al de HHT (Srinivasan *et al.*, 2003).

4.1.5 Mutantes de *alk1* en pez cebra

Mediante experimentos de mutagénesis química en pez cebra, se encontró el gen homólogo del *alk1* de mamíferos. Aunque los embriones homocigotos para mutantes de *alk1* no muestran epistaxias ni telangiectasias, sí presentan dilatación de los vasos craneales y mueren a los 7-10 días tras la fecundación. Es posible, como sucede en el modelo murino, que sólo determinados fondos genéticos den lugar a una sintomatología similar a la observada en humanos, posiblemente debido a la actuación de genes modificadores (Roman *et al.*, 2002).

El pez cebra se ha empleado también como un modelo para estudiar *in vivo* el papel funcional de mutaciones encontradas en pacientes de HHT que afectan al dominio quinasa de *ALK1*. Inyectando los ARN mensajeros de las mutaciones en embriones unicelulares, se describió que algunas de ellas se expresaban en membrana y podían no ser funcionales, presentar una actividad reducida o bien actuar como dominantes negativos (Gu *et al.*, 2006).

4.2 Modelos celulares

4.2.1 HUVECs

Hasta la fecha, el único modelo celular disponible para el estudio de las bases moleculares de la enfermedad en humanos son las HUVECs, cultivos primarios de células endoteliales obtenidas de la vena umbilical.

Así, en HUVECs se vio que los niveles de Endogлина o ALK1 eran menores en células de recién nacidos portadores de una mutación en estos genes que en células control (Abdalla *et al.*, 2000). También, gracias a este

modelo se vio que la producción de TGF- β 1 en HUVECs de recién nacidos con una mutación en *endoglin* era menor que en células obtenidas de niños sanos (Letarte et al., 2005).

Sin embargo, la disponibilidad de cordones umbilicales de niños enfermos es muy escasa, y dado que los recién nacidos no muestran aún síntomas, apenas hay datos sobre las alteraciones moleculares asociadas a la enfermedad. Conocemos, al menos en parte, qué genes pueden estar mutados y qué síntomas manifiestan los pacientes, pero entre ambos existe un largo camino que durante años ha permanecido inexplorado...

Objetivos

Con el objeto de identificar mutaciones responsables de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria en España y para elucidar los mecanismos moleculares y celulares responsables de esta patología, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Estudio de mutaciones de los genes *endogлина* y *ALK1* en pacientes españoles con Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.
2. Análisis de la expresión de Endogлина en macrófagos y estudio de su posible utilidad como método diagnóstico de la enfermedad.
3. Establecimiento de un modelo de células endoteliales para el estudio de las bases moleculares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.
4. Estudio de la expresión génica diferencial entre pacientes con Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria e individuos control y su implicación en la fisiopatología de la enfermedad.

Material y Métodos

1. Análisis de mutaciones y polimorfismos

1.1 Muestras de los pacientes

Las muestras de sangre de los pacientes analizados fueron recogidas, en su mayor parte, en el Hospital de Sierrallana (Torrelavega, Santander, hospital de referencia de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria o HHT en España). Toda la investigación se hizo conforme a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (*Cardiovascular Research*, 1997; 35:2-4). Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente y donante sano, o el de los padres en el caso de ser éste menor de edad. El diagnóstico positivo de HHT se basó en los criterios de Curaçao (Shovlin et al., 2000), considerando a un individuo como enfermo si presentaba al menos tres de estos criterios. Como controles se emplearon donantes sanos, considerando como sanos aquellos que no presentaban ninguno de los criterios de Curaçao. Se estableció un triple código para cada paciente que consistía en el número de familia, número de paciente dentro de la familia y año de recepción de la muestra.

1.2 Aislamiento y amplificación de ADN genómico

El ADN genómico se aisló a partir de linfocitos de sangre periférica empleando el *Qiamp Mini Kit* (Qiagen). Los 15 exones de *endogлина* y los 9 exones codificantes de *ALK1* se amplificaron mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) empleando la polimerasa *HotMaster* (Eppendorf) y se secuenciaron mediante un protocolo de secuenciación por ciclos (Applied Biosystems). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados han sido publicadas, en el caso de *endogлина* (Pece et al., 1997) y en el caso de *ALK1* (Abdalla et al., 2000). El ADNc de *endogлина* deriva de la secuencia de referencia de *GenBank* 33871100 (BC014271.2) y el de *ALK1* de la secuencia de referencia 4557242 (NM_000020.1). Los nucleótidos están numerados correspondiendo el número 1 con la adenina del codón de iniciación de la traducción, ATG.

1.3 Mutagénesis dirigida

Se llevó a cabo mutagénesis dirigida, específica de sitio, a partir de ALK1 silvestre incluido en el vector pcDNA3.1, mediante PCR y empleando la polimerasa *Pfu Turbo Taq Polymerase* (Stratagene) seguida de digestión con la enzima *DpnI* para destruir el DNA molde. Se obtuvieron los mutantes R374W, M376T, A377T y H297R, que fueron tomados de mutaciones encontradas en la población española con HHT. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 1.

68

<i>Mutación</i>	<i>Secuencia oligonucleótidos (5' – 3')</i>
<i>R374W</i>	Dir. GTGGGCACCAAGTGGTACATGGCAC Rev. GTGCCATGTACCACTTGGTGCCAC
<i>M376T</i>	Dir. AAGCGGTACATGACACCCGAGGTGCT Rev. AGCACCTCGGGTGTCATGTACCGCTT
<i>A377T</i>	Dir. ACCAAGCGGTACACGGCACCCGAGGT Rev. ACCTCGGGTGCCGTGTACCGCTTGGT
<i>H297R</i>	Dir. ACGCTGGAGCCCCGTCTGGCTCTGA Rev. TCAGAGCCAGACGGGGCTCCAGCGT

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos específicos empleados en la PCR mutagénica.

2. Análisis de expresión de ARN

2.1 RT-PCR semicuantitativa

Se extrajo en cada caso ARN empleando el sistema comercial *RNAeasy* (Qiagen). La síntesis de ADNc se llevó a cabo a partir de 1µg de RNA total mediante el *kit* comercial *First Strand cDNA Synthesis* (Roche), usando como cebadores oligonucleótidos hexaméricos de secuencias obtenidas al azar (*random primers*) en un volumen final de reacción de 20µl, siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, 5µl de ADNc se sometieron a amplificación por PCR empleando la polimerasa *HotMaster* (Eppendorf). Como control interno de normalización se amplificó una secuencia de 417pb correspondiente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa (GAPDH; *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*). La secuencia de los oligonucleótidos empleados se muestra en la Tabla 2.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia oligonucleótidos (5' – 3')</i>
<i>TβRII</i>	Dir. ATGGCCATGGAGGCCCGCGTTAACCGGCAG Rev. GAGGATCCTATTTGGTAGTGTTTAG
<i>ALK5</i>	Dir. GGCCATGGATCTGCCACAACC Rev. GACCCGGGTACATTTTGATGCC
<i>ALK1</i>	Dir. GCAGATCTGACCCTGTGAAGCCG Rev. TACCGCGGCTGGCCATCTGTCC
<i>GAPDH</i>	Dir. GGCTGAGAACGGGAAGCTTGCA Rev. CGGCCATCACGCCACACAGT

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos específicos empleados en la amplificación por PCR a partir de ADNc obtenido por transcripción inversa.

2.2 PCR Cuantitativa a tiempo real

Se empleó el sistema *Universal Probe Library* (Roche). Este sistema se basa en la hibridación de sondas de 8-9pb y posee una librería de 90 sondas que abarcan todo el genoma humano. Cada sonda hibrida con una media de 7.000 transcritos y cada transcrito posee zonas de unión para aproximadamente 19 sondas diferentes. La especificidad del sistema se basa en la combinación de oligonucleótidos específicos y la sonda. Se determinaron los oligonucleótidos y sondas adecuados para los distintos genes en la página de Roche www.universal-probelibrary.com y se muestran en la Tabla 3.

Se emplearon triplicados de las muestras y cada experimento se repitió al menos dos veces. En cada caso se llevaron a cabo dos análisis, normalizando con respecto a dos genes endógenos distintos, *ARNr 18S* y *GAPDH*. Se calculó la media de ambos análisis comprobando que fueran consistentes entre sí. La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador Applied Biosystems (AB 7900).

<i>Gen</i>	<i>Secuencia oligonucleótidos (5' – 3')</i>	<i>Sonda</i>
<i>Ang-2</i>	Dir. TGCAAATGTTACAAATGCTAA Rev. AAGTTGGAAGGACCACATGC	75
<i>PECAM-1</i>	Dir. AGAAAACCACTGCAGAGTACCAG Rev. GGCCTCTTTCTTGTCCAGTGT	31
<i>Cdc25b</i>	Dir. AATGAACTTCACGCCTCAGC Rev. CGTCGAGACAGGGATAGGTG	28
<i>Ciclina B2</i>	Dir. TGGAAAAGTTGGCTCCAAAG Rev. CTTCTTCATGGAGACATCCTC	07
<i>eNOS</i>	Dir. GACCCTCACCGCTACAACAT Rev. CCGGGTATCCAGGTCCAT	05
<i>PAI-1</i>	Dir. TCCAGCAGCTGAATTCCTG Rev. GCTGGAGACATCTGCATCCT	15
<i>VE-Cad 2</i>	Dir. GGAGGAGCTCACTGTGGATT Rev. CTGATGCAGCAAGGACAGC	14
<i>N-WASP</i>	Dir. CCAGATACGACAGGGTATCCA Rev. GCAGGTGTTGGTGGTGTAGA	05
<i>COX-2</i>	Dir. TCACGCATCAGTTTTTCAAGA Rev. TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC	23
<i>ENG</i>	Dir. AGCCTCAGCCCCACAAGT Rev. GTCACCTCGTCCCTCTCG	41
<i>ALK1</i>	Dir. ATCTGAGCAGGGCGACAC Rev. ACTCCCTGTGGTGCAGTCA	79
* <i>GAPDH</i>	Dir. AGCCACATCGCTCAGACAC Rev. GCCAATACGACCAAATCC	60
* <i>18S</i>	Dir. CTCAACACGGGAAACCTCAC Rev. CGCTCCACCAACTAAGAACG	77

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos específicos empleados en la amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real. En la columna izquierda se incluye la lista de los genes amplificados. El asterisco indica los genes empleados como controles endógenos. En la columna derecha se indica el número de la sonda comercial (Universal Probe Library, Roche).

3. Cultivos celulares

3.1 Aislamiento de células mononucleares

A partir de 5ml de sangre venosa se recuperaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; *Peripheral Blood Mononuclear*

Cells) mediante centrifugación en gradiente de Ficoll usando el medio de separación Lymphoprep (ICN) y centrifugando a 1.500g sin freno, durante 30 minutos a 22°C. Se obtuvieron monocitos parcialmente diferenciados a macrófagos tras permitir su adhesión, durante 21 horas, a plástico, en pocillos de 3cm² de placas P-6 (Falcon) donde se incubaron en medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con suero bovino fetal a una concentración de 100ml/l.

3.2 Cultivos de Células Endoteliales

Se emplearon dos cultivos primarios (BOECs y HUVECs) y una línea de células endoteliales (HMEC; *Human Microvascular Endothelial Cells*). Todos los cultivos se mantuvieron en medio EBM-2 (*Endothelial Basal Medium 2*) suplementado con EGM-2 SingleQuots (*Endothelial Growth Medium 2*) (Clonetics, Cambrex).

Se obtuvieron BOECs (*Blood Outgrowth Endothelial Cells*) a partir de 50ml de sangre periférica. Tras centrifugación en gradiente de Ficoll se recuperaron las células mononucleares y se centrifugaron y lavaron dos veces en medio de cultivo EGM-2/EBM-2 (Clonetics). Finalmente se resuspendieron en 2ml de medio y se cultivaron en placas de 6 pocillos recubiertos de colágeno, tal como se ha descrito (Lin *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2000). Las células se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂ y el medio se cambió a diario durante la primera semana y cada dos días a partir de la segunda semana. Se establecieron cultivos puros de células endoteliales cuando éstas eran las únicas células supervivientes en los pocillos al cabo de 30-45 días de cultivo. Para su caracterización y estudios funcionales se emplearon BOECs de segundo a cuarto pase.

Las HUVECs se obtuvieron lavando la vena del cordón umbilical con solución isotónica Hank's y tras digestión durante 10 minutos a 37°C con colagenasa tipo I-A (Sigma). Las células endoteliales fueron purificadas por adhesión diferencial a la placa, especificidad del medio de cultivo y por su potencial proliferativo sobre el resto de tipos celulares contaminantes. Para mantener estos cultivos primarios, las placas se incubaron previamente con

gelatina al 0,2% en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) durante 1 hora a 37°C.

3.3 Cultivos de Células no Endoteliales

Se emplearon cultivos primarios de fibroblastos humanos, así como las líneas Raw 264.7 (macrófagos murinos), HEK 293T (células epiteliales procedentes de un carcinoma de riñón embrionario humano; *Human Embryonic Kidney carcinoma cells*) y Phoenix (células HEK 293T modificadas para permitir el empaquetamiento de retrovirus). En todos los casos se empleó el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con el 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina y estreptomycin (DMEM completo).

72

4. Transfecciones y Ensayos de Luciferasa

Todos los ensayos se llevaron a cabo mediante la transfección transitoria de las células indicadas en cada caso en placas de 24 pocillos, empleando como reactivo de transfección *Superfect* (Qiagen). Los vectores reporteros y vectores de expresión empleados se muestran en las Tablas 4 y 5. Todos los vectores reporteros empleados se encuentran acoplados al ADNc que codifica la enzima luciferasa.

Las unidades relativas de luciferasa se determinaron en un luminómetro TD20/20 (Promega). En todos los casos, la transfección incluyó un vector de expresión de β -galactosidasa insensible a TGF- β (pSV40/ β -Gal) que se utilizó como control interno para corregir la eficiencia de transfección. La medida de esta actividad se llevó a cabo mediante el reactivo *Galacto-Light* (Tropix) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se definen como unidades relativas de luciferasa (URL) el cociente de la actividad luciferasa entre la de β -galactosidasa. Todos los puntos de las transfecciones se hicieron por triplicado y éstas se repitieron al menos en tres experimentos independientes. En las figuras se muestran experimentos representativos.

Para los ensayos de transactivación se utilizaron vectores de expresión que codificaban las proteínas Smad1, 2 y 3 fusionadas al dominio de transactivación Gal4. Fueron cotransfectadas con el vector reportero pFr5-luc (Stratagene). Así, una vez fosforilada la proteína Smad correspondiente, la proteína de fusión es capaz de translocarse al núcleo donde se unirá a una secuencia presente en el vector reportero que es reconocida por Gal4, permitiendo así la transcripción del gen de la Luciferasa.

En los casos en los que se realizó tratamiento con TGF-β1 (Preprotech), se empleó 1ng/ml durante 3 horas para estimular la vía ALK1/Endoglina y 10ng/ml durante 24 horas para estimular la vía de ALK5.

En el ensayo de interferencia de *endoglina* se transfectó un ARN interferente que reconoce una región de 23 pares de bases del exón 4 del ARNm de *endoglina* (Sanz-Rodriguez et al., 2004b). Después de la transfección, las células se cultivaron durante 48h antes de teñir el citoesqueleto.

Reportero	Vector	Descripción	Procedencia
BRE-luc	pGL3	Reportero de la vía ALK1. Obtenido del promotor de Id1	Dr. Peter Ten Dijke (The Netherlands Cancer Institute)
CAGA-luc	pGL3	Reportero de la vía ALK5. Obtenido del promotor de PAI-1	Dr. Peter Ten Dijke (The Netherlands Cancer Institute)
3TP lux	pGL2	Reportero TGF-β. Obtenido del promotor de PAI-1	Dr. Joan Massagé (Memorial Sloan-Kettering)
pALK5	pGL2	Zona proximal del promotor de ALK5 (-867/-228)	Dr. Soichi Kojima (RIKEN)
pALK1	pGL2	Zona proximal del promotor de ALK1 (-1035/+209)	Dr. Calvin PH Vary (Maine)
pCD105	pXP2	Zona proximal del promotor de ENG (-450/+350)	Generado en el laboratorio (Rius et al., 1998)
pTGF-β1	pGL2	Zona proximal del promotor de TGF-β1 (-867/-67)	Dr. Soichi Kojima (RIKEN)
Gal4	pFr5-luc	Elemento de transactivación de Gal4	Stratagene

Tabla 4. Vectores reporteros empleados. Se muestran los vectores reporteros empleados y su procedencia.

ADNc	Vector	Descripción	Procedencia
<i>Gal4 Smad1</i>	<i>pGal4</i>	Proteína de fusión Gal4-Smad1	Dr. Konosuke Nakayama (Universidad de Tokio)
<i>Gal4 Smad2</i>	<i>pGal4</i>	Proteína de fusión Gal4-Smad2	Dr. Konosuke Nakayama (Universidad de Tokio)
<i>Gal4 Smad3</i>	<i>pGal4</i>	Proteína de fusión Gal4-Smad3	Dr. Rik Deryng (Georgetown University)
<i>ALK1 wt</i>	<i>pcDNA3.1</i>	Forma silvestre de la proteína	Dr. Kohei Miyazono (Universidad de Tokio)
<i>K299R</i>	<i>pcDNA3.1</i>	Mutante dominante negativo	Dr. Kohei Miyazono (Universidad de Tokio)
<i>Q201D</i>	<i>pcDNA3.1</i>	Mutante constitutivamente activo	Dr. Kohei Miyazono (Universidad de Tokio)
<i>R374W</i>	<i>pcDNA3.1</i>	Mutación en dominio quinasa (exón 8)	Generado en el laboratorio
<i>M376T</i>	<i>pcDNA3.1</i>	Mutación en dominio quinasa (exón 8)	Generado en el laboratorio
<i>A377T</i>	<i>pcDNA3.1</i>	Mutación en dominio quinasa (exón 8)	Generado en el laboratorio
<i>H297R</i>	<i>pcDNA3.1</i>	Mutación en dominio quinasa (exón 7)	Generado en el laboratorio
<i>ENG wt</i>	<i>pDisplay</i>	Forma silvestre de la proteína	Generado en el laboratorio (Guerrero-Esteo <i>et al.</i> , 2002)
<i>ENG wt</i>	<i>pCMV5</i>	Forma silvestre de la proteína	Generado en el laboratorio (Letamendia <i>et al.</i> , 1998)
<i>ENG EC</i>	<i>pDisplay</i>	Región extracelular de Endoglina	Generado en el laboratorio (Guerrero-Esteo <i>et al.</i> , 2002)
<i>ENG CT</i>	<i>pDisplay</i>	Región intracelular de Endoglina	Generado en el laboratorio (Guerrero-Esteo <i>et al.</i> , 2002)
<i>ARNi ENG (ex 4)</i>	<i>pSUPER</i>	ARN interferente de <i>endoglina</i>	Generado en el laboratorio (Sanz-Rodriguez <i>et al.</i> , 2004)
<i>EGFP</i>	<i>pEGFP</i>	Proteína verde fluorescente	Clontech

Tabla 5. Vectores de expresión empleados. Se muestran los vectores de expresión empleados y su procedencia.

5. Análisis de expresión de proteínas

5.1 Citometría de Flujo

Para la identificación de los monocitos/macrófagos y el estudio de la expresión de Endoglina por citometría de flujo, PBMCs frescos y PBMCs

cultivados durante 21 horas se incubaron con un *cocktail* de anticuerpos monoclonales que contenía anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD11c y anti-CD11b. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; *Fluorescein Isothiocyanate*). Finalmente, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con una solución de formaldehído en PBS frío a razón de 37ml/l. Se estudió la expresión de Endoglina en las células negativas para CD3 y CD16 y positivas para CD11c, CD11b y CD14.

Las células se incubaron también con concentraciones saturantes de los anticuerpos P4A4 (anti-endoglina) (Pichuantes *et al.*, 1997), Bear1 (anti-CD11b) o un control de isotipo, durante 30 minutos a 4°C en PBS frío. Las incubaciones se hicieron en presencia de γ -globulinas humanas para bloquear las uniones inespecíficas. A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón y conjugado con FITC.

Para la caracterización de células endoteliales, así como de los fibroblastos humanos, se llevaron a cabo incubaciones con los anticuerpos monoclonales anti-endoglina (P4A4), anti-Factor von Willebrand (vWF, sc-7154, Santa Cruz), anti-ALK1 (MAB370, R&D), anti-Flk1/KDR (MAB3572, R&D), anti-Flt1 (MAB321, R&D), anti-fibroblast surface protein (1B10, Sigma) o un control de isotipo durante 30 minutos a 4°C en PBS frío y con anti-inmunoglobulinas humanas, seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con FITC.

Se analizó un mínimo de 5.000 células, en cada caso, empleando un citómetro de flujo Coulter Epics XL. Los valores obtenidos se dan en forma de índice de expresión, resultado del producto del porcentaje de células positivas por la intensidad de fluorescencia media de la población total de células.

5.2 Western Blot

Los extractos proteicos se obtuvieron mediante lisis en hielo durante 30 minutos en presencia de SDS 1%. Los lisados se centrifugaron a 14.000g durante 5 minutos.

Las proteínas se separaron y analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), de distinto porcentaje de acrilamida según la proteína a analizar. Muestras de extractos celulares totales, o bien inmunoprecipitados, se diluyeron en tampón Laemmli, se hirvieron durante 5 minutos y se analizaron en condiciones reductoras, con 100 mM DTT (Sigma), o no reductoras, en minigeles adaptados a los sistemas de electroforesis Mini Protean 3 (Bio-Rad Laboratories). Las proteínas separadas en función de sus tamaños presentes en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P o Nitrocelulosa (Amersham), según los casos.

Las uniones inespecíficas se bloquearon incubando la membrana en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-Tween 20 (0,05%). Una vez bloqueada, la membrana se incubó con los anticuerpos correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Tras realizar 4 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 20, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa (DakoCytomation), durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras 4 lavados con PBS-Tween 20, se llevó a cabo la reacción de quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial *SuperSignal* (Pierce). La densitometría de las bandas, reveladas en películas Curix RP2 Plus (AGFA), se realizó con el programa informático Adobe Photoshop CS (*Adobe Systems Incorporated*).

Se emplearon los siguientes anticuerpos: Cdc25b (sc-5619), eNOS (sc-654), PAI-1 (sc-8979), WASL (sc-20770), y Ciclina B2 (sc-2830) (todos ellos de Santa Cruz), VE-Cadherina 2 (Chemicon; MAB1989), ALK1 (R&D), PECAM-1/CD31 (HC1/6) (Cabanas *et al.*, 1989) y Endoglina (P4A4)

(Pichuantes et al., 1997), ambos producidos en el laboratorio. Como controles de carga se emplearon anticuerpos anti-actina (A-2103), o anti-tubulina (T-5168) (ambos de Sigma). En algunos casos se usó la tinción de proteínas totales, con Rojo Ponceau o Azul de Coomassie, como control de carga. Se emplearon las diluciones recomendadas por el fabricante en cada caso.

5.3 ELISA

Para la detección de la Angiopoyetina-2, se empleó un *Kit* comercial de ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) (R&D). Se emplearon 200µl de las muestras de plasma, tanto de pacientes de HHT como controles sanos, y 50µl de plasma de los ratones *eng*^{+/+} y *eng*^{+/-}. El protocolo empleado fue el indicado por el fabricante.

5.4 Microscopía de Inmunofluorescencia

Se crecieron las células en cristales tapizados con colágeno tipo I y se fijaron con 3.5% formaldehído en PBS. Las muestras se lavaron y bloquearon empleando PBS con 2% de BSA durante una hora a 4°C. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos anti-endogлина (P4A4), anti-PECAM1 (Clon HC1/6) anti-ALK1 (MAB370, R&D), anti-von Willebrand Factor (vWF, sc-7154, Santa Cruz) y VE-cadherina (sc-9989, Santa Cruz), durante una hora a 4°C. Para el marcaje con vWF las células se permeabilizaron usando 100µg/ml de L-α-lisofosfatidilcolina. Seguidamente, las muestras se incubaron con el anticuerpo IgG-anti-conejo/ratón (Molecular Probes). Para marcar los filamentos de actina, las células fueron fijadas, marcadas y permeabilizadas en un solo paso empleando 5 unidades/ml de Alexa-546 faloidina (Molecular Probes), 100µg/ml de L-α-lisofosfatidilcolina y PBS frío con 3,5% de formaldehído. Los cristales se montaron con Mowiol 44-88 (Sigma) y las imágenes se analizaron en un microscopio confocal (Leica Microsystems). Cuando fue requerido, se transfectaron BOECs, previamente a los marcajes, con vectores de expresión para la proteína verde fluorescente (EGFP; *Enhanced*

Green Fluorescent Protein), Endoglina (pCMV5-ENG) o un ARN interferente de *endoglina* (pSUPER-Endo).

6. Ensayos de migración, adhesión y angiogénesis

6.1 Wound Healing

En placas de 24 pocillos con las células endoteliales en confluencia, se practicó una raya, con una punta estéril, de lado a lado de los pocillos. Las células se lavaron con tampón HBSS (*Hanks Balanced Salts Solution*) (Gibco), y se cultivaron en medio EGM-2/EBM-2. Se tomaron fotografías desde las 3 horas hasta las 48 horas después de practicar la herida.

6.2 Ensayo de adhesión a fibronectina

Se sembraron 50.000 células en 100µl de medio EGM-2/EBM-2 en placas de 96 pocillos (Costar), previamente tapizados con 2.5µg/ml de fibronectina. Se centrifugaron las placas durante 15 segundos a 400rpm con el fin de poner las células en contacto con el ligando. Se incubaron durante una hora a 37°C y a continuación se lavaron tres veces con tampón HBSS, con el fin de eliminar las células que no se hubieran adherido en ese tiempo. Las células adheridas se tiñeron con cristal violeta y se cuantificó el colorante con un espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, ELX 800).

6.3 Ensayo de formación de tubos sobre Matrigel

Para el ensayo de formación de tubos, se sembraron 300.000 células (BOECs, HUVECs, HMEC) por pocillo y se cultivaron a 37°C en medio EGM-2/EBM-2 sobre placas recubiertas de matrigel (Becton Dickinson), tal como indica el fabricante. Se comenzaron a tomar fotografías de los pocillos a partir de una hora hasta las 12 horas después de haberlas sembrado.

7. Ensayos de ciclo celular

7.1 Ensayo de proliferación MTT

La proliferación de las células endoteliales se llevó a cabo mediante el ensayo MTT (Metil Tetrazolio). El MTT, es una sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), la cual reacciona con el sistema mitocondrial de las células viables dando como resultado cristales de formazán. El formazán es un compuesto de coloración violeta cuya absorbancia puede ser leída a través de un espectrofotómetro. Los valores de absorbancia obtenidos a partir de este método son directamente proporcionales a la cantidad de células viables. Se añadieron a cada pocillo 50µl de una solución 2mg/ml de MTT (Sigma). Tras 3 horas a 37°C, en oscuridad, se añadió 0,01N HCl con 10% de SDS, para disolver el formazán formado y se midió la absorbancia a 540nm en un lector de placas (Bio-Tek Instruments, ELX 800). Los experimentos se repitieron al menos dos veces, empleando triplicados, los resultados que se muestran son representativos.

7.2 Estudio del perfil de ciclo celular en citometría de flujo

Se sembraron 100.000 células en pocillos de placas P-6. Tras 24 horas de cultivo, se fijaron en PBS:formaldehído (9:1) y se incubaron con ARNasa y yoduro de propidio (PI; *Propidium Iodide*). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics XL. Los experimentos se repitieron al menos dos veces.

8. Tratamiento con fármacos

Para el tratamiento de células endoteliales con drogas antifibrinolíticas, se emplearon las siguientes concentraciones de cada uno de los fármacos:

- Ácido Tranexámico (Amchafibrin; Rottafarm): 0.5, 1 y 2mM
- Ácido ε-Aminocaproico (Caproamin; Rottafarm): 0.5, 1 y 2mM
- Aprotinina (Sigma): 5, 10 y 20µg/ml

9. Estudio de chips de ADNc (*Microarrays*)

9.1 Hibridación y detección de la señal

El experimento de *Microarrays* se llevo a cabo empleando la plataforma de CodeLink (Amersham; General Electric). Se extrajo ARN de cuatro cultivos de BOECs distintos (un cultivo HHT1, dos HHT2 y un cultivo de un donante sano), empleando el *kit* comercial RNAeasy (Qiagen). 2µg de ARN de cada tipo celular, por triplicado, fueron retrotranscritos a ADNc y, en un segundo paso, a ARNc, el cual se marcó con biotina 16 UTP (Roche), empleando la ARN polimerasa del fago T7 (Roche), siguiendo el protocolo de *CodeLink Expression Assay Reagent Kit Protocol* (Amersham; General Electric).

La calidad del ARN total y el ARNc marcado con biotina se monitorizó con un Bioanalizador. Para cada *Bioarray* se emplearon 10µg de ARNc marcado en 260µl de la mezcla de hibridación. La hibridación se llevó a cabo a 37°C durante 17 horas en agitación. Después de la hibridación, se llevaron a cabo una serie de lavados a 46°C en tampón TNT 0,75X (0.1 M Tris-Hcl, pH 7,5, 0.15 M NaCl, 0,05% Tween 20), tras los cuales se reveló la señal incubando los portas 30 minutos a temperatura ambiente con el colorante Cy5-estreptavidina en tampón TNT 1X. Los lavados finales se hicieron en tampón TNT 1X y solución SSC 0,1X (cloruro y citrato sódico; *sodium chloride & sodium citrate*)/0.05% Tween 20, siempre siguiendo el protocolo de CodeLink.

Los portas con la matriz fueron escaneados en un escáner GenePix Array y los datos se analizaron empleando el programa *CodeLink Expression Analysis Software*.

9.2 Análisis estadístico de los datos

Los valores absolutos de intensidad fueron normalizados mediante el método de cuantiles implementado con el paquete estadístico *Bioconductor Package Limma* (<http://www.bioconductor.org>). Los datos de cada condición

(control, HHT1, HHT2n y HHT2m) se filtraron de acuerdo a los siguientes pasos:

- Únicamente los puntos con dos o tres puntos de calidad asignados como G (*good*) o L (*low*) fueron seleccionados para el análisis.
- En aquellos puntos en los que únicamente dos datos eran válidos, el tercer punto se excluyó y se utilizó la media de los dos valores válidos.
- Los valores inferiores a cero se igualaron a diez.

Tras estos procedimientos de filtrado de datos, éstos se reagruparon en los siguientes grupos experimentales: control vs HHT1, control vs HHT2n, control vs HHT2m. Los genes con una diferencia de valores medios, entre los dos grupos experimentales comparados, menor a 50, fueron eliminados. El análisis estadístico de cada uno de los grupos seleccionados se llevó a cabo por el método del error acumulativo local (*Package LPE from Bioconductor*). Los valores-*p* obtenidos se ajustaron para un test de múltiples hipótesis usando el control de la tasa del falso positivo basado en el procedimiento desarrollado por Benjamín y Yekutieli (Reiner *et al.*, 2003) e implementado con el *Bioconductor Package Multitest*.

Aquellos genes con valores de $p < 0,05$ se consideraron como expresados diferencialmente. Para discernir los genes comunes afectados en HHT, independientemente de la mutación, y para reducir el ruido debido a la expresión génica entre diferentes individuos, sólo los genes expresados diferencialmente en los tres grupos experimentales se consideraron para su anotación en la tabla.

10. Inmortalización de Células Endoteliales

Se cultivaron células Phoenix en placas P-100, en medio de cultivo DMEM completo. Una vez alcanzado el 70% de confluencia se transfectaron tres placas con 10µg de los plásmidos pBABE-EST2, pZIPneoSV(TAG) o pBABE-EST2 junto con pLXSN-E6-E7 y se les añadió medio EGM-2/EBM-2. Para aumentar la eficacia de transfección se añadió 8µg/ml de polibreno (Sigma).

A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes con las partículas retrovirales, se pasaron por filtros de $0,45\mu\text{m}$ para eliminar restos celulares y se emplearon para infectar las células endoteliales. Las células endoteliales se mantuvieron 48 horas con el medio de infección y $8\mu\text{g/ml}$ de polibreno. A continuación, se cambió por medio fresco y se añadió el antibiótico de selección. El medio se cambió cada dos días hasta que aparecieron clones resistentes. Una vez obtenida la confluencia, y manteniendo siempre el antibiótico de selección, las células se amplificaron diez pases antes de caracterizarlas. Se emplearon los antibióticos geneticina (G418) ($400\mu\text{g/ml}$; Gibco BRL) y puromicina ($1\mu\text{g/ml}$; Gibco BRL).

11. Análisis estadísticos

El estudio estadístico de los niveles de expresión de Endoglina en macrófagos de pacientes de HHT, respecto a controles, se hizo mediante tests no paramétricos: el Test de Kruskal Wallis, considerando todos los grupos de edad y controles, y el Test de Mann-Whitney, entre grupos de edad distintos, agrupándolos dos a dos.

Para analizar la dependencia de la edad con el índice de expresión de Endoglina en los controles sanos, se calcularon las correlaciones de Pearson entre variables completas (edad e índice de expresión de endoglina a 0 y 21 horas) y las correlaciones conjuntas, teniendo en cuenta que los datos proceden de seis experimentos independientes.

En los demás experimentos de este trabajo, el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la aplicación del test t-Student. Las representaciones gráficas muestran la media \pm SD (*Standard Deviation*). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Se indican con asteriscos los niveles de significación * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Resultados y Discusión

OBJETIVO 1. ESTUDIO DE MUTACIONES EN PACIENTES CON TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA.

1.1 Análisis de mutaciones en pacientes españoles de HHT

Debido al gran desconocimiento que existe en torno a la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, son muchos los pacientes que tras ser atendidos por médicos de distintas especialidades, no reciben un diagnóstico claro de su enfermedad. Las manifestaciones clínicas de estos pacientes pueden resultar confusas y hasta el año 2000 no se establecieron unos criterios claros y objetivos [criterios de Curaçao (Shovlin et al., 2000)], que permitieran determinar si un individuo presenta o no HHT.

En España, esta enfermedad no había sido estudiada ni existía un hospital de referencia donde pudieran acudir los pacientes diagnosticados de HHT hasta finales del año 2002. Es entonces cuando, en colaboración con varios médicos del hospital de Sierrallana en Torrelavega (Santander), iniciamos un estudio de la enfermedad. En nuestro laboratorio analizaríamos las mutaciones presentes en los pacientes a partir de muestras de sangre enviadas desde el Hospital de Sierrallana. A su vez, siguiendo las directrices del comité clínico de la Asociación Americana de HHT, en Sierrallana establecerían un protocolo completo de pruebas clínicas con las que detectar las posibles malformaciones arterio-venosas que pudieran presentar los pacientes. Así, en febrero del año 2003, el Hospital de Sierrallana fue nombrado centro de referencia para la HHT en España.

El estudio genético de la HHT ha cobrado peso en los últimos años. Debido a que no se conocen, hasta la fecha, portadores de la mutación que en edad adulta no muestren síntomas de la enfermedad, este estudio es muy útil para determinar en personas jóvenes o incluso desde el momento del nacimiento, si presentan o no HHT, con el fin de iniciar, si fuera necesario, un seguimiento clínico del paciente.

A partir de muestras de pacientes clínicamente diagnosticados o de sus familiares, hemos realizado el estudio genético de 180 individuos,

pertenecientes a 51 familias distintas. El estudio consistió en amplificar y secuenciar los 15 exones de los que consta el gen de Endogлина y los 9 exones codificantes del gen de ALK1. Encontramos la mutación en 103 pacientes y confirmamos la ausencia de mutación en 34 individuos, familiares de enfermos. En 43 pacientes con síntomas (el 28,8% de los individuos analizados) no localizamos la mutación, lo cual podría deberse a diversas razones:

- Puede ser que la mutación no se encuentre en ninguno de los dos genes analizados, ya que recientemente se ha descrito la existencia de un tercer y cuarto locus que pueden encontrarse mutados en pacientes de HHT (Bayrak-Toydemir et al., 2006; Cole et al., 2005).
- También puede suceder que la mutación se encuentre en una región intrónica alejada del exón, y que por tanto no hayamos analizado, pero que afecte al procesamiento alternativo o *splicing* del ARN mensajero. Así sucedería si la mutación se encontrara en el *Branch Point*, secuencia consenso situada en los intrones y que es necesaria para la formación de una estructura en forma de lazo que aparece previa a la escisión del intrón, región que se ha encontrado mutada en algunas enfermedades humanas (van der Veen et al., 1987).
- Finalmente, en el caso de que se produjera una delección en heterocigosis que implicara uno o varios exones completos, no podríamos detectarla por secuenciación, ya que secuenciaríamos el alelo sano sin encontrar alteración. Este tipo de mutaciones se han descrito tanto en *endogлина* como *ALK1*.

De las 51 familias estudiadas, en 35 de ellas encontramos la mutación causante de la enfermedad, mientras que 16 permanecen sin identificar. De las 35 familias, 13 presentan la mutación en *endogлина* (por lo que son pacientes HHT1) y 22 en *ALK1* (pacientes HHT2). Esta prevalencia de HHT2 sobre HHT1 es similar a la que se ha descrito en otros países de la cuenca mediterránea como Francia (Lesca et al., 2004) o Italia (Lastella et al., 2003; Olivieri et al., 2002), mientras que es inversa a la

encontrada en países del norte de Europa (Letteboer et al., 2005) o Canadá (Abdalla et al., 2003; Abdalla et al., 2000).

Entre las 35 familias encontramos 33 mutaciones diferentes, 26 de las cuales eran originales ya que no habían sido publicadas ni introducidas en la base de datos de la Fundación Internacional de HHT.

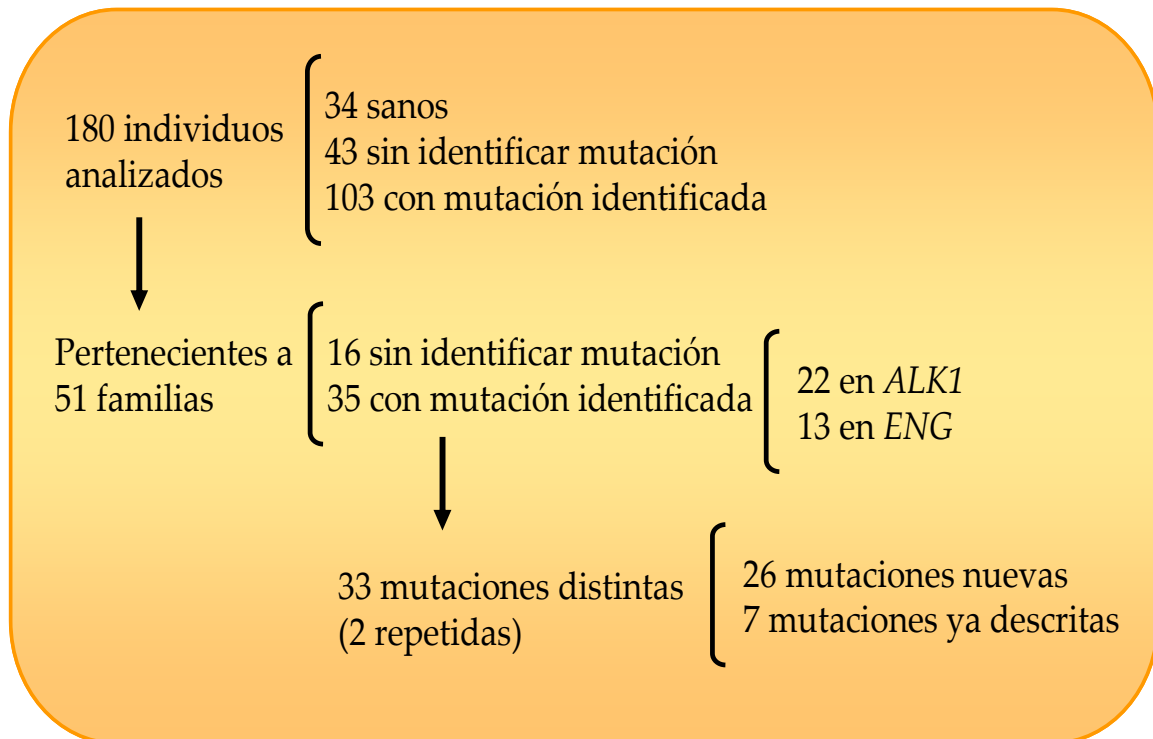
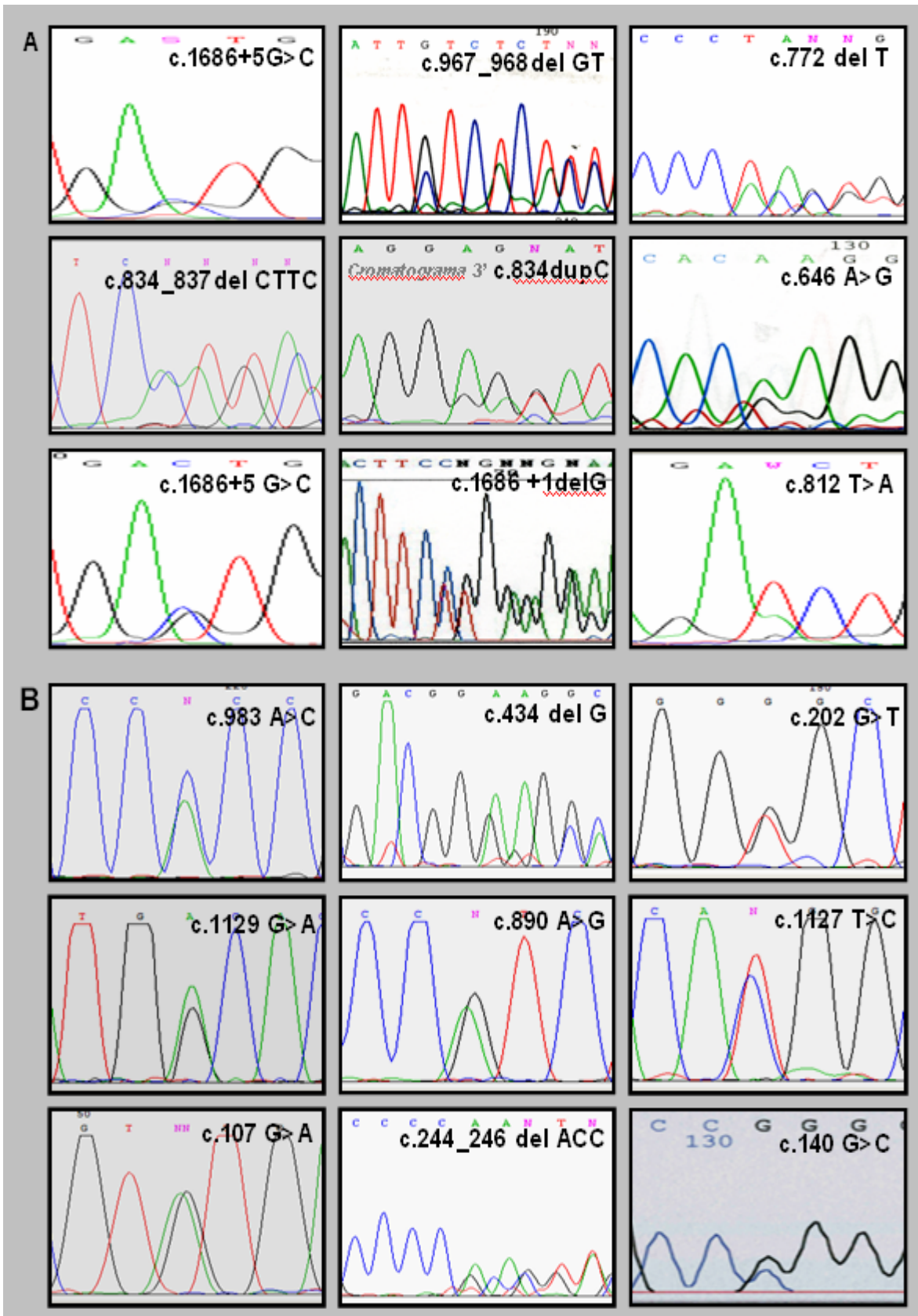


Figura 14. Resumen de los datos obtenidos en el análisis mutacional. Se muestra el número de mutaciones identificadas a partir de las muestras analizadas, así como su localización génica. De las 33 mutaciones distintas identificadas, 26 de ellas se describen por primera vez en esta tesis.



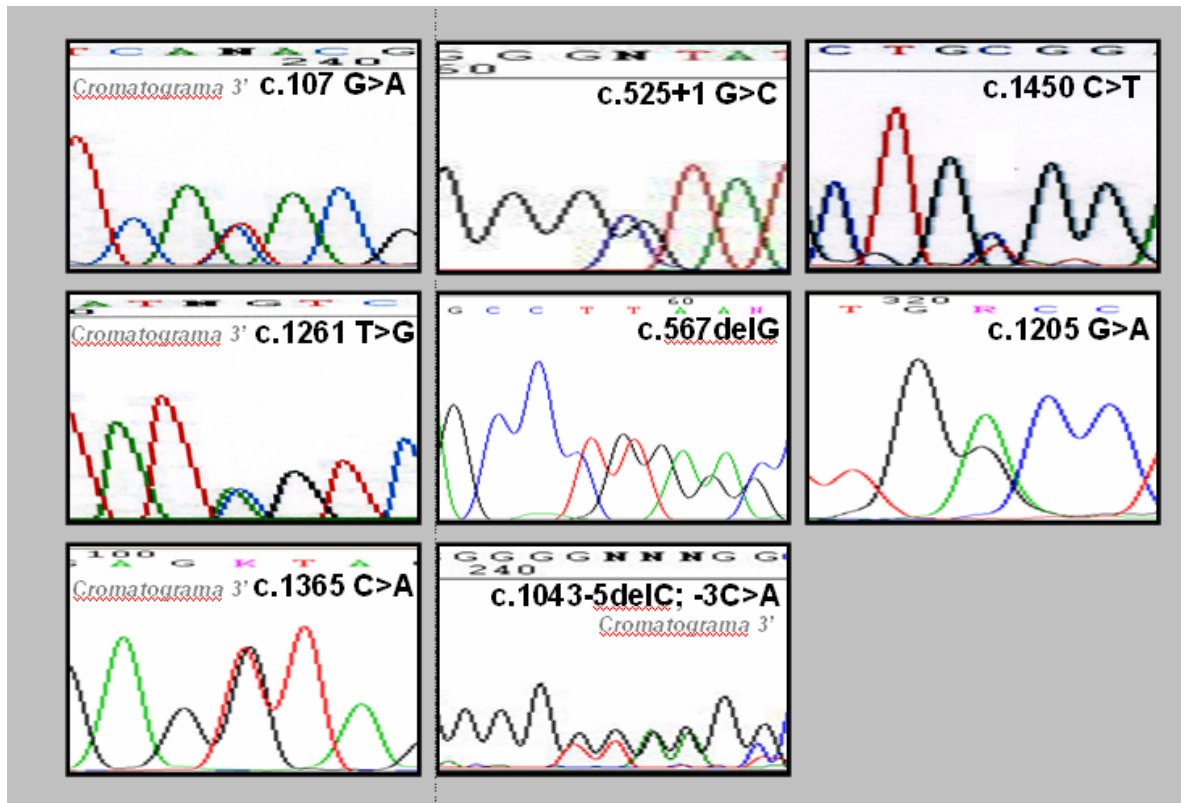


Figura 15. Mutaciones identificadas que no habían sido descritas previamente. **A.** Mutaciones nuevas presentes en el gen de Endoglin. Se muestran cromatogramas de las familias: 3, 7, 15, 23, 25, 30, 31, 33, 39, 42 y 45 (de izquierda a derecha y de arriba abajo). **B.** Mutaciones nuevas presentes en el gen de ALK1. Cromatogramas de las familias: 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 26, 34, 35, 36, 38, 41, 44 y 50 (de izquierda a derecha y de arriba abajo). Las familias 9 y 19 presentan la misma mutación, al igual que sucede con la 31 y 33. Se indica la posición mutada en el ADNc, así como la base o bases afectadas. En los casos en los que el cromatograma de la secuencia directa no era claro, se muestra la secuencia inversa (cromatograma 3').

Núm pac	Fam	Ed	Manif Clin	Gen	Exón	ADNc	Prot	Tipo	Ref
01.01.03	1	80	E,T,PAVM,CAVM,GB	ENG	4	c.511 C>T	p.R171X	Sin sentido	Shovlin, 1997
01.02.03	1	40	E,T	ENG	4	c.511 C>T	p.R171X	Sin sentido	Shovlin, 1997
02.01.03	2	69	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.02.03	2	47	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.03.03	2	45	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.04.03	2	22	E	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.05.03	2	18	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.06.03	2	12	E	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.07.03	2	78	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.08.03	2	74	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.09.04	2	48	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.10.04	2	50	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.11.04	2	42	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.14.04	2	20	E	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.17.04	2	49	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.18.05	2	0		ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.19.05	2	61	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.20.05	2	13	E	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
02.21.06	2	70	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Sustitución	Berg, 1997
03.01.03	3	75	E,T,GB	ENG	Int11	c.1686+5 G>C	r.spl	Sustitución	Nueva
03.02.03	3	40	E,T,PAVM	ENG	Int11	c.1686+5 G>C	r.spl	Sustitución	Nueva
03.03.06	3	38	E,T	ENG	Int11	c.1686+5 G>C	r.spl	Sustitución	Nueva
07.01.03	7	45	E,T	ENG	7	c.967_968 del GT	p.V323 fs	Delección	Nueva
07.02.04	7	38	E,T	ENG	7	c.967_968 del GT	p.V323 fs	Delección	Nueva
07.03.04	7	78	E,T	ENG	7	c.967_968 del GT	p.V323 fs	Delección	Nueva
07.04.04	7	6	E	ENG	7	c.967_968 del GT	p.V323 fs	Delección	Nueva
09.01.03	9	59	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Sustitución	Nueva
09.02.04	9	37	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Sustitución	Nueva
09.03.05	9	41	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Sustitución	Nueva
09.04.06	9	20	E	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Sustitución	Nueva
09.05.06	9	12	E	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Sustitución	Nueva
09.06.06	9	8	E	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Sustitución	Nueva
10.01.04	10	49	E,T	ALK1	4	c.434 del G	p.R145 fs	Delección	Nueva
10.02.04	10	56	E,T	ALK1	4	c.434 del G	p.R145 fs	Delección	Nueva
10.03.04	10	54	E,T	ALK1	4	c.434 del G	p.R145 fs	Delección	Nueva
11.01.04	11	67	E,T	ENG	4	c.392 C>T	p.P131L	Sustitución	Cymerman, 2003
11.02.04	11	37	E,T	ENG	4	c.392 C>T	p.P131L	Sustitución	Cymerman, 2003
11.03.04	11	40	E,T	ENG	4	c.392 C>T	p.P131L	Sustitución	Cymerman, 2003
12.01.04	12	48	E,T,GB,HAVM	ALK1	3	c.202 G>T	p.G68C	Sustitución	Nueva
13.01.04	13	40	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Sustitución	Nueva
13.02.04	13	65	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Sustitución	Nueva
13.03.04	13	16	E	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Sustitución	Nueva
13.04.04	13	21	E	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Sustitución	Nueva
13.05.04	13	47	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Sustitución	Nueva
14.01.04	14	48	E,T,PAVM,GB	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Sustitución	Nueva
14.02.04	14	31	E,T,PAVM	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Sustitución	Nueva
14.03.04	14	36	E,T	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Sustitución	Nueva

Núm pac	Fam	Ed	Manif Clin	Gen	Exón	ADNc	Prot	Tipo	Ref
14.04.04	14	25	E	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Sustitución	Nueva
14.05.04	14	21	E	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Sustitución	Nueva
14.07.04	14	32	E,T	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Sustitución	Nueva
15.01.04	15	59	E,T	ENG	6	c.772 del T	p.Y258fs	Delección	Nueva
16.01.04	16	64	E,T,PAVM	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Sustitución	Nueva
16.02.04	16	33	E,T,PAVM	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Sustitución	Nueva
16.03.04	16	37	E,T	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Sustitución	Nueva
16.04.04	16	36	E,T	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Sustitución	Nueva
17.01.04	17	50	E,T	ALK1	3	c.107 G>A	p.C36Y	Sustitución	Nueva
17.02.05	17	24	E	ALK1	3	c.107 G>A	p.C36Y	Sustitución	Nueva
19.01.04	19	57	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Sustitución	Nueva
21.01.04	21	50	E,T	ALK1	3	c.244_246 del ACC	p.T82del	Delección	Nueva
23.01.04	23	50	E,T	ENG	7	c.834_837 del CTTC	p.F279 fs	Delección	Nueva
23.02.04	23	19	E,CAVM	ENG	7	c.834_837 del CTTC	p.F279 fs	Delección	Nueva
23.03.04	23	15	E	ENG	7	c.834_837 del CTTC	p.F279 fs	Delección	Nueva
23.04.04	23	56	E,T,PAVM,CAVM	ENG	7	c.834_837 del CTTC	p.F279 fs	Delección	Nueva
25.01.04	25	42	E,T,PAVM,CAVM	ENG	7	c.834 dupC	p.F279 fs	Duplicación	Nueva
26.01.04	26	17	E,CAVM,HAVM	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Sustitución	Nueva
26.02.04	26	41	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Sustitución	Nueva
26.03.04	26	48	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Sustitución	Nueva
26.04.04	26	8	E	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Sustitución	Nueva
26.05.04	26	11	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Sustitución	Nueva
26.06.04	26	3	E	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Sustitución	Nueva
26.07.04	26	21	E	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Sustitución	Nueva
29.01.05	29	43	E,T	ALK1	Int6	c.773-2 A>G	r.spl	Sustitución	Lesca, 2004
30.01.05	30	39	E,T	ENG	5	c.646 A>G	p.K216Q	Sustitución	Nueva
30.02.05	30	15	E,PAVM	ENG	5	c.646 A>G	p.K216Q	Sustitución	Nueva
30.03.05	30	4	E	ENG	5	c.646 A>G	p.K216Q	Sustitución	Nueva
31.01.05	31	43	E,T	ENG	Int11	c.1686+5 G>C	r.spl	Sustitución	Nueva
33.01.05	33	30	E,T,PAVM	ENG	Int11	c.1686+5 G>C	r.spl	Sustitución	Nueva
33.02.05	33	56	E,T	ENG	Int11	c.1686+5 G>C	r.spl	Sustitución	Nueva
34.01.05	34	81	E,T	ALK1	3	c.107 G>A	p.C36Y	Sustitución	Nueva
35.01.05	35	50	E,T	ALK1	Int4	c.525+1 G>C	r.spl	Sustitución	Nueva
36.01.05	36	42	E,T	ALK1	10	c.1450 C>T	p.R484W	Sustitución	Nueva
36.02.05	36	5	E,PAVM	ALK1	10	c.1450 C>T	p.R484W	Sustitución	Nueva
38.01.05	38	54	E,T	ALK1	9	c.1261 T>G	p.Y421D	Sustitución	Nueva
39.01.05	39	53	E,T,GB	ENG	Int11	c.1686 +1 delG	r.spl	Delección	Nueva
41.01.05	41	56	E,T	ALK1	5	c.567 delG	p.G189 fs	Delección	Nueva
42.01.05	42	61	E,T	ENG	6	c.812 T>A	p.I271N	Sustitución	Nueva
44.01.05	44	46	E,T	ALK1	8	c.1205 G>A	p.G402D	Mnissense	Nueva
44.02.05	44	37	E,T	ALK1	8	c.1205 G>A	p.G402D	Sustitución	Nueva
44.03.06	44	14	E	ALK1	8	c.1205 G>A	p.G402D	Sustitución	Nueva
44.04.06	44	78	E,T	ALK1	8	c.1205 G>A	p.G402D	Sustitución	Nueva
45.01.06	45	68	E,T	ENG	10	c.1365 C>A	p.Y455X	Sin sentido	Nueva
45.02.06	45	66	E,T	ENG	10	c.1365 C>A	p.Y455X	Sin sentido	Nueva
45.03.06	45	36	E,T	ENG	10	c.1365 C>A	p.Y455X	Sin sentido	Nueva
46.04.06	45	11	E	ENG	10	c.1365 C>A	p.Y455X	Sin sentido	Nueva

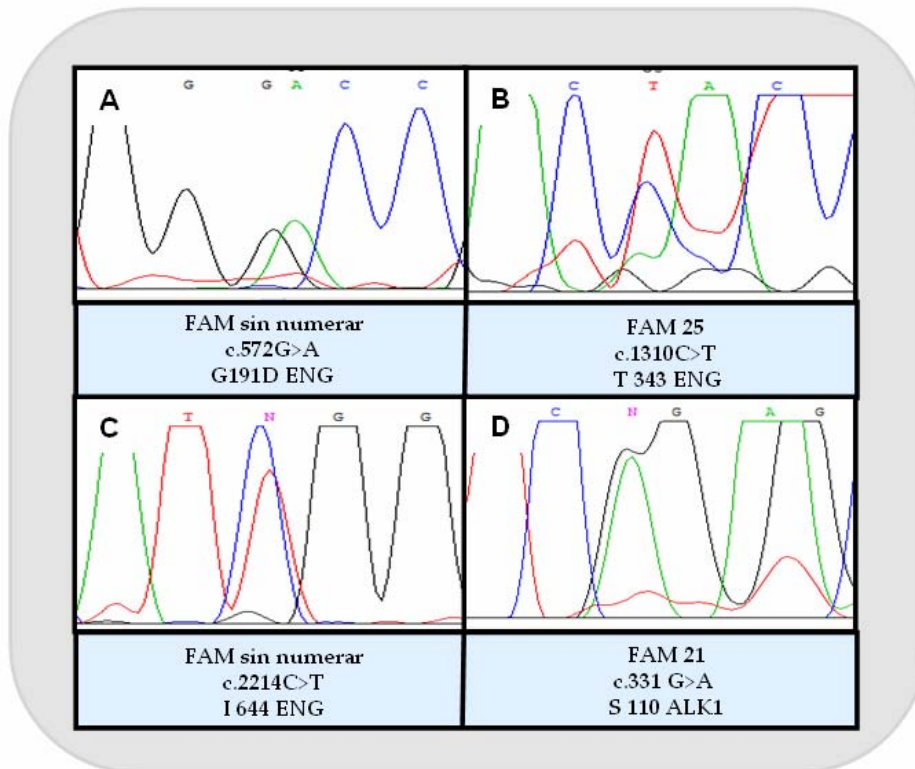
Núm pac	Fam	Ed	Manif Clín	Gen	Exón	ADNc	Prot	Tipo	Ref
47.01.06	47	42	E,T	ALK1	3	c.144-145 insG	p.A49 fs	Inserción	Klaus, 1998
48.01.06	48	42	E,T,PAVM	ALK1	8	p.1232 G>A	p. R411Q	Sustitución	Johnson, 1996
48.02.06	48	47	E,T	ALK1	8	p.1232 G>A	p. R411Q	Sustitución	Johnson, 1996
48.03.06	48	4	E,PAVM	ALK1	8	p.1232 G>A	p. R411Q	Sustitución	Johnson, 1996
49.01.06	49	45	E,T	ALK1	7	p.1030 T>C	p.C344R	Sustitución	Bayrak, 2006
50.01.05	50	42	E,T	ALK1	Int7	c.1043-5 delC; -3C>A	r.spl	Delec,Sustit	Nueva
50.02.05	50	40	E,T	ALK1	Int7	c.1043-5 delC; -3C>A	r.spl	Delec, Sustit	Nueva
50.03.05	50	37	E,T	ALK1	Int7	c.1043-5 delC; -3C>A	r.spl	Delec, Sustit	Nueva
50.04.05	50	18	E,T	ALK1	Int7	c.1043-5 delC; -3C>A	r.spl	Delec, Sustit	Nueva

Tabla 6. Pacientes estudiados con mutación identificada. Se muestra el código de paciente (Núm pac; formado por un número asignado a cada familia, el número del paciente dentro de la familia y el año en que fue procesada la muestra), el número de familia (Fam), la edad (Ed), manifestaciones clínicas (Manif Clín; E: epistaxias; T: telangiectasias; PAVM: malformaciones arterio-venosas pulmonares; CAVM: malformaciones arterio-venosas cerebrales; HAVM: malformaciones arterio-venosas hepáticas; GB: sangrado gástrico), el gen y exón en el que se encuentra la mutación, el código de la mutación a nivel ADNc y proteína (Prot), el tipo de mutación (sustitución, delección, duplicación o mutación sin sentido) y la referencia (Ref) en aquellas mutaciones que ya han sido descritas previamente.

1.2 Estudio de polimorfismos en pacientes de HHT

Durante la realización del estudio genético de los pacientes, encontramos también cuatro polimorfismos en los cuales la sustitución de una base por otra no daba lugar a un cambio de aminoácido, o bien, si lo hacía, el cambio no era responsable de la patología (Figura 16). Tres de ellos (G191D, T343, I644) se encontraron en *endogлина* y uno (S110) en *ALK1*. Únicamente G191D se encontraba ya descrito previamente en la literatura (Lesca et al., 2004).

Figura 16 (página 93). Polimorfismos identificados. Se muestran los cromatogramas de los cuatro polimorfismos identificados. **A, B, C**, encontrados en *endogлина*, **D**, en *ALK1*. En **B, C, D** se trata de una sustitución en la última base del codón que no da lugar a cambio de aminoácido. Estos polimorfismos no se encontraban descritos previamente en la literatura. En **A** se produce un cambio de una glicina por un ácido aspártico, cambio que no es responsable de la patología, habiendo sido ya descrito como un polimorfismo que aparece también en la población sin síntomas clínicos de HHT, con una frecuencia del 6,4%. Se muestra el cromatograma de dos familias sin numerar, no incluidas en el estudio al no haber sido clínicamente estudiadas en el hospital de referencia.



OBJETIVO 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ENDOGLINA EN MACRÓFAGOS Y ESTUDIO DE SU POSIBLE UTILIDAD COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO.

2.1 Estudio de los niveles de expresión de Endoglina en monocitos diferenciados *in vitro* de pacientes de HHT

Los monocitos expresan niveles de Endoglina prácticamente despreciables en su superficie en condiciones normales, sin embargo, estos niveles aumentan significativamente cuando el monocito se diferencia a macrófago (Lastres et al., 1992). Nos planteamos, que siendo una haploinsuficiencia el mecanismo causante de la patología, cabría esperar que los macrófagos de pacientes portadores de una mutación en el gen de Endoglina, expresaran en superficie la mitad de Endoglina que un individuo sano. De ser así, éste podría resultar un método sencillo de análisis para diferenciar si el paciente es HHT1 o HHT2.

Así, analizamos de forma sistemática las muestras de sangre de pacientes que fuimos recibiendo, comparando siempre con muestras control tratadas en paralelo y obtenidas de un individuo de edad similar al paciente.

La fracción mononuclear de la sangre, obtenida tras realizar un gradiente de ficol, se mantenía en cultivo durante 21-24h. Está ampliamente aceptado que tras ese tiempo de adherencia a placa, los monocitos se han diferenciado a macrófagos. En prácticamente todos los casos analizados, la expresión de Endogлина en macrófagos de pacientes HHT fue menor que la de los individuos control. Sin embargo, mientras que los niveles de expresión en las células control no variaban significativamente, sí existían grandes variaciones de unos pacientes a otros. Contrariamente al esperado 50% de expresión de Endogлина en los pacientes, con respecto al control, de acuerdo con la hipótesis de haploinsuficiencia, encontramos grandes fluctuaciones que parecían estar relacionadas con la edad del enfermo. En la Figura 17 se muestra como ejemplo un experimento llevado a cabo con un control de 37 años y un paciente HHT1 de 40.

Más sorprendente fue el hecho de encontrar que la disminución en los niveles de expresión de Endogлина en macrófagos no aparecía únicamente en pacientes HHT1, sino también en HHT2. Por alguna razón, una mutación en ALK1 estaba conduciendo a una disminución en la expresión de Endogлина. Esta falta de expresión de Endogлина en pacientes de HHT2 podría hacernos postular que el mecanismo último responsable de la enfermedad, tanto en HHT1 como en HHT2, es la falta de Endogлина, hecho que explicaría la igualdad de síntomas en ambos tipos de pacientes.

Este hallazgo contrastaba con los estudios realizados por Abdalla y colaboradores (Abdalla et al., 2000), los cuales mostraban que los niveles de expresión de Endogлина en pacientes HHT2 eran similares a los encontrados en individuos sanos. Esta discrepancia se podría deber, al menos en parte, a las diferencias en la metodología empleada. Nosotros empleamos un método directo y cuantitativo como es la citometría de flujo, estimando niveles de Endogлина en superficie, frente a su estudio semicuantitativo empleando marcaje metabólico seguido de inmunoprecipitación y *Western Blot*.

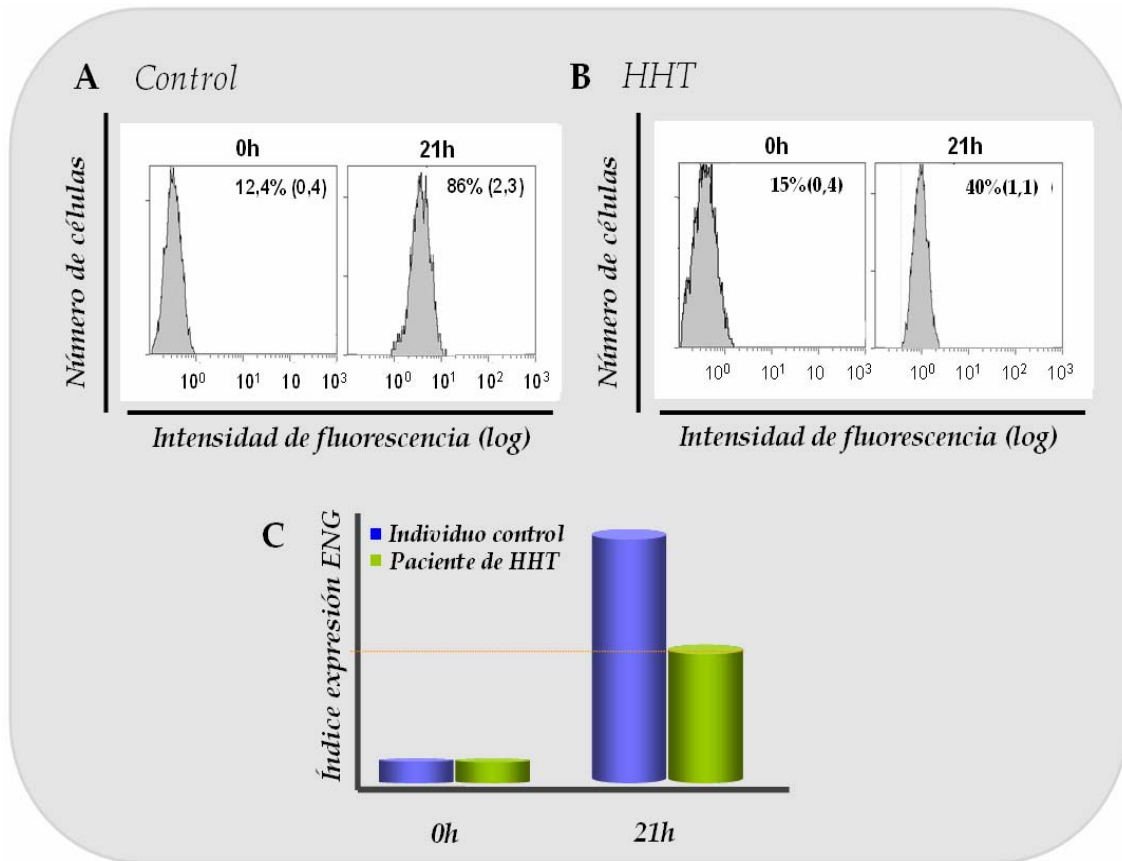


Figura 17. Aumento de expresión de Endoglina en la diferenciación de monocito a macrófago en pacientes de HHT e individuos sanos. A. Expresión de Endoglina tras 0 o 21 horas de adhesión a placa en monocitos de un individuo control. **B.** Expresión de Endoglina tras 0 o 21 horas de adhesión a placa en monocitos de un paciente de HHT. **C.** Índice de expresión de Endoglina (resultado de multiplicar el porcentaje de células positivas por la intensidad de fluorescencia media de la población) en monocitos y macrófagos de un paciente de HHT y un individuo control. Se muestra un experimento representativo.

Realizamos un análisis de expresión de Endoglina en monocitos y macrófagos de pacientes HHT1 y HHT2 clínicamente diagnosticados, así como de la población control, clasificando los individuos por edades. El estudio se hizo en 13 pacientes y 40 voluntarios sanos, agrupados por décadas y estudiando al menos a tres personas de cada grupo, desde la primera a la novena década de vida (Figura 18).

En el caso de la población control, encontramos que los niveles de expresión de Endoglina en los macrófagos oscilaban en torno a un valor, sin

encontrarse diferencias significativas entre los distintos grupos de edad. Sin embargo, al medir los niveles en macrófagos de pacientes, observamos que a edades tempranas los niveles de expresión eran similares a los de la población control, mientras que éstos iban disminuyendo conforme aumentaba la edad, hasta ser prácticamente nulos en los pacientes de mayor edad (en torno a los 80 años). Esta pérdida de la capacidad de aumentar la expresión de Endogлина se correlaciona con el aumento de la penetrancia de la enfermedad que se produce a lo largo de la vida de estos pacientes.

En enfermos jóvenes, se produce una compensación de la haploinsuficiencia de forma que el alelo sano debe de estar sobreexpresándose para alcanzar niveles de Endogлина en membrana similares a los presentes en individuos sanos. Sin embargo, esta capacidad de compensación se va perdiendo con la edad, hasta tal punto que en los pacientes de mayor edad ni siquiera el alelo sano es capaz de expresarse con normalidad y prácticamente no se encuentra Endogлина en la membrana de los macrófagos. Esta disminución paulatina de la expresión con la edad podría deberse a que los bajos niveles de Endogлина, consecuencia de la mutación, fueran responsables de alteraciones de otros factores o procesos que se vean agravados por la edad e influyan a su vez sobre la propia expresión de Endogлина. Así, se explicaría que la expresión disminuya gradualmente, más allá del 50% esperado debido a la presencia de un único alelo funcional.

Encontramos también una correlación entre los niveles de Endogлина y la gravedad de los síntomas, de forma que pacientes con una sintomatología más marcada presentaban niveles de Endogлина claramente inferiores a los de la media de individuos de su edad. Así, en la Figura 18 se muestra recuadrado en amarillo el caso de un paciente de 45 años que presentaba nueve fístulas arterio-venosas pulmonares mayores de 3mm y había sido intervenido de dos malformaciones arterio-venosas en cerebro. Los niveles de expresión de Endogлина en sus macrófagos era muy inferior al que esperábamos encontrar con relación a su edad.

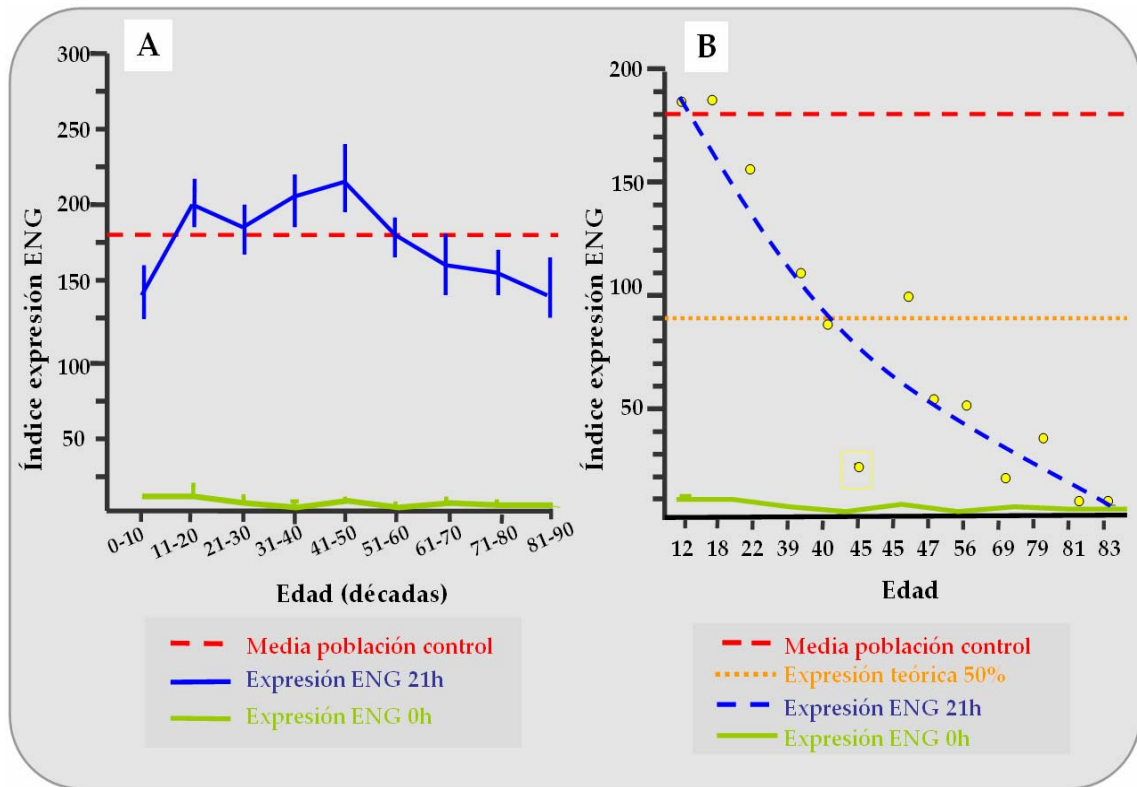


Figura 18. Análisis comparativo de los niveles de expresión de Endoglina en monocitos y macrófagos de población control y HHT en función de la edad. A. Los niveles de expresión de Endoglina en macrófagos de la población sin síntomas de HHT (línea azul), oscilan en torno a un valor medio (línea roja discontinua), sin existir diferencias significativas. **B.** Los niveles de expresión de Endoglina en macrófagos de individuos con HHT (se muestra la tendencia; línea azul discontinua), disminuyen conforme aumenta la edad y la severidad de los síntomas. La línea roja discontinua representa la media hallada en la población control, la línea de puntos naranja representa el 50% de expresión, con respecto a la población control, teóricamente esperado en la población HHT. El cuadro amarillo indica el caso de un paciente con una sintomatología muy marcada para su edad. La línea verde, tanto en A como en B, representa la expresión de Endoglina en monocitos.

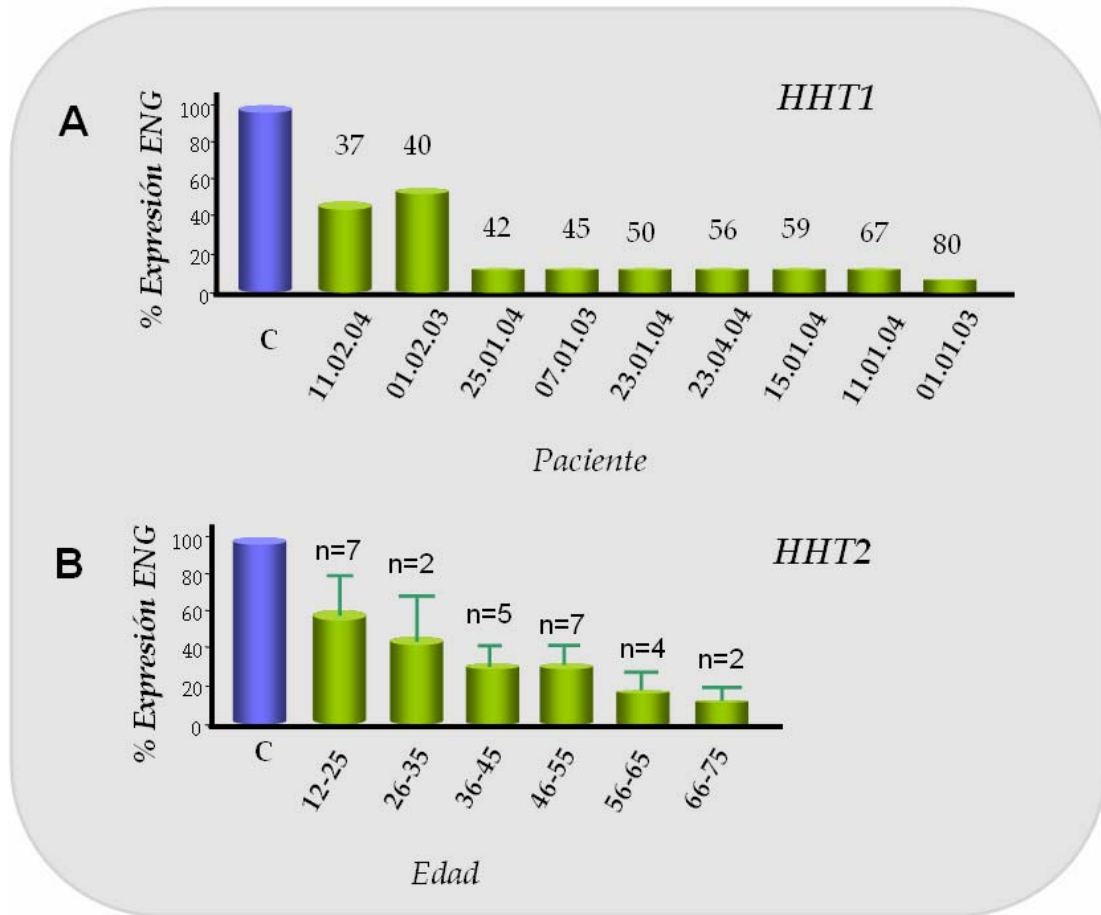
Por tanto, la capacidad de inducción de la expresión de Endoglina parecía comportarse como un marcador molecular relacionado con la severidad de la enfermedad. Las diferencias en la gravedad de los síntomas entre distintos pacientes, teniendo en cuenta que se propone que en todos ellos la haploinsuficiencia de la proteína mutada es la responsable de las

manifestaciones clínicas (Marchuk, 1998; Shovlin et al., 1997), indica que factores epigenéticos y ambientales podrían estar influyendo en la sintomatología, así como el propio fondo genético de cada paciente.

Este estudio comparativo entre pacientes y población control, se extendió más adelante con un mayor número de pacientes, tanto HHT1 como HHT2 (Figura 19), corroborándose los resultados obtenidos en el estudio inicial. El análisis de expresión de Endogлина en macrófagos de un posible paciente en relación a un control, podría constituir una prueba diagnóstica rápida de la presencia de HHT, ya que la sintomatología observable podría confundirse con otras enfermedades hemorrágicas tales como la enfermedad de von Willebrand. Sin embargo, este tipo de análisis no nos serviría para distinguir pacientes HHT1 y HHT2.

El hecho de que las manifestaciones clínicas comiencen a aparecer alrededor de la adolescencia y que la penetrancia de la enfermedad aumente con la edad, así como la existencia de mecanismos compensatorios a edades tempranas que permitan que el alelo sano se sobreexpresen hasta alcanzar niveles normales de proteína, nos indican que las HUVECs, células endoteliales derivadas de cordón umbilical, no son un buen modelo para el estudio de las bases moleculares de la HHT, puesto que probablemente aún no presenten las alteraciones que se encontrarían en células endoteliales de un paciente adulto.

Figura 19 (Página 99). Niveles de expresión de Endogлина en pacientes de HHT1 y HHT en relación a controles sanos. A. Porcentaje de expresión de Endogлина en pacientes HHT1 en relación a un control (C). **B.** Porcentaje de expresión de Endogлина en pacientes HHT2 agrupados por edades, en relación a un control (C).



2.2 Expresión de ALK1 en monocitos humanos

Con el fin de entender por qué en pacientes de HHT2 la expresión de Endogлина en macrófagos también se encontraba disminuida, nos planteamos si la propia falta de ALK1 (debida a la mutación presente en estos pacientes) era responsable de la disminución en la expresión de Endogлина. Sabiendo que la expresión de Endogлина aumenta al tratar a las células con TGF- β (Botella *et al.*, 2001; Lastres *et al.*, 1996; Rius *et al.*, 1998), los datos parecían sugerir una conexión entre el sistema de receptores de TGF- β y la expresión de Endogлина. Por eso, hipotetizamos que podría ser necesaria cierta cantidad de ALK1 para que Endogлина pueda expresarse con normalidad en el proceso de diferenciación de los monocitos.

Así, en primer lugar, quisimos determinar si ALK1 se expresa en los monocitos y macrófagos humanos. Se sabía que ALK1 está presente en

macrófagos de ratón (Panchenko et al., 1996), pero nada había publicado al respecto en humanos.

Tras mantener monocitos adheridos a plástico durante 20 minutos o 24 horas (permitiendo así su diferenciación a macrófagos), vimos por RT-PCR que ALK1 se expresaba en ambos casos, pese a no saber si la expresión es constante o aumenta en la diferenciación, por no tratarse de un análisis cuantitativo (Figura 20). El experimento se hizo en presencia y ausencia de transcriptasa reversa, con el fin de descartar una posible amplificación de DNA genómico en la subsiguiente PCR. A continuación, la banda obtenida se secuenció, confirmándose que se trataba de ALK1.

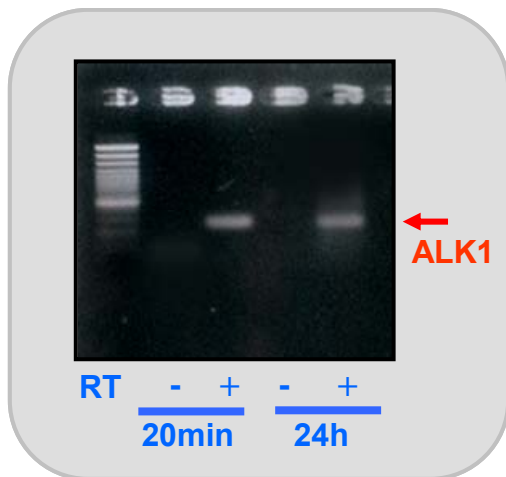


Figura 20. RT-PCR para el exón 7 de ALK1 en monocitos y macrófagos humanos. En los carriles se muestra la amplificación del exón 7 de ALK1 en monocitos (tras 20 minutos de adhesión a placa) y macrófagos (tras 24h) en presencia y ausencia de transcriptasa reversa.

2.3 Señalización de la vía de ALK1 en monocitos

A continuación, quisimos determinar si ALK1 es un receptor de TGF- β funcional en macrófagos, ya que la coexistencia de los receptores de tipo I, ALK5 y ALK1, sólo estaba descrita en células endoteliales. Así, transfectamos células Raw 264.7 (macrófagos murinos) con distintos reporteros de la vía de TGF- β . La construcción CAGA-luc contiene 9 repeticiones CAGA que son reconocidas y a las cuales se une el complejo Smad3/Smad4, seguidas del gen reportero *luciferasa* (Dennler et al., 1998). De esta forma, mediante un ensayo de luminometría podemos evaluar si se está fosforilando Smad3 y, por tanto, si el TGF- β está señalizando vía ALK5. BRE-luc (*BMP-responsive element*), sin embargo, consta de dos repeticiones de tres motivos reconocidos por los complejos Smad1/Smad4 y

Smad5/Smad4, lo cual nos permite evaluar si está señalizando la vía de ALK1 (Korchynskyi and ten Dijke, 2002).

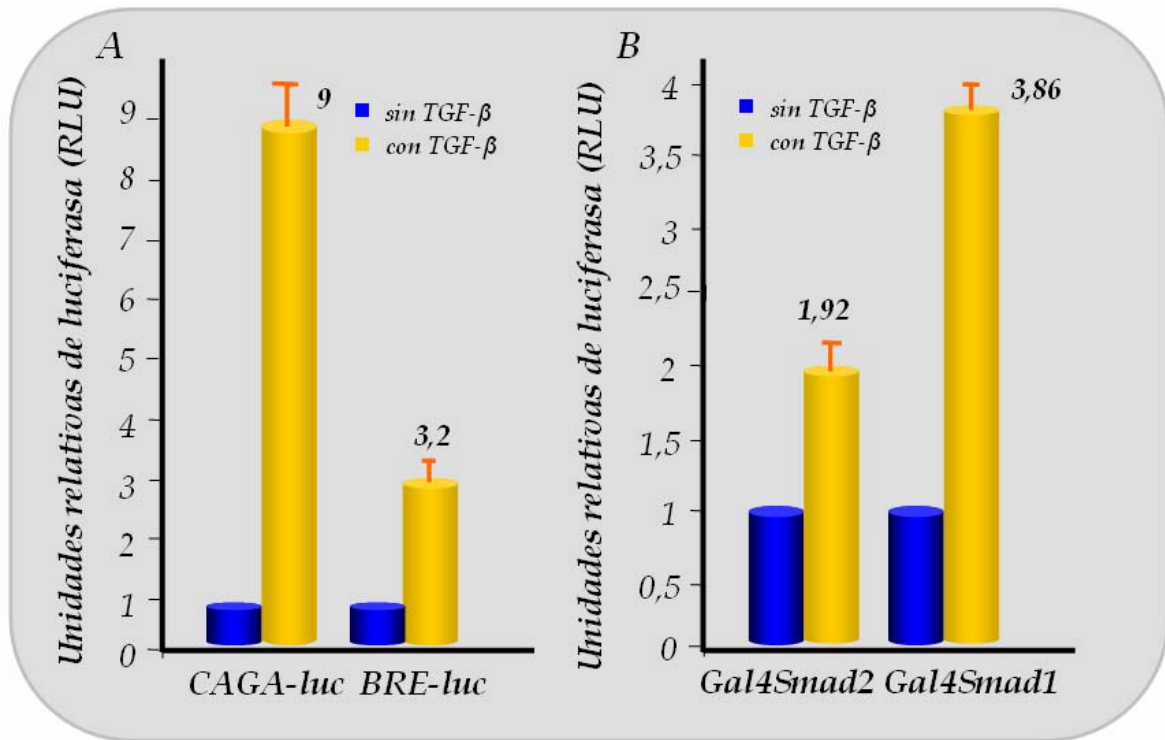


Figura 21. Medida de la actividad de reporteros de las vías de ALK5 y ALK1 en macrófagos (Raw 264.7) antes y después de estimular con TGF-β. **A.** Se muestra la actividad de los reporteros CAGA-luc y BRE-luc en unidades relativas de luciferasa (RLU). Tras tratamiento con TGF-β (10ng/ml y 1 ng/ml, respectivamente), ambos reporteros aumentan su actividad. **B.** Se muestra la actividad de los reporteros Gal4Smad2 y Gal4Smad3, que aumenta tras el tratamiento con TGF-β.

En la Figura 21A se puede observar que, al tratar con TGF-β, ambos reporteros, CAGA-luc y BRE-luc, aumentaban su actividad, lo que sugiere que ambas rutas de TGF-β están activas en macrófagos.

Con el fin de corroborar esta idea, transfectamos células Raw con vectores de expresión Gal4 fusionados a distintas proteínas Smad. Esta proteína de fusión adopta un plegamiento en forma de horquilla cerrada que se despliega en el momento en el que la proteína Smad es fosforilada por el receptor tipo I correspondiente. Una vez desplegada, la proteína es capaz de translocarse al núcleo donde se unirá a una secuencia reconocida por Gal4 presente en el vector reportero, permitiendo así la transcripción del

gen de la Luciferasa. Empleamos los sistemas Gal4/Smad2 y Gal4/Smad1 (Figura 21B), comprobando que Smad2 y Smad1 estaban siendo fosforiladas, hecho que de nuevo indicaba que tanto la ruta de ALK5 como la de ALK1 están activas en macrófagos.

Para conocer si la vía de ALK1 ejerce funciones similares a las descritas en células endoteliales, sería interesante, en un futuro, estudiar la cooperación funcional ALK1/Endogлина en macrófagos, así como estudiar los genes diana que están siendo regulados por esta vía y así poder esclarecer el papel funcional de la dualidad ALK1/ALK5 en macrófagos.

102

De la misma forma que ocurre en células endoteliales, la estimulación de TGF- β a tiempos cortos, induce migración en los macrófagos, mientras que a tiempos largos la inhibe. Aunque se ha propuesto que el efecto en migración podría estar mediado por la señalización de TGF- β vía Rho GTPasas (Kim *et al.*, 2006), sería interesante estudiar la posible implicación de ALK5 y ALK1 en este proceso. De hecho, los mismos autores vieron que mientras que los niveles de ALK5 son altos en monocitos quiescentes, disminuyen cuando el monocito se activa y diferencia a macrófago, lo cual podría concordar con una prevalencia en la señalización de ALK1 en ese momento.

Se sabe que los monocitos y macrófagos ejercen un papel importante durante la angiogénesis. Monocitos circulantes son reclutados hacia los tejidos tumorales mediante gradientes quimiotácticos, y allí se van a diferenciar hacia macrófagos asociados a tumores (TAMs; *Tumor-Associated Macrophages*). Estos macrófagos, en respuesta a la hipoxia del tejido, van a liberar citoquinas proangiogénicas tales como TGF- β , TNF- α , MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase-9*) o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Luo *et al.*, 2006; Murdoch and Lewis, 2005). De la misma forma, estímulos proinflamatorios pueden inducir en monocitos la liberación de IL-1 β , citoquina que presenta una gran capacidad de estimular angiogénesis (Naldini *et al.*, 2006). Puesto que algunas de estas funciones parecen estar reguladas en parte por TGF- β , podríamos pensar que las diferentes funciones ejercidas por monocitos quiescentes o monocitos activados y

diferenciados a macrófagos, podrían deberse, en parte, a la existencia de dos receptores tipo I de TGF- β alternativos.

Por tanto, visto que, aunque en menores niveles que en células endoteliales, tanto Endogлина como ALK1 se expresan en macrófagos, sería interesante determinar si estas células tienen algún papel relevante en la fisiopatología de la enfermedad. Podríamos pensar que si, tal como sucede en células endoteliales, la vía ALK1/Endogлина está implicada en la estimulación de genes que promueven migración y proliferación, estas capacidades estarían disminuidas en macrófagos, pudiendo dar lugar a una peor resolución de infecciones, hecho que explicaría en parte la alta incidencia de abscesos cerebrales que existe en pacientes de HHT.

La capacidad del TGF- β de inducir funciones opuestas en una misma célula, según el contexto fisiológico, parece no ser exclusivo de células endoteliales. Recientemente se ha visto que en células estrelladas del hígado, en estado quiescente, el TGF- β induce una inhibición del crecimiento mediada por Smad2, mientras que al activarse, se diferencian a miofibroblastos y comienzan a expresar Endogлина, momento en el cual cesa el efecto inhibitorio y el TGF- β induce una síntesis desmesurada de matriz extracelular, que conduce a una fibrosis hepática (Meurer et al., 2005). Igualmente, se ha descrito la presencia de ALK1 en células estrelladas, así como su señalización vía Smad1, conduciendo a la inducción de la expresión de genes como Id1 (Wiercinska et al., 2006). Podría, por tanto, especularse que el papel dual del TGF- β en células estrelladas se deba, al igual que ocurre en células endoteliales y quizá en macrófagos, a la presencia de dos vías de señalización alternativas, cuya actividad depende del estado de activación de la célula.

OBJETIVO 3. BÚSQUEDA DE UN MODELO CELULAR VÁLIDO PARA EL ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA.

3.1 Obtención de células endoteliales derivadas de sangre periférica

Las células endoteliales se consideran las dianas directas de la HHT, ya que los genes mutados, *endogлина* y *ALK1*, se expresan fundamentalmente en estas células y todas las manifestaciones descritas en pacientes de HHT se dan a nivel de la vasculatura. Para poder estudiar las alteraciones a nivel molecular que se presentan en las células de estos pacientes, y que dan lugar a la fisiopatología de la enfermedad, sería interesante disponer de un modelo endotelial que pudiera obtenerse directamente de estos pacientes. Las HUVECs, células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical, son lógicamente difíciles de conseguir de recién nacidos portadores de una mutación responsable de HHT. Además, estas células no suponen un buen modelo para un estudio molecular de la enfermedad, puesto que la sintomatología comienza a manifestarse en torno a la adolescencia y se va agravando con la edad. Debido a esto, es posible que las células endoteliales de recién nacidos con una mutación en *endogлина* o *ALK1*, no presenten aún alteraciones en sus funciones biológicas.

En el laboratorio, pusimos a punto el cultivo de células endoteliales obtenidas a partir de sangre periférica, tanto de pacientes de HHT, como de donantes sanos. Se calcula que existe una media de 2.6 células endoteliales circulantes por mililitro de sangre, número que se expande considerablemente *in vitro* si se cultivan en un medio muy rico para células endoteliales, hasta llegar a dar un cultivo primario puro (Lin et al., 2000). Las células de estos cultivos, denominadas BOECs (*Blood Outgrowth Endothelial Cells*; (Lin et al., 2002)) no expresan marcadores de precursores hematopoyéticos, como es CD133. Sin embargo, es difícil determinar si proceden de células endoteliales maduras desprendidas de forma natural del endotelio (CECs; *Circulating Endothelial Cells*), o bien, de

células progenitoras circulantes (EPCs; *Endothelial Precursor Cells*) que han madurado *in vitro*, perdiendo así los marcadores característicos de precursores. Por otro lado, está descrito que monocitos tratados con factores proangiogénicos pueden diferenciarse a células endoteliales, perdiendo los marcadores característicos de este linaje, como CD14 (Kuwana *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que el cultivo inicial, obtenido a partir de un gradiente de Ficoll, es muy rico en células mononucleares, y que el medio de cultivo lleva un gran número de factores proangiogénicos como VEGF, FGF, o PDGF, tampoco deberíamos descartar este posible origen.

Hasta hoy (noviembre de 2006), hemos mantenido en el laboratorio 22 cultivos de BOECs, entre controles y HHT. Morfológicamente hemos sido capaces de distinguir cuatro tipos de cultivos claramente diferenciables, sin descartar, que cuando el número de cultivos aumente, podamos encontrar una mayor variedad (Figura 22). Con el fin de poder estudiar las características de estas células, clasificamos los cultivos en cuatro tipos según nuestras observaciones:

- BOECs obtenidas de donantes sanos: presentaban una morfología similar a las HUVECs.
- BOECs HHT1. De mayor tamaño que las controles, más redondeadas y con un crecimiento considerablemente más lento.
- BOECs HHT2 con una mutación sin sentido o *nonsense* que da lugar a la aparición de un codón de parada (*STOP*) prematuro. Aunque también redondeadas y lentas en su crecimiento, eran más similares a las controles. Las denominamos HHT2n.
- BOECs HHT2 con una sustitución (mutación *missense*) en el dominio quinasa de ALK1. Células muy alargadas con un crecimiento muy rápido. Se expandían sin respetar la monocapa, comportándose, en este sentido, de forma similar a células tumorales. Las denominamos HHT2m.

Desde el cultivo inicial de células mononucleares hasta que obtenemos un pocillo confluyente de células endoteliales puras, se requiere en torno a un mes. En algunos casos, los cultivos se perdieron en el primer o segundo pase debido a que las células apenas se dividían y en algunos casos también adquirirían un aspecto senescente con múltiples núcleos y vacuolas (Figura 23). Estas características podrían ser indicativas de alteraciones a nivel del ciclo celular o bien a un proceso de muerte en el que entraban prematuramente estas células en cultivo.

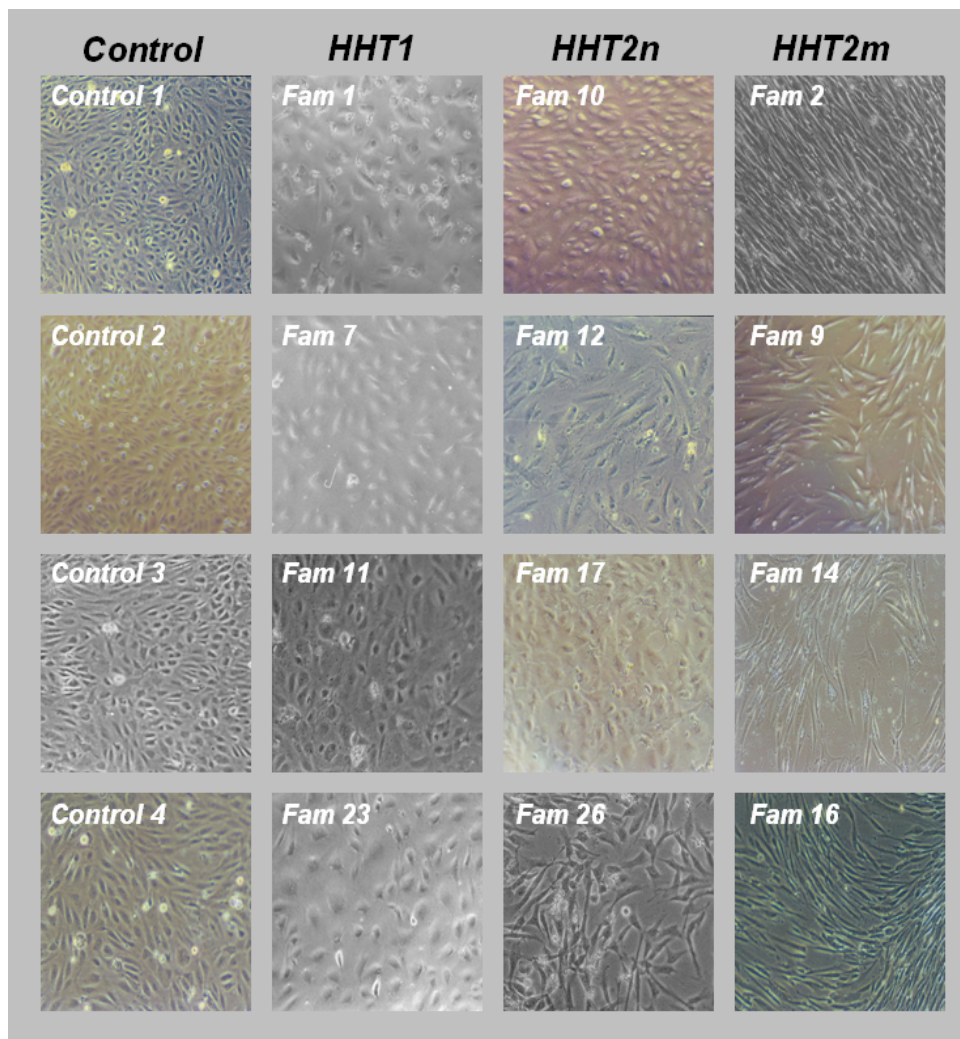


Figura 22. Fotografías de cultivos primarios de células endoteliales derivadas de sangre periférica (BOECs). Se muestran, por columnas, cultivos representativos de los cuatro tipos de BOECs descritos. La clasificación se hizo conforme a la observación morfológica y al comportamiento de los cultivos mantenidos en el laboratorio.

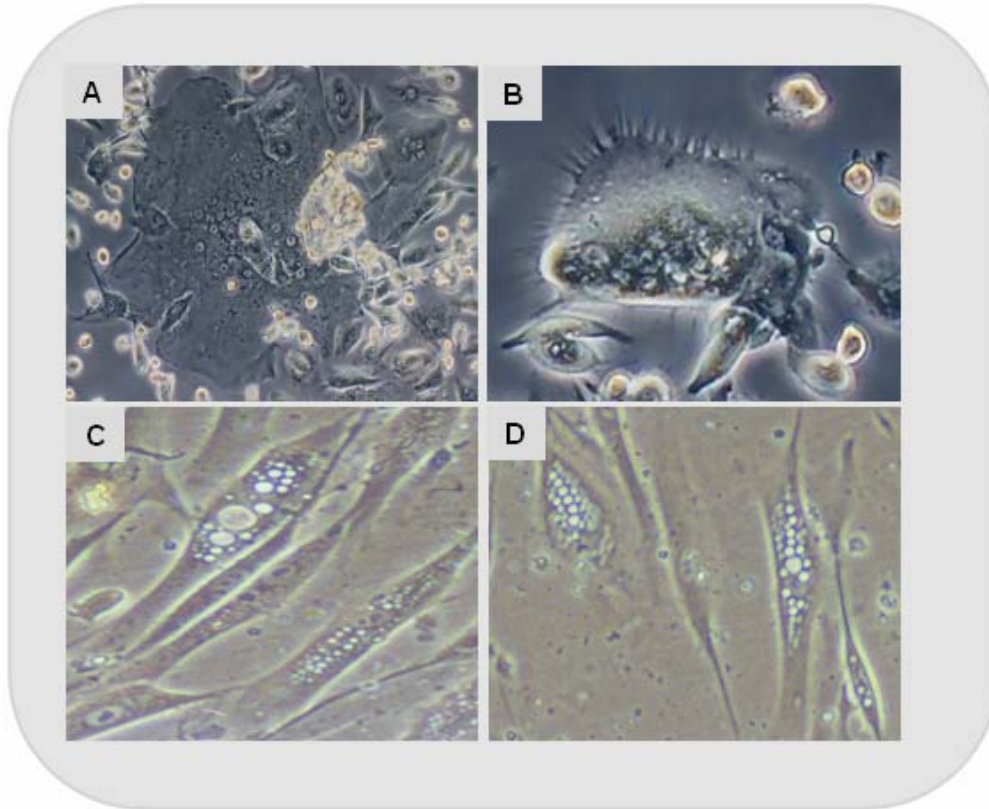


Figura 23. Fotografías de células con aspecto senescente. Se muestran fotografías representativas de un cultivo cuyas células adquirieron gran tamaño, un fenotipo senescente con múltiples núcleos y vacuolas y dejaron de dividirse. Las células se obtuvieron de las familias 10 (**A, B**) y 14 (**C, D**).

Se caracterizaron todos los cultivos empleando una batería de marcadores específicos de células endoteliales, VE-Cadherina (*Vascular Endothelial Cadherin 2*), PECAM-1 (*Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*), Factor von Willebrand, Endogлина, ALK1 y Flk1 (*Fetal Liver Kinase 1* o Receptor tipo II de VEGF) (Figuras 24 y 25). Como control negativo se emplearon fibroblastos primarios humanos, los cuales no se tiñeron con los anticuerpos específicos de marcadores de células endoteliales PECAM-1, Flt1 (*Fms-related tyrosine kinase 1* o Receptor tipo I de VEGF), VE-Cadherina y Flk1, pero sí con el anticuerpo 1B10, específico para el antígeno asociado a fibroblastos (FA; *Fibroblasts-Associated Antigen*). Todos los cultivos de BOECs resultaron negativos para CD14 y FA (datos no mostrados).

Al realizar las tinciones para inmunofluorescencia, nos llamó la atención el gran número de células bi- y trinucleadas, presentes fundamentalmente entre las HHT1 y HHT2n (en torno a un 25% de las células; Figura 26). Estos datos sugerían que en estas células procedentes de enfermos de HHT existían defectos en la regulación del ciclo celular y de la citocinesis.

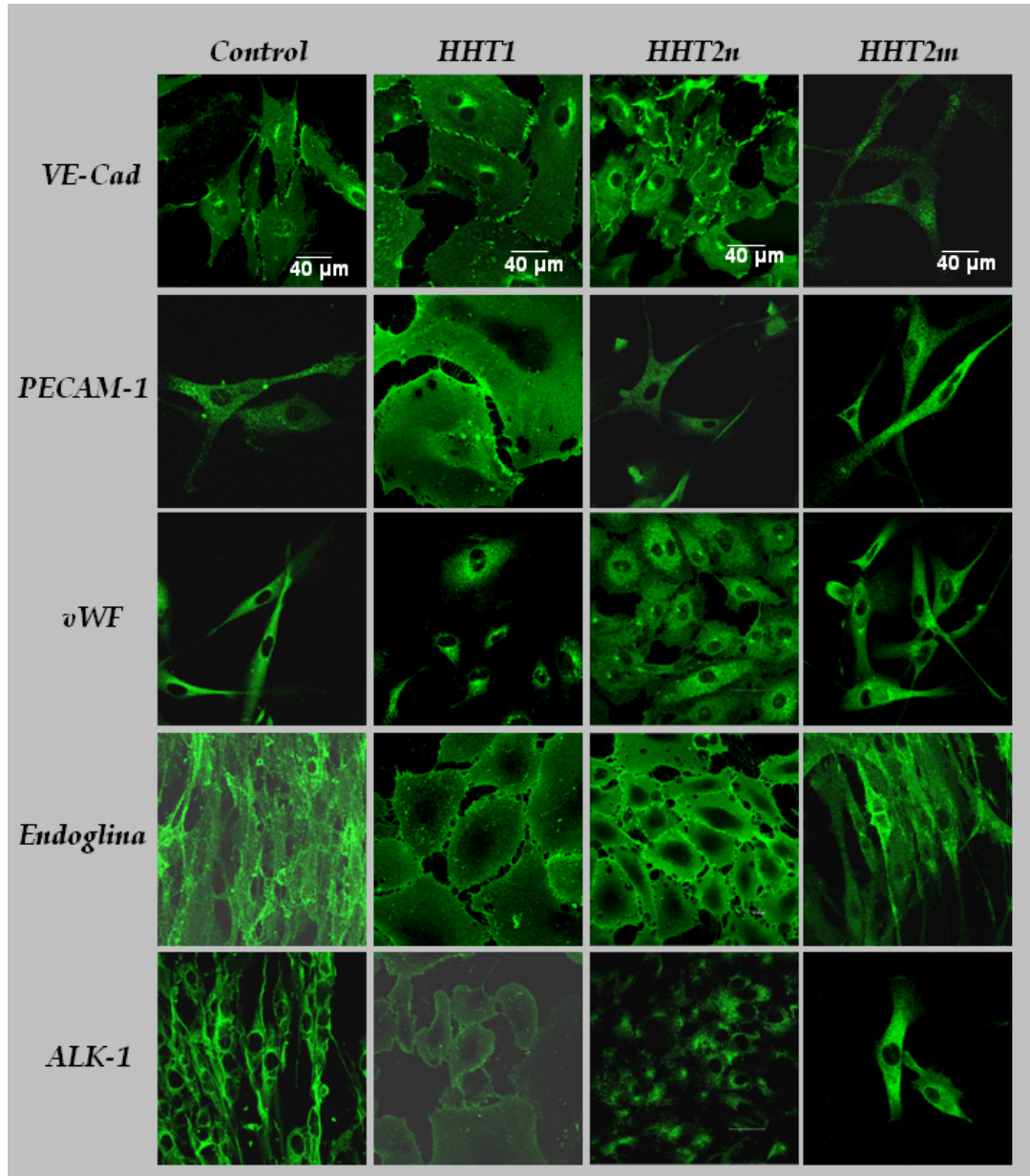


Figura 24. Caracterización por microscopía confocal de los cultivos endoteliales. Se muestran células de un cultivo representativo de cada uno de los cuatro tipos de BOECs descritos. Se emplearon los marcadores VE-Cadherina (VE-Cad), PECAM-1, Factor von Willebrand (vWF), Endoglin y ALK1. En todos los casos se muestran secciones transversales de las células.

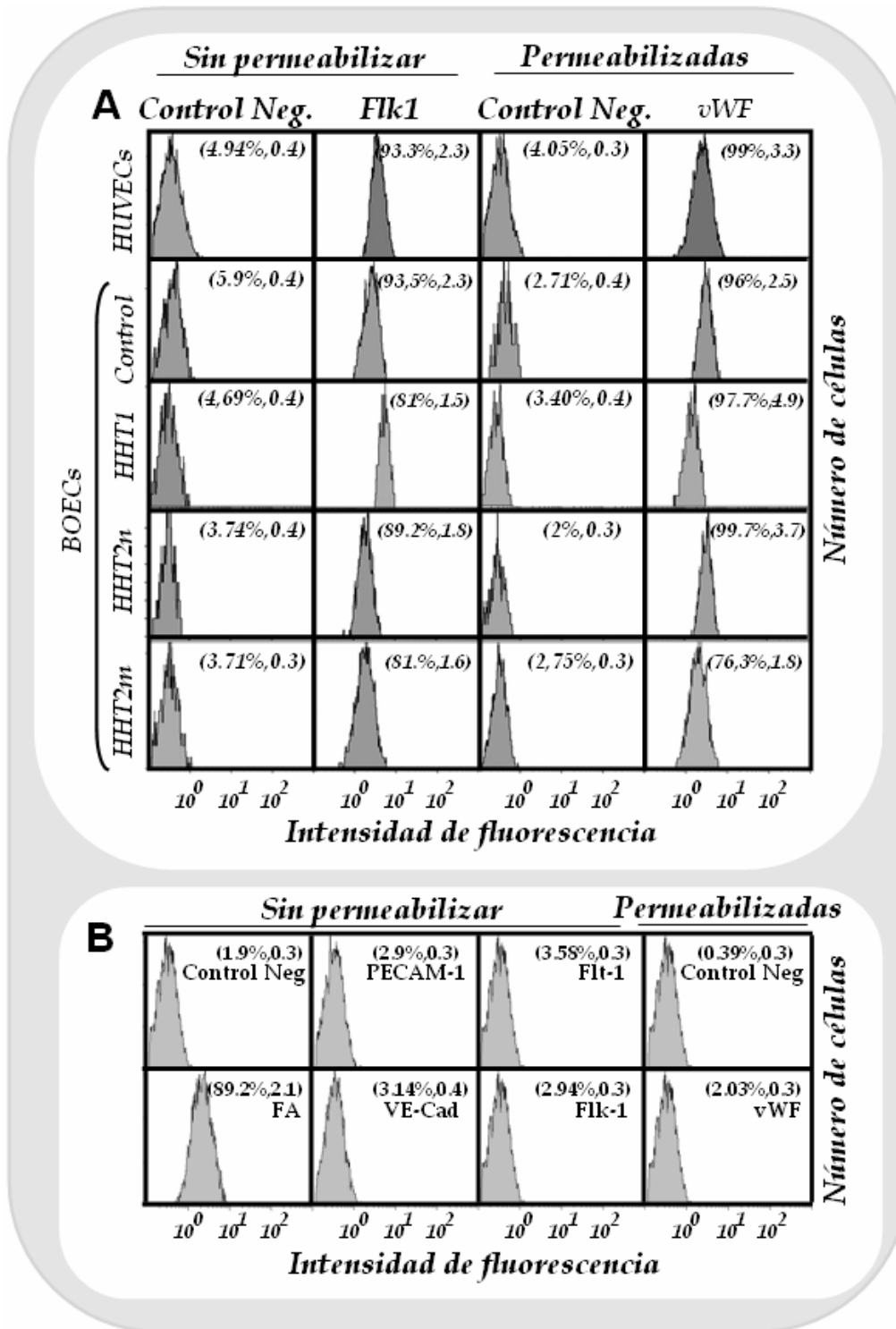


Figura 25. Caracterización por citometría de flujo de los cultivos endoteliales. **A.** Se emplearon células de un cultivo representativo de cada uno de los cuatro tipos de BOECs descritos, así como HUVECs como control positivo. Se muestran los marcadores Flk1 y vWF. **B.** Fibroblastos primarios humanos empleados como control negativo. Se muestran los marcadores PECAM-1, Flt1, VE-Cadherina, Flk1 y vWF (marcaje negativo) y FA, marcador específico de fibroblastos (marcaje positivo). En ambos casos se marcaron las células con un anticuerpo irrelevante para ajustar la intensidad de fluorescencia (Control Neg.).

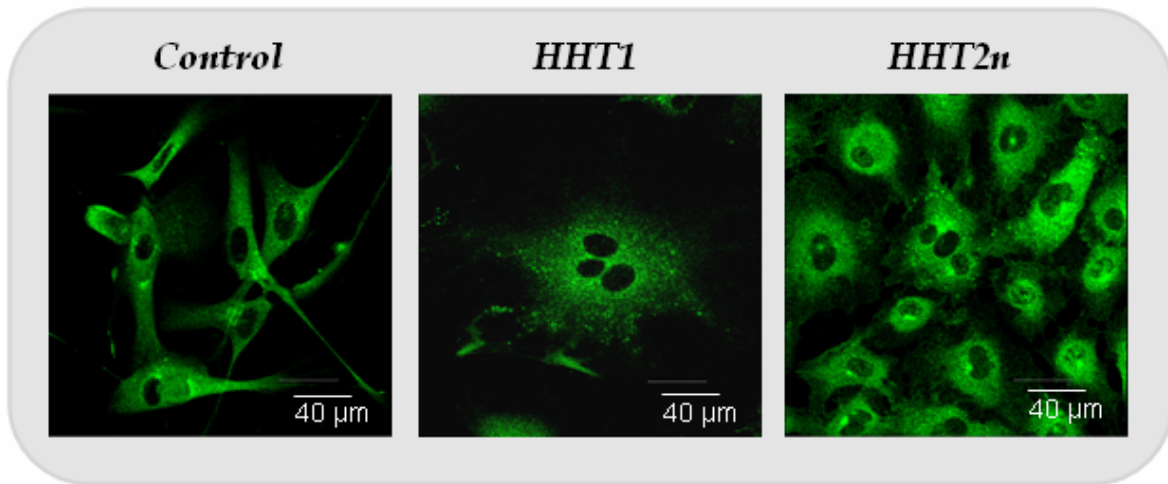


Figura 26. Presencia de células multinucleadas entre los cultivos de BOECs HHT. Se muestra una tinción para vWF donde se ven células multinucleadas en el caso de las BOECs procedentes de enfermos. Estas células se encontraron fundamentalmente en los cultivos HHT1 y HHT2n.

3.2 Expresión de Endoglina en BOECs

Habiendo visto que los niveles de expresión de Endoglina se encontraban disminuidos en macrófagos de pacientes, tanto HHT1 como HHT2, con respecto a los controles sanos, nos preguntamos si se daría una situación similar en las células endoteliales de estos pacientes. Así, medimos los niveles de Endoglina por citometría de flujo (Figura 27) y *Western Blot* (Figura 28) en BOECs de pacientes y de controles sanos.

En el caso de HHT1, encontramos que los niveles de Endoglina en membrana estaban en torno a un 50% con respecto al control, lo que cabía esperar de un individuo adulto con un único alelo funcional. Sin embargo, en los pacientes de HHT2 los niveles de Endoglina también eran menores que en el control y, curiosamente, los niveles más bajos se encontraban en las células portadoras de una mutación en el dominio quinasa de ALK1, estando, como promedio, en torno al 30% en relación al control. Se obtuvieron resultados similares en los análisis por citometría de flujo y *Western Blot*. Se muestran los resultados de una familia representativa de cada tipo de BOECs descrito (Figuras 27 y 28). El resultado fue similar en las familias analizadas dentro de cada grupo. Se empleó el marcador Flt1, en citometría de flujo, como un control positivo endotelial, comprobando

que su expresión no variaba entre los distintos tipos de células endoteliales (dato no mostrado).

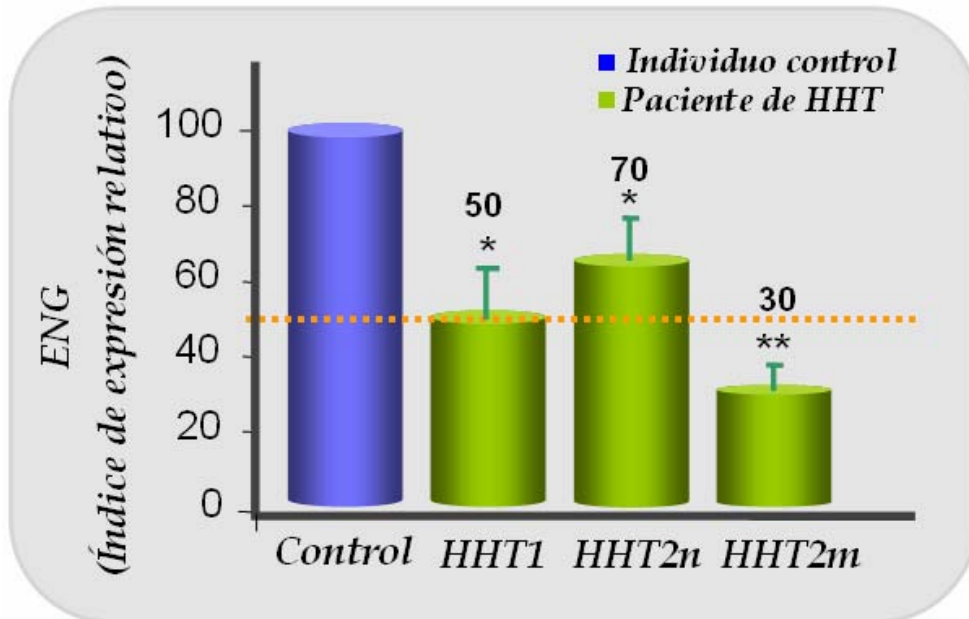


Figura 27. Niveles de expresión de Endogлина en BOECs control y HHT. Se muestra el índice de expresión de Endogлина relativo al control, obtenido mediante análisis por citometría de flujo. La línea naranja de puntos indica el 50% teórico esperado en el caso de pacientes HHT1.

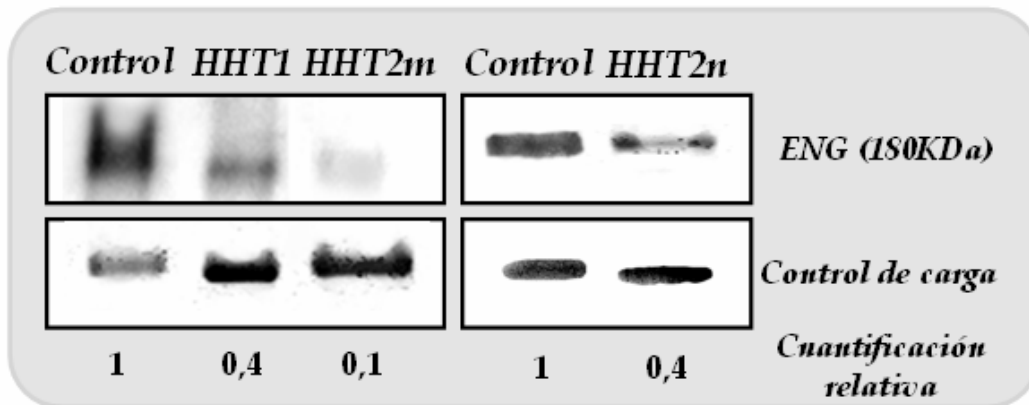


Figura 28. Expresión de Endogлина en BOECs. Se muestran Western Blots llevados a cabo en condiciones no reductoras, a partir de extractos proteicos totales de BOECs. Las bandas corresponden al homodímero de Endogлина. Se muestran Coomassie Blue (izquierda) y HLA Clase I (derecha) como controles de carga, respectivamente. En la parte inferior se indican los valores de la cuantificación relativa.

Quando analizamos la expresión de Endogлина en HUVECs procedentes de un recién nacido con una mutación en ALK1 (HHT2m), encontramos que los niveles estaban ligeramente reducidos en relación al

control (Figura 29), pero no tanto como en las BOECs procedentes de pacientes adultos de la misma familia, tal como cabría esperar debido a la falta de sintomatología en recién nacidos y al enmascaramiento de la haploinsuficiencia a edades tempranas, que ya habíamos visto al estudiar los macrófagos de pacientes.

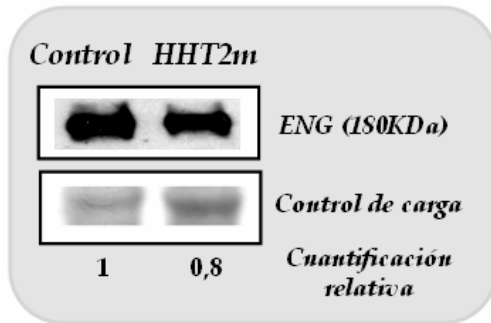
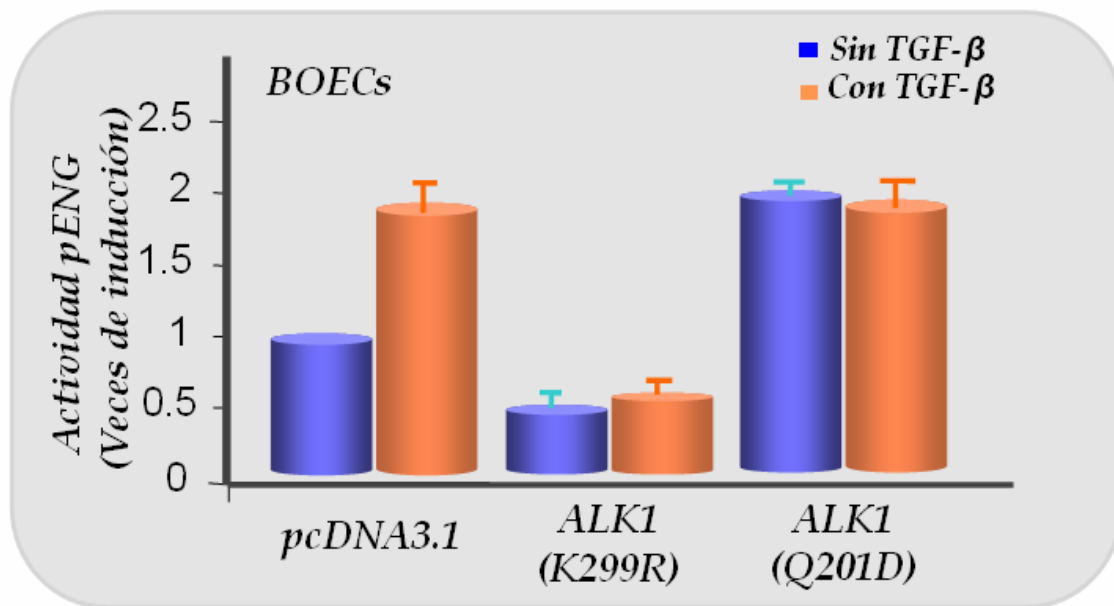


Figura 29. Expresión de Endoglina en HUVECs. Western Blot llevado a cabo a partir de extractos proteicos totales de HUVECs control y HHT2. Se muestran bandas teñidas con Rojo Ponceau como control de carga. En la parte inferior se indican los valores de la cuantificación relativa.

3.3 Efecto de ALK1 sobre el promotor de *endoglina*

A continuación, quisimos ver si la presencia de menores niveles de ALK1 funcional en pacientes HHT2 era la responsable de que Endoglina no se expresara con normalidad en las células de estos pacientes. Para ello, cotransfectamos BOECs obtenidas de un donante sano con un vector reportero que contiene la zona proximal del promotor de *endoglina* (pCD105 -450/+350 o pENG) y distintos vectores de expresión de ALK1. Empleamos un dominante negativo (K299R), que incluye una mutación en su dominio quinasa, así como un mutante constitutivamente activo (Q201D) (Figura 30).

Figura 30 (Página 113). Regulación de la actividad del promotor de endoglina por ALK1 (I). Se muestra la actividad del promotor de endoglina en veces de inducción con respecto al vector vacío sin tratar. Se transfectaron, de forma transitoria, BOECs obtenidas de un donante sano con una construcción que contiene la zona proximal del promotor de endoglina (pENG) y el gen reportero luciferasa, así como vectores de expresión para ALK1 dominante negativo (K299R) y constitutivamente activo (Q201D). Los vectores de expresión se generaron en pcDNA3.1. Se muestran los resultados en células tratadas y sin tratar con TGF- β (10ng/ml).



En células transfectadas con el vector vacío (pcDNA3.1) y tratadas con TGF- β , la actividad del promotor aumentó casi dos veces, hecho esperable pues se sabe que en células endoteliales el TGF- β estimula la expresión de Endogлина (Lastres et al., 1996; Rius et al., 1998). En células no endoteliales (HeLa, HepG2) se ha visto que la inducción del promotor de *endogлина* puede darse tanto por Smad3/Smad4 (Botella et al., 2001), como por Smad1/Smad4 (datos no publicados). Desconocemos, sin embargo, si esta respuesta se da, en células endoteliales, únicamente vía ALK1 o si implica tanto a ALK1 como ALK5.

Al transfectar las células endoteliales con el dominante negativo de ALK1 y tratar con TGF- β , la actividad del promotor de *endogлина* no aumentó, por lo que el dominante negativo está interfiriendo con los propios receptores de la célula. Sin embargo, cuando se expresó la forma constitutivamente activa de ALK1, la actividad del promotor aumentó considerablemente, incluso en ausencia de TGF- β (Figura 30). Estos resultados indicaban que la vía de ALK1 señala sobre el promotor de *endogлина*, estimulando su actividad. Podría ser que se necesite unos ciertos niveles de ALK1 funcional para estimular la actividad del promotor con normalidad, de forma que, en pacientes de HHT2, la falta de ALK1 condujera a una baja estimulación del promotor, y por tanto a una menor expresión de Endogлина.

Con el fin de excluir una posible interferencia con los receptores endógenos de la célula, repetimos el experimento en células HEK293T, que no expresan ALK1 (Figura 31). En estas células, el promotor de *endogлина* no aumenta su actividad en respuesta a TGF- β , en ausencia de ALK1, por lo que la estimulación del promotor debe darse a través de esta vía y no vía ALK5. Al transfectar la forma silvestre de ALK1 (*wt*; *wild type*), aumentó la actividad del promotor de forma similar a lo que sucedía en células endoteliales.

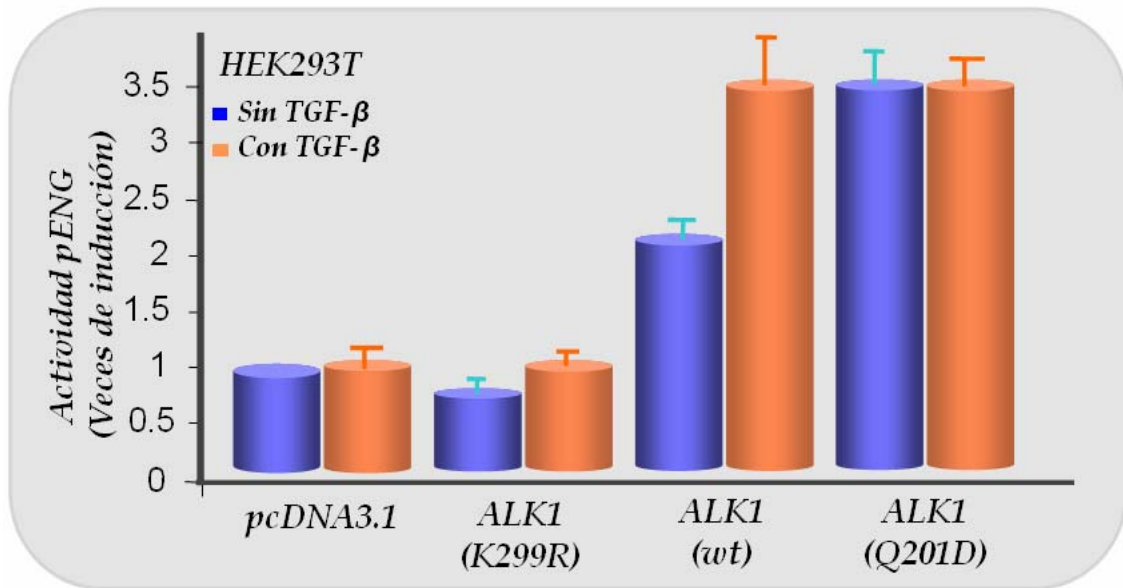


Figura 31. Regulación de la actividad del promotor de endogлина por ALK1 (II). Se muestra la actividad del promotor de endogлина en veces de inducción con respecto al vector vacío sin tratar. Se transfectaron, de forma transitoria, células HEK293T con la construcción que lleva el promotor de endogлина y los vectores de expresión ALK1 *wt*, K299R y Q201D. Se muestran los resultados en células tratadas y sin tratar con TGF- β (10ng/ml).

3.4 Expresión de ALK1 en BOECs

Dado que la expresión de Endogлина se encuentra disminuida, tanto en HHT1 como en HHT2, decidimos analizar los niveles de ALK1 en estas células. Estudiamos su expresión por citometría de flujo (Figura 32) y por *Western Blot* (Figura 33). Las diferencias encontradas en este caso, entre pacientes y controles, fueron menores que en el caso de Endogлина. Las células HHT2n presentaban unos niveles de expresión de ~50% en relación al control, como cabe esperar de una haploinsuficiencia. Sin embargo, las

células HHT2m presentaban una expresión de ALK1 mayor (~80%), lo que sugería que la proteína mutada podía estar expresándose en membrana. En el caso de las células HHT1 se observaba un descenso en la expresión, más marcado por *Western Blot* que por citometría de flujo, quizá atribuible a una contribución de los niveles de Endogлина sobre la transcripción de *ALK1*.

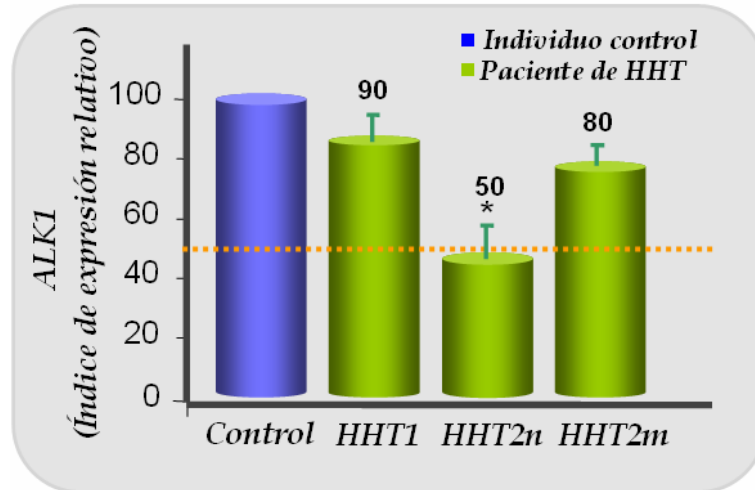


Figura 32. Niveles de expresión de ALK1 en BOECs control y HHT. Se muestra el índice de expresión de ALK1 relativo al control, obtenido mediante análisis por citometría de flujo. La línea naranja de puntos indica el 50% teórico esperado en el caso de pacientes HHT2.

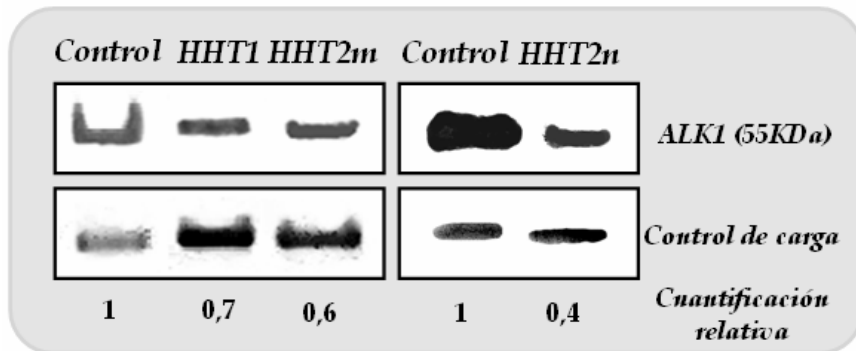


Figura 33. Expresión de ALK1 en BOECs. Se muestran Western Blots realizados, a partir de extractos proteicos totales de BOECs. Se empleó tinción con Coomassie Blue (izquierda) y detección de HLA Clase I (derecha) como controles de carga, respectivamente. En la parte inferior se indican los valores de la cuantificación relativa.

Al medir los niveles de ALK1 por *Western Blot* en extractos proteicos de HUVECs, obtenidas de un recién nacido sano y uno HHT, y cuantificar las bandas, no encontramos diferencias significativas (Figura 34), de nuevo probablemente debido a la compensación de la haploinsuficiencia que

parece darse en la expresión, tanto de Endogлина como de ALK1, a edades tempranas.

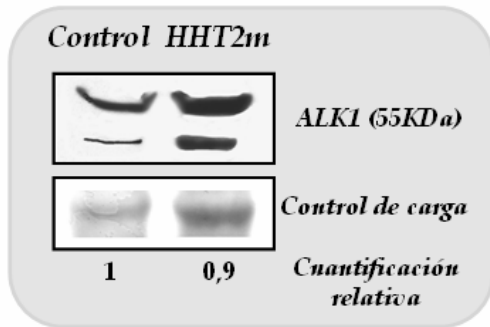


Figura 34. Expresión de ALK1 en HUVECs. Western Blot llevado a cabo a partir de extractos proteicos totales de HUVECs control y HHT2. Se muestran bandas teñidas con Rojo Ponceau como control de carga. En la parte inferior se indican los valores de la cuantificación relativa.

3.5 Efecto de Endogлина sobre el promotor de ALK1

De igual forma que vimos que ALK1 influye sobre los niveles de expresión de Endogлина, decidimos estudiar si la regulación a nivel transcripcional era recíproca. Para ello, transfectamos células HEK293T con un vector (pALK1) que contiene un fragmento proximal de 1.244pb del promotor de ALK1 (que está siendo caracterizado en nuestro laboratorio) y con vectores de expresión de Endogлина en su forma silvestre, de la porción extracelular (EC) o de la porción citoplásmica de la proteína (CT) (Figura 35).

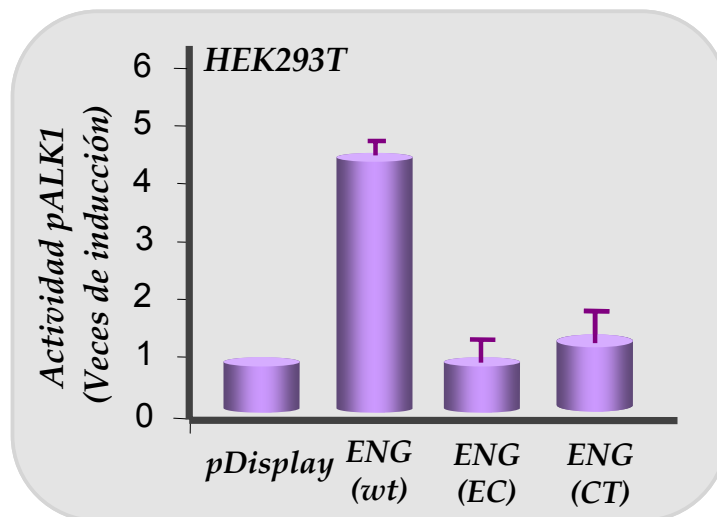


Figura 35. Regulación de la actividad del promotor de ALK1 por Endogлина. Se muestra la actividad del promotor de ALK1 en veces de inducción con respecto a la actividad basal transfectando el vector vacío (pDisplay). Se transfectaron células HEK293T con la construcción que lleva el promotor de ALK1 y los vectores de expresión ENG wt y las porciones extracelular (EC) y citoplásmica (CT) de Endogлина. Los vectores de expresión se generaron en pDisplay, vector que aporta una secuencia señal en fase con la proteína y que dirige su expresión a membrana.

Comprobamos que Endogлина, en su forma silvestre, era capaz de estimular la actividad del promotor de *ALK1*. Sin embargo, las porciones extracelular y citoplásmica de Endogлина no fueron capaces de estimular por sí solas la actividad del promotor, por lo que la proteína completa parece ser necesaria para que se produzca la señalización.

Existe, por tanto, una regulación mutua de Endogлина y *ALK1*, a nivel transcripcional, que puede explicar que la falta de uno, debida a una mutación, conlleve a una disminución en los niveles del otro, a causa de una estimulación más débil. Así, independientemente del gen portador de la mutación, la vía *ALK1/Endogлина* se encontrará alterada, lo que en parte explica que los pacientes de HHT1 y HHT2 presenten los mismos síntomas.

3.6 Análisis de las vías de señalización de TGF- β en BOECs HHT

En primer lugar, estudiamos la inducción de la expresión de Endogлина en respuesta al tratamiento con TGF- β , en BOECs HHT y controles. Tratamos las células con 10ng/ml de TGF- β , y medimos en cada caso, por citometría de flujo, la expresión de Endogлина en membrana, antes y después del tratamiento (Figura 36).

Se dio el valor 1 a la expresión de la proteína en cada tipo de BOECs, en ausencia de TGF- β . De esta forma, vimos que mientras que en las BOECs obtenidas de individuos sanos la expresión de Endogлина aumentaban dos veces y media después del tratamiento, las HHT1 y las HHT2n presentaban una menor respuesta al TGF- β , aumentando la expresión de Endogлина únicamente una vez y media. Por el contrario, las células HHT2m no respondían al tratamiento.

Puesto que parece existir una alteración de la vía de señalización *ALK1/Endogлина* en pacientes tanto HHT1 como HHT2, y dado que las células de pacientes no son capaces de responder adecuadamente al tratamiento de TGF- β estimulando la expresión de Endogлина, parece que

esta inducción se da, al menos en parte, vía ALK1, como un mecanismo de retroalimentación positiva.

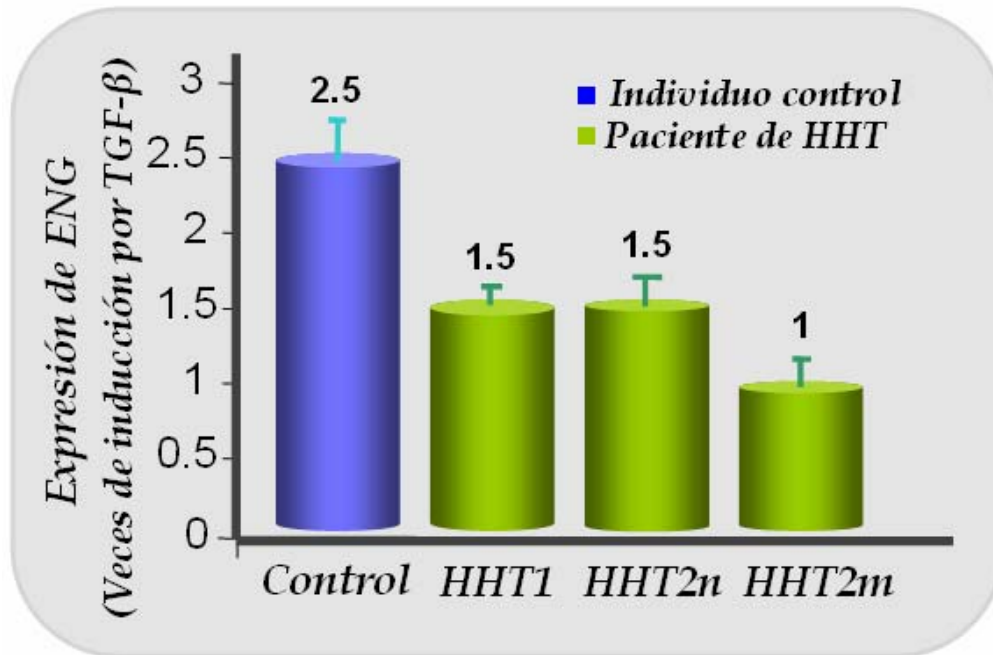


Figura 36. Expresión de Endogлина en BOECs tras tratamiento con TGF-β. Se muestra la expresión de Endogлина en veces de inducción por TGF-β. En cada caso la inducción se consideró relativa a los niveles de expresión en las células sin tratar.

Hemos demostrado que el promotor de *endogлина* puede ser estimulado a través de la vía de ALK1 (Figuras 30, 31). Sin embargo, dado que en células no endoteliales (HeLa, HepG2) el promotor de *endogлина* es capaz de responder a Smad2 y Smad3 (Botella et al., 2001), sería interesante estudiar el efecto de la vía de ALK5 sobre este promotor en células endoteliales, y así llegar a entender, con más detalle, como funciona el balance de las dos rutas.

A continuación, quisimos analizar el funcionamiento de las vías de señalización de TGF-β, ALK5 y ALK1/Endogлина, en las células endoteliales de los pacientes. Para ello, empleamos los reporteros CAGA-luc y BRE-luc para monitorizar el funcionamiento de ALK5 y ALK1, respectivamente. Transfectamos los cuatro tipos de BOECs descritos con los reporteros y tratamos las células con 1ng/ml durante 3h (para el caso de BRE-luc) o 10ng/ml durante 24 horas (para el caso de CAGA-luc).

Se eligieron estas dosis y tiempos de tratamiento ya que fue descrito por el grupo de ten Dijke que la fosforilación de Smad5 por ALK1 es máxima a dosis bajas y a tiempos cortos, mientras que la cuando la dosis de TGF- β aumenta y la exposición es más prolongada, disminuye su fosforilación. Sin embargo, en el caso de Smad2, la fosforilación por ALK5 se mantiene estable a dosis altas y tras 24 horas de tratamiento (Goumans et al., 2002).

Recientemente ha sido publicado, por el mismo grupo, que esta rápida disminución de la fosforilación de Smad5, se debe a una inducción de la Smad inhibitoria Smad7, por parte de ALK1, la cual inhibe de forma específica esta vía, a través del reclutamiento de la fosfatasa PP1 α (*Protein Phosphatase 1 α*) que desfosforila e inactiva ALK1 (Valdimarsdottir et al., 2006). Así, se establece un mecanismo de retroalimentación negativo, que permite la inactivación de esta vía y la prevalencia de la vía de ALK5. Este mecanismo es fundamental en angiogénesis, ya que permite que, en presencia de TGF- β , la célula endotelial pueda, en primer lugar, desorganizar la membrana basal, migrar y proliferar (fenómenos biológicos inducidos por la vía de ALK1) y a continuación, gracias a la inactivación de esta vía, que las células dejen de proliferar, se sintetice matriz extracelular y se establezca el vaso mediante el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso vascular (funciones inducidas vía ALK5), favoreciendo así el paso de la fase de activación a la fase de resolución de la angiogénesis.

En todas las células de los pacientes, tras el tratamiento con TGF- β a la dosis correspondiente, encontramos una actividad del reportero BRE-luc claramente menor que en las células control (Figura 37), como cabía esperar, puesto que hemos demostrado que estas células tienen la vía ALK1/Endogлина alterada. Las células HHT2m son, de nuevo, las que presentan un mayor defecto en la señalización.

Sin embargo, encontramos que no sólo la vía de ALK1 presenta una actividad menor en las BOECs HHT, sino también la vía de ALK5, ya que la actividad del reportero CAGA-luc disminuía considerablemente en estas células. Parece, por tanto, que existe una regulación recíproca entre ambas vías de forma que al estar una alterada, repercute en la otra.

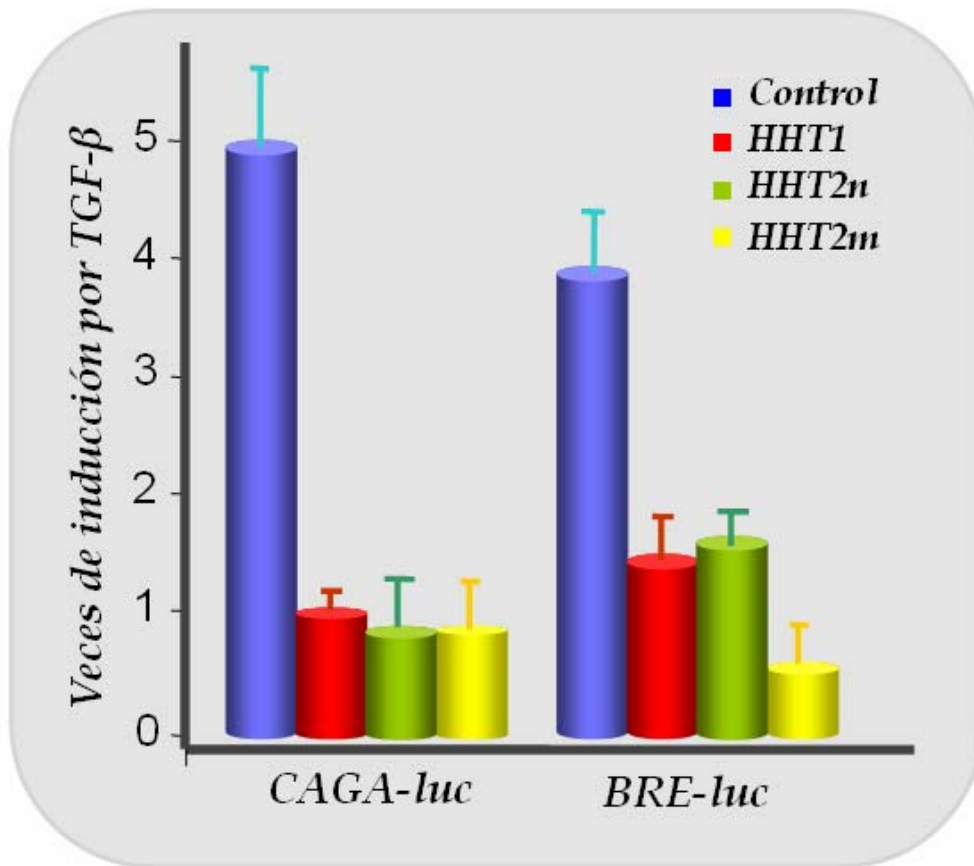


Figura 37. Estudio de las vías de señalización de TGF- β en BOECs control y HHT (I). Se muestra la actividad de los reporteros de las vías de ALK5 (CAGA-luc) y ALK1 (BRE-luc), tras tratamiento con 10ng/ml de TGF- β (24h) o 1ng/ml (3h), respectivamente. Se muestran los valores en veces de inducción relativos a la actividad de luciferasa en las células sin tratar, en cada caso.

De la misma forma, transfectamos las células con los reporteros Gal4Smad1, Gal4Smad2 y Gal4Smad3, con el fin de estudiar el estado de las vías ALK5 y ALK1, en base a la fosforilación de las proteínas Smads. Se trataron, igualmente, con una dosis baja de TGF- β para estudiar la fosforilación de Smad1 y una dosis alta para estudiar la de Smad2 y Smad3 (Figura 38). Los resultados obtenidos corroboraron lo que habíamos observado con los reporteros CAGA-luc y BRE-luc, que tanto la vía de ALK5 como la de ALK1 presentan una señalización disminuída en las células endoteliales de pacientes HHT.

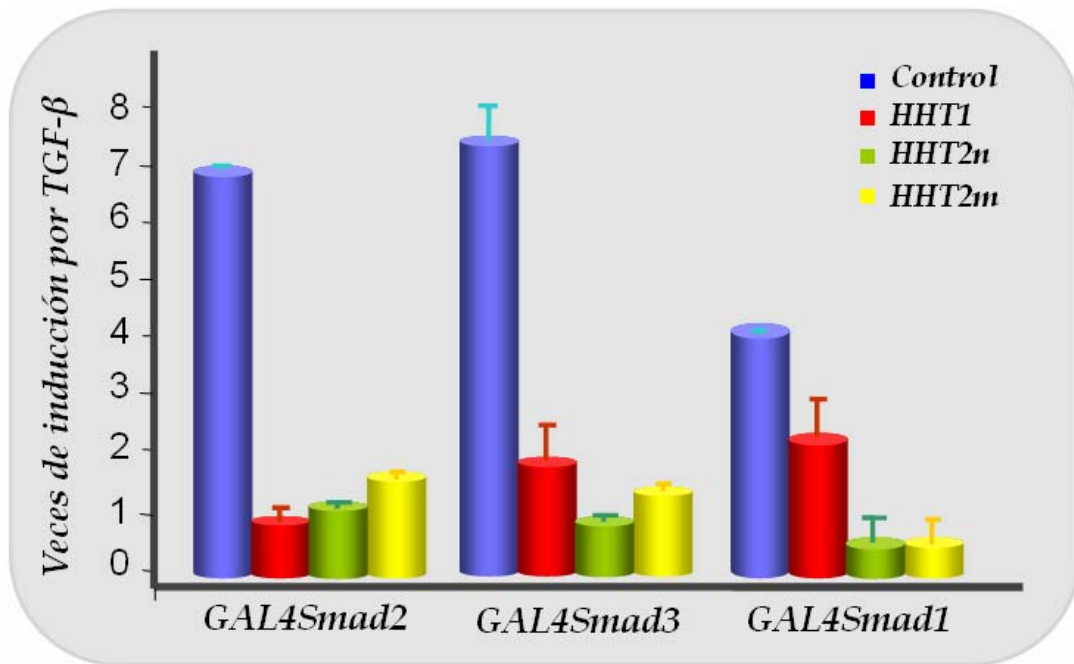


Figura 38. Estudio de las vías de señalización de TGF- β en BOECs control y HHT (II). Se muestra la actividad de los reporteros de las vías de ALK5 (Gal4Smad2, Gal4Smad3) y ALK1 (Gal4Smad1), tras tratamiento con 10ng/ml de TGF- β (24h) o 1ng/ml (3h), respectivamente. Se muestran los valores en veces de inducción relativos a la actividad de luciferasa en las células sin tratar, en cada caso.

Dado que los niveles de activación de los reporteros de la ruta de ALK5 se encontraban disminuidos en las células endoteliales de los pacientes, con respecto a los controles, nos planteamos si este efecto podría atribuirse a unos menores niveles de expresión de los receptores. Así, partiendo de ARN mensajero de los distintos tipos de BOECs, hicimos una RT-PCR semicuantitativa para ALK5 y T β RII (Figura 39).

Tomamos muestras a 20, 25 y 30 ciclos y normalizamos los valores empleando como control endógeno GAPDH. A continuación, cuantificamos los niveles de ALK5 y T β RII en las BOECs HHT en relación a los niveles presentes en el control. Mientras que en el caso del receptor tipo II, los niveles no variaban de forma significativa en los distintos tipos de células, la expresión de ALK5 se encontraba claramente disminuida en todas las células HHT, respecto a los controles. Por tanto, la deficiente señalización se debe a un efecto específico sobre ALK5 y no a un descenso general en la expresión de los componentes de las rutas de TGF- β .

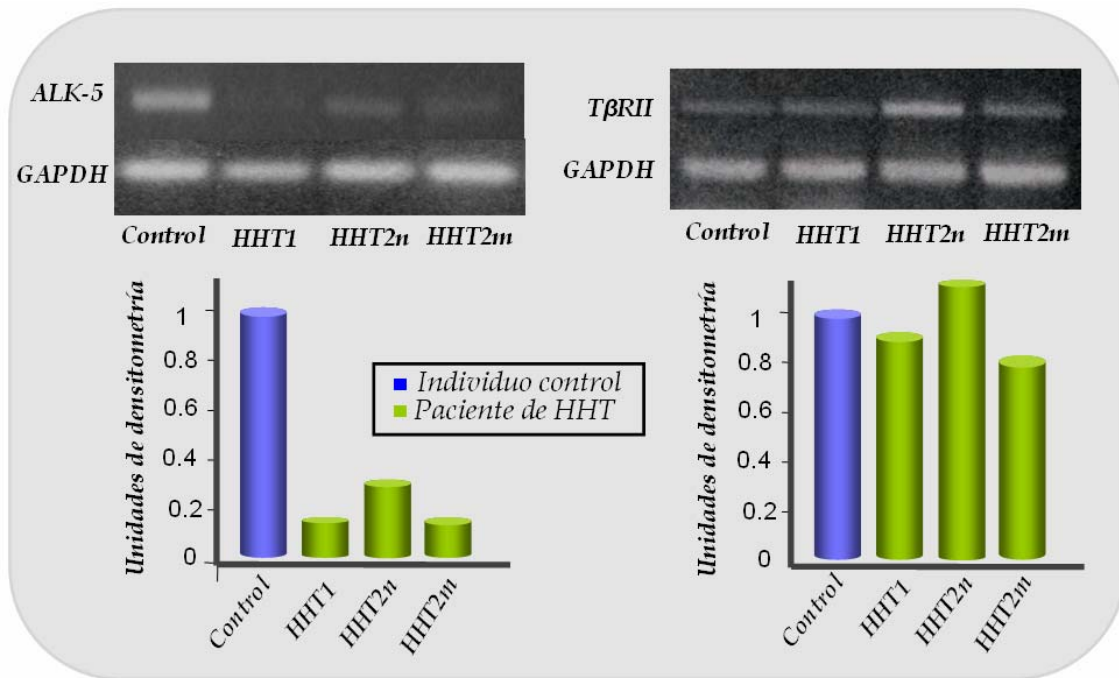
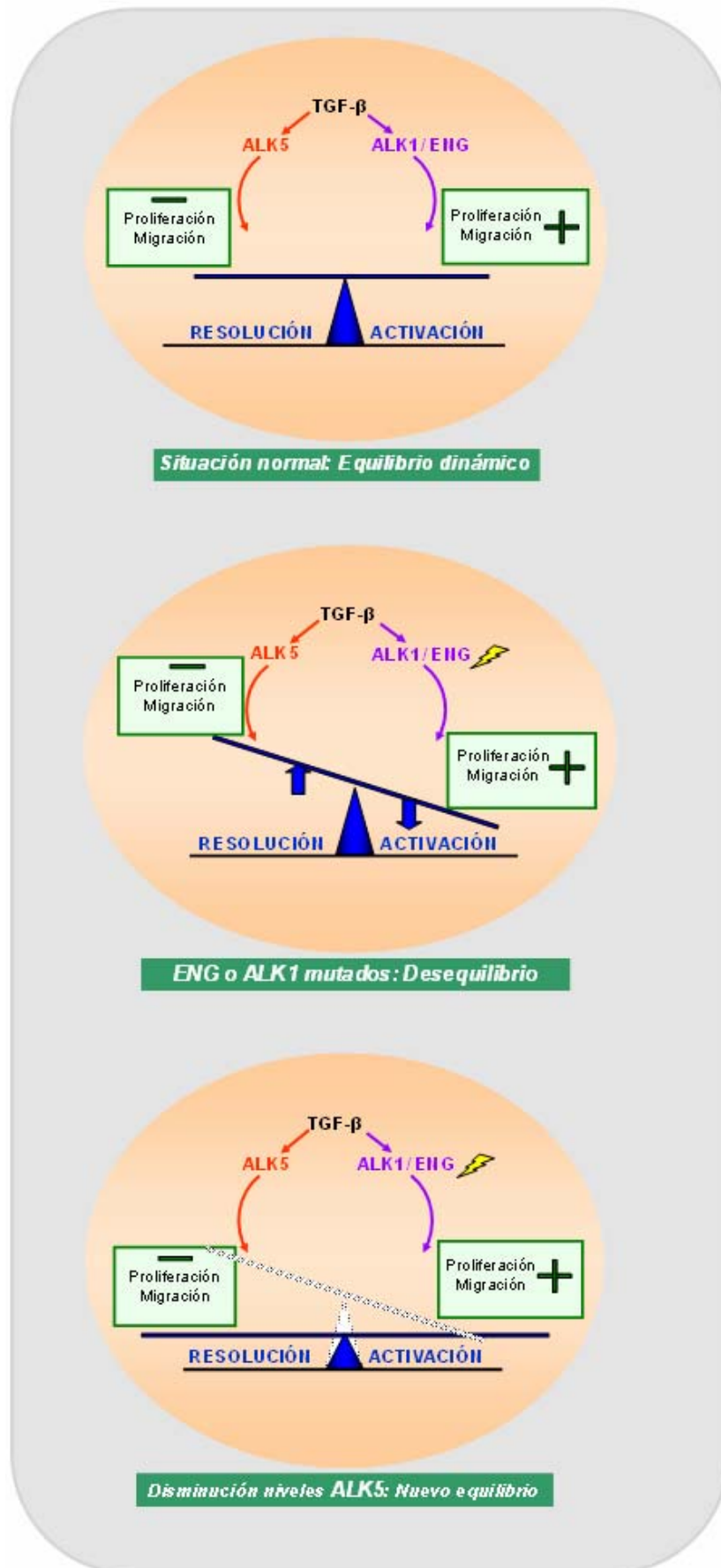


Figura 39. Niveles de expresión en BOECs de ALK5 y TβRII. RT-PCR semicuantitativa para ALK5 y TβRII, empleando GAPDH como control endógeno y tomando muestras a los 20, 25 y 30 ciclos. Se muestra gel y cuantificación a 25 ciclos.

Dado que la vía de ALK5 conduce, en células endoteliales, a una inhibición de la proliferación, si se encontrara disminuida la señalización vía ALK1/ENG y, como consecuencia, la vía de ALK5 predominara, las células frenarían su crecimiento o dejarían de dividirse. Sin embargo, se ha descrito que en células endoteliales embrionarias (MEECs; *Mouse Embryonic Endothelial Cells*) procedentes de ratones heterocigotos para *endogлина* ($eng^{+/-}$), los niveles de ALK5 se encuentran disminuidos con respecto a los de los ratones silvestres ($eng^{+/+}$), sin encontrarse diferencias en la tasa de proliferación de ambos tipos de células (Lebrin et al., 2004). Estos datos encajan con nuestros resultados obtenidos en células de pacientes tanto HHT1 como HHT2.

Figura 40 (Página 123). Modelo de equilibrio entre las vías de ALK5 y ALK1 en células endoteliales. En una célula sana existe un equilibrio dinámico entre las vías de señalización de TGF-β. En células con una disminución en la señalización vía ALK1/Endogлина, disminuyen a su vez los niveles de ALK5, estableciéndose un nuevo equilibrio con menores niveles de receptores.



Proponemos, por tanto, que en una situación normal existe un equilibrio dinámico entre las vías de ALK5 y ALK1 que permite que predomine una u otra en función de los requerimientos de la célula. Así, ante un estímulo angiogénico aumentará la expresión de Endogлина y se favorecerá la vía de ALK1, dando lugar a la fase de activación de la angiogénesis. Esta vía será inhibida en un corto periodo de tiempo y se favorecerá el predominio de la vía de ALK5, con la consiguiente estabilización del vaso.

En células deficientes en Endogлина y ALK1, existiría un desequilibrio en favor de la vía de ALK5 que daría lugar a que las células frenaran su crecimiento o dejaran de dividirse. Sin embargo, parece que existe un equilibrio adaptativo que permite a las células disminuir sus niveles de ALK5 y alcanzar un nuevo equilibrio, aunque con menores niveles de receptores de ambas rutas. Así, las células continuarán dividiéndose, a pesar de las alteraciones que el descenso en la señalización de ambas vías de TGF- β pueda conllevar (Figura 40).

3.7 Efecto de Endogлина y ALK1 sobre el promotor de *ALK5*

Para comprender la base del equilibrio adaptativo entre ambas rutas, nos planteamos si existiría una regulación de la expresión de ALK5, a nivel transcripcional, a través de la vía de ALK1/Endogлина. Para averiguarlo, cotransfectamos tanto BOECs como células HEK293T, con un vector reportero que contiene la parte proximal del promotor de *ALK5* y el gen de la Luciferasa, así como distintos vectores de expresión para Endogлина y ALK1: las formas silvestres de ambos y los mutantes constitutivamente activo y dominante negativo de ALK1. Medimos la actividad del promotor en las células tratadas y sin tratar con TGF- β (Figura 41).

Comprobamos, que tanto las formas silvestres de ambas proteínas como la forma constitutivamente activa de ALK1 eran capaces de estimular la transcripción de *ALK5*, mientras que el dominante negativo no inducía actividad del promotor. Por tanto, la falta de Endogлина y ALK1 en estas

células parece conducir a una falta de estimulación del promotor de *ALK5* y a una menor expresión de la proteína.

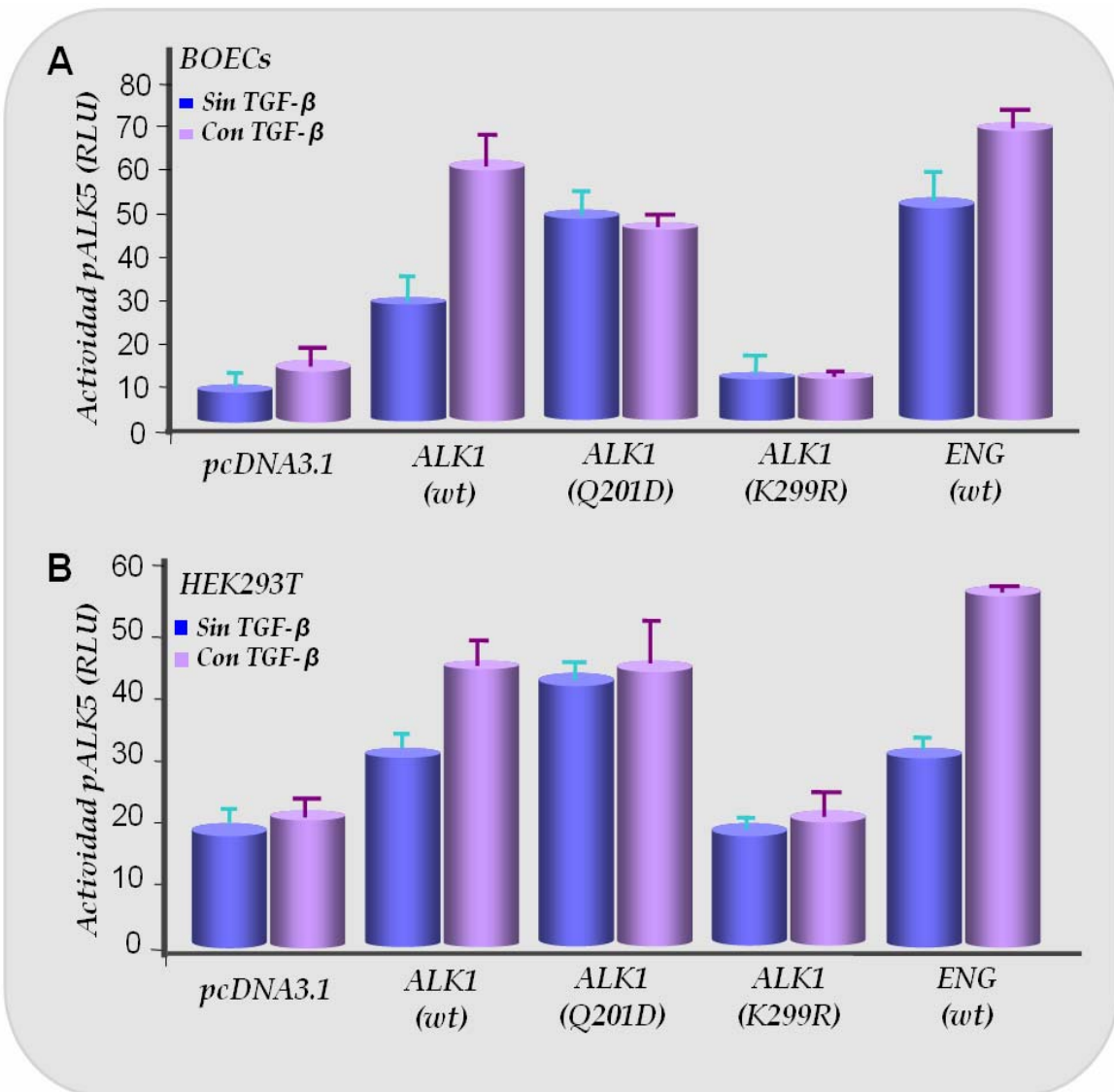


Figura 41. Regulación de la actividad del promotor de *ALK5* por *Endogлина* y *ALK1*. Se muestra la actividad del promotor de *ALK5* en unidades relativas de luciferasa (RLU). Se transfectaron BOECs (A) y células HEK293T (B) con la construcción que lleva el promotor de *ALK5* (p*ALK5*) y los vectores de expresión *ENG* wt, *ALK1* wt, *ALK1* QD y *ALK1* KR. Se midió la actividad del promotor en ausencia o presencia de TGF-β (10ng/ml).

3.8 Efecto de Endoglina sobre el promotor de *TGF-β1*

Letarte y colaboradores (Letarte et al., 2005), mostraron que los niveles circulantes de TGF-β1 se encuentran disminuidos en los pacientes de HHT1, así como en los ratones heterocigotos *eng*^{+/-} de la cepa 129/Ola, y postulan que ésta podría ser la razón por la cual únicamente los ratones heterocigotos de esta cepa manifiestan síntomas de HHT. Visto que existe una regulación, a nivel transcripcional, entre distintos componentes implicados en la señalización de TGF-β, nos planteamos si la falta de Endoglina en estos pacientes podría ser responsable de la disminución en los niveles de TGFβ1.

126

Transfectamos células HEK293T con un vector reportero que lleva el promotor de TGF-β1 y un vector de expresión de Endoglina. Así, se pudo demostrar que Endoglina es capaz de estimular la transcripción del promotor. Por tanto, existe una regulación mutua entre Endoglina y TGF-β por la cuál cada proteína es capaz de estimular el promotor de la otra (Figuras 42 y 43).

Teniendo en cuenta que tanto las células HHT1 como HHT2, presentan niveles reducidos de Endoglina, es fácil pensar que los niveles de TGF-β1 también se encuentren reducidos en estos pacientes, hecho que podría suponer un factor común a ambos tipos de enfermos y explicar la igualdad de los síntomas clínicos. Parece, por tanto, que existe una alteración global en la señalización de TGF-β que puede conducir a una regulación inadecuada de los genes dianas regulados por estas vías.

Figura 42 (Página 127). Regulación de la actividad del promotor de TGF-β1 por Endoglina. Se muestra la actividad del promotor de TGF-β1 en unidades relativas de luciferasa. Se transfectaron células HEK293T con la construcción que lleva el promotor de TGF-β1 (*p TGF-β1*) y un vector de expresión de *ENG*. Se midió la actividad del promotor en ausencia o presencia de TGF-β (10ng/ml).

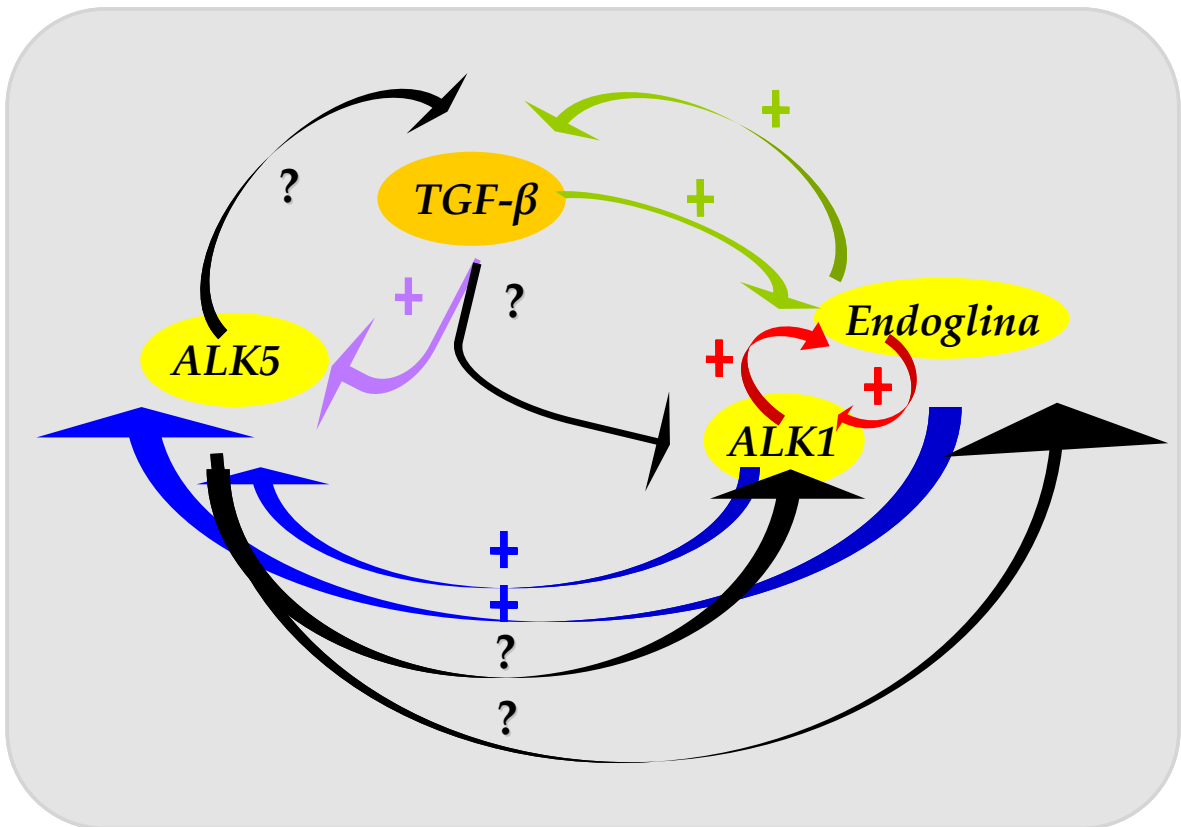
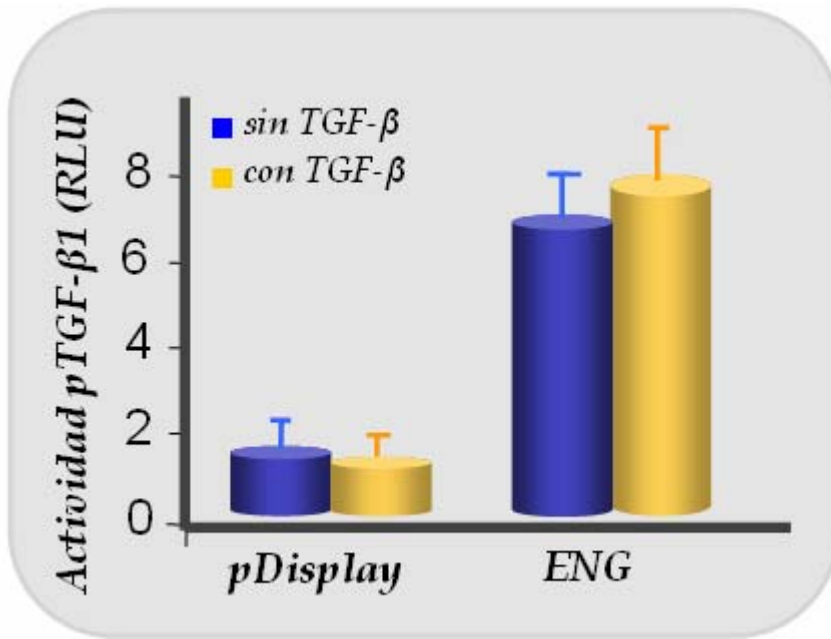


Figura 43. Esquema de las interacciones a nivel transcripcional entre distintos componentes de las vías de señalización del TGF-β en células endoteliales. Se muestra la regulación entre distintos componentes de las vías de señalización de TGF-β. Las flecha negras indican posibles interacciones que no han sido estudiadas hasta la fecha.

3.9 Mutagénesis dirigida *in vitro*

El cultivo de BOECs de pacientes de HHT sugería, debido a las diferencias en morfología y en su tasa de proliferación, que no todas las mutaciones se comportarían exactamente de la misma forma, contrariamente a la idea hasta ahora aceptada de que es una haploinsuficiencia el mecanismo responsable de la enfermedad, independientemente del tipo de mutación. Son muchos los trabajos que afirman que las mutaciones causantes de la HHT se comportan como alelos nulos, sin llegar a expresarse en la membrana, debido a inestabilidad del mensajero o de la propia proteína mutada (Berg et al., 1997; Gallione et al., 1998; Johnson et al., 1996; McAllister et al., 1994; Pece et al., 1997; Shovlin et al., 1997).

Únicamente un artículo sugería la existencia de mutaciones que pueden expresarse en la membrana. Lux y colaboradores (Lux et al., 2000) estudiaron seis mutaciones de cambio de base en Endogлина, encontrando que todas ellas podían expresarse en la membrana, aunque únicamente en forma de heterodímeros con la proteína silvestre. Por otro lado, estudiando mutaciones que dan lugar a una proteína truncada, demostraron que algunas de ellas podían actuar como un dominante negativo intracelular, secuestrando proteína silvestre dentro de la célula.

Este trabajo proponía, por tanto, modelos alternativos a la haploinsuficiencia, que sigue siendo aceptada como el mecanismo responsable de la patología en HHT. De la misma forma, y dado que la expresión de ALK1 en algunas células HHT (en aquéllas que presentaban una mutación de cambio de base en el dominio quinasa) era mayor de lo esperado en caso de una haploinsuficiencia (Figuras 32 y 33), decidimos estudiar si estas proteínas mutadas podían alcanzar la membrana.

Para ello, hicimos mutagénesis dirigida *in vitro* con cuatro mutaciones distintas, R374W (familia 2; exón 8), M376T (familia 16; exón 8), A377T (familia 13; exón 8) y H297R (familia 14; exón 7), a partir del vector pCDNA3.1 en el cual estaba clonado el ALK1 silvestre. Las cuatro

mutaciones escogidas fueron tomadas de familias cuyas células tuvimos en cultivo en el laboratorio. Mientras que las células endoteliales portadoras de las mutaciones R374W y M376T se comportaban claramente como HHT2m, presentando una morfología alargada y un crecimiento muy rápido, las células que presentaban la mutación A377T, tenían una morfología redondeada, más similar a las HHT2n. Las células de la familia 14, con la mutación H297R, a pesar de su apariencia HHT2m adquirieron un fenotipo senescente en pase 2 presentando múltiples vacuolas y prolongaciones, y dejaron de proliferar.

Transfectamos células HEK293T (debido a que no expresan ALK1 endógeno) con los vectores de expresión de los mutantes y medimos su expresión, tanto por citometría de flujo como por *Western Blot* (Figura 44). Los cuatro mutantes, todos ellos sustituciones de una base por otra en el dominio quinasa de ALK1, se expresaban en membrana, contrariamente a la idea generalmente aceptada de que las mutaciones causantes de HHT daban lugar a falta de proteína, por inestabilidad del mensajero o de la propia proteína mutante.

A continuación, quisimos estudiar la funcionalidad de la señalización mediada por estas proteínas mutadas. También, nos preguntamos si diferencias en la señalización de TGF- β podrían explicar el distinto comportamiento de las células HHT2m.

A tal fin, hicimos de nuevo transfecciones transitorias con los vectores portadores de estas mutaciones en células HEK293T y empleamos los reporteros BRE-luc y Gal4Smad1 para analizar el funcionamiento de la vía de señalización de ALK1. Cotransfectamos en cada caso dos dosis de ALK1 silvestre, dos dosis del mutante o una de cada, con el fin de simular las situaciones de homocigosis y heterocigosis. Las células se trataron con 1ng/ml de TGF- β tres horas antes de la medida de actividad luciferasa, dosis a la cuál es máxima la fosforilación de las Smads dependientes de ALK1. Los resultados obtenidos con ambos reporteros fueron consistentes (Figura 45).

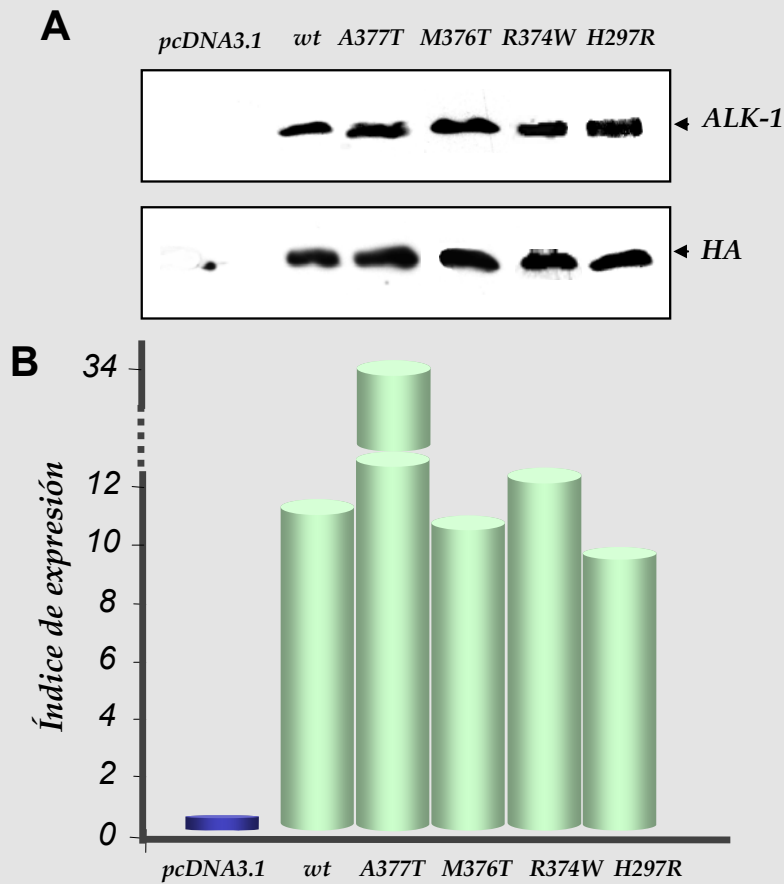
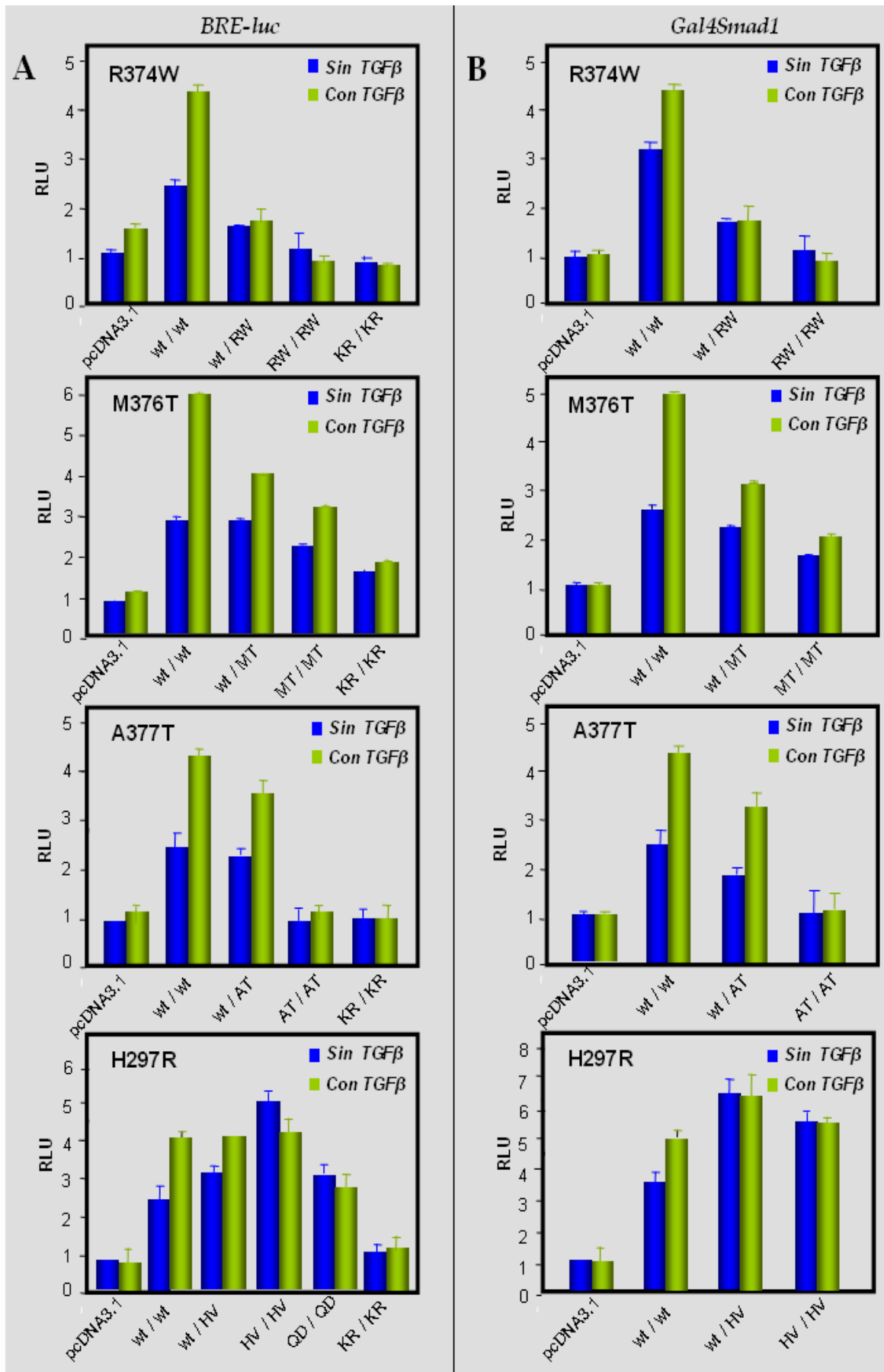


Figura 44. Análisis de la expresión in vitro de mutantes del dominio quinasa de ALK1. **A.** Western Blots de células HEK293T transfectadas con vectores de expresión de distintos mutantes del dominio quinasa de ALK1. Se revelaron con un anticuerpo monoclonal frente ALK1 y con anticuerpo anti-HA, epítipo fusionado a la proteína ALK1 recombinante. **B.** Análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana de los mutantes. Se muestra el índice de expresión en cada caso.

Figura 45 (Página 131). Análisis de la función de los mutantes R374W, M376T, A377T y H297R. Se hicieron transfecciones transitorias con mutantes de ALK1, en todos los casos sustituciones de una base por otra en el dominio quinasa. El análisis de la señalización de la vía de ALK1 se hizo empleando las construcciones reporteras BRE-luc (**A**) y Gal4Smad1 (**B**). En todos los casos se transfectaron dos dosis de la proteína silvestre, dos dosis de la proteína mutada o una dosis de cada. Se muestran los resultados en unidades relativas de luciferasa de extractos de células tratadas y sin tratar con TGF- β .



- La mutación **R374W** parece comportarse como un dominante negativo, de la misma forma que el mutante artificial dominante negativo ya descrito en la literatura (K299R). Simplemente transfectando una dosis del mutante junto con una de la proteína silvestre, la actividad del reportero ya disminuye hasta casi los niveles de actividad basal observados transfectando el vector vacío, por lo que el mutante está impidiendo la actividad de la proteína silvestre. Empleando dos dosis de la proteína mutada no se induce actividad del reportero.
- La mutación **M376T** presenta una dominancia intermedia entre la proteína silvestre y una proteína nula o no funcional. Transflectando una dosis de cada construcción (wt y M376T), la señalización disminuye con respecto a la inducida por las dos dosis de ALK1 wt; transflectando dos dosis del mutante disminuye aún más la señalización, pero aún es capaz de estimular la actividad del reportero y de responder a TGF- β .
- La mutación **A377T** se comporta como un alelo nulo, aún expresándose en la membrana, no es funcional. Al transfectar una dosis de cada construcción (wt y A377T), disminuye la señalización con respecto a la inducida por la proteína silvestre. Sin embargo, transflectando dos dosis del mutante no se induce la actividad del reportero ni hay respuesta a TGF- β , por lo que esta proteína no es capaz de señalar.
- La mutación **H297R** parece comportarse como un dominante positivo al emplear el reportero BRE-luc, ya que es capaz de aumentar la señalización al combinarse con el wt incluso en ausencia de ligando, de forma similar a como actúa el mutante artificial de ALK1 constitutivamente activo descrito en la literatura (Q201D). La inducción de actividad del reportero es mayor cuando se emplea una dosis de cada (wt y H297R) que en el caso de únicamente wt y es máxima cuando se transflectan dos dosis del mutante. Sin embargo, este resultado no fue tan claro al emplear el reportero Gal4Smad1, con el cual al transfectar dos dosis del mutante no se estimuló más la señalización que al emplear una dosis de cada (wt y H297R).

Curiosamente, son las células portadoras de las mutaciones R374W y M376T las que encuadramos dentro del tipo HHT2m. Funcionalmente, una actúa como dominante negativo y otra presenta una actividad quinasa reducida. Sin embargo, ambas conducen a un fenotipo similar en las células. La mutación A377T, vemos que se comporta como un alelo nulo, conduciendo, por tanto, a una haploinsuficiencia funcional. Las células portadoras de esta mutación morfológicamente son más parecidas a las HHT2n, en las cuales, debido a la aparición de un codón *STOP* prematuro, se forma una proteína truncada que no se expresa en membrana, conduciendo igualmente a una haploinsuficiencia. El caso de la mutación H297R habría que estudiarlo en mayor profundidad. La existencia de mutantes constitutivamente activos, y en concreto de proteínas quinasa, son frecuentes en cáncer (Di Nicolantonio and Bardelli, 2006) y también se han descrito en otras enfermedades como en diversas cardiopatías (Arad *et al.*, 2002). Sin embargo, no podemos afirmar que esta mutación funcione como un dominante positivo mientras no la estudiemos con más detalle.

Los resultados demuestran que la morfología y el comportamiento de las células están, en parte, relacionados con el tipo de mutación que éstas presentan: si se expresan o no en membrana y, de hacerlo, si son capaces de señalar y si interfieren o no con la señalización de la proteína silvestre. Sin embargo, la mutación no explica por sí sola el comportamiento de la célula, por lo que deben de existir otros factores tales como el fondo genético del paciente, factores epigenéticos y ambientales o alteraciones adquiridas en cada caso a causa de la enfermedad, que contribuyan a la adquisición de un determinado fenotipo y comportamiento celular.

En concordancia con nuestro trabajo y el de Lux (Lux *et al.*, 2000), Gu y colaboradores (Gu *et al.*, 2006) estudiaron mutaciones encontradas en el dominio quinasa de ALK1 de pacientes HHT2 mediante la inyección del correspondiente ARN mensajero en embriones unicelulares de pez cebra y analizando su comportamiento durante el desarrollo. Demuestran así que algunas de las proteínas mutadas se expresan en membrana y presentan

distintos comportamientos, pudiendo no ser funcionales, presentar una actividad reducida o bien actuar como dominantes negativos.

3.10 Tratamiento de pacientes españoles de HHT con Ácido Tranexámico (AT)

Existen algunos estudios clínicos basados en el uso de Ácido Tranexámico para la mejora de las epistaxias en pacientes de HHT. Sin embargo, estos trabajos incluyen, como máximo, tres pacientes (Klepfish et al., 2001; Perez del Molino *et al.*, 2004; Sabba et al., 2001). En la unidad de HHT del hospital de referencia en España se han atendido, desde 2003, más de 150 pacientes de HHT, entre los cuales 14 se presentaron voluntarios para un estudio sobre el efecto del Ácido Tranexámico. Estos pacientes presentaban epistaxias severas que disminuían de forma considerable su calidad de vida. Tras seguir un tratamiento de 500mg de AT cada 8 horas, vía oral, todos los pacientes mostraron un claro descenso en la intensidad y frecuencia de los sangrados nasales desde la primera semana de tratamiento, disminuyendo significativamente su necesidad de transfusiones sanguíneas. Si el tratamiento se interrumpía, las hemorragias aumentaban de forma inmediata. Actualmente (noviembre de 2006), todos los pacientes continúan con el tratamiento y hasta ahora ninguno ha mostrado reacciones adversas. Otro antifibrinolítico que también se ha empleado en el tratamiento de pacientes de HHT es el ácido aminocaproico (AA), sin embargo, los estudios realizados con AT demuestran que éste es 10 veces más efectivo en la reducción de las epistaxias (Klepfish et al., 2001; Sabba et al., 2001).

3.11 Efecto de AT sobre los niveles de Endogлина y ALK1 en células endoteliales

A la vez que se realizó el estudio clínico de 14 pacientes, en el laboratorio nos planteamos si el ácido Tranexámico, aparte de su actividad antifibrinolítica, podría tener algún efecto, directo o indirecto, sobre la expresión de Endogлина que favoreciera la mejoría de estos pacientes.

Así, en primer lugar, decidimos emplear un rango de concentraciones de AT (de 0 a 10mM) para tratar células endoteliales (HUVECs) durante 24 horas y estudiar, por citometría de flujo, si variaban o no los niveles de Endogлина en membrana (Figura 46A). De esta forma, encontramos que tratando las células con una dosis de 0,5mM de AT, la expresión de Endogлина aumentaba entre 5 y 6 veces, aumento que se mantenía hasta la dosis más alta que empleamos, de 10mM. La expresión de PECAM no varió con los tratamientos, por lo que se trataba de un efecto específico sobre Endogлина.

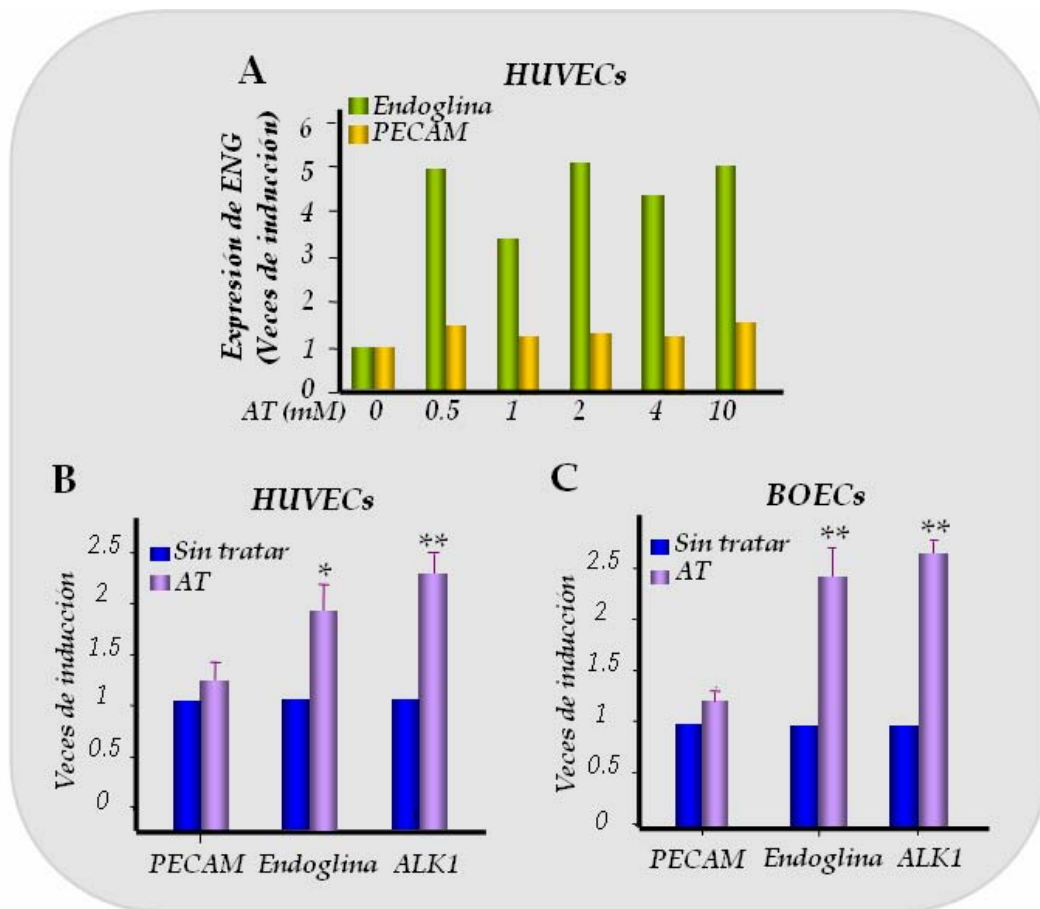


Figura 46. Efecto del Ácido Tranexámico (AT) sobre la expresión de Endogлина y ALK1. **A.** Incremento en la expresión de Endogлина en HUVECs tras el tratamiento con distintas dosis de AT durante 24h. **B,C.** Incremento en la expresión de Endogлина y ALK1 en HUVECs (**B**) y BOECs (**C**) tras el tratamiento con AT 2mM durante 24h. Se empleó PECAM como un control que no experimenta variaciones con el tratamiento. Se muestran los resultados en veces de inducción con respecto a los niveles de expresión en las células sin tratar, en cada caso.

A continuación, tratamos HUVECs (Figura 46B) y BOECs (Figura 46C) con 2mM de AT y estudiamos si se estimulaba también la expresión de ALK1. Mientras que los niveles de PECAM se mantenían constantes, los de Endoglina y ALK1 aumentaban con el tratamiento. Observamos que la magnitud de la inducción variaba en función de los niveles de expresión iniciales de las células, niveles que varían con el cultivo. Cuando las células expresan basalmente niveles altos, es más difícil obtener un gran incremento. Sin embargo, en todos los casos existió al menos una inducción de dos veces.

3.12 Efecto de otros antifibrinolíticos sobre los niveles de Endoglina y ALK1 en células endoteliales

Con el fin de averiguar si el efecto del AT sobre la expresión de Endoglina y ALK1 era un efecto directo o bien si se trataba de un efecto indirecto mediado por su actividad antifibrinolítica, decidimos estudiar el efecto de otros fármacos que actuaran de forma similar. Escogimos por un lado el ácido aminocaproico (AA) debido a que su mecanismo de acción es el mismo que el del AT, actúa uniéndose al plasminógeno, impidiendo así su unión a fibrina y, por tanto su degradación. Por otro lado, para averiguar si se trata de un efecto secundario a la actividad antifibrinolítica, buscamos otro fármaco antifibrinolítico que presentara un mecanismo de acción distinto. Empleamos la aprotinina (AP), inhibidor de serín-proteasas que muestra una particular afinidad por la plasmina.

Tratamos células endoteliales con los tres fármacos empleando distintas dosis (0.5, 1 y 2mM de AT y AA; 5 y 10µg/ml de AP). Empleamos células HMEC, línea ya establecida de células endoteliales, y medimos por citometría de flujo los niveles de Endoglina y ALK1 (Figura 47). Encontramos que los tres fármacos eran capaces de inducir la expresión de ambas proteínas, por lo que no se trata de un efecto específico del AT, sino que la inducción parecía ser un efecto producido a consecuencia de la inhibición de la fibrinólisis.

Empleando las mismas dosis de AT y AA, comprobamos que el AT induce un aumento mayor en la expresión tanto de Endoglina como de ALK1, lo que puede ser la causa de que el AT sea más efectivo clínicamente. Esta diferencia podría deberse a una distinta afinidad en la unión de los dos fármacos al plasminógeno.

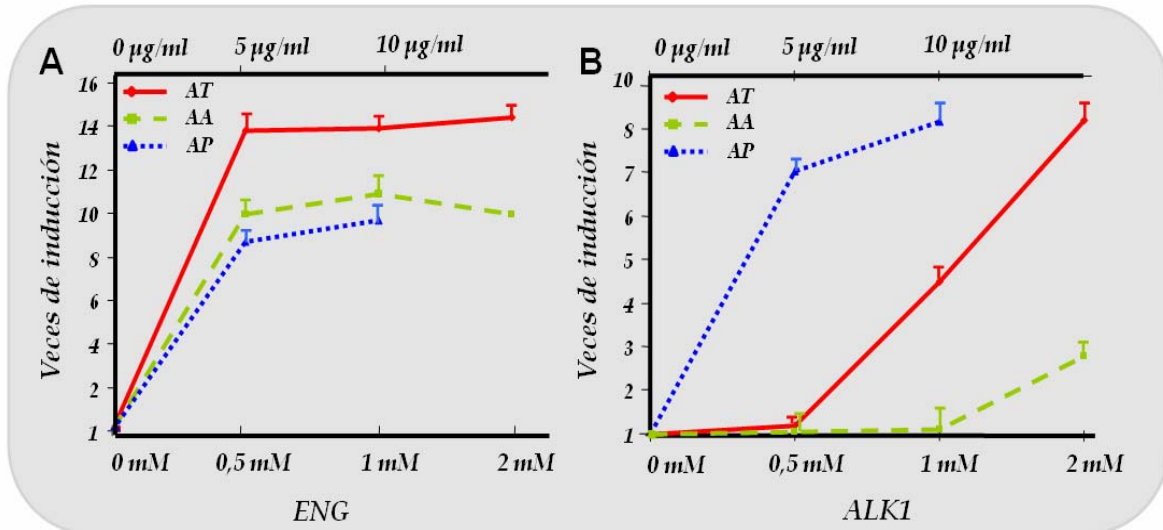


Figura 47. Efecto de los fármacos AT, AA y AP sobre la expresión de Endoglina y ALK1. Se emplearon distintas concentraciones de los fármacos: 0.5, 1 y 2mM (AT, AA), 5 y 10µg/ml (AP). Se muestra su efecto, en veces de inducción con respecto a las células sin tratar, sobre la expresión de Endoglina (A) y ALK1 (B) en células HMEC.

Decidimos a continuación estudiar el efecto de los tratamientos a nivel de ARNm, para ver si existía un efecto transcripcional o si, por el contrario, se trataba de un efecto postranscripcional, que podría darse a nivel de traducción, de estabilización del mensajero, de la proteína o bien a nivel del transporte de ésta a membrana. Para ello, hicimos RT-PCR cuantitativa para *endoglina* y *ALK1*, partiendo de ARNm total de células endoteliales HMEC sin tratar o tratadas con cada uno de los fármacos durante 24 horas (Figura 48).

Únicamente en el caso del AT encontramos una inducción significativa a nivel de ARNm. Es posible que exista un efecto transcripcional con el empleo de los tres fármacos, pero que sea menor en el caso del AA y la AP, prevaleciendo en éstos un efecto postranscripcional. Como el efecto sobre la

expresión de Endoglina y ALK1 es secundario al efecto antifibrinolítico de los fármacos, quizá se necesiten más de 24 horas para que el efecto a nivel de la transcripción sea claramente observable. Además, si el AT es el más eficaz en la actividad antifibrinolítica, será el primero en el que notemos el aumento en los niveles de ARNm de *endoglina* y *ALK1*.

En cualquier caso, debe existir también un efecto postranscripcional visible a más corto plazo, que explique el aumento de Endoglina y ALK1 en la membrana de las células endoteliales.

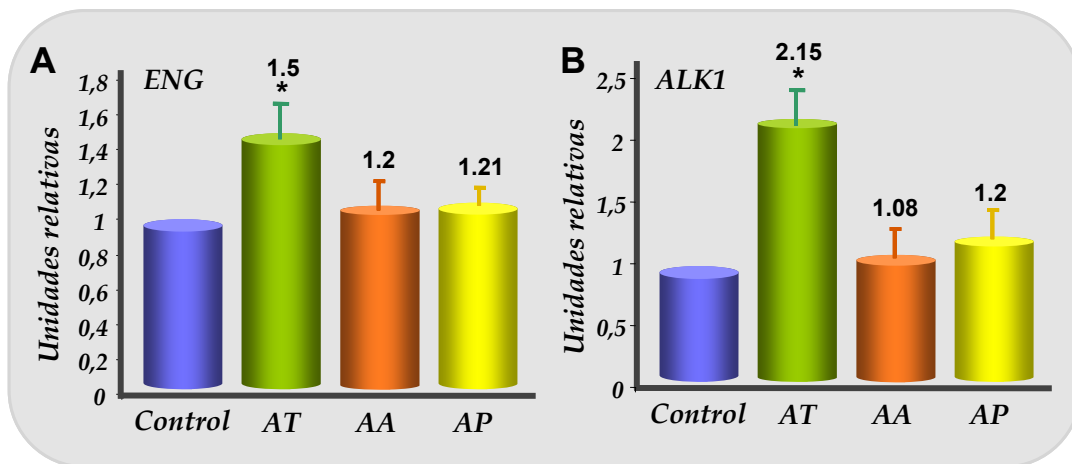


Figura 48. Efecto de los fármacos AT, AA y AP sobre los niveles de ARNm de Endoglina y ALK1 en células HMEC. Se muestran los niveles, en unidades relativas con respecto al control sin tratar, de ARNm de endoglina (A) y ALK1 (B), respectivamente. Se emplearon unas concentraciones de 2mM de AT y AA y 5µg/ml de AP.

3.13 Efecto del AT sobre las vías de señalización de TGF-β

Dado que, al menos en el caso del AT, parecía existir un aumento en los niveles de ARNm de *endoglina* y *ALK1*, nos planteamos si ese efecto se debía a una mayor actividad de los promotores o a una estabilización de los mensajeros.

Transfectamos BOECs obtenidas de un individuo sano con los promotores de *endoglina* (*pENG*) y *ALK1* (*pALK1*) y estudiamos su actividad en ausencia y presencia de AT (Figura 49A). La actividad de los promotores aumentaba dos veces, en ambos casos, al tratar las células con 2mM de AT.

En el caso del promotor de *endogлина*, transfectamos a su vez vectores de expresión para las formas constitutivamente activa y dominante negativa de ALK1. El efecto de estos mutantes nos permitiría discernir si el aumento de actividad de los promotores se estaba dando vía señalización de TGF- β o por otra vía.

Si el aumento de actividad de los promotores se estuviera dando por una vía independiente de TGF- β , la actividad del promotor de *endogлина* aumentaría al tratar con AT, independientemente de la expresión del dominante negativo o del constitutivamente activo de ALK1. Sin embargo, esto no sucede (Figura 49A), por lo que el aumento de la actividad de los promotores, y por tanto, de los niveles de ARNm, debe producirse por un aumento en la actividad de la propia vía de TGF- β ALK1/Endogлина. Así, la disminución de la actividad fibrinolítica está de alguna forma aumentando la señalización de TGF- β .

Quisimos averiguar, a continuación, si el aumento en la señalización de TGF- β era general o específico de la vía ALK1/Endogлина. Para ello transfectamos BOECs control con distintos reporteros de las vías de TGF- β . Empleamos 3TPlux, que es un reportero general de TGF- β obtenido de la zona proximal del promotor del gen *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), que incluye sitios de unión para Smad3, además de otros factores de transcripción, y los reporteros específicos de las vías de ALK5 y ALK1, CAGA-luc y BRE-luc, respectivamente (Figura 49B).

La actividad de 3TPlux se vio incrementada en una vez y media tras el tratamiento con AT, mientras que el CAGA-luc no se vio afectado. El reportero BRE-luc aumentó su actividad cuatro veces. Por lo tanto, el AT está induciendo un aumento en la señalización de TGF- β vía ALK1. El ligero aumento de la actividad de 3TPlux podría deberse a la unión de factores de transcripción distintos de las Smads, cuya actividad fuera también estimulada por el tratamiento.

Dado que el AT, así como el AA, se unen al plasminógeno en la región de unión a la fibrina, pero no impiden la transformación del plasminógeno

en plasmina, puede estar produciéndose una acumulación de plasmina no implicada en fibrinólisis. Por otro lado, sabiendo que la plasmina es una de las proteasas implicadas en la activación del TGF- β latente (Bailly *et al.*, 1997; Yee *et al.*, 1993), podríamos postular que la plasmina, unida al fármaco, no es capaz de degradar fibrina pero sí de cortar proteolíticamente el péptido LAP, que mediante su unión al TGF- β lo mantiene inactivo. Así, aparte de inhibir la fibrinólisis favoreciendo la estabilización del coágulo en los pacientes, podría estar dándose una mayor activación de TGF- β latente y un aumento en su señalización, que podríamos estar detectando únicamente vía ALK1 puesto que es el receptor que se activa a concentraciones más bajas y tiempos más cortos. Este aumento en la señalización conduciría, en última instancia, a un aumento de la expresión de Endogлина y ALK1.

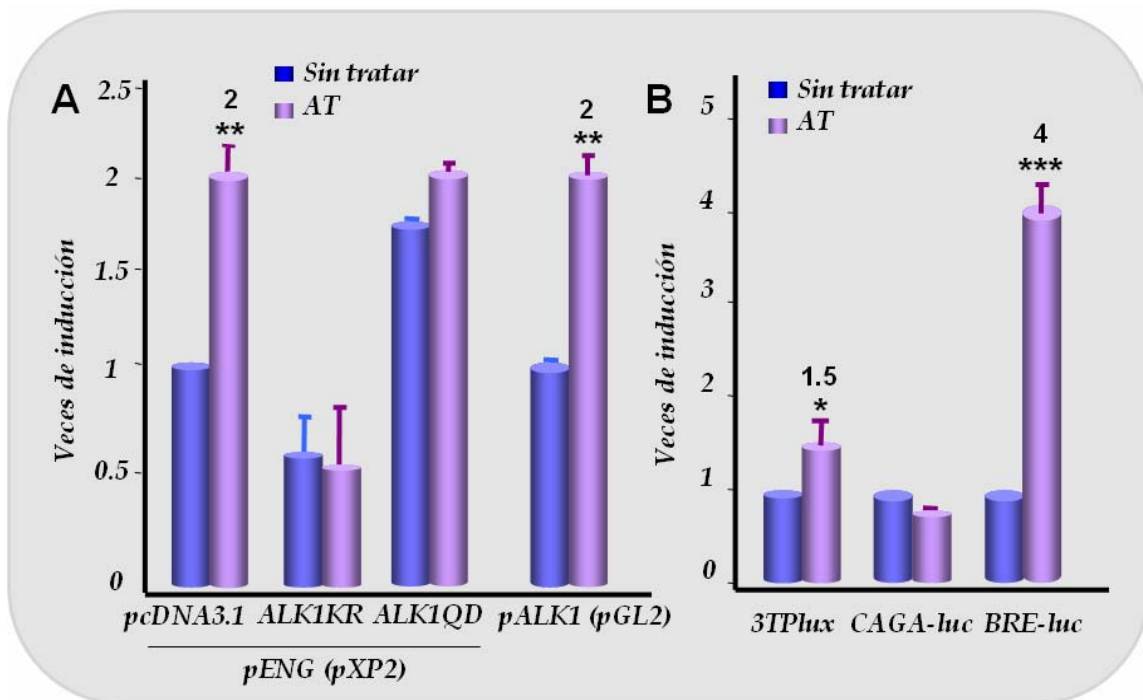


Figura 49. Efecto del AT sobre las vías de señalización de TGF- β en BOECs. **A.** BOECs transfectadas con el promotor de endogлина (en pXP2) y los vectores de expresión de ALK1 KR y QD o bien con el promotor de ALK1 (en pGL2). Se muestra la actividad de los promotores en ausencia o presencia de AT 2mM, en veces de inducción con respecto al vector vacío sin tratar. **B.** BOECs transfectadas con los reporteros de TGF- β 3TPlux, CAGA-luc y BRE-luc. Se muestra su actividad en ausencia o presencia de AT 2mM, en veces de inducción con respecto al vector reportero sin tratar, en cada caso. Se indica el valor de la inducción en los casos en los que ésta fue significativa.

Sin embargo, de ser así el mecanismo, quedaría sin explicar por qué la aprotinina, siendo un inhibidor de proteasas, conduce al mismo efecto. Podría suceder que la AP esté actuando sobre la plasmina inhibiendo la fibrinólisis pero no la acción sobre LAP. Otra explicación alternativa sería que estos fármacos actúen por vías independientes o bien que los tres fármacos estimulen la liberación de TGF- β y su señalización por alguna vía que desconocemos.

No podemos tampoco descartar la posibilidad de que el efecto de estos antifibrinolíticos se dé vía BMPs, ya que recientemente se ha descrito que tanto BMP-9 como BMP-10 son ligandos de ALK1 (David et al., 2006), aunque existe poca información al respecto y desconocemos si esta señalización podría conducir a un aumento de la expresión de Endogлина y ALK1.

3.14 Efecto del AT, AA y AP sobre funciones biológicas de las células endoteliales

Dado que habíamos visto que la vía de señalización de ALK1/Endogлина favorece migración, proliferación y, por tanto, angiogénesis, quisimos comprobar si el aumento en la señalización de esta vía, inducido por el AT, podía verse reflejado en funciones de las células endoteliales que reflejen su capacidad angiogénica, como son la formación de tubos y la cicatrización de heridas (*wound healing*) *in vitro*.

Sembramos células endoteliales HMEC en placas de 6 pocillos tapizadas con matrigel, y a continuación tratamos las células con los antifibrinolíticos. Estudiamos la formación de tubos en cada caso, tomando fotografías cada hora, desde el momento del tratamiento, hasta las 12 horas (Figura 50). El matrigel es matriz extracelular producida por un sarcoma murino, compuesta por laminina, colágeno tipo IV, proteoglicanos y entactina. A temperatura ambiente, esta solución en estado de gel polimeriza dando lugar a una matriz biológicamente activa que se comporta como la lámina basal, permitiendo a las células actuar como lo hacen *in vivo*. De esta

forma, las células endoteliales sembradas sobre esta matriz, son capaces de formar tubos tal como lo harían *in vivo* ante estímulos angiogénicos (Furcht, 1986).

Tres horas después de sembrar las células en medio de cultivo con los tratamientos ya se observaban diferencias. En las células tratadas con AT se observaban pequeños tubos, en mayor número que en las células tratadas con AA y AP. En las células control sólo podían observarse pequeñas agrupaciones de células que aún no constituían tubos. Tras 6 horas, las células expuestas a AT formaban ya una red compleja de tubos, mientras que estas redes eran más sencillas en las expuestas a AA y AP, y en las células control se observaba únicamente una red incipiente. Hasta las 8 horas, en el caso de las células tratadas con AA y AP, y hasta las 12 horas, en el caso de las controles, no se formó una red compleja similar a la observada en las células tratadas con AT.

Por tanto, los tres fármacos eran capaces de favorecer la angiogénesis, probablemente gracias al aumento en los niveles de Endogлина y ALK1, así como de la señalización por esta vía. Sin embargo, la inducción más eficaz la llevaba a cabo el AT, hecho que está en concordancia con todos los datos obtenidos tanto a nivel molecular, como clínico. Las células endoteliales son capaces de migrar y formar tubos en presencia de AP ya que es un inhibidor de serín proteasas y no afecta a las metaloproteinasas que degradan la matriz en el proceso de migración.

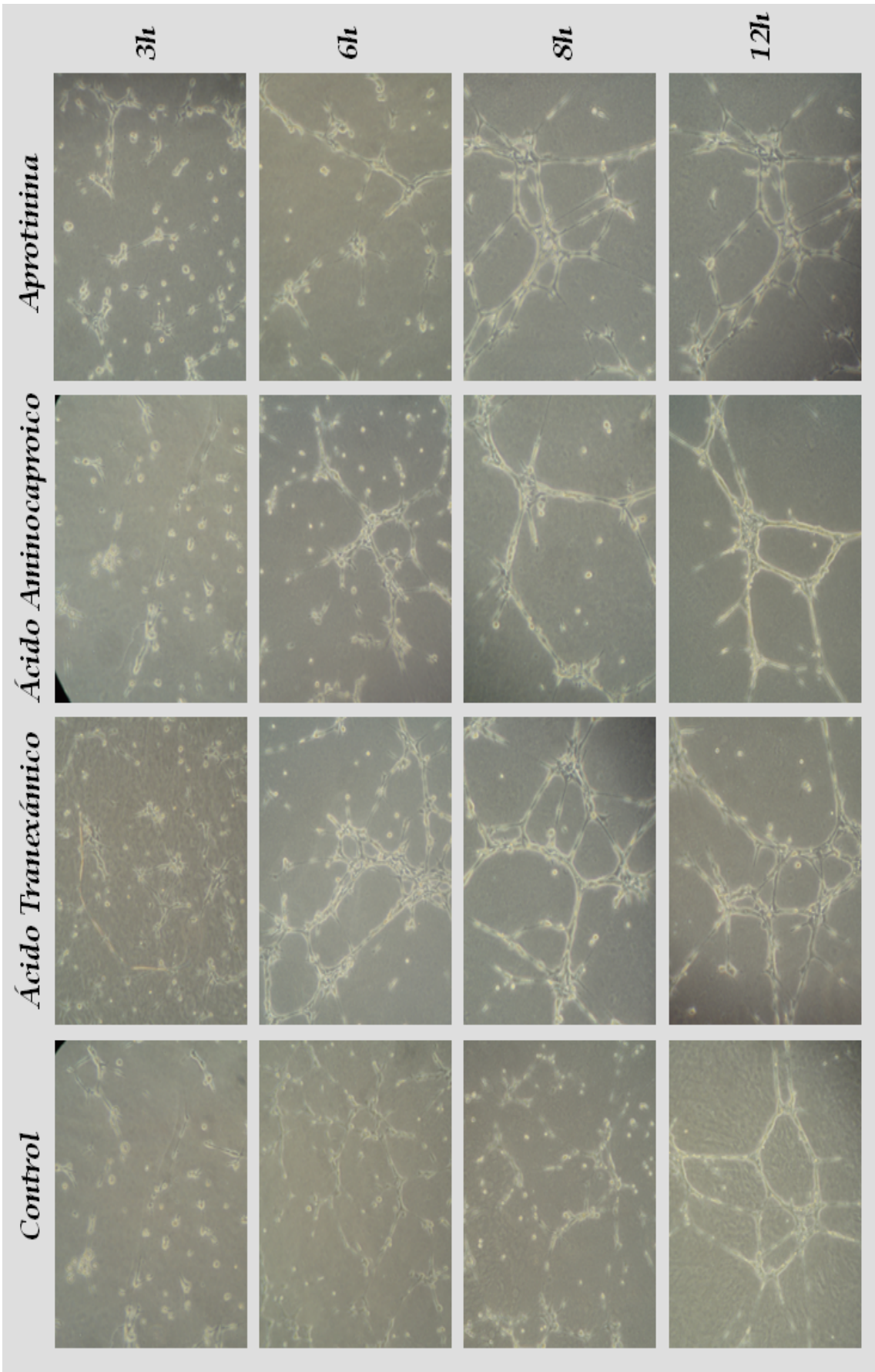
Igualmente, quisimos evaluar si los fármacos tenían algún efecto a nivel de migración de células endoteliales, como cabría esperar ya que habíamos visto que favorecían la formación de vasos, y lo hicimos mediante un ensayo de *wound healing*. Una vez teníamos las células endoteliales HMEC confluentes, realizamos una raya o "herida" que recorría el pocillo en línea recta, de un extremo al otro. A continuación, tratamos las células con los fármacos y tomamos fotos cada 3 horas hasta las 24 horas (Figura 51). Pasadas 9 horas, podía observarse migración de algunas células hacia el centro de la herida en los pocillos tratados con los fármacos, migración que se encontraba más avanzada en las células tratadas con AT. En las células

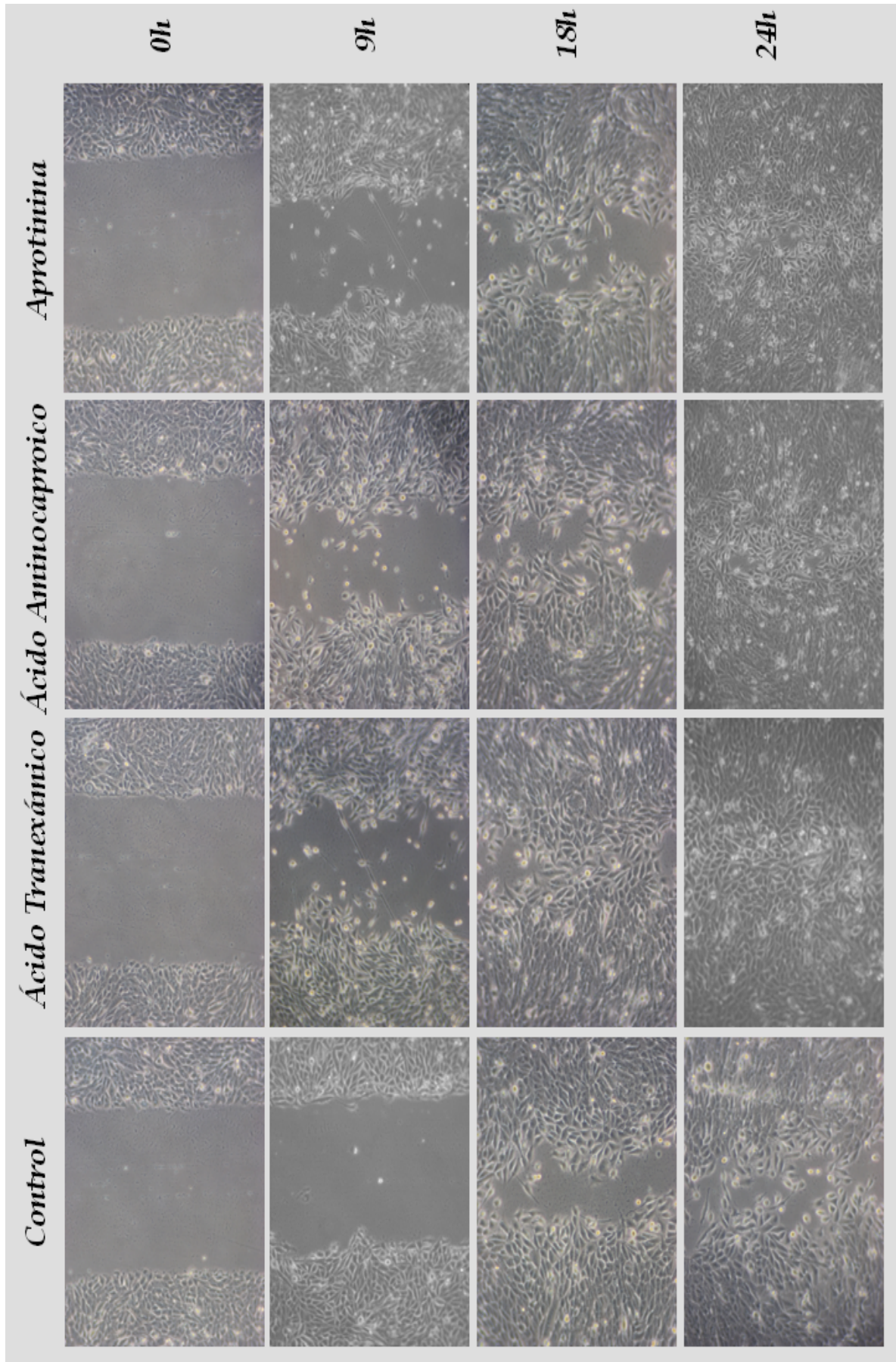
sin tratar apenas se había iniciado el proceso. A las 18 horas la herida estaba prácticamente cerrada en el pocillo tratado con AT, en los tratados con AA y AP la migración estaba avanzada, mientras que aún era escasa en las células control. A las 24 horas todas las heridas expuestas a tratamiento estaban cerradas, mientras que aún no lo estaba la herida sin tratar.

Por tanto, empleando dos sistemas fisiológicos, corroboramos que debido a un efecto secundario a su actividad antifibrinolítica, estos fármacos son capaces de favorecer la angiogénesis. Este efecto se produce mediante un aumento en la señalización de la vía de TGF- β ALK1/Endoglin, así como de la expresión de estas proteínas, presumiblemente por un doble efecto transcripcional y postranscripcional. El fármaco más efectivo en estas funciones es el AT, hecho que concuerda con su mayor eficacia clínica. Sin embargo, los mecanismos que unen la inhibición de la fibrinólisis con la estimulación de angiogénesis, están aún por esclarecer.

Figura 50 (Página 144). Ensayo de tubulogénesis de células endoteliales HMEC sobre matrigel. Se muestran fotografías de las células a las 3, 6, 8 y 12 horas tras su siembra y tratamiento con AT, AA y AP.

Figura 51 (Página 145). Ensayo de cicatrización de herida o wound healing en células endoteliales HMEC. Se muestran fotografías de las células a las 0, 9, 18 y 24 horas tras la realización de la herida y del tratamiento con AT, AA y AP.





3.15 Inmortalización de BOECs

Con el fin de poder disponer de una fuente inagotable de células endoteliales portadoras de una mutación en *endoglin* o *ALK1*, como un modelo para estudiar las alteraciones que conducen a la sintomatología de estos pacientes, nos propusimos inmortalizar BOECs, tanto de pacientes de HHT como de controles sanos.

Para ello, empleamos las tres estrategias más comunes para la inmortalización de células endoteliales:

146

- Infección con retrovirus que contienen el gen de la Transcriptasa Reversa de la telomerasa humana (**hTERT**; *human Telomerase Reverse Transcriptase*). El mecanismo por el que induce inmortalización de las células no es del todo conocido, habiéndose encontrado células inmortalizadas por este método que sufren acortamiento de los telómeros, a pesar de la alta actividad telomerasa, y que sin embargo presentan niveles disminuidos de p16^{INK4a} (*Inhibitor of Cyclin-dependent Kinase 4a*) y p21, así como una hiperfosforilación de Rb (Retinoblastoma) (Bian *et al.*, 2005; Veitonmaki *et al.*, 2003).
- En algunos casos, la adquisición de actividad telomerasa no es suficiente para lograr la inmortalización de las células, por lo que se pueden emplear, de forma combinada, vectores retrovirales que codifican **hTERT** y vectores que contienen las proteínas de papilomavirus **E6** y **E7** (Noble *et al.*, 2004). Mientras que E6 acelera degradación de p53, E7 inhibe la vía p16^{INK4a}/Rb, induciendo una disminución en los niveles de p16 y una hiperfosforilación de Rb que conducen a su inactivación (Tsutsui *et al.*, 2002).
- Infección con retrovirus que codifican el antígeno T largo del SV40 (SV40LT; *Simian Virus 40 Large T Antigen*). El antígeno T es capaz de inhibir la función de al menos tres proteínas inhibidoras del

crecimiento celular: Rb, p53 y SEN6 (*Senescente-related 6*) (Bian et al., 2005).

Empleamos células empaquetadoras anfotrópicas Phoenix, células derivadas de HEK293T que llevan en su genoma los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la formación de partículas retrovirales. Al transfectar estas células con un plásmido en el cual el gen de interés está flanqueado por las secuencias LTR (*Long Terminal Repeat*) necesarias para la replicación del virus, pueden formarse las partículas virales y liberarse al medio. Este medio se emplea posteriormente para infectar las células que se quieren inmortalizar (Figura 52).

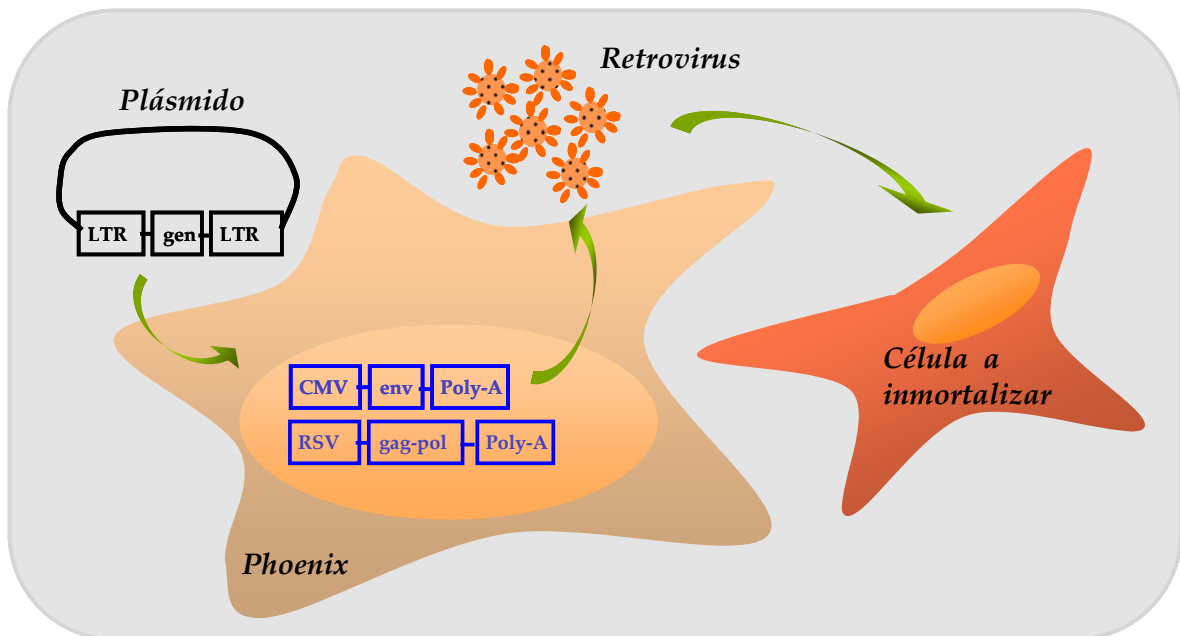


Figura 52. Producción de partículas retrovirales empleando células empaquetadoras. Las células Phoenix llevan en su genoma los genes retrovirales *env*, *gag* y *pol*. Para la formación de las partículas virales se transfecta un plásmido que incorpora el gen de interés para la inmortalización, flanqueado por las secuencias LTR necesarias para la replicación de los retrovirus.

Mediante este método infectamos en primer lugar HUVECs, con el fin de poner a punto el método y también debido a que apenas hay trabajos en los que se hayan inmortalizado este tipo de células endoteliales (Bian et al., 2005). Con las tres estrategias logramos obtener células que se dividían de forma ilimitada, aunque la infección con el antígeno T del SV40 resultó el

método más eficaz. Tras 10 pases sin que las células entraran en senescencia ni disminuyera su tasa de proliferación, las caracterizamos empleando marcadores endoteliales: VE-Cad, vWF, PECAM, ALK1, ENG y Flk1 (Figura 53), comprobando que se mantenía el fenotipo endotelial.

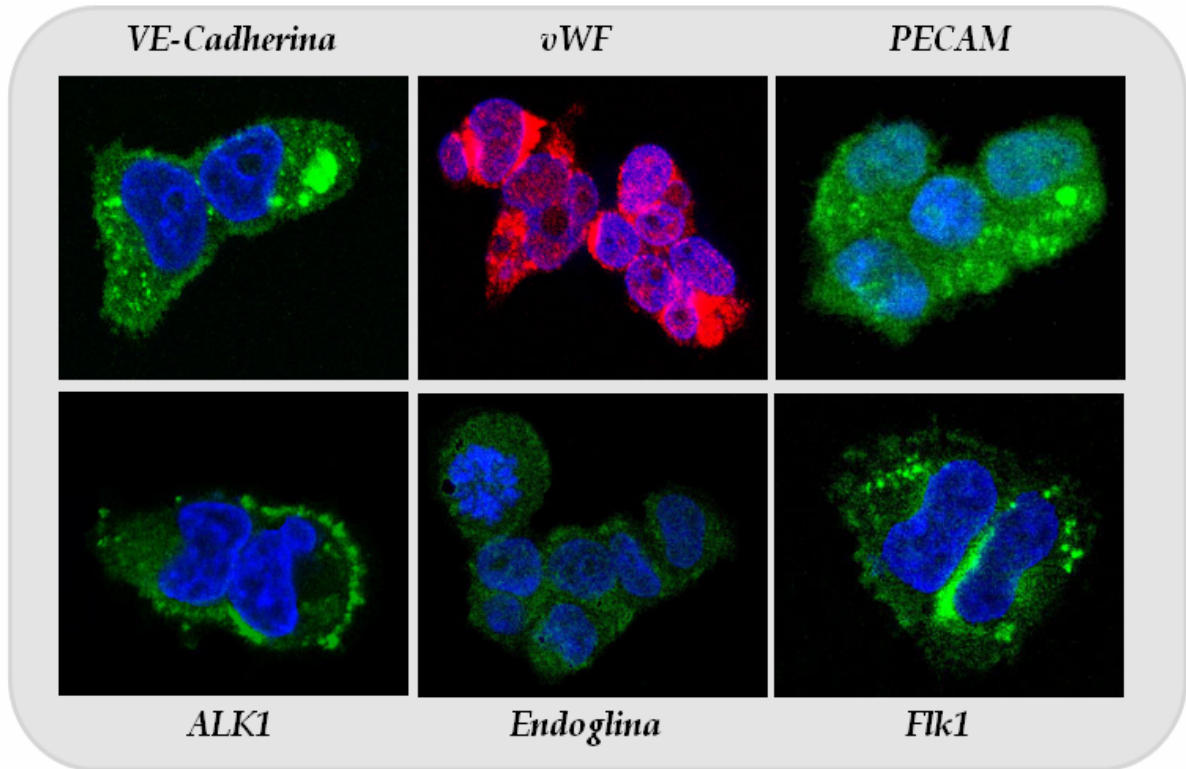


Figura 53. Caracterización fenotípica, por microscopía confocal, de HUVECs inmortalizadas con el antígeno T del virus SV40. Las fotografías muestran tinciones para los marcadores endoteliales VE-Cadherina, vWF, PECAM, ALK1, Endoglina y Flk1.

A continuación, empleando exclusivamente los retrovirus portadores del antígeno T del SV40, se infectaron BOECs procedentes de un individuo sano. Las células que incorporaron el genoma del retrovirus, adquirieron una morfología similar a las HUVECs inmortalizadas, de un tamaño más pequeño que las células de origen y con una alta tasa de replicación. De la misma forma que se hizo con las HUVECs, tras 10 pases sin observar diferenciación ni senescencia en las células, se caracterizaron con una batería de marcadores para células endoteliales (Figura 54), comprobando que no perdían su identidad endotelial, pese a que los marcajes, al igual que ocurría con las HUVECs, eran más débiles que en las células de origen marcadas como control positivo (dato no mostrado).

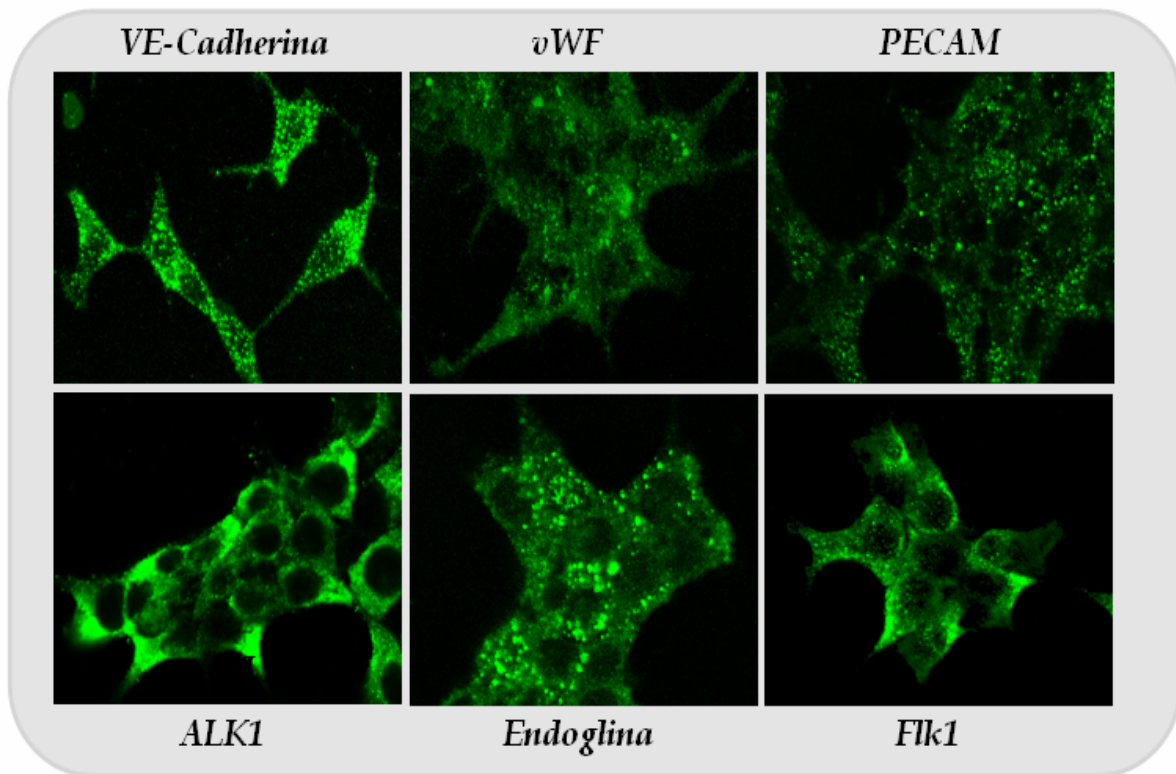


Figura 54. Caracterización fenotípica, por microscopía confocal, de BOECs control, immortalizadas con el antígeno T del virus SV40. Las fotografías muestran tinciones para los marcadores endoteliales VE-Cadherina, vWF, PECAM, ALK1, Endoglin y Flk1.

Debido a la falta de disponibilidad de BOECs procedentes de enfermos, no se pudieron immortalizar, pero ese sería el próximo paso a realizar para poder hacer estudios de funcionalidad, comparando con BOECs control immortalizadas, y así poder determinar si es un buen modelo para el estudio de las bases moleculares y celulares de la enfermedad.

OBJETIVO 4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE PACIENTES CON TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA E INDIVIDUOS CONTROL. IMPLICACIÓN DE ESTOS GENES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

4.1 Estudio de los genes diferencialmente expresados en células endoteliales de pacientes de HHT

Una vez que habíamos visto que las dos vías de TGF- β presentes en células endoteliales se encontraban alteradas en los pacientes de HHT, nos preguntamos qué procesos fisiológicos se verían repercutidos, de forma directa o indirecta, debido a este defecto en señalización. Por otro lado, sabiendo que Endogлина está implicada en funciones independientes de TGF- β , la disminución en su expresión podía reflejarse en defectos en estas funciones. Por esto, nos planteamos el estudio de los genes que se encuentran diferencialmente expresados en las células endoteliales de pacientes de HHT con respecto a las controles.

Para ello, hicimos un análisis de expresión diferencial de genes empleando chips de ADNc (*Microarrays*) partiendo de 2 μ g iniciales de ARN de cada uno de los cuatro tipos de BOECs que habíamos descrito. Cada tipo de células provenía de un paciente distinto y en todos los casos se hicieron triplicados. Empleamos la plataforma *Codelink* de genoma humano completo. Estos *Microarrays*, incluyen sondas de ADN de 30 nucleótidos cada una, adheridas a una matriz sólida.

Con el fin de encontrar un patrón molecular común para pacientes de HHT1 y HHT2, dado que presentan la misma sintomatología, decidimos seleccionar únicamente los genes que se encontraban diferencialmente expresados en los tres tipos de BOECs HHT, comparando con la expresión en las células control. De esta forma, además, minimizábamos el problema de encontrar genes con una expresión diferencial debida al fondo genético del propio paciente.

Seleccionamos los genes que presentaban diferencias de expresión con una $p < 0.05$, encontrando 277 genes cuya expresión, en todas las

células HHT, estaba disminuida de forma significativa con respecto a las células control, y 63 genes cuya expresión se encontraba aumentada (Tablas 8 y 9 de los Anexos).

Mediante el empleo de algoritmos del tipo de *Gene Ontology*, herramienta bioinformática que analiza redes de proteínas, en colaboración con el Dr. Vega, estudiamos en qué procesos biológicos se encontraban implicados los genes diferencialmente expresados. Así, encontramos que la mayor parte de los genes codificaban proteínas implicadas en procesos fundamentales para la inflamación y angiogénesis, como son adhesión, migración, ciclo celular, matriz extracelular, citoesqueleto y trans migración endotelial, así como proteínas implicadas en la fisiología vascular (Figura 55).

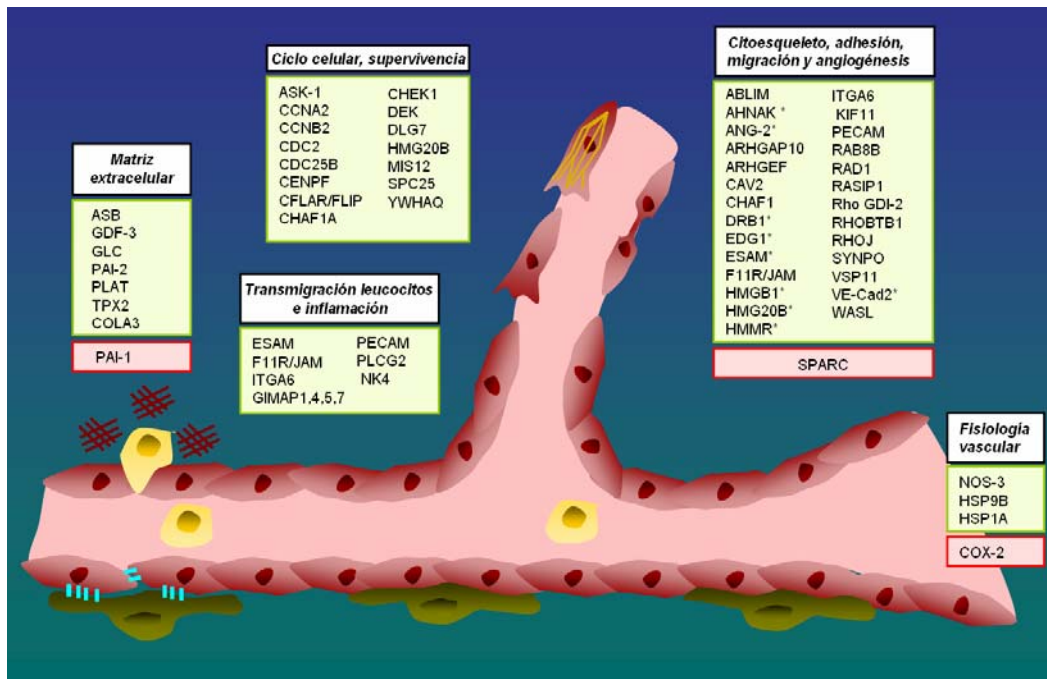


Figura 55. Selección de algunos de los genes diferencialmente expresados en BOECs HHT con respecto a BOECs control, clasificados según el proceso en el que se encuentran implicados. La mayor parte de los genes diferencialmente expresados se encontraban implicados en adhesión, migración, matriz extracelular, trans migración leucocitaria e inflamación, citoesqueleto, ciclo celular, angiogénesis y fisiología vascular. La clasificación de los genes es abierta, puesto que la mayoría de ellos podría encuadrarse dentro de más de una función biológica. Los cuadros verdes muestran genes con expresión disminuida, mientras que los cuadros rojos representan genes con expresión aumentada.

4.2 Selección de genes a validar

De entre todos los genes diferencialmente expresados, elegimos ocho genes para validar (siete con expresión disminuida y uno con expresión aumentada). Estos genes se encuentran implicados en procesos que, de estar alterados, podrían explicar en parte la aparición de malformaciones arterio-venosas en estos pacientes. Algunas de estas funciones biológicas como migración, síntesis de matriz extracelular o angiogénesis, es lógico pensar que puedan estar alteradas puesto que en parte están reguladas por una u otra vía de TGF- β . Sin embargo, hasta la fecha no se conocen los genes implicados causantes de la patología o alterados como consecuencia de ésta. Los únicos trabajos de *Microarrays* relacionados con las vías de señalización de TGF- β en células endoteliales, se basan en la sobreexpresión de ALK1 y ALK5 constitutivamente activos para el estudio de sus genes diana (Lamouille *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2006; Ota *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006), modelo que se encuentra muy alejado de la situación fisiológica de esta enfermedad.

152

Adhesión Migración	Ciclo celular	Organización Citoesqueleto	Fisiología vascular	Angiogénesis	Organización Matriz extracelular
PECAM VE-Cad2 ↓	Ciclina-B2 Cdc25b ↓	N-WASP ↓	eNOS ↓	Ang-2 ↓	PAI-1 ↑

Tabla 7. Genes seleccionados para la validación de los Microarrays. Se muestran los genes seleccionados para su validación y los procesos biológicos en los que se encuentran implicados. Las flechas indican si los genes tienen su expresión aumentada o disminuida con respecto a la expresión en las células control.

Escogimos los siguientes genes para su validación:

- **PECAM-1 y VE-Cadherina 2 (Protocadherina 12).** Debido a su implicación en adhesión entre células endoteliales y células endoteliales-leucocitos, consideramos que podrían ser importantes en

la fisiopatología de la enfermedad y podrían estar implicados en defectos en el proceso de angiogénesis o a nivel de respuesta inflamatoria. PECAM-1 se expresa en las uniones intercelulares de células endoteliales y juega un importante papel en la trans migración endotelial de leucocitos (Nourshargh *et al.*, 2006). VE-Cadherina 2, sin embargo, está implicada en la adhesión entre células endoteliales y debe dejar de expresarse en membrana cuando el leucocito comienza a trans migrar (Wallez *et al.*, 2006).

- **Ciclina B2 y Cdc25b** (*Cell Division Cycle 25b*). Habíamos visto que las BOECs HHT1 y HHT2n presentaban un crecimiento muy lento y que algunos cultivos se perdían porque las células dejaban de proliferar. En general, en estos cultivos aparecía un gran número de células multinucleadas. Por otro lado, las células HHT2m presentaban un crecimiento muy rápido y descontrolado. Todos estos factores parecían indicar la existencia de alteraciones a nivel del ciclo celular. A pesar de las claras diferencias en el comportamiento de las BOECs de pacientes, encontramos un gran número de genes, implicados en ciclo celular, cuya expresión estaba disminuida en todos los tipos de células de pacientes.

Las ciclinas B1 y B2 se expresan en células en proliferación y actúan uniéndose y activando p34cdc2, proceso fundamental para la entrada en mitosis en células eucariotas (Nigg *et al.*, 1992). La ciclina B2, concretamente, parece jugar un importante papel en la regulación del ciclo celular mediada por TGF- β (Liu *et al.*, 1999). Cdc25B es una fosfatasa que activa los complejos en los que se encuentran ciclina A y ciclina B1, activación que es necesaria para la entrada en mitosis (Nilsson and Hoffmann, 2000).

- **N-WASP** (*Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*). Dado que Endogлина está implicada en la organización de la formación de fibras de estrés en células endoteliales, la falta de endogлина podría implicar defectos en citoesqueleto. WASL (*Wiskott-Aldrich syndrome-like*), proteína codificada por el gen *N-WASP*, regula la formación del

citoesqueleto de actina a través de la activación de los complejos Arp2/3 o mediante su unión directa con la Rho GTP-asa pequeña Cdc42 (Carlier *et al.*, 1999).

- **eNOS (NOS3)**. Existen trabajos recientes que demuestran una disminución de la síntesis de NO en ratones heterocigotos *eng^{+/-}*, con respecto a los silvestres. Esta menor síntesis puede deberse a una disminución en los niveles de la enzima eNOS (Jerkic *et al.*, 2004), o a un desacoplamiento de la enzima debido al papel de Endoglina facilitando la interacción entre eNOS y la chaperona HSP90 (Toporsian *et al.*, 2005). Nos planteamos si existiría en los pacientes de HHT una menor síntesis de óxido nítrico, necesario para inducir vasodilatación en los vasos.

- **Angiopoyetina-2**. Una disminución en los niveles de Ang-2 podría ser causa de importantes defectos en el proceso de angiogénesis. La Ang-2 es ligando del receptor endotelial Tie-2 (*Tyrosine Kinase Endothelial receptor*) y está implicada en la desestabilización del vaso necesaria para el inicio de la angiogénesis. Esta función la realiza Ang-2 en presencia de VEGF, sin embargo, cuando VEGF no está presente, Ang-2 conduce a una apoptosis de las células endoteliales con la consecuente regresión de los vasos (Yu, 2005).

- **PAI-1**. Se trata de un miembro de la familia de proteínas que inhiben a los activadores de plasminógeno. El plasminógeno es el precursor de la plasmina, proteasa que degrada la fibrina, componente principal del coágulo (Nicholl *et al.*, 2006). Un aumento en los niveles de PAI-1 podría conducir a alteraciones en la degradación de la matriz extracelular así como del coágulo.

4.3 Validación de los genes seleccionados

La validación de los genes seleccionados se llevó a cabo midiendo los niveles tanto de ARNm, por PCR cuantitativa, como de proteína, por *Western Blot*. Para la PCR cuantitativa, partimos de muestras de ARNm de

las BOECs que habían sido empleadas en el *Microarray*. Para normalizar los niveles de expresión de los genes, empleamos dos genes endógenos, GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*) y ARNr 18S (ARN ribosómico 18S), tratando de minimizar así las posibles variaciones de expresión de los genes endógenos, debido al empleo de muestras de individuos distintos. Se realizaron en cada caso dos análisis, uno con respecto a cada gen endógeno, y se comprobó que los resultados fueran similares en ambos. Se emplearon siempre triplicados y se hicieron las medias de los datos obtenidos con los dos análisis. Cada experimento completo se repitió al menos dos veces (Figura 56).

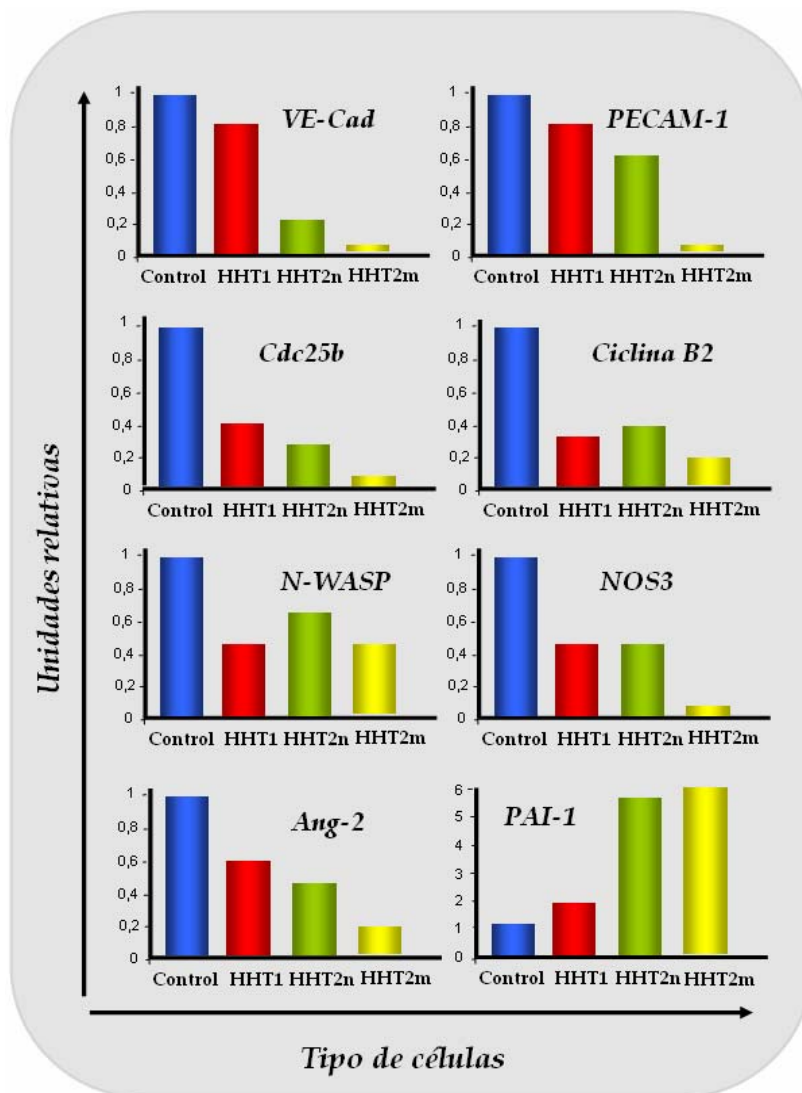


Figura 56. Niveles de expresión de ARN mensajero de los genes seleccionados, en BOECs HHT, respecto a BOECs control. Se muestran los niveles de expresión en unidades relativas respecto a los niveles en el control.

En todos los casos, se corroboró el aumento o disminución de la expresión de los genes que habíamos encontrado alterados en el *Microarray*. Resultó llamativo encontrar que, en casi el 100% de los casos, las células que presentaban mayor alteración en la expresión eran las HHT2m, al igual que habíamos visto que eran las que expresaban menores niveles de Endogлина y una respuesta más pobre a TGF- β .

La validación del *Microarray* por *Western Blot*, se llevó a cabo empleando extractos proteicos de las BOECs. Como una comprobación adicional, en colaboración con el grupo de los Drs. López-Novoa y Rodríguez-Babero, parte de los genes seleccionados se validaron también por *Western Blot* a partir de extractos pulmonares de ratones heterocigotos *eng*^{+/-} (Figura 57). En el caso de los tejidos murinos se incluyó también Endogлина como un control positivo de la heterocigosis. En todos los casos, de nuevo, se corroboraron los datos obtenidos en los *Microarrays* y en la PCR cuantitativa.

Decidimos también estudiar los niveles de ARN mensajero de *endogлина* y *ALK1* en las BOECs, por PCR cuantitativa. Comprobamos que en los dos casos los niveles estaban disminuidos en las BOECs HHT respecto a las BOECs control (Figura 58). Sin embargo, los niveles de ARN mensajero de *endogлина* y *ALK1* no tienen por qué corresponder con los niveles de proteína en membrana en estas células, ya que en muchos casos la mutación da lugar a un mensajero inestable que será degradado, y desconocemos que porcentaje de estos mensajeros estamos detectando.

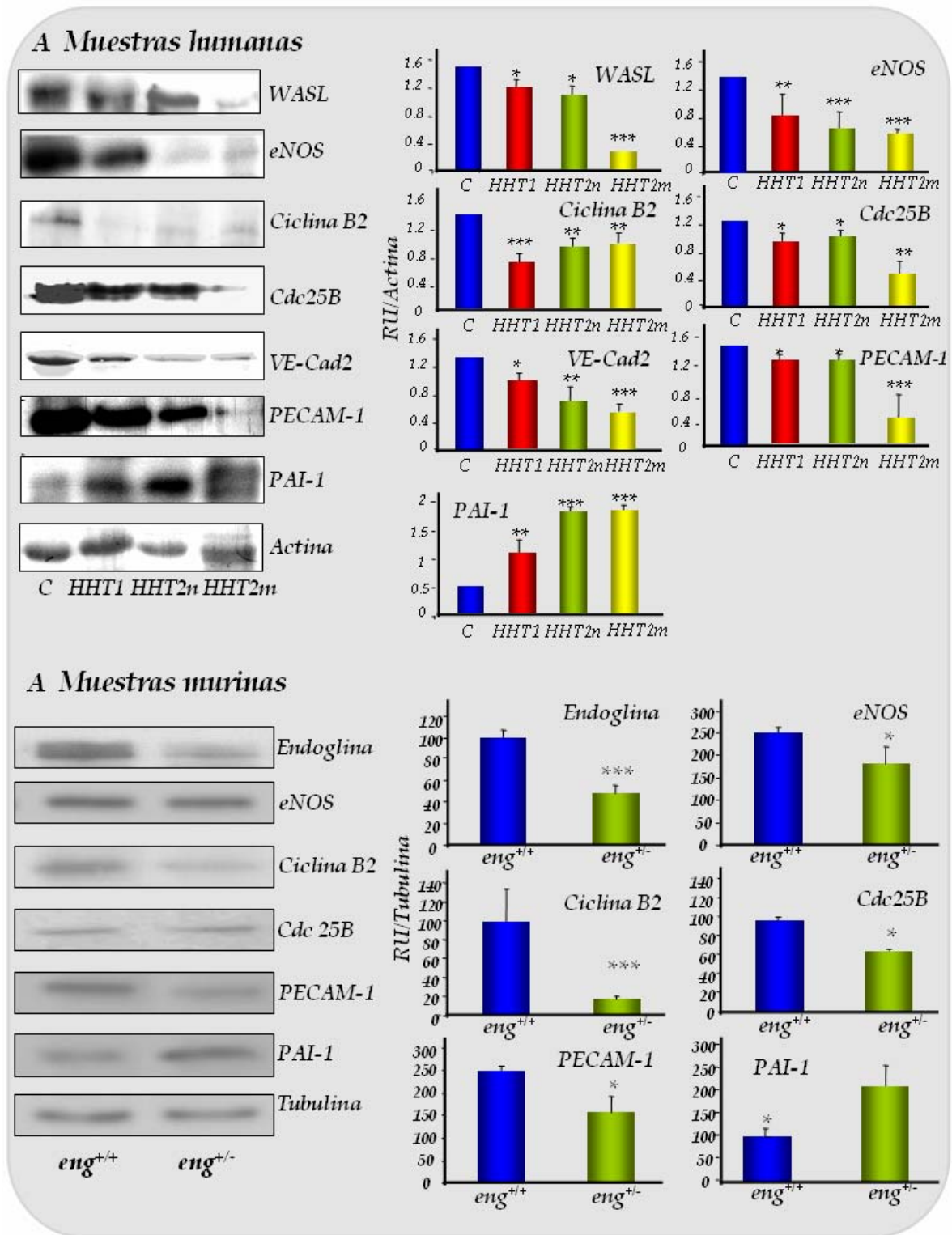


Figura 57. Niveles de expresión de las proteínas codificadas por los genes seleccionados. A la izquierda de la figura se muestran los Western Blot y a la derecha la densitometría de las bandas en cada caso. **A.** Extractos proteicos de BOECs. **B.** Extractos pulmonares de ratones heterocigotos $eng^{+/-}$.

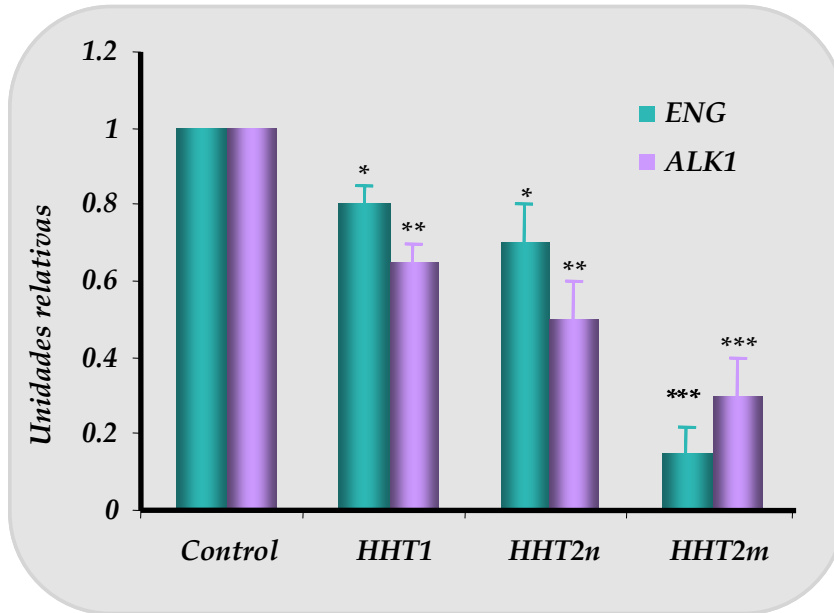


Figura 58. Niveles de expresión de ARN mensajero de endoglina y ALK1, en BOECs HHT, respecto a BOECs control. Se muestran los niveles de expresión en unidades relativas respecto a los niveles en las células control.

4.4 Estudio de la angiogénesis en BOECs HHT

A continuación, decidimos hacer ensayos fisiológicos que nos permitieran evaluar si los procesos en los que están implicados los genes que habíamos seleccionado, se encuentran afectados en las células de pacientes.

Un gran número de los genes diferencialmente expresados en el *Microarray*, se encuentra implicado en angiogénesis. Entre ellos, podríamos destacar: **Ang-2**, **Fyn**, tirosina quinasa de la familia de las proteínas Src, que interacciona con Ang-2 e induce migración y proliferación de células endoteliales (Godeny and Sayeski, 2006), **HMGB1** (*High-mobility group box 1 protein*), que induce migración de células endoteliales y la formación de vasos, (Schlueter *et al.*, 2005) o **EDG1** (*Endothelial Differentiation Sphingolipid G-Protein-coupled Receptor 1*), implicado en la señalización vía PDGF, favorece la maduración de los vasos y el reclutamiento de células de músculo liso vascular y pericitos (Favre *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, decidimos evaluar si las BOECs de pacientes llevaban a cabo un proceso de angiogénesis adecuado. Para ello, hicimos un ensayo de formación de tubos *in vitro*, sobre matriz de matrigel, con los cuatro tipos de BOECs, y HUVECs como un control positivo (Figura 59).

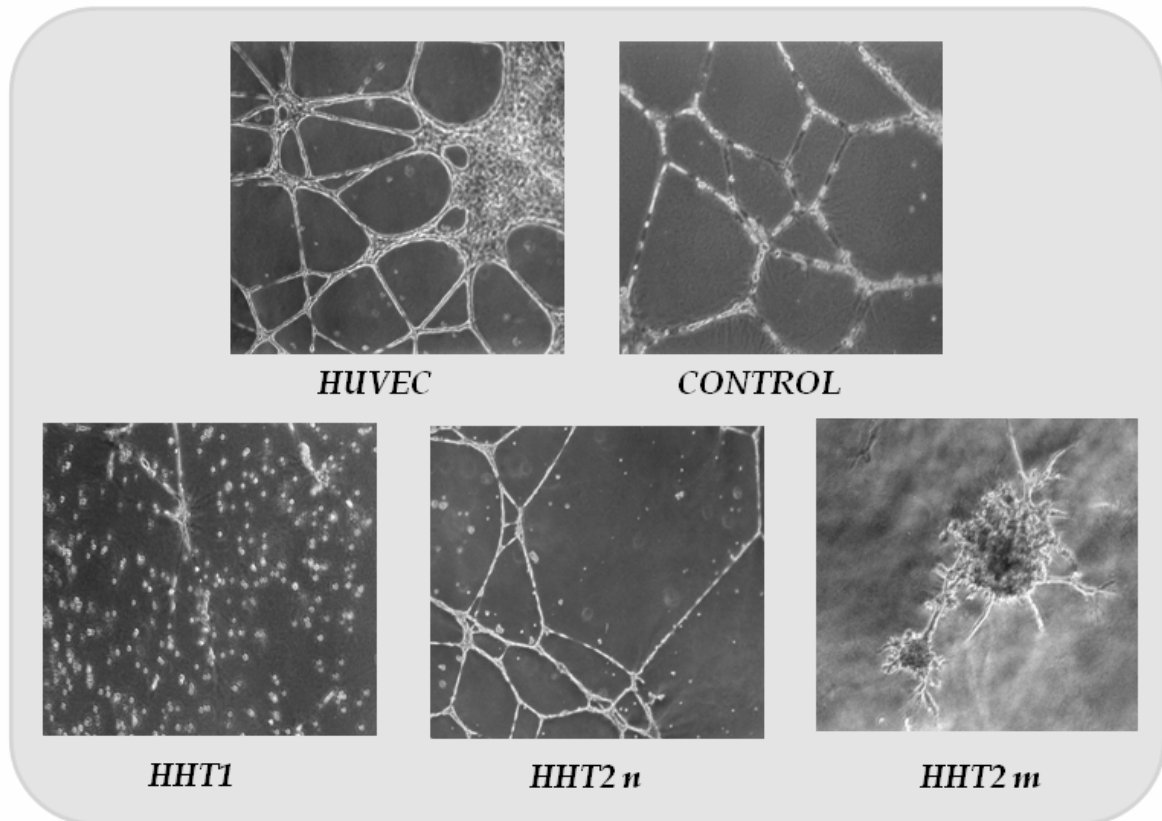


Figura 59. Ensayo de tubulogénesis de HUVECs, BOECs HHT y control sobre matrigel. Se muestran fotografías de las células transcurridas 12 horas desde su siembra.

Tras 12 horas desde que fueron sembradas las células, las BOECs control habían formado una red de tubos similar a la formada por las HUVECs. Sin embargo, las células HHT1 no fueron capaces de formar tubos. Las HHT2n formaron una red de forma similar a las células control, pero, sin embargo, esta red estaba formada por tubos más finos y frágiles. Las HHT2m tampoco fueron capaces de formar tubos, sino que se agrupaban formando aglomerados de células de los cuales surgían pequeños brotes de vasos, que no llegaba a extenderse. Existen, como vemos, claros defectos

en angiogénesis que sin embargo se manifiestan de forma distinta en cada tipo de célula.

Como otra prueba relacionada con angiogénesis decidimos analizar por ELISA los niveles de Ang-2, y también como una manera de validar el *Microarray* midiendo los niveles de proteína de forma alternativa al *Western Blot*. Elegimos la Ang-2 además de por su clara implicación en angiogénesis, porque se trata de un factor soluble que de encontrarse en niveles reducidos en el plasma de pacientes, podría emplearse como un criterio diagnóstico muy sencillo de medir. Así, a partir de muestras de plasma de 26 pacientes de HHT, HHT1 y HHT2 indistintamente, y 10 controles sanos, así como de ratones silvestres *eng*^{+/+} y heterocigotos *eng*^{+/-}, se midieron los niveles de Ang-2 circulante (Figura 60).

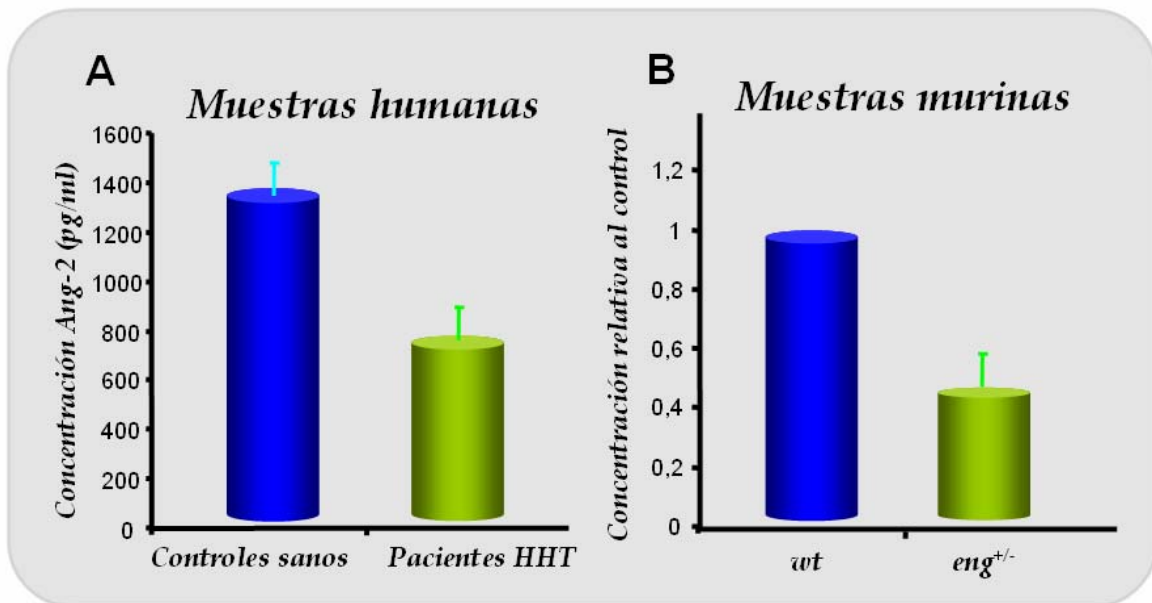


Figura 60. Niveles de Angiopoyetina-2 en plasma. A. Muestras de 26 pacientes de HHT y 10 controles sanos. **B.** Muestras de ratones silvestres *eng*^{+/+} (*wt*) y heterocigotos *eng*^{+/-}.

Tanto en el caso de los pacientes de HHT como en el de los ratones heterocigotos para *endogлина*, encontramos unos niveles de ~50% con respecto a los controles. La concentración de Ang-2 que obtuvimos en el caso de las muestras control se encontraba dentro de los márgenes de normalidad según el fabricante del *kit* de ELISA (1071-4389pg/ml),

mientras que las muestras de HHT se encontraban debajo de estos límites, lo que indicaba que el experimento era reflejo de la realidad y que puede ser empleado como un método de diagnóstico rápido. Existen trabajos que muestran alteraciones en los niveles de otra molécula proangiogénica, el VEGF, en plasma de pacientes de HHT. Sin embargo, los datos al respecto son escasos y contradictorios (Cirulli *et al.*, 2003; Sadick *et al.*, 2005a; Sadick *et al.*, 2005b). Hasta la fecha nada se había publicado con respecto a los niveles de Ang-2 en pacientes de HHT.

El descenso de Ang-2 que encontramos es muy significativo y puede ser responsable de importantes alteraciones en el proceso de angiogénesis, lo que llevaría a una deficiente reparación cuando se producen roturas de capilares o de las propias fístulas que se forman frecuentemente en estos pacientes.

4.5 Estudio de la migración de células endoteliales de pacientes de HHT

Ensayamos también la capacidad de migración de las BOECs HHT, y lo hicimos mediante un ensayo de "cicatrización" *in vitro* o *wound healing*. Sembramos las células de los pacientes y las células control e hicimos una raya o herida que recorría el pocillo de extremo a extremo. A continuación, tomamos fotos cada 4 horas estudiando el tiempo que tardaban las células en invadir y cerrar la herida (Figura 61).

Las células control cierran la herida antes de las 18 horas, mientras que las células HHT1 y HHT2n no lo logran hasta pasadas 24h. Las HHT2m, pese a ser las primeras que comienzan a migrar, lo hacen de forma desordenada y a las 24 horas aún no han logrado cicatrizar. Sería interesante, en un futuro próximo, completar este experimento con un ensayo de migración de células endoteliales en cámaras *Transwell*, en las cuales las células migran en respuesta a un gradiente de quimioquinas.

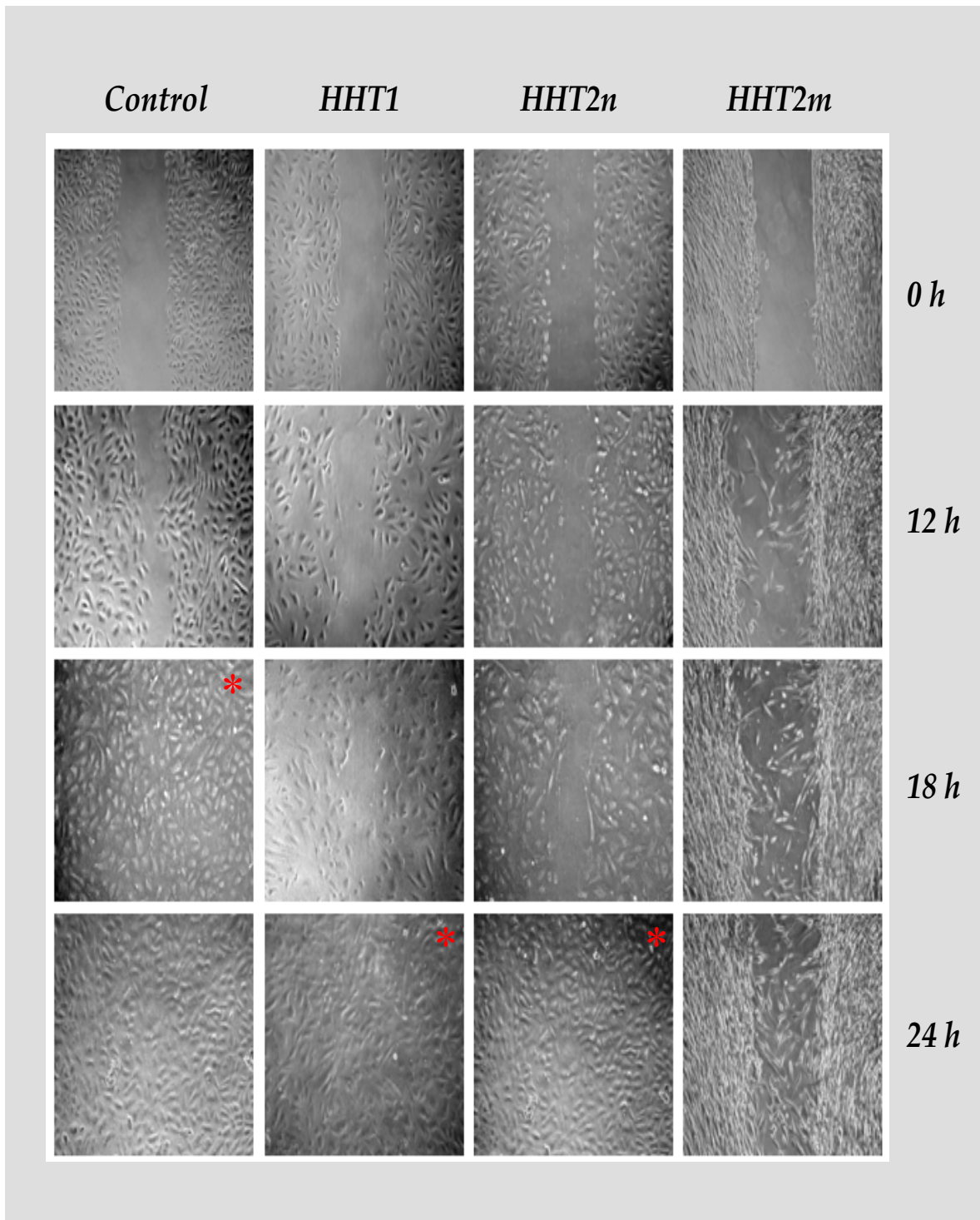


Figura 61. Ensayo de wound healing con BOECs HHT y BOECs control. Se tomaron fotografías a las 0, 12, 18 y 24 horas. Los asteriscos rojos representan el momento en el que la herida se encontraba cerrada.

Encontramos defectos en migración en las células procedentes de pacientes, lo cual concuerda con el hecho de que estas células tengan alterada la vía de señalización ALK1/Endogлина. Estos defectos en migración pueden en parte ser causa de que no se lleve a cabo un proceso de angiogénesis adecuado.

4.6 Estudio de la adhesión de células endoteliales de pacientes de HHT

Estudiando los genes diferencialmente expresados en el *Microarray*, comprobamos que un gran número de ellos codificaban proteínas implicadas en adhesión, tanto entre células endoteliales como célula endotelial-leucocito o célula endotelial-lámina basal (Figura 62). De entre estas proteínas podríamos destacar:

- **ESAM** (*Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*) y **VE-Cadherina 2**: ambas están implicadas en adhesión entre células endoteliales mediante interacciones homotípicas. ESAM se encuentra en uniones estrechas entre células (Nasdala *et al.*, 2002) y también se ha descrito que participa en extravasación de neutrófilos y regulación de la permeabilidad vascular (Wegmann *et al.*, 2006). VE-Cad 2 se encuentra en uniones adherentes entre células endoteliales adyacentes (Cavallaro *et al.*, 2006) y mediante su interacción con beta-catenina parece que puede regular el citoesqueleto de actina (Chiu *et al.*, 2004).

- **PECAM-1** y **JAM-A** (*Junctional Adhesion Molecule-A*): Ambas proteínas pertenecen a la superfamilia de las Inmunoglobulinas, se expresan tanto en células endoteliales como leucocitos y están implicadas directamente en el paso de éstos a través de la barrera endotelial (Nourshargh *et al.*, 2006). PECAM-1 regula la migración transendotelial mediante interacciones homotípicas, mientras que JAM-A parece que puede formar tanto interacciones homotípicas como heterotípicas con la integrina LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*) (Muller, 2003).

- **ITGA6** (Integrina $\alpha 6$): Integrina implicada directamente en la adhesión a laminina, proteína fundamental, junto con el colágeno tipo IV, de la lámina basal perivascular (Wang *et al.*, 2005).

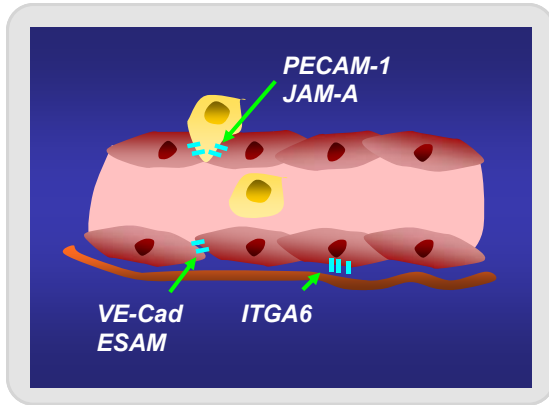


Figura 62. Moléculas implicadas en la adhesión de células endoteliales cuyos genes estaban diferencialmente expresados en el Microarray. Se muestran procesos de adhesión CE-CE, CE-leucocito y CE-lámina basal.

Hicimos un ensayo de adhesión a sustrato con BOECs HHT y BOECs control, empleando como sustrato fibronectina. Dejamos adherir las células al sustrato y tras una hora lavamos y teñimos con cristal violeta. Mediante un ensayo colorimétrico calculamos el número de células que habían permanecido adheridas, comparando con las BOECs control (Figura 63).

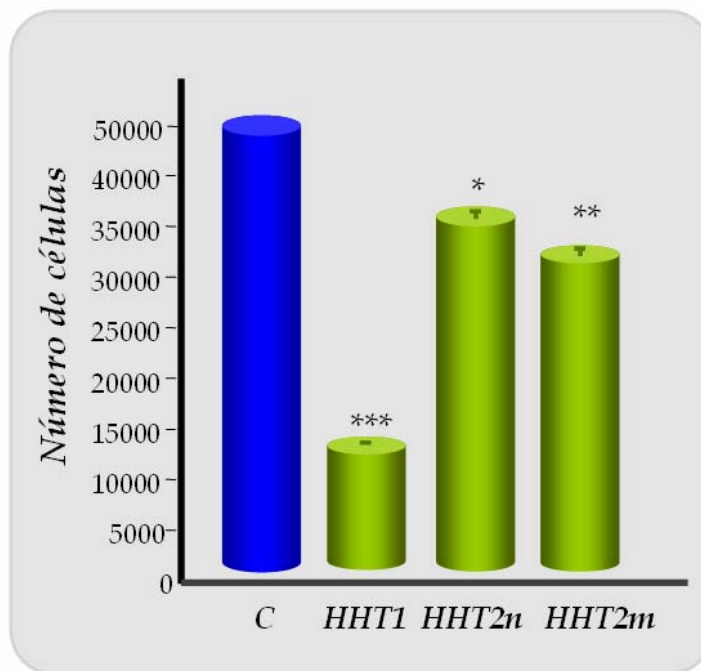


Figura 63. Ensayo de adhesión a fibronectina empleando BOECs HHT y BOECs control. Se muestra el número de células que permanecieron adheridas al sustrato tras una hora de adhesión. En todos los casos se emplearon triplicados. Se muestra un experimento representativo.

La fibronectina, al igual que la vitronectina, son proteínas de matriz implicadas en la migración de células endoteliales durante la angiogénesis (Hallmann *et al.*, 2005). El experimento mostró que la adhesión a fibronectina se encontraba disminuida en todas las células HHT, fundamentalmente en las HHT1. Como en el *Microarray* no encontramos alterada la expresión de ninguna integrina implicada en la adhesión a fibronectina, esta disminución de la adhesión podría deberse a un efecto indirecto causado por posibles alteraciones en la regulación citoesqueleto debidas a la falta de Endogлина, e incluso también de VE-Cadherina 2.

Otra razón que explicaría la disminución de adhesión a fibronectina, podría ser el hecho de que el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa o uPA (*Urokinase-type Plasminogen Activator*) unido a su receptor uPAR (*Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*), interaccionan con la integrina $\alpha 5\beta 1$, implicada en la adhesión a fibronectina, aumentando la adhesión a esta proteína. Los niveles de PAI-1, inhibidor de uPA, parecen estar aumentados en estos pacientes, por lo que disminuye la interacción del complejo uPA/uPAR con la integrina, y, por tanto, la adhesión a fibronectina (Figura 64).

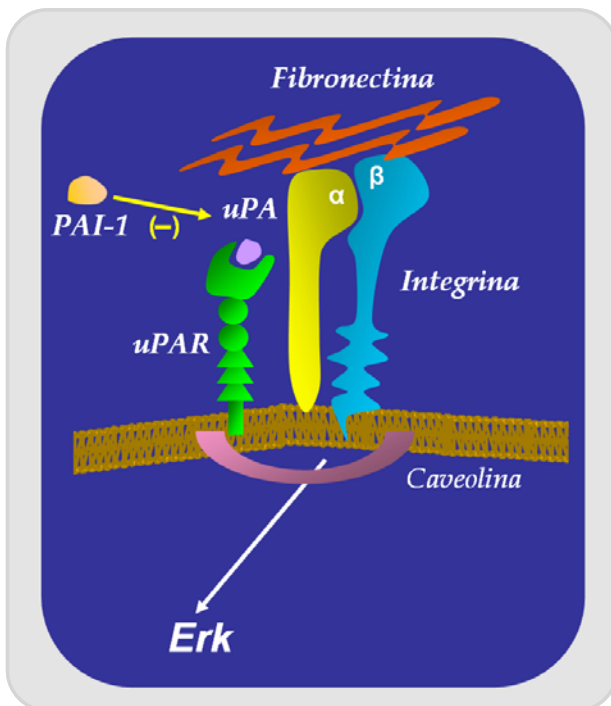


Figura 64. La interacción entre el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa unido a su receptor y la integrina $\alpha 5\beta 1$ favorece la adhesión a fibronectina. PAI-1 inhibe la actividad de uPA, impidiendo su interacción con la integrina.

Sería interesante repetir este ensayo probando la adhesión a laminina, proteína que forma parte de la lámina basal periendothelial, ya que en el *Microarray* encontramos una disminución en la expresión de la integrina α_6 , implicada directamente en la adhesión a esta proteína.

4.7 Posibles alteraciones en la respuesta inflamatoria en pacientes de HHT

Aunque no hicimos ningún ensayo de migración transendotelial, es muy probable que se encuentre afectada en estos pacientes. Se han descrito seis moléculas expresadas por las células endoteliales que están implicadas en este proceso, considerando migración transendotelial únicamente como al proceso de diapédesis, es decir, el paso del leucocito a través de la barrera endotelial, sin tener en cuenta la primera adhesión al endotelio ni el movimiento de rotación del leucocito sobre éste.

Estas moléculas son: **PECAM** y **CD99**, se expresan tanto en la célula endotelial como en el leucocito y forman interacciones homotípicas entre las dos células; **JAM-A, B** y **C**, se cree que pueden formar con el leucocito interacciones tanto homotípicas como heterotípicas, uniéndose en este caso a las integrinas LFA-1, VLA-4 y Mac-1, respectivamente; y, finalmente, **VE-Cadherina**, implicada en la adhesión entre células endoteliales, desaparece de la membrana para permitir el paso del leucocito (Muller, 2003) (Figura 65). De estas seis moléculas, tres, PECAM, JAM-A y VE-Cadherina, se encuentran disminuidas en las células de los pacientes, por lo que podríamos esperar una alteración en la extravasación de leucocitos a los tejidos, que conduzca a una respuesta inmune deficiente. A este hecho se podrían sumar las posibles alteraciones presentes en los macrófagos de los pacientes, debido a la falta de Endoglin y, quizá, a una disminución en la vía de señalización de ALK1.

Una respuesta inmune alterada podría explicar, en parte, la elevada frecuencia de abscesos cerebrales en pacientes de HHT. Sería interesante, por tanto, realizar ensayos de migración transendotelial *in vitro* empleando

células endoteliales enfermas y monocitos sanos y viceversa, estudiando así la posible implicación de cada uno en la patogénesis.

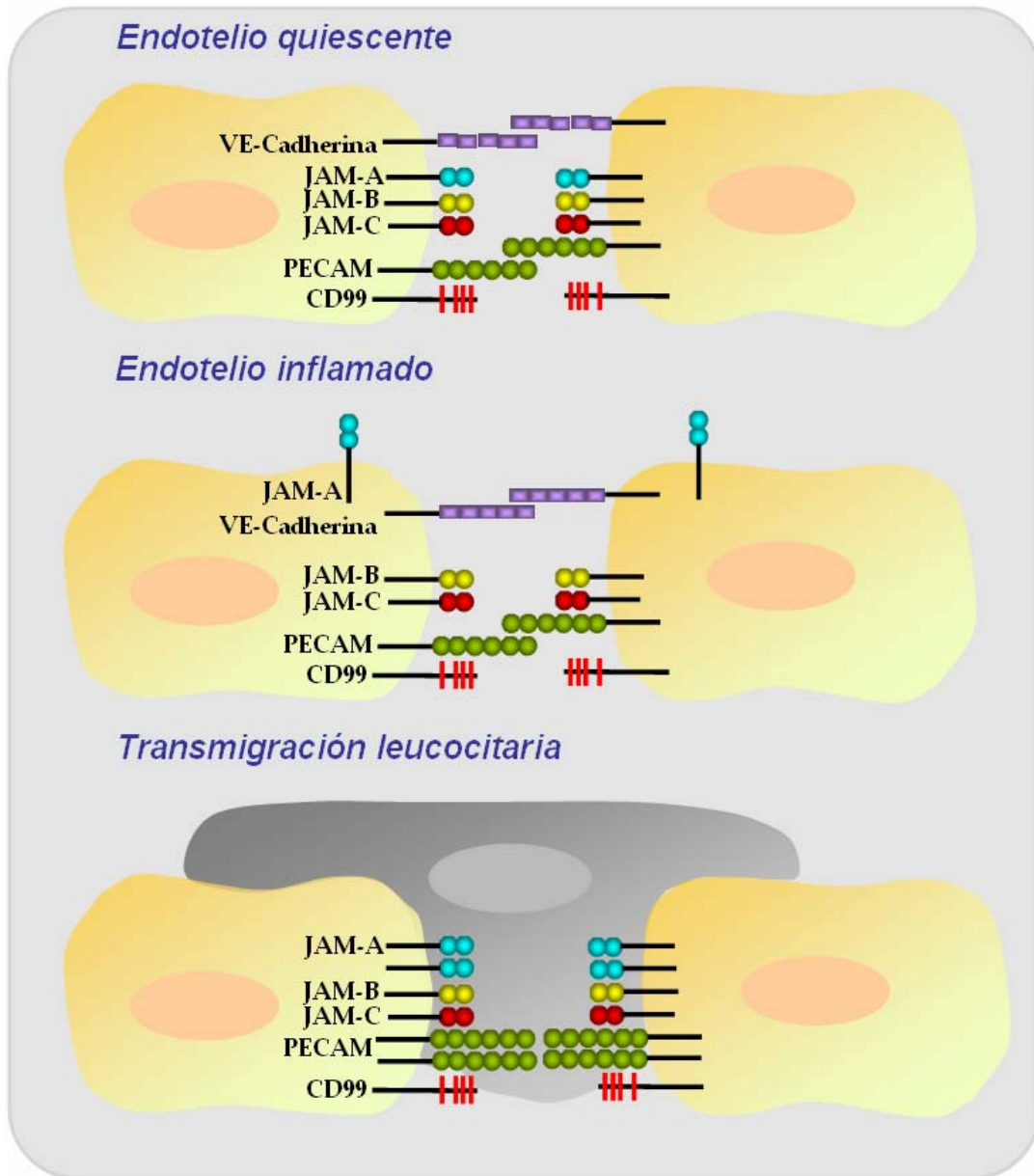


Figura 65. Migración de leucocitos a través de la barrera endotelial. Se muestra el proceso de migración transendotelial o diapédesis y las moléculas de adhesión presentes en células endoteliales implicadas en el proceso.

Para evaluar las posibles alteraciones en la respuesta inflamatoria en pacientes de HHT, nos planteamos, como un experimento a realizar a corto plazo, inducir un estado inflamatorio en la mucosa nasal de ratones heterocigotos *eng*^{+/-} y silvestres *eng*^{+/+} y comparar la resolución de la inflamación en ambos casos.

4.8 Estudio de la organización del citoesqueleto en células endoteliales de pacientes de HHT

A continuación, decidimos estudiar las posibles alteraciones en el citoesqueleto de las células endoteliales de estos pacientes. Por un lado, encontramos en el *Microarray* genes diferencialmente expresados, algunos que codifican proteínas del citoesqueleto, como **WASL**, y otros, proteínas implicadas en su organización, como las Rho-GTPasas **Rho-GDI 2** (*Rho GDP-dissociation inhibitor 2*), **Rho BTB1** (*Rho BTK Binding Protein 1*) y **Rho J**. Por otro lado, en nuestro laboratorio se había demostrado que aparte de su papel como correceptor de TGF- β , Endoglina es capaz de interactuar por su dominio citoplásmico con componentes de la familia de proteínas con dominios LIM, como son Zyxin y ZRP1 (Conley et al., 2004; Sanz-Rodriguez et al., 2004b).

168

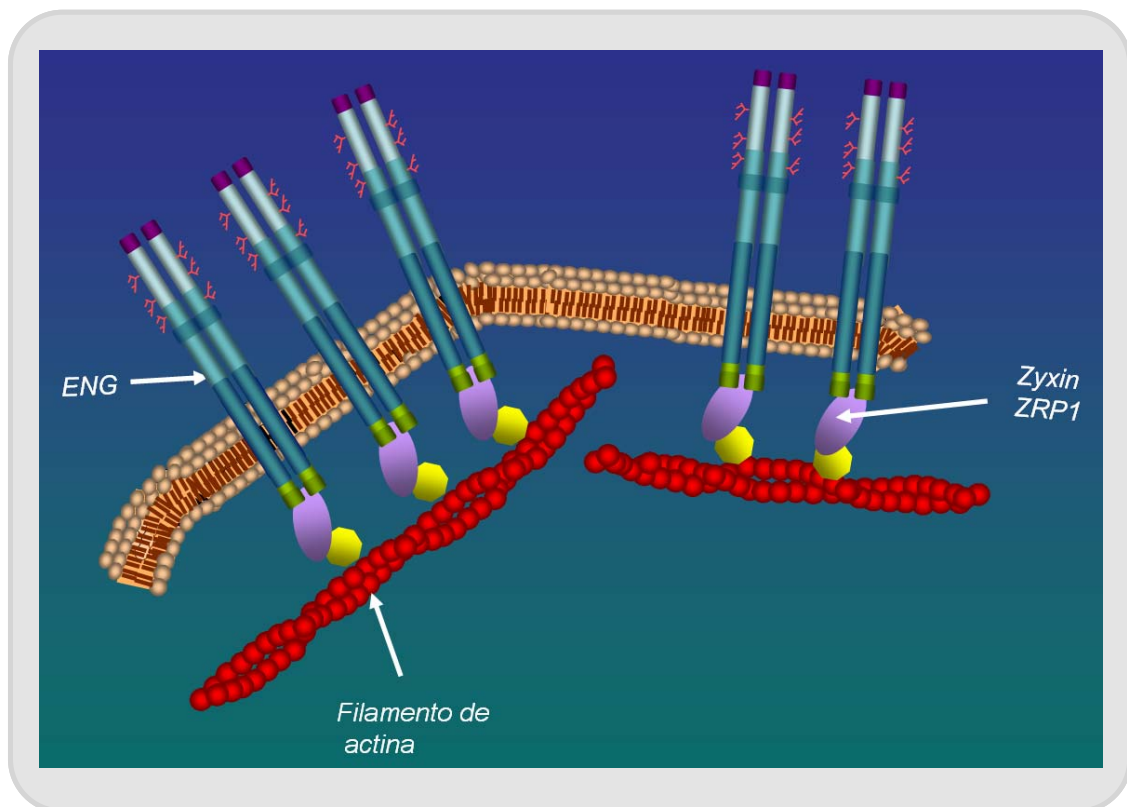


Figura 66. Esquema representativo de la interacción de Endoglina con miembros de la familia de proteínas con dominios LIM. Endoglina dirige la formación de las fibras de estrés de forma paralela a la membrana mediante su interacción con complejos proteicos implicados en la polimerización del citoesqueleto de actina.

Estas proteínas, a su vez, actúan como un lugar de ensamblaje de complejos proteicos implicados en la regulación de la polimerización del citoesqueleto de actina, como los complejos Arp2/3 (Bernheim-Groswasser *et al.*, 2002). Así, Endoglina, en células endoteliales, permite que la polimerización de las fibras de actina se produzca de forma paralela a la membrana gracias a su interacción con estos complejos (Figura 66).

Al presentar estas células niveles reducidos de Endoglina y, presumiblemente, según los datos obtenidos en el *Microarray*, de otras moléculas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina, quisimos estudiar si el citoesqueleto se encontraba alterado en las BOECs de pacientes HHT. Para ello, hicimos en primer lugar una tinción para F-actina y observamos las células por microscopía confocal (Figura 67).

En las BOECs control se observan fibras de estrés recorriendo la célula longitudinalmente. Sin embargo, en las células que presentan una mutación en *endoglina* o en *ALK1*, tal como esperábamos, el citoesqueleto se encuentra totalmente desestructurado, observándose agrupaciones de fibras y múltiples núcleos de polimerización.

Como una prueba adicional, cotransfectamos BOECs control con un ARN interferente que interrumpe la expresión de Endoglina y un vector de expresión para la proteína verde fluorescente (EGFP; *Enhanced Green Fluorescent Protein*) (Figura 68). La interferencia se produce por la unión a una región de 23 pares de bases en el exón 4 del ARNm de *endoglina*. El interferente forma una estructura secundaria en forma de horquilla que impide la traducción del mensajero. Tras 48 horas de la transfección, el citoesqueleto quedó totalmente desestructurado, probando que la presencia de Endoglina, en células endoteliales, es fundamental para el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto.

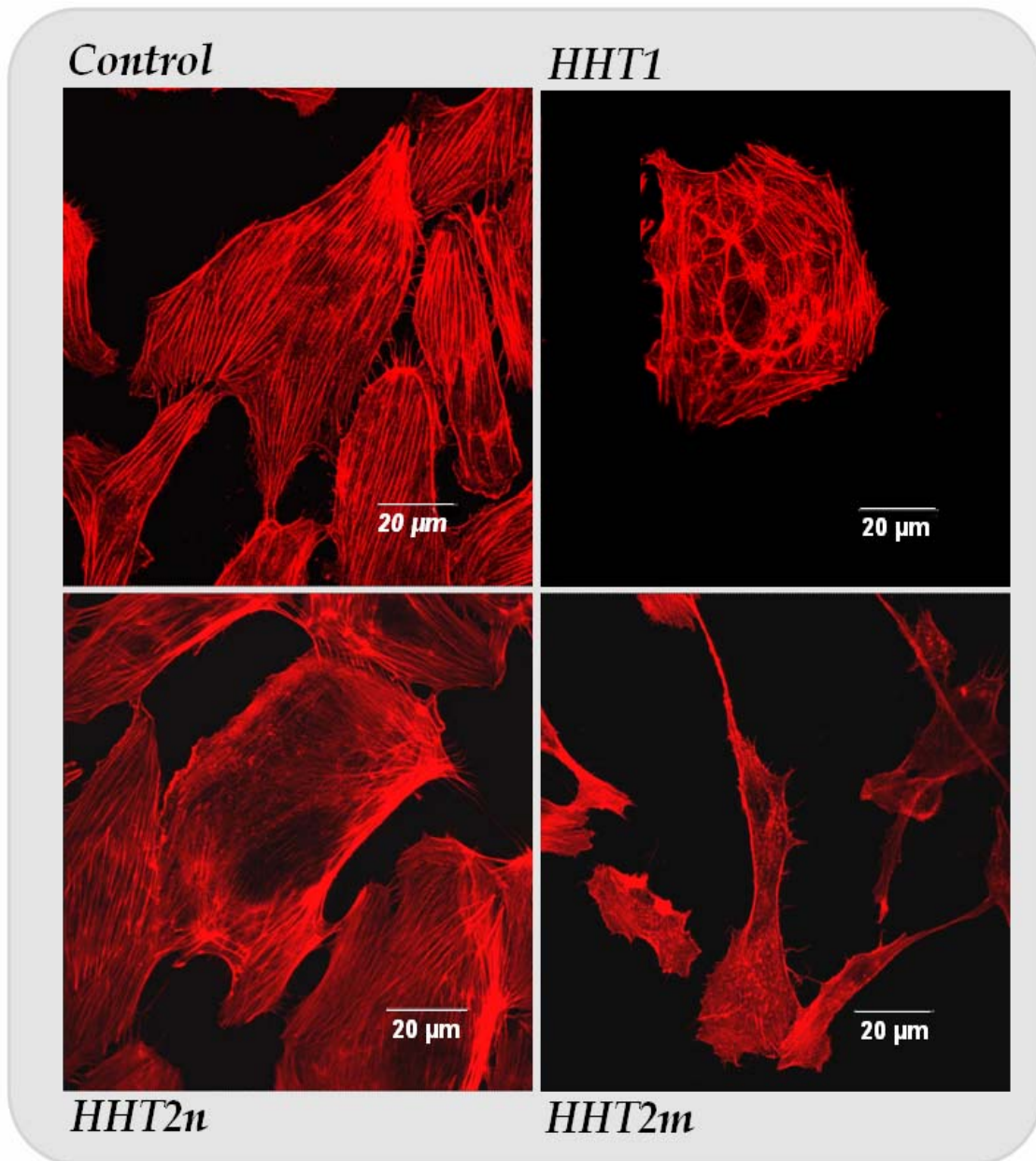
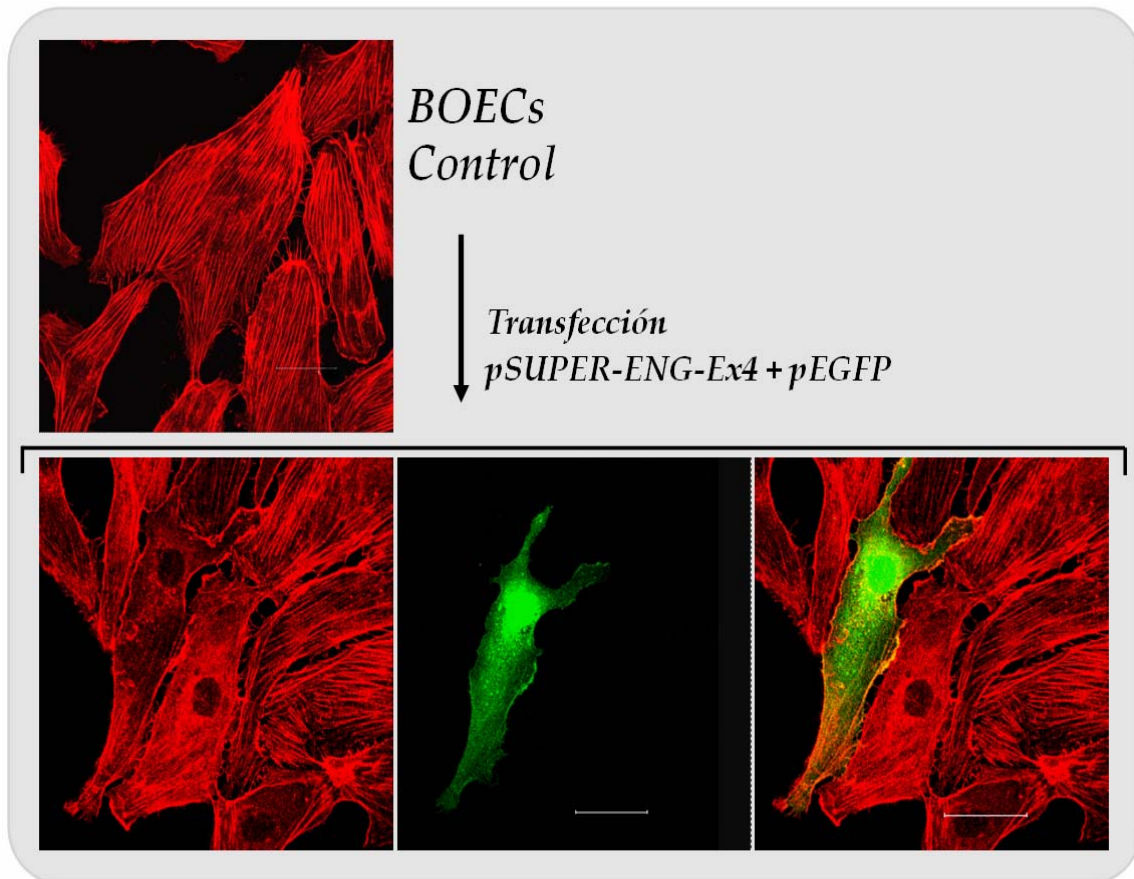


Figura 67. Citoesqueleto de actina de BOECs HHT y control. Se muestran imágenes de microscopía confocal de una tinción para F-actina en BOECs HHT y controles. En las células endoteliales de pacientes se observa un citoesqueleto totalmente desestructurado.

Figura 68 (Página 171). Citoesqueleto de actina de BOECs control transfectadas con un ARN interferente de Endoglin. Se muestran imágenes de microscopía confocal de una tinción para F-actina en BOECs control cotransfectadas con el ARN interferente pSUPER-ENG-Ex4 y pEGFP. Pasadas 48 horas desde la transfección, las células que incorporaron los plásmidos presentaban un citoesqueleto completamente desestructurado.



Finalmente, cotransfectamos BOECs HHT1 y HHT2 con un vector de expresión de Endogлина (pCMV5-ENG) y otro de EGFP, con el fin de estudiar si se producía una reestructuración del citoesqueleto (Figura 69). En el caso de las BOECs HHT1, 48 horas después de la transfección podían observarse fibras de estrés recorriendo la célula de lado a lado, y en el caso de las HHT2, observamos una reestructuración parcial.

Sería interesante repetir este experimento con una transfección estable en lugar de transitoria y empleando vectores retrovirales en lugar de plásmidos, ya que las células endoteliales son difíciles de transfectar. Una transfección estable permitiría a las células adaptarse y volver a regular la polimerización del citoesqueleto de actina. La falta de Endogлина en células HHT, así como la alteración en los niveles de expresión y en las funciones de otras proteínas, están afectando la regulación de la polimerización del citoesqueleto, por lo que para observar un efecto claro de reestructuración sería conveniente estudiarlo a más largo plazo. Por otro lado, es posible que el mero aumento de los niveles de Endogлина no sea

suficiente para una recuperación total de las funciones de las células ya que, con la evolución de la enfermedad, un gran número de vías de señalización podría encontrarse alterado.

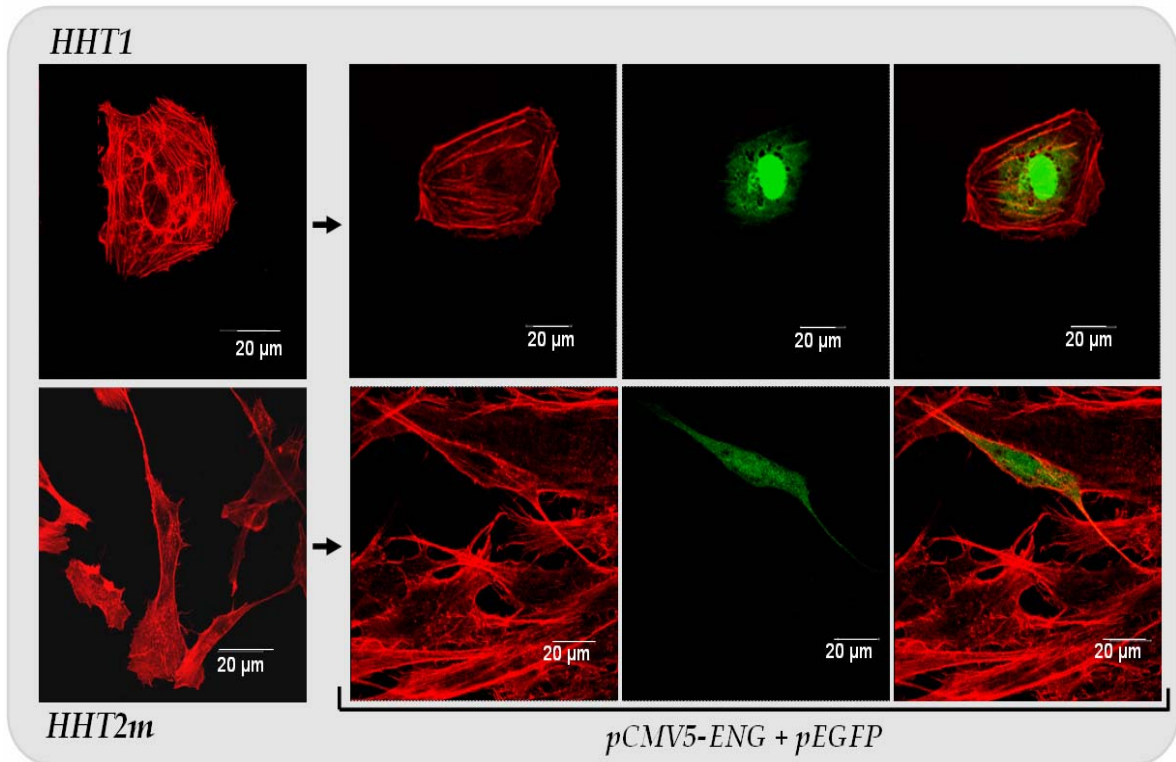


Figura 69. Citoesqueleto de actina de BOECs HHT1 y HHT2 transfectadas con un vector de expresión de Endoglin. Se muestran imágenes de microscopía confocal de una tinción para F-actina en BOECs HHT1 y HHT2m cotransfectadas con los vectores de expresión pCMV5-ENG y pEGFP. Se observa una reestructuración del citoesqueleto en HHT1 y una reestructuración parcial en HHT2m.

4.9 Estudio del ciclo celular en células endoteliales de pacientes de HHT

Al mantener los cultivos de BOECs procedentes de pacientes de HHT observábamos claras diferencias en su tasa de proliferación con respecto a las BOECs control. Por otro lado, en el *Microarray* encontramos un gran número de genes implicados en ciclo celular que presentaban una expresión diferencial con respecto a las células control. Entre estos genes se encuentran:

- **Cdc2** (*Cell Division Cycle 2*): miembro de la familia de serina/treonina quinasas, es la subunidad catalítica de un complejo proteico que regula la entrada en mitosis (MPF; *M-phase promoting factor*) y que es esencial para los puntos de regulación G1/S y G2/M en el ciclo celular de eucariotas. Recientemente, se ha descrito que Cdc2 regula proliferación, migración e invasión de células endoteliales durante la angiogénesis tumoral al fosforilar al factor de transcripción RUNX2 (Qiao *et al.*, 2006).
- **Cdc25b**: fosfatasa que activa los complejos en los que se encuentran ciclina A y ciclina B1, permitiendo la entrada en mitosis (Nilsson and Hoffmann, 2000).
- **Ciclina B2**: ciclina que se une y activa p34cdc2, proceso fundamental para la entrada en mitosis en células eucariotas (Nigg *et al.*, 1992).

Parecía existir una alteración en los niveles de proteínas que regulan la entrada en mitosis común a todos los tipos de células HHT. Por ello, decidimos en primer lugar testar la proliferación y viabilidad de las BOECs HHT y controles, y lo hicimos mediante un sistema MTT (Metil Tetrazolio) (Figura 70A). Este ensayo se basa en la reducción de sales de tetrazolio. Las sales de tetrazolio son de color amarillo y pueden ser reducidas por células metabólicamente activas gracias a sus enzimas deshidrogenadas, dando como producto cristales de formazán, de color morado, que pueden ser solubilizados y cuantificados por espectrofotometría.

Comprobamos, como ya habíamos visto al describir los cultivos primarios, que las BOECs HHT1 y las HHT2n proliferan más lentas que las controles, mientras que las HHT2m lo hacen más rápido. La diferencia entre las células control y las HHT2m no fue muy grande debido a que al aumentar el número de pase de estas células su velocidad de proliferación disminuye, probablemente debido a senescencia. En el momento de realizar este ensayo, las células se encontraban ya en pase 7.

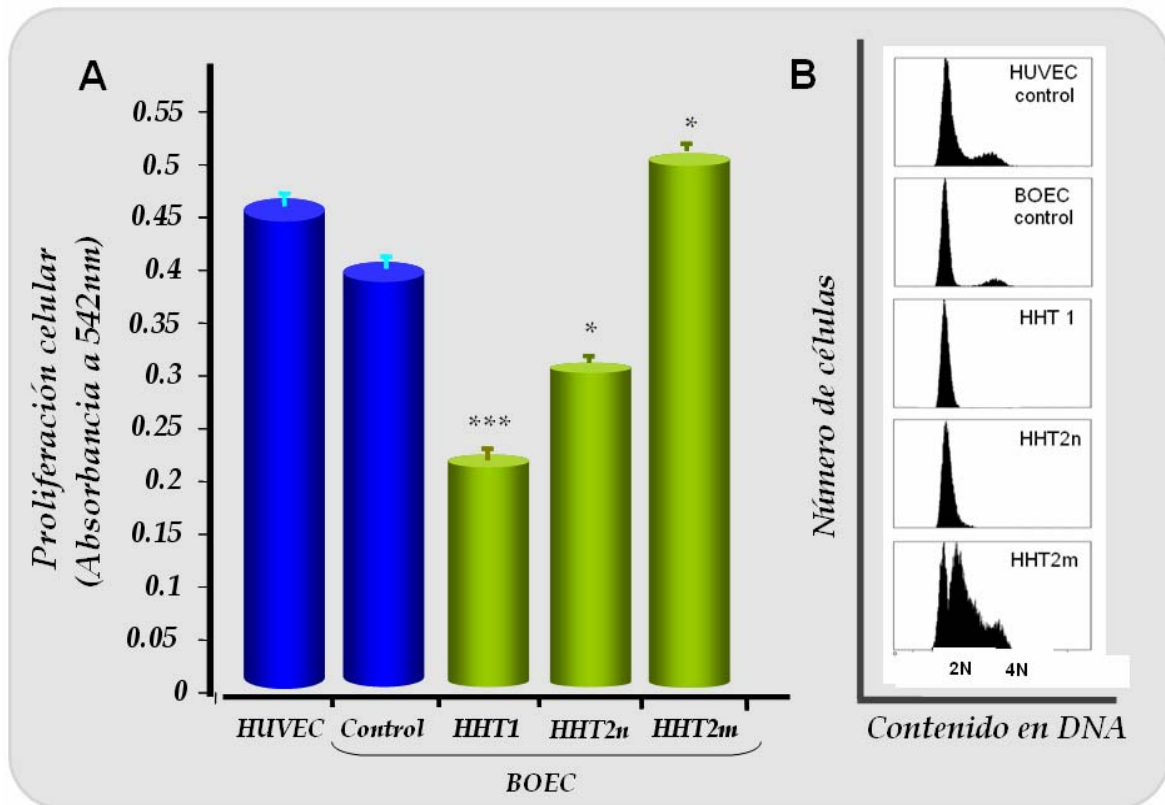


Figura 70. A. Ensayo de MTT empleando BOECs control, BOECs HHT y HUVECs. La medida de absorbancia es indicativa de la tasa de proliferación de las células. **B. Perfiles de ciclo celular de las BOECs control, BOECs HHT y HUVECs.** El ciclo celular se midió por citometría de flujo mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI; Propidium Iodide).

Como una prueba adicional, estudiamos los perfiles de ciclo celular por citometría de flujo, marcando el ADN con yoduro de propidio en cultivos cuyos ciclos celulares no fueron sincronizados (Figura 70B). En el caso de las BOECs HHT1 y HHT2n, la mayor parte de las células se encontraban en fase G1 (pico 2N en la figura), sin observarse apenas células en fase de síntesis o en G2/M (pico 4N en la figura). En las células HHT2m, por el contrario, se observaba un gran número de células en fase de síntesis, formando un pico poco habitual en estos perfiles, típico de células acumuladas en fase de síntesis.

Vimos, que a pesar de tener una expresión disminuida de genes implicados en la entrada en mitosis, en las células HHT2m se observaba un alto porcentaje de células en fase G2/M. Dado que únicamente hemos

seleccionado los genes comunes a todos los tipos de células HHT, sería interesante estudiar qué genes, diferencialmente expresados en este tipo de células, son responsables de su elevado índice de proliferación. Tienen que existir, necesariamente, mecanismos alternativos que conduzcan a un incremento en su tasa de división.

4.10 Posibles alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico en células endoteliales de pacientes de HHT

Recientemente, se han publicado varios trabajos que prueban la existencia de alteraciones de la fisiología vascular de ratones heterocigotos *eng*^{+/-} a causa de la disminución en los niveles de Endogлина. La enzima eNOS produce, en células endoteliales, óxido nítrico capaz de inducir una vasodilatación. En ratones heterocigotos *eng*^{+/-} se ha encontrado una disminución en los niveles de expresión de esta enzima (Jerkic et al., 2004). TGF-β induce un aumento de la expresión de eNOS vía Smad2 (Saura et al., 2002). En parte, esta estimulación se debe a Endogлина, la cual favorece la estabilidad de Smad2 al inhibir su ubiquitinación por Smurf2 (Santibanez et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito que Endogлина estabiliza a eNOS e induce la producción de NO, ya que actúa favoreciendo el acoplamiento de la enzima a la chaperona HSP90 (Toporsian et al., 2005). La falta de Endogлина conducirá, por tanto, a una menor síntesis de NO (Figura 71). Así, en los ratones *eng*^{+/-} la respuesta miogénica está alterada debido a la falta de NO, de forma que las arterias no son capaces de amortiguar los cambios fisiológicos de la presión sanguínea.

El NO formado se une rápidamente al grupo hemo de la hemoglobina o a aniones superóxido dando lugar a nitritos y peroxinitritos. En células con una menor expresión de Endogлина, se forma menos NO y aumenta, por tanto, la cantidad de radicales libres, pudiendo causar daños en la célula debido a estrés oxidativo.

Por otro lado, la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) es una enzima capaz de producir prostaglandinas y prostaciclina vasodilatadoras. Se sabe que en

células deficientes para COX-2, el NO es capaz de estimular la liberación de prostaglandinas y prostaciclina vasodilatadoras (Clancy *et al.*, 2000). Igualmente, en células deficientes para Endoglina, la expresión de COX-2 aumenta (Figura 71), posiblemente debido a un mecanismo de compensación que permita la producción de factores vasodilatadores que compensen la falta de NO (Jerkic *et al.*, 2006).

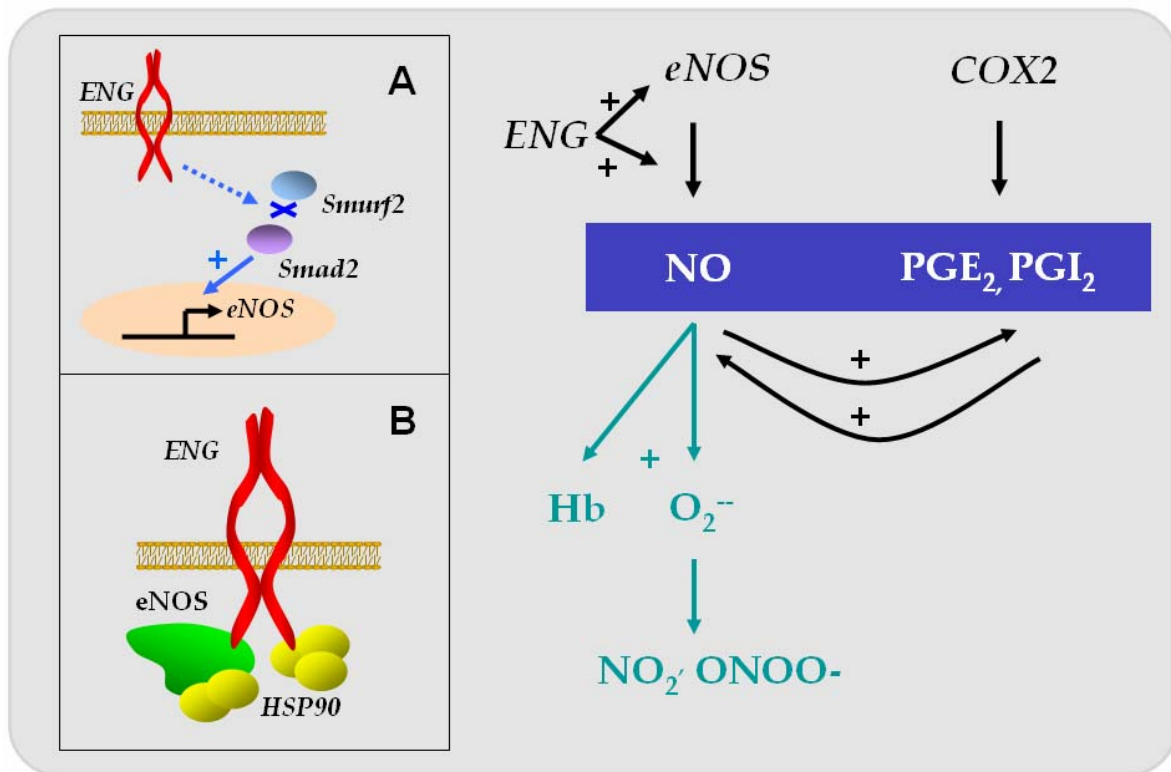


Figura 71. Esquema representativo de los sistemas productores de factores vasodilatadores en células endoteliales e implicación de Endoglina. Se muestra la síntesis de vasodilatadores por las enzimas óxido nítrico endotelial y ciclooxigenasa-2. Endoglina inhibe la ubiquitinación de Smad2 por Smurf2, el aumento de la señalización vía Smad2 conduce a un incremento en la expresión de eNOS (A). Endoglina, a su vez, favorece el acoplamiento entre eNOS y la chaperona HSP90 (B). La falta de Endoglina, por tanto, conduce a una menor producción de óxido nítrico. Parecen existir mecanismos de compensación entre ambas vías. Esquema elaborado a partir de datos publicados (Jerkic *et al.*, 2004; Jerkic *et al.*, 2006; Santibanez *et al.*, 2006; Toporsian *et al.*, 2005).

Así, decidimos estudiar los niveles de COX-2 en las células procedentes de pacientes con respecto a controles. Medimos los niveles de ARNm por PCR cuantitativa (Figura 72) y comprobamos, en concordancia con el trabajo de Jerkic, que los niveles de expresión de esta enzima se

encuentran aumentados en todas las células HHT. Como era de esperar, los datos de los *Microarrays* mostraron una disminución de los niveles de expresión de *NOS3*, gen que codifica eNOS y que validamos por *Western Blot* y PCR cuantitativa.

Tal como se ha postulado (Jerkić et al., 2006), podrían existir mecanismos de compensación que conduzcan a un aumento de los niveles de COX-2 con el fin de producir factores vasodilatadores que suplan la falta de NO. Es posible, también, que los mecanismos compensatorios no sean suficientes para evitar alteraciones en la fisiología vascular de estos pacientes, debido al alto número funciones alteradas en sus células.

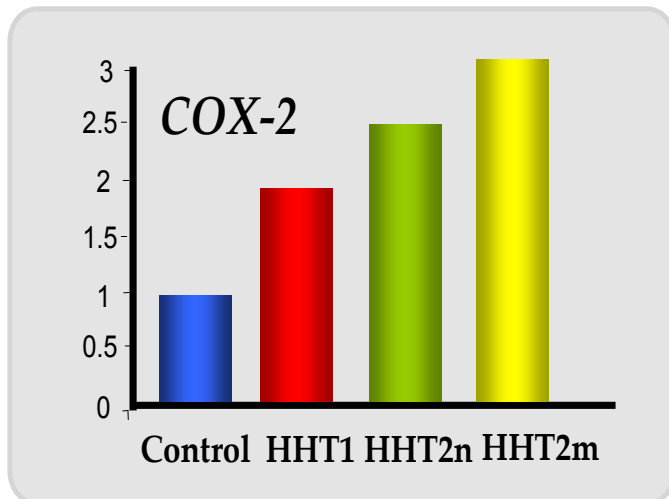


Figura 72. Niveles de expresión de COX-2 en BOECs HHT y control. Se muestran los niveles de ARNm de COX-2 medidos por PCR-cuantitativa. El experimento se repitió dos veces, con muestras por triplicado y se hicieron dos análisis normalizados frente a los niveles de expresión de los genes endógenos ARNr 18S y GAPDH.

Discusión General y Modelo

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria es una enfermedad genética caracterizada fundamentalmente por alteraciones en la estabilidad de los capilares y en el remodelado vascular. En células endoteliales existen dos vías de señalización de TGF- β alternativas, vías que regulan la expresión de genes diana implicados en las fases de activación y resolución de la angiogénesis. La tendencia a considerar la angiogénesis como un proceso constituido por dos fases diferenciables en el tiempo, es probablemente una simplificación excesiva. Para que se dé la formación de un nuevo vaso es necesario, en primer lugar, que se desorganice la lámina basal y se degrade matriz extracelular permitiendo así migrar a células endoteliales. Sin embargo, esta degradación de proteínas de la matriz debe darse en la zona que rodea al vaso y es importante que no se dé una degradación descontrolada que deje a las células sin puntos de apoyo para migrar.

De esta forma, debe existir un balance entre proteasas y antiproteasas que permita un estrecho control de en qué zona se produce la degradación y en qué magnitud. Del mismo modo, al formarse el vaso, existe una liberación de factores proangiogénicos de forma local, en la zona de elongación, mientras que a poca distancia, en la zona recién formada, debe favorecerse el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso vascular, así como la síntesis de matriz y la organización de la lámina basal, con la consecuente estabilización del vaso. De nuevo, puede haber una síntesis simultánea de factores pro y antiangiogénicos, que actúan de forma local.

Esta liberación de factores con actividades opuestas, de forma muy controlada, tanto en el espacio como en el tiempo, puede explicar la regulación tan estrecha que existe entre los propios componentes de las vías de señalización de TGF- β . Así, no sólo Endoglin y ALK1 se regulan de forma positiva entre ellos, sino que ambos son capaces de estimular la expresión de ALK5, permitiendo así el control de los distintos procesos implicados en la angiogénesis.

Esta regulación mutua entre los distintos componentes de las vías implica, como sucede en el caso de la HHT, que cuando un componente tiene alterada su expresión, todo el sistema se ve alterado. En estos pacientes, tanto si presentan una mutación en Endogлина como en ALK1, los niveles de ambos se encuentran disminuidos y la menor señalización de esta vía conduce a una regulación defectuosa de la vía de ALK5, por lo que al final todos los procesos implicados en angiogénesis, regulados por TGF- β , se van a ver alterados.

Es de resaltar que, de acuerdo con la bibliografía, todos los genes diferencialmente expresados en el *Microarray* que habíamos seleccionado para validar están regulados por TGF- β . La angiogénesis se inicia normalmente tras un estímulo mediado por VEGF, cuya expresión se induce por hipoxia en células endoteliales. En determinadas condiciones puede existir una cooperación de TGF- β e hipoxia (Sanchez-Elsner *et al.*, 2001). También, hipoxia, TGF- β y VEGF, van a inducir la síntesis y liberación de angiopoyetina-2 en células endoteliales de microvasculatura (Mandriota and Pepper, 1998; Oh *et al.*, 1999). En células endoteliales, el ciclo celular está en parte regulado por TGF- β , y se ha descrito una asociación funcional entre T β RII y ciclina B2 (Liu *et al.*, 1999). De igual forma, los procesos de adhesión, migración, polarización del citoesqueleto y síntesis de matriz extracelular en los que se encuentran implicadas moléculas como PECAM-1, VE-Cadherina2, WASL o PAI-1, están regulados directamente por las vías de señalización de TGF- β .

Finalmente, la síntesis de NO en células endoteliales está también regulada por TGF- β . Se ha demostrado que eNOS se localiza en caveolas, donde interacciona con receptores de esta vía (Schwartz *et al.*, 2005) y, por otro lado, el TGF- β induce la transcripción de *NOS3*, en un proceso mediado por Smad2 (Saura *et al.*, 2002). Además, el mecanismo de compensación entre los sistemas de eNOS y COX-2 está también regulado por TGF- β (Harding *et al.*, 2006).

De esta forma, la falta de expresión de Endogлина o de ALK1 puede conducir a la alteración de un gran número de procesos mediados por vías

de señalización que se encuentran reguladas entre sí y que podrían explicar patología vascular de los pacientes de HHT. En última instancia, independientemente del tipo de mutación, el resultado final es el mismo, de forma que los pacientes HHT1 y HHT2 presentan los mismos síntomas.

Hemos visto que las BOECs derivadas de pacientes son un modelo adecuado para el estudio de la HHT, ya que independientemente de tratarse de células circulantes, o incluso aunque procedieran de células precursoras, son células que presentan las vías de señalización de TGF- β alteradas y, como consecuencia, un gran número de genes diana tienen afectada su expresión (Figura 73) y múltiples procesos implicados en angiogénesis o inflamación son defectuosos. Combinando estudios *in vitro* con BOECs y experimentos *in vivo* con los modelos de ratones heterocigotos para *endoglin* y *ALK1*, es posible aproximarse bastante a un entendimiento más global de los procesos responsables de la patología de pacientes de HHT, sin restringirse a la idea excesivamente simplificada de la alteración en las vías de ALK5 y ALK1.

El análisis de los *Microarrays* abre múltiples vías de estudio para entender, no sólo los procesos implicados en esta enfermedad, sino también la regulación entre múltiples vías de señalización y factores implicados en distintas funciones de las células endoteliales. Sería interesante, en un futuro próximo, realizar estudios independientes de cada uno de los procesos que hemos encontrado alterados, así como estudiar la contribución de cada uno de los genes cuya expresión está alterada. De esta forma, se podrá entender qué genes se encuentran diferencialmente expresados como consecuencia directa de la enfermedad y cuáles debido, de forma secundaria, a mecanismos de compensación de la célula. Por otro lado, estos estudios nos acercarán con mayor detalle al conocimiento de las dianas directas de las vías de ALK1 y ALK5.

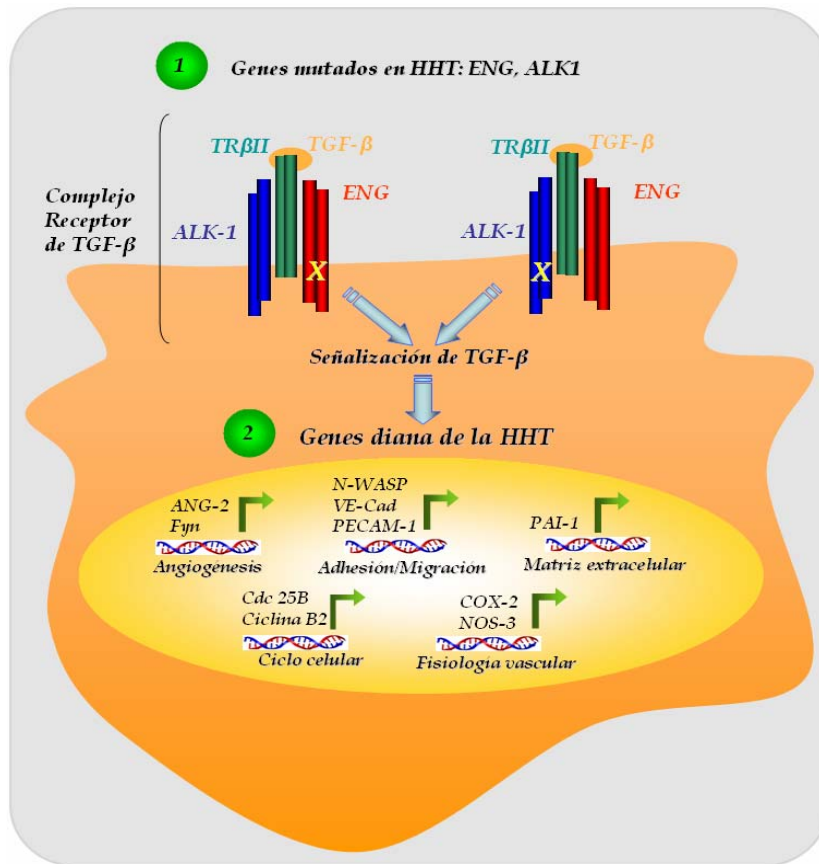


Figura 73. Modelo representativo de genes diana de HHT. Se muestran las vías de señalización de TGF-β en una célula endotelial, algunos de los genes diferencialmente expresados en la enfermedad y los procesos en los que estos genes están implicados.

Recientemente, han sido publicados múltiples trabajos que muestran la presencia de Endogлина y ALK1 en células no endoteliales. Sin embargo, la función que desempeñan en un contexto distinto al endotelial apenas se conoce. Sería interesante determinar si en estas células no endoteliales de pacientes de HHT, existen alteraciones en sus funciones que contribuyan a la patología de la enfermedad. El conocimiento a nivel celular y molecular de todos los fenómenos biológicos alterados en HHT, nos conducirá a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, más eficaces que las existentes y que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

Finalmente, con el fin de englobar los datos obtenidos en este trabajo y entender con más detalle cómo se producen las malformaciones vasculares en estos pacientes, proponemos el siguiente modelo:

Se ha descrito que en condiciones de hipoxia la expresión de Endoglina protege a las células endoteliales de sufrir apoptosis (Li *et al.*, 2003). La falta de Endoglina en células HHT favorecerá que, ante una situación de hipoxia, se den fenómenos de apoptosis con más frecuencia que en los capilares de una persona sana. Por otro lado, en los capilares de estos pacientes encontramos células endoteliales con un citoesqueleto desestructurado. La respuesta miogénica en vasos que expresen menores niveles de Endoglina y, consecuentemente, de óxido nítrico, podría también estar alterada, por lo que no se amortiguarían adecuadamente los cambios de presión (Figura 74A).

Así, ante cambios fisiológicos de presión sanguínea, que no serían bien amortiguados, un daño mecánico o un proceso inflamatorio que generara una situación de hipoxia, podría ocasionar una pérdida de capilares por rotura o apoptosis de las células endoteliales (Figura 74B). Debido a la fragilidad de estos capilares y dado que soportan más presión, puede producirse una dilatación de la vénula postcapilar que se va extendiendo hacia la arteriola, generando finalmente una unión directa vénula-arteriola, es decir, a una fístula arterio-venosa.

Uno de los peligros de la presencia de estas fístulas es que permiten el paso de bacterias (Figura 74C). Cuando la fístula se encuentra en el pulmón, ante una entrada masiva de agentes infecciosos éstos pueden atravesar la fístula y alcanzar el cerebro, con el consiguiente riesgo de dar lugar a un absceso cerebral. Los abscesos, si presionan un vaso, dan lugar a una isquemia cerebral. Por otro lado, la mezcla de sangre venosa y arterial da lugar a hipoxia parcial en el tejido donde se produce la fístula.

Debido a la fragilidad del citoesqueleto y a la menor adhesión entre las células endoteliales, estas fístulas podrían romperse ante cualquier daño mecánico o inflamación. Al romperse, producirán hemorragias que explican las frecuentes epistaxias y los sangrados internos que se producen en estos pacientes (Figura 74D).

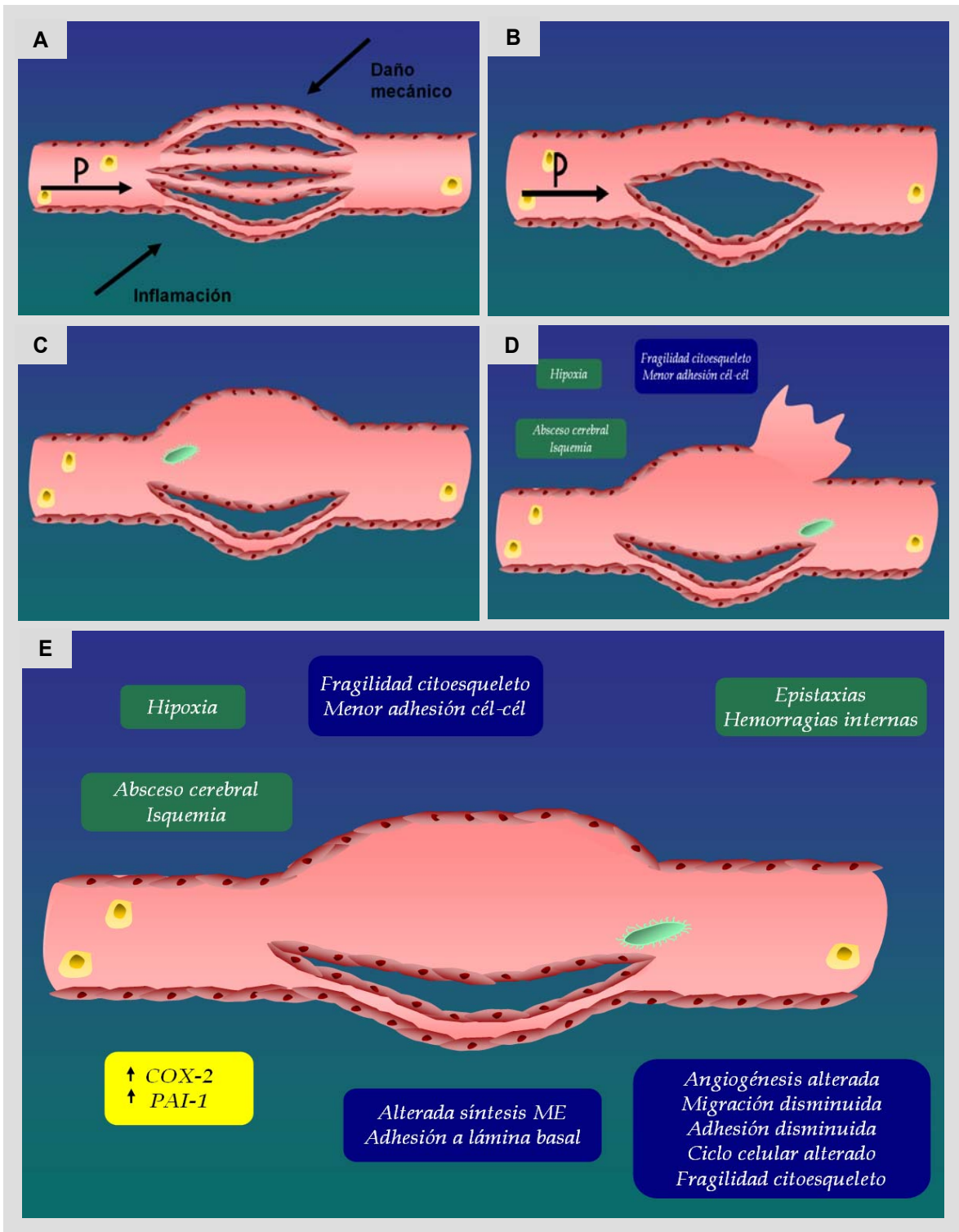


Figura 74. Modelo hipotético del proceso de formación de malformaciones arterio-venosas en pacientes de HHT. Se muestran los procesos de pérdida de capilares (A-B), formación de fístulas arterio-venosas (C), rotura (D) y procesos llevados a cabo para su reparación (E). En verde se muestran las manifestaciones de la enfermedad, en azul los mecanismos causantes de las alteraciones y en amarillo posibles mecanismos de compensación de la célula. P: presión.

Con el fin de reparar la rotura es necesario que se dé un proceso de angiogénesis. Sin embargo, hemos visto que existe un alteración general de los mecanismos implicados en este proceso, tales como migración, adhesión, proliferación, organización del citoesqueleto, síntesis de matriz extracelular o adhesión a la lámina basal, procesos necesarios para que se repare la herida y se estabilicen los nuevos vasos formados.

Es posible, que la expresión alterada que encontramos en algunos genes, pueda deberse a mecanismos que llevan a cabo las células para tratar de compensar estas alteraciones, como podrían ser el aumento de COX-2, que trataría de suplir la falta de eNOS, o el aumento de PAI-1, que va a conducir a una estabilización del coágulo en estos pacientes (Figura 74E).

Conclusiones

1. En la población española afectada por HHT hay una mayor frecuencia de mutaciones en *ALK1* que en *endogлина*, en torno al doble, en consonancia con la distribución encontrada en otros países mediterráneos como Italia y Francia.
2. En el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en pacientes de HHT, tanto HHT1 como HHT2, existe una menor inducción de la expresión de Endogлина que en células control. Los niveles de expresión en pacientes están inversamente relacionados con la edad y severidad de los síntomas.
3. No todas las mutaciones presentes en *ALK1* se comportan como alelos nulos, existiendo alternativas frente a la haploinsuficiencia. Algunas proteínas mutadas se expresan en membrana, pudiendo actuar como dominantes negativos, dominantes positivos o presentar una funcionalidad reducida respecto al alelo sano.
4. Mediante el cultivo de células de sangre periférica de pacientes hemos obtenido líneas primarias de células endoteliales (BOECs) como modelo de HHT.
5. En relación a las células endoteliales control, las procedentes de pacientes presentan menores niveles de Endogлина y *ALK1*, una menor inducción de la expresión de Endogлина en respuesta a TGF- β y una menor señalización mediada por *ALK1* y *ALK5*.
6. Algunos fármacos antifibrinolíticos usados en el tratamiento de HHT como el Ácido Tranexámico, son capaces de aumentar la expresión de Endogлина y *ALK1*, simultáneamente a su efecto antifibrinolítico, por un mecanismo dependiente de TGF- β . Este aumento de expresión favorece el proceso de angiogénesis.

7. En células endoteliales de pacientes de HHT existe una alteración en la expresión de múltiples genes que se encuentran implicados, fundamentalmente, en procesos de adhesión, migración, síntesis de matriz extracelular, organización del citoesqueleto, ciclo celular, migración transendotelial y fisiología vascular. La alteración en estos procesos afecta a la angiogénesis, remodelado y homeostasis vasculares.
8. Los cultivos de células endoteliales obtenidas a partir de sangre periférica de pacientes de HHT, pueden ser un modelo adecuado para el estudio de las bases moleculares y celulares de la enfermedad, presentando un gran número de alteraciones en sus funciones biológicas que pueden explicar las manifestaciones clínicas de los pacientes.

Bibliografía

- Abdalla, S.A., Gallione, C.J., Barst, R.J., Horn, E.M., Knowles, J.A., Marchuk, D.A., Letarte, M. and Morse, J.H. (2004) Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J*, **23**, 373-377.
- Abdalla, S.A., Geithoff, U.W., Bonneau, D., Plauchu, H., McDonald, J., Kennedy, S., Faughnan, M.E. and Letarte, M. (2003) Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet*, **40**, 494-502.
- Abdalla, S.A. and Letarte, M. (2006) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*, **43**, 97-110.
- Abdalla, S.A., Pece-Barbara, N., Vera, S., Tapia, E., Paez, E., Bernabeu, C. and Letarte, M. (2000) Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet*, **9**, 1227-1237.
- Adam, P.J., Clesham, G.J. and Weissberg, P.L. (1998) Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 33-37.
- Altomonte, M., Montagner, R., Fonsatti, E., Colizzi, F., Cattarossi, I., Brasoveanu, L.I., Nicotra, M.R., Cattelan, A., Natali, P.G. and Maio, M. (1996) Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer*, **74**, 1586-1591.
- Andersen, P.E., Kjeldsen, A.D., Oxhoj, H., Vase, P. and White, R.I., Jr. (1998) Embolotherapy for pulmonary arteriovenous malformations in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Acta Radiol*, **39**, 723-726.
- Andres, J.L., Stanley, K., Cheifetz, S. and Massague, J. (1989) Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*, **109**, 3137-3145.
- Annichino-Bizzacchi, J.M., Facchini, R.M., Torresan, M.Z. and Arruda, V.R. (1999) Hereditary hemorrhagic telangiectasia response to aminocaproic acid treatment. *Thromb Res*, **96**, 73-76.
- Arad, M., Benson, D.W., Perez-Atayde, A.R., McKenna, W.J., Sparks, E.A., Kanter, R.J., McGarry, K., Seidman, J.G. and Seidman, C.E. (2002) Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*, **109**, 357-362.
- Arthur, H.M., Ure, J., Smith, A.J., Renforth, G., Wilson, D.I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D.V., Jowett, T., Marchuk, D.A., Burn, J. and Diamond, A.G. (2000) Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol*, **217**, 42-53.
- Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F.M., Massague, J. and Wrana, J.L. (1993) Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, **75**, 671-680.
- Bailly, S., Brand, C., Chambaz, E.M. and Feige, J.J. (1997) Analysis of small latent transforming growth factor-beta complex formation and

- dissociation by surface plasmon resonance. Absence of direct interaction with thrombospondins. *J Biol Chem*, **272**, 16329-16334.
- Barbara, N.P., Wrana, J.L. and Letarte, M. (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*, **274**, 584-594.
- Bayrak-Toydemir, P., McDonald, J., Akarsu, N., Toydemir, R.M., Calderon, F., Tuncali, T., Tang, W., Miller, F. and Mao, R. (2006) A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A*, **140**, 2155-2162.
- Bellon, T., Corbi, A., Lastres, P., Cales, C., Cebrian, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massague, J., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol*, **23**, 2340-2345.
- Berg, J.N., Gallione, C.J., Stenzel, T.T., Johnson, D.W., Allen, W.P., Schwartz, C.E., Jackson, C.E., Porteous, M.E. and Marchuk, D.A. (1997) The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet*, **61**, 60-67.
- Bernheim-Groswasser, A., Wiesner, S., Golsteyn, R.M., Carlier, M.F. and Sykes, C. (2002) The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature*, **417**, 308-311.
- Bian, C., Zhao, K., Tong, G.X., Zhu, Y.L. and Chen, P. (2005) Immortalization of human umbilical vein endothelial cells with telomerase reverse transcriptase and simian virus 40 large T antigen. *J Zhejiang Univ Sci B*, **6**, 631-636.
- Birukova, A.A., Birukov, K.G., Adyshev, D., Usatyuk, P., Natarajan, V., Garcia, J.G. and Verin, A.D. (2005) Involvement of microtubules and Rho pathway in TGF-beta1-induced lung vascular barrier dysfunction. *J Cell Physiol*, **204**, 934-947.
- Blanco, F.J., Santibanez, J.F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C.P. and Bernabeu, C. (2005) Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol*, **204**, 574-584.
- Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S.E. and Kaiser, H.E. (1998) Upregulation of endoglin (CD105) expression during childhood brain tumor-related angiogenesis. Anti-angiogenic therapy. *Anticancer Res*, **18**, 1485-1500.
- Botella, L.M., Sanchez-Elsner, T., Rius, C., Corbi, A. and Bernabeu, C. (2001) Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem*, **276**, 34486-34494.
- Botella, L.M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M.P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C.P., Ramirez, J.R., Friedman, S. and Bernabeu, C. (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood*, **100**, 4001-4010.

- Bourdeau, A., Cymerman, U., Paquet, M.E., Meschino, W., McKinnon, W.C., Guttmacher, A.E., Becker, L. and Letarte, M. (2000) Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Am J Pathol*, **156**, 911-923.
- Bourdeau, A., Dumont, D.J. and Letarte, M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*, **104**, 1343-1351.
- Bourdeau, A., Faughnan, M.E., McDonald, M.L., Paterson, A.D., Wanless, I.R. and Letarte, M. (2001) Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Pathol*, **158**, 2011-2020.
- Brown, M.A., Zhao, Q., Baker, K.A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I. and Choe, S. (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem*, **280**, 25111-25118.
- Buhring, H.J., Muller, C.A., Letarte, M., Gougos, A., Saalmuller, A., van Agthoven, A.J. and Busch, F.W. (1991) Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia*, **5**, 841-847.
- Burrows, F.J., Derbyshire, E.J., Tazzari, P.L., Amlot, P., Gazdar, A.F., King, S.W., Letarte, M., Vitetta, E.S. and Thorpe, P.E. (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*, **1**, 1623-1634.
- Buscarini, E., Buscarini, L., Danesino, C., Piantanida, M., Civardi, G., Quaretti, P., Rossi, S., Di Stasi, M. and Silva, M. (1997) Hepatic vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Doppler sonographic screening in a large family. *J Hepatol*, **26**, 111-118.
- Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Bellon, T., Figdor, C.G., Te Velde, A.A., Fernandez, J.M., Acevedo, A. and Bernabeu, C. (1989) Characterization of a novel myeloid antigen regulated during differentiation of monocytic cells. *Eur J Immunol*, **19**, 1373-1378.
- Calabro, L., Fonsatti, E., Bellomo, G., Alonci, A., Colizzi, F., Sigalotti, L., Altomonte, M., Musolino, C. and Maio, M. (2003) Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol*, **194**, 171-175.
- Carrier, M.F., Ducruix, A. and Pantaloni, D. (1999) Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol*, **6**, R235-240.
- Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, **438**, 932-936.
- Carvalho, R.L., Jonker, L., Goumans, M.J., Larsson, J., Bouwman, P., Karlsson, S., Dijke, P.T., Arthur, H.M. and Mummery, C.L. (2004) Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development*, **131**, 6237-6247.
- Cavallaro, U., Liebner, S. and Dejana, E. (2006) Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res*, **312**, 659-667.

- Cirulli, A., Liso, A., D'Ovidio, F., Mestice, A., Pasculli, G., Gallitelli, M., Rizzi, R., Specchia, G. and Sabba, C. (2003) Vascular endothelial growth factor serum levels are elevated in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Acta Haematol*, **110**, 29-32.
- Clancy, R., Varenika, B., Huang, W., Ballou, L., Attur, M., Amin, A.R. and Abramson, S.B. (2000) Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol*, **165**, 1582-1587.
- Cole, S.G., Begbie, M.E., Wallace, G.M. and Shovlin, C.L. (2005) A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet*, **42**, 577-582.
- Conley, B.A., Koleva, R., Smith, J.D., Kacer, D., Zhang, D., Bernabeu, C. and Vary, C.P. (2004) Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem*, **279**, 27440-27449.
- Conley, B.A., Smith, J.D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, C. and Vary, C.P. (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, **153**, 323-335.
- Cymerman, U., Vera, S., Karabegovic, A., Abdalla, S. and Letarte, M. (2003) Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat*, **21**, 482-492.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J. and Letarte, M. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **267**, 19027-19030.
- Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., ten Dijke, P., Iwata, K.K. and Massague, J. (1990) Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem*, **265**, 20533-20538.
- Chen, K., Mehta, J.L., Li, D., Joseph, L. and Joseph, J. (2004) Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res*, **95**, 1167-1173.
- Chen, S. and Lechleider, R.J. (2004) Transforming growth factor-beta-induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line. *Circ Res*, **94**, 1195-1202.
- Chiu, Y.J., Kusano, K., Thomas, T.N. and Fujiwara, K. (2004) Endothelial cell-cell adhesion and mechanosignal transduction. *Endothelium*, **11**, 59-73.
- Christian, J.L. and Nakayama, T. (1999) Can't get no SMADisfaction: Smad proteins as positive and negative regulators of TGF-beta family signals. *Bioessays*, **21**, 382-390.
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.J. and Bailly, S. (2006) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) endothelial cells. *Blood*.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J.M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J*, **17**, 3091-3100.

- Derynck, R. and Feng, X.H. (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1333**, F105-150.
- Derynck, R. and Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**, 577-584.
- Di Nicolantonio, F. and Bardelli, A. (2006) Kinase mutations in cancer: chinks in the enemy's armour? *Curr Opin Oncol*, **18**, 69-76.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S. and Akhurst, R.J. (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*, **121**, 1845-1854.
- Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez, R., Langa, C., Rodriguez-Barbero, A., Lopez-Novoa, J.M., Lamas, S. and Bernabeu, C. (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta*, **1587**, 36-44.
- Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E. and Leduc, R. (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*, **270**, 10618-10624.
- Duff, S.E., Li, C., Garland, J.M. and Kumar, S. (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J*, **17**, 984-992.
- Dumont, D.J., Gradwohl, G., Fong, G.H., Puri, M.C., Gertsenstein, M., Auerbach, A. and Breitman, M.L. (1994) Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*, **8**, 1897-1909.
- Ebner, R., Chen, R.H., Lawler, S., Zioncheck, T. and Derynck, R. (1993) Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. *Science*, **262**, 900-902.
- Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K. and Moses, H.L. (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem*, **274**, 37413-37420.
- Escalante, A., Pinzon, A., Belloso, E., Pozo, A. and Juan, C. (1988) [Cobalt therapy in the treatment of Osler-Rendu disease. Apropos of two cases]. *Acta Otorrinolaringol Esp*, **39**, 57-59.
- Esparza-Lopez, J., Montiel, J.L., Vilchis-Landeros, M.M., Okadome, T., Miyazono, K. and Lopez-Casillas, F. (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem*, **276**, 14588-14596.
- Favre, C.J., Mancuso, M., Maas, K., McLean, J.W., Baluk, P. and McDonald, D.M. (2003) Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**, H1917-1938.
- Feng, X.H. and Derynck, R. (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 659-693.
- Fernandez-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellon, T., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1993) Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet*, **64**, 204-207.

- Fiorella, M.L., Ross, D.A., White, R.I., Sabba, C. and Fiorella, R. (2004) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: state of the art. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, **24**, 330-336.
- Folkman, J. and D'Amore, P.A. (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, **87**, 1153-1155.
- Folkman, J. and Hanahan, D. (1991) Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp*, **22**, 339-347.
- Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M.R., Natali, P.G. and Maio, M. (2003) Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene*, **22**, 6557-6563.
- Fonsatti, E., Jekunen, A.P., Kairemo, K.J., Coral, S., Snellman, M., Nicotra, M.R., Natali, P.G., Altomonte, M. and Maio, M. (2000) Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res*, **6**, 2037-2043.
- Fujimoto, M., Hasegawa, M., Hamaguchi, Y., Komura, K., Matsushita, T., Yanaba, K., Koderu, M., Takehara, K. and Sato, S. (2006) A clue for telangiectasis in systemic sclerosis: elevated serum soluble endoglin levels in patients with the limited cutaneous form of the disease. *Dermatology*, **213**, 88-92.
- Fulbright, R.K., Chaloupka, J.C., Putman, C.M., Sze, G.K., Merriam, M.M., Lee, G.K., Fayad, P.B., Awad, I.A. and White, R.I., Jr. (1998) MR of hereditary hemorrhagic telangiectasia: prevalence and spectrum of cerebrovascular malformations. *AJNR Am J Neuroradiol*, **19**, 477-484.
- Furcht, L.T. (1986) Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. *Lab Invest*, **55**, 505-509.
- Gallione, C.J., Klaus, D.J., Yeh, E.Y., Stenzel, T.T., Xue, Y., Anthony, K.B., McAllister, K.A., Baldwin, M.A., Berg, J.N., Lux, A., Smith, J.D., Vary, C.P., Craigen, W.J., Westermann, C.J., Warner, M.L., Miller, Y.E., Jackson, C.E., Guttmacher, A.E. and Marchuk, D.A. (1998) Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat*, **11**, 286-294.
- Gallione, C.J., Repetto, G.M., Legius, E., Rustgi, A.K., Schelley, S.L., Tejpar, S., Mitchell, G., Drouin, E., Westermann, C.J. and Marchuk, D.A. (2004) A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet*, **363**, 852-859.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A. and Sessa, W.C. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, **392**, 821-824.
- Godeny, M.D. and Sayeski, P.P. (2006) Ang II-induced cell proliferation is mediated by c-Src/Yes/Fyn-regulated ERK1/2 activation in the cytoplasm and PKC ζ -controlled ERK1/2 within the nucleus. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Gougos, A. and Letarte, M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*, **265**, 8361-8364.
- Gougos, A., St Jacques, S., Greaves, A., O'Connell, P.J., d'Apice, A.J., Buhning, H.J., Bernabeu, C., van Mourik, J.A. and Letarte, M. (1992) Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing

- glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol*, **4**, 83-92.
- Goumans, M.J., Lebrin, F. and Valdimarsdottir, G. (2003a) Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med*, **13**, 301-307.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S. and ten Dijke, P. (2003b) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell*, **12**, 817-828.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. and ten Dijke, P. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *Embo J*, **21**, 1743-1753.
- Gu, Y., Jin, P., Zhang, L., Zhao, X., Gao, X., Ning, Y., Meng, A. and Chen, Y.G. (2006) Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF- β receptor ALK1 reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood*, **107**, 1951-1954.
- Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendia, A., Perez-Alvarez, M.J., Langa, C., Lopez, L.A., Fabra, A., Garcia-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1999) Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, **78**, 614-623.
- Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A. and Bernabeu, C. (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor- β receptors I and II. *J Biol Chem*, **277**, 29197-29209.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F. and Sorokin, L.M. (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*, **85**, 979-1000.
- Hanes, F. (1909) Multiple hereditary telangiectases causing hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Johns Hopkins Hospital Bulletin*. **20**, 63-73.
- Harding, P., Balasubramanian, L., Swegan, J., Stevens, A. and Glass, W.F., 2nd. (2006) Transforming growth factor β regulates cyclooxygenase-2 in glomerular mesangial cells. *Kidney Int*, **69**, 1578-1585.
- Harrison, R.E., Flanagan, J.A., Sankelo, M., Abdalla, S.A., Rowell, J., Machado, R.D., Elliott, C.G., Robbins, I.M., Olschewski, H., McLaughlin, V., Gruenig, E., Kermeen, F., Halme, M., Rasanen-Sokolowski, A., Laitinen, T., Morrell, N.W. and Trembath, R.C. (2003) Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*, **40**, 865-871.
- Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A., Beck, L.H., Smith, S.R. and D'Amore, P.A. (1999) Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res*, **84**, 298-305.
- Hoylaerts, M., Lijnen, H.R. and Collen, D. (1981) Studies on the mechanism of the antifibrinolytic action of tranexamic acid. *Biochim Biophys Acta*, **673**, 75-85.

- Ichimura, K., Tanaka, H., Yamamoto, Y. and Nakamura, K.I. (2006) Nasal dermoplasty for Japanese hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Auris Nasus Larynx*.
- Jameson, J.J. and Cave, D.R. (2004) Hormonal and antihormonal therapy for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope*, **114**, 705-709.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J.V., Prieto, M., Carron, R., Sanz-Rodriguez, F., Perez-Barriocanal, F., Rodriguez-Barbero, A., Bernabeu, C. and Lopez-Novoa, J.M. (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J*, **18**, 609-611.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J.V., Santibanez, J.F., Prieto, M., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Barriocanal, F., Pericacho, M., Arevalo, M., Vary, C.P., Letarte, M., Bernabeu, C. and Lopez-Novoa, J.M. (2006) Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res*, **99**, 248-256.
- Johnson, D.W., Berg, J.N., Baldwin, M.A., Gallione, C.J., Marondel, I., Yoon, S.J., Stenzel, T.T., Speer, M., Pericak-Vance, M.A., Diamond, A., Guttmacher, A.E., Jackson, C.E., Attisano, L., Kucherlapati, R., Porteous, M.E. and Marchuk, D.A. (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet*, **13**, 189-195.
- Johnson, D.W., Berg, J.N., Gallione, C.J., McAllister, K.A., Warner, J.P., Helmbold, E.A., Markel, D.S., Jackson, C.E., Porteous, M.E. and Marchuk, D.A. (1995) A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res*, **5**, 21-28.
- Jovine, L., Darie, C.C., Litscher, E.S. and Wassarman, P.M. (2005) Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem*, **74**, 83-114.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. and Wassarman, P.M. (2002) The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol*, **4**, 457-461.
- Kim, J.S., Kim, J.G., Moon, M.Y., Jeon, C.Y., Won, H.Y., Kim, H.J., Jeon, Y.J., Seo, J.Y., Kim, J.I., Kim, J., Lee, J.Y., Kim, P.H. and Park, J.B. (2006) Transforming growth factor-beta1 regulates macrophage migration via RhoA. *Blood*, **108**, 1821-1829.
- Kjeldsen, A.D., Brusgaard, K., Poulsen, L., Kruse, T., Rasmussen, K., Green, A. and Vase, P. (2001) Mutations in the ALK-1 gene and the phenotype of hereditary hemorrhagic telangiectasia in two large Danish families. *Am J Med Genet*, **98**, 298-302.
- Kjeldsen, A.D. and Kjeldsen, J. (2000) Gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol*, **95**, 415-418.
- Kjeldsen, A.D., Vase, P. and Green, A. (1999) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med*, **245**, 31-39.
- Klepfish, A., Berrebi, A. and Schattner, A. (2001) Intranasal tranexamic acid treatment for severe epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Intern Med*, **161**, 767.
- Koleva, R.I., Conley, B.A., Romero, D., Riley, K.S., Marto, J.A., Lux, A. and Vary, C.P. (2006) Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*, **281**, 25110-25123.

- Korchynskiy, O. and ten Dijke, P. (2002) Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem*, **277**, 4883-4891.
- Korzenik, J.R. (1996) Hereditary hemorrhagic telangiectasia and other intestinal vascular anomalies. *Gastroenterologist*, **4**, 203-210.
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. and Massague, J. (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev*, **13**, 804-816.
- Kuwana, M., Okazaki, Y., Kodama, H., Satoh, T., Kawakami, Y. and Ikeda, Y. (2006) Endothelial Differentiation Potential of Human Monocyte-derived Multipotential Cells. *Stem Cells*.
- Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J.J. and Bailly, S. (2002) Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood*, **100**, 4495-4501.
- Larson, A.M. (2003) Liver disease in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Gastroenterol*, **36**, 149-158.
- Lastella, P., Sabba, C., Lenato, G.M., Resta, N., Lattanzi, W., Gallitelli, M., Cirulli, A. and Guanti, G. (2003) Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet*, **63**, 536-540.
- Lastres, P., Bellon, T., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1992) Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*, **22**, 393-397.
- Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., Lopez, L.A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1996) Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol*, **133**, 1109-1121.
- Lastres, P., Martin-Perez, J., Langa, C. and Bernabeu, C. (1994) Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*, **301 (Pt 3)**, 765-768.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and Ten Dijke, P. (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*, **65**, 599-608.
- Lebrin, F., Goumans, M.J., Jonker, L., Carvalho, R.L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H.M. and ten Dijke, P. (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J*, **23**, 4018-4028.
- Lesca, G., Plauchu, H., Coulet, F., Lefebvre, S., Plessis, G., Odent, S., Riviere, S., Leheup, B., Goizet, C., Carette, M.F., Cordier, J.F., Pinson, S., Soubrier, F., Calender, A. and Giraud, S. (2004) Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat*, **23**, 289-299.
- Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L.M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L. and Bernabeu, C. (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem*, **273**, 33011-33019.
- Letarte, M., McDonald, M.L., Li, C., Kathirkamathamby, K., Vera, S., Pece-Barbara, N. and Kumar, S. (2005) Reduced endothelial secretion and plasma levels of transforming growth factor-beta1 in patients with

- hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Cardiovasc Res*, **68**, 155-164.
- Letteboer, T.G., Zewald, R.A., Kamping, E.J., de Haas, G., Mager, J.J., Snijder, R.J., Lindhout, D., Hennekam, F.A., Westermann, C.J. and Ploos van Amstel, J.K. (2005) Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet*, **116**, 8-16.
- Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F., Maynard, S.E., Sachs, B.P., Sibai, B.M., Epstein, F.H., Romero, R., Thadhani, R. and Karumanchi, S.A. (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, **355**, 992-1005.
- Li, C., Guo, B., Wilson, P.B., Stewart, A., Byrne, G., Bundred, N. and Kumar, S. (2000) Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer*, **89**, 122-126.
- Li, C., Issa, R., Kumar, P., Hampson, I.N., Lopez-Novoa, J.M., Bernabeu, C. and Kumar, S. (2003) CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci*, **116**, 2677-2685.
- Li, C.G., Reynolds, I., Ponting, J.M., Holt, P.J., Hillarby, M.C. and Kumar, S. (1998) Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) are markedly elevated in patients with Wegener's granulomatosis. *Br J Rheumatol*, **37**, 1303-1306.
- Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Urness, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B. and Wendel, D.P. (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, **284**, 1534-1537.
- Lin, Y., Chang, L., Solovey, A., Healey, J.F., Lollar, P. and Hebbel, R.P. (2002) Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood*, **99**, 457-462.
- Lin, Y., Weisdorf, D.J., Solovey, A. and Hebbel, R.P. (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*, **105**, 71-77.
- Liu, J.H., Wei, S., Burnette, P.K., Gamero, A.M., Hutton, M. and Djeu, J.Y. (1999) Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B. *Oncogene*, **18**, 269-275.
- Liu, Y., Jovanovic, B., Pins, M., Lee, C. and Bergan, R.C. (2002) Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene*, **21**, 8272-8281.
- Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J.L., Lane, W.S. and Massague, J. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*, **67**, 785-795.
- Lund, V.J. and Howard, D.J. (1999) A treatment algorithm for the management of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Rhinol*, **13**, 319-322.
- Luo, Y., Zhou, H., Krueger, J., Kaplan, C., Lee, S.H., Dolman, C., Markowitz, D., Wu, W., Liu, C., Reisfeld, R.A. and Xiang, R. (2006) Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest*, **116**, 2132-2141.
- Lux, A., Gallione, C.J. and Marchuk, D.A. (2000) Expression analysis of endoglin missense and truncation mutations: insights into protein structure and disease mechanisms. *Hum Mol Genet*, **9**, 745-755.
- Lux, A., Salway, F., Dressman, H.K., Kroner-Lux, G., Hafner, M., Day, P.J., Marchuk, D.A. and Garland, J. (2006) ALK1 signalling analysis

- identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF-beta and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovasc Disord*, **6**, 13.
- Ma, X., Labinaz, M., Goldstein, J., Miller, H., Keon, W.J., Letarte, M. and O'Brien, E. (2000) Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 2546-2552.
- Maher, C.O., Piepgras, D.G., Brown, R.D., Jr., Friedman, J.A. and Pollock, B.E. (2001) Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke*, **32**, 877-882.
- Mandriota, S.J. and Pepper, M.S. (1998) Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res*, **83**, 852-859.
- Marazuela, M., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Larranaga, E. and de Landazuri, M.O. (1995) Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol*, **102**, 328-334.
- Marchuk, D.A. (1998) Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol*, **5**, 332-338.
- Massague, J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 597-641.
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **67**, 753-791.
- Massague, J. and Gomis, R.R. (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*, **580**, 2811-2820.
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev*, **19**, 2783-2810.
- Matsubara, S., Bourdeau, A., terBrugge, K.G., Wallace, C. and Letarte, M. (2000) Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke*, **31**, 2653-2660.
- McAllister, K.A., Grogg, K.M., Johnson, D.W., Gallione, C.J., Baldwin, M.A., Jackson, C.E., Helmbold, E.A., Markel, D.S., McKinnon, W.C., Murrell, J. and et al. (1994) Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*, **8**, 345-351.
- McDonald, M.T., Papenberg, K.A., Ghosh, S., Glatfelter, A.A., Biesecker, B.B., Helmbold, E.A., Markel, D.S., Zolotor, A., McKinnon, W.C., Vanderstoep, J.L. and et al. (1994) A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet*, **6**, 197-204.
- Meurer, S.K., Tihaa, L., Lahme, B., Gressner, A.M. and Weiskirchen, R. (2005) Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem*, **280**, 3078-3087.
- Miller, D.W., Graulich, W., Karges, B., Stahl, S., Ernst, M., Ramaswamy, A., Sedlacek, H.H., Muller, R. and Adamkiewicz, J. (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer*, **81**, 568-572.

- Miyazono, K. (1996) [Transforming growth factor-beta and its receptors]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **107**, 133-140.
- Miyazono, K. (2000) Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci*, **113 (Pt 7)**, 1101-1109.
- Miyazono, K., Ten Dijke, P., Ichijo, H. and Heldin, C.H. (1994) Receptors for transforming growth factor-beta. *Adv Immunol*, **55**, 181-220.
- Morais, D., Ramirez, B. and Santos, J. (2002) [Local sclerosing treatment with etoxiesclerol in ORL disease: Rendu-Osler disease, granuloma, angioma...]. *Acta Otorrinolaringol Esp*, **53**, 658-661.
- Moussouttas, M., Fayad, P., Rosenblatt, M., Hashimoto, M., Pollak, J., Henderson, K., Ma, T.Y. and White, R.I. (2000) Pulmonary arteriovenous malformations: cerebral ischemia and neurologic manifestations. *Neurology*, **55**, 959-964.
- Moustakas, A. and Heldin, C.H. (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*, **118**, 3573-3584.
- Muller, W.A. (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*, **24**, 327-334.
- Murdoch, C. and Lewis, C.E. (2005) Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int J Cancer*, **117**, 701-708.
- Naldini, A., Leali, D., Pucci, A., Morena, E., Carraro, F., Nico, B., Ribatti, D. and Presta, M. (2006) Cutting edge: IL-1beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *J Immunol*, **177**, 4267-4270.
- Nasdala, I., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Kuhn, A., Ebnet, K., Brachtendorf, G., Samulowitz, U., Kuster, B., Engelhardt, B., Vestweber, D. and Butz, S. (2002) A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem*, **277**, 16294-16303.
- Nicholl, S.M., Roztocil, E. and Davies, M.G. (2006) Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*, **4**, 101-116.
- Nigg, E.A., Gallant, P. and Krek, W. (1992) Regulation of p34cdc2 protein kinase activity by phosphorylation and cyclin binding. *Ciba Found Symp*, **170**, 72-84; discussion 84-96.
- Nilsson, I. and Hoffmann, I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res*, **4**, 107-114.
- Noble, J.R., Zhong, Z.H., Neumann, A.A., Melki, J.R., Clark, S.J. and Reddel, R.R. (2004) Alterations in the p16(INK4a) and p53 tumor suppressor genes of hTERT-immortalized human fibroblasts. *Oncogene*, **23**, 3116-3121.
- Nourshargh, S., Krombach, F. and Dejana, E. (2006) The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol*, **80**, 714-718.
- O'Connell, P.J., McKenzie, A., Fisicaro, N., Rockman, S.P., Pearse, M.J. and d'Apice, A.J. (1992) Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol*, **90**, 154-159.
- Oh, H., Takagi, H., Suzuma, K., Otani, A., Matsumura, M. and Honda, Y. (1999) Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-

- regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **274**, 15732-15739.
- Oh, S.P., Seki, T., Goss, K.A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P.K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S. and Li, E. (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2626-2631.
- Olivieri, C., Mira, E., Delu, G., Pagella, F., Zambelli, A., Malvezzi, L., Buscarini, E. and Danesino, C. (2002) Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*, **39**, E39.
- Oshima, M., Oshima, H. and Taketo, M.M. (1996) TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*, **179**, 297-302.
- Osler, W. B. (1901) On a family form of recurring epistaxis, associated with multiple telangiectases of the skin and mucous membranes. *The Johns Hopkins Hospital Bulletin*. **12**, 333-337. Reprinted in *Medical Classics*, (1939). **4**, 243-253.
- Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H. and Miyazono, K. (2002) Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol*, **193**, 299-318.
- Panchenko, M.P., Williams, M.C., Brody, J.S. and Yu, Q. (1996) Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol*, **270**, L547-558.
- Pece, N., Vera, S., Cymerman, U., White, R.I., Jr., Wrana, J.L. and Letarte, M. (1997) Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest*, **100**, 2568-2579.
- Pepper, M.S. (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev*, **8**, 21-43.
- Pepper, M.S., Montesano, R., Orci, L. and Vassalli, J.D. (1991) Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in microvascular endothelial cells by a chondrocyte-derived transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun*, **176**, 633-638.
- Perez-Gomez, E., Eleno, N., Lopez-Novoa, J.M., Ramirez, J.R., Velasco, B., Letarte, M., Bernabeu, C. and Quintanilla, M. (2005) Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene*, **24**, 4450-4461.
- Perez del Molino, A., Zarrabeitia, R., Fernandez, A. and Botella, L.M. (2004) [Efficacy of tranexamic acid in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia and massive epistaxis]. *Med Clin (Barc)*, **123**, 118-119.
- Pichuanes, S., Vera, S., Bourdeau, A., Pece, N., Kumar, S., Wayner, E.A. and Letarte, M. (1997) Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens*, **50**, 265-276.

- Piek, E., Heldin, C.H. and Ten Dijke, P. (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J*, **13**, 2105-2124.
- Plauchu, H., de Chadarevian, J.P., Bideau, A. and Robert, J.M. (1989) Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet*, **32**, 291-297.
- Puri, M.C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A. and Partanen, J. (1995) The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *Embo J*, **14**, 5884-5891.
- Qiao, M., Shapiro, P., Fosbrink, M., Rus, H., Kumar, R. and Passaniti, A. (2006) Cell cycle-dependent phosphorylation of the RUNX2 transcription factor by cdc2 regulates endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, **281**, 7118-7128.
- Qu, R., Silver, M.M. and Letarte, M. (1998) Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res*, **292**, 333-343.
- Quintanilla, M., Ramirez, J.R., Perez-Gomez, E., Romero, D., Velasco, B., Letarte, M., Lopez-Novoa, J.M. and Bernabeu, C. (2003) Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*, **22**, 5976-5985.
- Ramirez, B., Morais, D., Condado, M.A., Marcos, M., Martin, G. and Poncela, M. (2000) [A new sclerosant for the treatment of Rendu-Osler-Weber disease]. *Acta Otorrinolaringol Esp*, **51**, 36-39.
- Reiner, A., Yekutieli, D. and Benjamini, Y. (2003) Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*, **19**, 368-375.
- Reyes-Mujica, M., Lopez-Corella, E., Perez-Fernandez, L., Cuevas-Schacht, F. and Carrillo-Farga, J. (1988) Osler-Weber-Rendu disease in an infant. *Hum Pathol*, **19**, 1243-1246.
- Rius, C., Smith, J.D., Almendro, N., Langa, C., Botella, L.M., Marchuk, D.A., Vary, C.P. and Bernabeu, C. (1998) Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood*, **92**, 4677-4690.
- Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Alvarez-Munoz, P., Pandiella, A., Bernabeu, C. and Lopez-Novoa, J.M. (2006) Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem*, **18**, 135-142.
- Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Eleno, N., Rodriguez-Pena, A., Duwel, A., Jerkic, M., Sanchez-Rodriguez, A., Bernabeu, C. and Lopez-Novoa, J.M. (2001) Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 142-147.
- Roelen, B.A., van Rooijen, M.A. and Mummery, C.L. (1997) Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn*, **209**, 418-430.
- Roman, B.L., Pham, V.N., Lawson, N.D., Kulik, M., Childs, S., Lekven, A.C., Garrity, D.M., Moon, R.T., Fishman, M.C., Lechleider, R.J. and

- Weinstein, B.M. (2002) Disruption of *acvrl1* increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels. *Development*, **129**, 3009-3019.
- Roy-Chaudhury, P., Simpson, J.G. and Power, D.A. (1997) Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp Nephrol*, **5**, 55-60.
- Ruoslahti, E. and Giancotti, F.G. (1989) Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells*, **1**, 119-126.
- Saba, H.I., Morelli, G.A. and Logrono, L.A. (1994) Brief report: treatment of bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia with aminocaproic acid. *N Engl J Med*, **330**, 1789-1790.
- Sabba, C., Gallitelli, M. and Palasciano, G. (2001) Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*, **345**, 926.
- Sadick, H., Naim, R., Gossler, U., Hormann, K. and Riedel, F. (2005a) Angiogenesis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: VEGF165 plasma concentration in correlation to the VEGF expression and microvessel density. *Int J Mol Med*, **15**, 15-19.
- Sadick, H., Riedel, F., Naim, R., Goessler, U., Hormann, K., Hafner, M. and Lux, A. (2005b) Patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia have increased plasma levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 as well as high ALK1 tissue expression. *Haematologica*, **90**, 818-828.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L. and Bernabeu, C. (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*, **276**, 38527-38535.
- Santibanez, J.F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C.P., Lopez-Novoa, J.M., Attisano, L. and Bernabeu, C. (2006) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol*, **210**, 456-468.
- Sanz-Rodriguez, F., Fernandez, L.A., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Ramirez, J.R., Coto, E., Bernabeu, C. and Botella, L.M. (2004a) Mutation analysis in Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. *Clin Chem*, **50**, 2003-2011.
- Sanz-Rodriguez, F., Guerrero-Esteo, M., Botella, L.M., Banville, D., Vary, C.P. and Bernabeu, C. (2004b) Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem*, **279**, 32858-32868.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. and Qin, Y. (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, **376**, 70-74.
- Saura, M., Zaragoza, C., Cao, W., Bao, C., Rodriguez-Puyol, M., Rodriguez-Puyol, D. and Lowenstein, C.J. (2002) Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ Res*, **91**, 806-813.
- Schlueter, C., Weber, H., Meyer, B., Rogalla, P., Roser, K., Hauke, S. and Bullerdiek, J. (2005) Angiogenetic signaling through hypoxia:

- HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol*, **166**, 1259-1263.
- Schwartz, E.A., Reaven, E., Topper, J.N. and Tsao, P.S. (2005) Transforming growth factor-beta receptors localize to caveolae and regulate endothelial nitric oxide synthase in normal human endothelial cells. *Biochem J*, **390**, 199-206.
- Shovlin, C.L., Guttmacher, A.E., Buscarini, E., Faughnan, M.E., Hyland, R.H., Westermann, C.J., Kjeldsen, A.D. and Plauchu, H. (2000) Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet*, **91**, 66-67.
- Shovlin, C.L., Hughes, J.M., Scott, J., Seidman, C.E. and Seidman, J.G. (1997) Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet*, **61**, 68-79.
- Shovlin, C.L., Hughes, J.M., Tuddenham, E.G., Temperley, I., Perembelon, Y.F., Scott, J., Seidman, C.E. and Seidman, J.G. (1994) A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nat Genet*, **6**, 205-209.
- Shovlin, C.L. and Letarte, M. (1999) Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax*, **54**, 714-729.
- Song, J., Oh, S.P., Schrewe, H., Nomura, M., Lei, H., Okano, M., Gridley, T. and Li, E. (1999) The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev Biol*, **213**, 157-169.
- Srinivasan, S., Hanes, M.A., Dickens, T., Porteous, M.E., Oh, S.P., Hale, L.P. and Marchuk, D.A. (2003) A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet*, **12**, 473-482.
- St-Jacques, S., Cymerman, U., Pece, N. and Letarte, M. (1994) Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology*, **134**, 2645-2657.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, **87**, 1171-1180.
- Sutton, H. G. (1864) Epistaxis as an indication of impaired nutrition, and of degeneration of the vascular system. *Medical Mirror*, **1**, 769-781.
- ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H. and Miyazono, K. (1993) Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*, **8**, 2879-2887.
- Thorsen, S. (1975) Differences in the binding to fibrin of native plasminogen and plasminogen modified by proteolytic degradation. Influence of omega-aminocarboxylic acids. *Biochim Biophys Acta*, **393**, 55-65.
- Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M.G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D.H., Husain, M. and Letarte, M. (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res*, **96**, 684-692.

- Torsney, E., Charlton, R., Diamond, A.G., Burn, J., Soames, J.V. and Arthur, H.M. (2003) Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation*, **107**, 1653-1657.
- Trembath, R.C., Thomson, J.R., Machado, R.D., Morgan, N.V., Atkinson, C., Winship, I., Simonneau, G., Galie, N., Loyd, J.E., Humbert, M., Nichols, W.C., Morrell, N.W., Berg, J., Manes, A., McGaughran, J., Pauciulo, M. and Wheeler, L. (2001) Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*, **345**, 325-334.
- Tsutsui, T., Kumakura, S., Yamamoto, A., Kanai, H., Tamura, Y., Kato, T., Anpo, M., Tahara, H. and Barrett, J.C. (2002) Association of p16(INK4a) and pRb inactivation with immortalization of human cells. *Carcinogenesis*, **23**, 2111-2117.
- Urness, L.D., Sorensen, L.K. and Li, D.Y. (2000) Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*, **26**, 328-331.
- Valdimarsdottir, G., Goumans, M.J., Itoh, F., Itoh, S., Heldin, C.H. and ten Dijke, P. (2006) Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol*, **7**, 16.
- van de Kerkhof, P.C., Rulo, H.F., van Pelt, J.P., van Vlijmen-Willems, I.M. and De Jong, E.M. (1998) Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol*, **78**, 19-21.
- van der Veen, R., Kwakman, J.H. and Grivell, L.A. (1987) Mutations at the lariat acceptor site allow self-splicing of a group II intron without lariat formation. *Embo J*, **6**, 3827-3831.
- Vase, I. and Vase, P. (1979) Ocular lesions in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, **57**, 1084-1090.
- Vase, P. and Grove, O. (1986) Gastrointestinal lesions in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Gastroenterology*, **91**, 1079-1083.
- Veitonmaki, N., Fuxe, J., Hultdin, M., Roos, G., Pettersson, R.F. and Cao, Y. (2003) Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb. *Faseb J*, **17**, 764-766.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdolah, Y., Lim, K.H., Yuan, H.T., Libermann, T.A., Stillman, I.E., Roberts, D., D'Amore, P.A., Epstein, F.H., Sellke, F.W., Romero, R., Sukhatme, V.P., Letarte, M. and Karumanchi, S.A. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*, **12**, 642-649.
- Vincent, E.B., Runyan, R.B. and Weeks, D.L. (1998) Production of the transforming growth factor-beta binding protein endoglin is regulated during chick heart development. *Dev Dyn*, **213**, 237-247.
- Vincent, P., Plauchu, H., Hazan, J., Faure, S., Weissenbach, J. and Godet, J. (1995) A third locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12q. *Hum Mol Genet*, **4**, 945-949.
- Wallez, Y., Vilgrain, I. and Huber, P. (2006) Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med*, **16**, 55-59.

- Wang, J.M., Kumar, S., van Agthoven, A., Kumar, P., Pye, D. and Hunter, R.D. (1995) Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells. *Int J Cancer*, **62**, 791-796.
- Wang, S., Dangerfield, J.P., Young, R.E. and Nourshargh, S. (2005) PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J Cell Sci*, **118**, 2067-2076.
- Weber, F. P. (1907) Multiple hereditary developmental angiomas (telangiectases) of the skin and mucous membranes associated with recurring haemorrhages. *Lancet*. **2**, 160-162.
- Wegmann, F., Petri, B., Khandoga, A.G., Moser, C., Khandoga, A., Volkery, S., Li, H., Nasdala, I., Brandau, O., Fassler, R., Butz, S., Krombach, F. and Vestweber, D. (2006) ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J Exp Med*, **203**, 1671-1677.
- Westphal, J.R., Willems, H.W., Schalkwijk, C.J., Ruiter, D.J. and de Waal, R.M. (1993) A new 180-kDa dermal endothelial cell activation antigen: in vitro and in situ characteristics. *J Invest Dermatol*, **100**, 27-34.
- Wiercinska, E., Wickert, L., Denecke, B., Said, H.M., Hamzavi, J., Gressner, A.M., Thorikay, M., ten Dijke, P., Mertens, P.R., Breitkopf, K. and Dooley, S. (2006) Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, **43**, 1032-1041.
- Willemse, R.B., Mager, J.J., Westermann, C.J., Overtoom, T.T., Mauser, H. and Wolbers, J.G. (2000) Bleeding risk of cerebrovascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Neurosurg*, **92**, 779-784.
- World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects (1997) *Cardiovascular Research*, 35: 2-4.
- Wu, X., Ma, J., Han, J.D., Wang, N. and Chen, Y.G. (2006) Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc Res*, **71**, 12-19.
- Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzen, P., Miyazono, K. and Heldin, C.H. (1994) Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, **269**, 20172-20178.
- Yee, J.A., Yan, L., Dominguez, J.C., Allan, E.H. and Martin, T.J. (1993) Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol*, **157**, 528-534.
- Yu, Q. (2005) The dynamic roles of angiopoietins in tumor angiogenesis. *Future Oncol*, **1**, 475-484.
- Yue, J. and Mulder, K.M. (2000) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol*, **142**, 125-131.

Anexos

Anexo I. Tablas 8 y 9.

*Genes diferencialmente expresados en el
experimento de Microarrays*

<i>Gen</i>	<i>Código de acceso</i>	<i>Ratio HHT1 vs C</i>	<i>Ratio HHT2n vs C</i>	<i>Ratio HHT2m vs C</i>
ABLIM1	NM_002313	-2,51	-3,67	-3,22
ACVRL1	AK056725	-2,45	-4,77	-2,96
AF15Q14	AA662240	-2,27	-1,76	-0,92
AHNAK	M80899	-2,67	-2,04	-1,67
AKR1C3	NM_003739	-2,46	-1,21	-2,87
ALPK3	AL833276	-2,48	-4,67	-2,75
AMD1	NM_001634	-4,23	-1,58	-3,88
ANGPT2	NM_001147	-1,42	-7,49	-2,05
ARHGAP10	NM_024605	-3,99	-1,61	-2,92
ARHGEF15	NM_173728	-1,76	-2,98	-2,37
ASB9	NM_024087	-3,51	-2,92	-2,17
ASK	NM_006716	-2,57	-1,56	-2,51
B4GALT5	NM_004776	-1,45	-2,35	-0,54
BAT3	NM_004639	-1,67	-1,18	-2,22
BNIP1	NM_001205	-3,23	-2,03	-2,68
BNIP2	AK125533	-3,36	-2,33	-3,50
BTBD6	NM_033271	-3,15	-1,38	-2,56
C10orf3	NM_018131	-2,55	-2,01	-1,98
C14orf109	BU739864	-2,47	-1,99	-2,42
C21orf63	NM_058187	-2,57	-2,27	-1,68
C6orf11	NM_005452	-3,01	-1,87	-2,19
C9orf112	NM_138778	-3,85	-2,30	-3,54
C9orf58	NM_031426	-1,62	-3,71	-1,41
C9orf59	NM_033387	-1,24	-3,02	-1,54
CALCRL	NM_005795	-1,99	-6,25	-3,60
CAV2	R01546	-3,42	-2,03	-2,80
CBX2	BG354579	-0,93	-2,10	-1,17
CCNA2	NM_001237	-1,61	-1,78	-1,55
CCNB2	NM_004701	-1,63	-1,81	-0,53
CDC25B	NM_212530	-1,47	-1,25	-0,64
CDYL	NM_004824	-1,32	-1,89	-1,61
CDYL2	NM_152342	-0,96	-2,42	-1,41
CECR6	NM_031890	-1,15	-2,43	-1,54
CENPF	NM_016343	-2,30	-1,99	-1,48
CFLAR	NM_003879	-2,40	-2,45	-1,56
CGI-119	NM_016056	-3,09	-1,74	-3,59
CHAF1A	NM_005483	-3,61	-2,00	-2,91
CHCHD3	NM_017812	-1,84	-2,02	-1,92
CHEK1	NM_001274	-3,37	-1,82	-2,75
ChGn	NM_018371	-1,15	-3,10	-1,97
CHMP1.5	NM_020412	-3,71	-2,30	-3,40
CIDEB	NM_014430	-2,92	-2,69	-2,93
CKS1B	NM_001826	-2,79	-1,35	-1,57

COPS3	NM_003653	-4,25	-1,70	-3,73
CPSF1	NM_013291	-1,75	-2,22	-2,85
CPSF3	NM_016207	-2,91	-2,31	-2,60
CSE1L	NM_001316	-1,45	-1,38	-2,58
CSRP1	NM_004078	-3,75	-2,69	-3,77
CYYR1	NM_052954	-1,82	-5,26	-1,32
DEK	NM_003472	-2,84	-2,02	-2,16
DKFZP547E1010	R43702	-3,00	-1,56	-3,02
DKFZp762E1312	NM_018410	-1,81	-1,81	-0,74
DLG7	NM_014750	-1,51	-2,63	-1,01
DNAJA1	NM_001539	-1,82	-1,45	-2,18
DNASE1L3	NM_004944	-3,39	-4,98	-4,97
DRB1	NM_152945	-3,44	-1,93	-3,79
DSTN	NM_006870	-2,47	-0,96	-2,44
DTYMK	NM_012145	-3,08	-1,21	-2,12
DVL3	NM_004423	-3,51	-1,38	-3,70
DYSF	NM_003494	-3,13	-6,37	-3,54
EDG1	NM_001400	-2,36	-4,49	-3,06
EIF2S2	NM_003908	-3,86	-1,57	-3,27
EIF3S5	NM_003754	-1,91	-1,16	-2,24
EIF4A1	NM_001416	-5,77	-2,07	-4,91
EIF4A2	R89137	-2,34	-2,19	-2,67
ERCC3	NM_000122	-3,82	-1,92	-3,63
ESAM	NM_138961	-0,73	-7,47	-0,79
ETFA	NM_000126	-3,11	-1,53	-3,26
F11R	NM_016946	-2,76	-3,39	-3,33
FABP4	NM_001442	-1,07	-7,29	-1,24
FABP5	NM_001444	-3,42	-2,89	-3,59
FAHD1	NM_031208	-3,96	-2,52	-3,90
FEN1	NM_004111	-4,16	-1,92	-3,30
FGD5	NM_152536	-2,71	-5,64	-3,45
FLJ10213	NM_018029	-2,77	-2,12	-3,31
FLJ10853	NM_018246	-3,49	-1,29	-3,57
FLJ11724	AK021786	-1,82	-3,41	-1,61
FLJ11795	NM_024669	-1,09	-4,37	-2,16
FLJ12604	NM_024621	-2,19	-2,43	-1,81
FLJ12649	BC040518	-2,31	-2,24	-1,63
FLJ13912	NM_022770	-1,77	-2,80	-0,87
FLJ20641	NM_017915	-3,34	-1,36	-0,99
FLJ21103	NM_024556	-2,67	-1,58	-3,38
FLJ21438	AK024488	-0,92	-4,54	-5,20
FLJ21616	NM_024567	-2,05	-2,75	-1,64
FLJ22635	NM_025092	-0,96	-1,67	-1,81
FLJ22794	BC071759	-2,92	-2,15	-1,60
FLJ36031	AK098422	-0,78	-1,35	-1,02
FLJ40504	NM_173624	-2,30	-4,83	-2,03

FN5	NM_020179	-2,48	-1,93	-2,96
FPGS	NM_004957	-2,52	-1,64	-2,59
FTS	NM_022476	-1,54	-1,88	-1,65
FYN	NM_153047	-4,24	-1,46	-4,33
GABARAPL1	NM_031412	-1,31	-2,37	-2,49
GABPB2	NM_005254	-2,75	-2,81	-3,07
GAL	NM_015973	-3,18	-2,17	-1,36
GALNT1	U41514	-2,43	-4,17	-1,96
GALNT6	AA419568	-0,96	-2,03	-0,70
GBP3	NM_018284	-0,95	-3,25	-3,15
GDF3	NM_020634	-4,00	-3,66	-3,60
GDI2	NM_001494	-2,81	-1,57	-3,17
GIMAP1	NM_130759	-0,77	-6,77	-0,93
GIMAP4	NM_018326	-1,27	-8,52	-1,81
GIMAP5	NM_018384	-1,42	-2,87	-1,69
GIMAP7	NM_153236	-0,75	-5,59	-0,80
GLCE	BQ889128	-5,62	-3,87	-4,55
GNAS	NM_016592	-2,24	-1,23	-2,28
GOT2	NM_002080	-0,86	-1,79	-1,21
GPS1	NM_212492	-1,99	-1,91	-2,90
GTF2I	NM_032999	-3,28	-2,23	-3,69
HAN11	NM_005828	-1,21	-1,24	-1,65
HAT1	NM_003642	-3,24	-1,70	-2,16
HCAP-G	AF331796	-1,80	-2,35	-0,64
HMG20B	NM_006339	-2,35	-1,70	-3,01
HMGB1	NM_002128	-2,59	-1,72	-2,01
HMGB2	NM_002129	-1,24	-1,48	-0,53
HMMR	NM_012484	-1,74	-1,41	-1,20
HNRPA2B1	NM_002137	-1,61	-1,02	-1,36
HNRPK	NM_002140	-1,61	-1,40	-2,02
HSPA1A	NM_005345	-0,83	-1,80	-1,06
HSPA9B	NM_004134	-2,68	-1,22	-3,09
HSPC132	NM_016399	-2,10	-1,58	-1,09
HSPC152	NM_016404	-3,07	-1,11	-2,32
HSPCB	NM_007355	-0,75	-1,40	-0,78
HSPG2	NM_005529	-1,36	-2,35	-2,47
HT036	NM_031207	-2,61	-3,41	-2,48
ILF2	NM_004515	-0,81	-1,25	-1,66
ITGA6	NM_000210	-2,03	-3,95	-2,05
ITGB3BP	NM_014288	-2,46	-2,01	-1,57
KIAA0102	NM_014752	-2,86	-1,23	-3,19
KIAA0367	AL119769	-2,91	-3,87	-3,00
KIAA0540	BU429796	-2,94	-3,29	-2,93
KIAA0804	BX647915	-1,48	-1,79	-1,53
KIAA1272	AY007156	-0,53	-2,92	-1,08
KIF11	NM_004523	-1,96	-2,18	-1,38

KIF2C	NM_006845	-4,03	-2,39	-3,48
KPNA2	NM_002266	-0,79	-1,81	-0,71
KRTCAP2	NM_173852	-2,99	-1,10	-3,16
KTN1	NM_182926	-0,77	-1,52	-0,57
LDHB	NM_002300	-3,19	-1,70	-2,93
LOC130617	NM_138802	-3,34	-2,07	-3,42
LOC133619	NM_130809	-2,34	-1,26	-3,09
LOC348645	AI628657	-0,94	-5,39	-1,46
LOC91120	NM_033196	-1,13	-3,18	-1,42
LOC92162	NM_203411	-3,00	-6,48	-1,85
LRIG3	NM_153377	-4,07	-3,44	-4,01
LRPAP1	NM_002337	-1,81	-1,34	-2,45
LRRC28	NM_144598	-1,70	-1,34	-1,29
LTA4H	NM_000895	-0,59	-1,58	-1,75
MAT2B	NM_182796	-2,59	-3,00	-2,75
MBNL1	AW296451	-2,11	-2,83	-1,72
MCTP1	AK058012	-1,39	-3,65	-1,76
MED28	BM711190	-1,80	-2,09	-2,42
MEF2C	NM_002397	-2,03	-3,33	-2,14
MELK	NM_014791	-2,62	-2,15	-2,08
METAP1	NM_015143	-3,85	-2,32	-3,64
MGC13204	NM_031465	-2,45	-2,57	-3,28
MGC2714	NM_032299	-2,53	-1,40	-2,63
MGC3265	NM_024028	-1,78	-1,86	-2,45
MGC3794	NM_152902	-3,05	-1,42	-3,00
MGC49942	NM_174893	-3,08	-1,36	-2,98
MGC51082	NM_182498	-3,91	-2,80	-2,80
MGC57827	NM_207418	-1,59	-1,49	-0,77
MIS12	NM_024039	-3,31	-1,87	-3,32
MLZE	NM_031415	-3,44	-3,36	-3,85
MMRN1	NM_007351	-0,54	-4,12	-1,32
MRPL13	NM_014078	-3,05	-1,14	-3,08
MRPL35	NM_145644	-1,52	-1,69	-1,02
MRPS7	NM_015971	-3,33	-1,64	-3,26
MTA1	NM_004689	-3,58	-1,51	-3,20
MTB	T99312	-6,21	-2,34	-4,07
MTUS1	NM_001001931	-0,49	-2,90	-1,06
MTUS1	CA429135	-2,04	-4,46	-2,51
MX1	NM_002462	-2,09	-2,79	-3,04
MYCT1	NM_025107	-1,15	-3,03	-1,53
NAGPA	NM_016256	-3,04	-1,91	-3,68
NDUFV2	BI908152	-3,46	-2,41	-2,12
NEU1	NM_000434	-2,76	-2,69	-2,12
NFATC2	H80534	-1,79	-3,47	-2,44
NFIB	NM_005596	-0,60	-2,96	-1,21
NK4	NM_004221	-2,74	-3,30	-3,67

NOP5/NOP58	NM_015934	-3,56	-1,32	-2,58
NOS3	NM_000603	-1,63	-3,18	-0,99
NT5C3	NM_016489	-3,98	-2,07	-3,00
OIP5	NM_007280	-4,93	-3,88	-4,43
OXA1L	AI829834	-3,43	-2,00	-3,16
OXCT1	NM_000436	-3,80	-1,84	-3,51
PAI-RBP1	NM_015640	-1,43	-1,45	-0,92
PAPLN	NM_173462	-1,04	-2,80	-1,52
PBEF1	AK023341	-2,02	-2,27	-1,79
PCCB	NM_000532	-3,57	-1,23	-2,73
PCDH12	NM_016580	-1,36	-3,94	-2,36
PCNP	NM_020357	-1,18	-1,87	-1,96
PDCD6IP	W77963	-3,54	-1,85	-4,02
PDE2A	NM_002599	-0,78	-5,64	-0,99
PDF	NM_022341	-3,97	-2,06	-3,45
PECAM1	NM_000442	-1,82	-1,90	-2,35
PGBD1	NM_032507	-1,06	-1,85	-2,05
PGM2	NM_018290	-3,48	-3,06	-4,31
PIK3C2B	NM_002646	-0,95	-5,37	-0,73
PIM3	NM_001001852	-0,67	-2,26	-1,27
PITX1	NM_002653	-3,39	-4,44	-4,31
PLAT	NM_000930	-1,19	-1,31	-0,79
PLCB1	AW444937	-3,74	-2,55	-2,67
PLCG2	NM_002661	-1,25	-4,39	-2,26
PLSCR4	NM_020353	-2,01	-3,69	-2,42
PMF1	NM_007221	-1,69	-1,34	-1,79
PPGB	NM_000308	-1,97	-1,48	-3,08
PPT1	NM_000310	-1,70	-2,40	-1,95
PRKCH	NM_006255	-0,93	-4,28	-1,46
PRPF8	NM_006445	-1,22	-2,32	-2,19
PRPSAP2	NM_002767	-3,71	-3,21	-4,16
PSIP1	NM_033222	-1,32	-2,34	-1,70
PSMA4	NM_002789	-4,18	-2,06	-3,85
PSMB9	NM_002800	-1,71	-1,60	-2,86
PTPRB	AL080103	-1,94	-3,25	-2,67
PXK	NM_017771	-1,15	-1,21	-1,69
RAB8B	NM_016530	-3,34	-1,60	-2,68
RAD1	NM_002853	-4,35	-1,85	-3,35
RASIP1	NM_017805	-2,42	-6,29	-2,23
RBMS3	BX649052	-4,07	-2,98	-3,66
REA	NM_007273	-2,94	-1,12	-2,73
RHOBTB1	NM_014836	-2,85	-2,31	-3,33
RHOJ	AA187037	-2,01	-3,30	-2,74
RNF149	NM_173647	-3,62	-1,44	-2,83
RRM1	NM_001033	-3,25	-2,13	-2,66
SEC15L1	NM_019053	-3,81	-4,81	-3,80

SERPINB1	NM_030666	-0,64	-1,19	-1,26
SF3B14	NM_016047	-3,37	-1,11	-3,28
SIAT1	NM_003032	-1,37	-2,99	-2,31
SIAT9	NM_003896	-1,99	-2,99	-2,31
SLC12A2	U30246	-0,66	-2,63	-1,96
SLC25A29	BU197217	-3,04	-1,29	-3,18
SLC27A3	NM_024330	-0,85	-2,07	-1,17
SLC35A5	NM_017945	-3,14	-2,41	-3,37
SLC40A1	NM_014585	-3,67	-3,93	-3,09
SNRK	NM_017719	-3,13	-2,78	-3,08
SPATA7	NM_018418	-4,87	-2,86	-4,92
Spc25	NM_020675	-2,15	-1,43	-0,56
SPTBN1	NM_003128	-0,77	-2,73	-2,18
SRA1	AK054960	-1,07	-4,10	-0,69
SRPRB	NM_021203	-2,85	-1,54	-2,69
STMN1	NM_203401	-2,88	-2,54	-3,34
STMN1	NM_203401	-0,85	-1,39	-0,69
STRBP	NM_018387	-2,08	-2,21	-2,21
SULT1B1	NM_014465	-3,01	-2,46	-0,93
SYNCRIP	NM_006372	-4,26	-2,08	-3,12
SYNPO	AB028952	-3,10	-3,62	-3,18
TACC3	NM_006342	-1,63	-1,11	-0,70
TAF7	NM_005642	-2,46	-1,87	-2,44
TAX1BP3	NM_014604	-2,45	-2,19	-3,50
TGFBRAP1	BI857114	-1,15	-1,59	-1,24
TIMM13	NM_012458	-3,64	-1,32	-2,97
TM4SF14	NM_030927	-0,70	-2,00	-1,21
TM7SF3	NM_016551	-2,40	-1,95	-2,76
TMED9	BM920666	-1,86	-1,85	-2,12
TMEM37	BC046362	-1,07	-4,22	-0,98
TncRNA	W37893	-1,49	-1,60	-0,83
TOMM22	NM_020243	-1,00	-1,50	-1,23
TOP2A	NM_001067	-1,42	-2,37	-1,13
TPX2	NM_012112	-1,45	-3,08	-0,93
TREX1	NM_016381	-3,03	-1,47	-2,95
UBE2R2	NM_017811	-3,20	-2,18	-3,09
UPP1	NM_003364	-1,59	-2,73	-2,53
UREB1	NM_031407	-3,41	-1,54	-3,50
USP1	NM_003368	-3,46	-2,84	-2,60
VPS11	NM_021729	-3,12	-1,52	-3,44
WARS	NM_004184	-1,17	-1,98	-1,97
WASL	D88460	-3,71	-3,15	-2,30
WDFY1	NM_020830	-1,96	-1,60	-2,34
XLKD1	NM_006691	-1,16	-4,37	-0,94
YWHAB	NM_003404	-0,68	-1,52	-0,97
YWHAQ	NM_006826	-2,98	-1,70	-3,36

ZA20D3	NM_019006	-1,95	-2,15	-2,85
ZCSL3	NM_181706	-2,29	-1,52	-2,09
ZCWCC1	NM_014941	-4,28	-1,60	-4,01
ZNF9	NM_003418	-2,78	-1,61	-2,60

Tabla 8. Genes encontrados en el Microarray con expresión disminuida. Se muestran los genes cuya expresión está diferencialmente disminuida en células BOEC HHT frente a control. En las distintas columnas se representa el nombre del gen por orden alfabético, el código de entrada de cada gen al GenBank, y las veces de disminución de la expresión como \log_2 de HHT1, HHT2n y HHT2m, respectivamente, comparado con el control. En todos los casos los datos son estadísticamente significativos siendo, al menos, $p < 0.05$.

<i>Gen</i>	<i>Código de acceso</i>	<i>Ratio HHT1 vs C</i>	<i>Ratio HHT2n vs C</i>	<i>Ratio HHT2m vs C</i>
APOBEC3C	NM_014508	0,76	1,50	1,22
C18orf21	NM_031446	0,66	1,81	0,81
C21orf57	BM829897.1	1,03	1,95	1,51
CaMKIINalpha	NM_018584.4	1,57	2,20	1,43
CAPG	NM_001747.1	1,46	2,79	1,81
CCR7	NM_001242	1,99	1,80	1,66
CLCN5	BX098173.1	2,81	2,50	2,46
COX7A2L	AA888530.1	5,45	5,38	5,58
CYP1B1	NM_000104.2	4,89	5,90	5,58
DCTD	BC108278	1,25	1,44	1,15
DLGAP1	NM_001003809	0,75	1,51	0,89
DYRK4	NM_003845.1	4,10	4,12	4,02
FAM14A	NM_032036.1	0,89	1,85	0,96
FAM20C	NM_020223.1	1,08	2,68	0,98
FBN2	NM_001999.2	4,01	5,02	6,41
FHOD3	NM_198900	1,28	1,08	0,90
FLJ10357	NM_018071	2,09	1,61	1,75
FLJ20582	NM_014106	1,71	1,50	1,53
FLJ23588	NM_198856	3,50	3,01	3,22
FLJ25351	AI919317.1	2,51	2,11	2,26
FTH1	BG939615.1	0,70	1,04	0,62
GALP	NM_033106.1	0,59	1,55	0,68
GAS6	NM_000820.1	2,45	2,99	1,23
GLIPR1	NM_006851.1	2,16	2,28	2,29
GLS2	NM_013267	1,52	1,16	0,91
GRIP2	AF052177.1	2,31	1,80	2,15
HLA-DMB	NM_002118.3	2,97	2,38	2,42
HRH1	NM_000861.2	0,93	1,36	0,89
INHBA	NM_002192.1	1,28	1,80	1,42

KIAA1641	AK024934.1	1,91	1,48	1,60
KIF1A	NM_022113	2,74	2,36	2,25
KITLG	NM_000899	0,88	1,35	1,26
KRT19	NM_002276.3	1,11	1,70	3,26
LRRN6A	NM_032808	2,38	2,11	2,25
MT1E	NM_175617	0,63	2,43	1,32
MYL9	NM_006097.3	1,44	3,13	1,11
MYO15A	BQ447410.1	3,15	2,83	2,82
NDN	NM_002487.2	2,46	3,90	4,22
NDUFA8	NC_000009	3,58	2,72	3,84
NFAT5	NM_173215	2,08	1,64	2,00
PCBP4	NM_033010	0,61	1,25	0,72
PHF12	NM_020889.1	2,65	2,32	2,41
PHLDA2	NM_003311.2	1,11	1,99	1,35
PPP1R12A	NC_000012	1,41	1,21	0,92
PRSS12	NW_922162	1,37	2,18	0,99
REC14	NM_025234	2,32	1,99	2,26
RNASET2	NM_003730.3	1,76	1,62	1,28
SEMA3B	NM_004636.1	2,11	2,06	2,04
SERPINE1	NM_000602.1	1,22	1,02	1,16
SERPINE1	AU158706.1	1,01	2,50	1,08
SETDB1	NM_153759	1,92	5,41	3,00
SLC35B2	NM_178148	1,24	1,37	0,93
SLC35D3	NM_001008783	1,71	1,38	1,44
SPARC	AA634615.1	1,03	1,20	0,77
TNFRSF12A	NM_016639.1	1,41	1,35	1,07
VPS16	NM_007259	3,43	3,17	3,19
WFDC3	BF002489.1	1,87	1,63	1,81
ZNF169	NM_194320	0,88	1,08	0,77

Tabla 9. Genes encontrados en el Microarray con expresión aumentada. Se muestran los genes cuya expresión está diferencialmente aumentada en células BOEC HHT frente a control. Los parámetros que se muestran son equivalentes a la Tabla 8.

Anexo II.

*Publicaciones surgidas del trabajo
mostrado en esta Tesis Doctoral.*

Mutation Analysis in Spanish Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Deficient Endoglin Up-regulation in Activated Monocytes

FRANCISCO SANZ-RODRIGUEZ,^{1,2†} AFRICA FERNANDEZ-L.,^{1†} ROBERTO ZARRABEITIA,³
ALFONSO PEREZ-MOLINO,³ JOSE R. RAMÍREZ,⁴ ELIECER COTO,⁵ CARMELO BERNABEU,¹ and
LUISA M. BOTELLA^{1*}

Background: Mutations in the *endoglin* (*ENG*) or *ALK1* genes are responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia types 1 and 2 (HHT1 and HHT2), respectively, a dominant vascular dysplasia caused by haploinsufficiency. No formal mutation studies of patients with HHT have been conducted in Spain.

Methods: *ENG* and *ALK1* mutation analyses were carried out in 13 Spanish HHT patients diagnosed according to the Curaçao criteria. Because endoglin is up-regulated at the cell surface during the monocyte-macrophage transition, endoglin concentrations in activated monocytes were determined by immunofluorescence flow cytometry in a systematic analysis. As controls, 40 non-HHT volunteers were studied for up-regulation of endoglin in activated monocytes.

Results: The mutation responsible for HHT was identified in eight patients belonging to two unrelated families. One of the families has a nonsense mutation in exon 4 (c.511C>T; R171X) of the *ENG* gene, and accordingly the disorder was identified as HHT1. The other family has a missense mutation affecting exon 8 (c.1120C>T; R374W) of the *ALK1* gene, and hence is a

HHT2 family. Interestingly, endoglin up-regulation was deficient in activated monocytes of both HHT1 and HHT2 patients compared with controls. By contrast, endoglin up-regulation was age-independent in control donors across a broad range of ages. The extent of endoglin up-regulation in activated monocytes was most diminished in those patients with the most severe symptoms.

Conclusions: Endoglin up-regulation in activated monocytes is impaired in HHT1 and HHT2 patients and is age-dependent in both HHT types. Endoglin expression may predict the clinical severity of HHT.

© 2004 American Association for Clinical Chemistry

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT;⁶ OMIM 187300), or Rendu–Osler–Weber syndrome, is an inherited autosomal dominant disease affecting 1 in 10 000 individuals as assessed in several human populations (1, 2). HHT exhibits age-dependent onset and variable penetrance (1, 3, 4). The disease is characterized by abnormal vascular structures, which lead to epistaxis, telangiectasia, and anemia as well as visceral arteriovenous malformations (AVMs) in the lung, brain, and liver. These may contribute to serious health outcomes, such as stroke, seizures, brain abscess, and hemorrhage (5).

HHT is a genetically heterogeneous disorder. The first locus, HHT1, was assigned to chromosome 9q33–34 where *endoglin* (*ENG*) was identified as the mutated gene (6, 7). Endoglin (CD105) is a transmembrane homodimeric glycoprotein produced mainly in endothelial

¹ Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.

² Departamento de Biología y Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

³ Servicio de Medicina Interna, Hospital Sierrallana, Torrelavega (Cantabria), Spain.

⁴ Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Central de la Defensa, Gómez Ulla, Madrid, Spain.

⁵ Genética Molecular-Instituto Reina Sofía de Investigación Renal, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain.

†These authors should be considered joint first authors.

*Address correspondence to this author at: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain. Fax 34-915360432; e-mail cibluisa@cib.csic.es.

Received April 6, 2004; accepted August 27, 2004.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2004.035287

⁶ Nonstandard abbreviations: HHT, hereditary hemorrhagic telangiectasia; AVM, arteriovenous malformation; ALK1, activin receptor-like kinase 1; TGF- β , transforming growth factor- β ; HUVEC, human umbilical cord vein endothelial cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RT-PCR, reverse transcription-PCR; mAb, monoclonal antibody; and FITC, fluorescein isothiocyanate.

cells, but is also present at lower concentrations in activated monocytes (8–10). It may function as an auxiliary transforming growth factor- β (TGF- β) co-receptor (11, 12) and as a modulator of cell migratory and adhesive properties (13, 14). The second locus, HHT2, is the *ALK1* (activin receptor-like kinase 1) gene and maps to chromosome 12q (15, 16). *ALK1* is also expressed on endothelial cells, and *ALK1* is a type I receptor for the TGF- β superfamily. TGF- β and other members of this superfamily signal through type I and II serine/threonine kinase receptors (17). After ligand binding, the type II receptor recruits the type I receptor, and the latter is transphosphorylated, leading to its activation. Once activated, the type I receptor transduces signals by phosphorylating a family of transcriptional coactivators, the Smads (18), which leads to their translocation to the nucleus and interaction with TGF- β -responsive genes. Because endoglin and *ALK1* are involved in the TGF- β signaling pathway and mutations in either of the genes coding for these proteins lead to HHT, it is hypothesized that both proteins participate in a common mechanism of vascular development and/or homeostasis.

The development of powerful molecular approaches for amplifying and sequencing genomic DNA from HHT patients allows, in most cases, determination of the genetic mutation responsible for the disease. However, the provision of a sequence-based diagnostic service is hampered by the predominance of novel mutations in affected individuals (at least in *ENG* and *ALK1*) and difficulties in detecting mutations in the heterozygous state, especially when a single base change underlies the cause of the disease. Thus, the diagnosis of HHT currently remains at the clinical level. Consequently, on behalf of the Scientific Advisory Board of the HHT Foundation, a consensus clinical profile, known as the Curaçao criteria, was developed and is currently used for clinical diagnosis of HHT (19). These criteria include four traits: epistaxis (spontaneous, recurrent nose bleeds); telangiectasias (multiple at characteristic sites, such as the lips, oral cavity, fingers, and nose); visceral lesions (AVMs in the lung, brain, liver, or spinal cord); and a family history. In accordance with these criteria, the HHT diagnosis is definite if three of four of these criteria are present; it is possible or suspected if two criteria are present and unlikely if fewer than two criteria are present.

Haploinsufficiency of the endoglin protein is currently accepted as the molecular basis for HHT1. Mutated endoglin proteins do not appear to be produced at the cell surface, and some nonsense mutations give rise to undetectable mRNA transcripts (3, 20, 21), leading to a loss of protein production. Haploinsufficiency has also been reported for HHT2 (22, 23). These observations suggest that direct measurement of the endoglin protein would constitute a useful diagnostic approach. However, the restricted expression of *ENG* and *ALK1*, mainly in endothelial cells, hampers direct measurement of the concentrations of the proteins encoded by these genes. In a few cases of HHT pregnancies, endothelial cells derived from

the umbilical cord vein (HUVECs) have been used as a tissue source for the direct study of endoglin mRNA and protein concentrations (9, 10, 22).

Interestingly, endoglin is up-regulated during the process of monocyte activation (8). This property has recently been used to quantify the relative endoglin concentrations in monocytes derived from HHT1 patients (9, 10). These authors concluded, however, that the true sensitivity and specificity of the test were difficult to establish. In this work, we present the first study formally conducted in Spain with HHT patients, of mutation analysis accompanied by flow cytometric quantification of endoglin up-regulation in activated monocytes.

Materials and Methods

CELL CULTURE

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from whole venous blood. Briefly, 5 mL of blood were used to recover mononuclear cells by Ficoll density gradient centrifugation using Lymphoprep Separation Medium (ICN) and centrifugation at 1500g for 30 min at 22 °C. Mononuclear cells were subsequently collected and washed in phosphate-buffered saline (PBS). Partially differentiated monocytes were subsequently obtained by plating of mononuclear cells on plastic in 6-cm wells of P-6 Falcon plates. Plated cells were incubated for 21 h in DMEM (Gibco BRL) supplemented with 100 mL/L fetal calf serum.

BLOOD SAMPLES, MUTATION ANALYSIS, AND REVERSE TRANSCRIPTION-PCR

Informed consent was obtained from all HHT patients and healthy non-HHT volunteers participating in the study. Positive diagnoses of HHT were based on the Curaçao criteria (19). The mutations in individuals analyzed in this study were confirmed by automated DNA sequence analysis. Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by use of the QIAamp Mini Kit (Qiagen). The 15 exons of the *ENG* gene were amplified by PCR using HotMaster Polymerase (Eppendorf) and sequenced by a cycle-sequencing protocol (Applied Biosystems) using previously reported primers (20). The nine exons of the *ALK1* gene were amplified and sequenced as described above, using primers reported elsewhere (22, 23). For reverse transcription-PCR (RT-PCR), total monocyte RNA was extracted by use of the RNeasy Kit (Qiagen). RNA (1 μ g) from monocytes plated for 20 min or 21 h was subjected to RT-PCR using the AMV reverse transcriptase (La Roche). One fourth of the total RNA-derived cDNA was subjected to PCR as described above, with primers corresponding to the coding region of exon 7 of *ALK1*: sense, 5'-CTTCATCGCCTCAGACAT-3'; antisense, 5'-GATGCAACACTGCAGGTT-3'.

FLOW CYTOMETRY

For identification of human peripheral blood monocytes, fresh PBMCs and PBMCs cultured for 21 h were aliquoted and stained with a monoclonal antibody (mAb) cocktail

containing anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD11c, and anti-CD11b. Subsequently, cells were washed twice with cold PBS and incubated with the appropriate fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody (Dako). Finally, cells were washed with cold PBS and fixed with a solution of 37 mL/L formaldehyde in cold PBS. A minimum of 10 000 stained cells were analyzed in a Coulter Epics XL flow cytometry system. Cells that were negative for CD3 and CD16 and positive for CD11c, CD11b, and CD14 were subsequently analyzed for endoglin production.

For analysis of endoglin up-regulation in differentiated monocytes, normal and HHT PBMCs were obtained, and monocytes were differentiated to macrophages by culture for 21 h as described above. For single-color flow cytometry, PBMCs from 10 mL of blood were divided equally and used at times 0 and 21 h after adherence. PBMCs or activated monocytes were then incubated with saturating amounts of mAb P4A4 [anti-endoglin (24)], Bear1 (anti-CD11b; kindly provided by Dr. Carl Figdor, University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands), or an isotype-matched control for 30 min at 4 °C in cold PBS. Incubations were conducted in the presence of human γ -globulins to block nonspecific binding and were followed by incubation with FITC-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG.

Samples were analyzed by flow cytometry as described above. Dead cells and contaminating lymphocytes were excluded by their forward- and side-scatter properties. A gate was set on CD11b⁺ cells, and these were analyzed for endoglin production. Endoglin values are reported in terms of the expression index, which is the product of the percentage of cells producing endoglin (positive cells) multiplied by the mean fluorescence intensity of the entire cell population (positive and negative).

STATISTICAL ANALYSIS

To analyze the age dependence of the endoglin expression index in non-HHT patients, we calculated the Pearson correlations among complete variables (age and endoglin expression index at 0 and 21 h) and the pooled correlations, taking into account that the factor-defining data originated from six sets of experiments.

Results

ENDOGLIN UP-REGULATION DURING ACTIVATION OF MONOCYTES

In the present work, endoglin up-regulation in the monocyte/macrophage transition was studied in controls and in HHT patients. The methodology for the flow cytometric analysis was essentially as described previously (8–10). Forward- and side-scatter analysis of control PBMCs together with single-color flow cytometry analysis allowed the identification of monocytes as a CD14-positive, CD3-negative, CD16-negative, CD11b-positive population (data not shown). We determined the basal concentrations of endoglin on freshly PBMCs and on cells

obtained after 21 h of adherence (Fig. 1). At time 0 h, monocytes produced low amounts of CD105 (12.4%, with a mean fluorescence intensity of 0.4). After 21 h of adherence, there was no significant change in CD11b production in the activated monocyte population, but 86% of these cells became CD105⁺, with a 2.3-fold increase in the mean fluorescence intensity. At all time points, the gate representing lymphocytes was CD3⁺ and <5% of the CD105⁺ mean fluorescence (data not shown).

ANALYSIS OF ENDOGLIN UP-REGULATION IN A PANEL OF NON-HHT INDIVIDUALS

Cymerman et al. (10) stressed the need for a large number of probands to establish the sensitivity and specificity of the predictive value of endoglin up-regulation in activated monocytes for HHT. Hence, we surveyed endoglin up-regulation in activated monocytes in blood samples from 40 non-HHT volunteers covering a broad age range (20–80 years). This presumptive non-HHT population was based on the absence of Curaçao criteria symptoms for the disease (19).

The specific flow cytometry technique was used in six series of experiments encompassing a total of 40 donors, averaging a minimum of 3 individuals per decade of age. In all cases, the apparent endoglin concentration was measured by flow cytometry using a mAb to human endoglin. The amount of endoglin was recorded in terms of the expression index (Fig. 2A). Although at 0 time the endoglin expression index in monocytes was almost negligible (0.06–12), endoglin production was markedly up-regulated after 21 h in culture, with endoglin expression index values fluctuating between 120 and 210; the mean for the controls was 175. This variability is likely derived

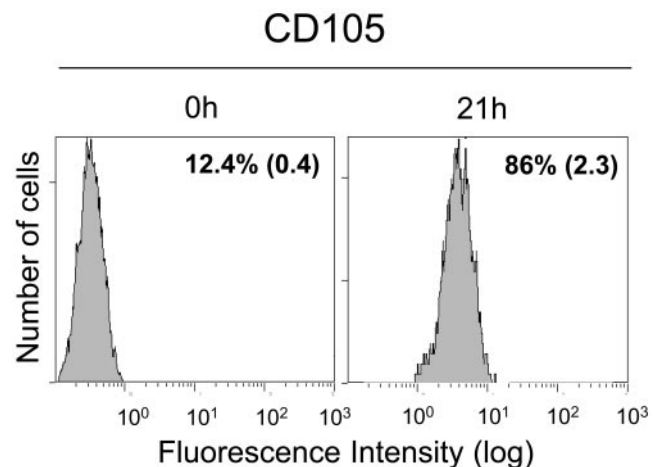


Fig. 1. Flow cytometry profiles from PBMCs.

Healthy PBMCs from 10 mL of blood were equally divided into 5-mL aliquots for two analyses. Freshly isolated PBMCs (0 h) and PBMCs that had undergone 21 h of monocyte activation by plastic adherence in culture (21 h) were subjected to single-color flow cytometry using mAb P4A4 (anti-CD105) followed by FITC-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG. The background produced by the control irrelevant antibody was subtracted from the final analysis of endoglin (CD105). The percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (in parentheses) are indicated.

from the blood collection process, fluctuations attributable to variation in hormonal and growth factor (i.e., TGF- β) concentrations (10), sample processing, and antibody reactivity inherent to each sample set collected and processed at the same time.

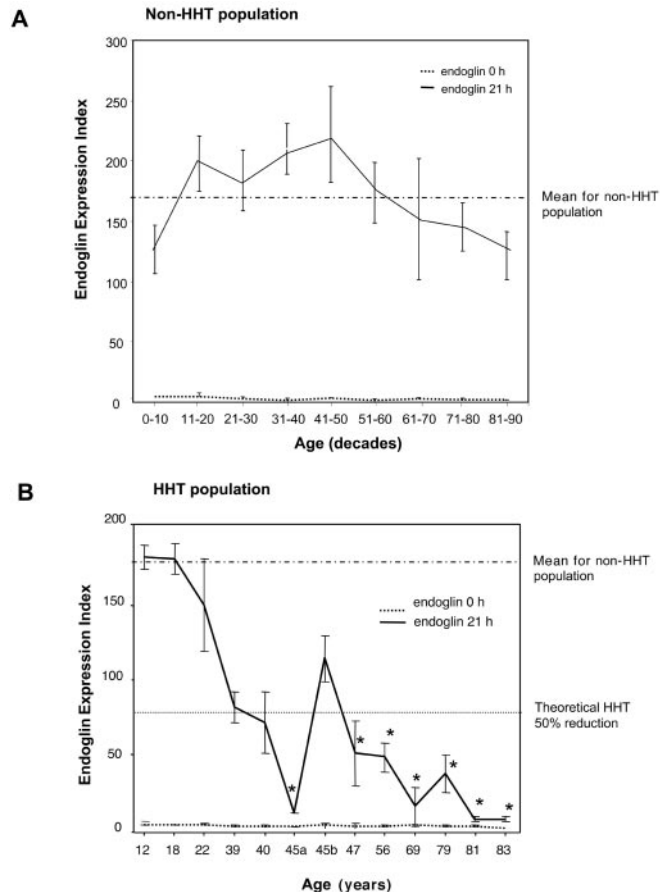


Fig. 2. Endoglin expression indexes in monocytes at 0 and 21 h of differentiation from non-HHT and HHT patients.

(A), expression index of endoglin in monocytes from non-HHT volunteers after 0 and 21 h of incubation. PBMCs from 10 mL of blood from non-HHT volunteers were equally divided into 5-mL aliquots for two analyses of endoglin (CD105) production by flow cytometry. One analysis was performed with freshly isolated PBMCs (0 h; dotted line), whereas the other was performed after 21 h of incubation in culture medium at 37 °C (21 h; solid line). The endoglin values at 0 and 21 h are reported as the expression index (the result of multiplying the percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity). The non-HHT population included volunteers spanning a broad age range. Each sample was analyzed in duplicate, and each age decade is represented by the mean of at least three different donors. No apparent correlation between age and endoglin expression index is apparent in activated monocytes (after 21 h incubation). (B), endoglin up-regulation is decreased in HHT patients and inversely related to their age and the severity of symptoms. Up-regulation of endoglin in partially differentiated monocytes is shown after adherence for 0 or 21 h. The endoglin concentration is reported as the expression index. Flow cytometry measurements were made on duplicate samples from 13 HHT patients diagnosed according to the Curaçao criteria. Endoglin up-regulation shows an inverse age-dependent correlation. * indicate samples from patients with markedly low up-regulation. Two 45-year-old patients are included (45a and 45b). The mutation for patient 45a had not been identified by the time of publication, and patient 45b had a mutation in *ALK1*, as indicated in Fig. 2 of the online Data Supplement. The low endoglin up-regulation of the 45a sample is associated with severe symptoms. The dotted line near the center of the graph indicates the theoretical 50% up-regulation in endoglin according to the heterozygous condition of the mutations and the haploinsufficiency hypothesis. The dot-dashed line indicates the mean for the non-HHT population and is shown for comparison.

The existence of a putative age dependence in endoglin up-regulation during the monocyte-macrophage transition in the control population was discarded based on two statistical tests: (a) the Pearson general correlation test using all 40 probands, and (b) a matrix of intragroup correlations taking the data as a pool of a series of independent experiments. In the first case, the Pearson test correlation coefficients of age and endoglin production (at 0 and 21 h) were 0.030 and -0.219 , respectively. Consistent with this finding, the matrix of intragroup correlations gave values of 0.011 and -0.274 , both approaches demonstrating the lack of significant correlations. Moreover, as HHT typically displays a late onset, we repeated the Pearson correlation test after excluding the 0–10 age group. The Pearson correlations were then 0.071 and -0.265 , whereas the corresponding intragroup matrix correlations were 0.042 and -0.322 at 0 and 21 h, respectively. Again, the correlation between age and endoglin production in the control probands was not significant. Therefore, from this statistical analysis we can conclude that in non-HHT patients, up-regulation of endoglin during the macrophage-monocyte transition is independent of age.

ENDOGLIN UP-REGULATION IN ACTIVATED MONOCYTES IS AGE-DEPENDENT IN THE HHT POPULATION

Endoglin up-regulation in HHT patients is shown in Fig. 2B. The clinical symptoms of these patients are summarized according to Curaçao criteria in Table 1 of the Data Supplement that accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol50/issue11/>. We observed a statistically significant decrease in endoglin up-regulation compared with the mean response of the non-HHT population. As a control, the up-regulation in a healthy age-paired donor was measured in each experiment to assess possible experimental fluctuations. This approach permits the up-regulation data to be reported in terms of the healthy control for each experiment and family. As can be seen in Fig. 2B, except in the youngest patients (range, 12–22 years), endoglin up-regulation was markedly lower than the mean for the control population. Moreover, in individuals 45 years and older, at least in the case of endoglin haploinsufficiency, the up-regulation decreased to below the theoretical 50% threshold represented by the control population. These data suggest that endoglin up-regulation is inversely correlated with age and, surprisingly, independent of the locus (*ENG* or *ALK1*) affected; the initial screening was done with a panel of patients being classified as HHT based on the clinical Curaçao criteria before genetic analysis was used to determine which locus was mutated (see below). Two different 45-year-old patients (patients 45a and 45b) showed distinctly different endoglin up-regulation patterns. Interestingly, the endoglin up-regulation shown by these two patients was correlated to the severity of the clinical symptoms. Thus, patient 45a, with

almost null up-regulation, matched four Curaçao criteria, presenting with nine lung AVMs larger than 3 mm and two cerebral AVMs. These results suggest that the degree of endoglin up-regulation in activated monocytes may be a molecular marker related to the severity of the HHT disease.

MUTATION AND ENDOGLIN UP-REGULATION ANALYSES IN A HHT1 FAMILY

We studied endoglin production in two affected members of a HHT family and compared the production with that of an unaffected relative. This family was diagnosed with HHT according to the Curaçao criteria; the eldest patient (81 years of age) presented with all four Curaçao criteria, whereas his affected son (40 years of age) presented with three (see Table 1 in the online Data Supplement). DNA sequencing of all endoglin exons showed that there was a nonsense mutation in c.511C>T (exon 4) leading to the change of an arginine to a stop codon (R171X; Fig. 1 in the online Data Supplement). From the clinical point of view, it is noteworthy mentioning that the 81-year-old patient suffered from an epidural abscess and that he is the first Spanish HHT patient with an identified mutation showing infectious brain complications. The pedigree of this family is shown in Fig. 3. The sequencing chromatogram is presented in Fig. 1 in the online Data Supplement.

Histograms representing the endoglin expression index values of monocytes at time 0 and after 21 h in culture are shown in Fig. 4. In both affected members, endoglin up-regulation was significantly decreased in comparison with the healthy relative. However, whereas endoglin up-regulation in the eldest patient was <20% of the control, his son had 70% of the expected endoglin up-regulation compared with an unaffected relative. Cyerman et al. (10) reported decreased endoglin up-regulation (<70%) in activated monocytes from 67 clinically diagnosed HHT family members. This study assumed a HHT1 phenotype for all 67, although the endoglin mutation was confirmed in fewer than one half (27 patients) of them.

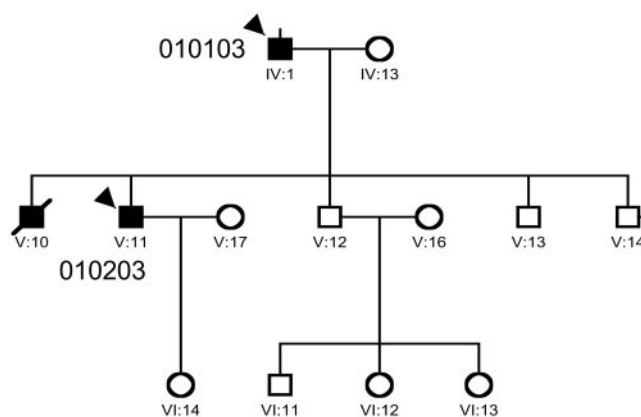


Fig. 3. Pedigree of the Spanish HHT1 family.

The familial pedigree, as far as is known, is presented. ■, affected individuals, according to the Curaçao criteria. Arrows indicate the two patients studied.

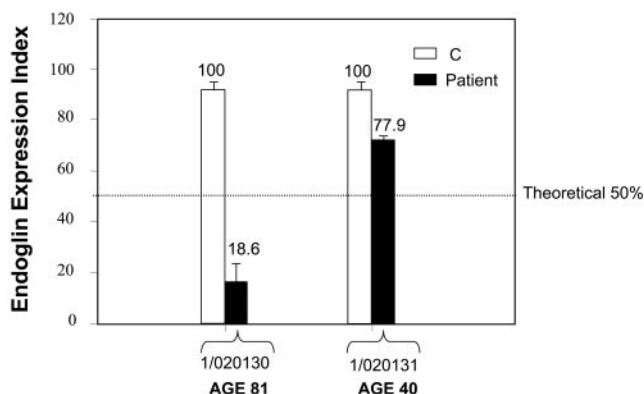


Fig. 4. Endoglin up-regulation in activated monocytes from a HHT1 family.

Endoglin expression index in monocytes after 0 and 21 h of culture are shown in comparison with a non-HHT control belonging to the same family. Up-regulation in the oldest member of the family (81 years of age; left) and his 40-year-old son (right) is compared with that in healthy controls (□). Numbers above the columns indicate the percentage of up-regulation, with respect to controls (represented arbitrarily as 100%).

Unfortunately, no relationship between this up-regulation and age was studied.

The difference in endoglin up-regulation according to the age of the patient is shown in Fig. 4; as can be seen, the older the individual, the less the extent of up-regulation. This age-related up-regulation is coincident with the severity of the symptoms such that the patient with the most depressed up-regulation (81 years of age) had more severe clinical manifestations of HHT (see Table 1 in the online Data Supplement). This result, diminished endoglin induction, may provide the molecular mechanism for the reported higher penetrance and increasing severity of HHT symptoms with increased age (4).

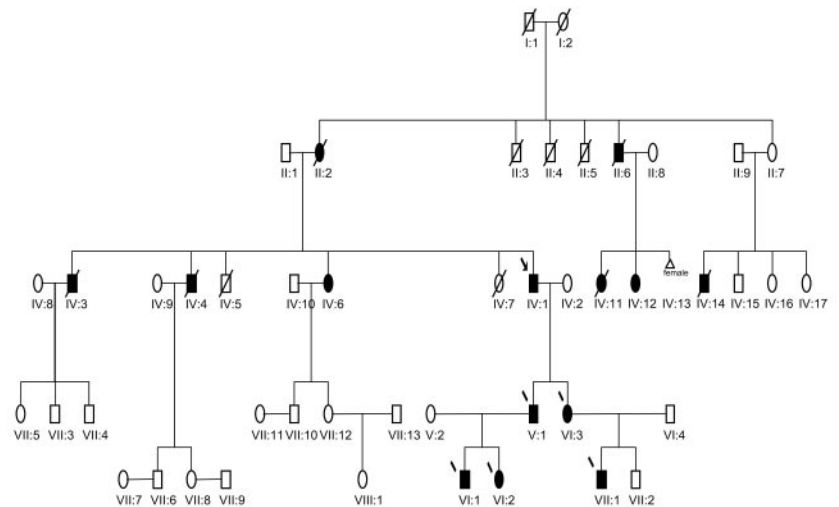
MUTATION AND ENDOGLIN UP-REGULATION ANALYSES IN A HHT2 FAMILY

Tests for endoglin up-regulation in activated monocytes were performed in blood samples from six HHT2 patients in a single affected family. The pedigree of this family is shown in Fig. 5. These patients were diagnosed as certain HHT carriers according to the Curaçao criteria. Although DNA sequencing of the *ENG* locus showed no mutations, sequencing of the *ALK1* locus revealed a missense mutation c.1120C>T (exon 8) leading to a change from arginine to tryptophan (R374W). The sequencing chromatograms for two affected members of this family and one healthy control relative are provided in Fig. 2 in the online Data Supplement. This *ALK1* mutation has already been described as pathogenic in HHT2 (23).

Table 1 in the online Data Supplement lists the clinical symptoms of each patient in this family. The *ALK1* mutation is present in six affected members but not in controls (unaffected members) of the same family. Fig. 6 shows the comparison of endoglin up-regulation with genotype. In particular, the results shown in Fig. 6B emphasize that the expression index for endoglin up-

Fig. 5. Pedigree of the Spanish HHT2 family.

Known members of this family are shown. *Filled symbols* represent affected individuals, according to the Curaçao criteria. *Arrows* indicate the six patients studied.



regulation in those HHT2 patients is age-dependent, as compared with controls. This up-regulation decreases from almost 90% in the youngest patients (12 and 18 years) to 5% in the eldest (69 years). The 47-year-old patient (Fig. 6B, indicated with asterisk) suffers from gastrointestinal bleeding (see Table 1 in the online Data Supplement). Thus, not only in HHT1, but also in HHT2 patients, the percentage of endoglin increase in activated monocytes is age-dependent and is related to the severity of clinical symptoms (Fig. 6; also see Table 1 in the online Data Supplement). This result leads us to speculate about a role of ALK1 in endoglin up-regulation during monocyte differentiation. Because endoglin shows deficient up-regulation in HHT2 patients (Fig. 6), we postulate that normal concentrations of functional ALK1 are necessary for endoglin up-regulation during the process of monocyte activation. *ALK1* has been shown to be expressed mainly in endothelial cells (25), but nothing was known about its possible expression in human monocytes. Although Panchenko et al. (26) showed that ALK1 was also present in rat macrophages, to our knowledge, nothing has been reported to date about ALK1 production in human monocytes. We were able to amplify ALK1-specific cDNA by use of total RNA from activated monocytes. The results of specific RT-PCR amplification of the ALK1 mRNA in human monocytes after 20 min or 21 h of adhesion to culture plates are shown in Fig. 3A of the online Data Supplement. A specific DNA fragment corresponding to ALK1 mRNA could be amplified in both samples. Furthermore, DNA sequencing of this fragment confirmed that it was actually cDNA of *ALK1* exon 7 (Fig. 3B in the online Data Supplement). This result demonstrates that activated monocytes produce ALK1.

Discussion

Haploinsufficiency is the molecular basis currently accepted for the clinical manifestations in HHT1 and HHT2 patients (3, 20, 22). Because endothelial cells from adult HHT patients are currently very difficult to obtain, the use

of activated monocytes from peripheral blood represents an alternative method to measure endoglin concentrations in patients clinically diagnosed as having HHT. The role of endoglin in the monocytic lineage remains to be

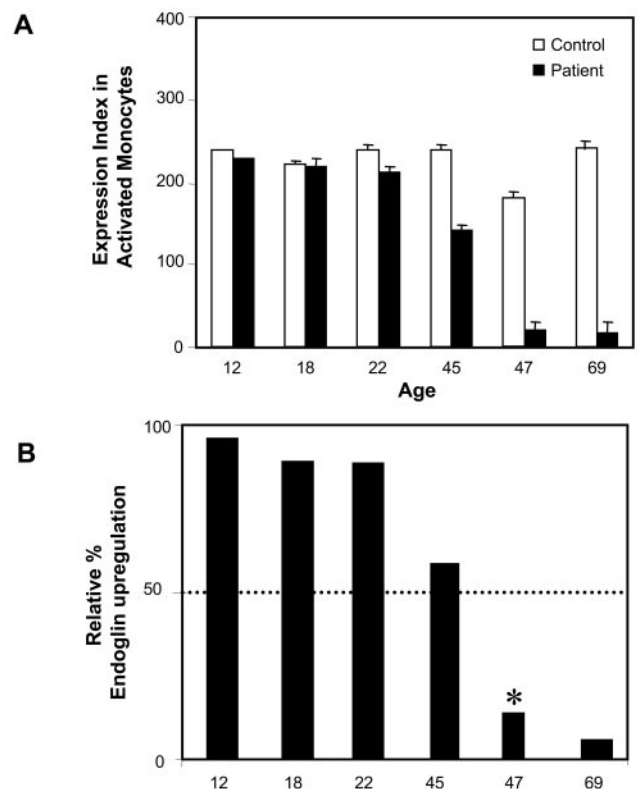


Fig. 6. Endoglin up-regulation in activated monocytes from patients in a HHT2 family.

(A), endoglin up-regulation in activated monocytes from patients in the same HHT2 family and healthy controls indicated in Fig. 2. The endoglin concentration is reported as the expression index. Flow cytometry measurements were made in duplicates. (B), percentage of expression index for endoglin in monocytes from six HHT2 patients in relation to the healthy control. These data indicate a clear age dependence of endoglin up-regulation in the HHT2 family. * indicates a patient whose percentage of endoglin up-regulation is lower than expected according to age. The dotted line indicates the theoretical 50% up-regulation in endoglin for the mutation in the heterozygous state.

elucidated, but it can be postulated that endoglin gene expression might be necessary for proper macrophage performance. Supporting this view, there are several reports on deficiencies in the immune response of HHT (27–29). Thus, HHT patients show higher occurrences of purulent meningococcal encephalitis (27). In addition, brain abscesses (28), recurrent *Staphylococcus aureus* extracerebral infections (29), and epidural abscess (this work) have been observed in these patients. Nevertheless, more systematic studies are required to assess this immunologic correlation.

Previous reports (10) analyzing endoglin concentrations in activated monocytes of HHT patients concluded that this approach is more difficult than the use of umbilical cord-derived HUVECs because the endoglin concentrations are 5- to 20-fold lower and are likely modulated by hormones and growth factors present in the serum.

The relative deficiency of endoglin in activated monocytes from HHT1 patients is expected and has been used as complementary to endoglin analysis in HUVECs (newborns) and in mutation studies to differentiate between HHT1 and HHT2 families (10). In the present work, we have determined endoglin up-regulation in activated monocytes from a large non-HHT sample of 40 donors spanning a broad range of ages to assess the diagnostic sensitivity of this method. Analysis of HHT patients demonstrated significantly lower endoglin up-regulation in monocytes compared with non-HHT samples. In the HHT1 family studied, the decrease in endoglin up-regulation in monocytes was more pronounced in the oldest patient, who also had more severe symptoms. The situation concerning *ALK1*, the other locus affected in HHT2 patients, would seem in principle different. *ALK1* is produced predominantly by endothelial cells (25, 30, 31), and here we have shown that *ALK1* is also produced by human monocytes. Unexpectedly, family 2, whose members harbor an *ALK1* mutation (HHT2), also showed deficient endoglin up-regulation, as in the case of the *ENG* mutation (HHT1). The age-dependent failure in endoglin up-regulation was also evident in this HHT2 family: we found an almost perfect inverse relationship between age and endoglin up-regulation in the six affected members studied. On the other hand, the inverse relationship between endoglin up-regulation and age was complete when the severity of symptoms was taken into account. The younger patients (<40 years; see Fig. 6) seemed to compensate for the haploinsufficiency quite well; in those individuals, endoglin up-regulation was >50% of the value in healthy controls (the theoretically expected value). In patients 40–60 years of age, up-regulation was ~50% of the value for healthy controls. Finally, in individuals older than 60, the increase of endoglin in activated monocytes was much less than 50% of the increase in healthy individuals. Endoglin up-regulation was almost totally absent in the most severely affected patients.

The down-regulation of endoglin in activated mono-

cytes derived from HHT2 patients contrasts with a previous report (22) in which endoglin concentrations remained unaffected in HHT2 patients. This apparent discrepancy is likely explained, in part, by the different experimental methods used to determine the endoglin concentration. In the present study, we have used a straightforward quantitative method, without major manipulation of samples, i.e., flow cytometric analysis of endoglin present on the surface of activated monocytes in living cells. By contrast, Abdalla et al. (22) carried out metabolic labeling, immunoprecipitation, and Western blot analyses of endoglin from cellular extracts of HUVECs and activated monocytes, which likely provided only a semiquantitative measurement. They also carried out flow cytometry experiments using HUVECs but did not examine activated monocytes. Furthermore, the age of the patient was not included in their analysis and may also have contributed to the differences observed. For example, we have shown that in HHT2 family 2 (Fig. 6), the endoglin concentrations in the younger affected members (12, 18, and 22 years) were not significantly different from the concentrations in age-matched controls and that endoglin deficiencies became evident only in the older family members (>45 years). Therefore, it would be predicted that in HHT2 HUVECs (newborns, age 0), the amount of endoglin should be close to the concentrations in HUVECs from healthy newborns, in agreement with the HUVEC data reported by Abdalla et al. (22). Unfortunately, these authors provide no information regarding the age of the six HHT2 patients from whom the monocytes were derived and analyzed (22).

The reason for the association between the *ALK1* mutation and deficient endoglin up-regulation remains to be elucidated, but it could be related to the TGF- β -dependent regulation of endoglin. Thus, because endoglin is positively regulated by TGF- β (11, 32, 33) and is a co-receptor of TGF- β (11, 12, 34), endoglin is probably subject to a positive feedback loop of regulation. HHT1 patients have, in theory, one half the endoglin concentrations of healthy individuals, and this haploinsufficiency may impair the feedback regulation, leading, in the long term, to impaired endoglin production as is observed in older patients. On the other hand, *ALK1* is a type I receptor of the TGF- β superfamily, which is also involved in TGF- β signaling. Interestingly, Ota et al. (35) reported that endoglin is up-regulated by *ALK1* in proliferating endothelial cells. Hence, decreased concentrations of functional *ALK1* receptor in HHT2 patients may also lead to improper endoglin up-regulation in monocytes. It can be speculated that during monocyte differentiation, TGF- β signaling is necessary. According to reports in this field (25, 30, 31, 36), TGF- β can signal through two type I receptors, *ALK1* and *ALK5*, which display different affinities for TGF- β 1. On stimulation with high concentrations of TGF- β , both type I receptors are activated, but the signaling through *ALK1* is dominant (31). Because endoglin shows deficient up-regulation in HHT2 patients with mutated *ALK1*, our

hypothesis is that normal concentrations of functional ALK1 are necessary for the proper induction of endoglin synthesis during monocyte differentiation. This is in agreement with the results obtained in the present study demonstrating the production of ALK1 in activated monocytes.

Under certain physiologic conditions, such as hypoxia and wound healing (37, 38), the resulting up-regulation of endoglin may be particularly important. Endoglin production may be critical in these situations, in which a significant increase in endoglin production is required. Under such conditions, the amount of endoglin in HHT patients may be insufficient for endothelial cells to meet physiologic requirements, leading to apoptosis (39) and, consequently, to impairment of the vasculature, which is characteristic of HHT (1, 40). From a pathogenic point of view, deficient up-regulation of endoglin in HHT2 patients suggests important consequences, i.e., that endoglin haploinsufficiency is the ultimate trigger mechanism underlying not only HHT1, but also HHT2. Although this is an interesting hypothesis, further experiments are required to assess whether endoglin production in vascular cells in vivo is also affected in HHT2 patients.

HHT is genetically heterogenous; the HHT1 and HHT2 genes are complex (with 15 and 9 exons, respectively), and no prevalent mutation has been found. As seen in this study, the impact of patient age on endoglin up-regulation is a crucial variable, implying that age should be considered during diagnostic assessment. The inverse relationship between age and endoglin up-regulation may explain the general increase in penetrance of the disease during a patient's life. Finally, the up-regulation of endoglin in activated monocytes appears to be correlated to the severity of the disease, which highlights the physiologic relevance of endoglin production in relation to the symptoms of the HHT.

We are indebted to Drs. Michelle Letarte and Ursula Cymerman for excellent suggestions and advice concerning the methods for HHT patient sequencing, Dr. Calvin Vary for helpful editing of the manuscript, Carmen Langa for exceptional technical assistance, Dr. Carmen Gimenez for collaboration in collecting blood samples from the control population, Dr. Laura Barrios for excellent help with the statistical analysis, Dr. Carmelo Morales for allowing us access to his data on Spanish HHT families, M^ª Victoria Gomez-España and María Jesús Borquez for their help in blood extractions, the HHT Foundation International for support, and to all of the volunteers and HHT patients for their collaboration, without which this study would not have been possible. This work was supported by grants from Ministerio de Educacion y Ciencia, Comunidad Autónoma de Madrid, and Fondo de Investigación Sanitaria (PI020200) to C. Bernabeu. A. Fernandez-Lopez is a predoctoral fellow of Fondo de Investigación Sanitaria (Grant PI020200).

References

- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 1995;333:918–24.
- Haitjema T, Westermann CJ, Overtom TT, Timmer R, Disch F, Mauser H, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu disease): new insights in pathogenesis, complications, and treatment. *Arch Intern Med* 1996;156:714–9.
- Marchuk D, Lux A. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Vol. IV, 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2001:5419–543.
- Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 1989;32:291–7.
- Shovlin CL, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* 1999;54:714–29.
- Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M, Bernabeu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34→qter. *Cytogenet Cell Genet* 1993;64:204–7.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8:345–51.
- Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, et al. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 1992;22:393–7.
- Pece-Barbara N, Cymerman U, Vera S, Marchuk DA, Letarte M. Expression analysis of four endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Hum Mol Genet* 1999;8:2171–81.
- Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara S, Bourdeau A, White R Jr, Dunn J, et al. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatric Res* 2000;47:24–35.
- Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, et al. Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J Cell Biol* 1996;133:1109–21.
- Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- β . A comparative study with β -glycan. *J Biol Chem* 1998;273:33011–9.
- Guerrero-Estero M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA, et al. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1999;78:614–23.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C, et al. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem* 2004;279:27440–9.
- Johnson D, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon S, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 1996;13:189–95.
- Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, et al. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res* 1995;5:21–8.
- Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807–20.

18. Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:235–43.
19. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 2000;91:66–7.
20. Pece N, Vera S, Cymerman U, White RJ, Wrana JL, Letarte M. Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest* 1997;100:2568–79.
21. Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman M, Seidman JG. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1997;61:68–79.
22. Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, et al. Analysis of ALK1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 2000;9:1227–37.
23. Abdalla SA, Geisthoff UW, Bonneau D, Plauchu H, McDonald J, Kennedy S, et al. Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* 2003;40:494–502.
24. Pichuantes S, Vera S, Bourdeau A, Pece N, Kumar S, Wayner EA, et al. Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens* 1997;50:265–76.
25. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J* 2002;21:1743–53.
26. Panchenko MP, Williams MC, Brody JS, Yu Q. Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol* 1996;270(4 Pt 1):L547–58.
27. Hazouard E, Ritz-Quillacq L, Herbreteau D, Legras A, Dequin PF, Ginies G. Weber-Rendu-Osler disease: pulmonary arterio-venous malformation with shunt disclosed after 5 occurrences of purulent meningococcal encephalitis. *Rev Mal Respir* 1999;16:95–7.
28. Dong SL, Reynolds SF, Steiner IP. Brain abscess in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: case report and literature review. *J Emerg Med* 2003;20:247–51.
29. Duval X, Djendli S, Le Moing V, Longuet P, Barry B, Lepout C, et al. Recurrent *Staphylococcus aureus* extracerebral infections complicating hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Rendu-Weber disease). *Am J Med* 2001;110:671–2.
30. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2626–31.
31. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signalling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:301–7.
32. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 1998;92:4677–90.
33. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A, Bernabeu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor- β stimulation. *J Biol Chem* 2001;276:34486–94.
34. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:19027–30.
35. Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, et al. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- β in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 2002;193:299–318.
36. Karlsson S, ten Dijke P. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell* 2003;12:817–28.
37. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- β pathways. *J Biol Chem* 2002;277:43799–808.
38. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, et al. Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor- β signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 2002;100:4001–10.
39. Li C, Issa R, Kumar P, Hampson IN, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, et al. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* 2003;116:2677–85.
40. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectasias of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* 1990;95:422–7.

Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions

Africa Fernandez-L^{a,1}, Francisco Sanz-Rodriguez^{b,1}, Roberto Zarrabeitia^c, Alfonso Pérez-Molino^c, Robert P. Hebbel^d, Julia Nguyen^d, Carmelo Bernabéu^{a,*}, Luisa-Maria Botella^{a,1}

^aCentro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9. Madrid 28040, Spain

^bDepartamento de Biología, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

^cDepartamento de Medicina Interna, Hospital Sierrallana, Torrelavega, Santander, Spain

^dVascular Biology Centre, MMC 480,420, Delaware St, SE Minneapolis, MN 55455, USA

Received 24 January 2005; received in revised form 26 May 2005; accepted 15 June 2005

Available online 5 July 2005

Time for primary review 14 days

Abstract

Objective: Hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT) is originated by mutations in endoglin (*HHT1*) and *ALK1* (*HHT2*) genes. The purpose of this work was to isolate and characterize circulating endothelial cells from HHT patients.

Methods: Pure primary cultures of blood outgrowth endothelial cells (BOECs) were obtained from 50 ml of peripheral blood by selection on collagen plates with endothelial medium.

Results: The amount of endoglin in *HHT1*–BOECs is half the controls, but *HHT2*–BOECs are also endoglin-deficient. Since the TGF- β /*ALK1* pathway activates the endoglin promoter activity, these results suggest the involvement of *ALK1* in endoglin gene expression. Endothelial TGF- β pathways, mediated by *ALK1* and *ALK5*, are impaired in HHT cells. HHT–BOECs show disorganized and depolymerized actin fibers, as compared to the organized stress fibers of healthy–BOECs. Functionally, HHT–BOECs have impaired tube formation, in contrast with the cord-like structures derived from normal donors.

Conclusions: Decreased endoglin expression, impaired TGF- β signalling, disorganized cytoskeleton, and failure to form cord-like structures are common characteristics of endothelial cells from HHT patients. These features may lead to fragility of small vessels and bleeding characteristic of the HHT vascular dysplasia and to a disrupted and abnormal angiogenesis, which may explain the clinical symptoms associated with this disease.

© 2005 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Endothelial receptors; Endothelial function; Signal transduction; Angiogenesis; Remodelling

This article is referred to in the Editorial by R. Hirschberg (pages 180–182) in this issue.

1. Introduction

Hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT) is an autosomal dominant, multisystemic vascular dysplasia, characterized by recurrent haemorrhages [1,2]. Mutations in endoglin (*ENG*; chromosome 9) [3] and *ALK1* (chromosome 12) [4] are responsible for *HHT1* and *HHT2*, respectively. Endoglin and *ALK1* play important roles in

* Correspondence author. Tel.: +34 91 8373112x4246; fax: +34 91 5360432.

E-mail address: bernabeu.c@cib.csic.es (C. Bernabéu).

¹ These authors contributed equally to this work.

cardiovascular development, angiogenesis and vascular remodelling [5–9].

Endoglin and *ALK1* are components of the TGF- β receptor complex primarily expressed in endothelial cells (ECs) [9–11], where they collaborate with each other in TGF- β signalling [12,13]. TGF- β is a multifunctional cytokine member of a large superfamily of proteins including activins and bone morphogenetic proteins [14]. Cellular responses triggered by TGF- β are elicited via type I and type II serine/threonine kinase receptors and downstream by the Smad family of signal transducers [15]. Type I receptors act downstream from type II and determine the signalling specificity in the receptor complex. Since ECs express two different type I receptors, *ALK1* and *ALK5*, TGF- β may activate two different pathways. *ALK1* promotes Smad1 and Smad5 phosphorylation stimulating cell proliferation and migration, whereas activation of *ALK5* promotes phosphorylation of Smad2 and Smad3, and stimulates inhibition of proliferation and extracellular matrix synthesis [16]. Endoglin interacts with T β RII, *ALK1* and *ALK5* [13,17] and cooperates with *ALK1* in the endothelial TGF- β signal transduction favouring cell proliferation [12,13]. Endoglin binds different members of the TGF- β superfamily in the presence of the signalling receptors types I and II [18,19], and counteracts the TGF- β -induced growth inhibition of ECs [20].

The diagnosis of HHT remains at the clinical level, according to the consensus criteria of Curaçao [21]. These include epistaxis (spontaneous, recurrent nose bleeds), telangiectasias (multiple at the mucosa level), visceral lesions (in lung, brain, liver, or spinal cord) and family history. HHT diagnosis is definite if 3 criteria are present. Haploinsufficiency is generally accepted as the molecular basis for HHT, since many of the mutated endoglin and *ALK1* proteins are not expressed at the cell surface [1,22,23], although it is not excluded that some missense mutations, affecting the *ALK1* kinase domain, could be expressed [24].

The endothelial expression of *ENG* and *ALK1* makes difficult the measurement of protein levels in HHT patients due to difficulties in isolating this cell type. Only in cases of pregnancies from HHT families, endothelial cells from the umbilical vein (HUVECs) of affected newborns were available for direct studies [23,25]. However, this is not the best model, as they are derived from newborns, and HHT penetrance [26], as endoglin deficiency in activated monocytes [27], are age-dependent.

Blood outgrowth endothelial cells (BOECs) [28,29] are functionally mature ECs [30] able to be incorporated in vivo into the vascular endothelium and successfully used in gene therapy [29]. In this paper we report for the first time the characterization of pure cultures of BOECs from Spanish HHT patients with clinical diagnosis and identified mutations in *ENG* (*HHT1*) or *ALK1* (*HHT2*). HHT-BOECs were characterized and used to investigate the molecular basis of the disease.

2. Materials and methods

2.1. Patient samples and DNA sequencing

Informed consent was obtained from individuals participating in the study. Controls were healthy donors, as certified by annual medical surveys. The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki (*Cardiovascular Research* 1997;35:2–4). HHT diagnoses were based on Curaçao criteria. Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using Qia-amp Mini kit (Qiagen). The fifteen exons from *endoglin* and the nine exons from *ALK1* were PCR-amplified using HotMaster Polymerase (Eppendorf), reported primers [22–24] and sequenced with a cycle sequencing protocol (Applied Biosystems, USA).

2.2. Plasmids and site directed mutagenesis

GAL4-Smad1 and GAL4-Smad3 plasmids were generously provided by Drs. Nakayama and Derynck, respectively. TGF- β -responsive constructs (CAGA)₁₂-Luc, p(BRE)₂-Luc, were kindly provided by Dr. ten Dijke. Endoglin promoter construct pCD105 (–450/+350) and vector encoding human endoglin have been described [17,31]. Vectors encoding wild type *ALK1* (WT), kinase deficient *ALK1* (K229R), and constitutively active *ALK1* kinase (Q201D) in pcDNA3-HASL plasmid were generous gifts from Dr. Miyazono (University of Tokyo, Japan). The reporter vector for the *ALK5* promoter, pTGFbeta type I receptor (–1422/–65)-Luc, was a kind gift of Dr. Kojima (RIKEN Wako, Saitama, Japan). Site directed mutagenesis of pcDNA3.1 *ALK1* (WT) was made by PCR to substitute 1120 C by T yielding *ALK1* (R374W).

2.3. Cell cultures and tube formation assay

BOECs were grown from 50 ml peripheral blood, culturing buffy coat mononuclear cells on collagen I coated wells using EGM/EBM-2 medium (Clonetics), as described [28,29]. Briefly, cells from mononuclear layers were pelleted and resuspended in 5 ml of medium. Cells were centrifuged again and the pellet washed twice in culture medium, before resuspension in 5 ml of medium and plating on collagen coated P-6 wells. Cells were incubated in 5% CO₂ at 37 °C and medium was replaced daily for the first week and thereafter medium was changed every two days. BOECs were established as pure endothelial cultures, being the only surviving cell type covering the wells after 30–45 days of growth. For characterization and functional studies, BOECs from 2nd to 4th passage were used. For tube formation assays, cells were plated in EBM/EGM-2 culture medium on matrigel (Becton Dickinson) and incubated at 37 °C, as indicated by the manufacturer. Human umbilical vein ECs (HUVECs) were cultured in EBM/EGM-2. Human primary

fibroblasts and 293 T cell line (kidney epithelium) were cultured in DMEM medium.

2.4. Western blot analysis

Cells were lysed on ice for 30 min in 1% SDS. Lysates were centrifuged at 14,000 $\times g$ for 5 min. Aliquots of cleared cell lysates were boiled in SDS sample buffer and analyzed in 7.5% SDS-PAGE under non-reducing conditions. Proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes, followed by immunodetection with anti-endoglin (P4A4), anti-*ALK1* (MAB370, R&D; sc-402 Santa Cruz), or anti-HLA class I (W6/32; Sigma). Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugates from Dako. Membranes were developed by chemiluminescence (ECL, Supersignal, Pierce).

2.5. Reverse transcription-PCR

RNA was extracted from 10⁶ cells using RNAeasy kit (Qiagen). RNA was reverse-transcribed to cDNA using random hexamers and AMV reverse transcriptase. PCRs with oligonucleotides for *ALK5*, T β RII [32] or GAPDH were performed using the HotMaster Taq polymerase (Eppendorf).

2.6. Immunofluorescent microscopy

Cells grown onto glass coverslips coated with collagen type I were fixed with 3.5% formaldehyde in PBS, washed and blocked with 2% BSA in PBS for 1 h at 4 °C. Cells were incubated for 1 h at 4 °C with anti-endoglin (P4A4), anti-PECAM1 (Clone HC1/6; Chemicon) anti-*ALK1* (MAB370, R&D), anti-von Willebrand Factor (vWF, sc-7154, Santa Cruz) and VE-cadherin (sc-9989, Santa Cruz) antibodies. For staining with vWF, cells were permeabilized with 100 μ g/ml L- α -lysophosphatidylcholine, followed by incubation with Alexa-488 green-conjugated anti-rabbit/mouse IgG antibody (Molecular Probes). For staining actin filaments, cells were fixed, stained, and permeabilized in a single step by addition of 5 units/ml Alexa-546 phalloidin (Molecular Probes), 100 μ g/ml L- α -lysophosphatidylcholine, and 3.5% formaldehyde in cold PBS. Coverslips were mounted with Mowiol 44-88 (Sigma) and observed with a spectral confocal microscope (Leica Microsystems). When required, BOECs were transfected, prior to actin staining, with expression vectors for green fluorescence protein (pEGFP), endoglin (pCMV5-*ENG*), or with a vector encoding a siRNA endoglin specific sequence (pSUPER-Endo), as described [34].

2.7. Flow cytometry

BOECs were incubated with mAb P4A4 (anti-endoglin), anti-vWF (permeabilized cells as above), anti-*ALK1* (MAB370, R&D), anti-Flk-1/KDR (MAB3572, R and D), anti-Flt-1 (MAB321, R&D), anti-fibroblast surface protein (1B10, Sigma) or an isotype-matched control for 30 min at 4

°C in cold PBS with human IgG, followed by secondary FITC-conjugated anti-IgG. Samples were analyzed on a Coulter Epics XL flow cytometer. Antigen measures are represented by the expression index, which is the result of multiplying the percentage of cells expressing antigen (positive cells) by the mean fluorescence intensity of the whole population (positive and negative).

2.8. Cell transfection and reporter assays

Transient transfections were made with Superfect (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. For GAL4 transactivation assays, GAL4-Smad1 or GAL4-Smad3 plasmids were cotransfected with the GAL4-luciferase reporter pFr5-Luc (Stratagene). Reporter assays with TGF- β responsive promoter constructs (CAGA)₁₂-luc, p(BRE)₂ and pCD105(-450/+350), and with the *ALK5* promoter construct (-1422/-65)-Luc were performed as described [13,32]. After transfection, cells were incubated with 10 ng/ml TGF- β 1 (Preprotech) for 24 h (reporters (CAGA)₁₂-luc, GAL4-Smad3, and GAL4-Smad2) or with 1 ng/ml TGF- β 1 for 3 h (reporters p(BRE)₂, GAL4-Smad1, and *ALK5*/-1422/-65-Luc). Relative luciferase units were measured in a TD20/20 luminometer (Promega, Madison, WI). Samples were cotransfected with the SV40- β -galactosidase expression vector to correct for transfection efficiency. Measures of β -galactosidase activity were performed using Galacto-light (Tropix). Transfections were made in duplicate and repeated at least in three independent experiments. Representative experiments are shown in the figures.

3. Results

3.1. Culture and characterization of ECs from peripheral blood

EC cultures were established using peripheral blood from either control donors or HHT patients. On average, it took between 30–45 days to get a confluent pure endothelial culture of about 10⁵ cells since plating the mononuclear layer. Distinguishable clusters of ECs appeared after 9–20 days, depending on the sample. Five independent control BOECs and a total of 11 HHT-BOEC cultures (from 8 different families/mutations) were obtained. ECs were characterized by morphology and staining with endothelial markers (endoglin and vWF), and actin cytoskeleton (Fig. 1). HHT-BOECs showed a significant number of binucleate cells, in contrast with the predominant mononuclear controls, supporting the reported involvement of endoglin and *ALK1* in cell proliferation [12,16]. Cultured BOECs were classified into four groups: healthy controls, *HHT1*, *HHT2/ALK1* missense mutants (*HHT2m*), and *HHT2/ALK1* nonsense mutants (*HHT2n*). As representative of these groups, we will report here data corresponding to controls and families *HHT1*(1), *HHT2*(2) and *HHT2*(10) (Figs. 2 and 3).

Healthy BOECs had the characteristic endothelial cobblestone shape at confluence (Fig. 1A). Five different cultures of BOECs were derived from *HHT1* patients. Two of them, belonged to father and son of family #1 where DNA sequencing revealed a nonsense mutation in c.511C>T leading to a stop codon (R171X) (Fig. 2). The other three belonged to families #4 and #23 (Fig. 1A), each one with a new *ENG* mutation (Fernandez-L et al., in preparation). The *HHT1* cells were bigger and rather round-shaped (Fig. 1A) compared to controls. Six *HHT2* BOECs were derived from 4 different families and mutations. Two families, *HHT2*(2) and *HHT2*(10) (Fig. 2), are representative for the two types of *HHT2*-BOECs so far analyzed. *HHT2*(2) harboured a missense mutation already described [24] in exon 8 of *ALK1*, c.1120C>T (R374W) (Fig. 2). Two independent cultures from two members of this family showed the same elongated morphology (Fig. 1B). A similar morphology was observed in BOECs derived from families #14 and #16 (1 and 3 independent cultures, respectively), harbouring new missense mutations in exon 7 and 8 of *ALK1* (Fig. 2). *HHT2*(10) family showed the deletion c.434delG in exon 4, leading to a

frameshift and premature stop codon in *ALK1* (R145fs) (Fig. 2). These *HHT2* BOECs are morphologically intermediate between control and *HHT1* ones, showing a bigger and a rounder shape than controls (Fig. 1B). To this same type belong cells of the family #13 (Fig. 1B).

BOECs were characterized as mature ECs by positive staining with specific antibodies against endoglin, PECAM-1, VE-cadherin, *ALK1*, anti-vWF, and anti-Flk-1/KDR (Figs. 1 and 3), and negative staining with the endothelial precursor marker CD133 and the monocytic marker CD14 [30; data not shown]. Quantification of vWF and Flk-1 demonstrated that BOECs showed a similar levels of expression as HUVECs (Fig. 3B). As a control, primary cultures of human fibroblasts were negative for vWF, Flk-1, Flt-1, PECAM-1 and VE-cadherin, but positive for the fibroblast marker 1B10 (Fig. 3C).

3.2. Decreased endoglin levels in *HHT* endothelial cells

Western blot analysis showed decreased amounts of endoglin in *HHT1*-BOECs (Fig. 4A). Surprisingly, endo-

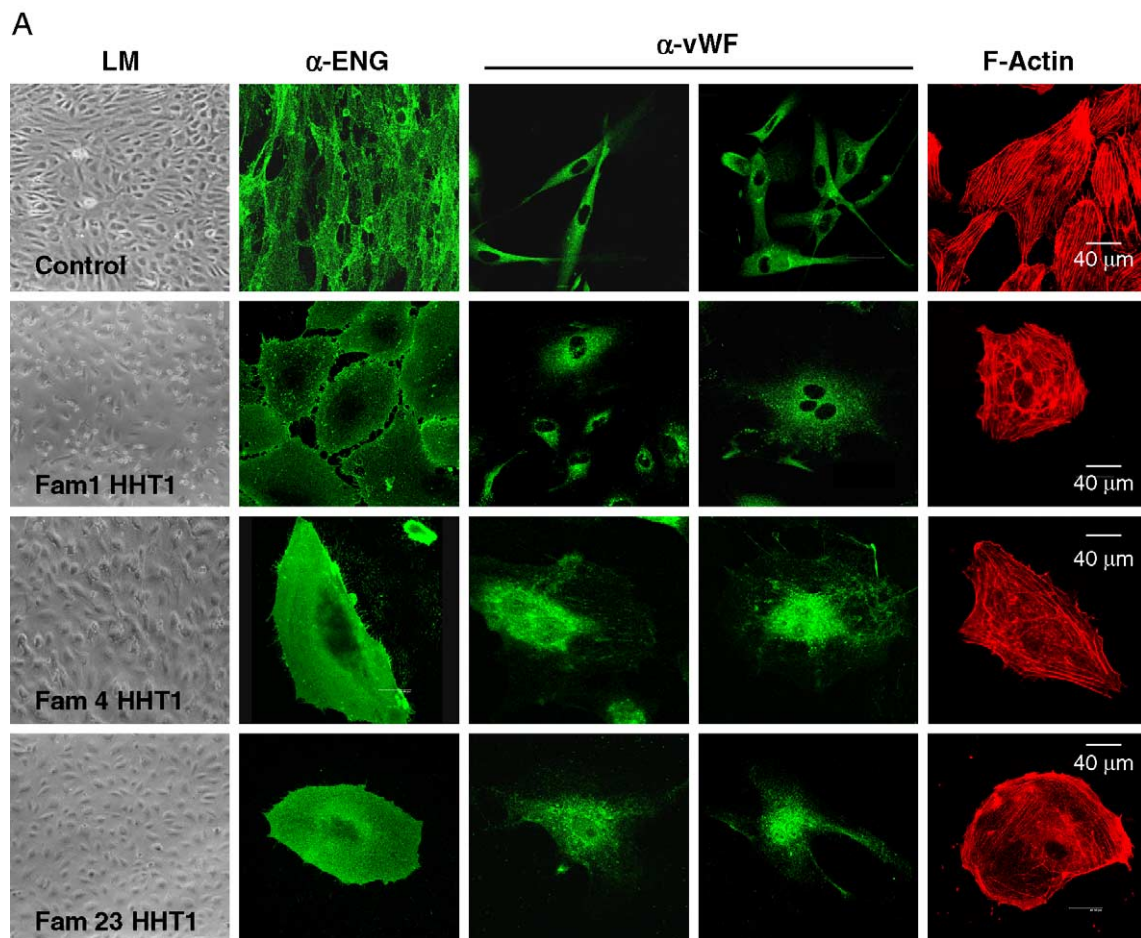


Fig. 1. Characterization of BOECs. BOECs from one representative control culture (A), 3 *HHT1* (A), and 5 *HHT2* (B) different families were analyzed by light microscopy (LM) and fluorescent staining. Contrast phase images are at 100× magnification. Staining with anti-vWF, and anti-endoglin (*ENG*) in green is shown along with the Alexa-546 phalloidin staining of F-actin (red). BOECs from family #13 were additionally stained with DAPI to visualize the nuclei.

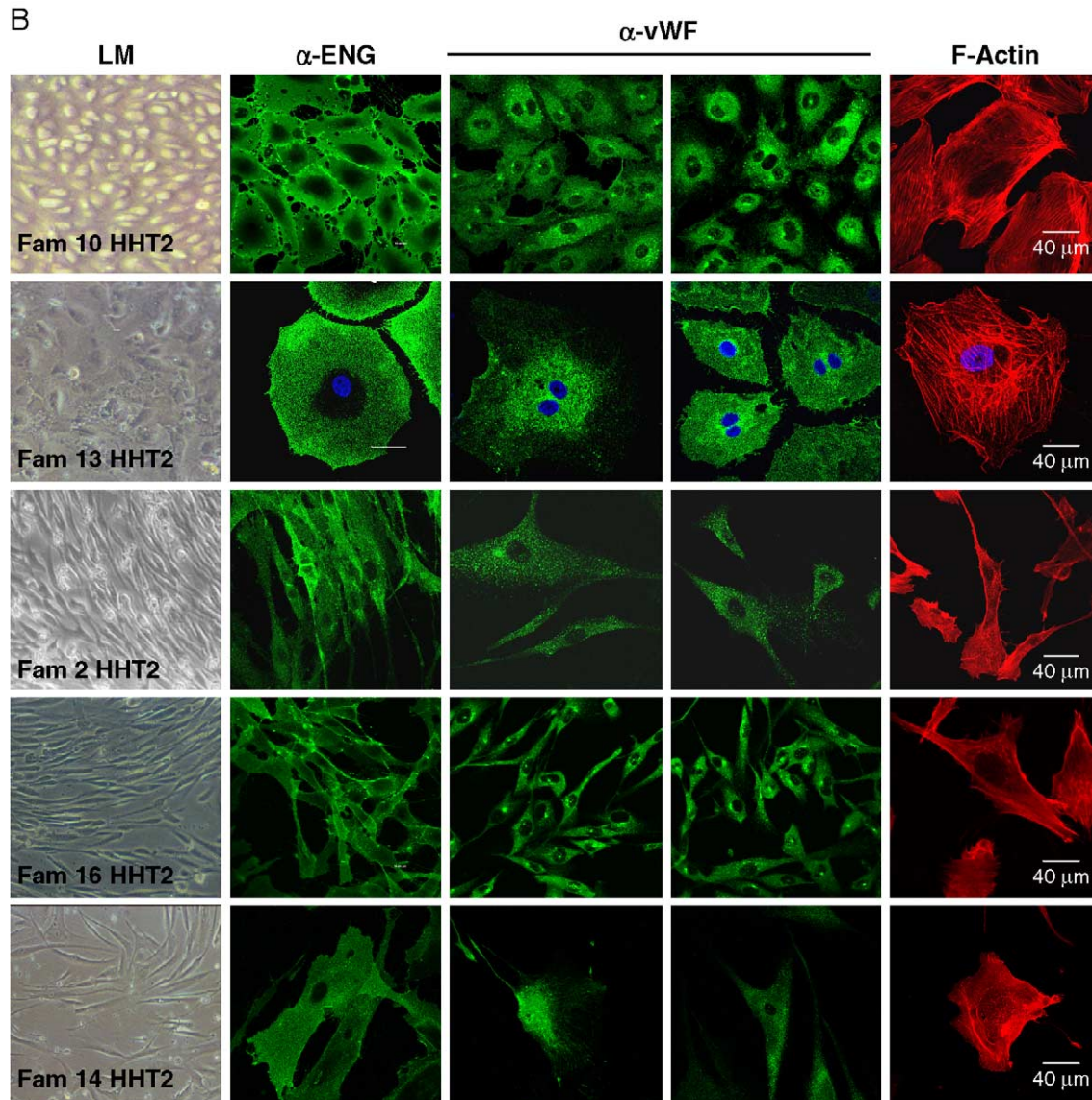


Fig. 1 (continued).

glin was also significantly reduced in *HHT2m*-BOECs. In addition, *ALK1* protein levels showed no major differences among controls, *HHT1*, and *HHT2m*, whereas a reduction in the *ALK1* levels was observed in *HHT2n* (Fig. 4A). Fig. 4B summarizes endoglin and *ALK1* expression levels from eleven different types of HHT-BOECs. *HHT2m* showed similar amount of *ALK1* (between 75% and 90%) than controls, suggesting that missense *ALK1* mutants may be expressed. *ALK1* levels were reduced in *HHT2n*, but were not affected in *HHT1* families. Endoglin levels showed a discrete reduction in *HHT2n*-BOECs, while they were decreased below 50% in *HHT1* and *HHT2m* ECs (Fig. 4B). The reduction levels of endoglin and *ALK1* among HHT-BOECs were confirmed by flow cytometry analysis, whereas expression levels of Flt-1 were unaffected (Fig. 4C). These results differ from studies in *HHT2* HUVECs [23,25] where no decreased endoglin levels were found.

This discrepancy may be explained by the HHT age-dependent penetrance [26], the age-dependent endoglin deficiency in HHT patients [27], and the different pathological situations represented by HUVECs (newborns 0 age) and BOECs (adult patients).

3.3. Involvement of *ALK1* in endoglin gene expression of *HHT2* cells

The down-regulated expression of endoglin in *HHT2* patients suggests the involvement of *ALK1* in endoglin expression. *ALK1* is a type I receptor which participates in TGF- β signalling. Since endoglin expression is increased by TGF- β [33], mutations of *ALK1* receptor in *HHT2* patients, may lead to an improper endoglin regulation in ECs. To test this hypothesis, cells were cotransfected with the reporter pCD105(-450/+350), containing the proximal part of

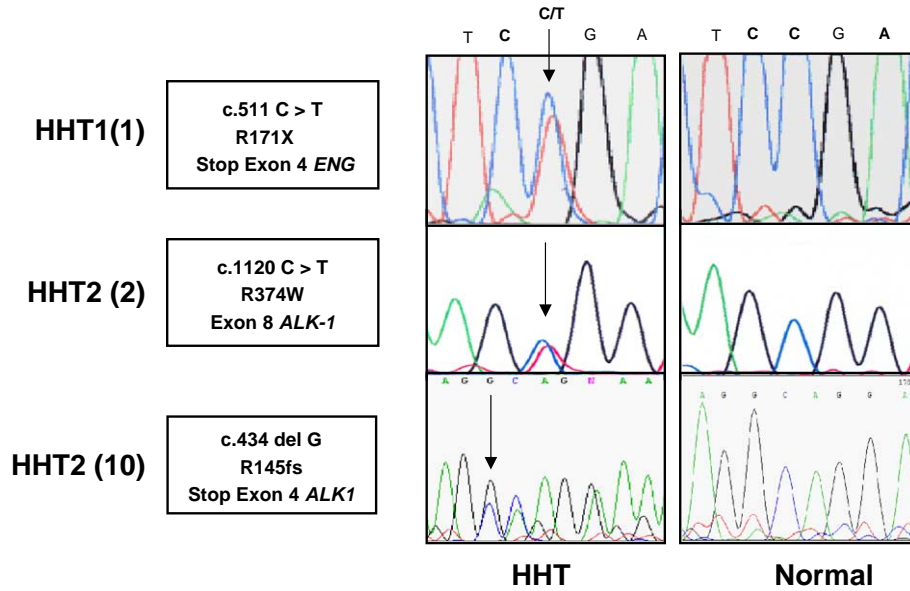


Fig. 2. Mutation analysis of HHT patients. Chromatograms show partial sequence of mutant *ENG* or *ALK1* genes compared to the corresponding normal sequence. The DNA mutation and the stop codon generated at the corresponding protein are shown on the left boxes.

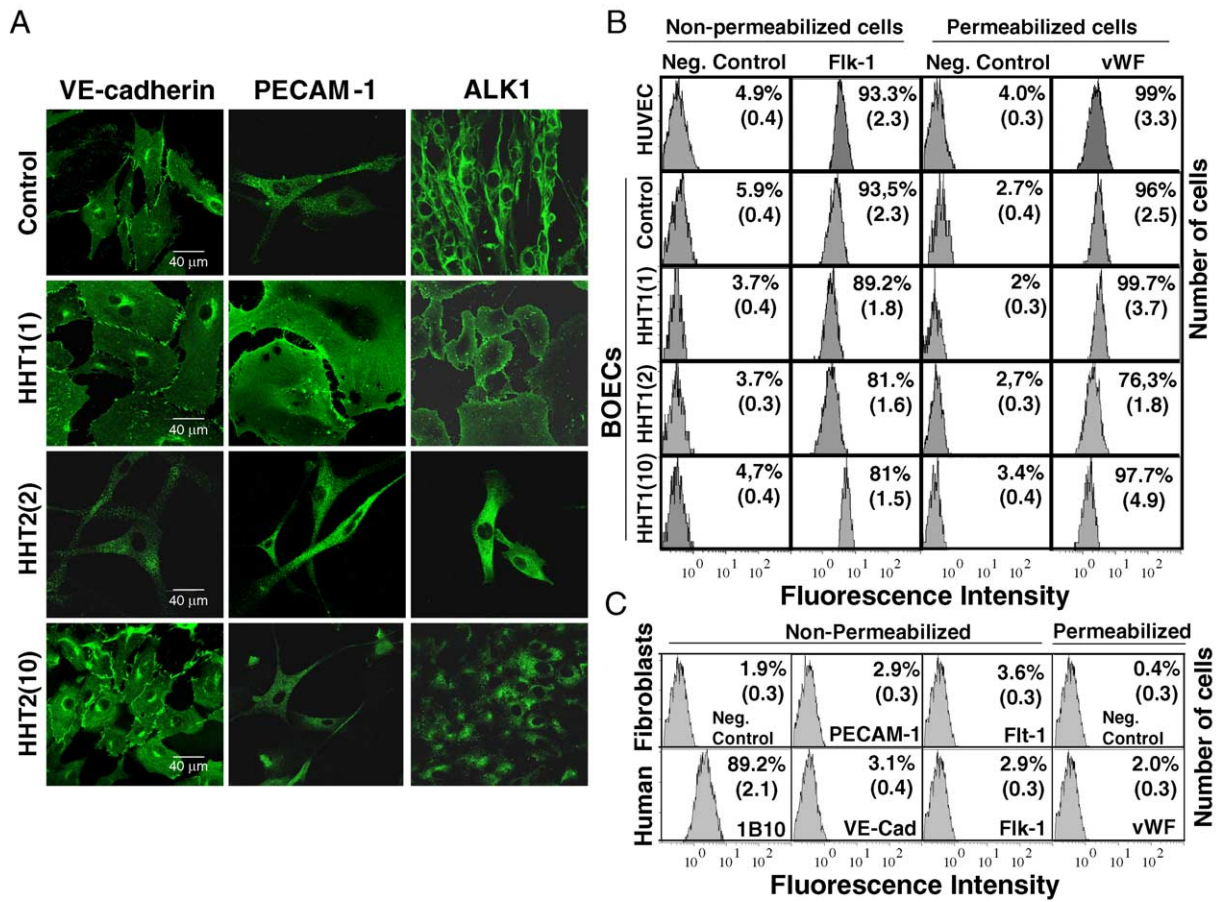


Fig. 3. Expression analysis of endothelial markers in BOECs from HHT patients. BOECs from *HHT1* (family #1) and *HHT2* (families #2 and #10) patients and from control donors were immunostained with the indicated endothelial specific antibodies and analyzed by fluorescence microscopy (A) or flow cytometry (B). HUVECs (upper row in B) and primary fibroblasts (C) were included as controls in flow cytometry analysis. The percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (in parenthesis) are indicated in the upper right corner of each flow cytometry histogram.

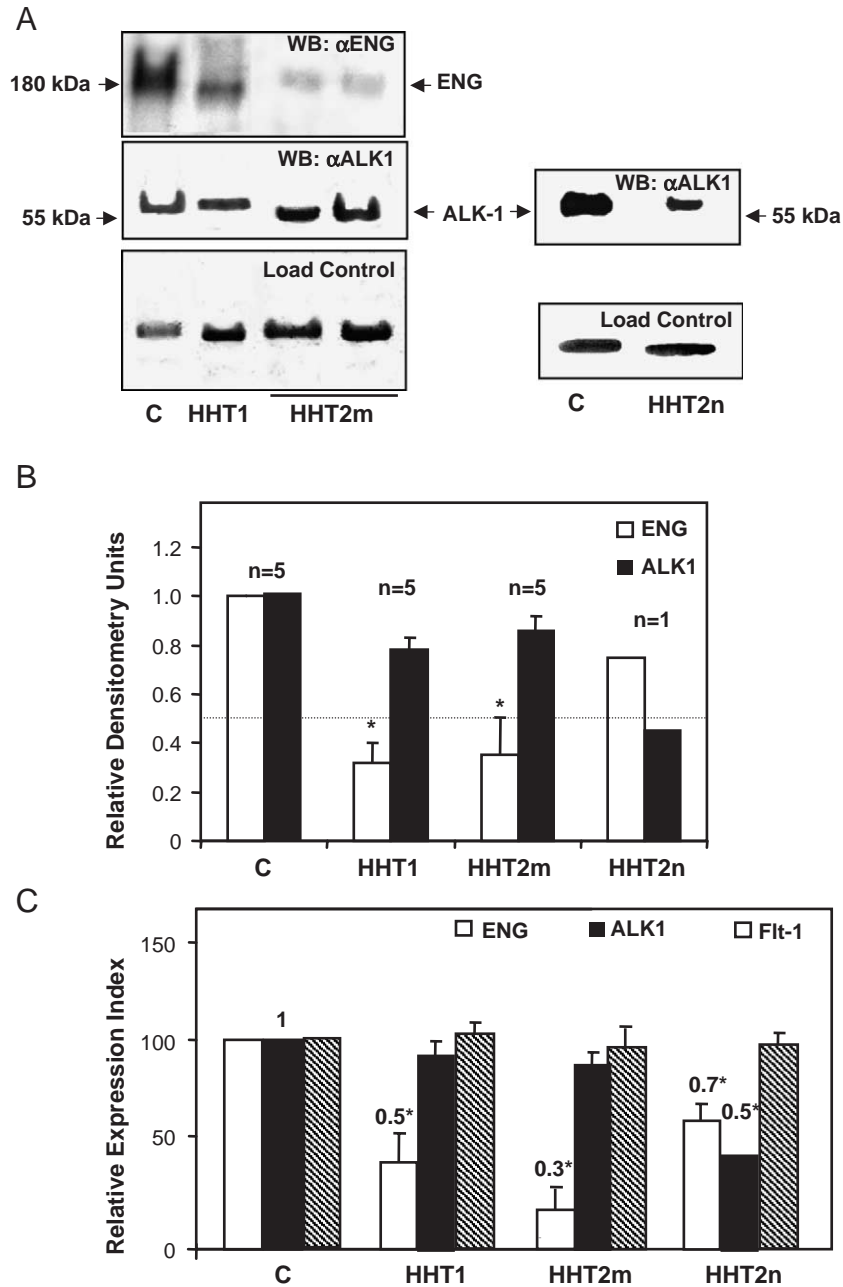


Fig. 4. Expression of endoglin and *ALK1* in ECs derived from control and HHT patients. A. Western blot analysis. Total protein extracts from control (C), or HHT-BOECs were analyzed by Western blot with either anti-endoglin or anti-*ALK1* antibodies. Loading controls included a coomassie blue stained band (lowest left panel), and the HLA class I antigen (lowest right panel). Arrows indicate the positions of endoglin, *ALK1* and molecular size markers. *HHT1* stands for *HHT1*(1), *HHT2m* for *HHT2*(2), and *HHT2n* for *HHT2* (10) families. B. Expression levels of endoglin and *ALK1* in eleven HHT-BOECs. Protein extracts from control ($n=5$), *HHT1* ($n=5$), *HHT2m* ($n=5$), or *HHT2n* ($n=1$) cultures were analyzed by Western blot as in panel A. Measures of densitometry of each endoglin or *ALK1* band relative to loading controls were performed and relative values are represented. n represents the number of independent primary cultures from different families analyzed in each case. *HHT2n* histogram represents the mean of three different extracts. ($*p<0.05$; Student's "t" test). C. Flow cytometry analysis. BOECs were subjected to flow cytometry analysis of endoglin, *ALK1* and Flt-1. Levels of antigens are represented as relative expression index (percentage of positive cells \times fluorescence intensity). Absolute expression indexes in control BOECs were 1500, 120, and 34 for endoglin, *ALK1*, and Flt-1, respectively. *HHT1* stands for *HHT1*(1), *HHT2m* for *HHT2*(2), and *HHT2n* for *HHT2* (10) families. ($*p<0.05$; Student's "t" test).

endoglin promoter, and expression vectors for different versions of *ALK1* kinase.

As shown in Fig. 5A, transfection of control BOECs with *ALK1* increased endoglin promoter activity, a constitutively active kinase form of *ALK1* (Q201D) doubled the transcrip-

tional activity of endoglin promoter, while a dominant negative version (*ALK1*, K229R) decreased by half the activity of endoglin promoter. Interestingly, an *ALK1* variant, carrying the mutation of the *HHT2*(2) family was able to inhibit 50% the activity of the endoglin promoter.

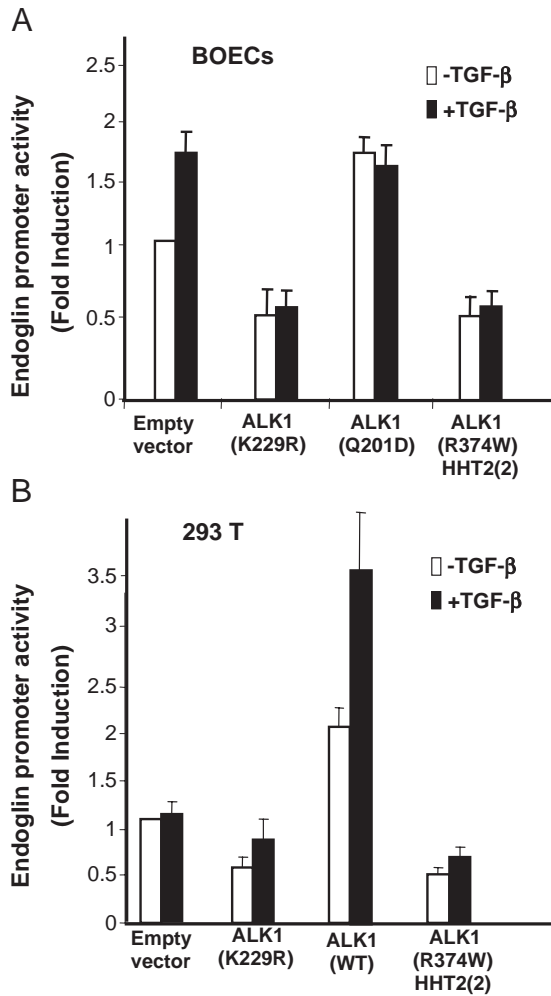


Fig. 5. *ALK1* regulates endoglin promoter activity in ECs. Control BOECs obtained from a healthy donor (A) or 293 T cells (B) were transiently transfected with the endoglin promoter construct pCD105(-450/+350), encoding luciferase as reporter, and expression vectors for *ALK1*-Q201D (constitutively active kinase form), *ALK1*-K229R (dominant negative form), *ALK1*-R374W (mutation found in *HHT2* family #2), *ALK1*-WT, or empty vector (pcDNA3.1). Cells were treated or not with 10 ng/ml TGF- β for 24 h. Promoter activity is expressed as fold induction relative to the empty vector.

TGF- β induced a significant increase of the endoglin promoter activity that was abolished upon ectopic expression of the *ALK1* mutants.

To exclude a possible interference of endogenous *ALK1*, transfections were also performed in the non-endothelial cell line 293 T, leading to similar results (Fig. 5B). In this experiment, treatment with TGF- β further increased the stimulating effect of *ALK1*-WT over the endoglin promoter. These results suggest that *ALK1* mutations in *HHT2* may interfere with endoglin gene expression.

3.4. TGF- β signalling pathways in *HHT* endothelial cells

As endoglin expression is TGF- β -inducible, the response to this factor was analyzed in *HHT*-BOECs.

Control ECs displayed a 2.5-fold induction of cell surface endoglin, while *HHT1*, *HHT2*(10) and *HHT2*(2) cells showed a marked reduction in endoglin induction levels (Fig. 6A), suggesting that *HHT*-BOECs have a

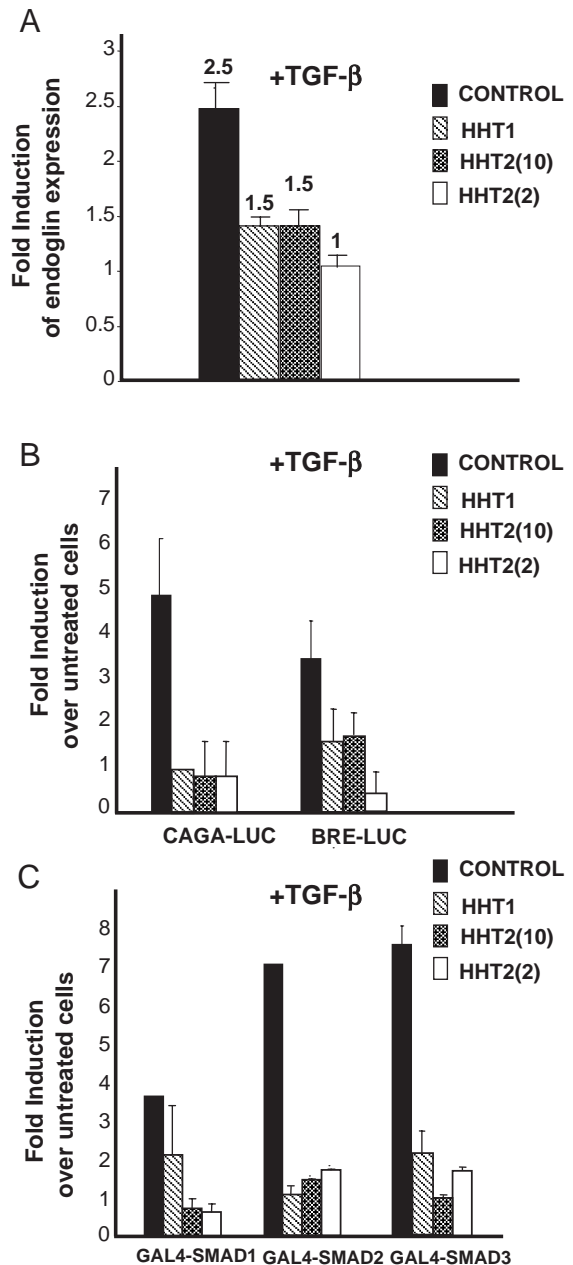


Fig. 6. TGF- β signalling pathways in control and *HHT*-BOECs. A. Control or *HHT*-BOECs were treated for 24 h with 10 ng/ml of TGF- β 1 and endoglin induction respect to untreated cells was measured by flow cytometry. Results are expressed as fold induction respect to untreated cells. B and C. Control or *HHT* BOECs were transiently transfected with (CAGA)₁₂Luc and (BRE)₂Luc reporters (B) or with GAL4-Smad1, GAL4-Smad2 or GAL4-Smad3 fusions together with the pFr5-Luc (C) and cells were incubated or not with TGF- β 1, before measuring the luciferase activity. Results are represented as fold induction of the TGF- β treated over the untreated counterparts. Transfected cells were BOECs from normal donor (Control), *HHT1*, *HHT2*(10), or *HHT2*(2) families.

deficient TGF- β signalling. ECs coexpress two different TGF- β type-I receptors, the ubiquitous *ALK5*, and *ALK1*, which is more specific for ECs [7,11,16,32]. Since endoglin cooperates with TGF- β /*ALK1* pathway, but interferes with TGF- β /*ALK5* route [12,13], these pathways were studied in HHT BOECs. The reporters (CAGA)₁₂-Luc and (BRE)₂-Luc were used to monitor *ALK5* and *ALK1* dependent signalling (Fig. 6B). In addition, since *ALK1* and *ALK5* signal via Smad1/5 and Smad2/3, respectively, GAL4 fusion constructs of Smad1, Smad2 and Smad3 were used to assess TGF- β /receptor I (*ALK1* or *ALK5*)-dependent signalling in these cells (Fig. 6C).

As shown in Fig. 6, the reporter activities of (CAGA)₁₂-Luc and (BRE)₂-Luc were stimulated from 4- to 5-fold upon TGF- β treatment in control BOECs. Similarly, GAL4-Smad1, GAL4-Smad2 and GAL4-Smad3

were transactivated in response to TGF- β , from 3-fold in GAL4-Smad1, to 7–8-fold in Gal4-Smad2 and GAL4-Smad3. Thus, both *ALK1*/TGF- β and *ALK5*/TGF- β pathways are active in ECs from normal donors. By contrast, TGF- β pathways were seriously affected in HHT-BOECs. As expected from the endoglin/*ALK1* cooperation [12,13], the TGF- β response of the *ALK1*-dependent reporters was impaired in HHT cells. Thus, the transactivation activity of GAL4-Smad1 and the (BRE)₂-Luc reporter activity in the presence of TGF- β were severely reduced (from 4- to 1.5-fold) in *HHT1*- and *HHT2*-BOECs (Fig. 6). Surprisingly, the *ALK5*-dependent TGF- β induction levels of (CAGA)₁₂-Luc reporter or GAL4-Smad3 transactivation were significantly reduced in *HHT1*- and *HHT2*-BOECs (Fig. 6). Altogether the results show that the responses of HHT-BOECs to TGF- β are severely compromised.

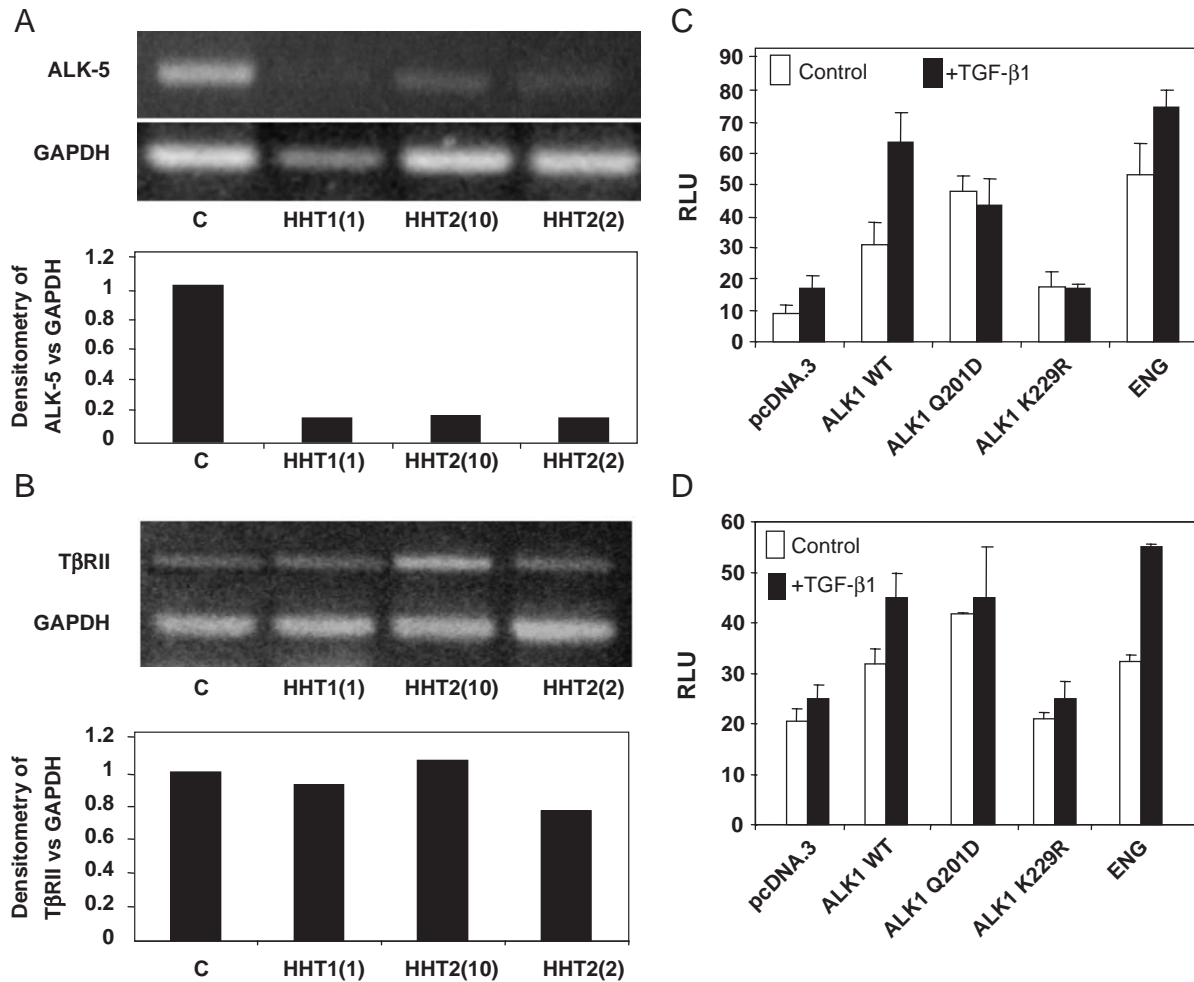


Fig. 7. *ALK5* expression is downregulated in HHT-BOECs. A and B. Semiquantitative RT-PCR of *ALK5* (A) or TβRII (B) versus GAPDH in control and HHT BOECs. RNA from control, *HHT1*(1), *HHT2*(2) and *HHT2*(10) BOECs, was retrotranscribed and the resulting cDNA was amplified using specific primers for *ALK5*, TβRII and GAPDH for 25 cycles. Bands were quantified by densitometry as shown in the histograms. Representative experiments out of three independent sets of experiments are shown. C and D. Effect of *ALK1* and endoglin on *ALK5* promoter activity. Control BOECs (C) or 293 T cells (D) were cotransfected with a luciferase reporter for *ALK5* promoter, and expression vectors for wild type *ALK1*, constitutively active *ALK1* (Q201D), dominant negative *ALK1* mutant (K229R), endoglin (*ENG*), or empty vector (pcDNA3), as indicated. After transfection, cells were treated or not with TGF- β 1, and the luciferase activity was normalized by β -galactosidase measures.

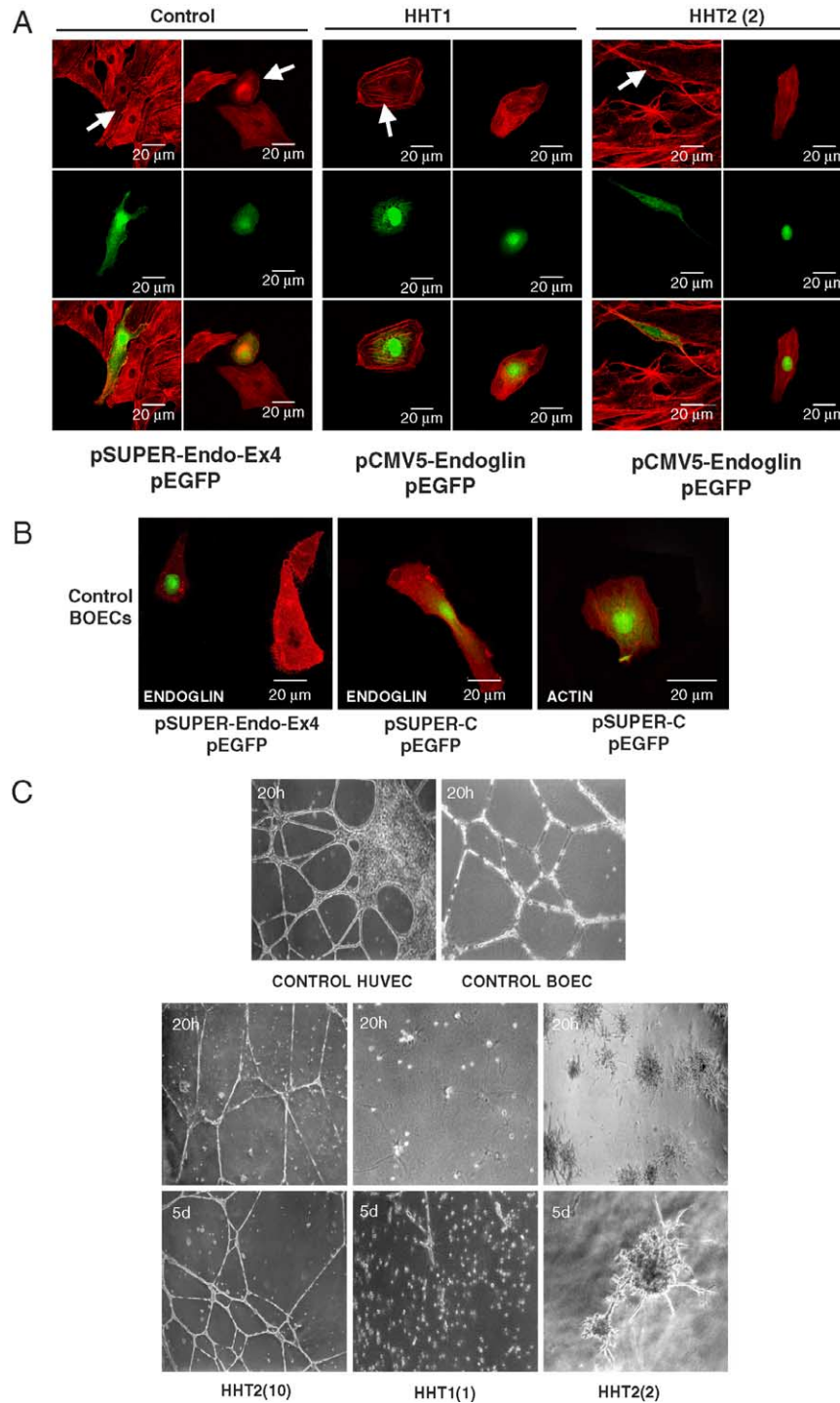


Fig. 8. Analysis of actin cytoskeleton and formation of cord-like structures in HHT-BOECs. A. Control, *HHT1* and *HHT2(2)* BOECs were transiently co-transfected with pSUPER-Endo-Ex4, pCMV5-Endoglin and pEGFP [34], as indicated. Cells were stained with phalloidin to visualize the F-actin cytoskeleton (red) and transfected cells were identified by the green fluorescence of EGFP. B. Control BOECs were transiently transfected with pSUPER-Endo-Ex4, pSUPER-C (control vector) and pEGFP [34], as indicated. Cells were stained with anti-endoglin or phalloidin (red) and transfected cells were identified by the green fluorescence of EGFP. C. Formation of cord-like structures on matrigel. BOECs and HUVECs were analyzed for their capacity to form tubes on matrigel at 37 °C for different times of incubation. Photographs corresponding to 20 h or 5 days are shown.

3.5. *ALK5* expression is reduced in HHT ECs and regulated by *ALK1* and endoglin

Since the *ALK5* pathway is disrupted in HHT–BOECs and a previous report [12] have shown a significant reduction in the levels of *ALK5* in *eng*⁺/*eng*[−] mouse embryonic ECs, we hypothesized that *ALK5* might be downregulated as a cell adaptation to compensate for decreased endoglin/*ALK1* expression. Therefore, we examined *ALK5* expression by RT-PCR. Fig. 7A shows a substantial decrease (80%) of *ALK5* expression in endoglin mutant *HHT1* compared to control BOECs. Similarly, a reduction of *ALK5* was observed when *ALK1* was mutated in families *HHT2*(2) and *HHT2*(10). These results are *ALK5* specific and are not due to a general decrease of the TGF- β signalling components since the T β RII transcript levels were not affected (Fig. 7B).

Next, we explored the mechanism leading to the downregulation of *ALK5* expression in HHT–BOECs. The possibility of a transcriptional regulatory crosstalk between *ALK1*/endoglin and *ALK5* pathways was assessed by transient cotransfections of control BOECs with an *ALK5* promoter construct and different expression vectors for *ALK1* and endoglin. As shown in Fig. 7C, cotransfection of wild type *ALK1*, constitutively active *ALK1* (Q201D), or wild type endoglin, stimulate the *ALK5* promoter activity by 3-, 5-, or 5.2-fold, respectively. By contrast, a dominant negative *ALK1* (K229R) decreased *ALK5* promoter activity almost to basal levels, even after TGF- β treatment. Moreover, TGF- β significantly enhanced the transactivation activity of cells transfected with wild type *ALK1* or endoglin. Similar results were obtained with the non-endothelial cell line 293 T (Fig. 7D).

Altogether, these results suggest that ECs keep a fine tuning between *ALK1*/endoglin and *ALK5* levels, and that mutations in either endoglin (*HHT1*), or *ALK1* (*HHT2*) downregulate *ALK5* gene expression to maintain a physiologically adaptative balance between *ALK1* and *ALK5* routes.

3.6. HHT BOECs show changes in cytoskeleton and tube formation

The abnormal shape of HHT–BOECs compared to controls (Figs. 1 and 3), suggests that actin cytoskeleton may be affected. While control ECs showed a highly organized cytoskeleton with stress fibers crossing the entire cell, *HHT1*- and *HHT2*–BOECs had a disorganized actin structure (Fig. 1). Most of the F-actin was disorganized and depolymerized at many points giving rise to very intricate patterns with different foci of actin polymerization in *HHT1*–BOECs. *HHT2*(2) BOECs also showed a poor organization of the actin cytoskeleton, with extense areas of depolymerization. *HHT2*(10) BOECs showed a combined situation: some cells displayed a completely normal F-actin cytoskeleton, while others had patches of F-actin depolymerization. Since *HHT1* and *HHT2* BOECs have in common a

significant decrease in the amount of endoglin, these results are compatible with the reported role of endoglin in the organization of actin cytoskeleton via its interaction with the zyxin family of proteins [34]. Supporting this view, endoglin suppression by siRNA in control BOECs leads to a disruption of the actin cytoskeleton (Fig. 8A). Conversely, overexpression of endoglin in *HHT1* BOECs significantly restored the actin network. However, overexpression of endoglin in *HHT2* BOECs resulted only in a slight recovery, visualized by some stress fibres, suggesting that endoglin expression was not sufficient to reverse the adaptation process induced by *ALK1* mutations. As expected, control BOECs transfected with pSUPER-Endo-Ex4 showed a decreased expression of endoglin compared to untransfected cells or to cells transfected with an irrelevant vector (pSUPER-C); also, transfection with pSUPER-C did not affect endoglin F-actin cytoskeleton (Fig. 8B).

The TGF- β /*ALK1*/endoglin pathway induces proliferation, migration and tube formation of ECs [12,16]. To gain more insight into possible functional problems of HHT–BOECs, we investigated their behaviour when building up cord-like structures in vitro. *HHT1* and *HHT2* cells were plated on matrigel, using normal donor BOECs and HUVECs as controls (Fig. 8C). While normal donor HUVECs and BOECs formed robust cord-like structures in less than 24 h, HHT–BOECs displayed deficient tube formation, but the pattern varied depending on the type of mutation. *HHT1*–BOECs did not give rise to clear cord-like structures and only after 5 days, a few short threads were visible. *HHT2*n cells, represented by family 10, formed a weak and thin tube-network after 20 h, but involving much less surface than control BOECs. In the case of *HHT2*m, represented by family 2, no tubes were formed, but instead big clusters of cells showing visible sprouting were quite abundant and, occasionally, were interconnected by short tubes after long time of incubation. Similar results were obtained with BOECs from different members of *HHT2*m families #14 and #16 (data not shown). Interestingly, when comparing *HHT2*(2) vs. *HHT2*(10), the lower capacity to form tubes was associated with a lower endoglin expression levels suggesting that endoglin is involved in tube formation. As endoglin and *ALK1* collaborate in the TGF- β /*ALK1*/endoglin pathway leading to the formation of cord-like structures, it could be hypothesized that levels of endoglin or *ALK1* activity below a critical threshold might hamper the tube formation in HHT–BOECs.

4. Discussion

This study represents the first molecular characterization of ECs from adult HHT patients, primary targets of the vascular disorder. The development of pure EC cultures from patients with clinical symptoms is a direct attempt to understand the status of HHT endothelial function. We have characterized and studied 5 different cultures from healthy

donors and 11 different cultures from HHT patients. HHT samples belonged to three types of mutations: *ENG* nonsense (5 independent cultures), *ALK1* nonsense (one culture), and *ALK1* missense (5 independent cultures). Common features to these HHT cells were positive staining for endothelial markers, endoglin deficiency, reduced *ALK5* expression and TGF- β signalling, disorganization of the F-actin cytoskeleton, and abnormal formation of cord-like structures.

As expected, *HHT1*-BOECs were endoglin haploinsufficient but, surprisingly, *HHT2m* and *HHT2n* cells were also endoglin-deficient. This is in agreement with the upregulation of endoglin observed upon *ALK1* overexpression [35]. In addition, we have previously reported endoglin deficient upregulation in activated monocytes of *HHT2* patients [27], suggesting that *ALK1* may modulate endoglin promoter activity during the monocyte-macrophage transition. The present work not only confirms this role for *ALK1*, but also demonstrates that *ALK1* mutations have an impact on the endoglin promoter activity when transfected in control BOECs (Fig. 5).

HHT-BOECs showed impaired TGF- β signalling. The decreased TGF- β /*ALK1* pathway could be predicted for *HHT1* and *HHT2* cells since endoglin cooperates with *ALK1* in ECs [12,13]. On the other hand, *HHT1*- and *HHT2*-BOECs exhibited a downregulation of TGF- β /*ALK5* signalling. In the case of *HHT1*, the *ALK5* downregulated activities agree with the decreased expression of *ALK5* observed in *eng*⁺/*eng*⁻ mouse embryonic ECs [12] and in

HHT-BOECs (Fig. 7). Since *ALK1*/endoglin is an antagonistic mediator of *ALK5* signalling [32], Lebrin et al. postulate that this adaptation occurs in order for ECs to survive to the potentiation of *ALK5*-induced growth arrest that would otherwise occur [12]. Accordingly, this adaptation could occur in *HHT2*-BOECs, where *ALK5* signalling is also downregulated (Fig. 6). The molecular basis for this adaptation is likely achieved through a transcriptional regulation of *ALK5* promoter by *ALK1* and endoglin, as shown in HHT-BOECs (Fig. 7).

The common clinical features for *HHT1* and *HHT2* may lie in the similar anomalies observed for the HHT cells compared to control BOECs, as hypothesized in Fig. 9. A shared consequence of mutations in *ALK1* or *ENG*, is endoglin deficiency, as shown in this work. This raises the interesting possibility that endoglin deficiency below a critical threshold is the ultimate pathogenic trigger in *HHT1* and *HHT2*. Supporting this view, endoglin and *ALK1* are components of the same TGF- β receptor complex, and despite being structurally and functionally different, they cooperate in the TGF- β /*ALK1* endothelial pathway. As in ECs, both *ALK1*- and *ALK5*-dependent TGF- β signalling pathways are active, an adequate balance must be attained among them. Since *ALK1* signalling promotes EC proliferation and migration, and *ALK5* inhibits proliferation, migration and induces extracellular matrix synthesis, both pathways must be tuned within ECs to coordinate the different types of responses adequate for each physiological

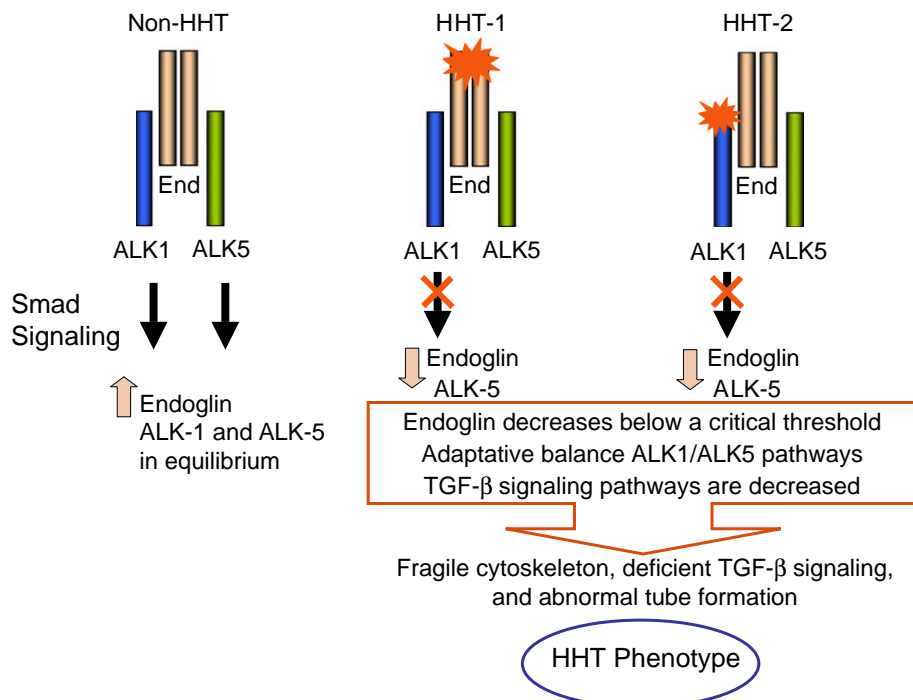


Fig. 9. Hypothetical model for HHT. Schematic model representing TGF- β receptor complex in healthy (Non-HHT) compared to the situation in *HHT1* and *HHT2* endothelial cells. Under a normal situation (Non-HHT), *ALK1* and endoglin are cooperating in the TGF- β /Smad pathway, and the endoglin levels are maintained to meet the physiological needs of the EC. However, in *HHT1* and *HHT2* cells, either endoglin or *ALK1*, fail as partners in the cooperative signalling. As a result, endoglin expression decreases below a critical threshold which leads to impaired TGF- β signalling, and abnormal cytoskeleton and tube formation in HHT ECs. These altered endothelial functions may explain the HHT phenotype.

situation. Since *ALK1* pathway is decreased in HHT–BOECs, a correcting mechanism to downregulate *ALK5* levels is probably induced to avoid the *ALK5*-dependent inhibition of cell proliferation. This regulation seems to be based on direct signals from *ALK1* and endoglin to the *ALK5* promoter. Further experiments in this line of investigation may help to elucidate the complicated network of regulatory interactions which ultimately lead to a fine tuning among the signalling components in the TGF- β pathway. In HHT, this tuning requires a physiological adaptation of ECs presumably reached during the differentiation from precursor to mature EC.

A direct consequence of *ALK1*/TGF- β deficient signalling in HHT–BOECs is the decreased capacity to form cord-like structures during angiogenesis [12], which may affect the organization of the capillary network. In addition, the abnormal actin cytoskeleton of HHT–BOECs may be also related to endoglin decreased levels. In fact, endoglin cytoplasmic domain interacts with ZRP1, present at the points of actin polymerization [34]. Accordingly, the decrease in endoglin levels would disrupt the actin polymerization sites. A disorganized cytoskeleton is prone to cell breaking with changes in shear stress and blood pressure. This might lead to vessel haemorrhages and eventual disappearance of the capillary network, as reported for the HHT vascular disorder. Finally, although our data suggest that BOECs constitute a novel and interesting cellular model to study the basis of HHT, it will be important to confirm these findings in mature vessel ECs from HHT patients.

Acknowledgements

Authors are indebted to Drs. Michelle Letarte and Ursula Cymerman for suggestions and advice on sequencing methods, Dr. Benilde Jimenez for human fibroblasts, Carmen Langa for technical assistance, Dr. Carmelo Morales for data on HHT families, M^a Victoria Gomez España and María Jesús Borquez for blood extractions, and to all the volunteers and HHT patients for their collaboration. Drs. R. Hebbel and J. Nguyen are funded by the National Institutes of Health USA (HL71269). This work was supported by grants from *Ministerio de Educación y Ciencia* (SAF2004-01390), *Fondo de Investigación Sanitaria* (PI020200) and HHT Foundation International to CB. Africa Fernandez-L is a predoctoral fellow of I3P Program from *Ministerio de Educación y Ciencia*.

References

- [1] Marchuk DA, Lux A. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, IV, 8th ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. p. 5419–31.
- [2] van den Driesche S, Mummery CL, Westermann CJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signalling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2003;58:20–31.
- [3] McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8:345–51.
- [4] Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 1996;13:189–95.
- [5] Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 1999;284:1534–7.
- [6] Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 1999;104:1343–51.
- [7] Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, et al. Activin receptor like kinase I modulates transforming growth factor beta 1 signalling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:2626–31.
- [8] Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, et al. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 2000;217:42–53.
- [9] Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003;17:984–92.
- [10] Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990;265:8361–4.
- [11] Seki T, Yun J, Oh SP. Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase I expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res* 2003;93:682–9.
- [12] Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho R, Valdimarsdottir G, Thorikay M, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /*ALK1* signal transduction. *EMBO J* 2004;23:4018–28.
- [13] Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CPH, Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and *ALK1*, two components of the endothelial transforming growth factor- β receptor complex. *J Cell Physiol* 2005;204:574–84.
- [14] Piek E, Heldin CH, ten Dijke P. Specificity, diversity and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J* 1999;13:2105–24.
- [15] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685–700.
- [16] Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J* 2002;21:1743–53.
- [17] Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 2002;277:29197–209.
- [18] Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999;274:584–94.
- [19] Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998;273:33011–9.
- [20] Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S, et al. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000;14:55–64.
- [21] Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu–Osler–Weber syndrome). *Am J Med Genet* 2000;91:66–8.

- [22] Pece N, Vera S, Cymerman U, White RJ, Wrana JL, Letarte M. Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest* 1997;100:2568–79.
- [23] Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, et al. Analysis of *ALK1* and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 2000;9:1227–37.
- [24] Abdalla SA, Geisthoff UW, Bonneau D, Plauchu H, McDonald J, Kennedy S, et al. Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* 2003;40:494–502.
- [25] Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI Jr, Dunn J, et al. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* 2000;47:24–35.
- [26] Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 1989;32:291–7.
- [27] Sanz-Rodriguez F, Fernandez-L A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, et al. Mutation analysis in Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Deficient endoglin upregulation in activated monocytes. *Clin Chem* 2004;279:32858–68.
- [28] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;105:71–7.
- [29] Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood* 2002;99:457–62.
- [30] Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005;93:228–35.
- [31] Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 2002;277:43799–808.
- [32] Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, et al. Activin receptor-like kinase (*ALK*)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/*ALK5* signaling. *Mol Cell* 2003;12:817–28.
- [33] Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A, Bernabeu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* 2001;276:34486–94.
- [34] Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 2004;279:32858–68.
- [35] Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, et al. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- β in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 2002;193:299–318.

MUTATION IN BRIEF

Mutation Study of Spanish Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia and Expression Analysis of Endoglin and ALK1

Africa Fernandez-L¹, Francisco Sanz-Rodriguez², Roberto Zarrabeitia³, Alfonso Perez-Molino³, Carmelo Morales³, Carlos M. Restrepo⁴, Jose R. Ramirez⁵, Eliecer Coto⁶, Gennaro M. Lenato⁷, Carmelo Bernabeu^{1†}, and Luisa M. Botella^{1*†}

¹Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid, Spain; ²Departamento de Biologia, Universidad Autonoma, Madrid, Spain; ³Departamento de Medicina Interna, Hospital Sierrallana, Torrelavega, Cantabria, Spain; ⁴Unidad de Genetica, Instituto de Ciencias Basicas, Facultad de Medicina, Universidad Colegio Mayor de Nuestra Senora del Rosario, Bogota, Colombia; ⁵Departamento de Anatomia Patologica, Hospital Central de la Defensa, Madrid, Spain; ⁶Genética Molecular-IRSIN, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain; ⁷Genetica Medica, DIMIMP Policlinico Bari, Bari, Italy

†The last two authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Luisa M. Botella, Centro de Investigaciones Biologicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, Madrid, 28040 Spain; E-mail: cibluisa@cib.csic.es

Grant sponsor: HHT Foundation International, USA; Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2004-01390); and Fondo de Investigación Sanitaria (PI020200) to C.B.

Communicated by Paolo Fortina

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) is an autosomal dominant and age-dependent vascular disorder originated by mutations in Endoglin (ENG) or activin receptor-like kinase-1 (ALK1, ACVRL1) genes. The first large series HHT analysis in Spanish population has identified mutations in 17 unrelated families. Ten different mutations in ALK1 and six in ENG genes were found. Six unrelated families had a mutation in ENG gene, four representing new mutations, p.Y258fs, p.V323fs, p.F279fs (c.834_837del CTTC), and p.F279fsdupC. Eleven unrelated families harboured mutations in ALK1; ten were new mutations identified as p.H328P, p.R145fs, p.G68C, p.A377T, p.H297R, p.M376T, p.C36Y, p.H328P, p.T82del and p.R47P. Overall, ALK1 mutations (HHT2) were predominant over ENG mutations (HHT1), in agreement with data reported for other Mediterranean countries (France, Italy), but at variance with Northern Europe or North America. Endoglin expression in HHT1 or HHT2 activated monocytes and blood outgrowth endothelial cells (BOECs) from older patients was well below the theoretical 50% level expected from the HHT1 haploinsufficiency model, suggesting that the pathogenic endoglin haploinsufficiency leading to the HHT phenotype is age-dependent. Interestingly, ALK1 protein levels of HHT BOECs in some missense ALK1 mutants were similar to controls. In vitro expression of these ALK1 constructs suggests that, in addition to the haploinsufficiency model, certain ALK1 mutants may inhibit the function of the wild type allele. ©2006 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Endoglin; ENG; ALK1; ACVRL1; HHT; TGF- β ; endothelial cells

Received 22 July 2005; accepted revised manuscript 9 December 2005.

INTRODUCTION

Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) (or Osler-Weber-Rendu syndrome) is an autosomal and age-dependent vascular disorder (MIM# 187300; Marchuk and Lux, 2001; Plauchu et al., 1989), diagnosed according to clinical criteria (Shovlin et al., 2000): epistaxes, telangiectases in skin and mucosa, and arteriovenous malformations (AVM) in lung, brain and liver. These features, together with the dominant inheritance, are the Curaçao criteria for the diagnosis of the disease, being positive if 3 out of the 4 criteria are present in a patient.

Two different loci have been identified as the affected genes in the disease: endoglin (ENG; 9q34) (Fernandez-Ruiz et al., 1993; McAllister et al., 1994) mutated in HHT type 1 (MIM# 131195) and the activin receptor-like kinase-1 (ALK1; 12q13) (Johnson et al., 1996) affected in HHT type 2 (MIM# 601284). Recently, a third locus for HHT has been mapped to chromosome 5, but the specific gene has not been identified (Cole et al., 2005). Endoglin and ALK1 are expressed in endothelial cells (ECs), and both take part of the TGF- β receptor/signalling complex (Cheifetz et al., 1992; Duff et al., 2003; Lebrin et al., 2004; Blanco et al., 2005). Protein expression studies in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and peripheral blood activated monocytes have proposed haploinsufficiency as the most likely model explaining HHT1, since most mutated endoglin alleles are not expressed on the surface of the cells (Pece et al., 1997; Gallione et al., 1998; Cymerman et al., 2000, and Paquet et al., 2001). Similarly, haploinsufficiency may account for HHT2, although the abundance of missense mutations affecting exons 7 and 8 suggests a malfunctioning of certain mutated ALK1 proteins (Abdalla et al., 2003b).

Endoglin interacts and cooperates with ALK1 in the TGF- β signalling pathway of ECs (Lebrin et al., 2004; Blanco et al., 2005). TGF- β signals upon binding to type II receptor on the surface of the cell. Once bound by TGF- β , type II receptor recruits and phosphorylates type I receptor. Both TGF- β receptors type I and II are serine/threonine kinases, and the activated type I receptor phosphorylates the Smad family of coactivators (Attisano and Wrana, 2002). Among type I receptors, ALK5 is expressed ubiquitously by cells, whereas ALK1 is predominantly expressed in ECs. ALK5 signals through Smad2/3 phosphorylation, whereas ALK1 phosphorylates preferentially Smad1/5 (Goumans et al., 2003). These phosphorylated Smads bind to Smad4, which is the common Smad transporter to the nucleus. There, the Smad complexes bind to promoters of TGF- β responsive genes.

To date, 156 ENG and 123 ALK1 mutants have been found (Abdalla et al., 2005). Mutations in ALK1 are spread all over the 9 translated exons (from 2 to 10), whereas ENG mutations are found in the 12 exons coding for the extracellular domain and no mutant has ever been found in either transmembrane or cytoplasmic endoglin coding exons. Here, we have identified 11 ALK1 mutations and 6 ENG mutations as origin of the HHT disease in 17 independent Spanish families, of which 14 of them had not been previously reported.

PATIENTS AND METHODS

Patient samples, DNA sequencing, and site directed mutagenesis

Informed consent was obtained from all the individuals participating in the study. Positive diagnoses of HHT were based on Curaçao established criteria. A code was established for each patient consisting in: family number, number of member within the family, and the year of sample reception. Genomic DNA was isolated from peripheral blood using Qia-amp Mini kit (Qiagen, Germany). Mutations were analyzed by direct sequencing of amplified exons for ALK1 and ENG. The fifteen ENG exons and the nine ALK1 exons were amplified by PCR using the HotMaster Polymerase (Eppendorf, Germany) and sequenced using a cycle sequencing protocol (Applied Biosystems, USA) with previously reported primers (Pece et al., 1997; Abdalla et al., 2000; 2003a). ALK1 cDNA sequence derives from GenBank reference sequence: 4557242 (NM_000020.1). ENG cDNA sequence derives from GenBank reference sequence: 33871100 (BC014271.2). Nucleotides are numbered with c.1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence. Mutagenesis of ALK1-WT in pcDNA3.1 was performed by PCR using the Pfu Turbo Taq polymerase (Stratagene) and subsequent DpnI digestion to destroy the wild type template.

Cell culture

Activated monocytes, BOECs and HUVECs were obtained as described (Sanz-Rodriguez et al., 2004; Fernandez-L et al., 2005). Independent BOECs' cultures of different donors from HHT1 (#1 and #11) and HHT2

(#2, #10, #13, #14 and #16) families were set up. Human kidney epithelial 293T cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS.

Western blot and flow cytometry analyses

Western Blot analysis was carried out as described (Fernandez-L et al., 2005) using anti-endoglin (P4A4), anti-ALK1 (R&D Systems) or anti-HA (12CA5, Roche Molecular Biochemicals) monoclonal antibodies (mAb). Endoglin up-regulation analysis of differentiated monocytes, was carried out by flow cytometry analysis from normal and HHT peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Sanz-Rodriguez et al., 2004).

Cell transfection and reporter assays

Transient transfections of 293T cells were made using Superfect (Qiagen) with pcDNA3.1 expression vectors encoding HA-tagged wild type ALK1 (ALK1-WT), a dominant negative mutant (ALK1-K229R), or the HHT mutants ALK1-R374W, ALK1-M376T, and ALK1-A377T. For GAL4-Smad1 transactivation assays, GAL4-Smad1 was cotransfected with the GAL4-luciferase reporter pFr5-Luc (Stratagene). Reporter assays were also made by cotransfection of the responsive TGF- β /ALK-1 promoter construct p(BRE)2. When required, transfected cells were treated with 1 ng/ml TGF- β 1 (Preprotech) for 3-4 h prior to luciferase measurements. Relative luciferase units (RLU) were measured in a TD20/20 luminometer (Promega, Madison, WI). Samples were cotransfected with the SV40- β galactosidase expression vector to correct for transfection efficiency. Measures of β -galactosidase activity were performed using Galacto-light (Tropix). The transfections were made in triplicates and repeated at least in three independent experiments. Representative experiments are shown in the figures.

Statistical analysis

The statistical analysis of endoglin upregulation in activated monocytes was made by non parametric tests: the Kruskal Wallis test considering all the age groups and controls, and the Mann-Whitney test in pairs between two age groups.

RESULTS

Clinical and molecular data of HHT1 and HHT2 Spanish families

Table 1 summarizes all the HHT families studied with their clinical features and identified mutations. Every DNA sample from clinically affected members of each family was screened for mutations in ENG or ALK1 genes without previous linkage analysis. Six unrelated families had nonsense, missense, or short deletion/insertion mutations in ENG gene. Also, a total of 11 unrelated families were found to harbour mutations in ALK1 gene, 10 of them different. Most of these were ALK1 point mutations, mainly substitutions leading to missense changes especially in exons 3, 7 and 8. In two cases, deletions of one or 3 nucleotides (exons 4 and 3, respectively) were found. In addition to HHT pathogenic mutations, some nucleotide substitutions without change in amino acid or leading to amino acidic conservative changes (c.572 G>A, p.G191D ENG; c.1029C>T, p.T343 ENG; c.1932C>T, p.I644 ENG; c.330 G>A, p.S110 ALK1) and hence polymorphisms, were detected. The corresponding chromatograms of all sequence tracings were reviewed but are not shown.

Endoglin upregulation analysis in activated monocytes of HHT1 and HHT2 families

Flow cytometry quantification of endoglin upregulation in activated monocytes from a large panel of HHT patients was carried out (Fig. 1A and B). Pooled data correspond to HHT1 (Fig. 1A) and HHT2 (Fig. 1B) families. In HHT1, values correspond to individual patients, whereas in HHT2 families, data are pooled in age intervals due to the high number of patients. In all HHT1 and HHT2 families, endoglin upregulation is strongly decreased compared to controls. In most cases the older the age of the patient, the lower the endoglin upregulation of activated monocytes. The decrease of endoglin upregulation in activated monocytes of HHT2 patients with age is statistically significant according to the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). There are also significant differences between different age groups, according to the Mann-Whitney test. The cutting edge for a statistical significant decrease with respect to controls (range 36-45) is 45 years, which is about the critical age reported in literature for the full penetrance of the disease. These results confirm our first report (Sanz-Rodriguez et al. 2004), extending the

conclusions to a more representative sample of HHT patients, and providing a physiological basis for the age dependence observed in HHT.

Expression of endoglin and ALK1 proteins in endothelial cells

A total of 11 HHT primary cultures of BOECs were established, belonging to 7 different families. Moreover, 5 independent cultures from control donors were obtained. Endoglin and ALK1 levels present in these BOECs were analyzed by Western blot and the results along with the densitometric measures are depicted in Fig. 1C-E. HHT1 family #11 shows endoglin expression levels below the theoretical 50% level as expected from the haploinsufficiency model (Fig. 1C). This is similar to the results obtained with HHT1 family #1 (Fernández-L et al., 2005). In HHT2 families, the expression of endoglin was also decreased (Fig. 1D). The decrease in endoglin was especially conspicuous in BOECs from family #2, where two independent donors showed levels below 1/4 of control. However, the endoglin deficiency is less obvious (approximately 70%) in HUVECs from an affected versus a non affected newborn of the same family #2 (Fig. 1D), in agreement with the well documented studies on HUVECs from HHT families (Abdalla and Letarte, 2005).

Figure 1E shows the analysis of ALK1 expression in HHT2 families. Parallel studies indicated that no significant decrease in the level of ALK1 expression was detected in HHT1 samples (data not shown). In HHT2 family #2 (p.R374W), there is no significant decrease in the ALK1 levels either from HUVECs (Fig. 1E) or from BOECs (Fernández-L et al., 2005). Similarly, ALK1 levels in families #13 (p.A377T) and #16 (p.M376T) with exon 8 missense mutations, are almost unaffected compared to controls (Fig. 1E). By contrast, family #10 (harbouring an ALK1 nonsense mutation which leads to a truncated protein) is the only HHT2 family of our series, whose ALK1 levels are below 50% (Fernández-L et al., 2005). In summary, whereas in HHT1 families, endoglin is haploinsufficient at the protein level, certain HHT2 families with missense mutations seem to have ALK1 levels similar to controls. These results suggest that these missense ALK1 alleles may be expressed in endothelial cells.

In vitro analysis of exon 8 missense ALK1 mutations

The apparent expression of ALK1 missense mutants in cells from HHT2 patients prompted us to carry out further in vitro studies with these mutants. They represent new mutations found in the Spanish population in exon 8 (families #13 and #16), and the mutation already described by Berg et al. (1997) in exon 8 (R374W). It is worth mentioning that protein region encoded by exon 8 of ALK1 is known to fall within one of the active kinase domains of ALK1 (Abdalla et al., 2003b). The possibility that such mutants could be expressed on the cell surface and had some functionality in TGF- β signalling was assessed. Thus, site directed mutagenesis was performed to generate ALK1 expression vectors encoding three representative mutant alleles of families #2, #13, and #16, respectively. Transfection of 293T cells demonstrated that ALK1 mutants are expressed, as determined by Western blot analysis with mAbs to ALK1 or to the hemagglutinin epitope tag of the constructs (Fig. 2A). Furthermore, similar to wild type ALK1, the mutant alleles were also expressed at the cell surface as demonstrated by flow cytometry analysis (Fig. 2A). It is worth noting that the values of wild type ALK1 and the different mutants were expressed in the same range of the transfected population (16-27%) and with similar intensity.

To analyze whether the expressed ALK1 mutant proteins were functional in TGF- β signalling, transient transfections were performed using BRE-luc as reporter for the TGF- β /ALK1 signalling pathway (Lebrin et al., 2004), and the one hybrid Gal4-Smad1 system to assess ALK1-dependent Smad phosphorylation (Fig. 2B and 2C). As shown in Fig. 2B, ALK1-R374W clearly inhibits the TGF- β /ALK1 pathway, behaving similarly to the kinase dead form of ALK1-K229R (Oh et al., 2000). In addition, p.A377T and p.M376T constructs also showed an inhibitory action on the basal and TGF- β 1-induced activity, but at a lower degree than ALK1-R374W. These results demonstrate the surface expression and inhibitory functional activities of certain ALK1 missense mutant alleles, suggesting that, unlike HHT1, the haploinsufficiency model is not always valid for HHT2.

DISCUSSION

The present study is the first large mutation series for clinically diagnosed Spanish HHT patients. We have studied a total of 62 patients distributed in 25 independent families. The mutation was identified in 17 of them, hence the rate of detected mutations in patients with a clinical diagnosis of HHT is 68%. Out of the 17 mutations, 6 were in ENG and 11 in ALK1. Thus, HHT due to mutation in ALK1 is much higher than in ENG. This is similar to other mediterranean populations like France (Lesca et al., 2004) and Italy (Olivieri et al., 2002; Lastella et al., 2003), but different from Canada (Abdalla et al., 2000; Cymerman et al., 2003) and Northern Europe populations

(Letteboer et al., 2005) where pathogenetic mutations in ENG are more frequent than in ALK1. We did not find a clear evidence for a more acute symptomatology in HHT1 than HHT2, and the number of pulmonary arteriovenous malformations (PAVMs) and gastrointestinal (GI) bleedings were equally shared by both types. The majority of the mutations found are new; only 2 mutations in ENG, and 1 in ALK1 had already been described. The mutations are distributed along exon 4 (2), exon 6 (1), and exon 7 (2) of ENG, as well as in exon 8 (3), exon 7 (3), exon 3 (4), and exon 4 (1) of ALK1.

Haploinsufficiency is the commonly accepted pathogenic model for HHT (Pece et al., 1997; Gallione et al., 1998; Paquet et al., 2001), although it is known that the associated vascular symptoms are uncommon in children and steadily increase with age (Plauchu et al., 1989). The data presented here and in recent reports (Sanz-Rodriguez et al., 2004; Fernandez-L et al., 2005) indicate that endoglin expression in HHT1 or HHT2 activated monocytes and BOECs of older patients is well below the theoretical 50% level expected from the HHT1 haploinsufficiency model. As this down-regulated expression of endoglin increases with age, we postulate that, at least in HHT1, the pathogenic endoglin haploinsufficiency leading to the vascular phenotype is age-dependent. This hypothesis is compatible with the fact that HUVECs from newborns (infrequently affected by the disease) with HHT1 mutations, show the expected 50% of endoglin levels compared to controls (Abdalla et al., 2000; Cymerman et al., 2000). On the other hand, the possible pathogenic significance of the decreased endoglin expression observed in HHT2 cells remains to be investigated.

Some ALK1 missense mutations appear to be expressed in HHT2 BOECs. Mutant constructs derived from families #2 (ALK1-p.R374W), #13 (ALK1-p.A377T), and #16 (ALK1-p.M376T) have been successfully expressed on the cell surface by transient transfections *in vitro*, and show an inhibitory effect on the TGF- β /ALK1 signaling pathway. These results provide evidence that in some HHT2 cases the mutated ALK1 kinase is expressed and functionally modulates the wild type ALK1/TGF- β pathway. Supporting this view are previous findings reporting that HHT2-associated missense mutations in the ALK1 extracellular domain abrogate ligand-dependent signaling (Lux et al., 1999) and that HHT2 BOECs encoding the missense ALK1 mutant p.R374W show a deficient TGF- β signaling (Fernandez-L et al., 2005). Further support has arisen while this manuscript was submitted. Thus, using zebrafish embryogenesis as a vascular model, Gu et al. (2005) have shown that some of the HHT2-related mutations generate a dominant-negative effect, while others lead to a loss of protein expression or receptor activity of ALK1. In summary, while this study supports the haploinsufficiency model for HHT1 and some HHT2 families, it suggests the possibility for a dominant-negative model in certain ALK1 missense mutations.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are indebted to Drs. Michelle Letarte and Ursula Cymerman for suggestions on methods of HHT patient sequencing, Dr. Kohei Miyazono for ALK1 constructs, Carmen Langa for technical assistance, Prof. Ginevra Guanti for hosting in her lab to A.F-L. and L.M.B., and to all the volunteers and HHT patients for their collaboration. A.F-L is a predoctoral fellow of I3P Program from Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

Patient num	Fam	Age	Clinical manifest	Gen	Exon	Mut DNA	Mut prot expected	Mut type	Ref
01.01.03	1	80	E,T,PAVM,CAVM,GB	ENG	4	c.511 C>T	p.R171X	Nonsense	Shovlin, 1997
01.02.03	1	40	E,T	ENG	4	c.511 C>T	p.R171X	Nonsense	Shovlin, 1997
02.01.03	2	69	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.02.03	2	47	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.03.03	2	45	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.04.03	2	22	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.05.03	2	18	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.06.03	2	12	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.07.03	2	78	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.08.03	2	74	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.09.04	2	48	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.10.04	2	50	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.11.04	2	42	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.14.04	2	20	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.17.04	2	49	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.18.05	2	0	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
02.19.05	2	61	E,T	ALK1	8	c.1120 C>T	p.R374W	Missense	Berg, 1997
07.01.03	7	45	E,T	ENG	7	c.967 968del GT	p.V323 fs	Deletion	New
07.02.04	7	38	E,T	ENG	7	c.967 968del GT	p.V323 fs	Deletion	New
07.03.04	7	78	E,T	ENG	7	c.967 968del GT	p.V323 fs	Deletion	New
07.04.04	7	6	E,T	ENG	7	c.967 968del GT	p.V323 fs	Deletion	New
09.01.03	9	59	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Missense	New
09.02.04	9	37	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Missense	New
09.03.05	9	41	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Missense	New
10.01.04	10	49	E,T	ALK1	4	c.434 del G	p.R145 fs	Deletion	New
10.02.04	10	56	E,T	ALK1	4	c.434 del G	p.R145 fs	Deletion	New
10.03.04	10	54	E,T	ALK1	4	c.434 del G	p.R145 fs	Deletion	New
11.01.04	11	67	E,T	ENG	4	c.392 C>T	p.P131L	Missense	Cymerman, 2003
11.02.04	11	37	E,T	ENG	4	c.392 C>T	p.P131L	Missense	Cymerman, 2003
11.03.04	11	40	E,T	ENG	4	c.392 C>T	p.P131L	Missense	Cymerman, 2003
12.01.04	12	48	E,T,GB,HAVM	ALK1	3	c.202 G>T	p.G68C	Missense	New
13.01.04	13	40	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Missense	New
13.02.04	13	65	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Missense	New
13.03.04	13	16	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Missense	New
13.04.04	13	21	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Missense	New
13.05.04	13	47	E,T	ALK1	8	c.1129 G>A	p.A377T	Missense	New
14.01.04	14	47	PAVM	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Missense	New
14.02.04	14	31	PAVM	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Missense	New
14.03.04	14	36	E,T	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Missense	New
14.04.04	14	25	E,T	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Missense	New
14.05.04	14	21	E,T	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Missense	New
14.06.04	14	56	E,T	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Missense	New
14.07.04	14	32	E,T	ALK1	7	c.890 A>G	p.H297R	Missense	New
15.01.04	15	59	E,T	ENG	6	c.772 del T	p.Y258 fs	Deletion	New
16.01.04	16	64	PAVM	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Missense	New
16.02.04	16	33	PAVM	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Missense	New
16.03.04	16	37	E,T	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Missense	New
16.04.04	16	36	E,T	ALK1	8	c.1127 T>C	p.M376T	Missense	New
17.01.04	17	50	E,T	ALK1	3	c.107 G>A	p.C36Y	Missense	New
19.01.04	19	57	E,T	ALK1	7	c.983 A>C	p.H328P	Missense	New
21.01.04	21	50	E,T	ALK1	3	c.244 246 del ACC	p.T82del	Deletion	New
23.01.04	23	50	E,T	ENG	7	c.834 837del CTTC	p.F279 fs	Deletion	New
23.02.04	23	19	CAVM	ENG	7	c.834 837del CTTC	p.F279 fs	Deletion	New
23.03.04	23	15	E,T	ENG	7	c.834 837del CTTC	p.F279 fs	Deletion	New
23.04.04	23	56	PAVM,CAVM	ENG	7	c.834 837del CTTC	p.F279 fs	Deletion	New
25.01.04	25	42	PAVM,CAVM	ENG	7	c.834dupC	p.F279 fs	Duplication	New
26.01.04	26	17	CAVM, HAVM	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Missense	New
26.02.04	26	41	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Missense	New
26.03.04	26	48	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Missense	New
26.04.04	26	8	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Missense	New
26.05.04	26	11	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Missense	New
26.06.04	26	3	E,T	ALK1	3	c.140 G>C	p.R47P	Missense	New

Table 1: Mutations and their effects on the protein are on GeneBank accession nos. AH 006911.1 (ENG) and AH005451.1 (ALK1). For cDNA, +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. Clinical data given: E-epistaxis, T-telangiectases, PAVM-pulmonary arterio-venous malformations, CAVM-cerebral arterio-venous malformations, HAVM-hepatic arterio-venous malformations, GB-gastric bleeding.

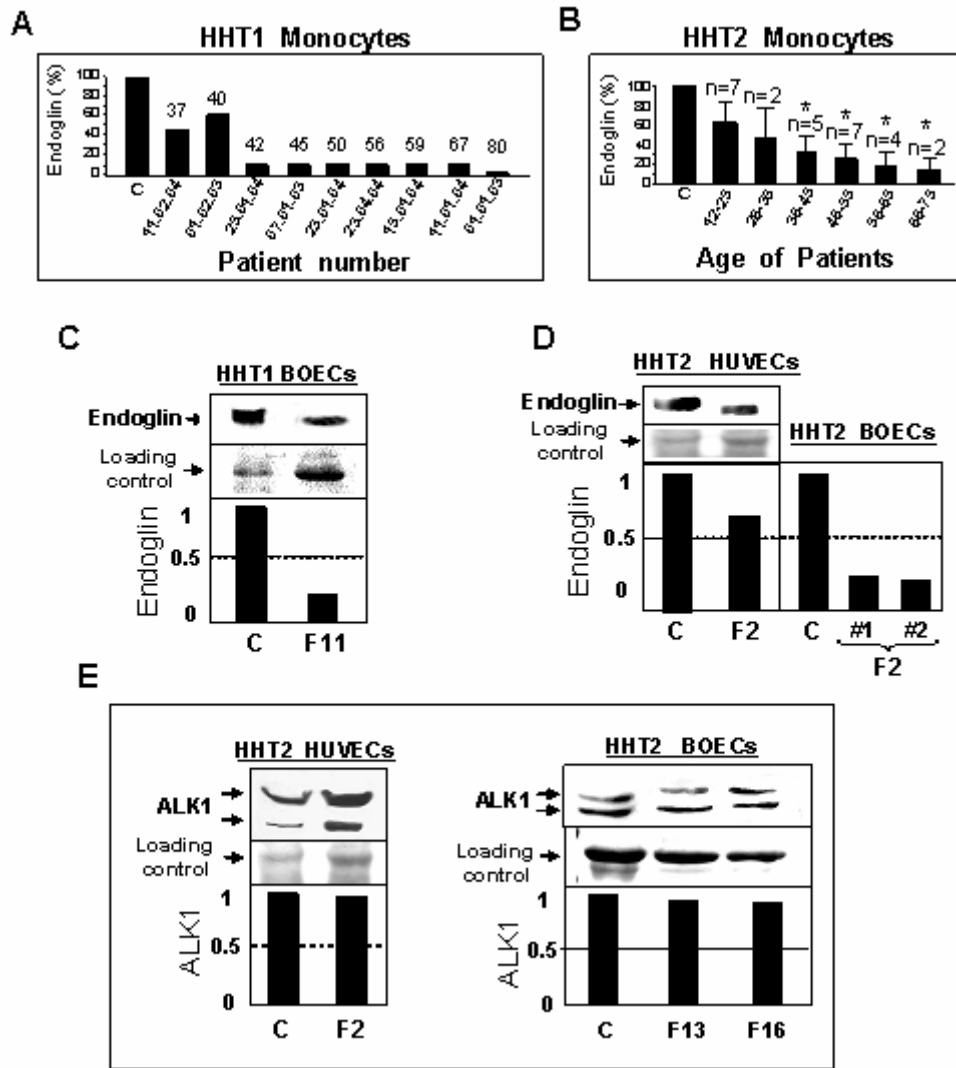


Figure 1. Endoglin expression levels in activated monocytes and BOECs from HHT1 and HHT2 patients. **A, B:** Flow cytometry analysis of endoglin upregulation in activated monocytes from HHT1 and HHT2 patients in comparison with a normal control belonging to the same family. Percentages with respect to controls, taken arbitrarily as 100%, are shown. **A:** HHT1 patients. Endoglin upregulation data from individual patients are represented. Numbers on top of the bars indicate the age of the patient whose reference number is indicated below. **B:** HHT2 patients. Endoglin upregulation data from pooled groups in age intervals are represented. Numbers on top of the bars indicate the number of samples from different donors. * $p < 0.05$ compared to control and to (12-25 group). **C-E:** Analysis of endoglin/ALK1 expression in HHT ECs by Western blot. Protein extracts of BOECs or HUVECs derived from HHT1 or HHT2 patients were subjected to Western blot analysis with anti-endoglin or anti-ALK1 mAbs. Quantification of endoglin and ALK1 bands was made by densitometry in relation to the loading control (the same band from Ponceau staining of nitrocellulose blots), and shown in the histograms. The family (F) numbers are indicated in each sample. The dotted line shows the 50% theoretical reduction according to haploinsufficiency hypothesis. For comparison purposes, panel D includes two different BOECs samples from distinct probands (#1 and #2) of HHT2 family #2, whose western blot analysis was published (Fernandez-L et al., 2005), but whose densitometric analysis is shown here.

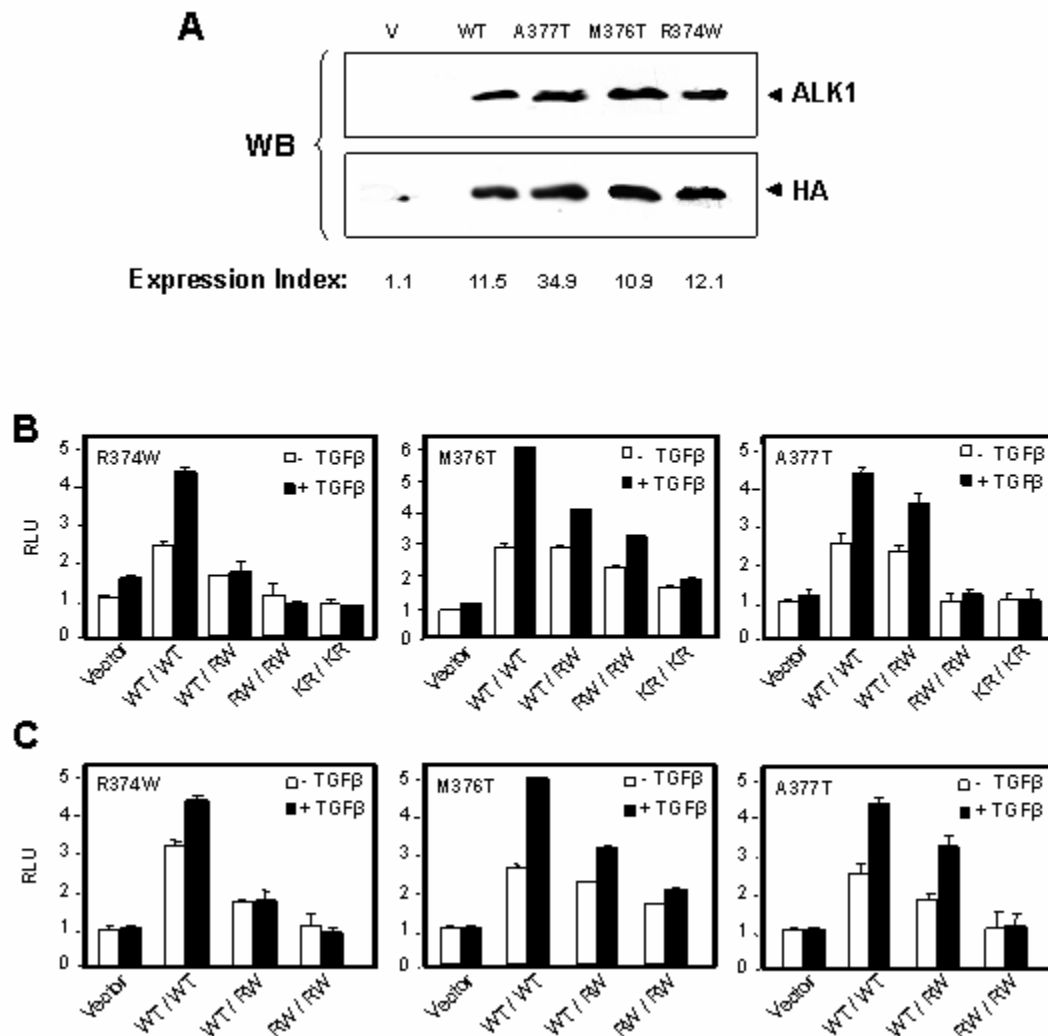


Figure 2. In vitro expression analysis of exon 8 missense ALK1 mutants. **A:** Protein expression of ALK1 mutants. Expression vectors encoding HA-tagged ALK1 mutants R374W, A377T, and M376T, were transiently in 293T cells, and expression of the corresponding ALK1 mutant proteins was analyzed by Western blot (WB) and compared to the wild type ALK1 construct (WT). Blots were developed in parallel by anti-ALK1 or anti-HA mAbs (upper part of the panel). Transfected cells were also analyzed by flow cytometry using an anti-ALK1 mAb and the corresponding expression index (percentage of positive cells x mean fluorescence intensity) of each sample is indicated in the lower part of the panel.

B, C: Functional analysis of ALK1 mutants. Transient transfections of ALK1 mutants R374W (RW), A377T (AT), and M376T (MT), alone or in combination with the ALK1 wild type (WT) were performed in 293 T cells, using BRE-luc (**B**) or Gal4-Smad1/pFr5-Luc (**C**) as reporters for the TGF- β /ALK1 signalling pathway. Different combinations of the ALK1 constructs were transfected to mimic the homozygosity or heterozygosity of the ALK1 alleles in the cell. Transfected cells were treated or not with TGF- β 1, as indicated.

REFERENCES

- Abdalla SA, Geithoff UW, Bonneau D, Plauchu H, McDonald J, Kennedy S, Faughnan ME, Letarte M. 2003a. Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* 40: 494-502.
- Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M. 2000. Analysis of ALK1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 9: 1227-1237.
- Abdalla SA, Cymerman U, Rushlow D, Chen N, Gwendolyn P, Stoeber GP, Lemire EG, Letarte M. 2005. Novel mutations and polymorphisms in genes causing hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mut* 783:1-8.
- Abdalla SA, Cymerman U, Johnson RM, Deber CM, Letarte M. 2003b. Disease-associated mutations in conserved residues of ALK-1 kinase domain. *Eur J Hum Genet* 4: 279-87.
- Abdalla SA, Letarte M. 2005. Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*. May 6 ahead of print.
- Attisano L, Wrana JL. 2002. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296: 1646-1647.
- Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. 1997. The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* 61: 60-67.
- Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol*. 204: 574-584.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 267: 19027-19030.
- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. 2005. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet*. 42: 577-582.
- Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI, Dunn J, Letarte M. 2000. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* 47: 24-35.
- Cymerman U, Vera S, Karabegovic A., Abdalla S, Letarte M. 2003. Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat*. 21: 482-92.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17: 984-992.
- Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabeu C, Botella LM. 2005. Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res*. 68: 235-248.
- Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M, Bernabeu C. 1993. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet*. 64: 204-207.
- Gallione CJ, Klaus DJ, Yeh EY, Stenzel TT, Xue Y, Anthony KB, McAllister KA, Baldwin MA, Berg JN, Lux A, Smith JD, Vary CP, Craigen WJ, Westermann CJ, Warner ML, Miller YE, Jackson CE, Gutmacher AE, Marchuk DA. 1998. Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat* 11: 286-94.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P. 2003. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* 12: 817-828.
- Gu Y, Jin P, Zhang L, Zhao X, Gao X, Ning Y, Meng A, Chen YG. 2005. Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF-β receptor ALK1 reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood*. Nov 10; [Epub ahead of print].
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Gutmacher AE, Jackson C.E., Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA. 1996. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13: 189-195.

- Lastella P, Sabbà C, Lenato GM, Resta N, Lattanzi W, Gallitelli M, Cirulli A, Guanti G. 2003. Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* 63: 536-540.
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho R, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P. 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23: 4018-4028.
- Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, Riviere S, Leheup B, Goizet C, Carette MF, Cordier JF, Pinson S, Soubrier F, Calender A, Giraud S. 2004. Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat* 23: 289-299.
- Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, Lindhout D, Hennekam FA, Westermann CJ, Ploos van Amstel JK. 2005. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet* 116: 8-16.
- Lux A, Attisano L, Marchuk DA. 1999. Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem*. 274: 9984-9992.
- Marchuk DA, Lux A. 2001. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, IV. 8th ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division. pp. 5419-5431.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, McCormick MK, Pericak-Vance MA, Heutink P, Oostra BA, Haitjema T, Westerman CJJ, Porteous ME, Guttmacher AE, Letarte M, Marchuk DA 1994. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8: 345-351.
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. 2000. Activin receptor like kinase I modulates transforming growth factor beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 97: 2626-2631.
- Olivieri C, Mira E, Delu G, Pagella F, Zambelli A, Malvezzi L, Buscarini E, Danesino C. 2002. Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 39: E39.
- Paquet ME, Pece-Barbara N, Vera S, Cymerman U, Karabegovic A, Shovlin C, Letarte M. 2001. Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Hum Mol Genet*. 10: 1347-1357.
- Pece N, Vera S, Cymerman U, White RJ, Wrana JL, Letarte M. 1997. Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest* 100: 2568-2579.
- Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. 1989. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 32: 291-297.
- Sanz-Rodriguez F, Fernandez-L, A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, Bernabeu C, Botella LM. 2004. Mutation Analysis in Spanish Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. Deficient Endoglin Upregulation in Activated Monocytes. *Clin Chem* 279: 32858-32868.
- Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. 1997. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 61: 68-79.
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD, Plauchu H. 2000. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 91: 66-68.

Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, a Vascular Dysplasia Affecting the TGF- β Signaling Pathway

Africa Fernández-L, Francisco Sanz-Rodríguez, PhD, Francisco J. Blanco,
Carmelo Bernabéu, PhD and Luisa M. Botella, PhD

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) is caused by mutations in endoglin (*ENG*; HHT1) or *ACVRL1/ALK1* (HHT2) genes and is an autosomal dominant vascular dysplasia. Clinically, HHT is characterized by epistaxis, telangiectases and arteriovenous malformations in some internal organs such as the lung, brain or liver. Endoglin and ALK1 proteins are specific endothelial receptors of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily that are essential for vascular integrity. Genetic studies in mice and humans have revealed the pivotal role of TGF- β signaling during angiogenesis. Through binding to the TGF- β type II receptor, TGF- β can activate two distinct type I receptors (ALK1 and ALK5) in endothelial cells, each one leading to opposite effects on endothelial cell proliferation and migration. The recent isolation and characterization of circulating endothelial cells from HHT patients has revealed a decreased endoglin expression, impaired ALK1- and ALK5-dependent TGF- β signaling, disorganized cytoskeleton and the failure to form cord-like structures which may lead to the fragility of small vessels with bleeding characteristic of HHT vascular dysplasia or to disrupted and abnormal angiogenesis after injuries and may explain the clinical symptoms associated with this disease.

Keywords: Actin cytoskeleton; ALK1; Angiogenesis; Endoglin; Endothelial cells; Hereditary hemorrhagic telangiectasia; TGF- β pathway; Vascular dysplasia

The Disease and its Clinical Manifestations

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler-Weber syndrome, is an autosomal dominant vascular disease characterized by localized angiodysplasia. This is manifested as epistaxis, mucocutaneous and gastrointestinal telangiectases, and arteriovenous malformations in the pulmonary, cerebral or hepatic circulation.¹ The prevalence is on average between 1 in 5,000 to 1 in 8,000, although it is higher in some regions, such as the Jura region in France, Funen island in Denmark and certain Caribbean islands in the Netherland Antilles.²⁻⁴

HHT patients are diagnosed according to the consensus clinical criteria of Curaçao, which were established by the Scientific Advisory Board of the HHT International Foundation⁵ (table 1). The presence of three out of four criteria (spontaneous recurrent epistaxis, cutaneous telangiectases, visceral involvements and familiar heredity) is considered as a positive diagnosis for HHT, while the

presence of only two criteria indicates a suspected diagnosis. The genetic diagnosis by DNA sequencing has not as yet been considered among these criteria, but may be in the future. Recently, Cohen et al⁶ have shown that a genetic screening strategy with targeted clinical protocol is more economically attractive than the conventional clinical screening and results in a reduction in the number of clinical tests for family members who do not have HHT.

The severity and age of onset in the different manifestations vary considerably, even among the members of the same family making diagnosis very difficult. It is especially critical in young patients since the penetrance of the disease is age-dependent.⁷⁻⁹ The mechanisms of the pathogenicity are not completely understood. However, the discovery of two genes involved in the disease and their functional link has thrown light on the mechanisms leading to vessel alterations.

Reprint Requests: Africa Fernández-L, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, Madrid 28040, Spain, Tel: 34918373112; Fax: 34915360432, Email: africa@cib.csic.es

Grant Support: This work was supported by grants from HHT Foundation International, Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2004-01390) and Fondo de Investigación Sanitaria (PI020200) to C.B. A.F-L is a predoctoral fellow of I3P Program from Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

Received: August 10, 2005 Revised: September 20, 2005 Accepted: October 6, 2005

Table 1. Criteria for HHT diagnosis

Clinical diagnosis	Curaçao criteria
Epistaxis	Spontaneous recurrent nosebleeds
Telangiectases	Red spots in oral mucosa and skin
Familial inheritance	Autosomal dominant
Internal organ involvement	Lung, brain, spinal cord, and liver arteriovenous malformations
Molecular	DNA sequencing for <i>ENG</i> and <i>ALK1</i> . Also in some cases where no mutations are found in the two main loci of HHT, DNA sequence of <i>MADH4</i> and <i>BMPRII</i> .

HHT, hereditary hemorrhagic telangiectasia. *ENG*, endoglin gene. *ALK1*, activin receptor-like kinase 1. *MADH4*, tumor suppressor protein, *DPC4/Smad4*. *BMPRII*, bone morphogenetic protein receptor 2.

Endoglin and *ALK1* are the Genes Mutated in HHT

The first locus to be identified as mutated in HHT patients was localized on chromosome 9q33-34^{10,11} by linkage studies. However, from the beginning, Shovlin et al¹¹ described genetic heterogeneity in the origin of HHT, as she found a HHT family not linked to this 9q locus. Independently, Fernandez-Ruiz et al¹² mapped endoglin to chromosome 9q33-34 by *in situ* hybridization. Then, McAllister et al¹³ showed that *ENG* was in fact the HHT gene and that mutations in *ENG* gave rise to type 1 HHT (HHT1, OMIM 131195). After the first evidence of genetic heterogeneity in HHT, different groups reported non-*ENG*-linked HHT families. Genetic linkage studies of those families placed the second locus on the 12q region. Subsequently, three families linked to 12q showed mutations in the *ALK1/ACVRL1* locus (activin receptor-like kinase 1, OMIM 600376) gene mapped on 12q11-q14. This locus was identified as the second cause of HHT, in this case denoted type 2 HHT (HHT2).¹⁴ Interestingly, patients with clinical characteristics of HHT without mutations in *ENG* or *ALK1* have also been reported, suggesting that other genes might be linked to HHT.^{15,16} In this sense, it was found that mutations in bone morphogenetic protein receptor II (*BMPRII*) give rise to pulmonary primary hypertension with a similar phenotype to HHT.¹⁷⁻¹⁹ Moreover, Gallione et al²⁰ recently reported that mutations in *MADH4* (Smad 4) can cause a syndrome consisting of both juvenile polyposis and HHT phenotypes. The proteins encoded by these different mutated loci in HHT patients share common functional roles, all of which belong to the transforming growth factor (TGF)- β signaling pathway (table 2). Recently a third locus, 5q31.3-5q32, has been described as responsible for the HHT3.²¹

HHT1 and HHT2 are Linked to Mutations in *ENG* and *ALK1*

Clinically, both HHT1 and HHT2 are indistinguishable,

although some studies have claimed a lower penetrance with a later onset in HHT2 versus a higher frequency of pulmonary arteriovenous malformations in HHT1.²²⁻²⁴ Also, the predominance of HHT1 or HHT2 appears to correlate with geographical location. Thus, while HHT1 is more abundant in North America, Canada^{23,25} and the northern European populations,²⁶ HHT2 is predominant in the Mediterranean countries such as Italy,^{24,27} France²⁸ and Spain.²⁹

To date, 136 *ENG* and 105 *ALK1* mutants have been found.³⁰ HHT1 associated mutations have been reported in the first 12 exons of *ENG* corresponding to the extracellular domain^{27,28,31} (figure 1). This number is continuously increasing, which indicates that any nucleotide could be mutated, except probably those encoding for the transmembrane region (exon 13) or cytoplasmic domain (exon 14). Mutations include deletions (small or those encompassing more than one exon), insertions of one or several bases, nucleotide substitutions and intron splice junction mutations leading, in most cases, to unstable RNA or proteins not expressed on cell surface.

More than 100 mutations have been described for *ALK1* with a predominance of missense mutations in the intracellular kinase domain (exons 7 and 8).³² In contrast, HHT1/*ENG* most frequently contains missense mutations with deletions and insertions being less common and long DNA reorganizations being very rare. Mutations in HHT1/*ENG* are especially concentrated in exons 3, 4, 7, 8 and 9. However, all exons may be affected (figure 1).

The TGF- β Signaling Pathway

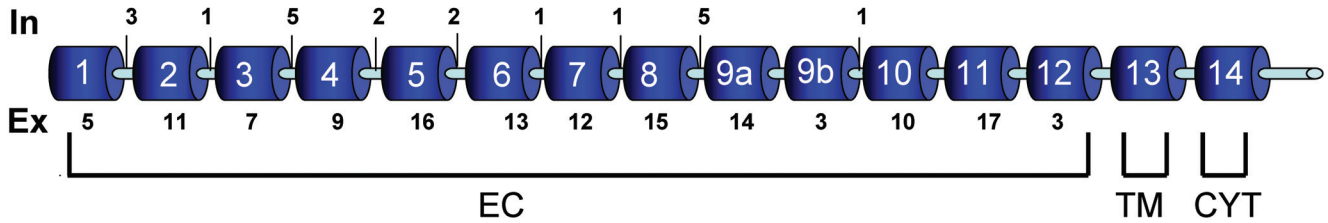
TGF- β signals through a heteromeric complex of type I (RI) and type II (RII) transmembrane serine/threonine kinase receptors (figure 2). Although the core of the TGF- β receptor complex is formed by the association of RI and RII, it may also contain auxiliary receptors such as endoglin and betaglycan.³³ First, TGF- β binds RII with a high affinity. This TGF- β /RII complex then recruits RI. Once the heteromeric complex TGF- β /RII/RI is formed,³⁴ a domain of RI is phosphorylated by RII.³⁵ This phosphorylation of serine/threonine residues leads to RI

Table 2. Loci and genes involved in HHT

Gene	Chromosomal locus	Type of disease
<i>ENG</i>	9q33-q34.1	HHT1
<i>ACVRL1/ALK1</i>	12q11-q14	HHT2
<i>MADH4</i>	18q21.1	JPHT
<i>BMPRII</i>	2q33	PPH
?	5q31.3-5q32	HHT3

HHT, hereditary hemorrhagic telangiectasia; JPHT, juvenile polyposis hemorrhagic telangiectasia; PPH, pulmonary primary hypertension

Endoglin



ALK1

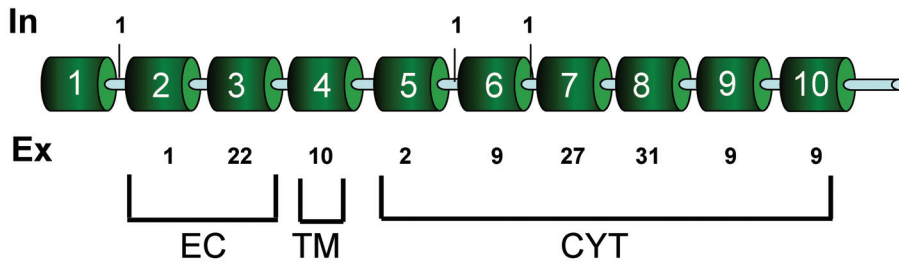


Figure 1. Mutations found in the different introns (In) and exons (Ex) of *ENG* and *ALK1*. Exons are represented by cylinders (numbered 1-14 in *ENG* and 1-10 in *ALK1*) with bars between the exons representing introns. Figures below the exons and above the introns represent the number of mutations found in each exon or intron, respectively. Protein domains of Endoglin and ALK1 are indicated under the exons by EC (extracellular domain), TM (transmembrane domain) and CYT (cytoplasmic domain). Adapted from Abdallà and Letarte.³⁰

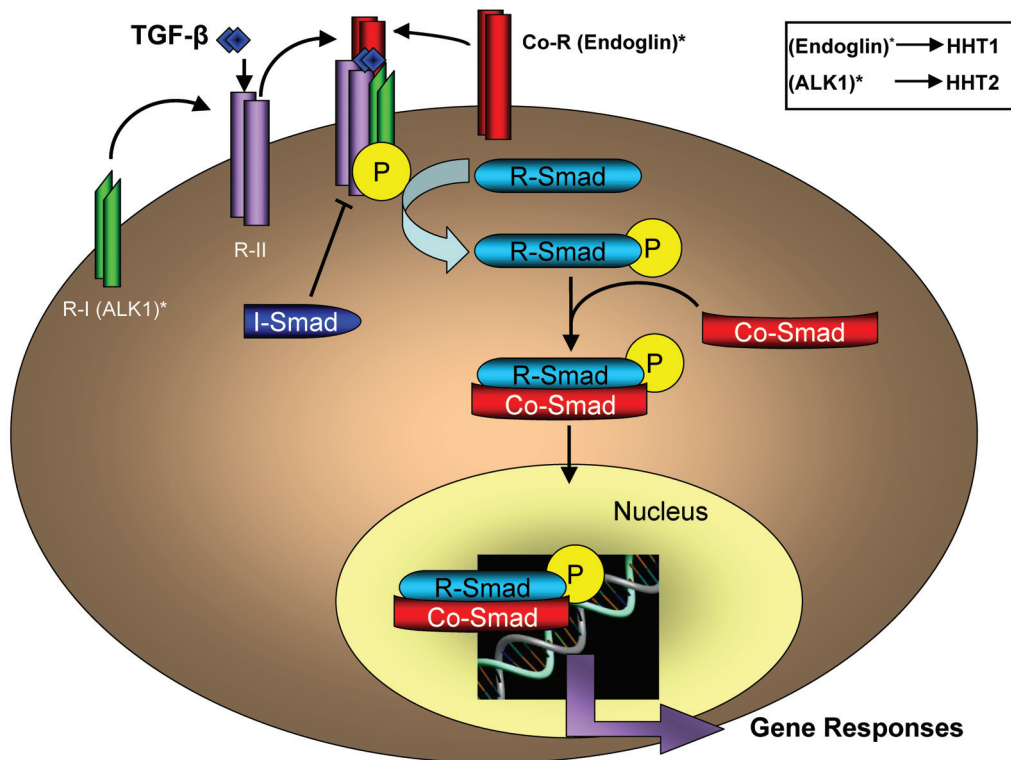


Figure 2. TGF- β signaling cascade. TGF- β binds to RII and the resulting complex recruits and phosphorylates RI. The receptor complex also contains the auxiliary receptor endoglin. Activated RI transmits the signal to the nucleus through the Smad family of co-activators. First, RI phosphorylates R-Smads which then associate with Co-Smads, namely Smad4. The R-Smad/Co-Smad complex translocates to the nucleus to regulate TGF- β responsive genes. R-Smad, receptor dependent Smad; I-Smad, inhibitory Smad; Co-Smad, collaborator Smad; ALK1, R-I mutated in HHT2; Endoglin, auxiliary TGF- β receptor mutated in HHT1.

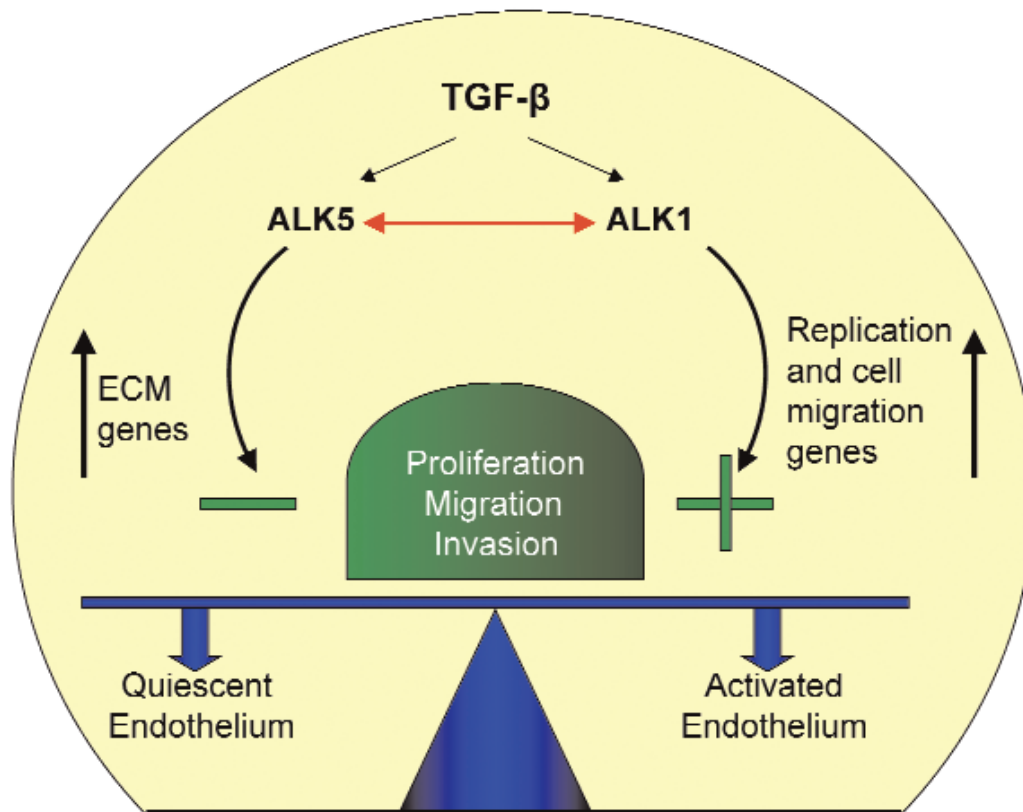


Figure 3. Balanced signaling through the TGF- β receptors type I, ALK1 and ALK5, in endothelial cells. When the TGF- β response is transmitted via ALK1, the proliferation and migration genes are stimulated giving rise to the activated phase of angiogenesis (activated endothelium). However, when the ALK5 pathway is predominant, the genes coding for extracellular matrix (ECM) components are upregulated and the proliferation and cell migration genes are repressed, leading to a quiescent endothelium. In addition, ALK1 and ALK5 functionally regulate each other. Adapted from Lebrin et al.⁴⁴

activation, in turn propagating the signal through a cascade of intracellular effectors which belong to the Smad protein family. There are three different types of Smads: receptor regulated (R-Smads), common mediator (Co-Smads) and inhibitory (I-Smads) Smads.^{35,36} R-Smads like Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 and Smad8 are phosphorylated and activated by RI and these activated R-Smads bind subsequently to the Co-Smad, Smad4. The R-Smad/Co-Smad complexes translocate to the nucleus where they contribute to the transcriptional activation of target genes. The I-Smads (Smad6 and Smad7) prevent R-Smad phosphorylation by competing with R-Smads for receptor interaction³⁷ through recruitment of ubiquitin ligases to the activated receptor leading to its proteosomal degradation³⁸ or by recruiting phosphatases that inactivate RI.³⁹

All the genes implicated in HHT code for proteins belonging to the TGF- β signaling pathway. Therefore, understanding this pathway is crucial for establishing the relationship between genes affected by mutation in HHT patients and the disease. BMPRII (bone morphogenetic protein receptor-2) and ALK1 belong to the RII and RI families, respectively. Smad4 belongs to the Smad effectors family and endoglin (or CD105) is an endothelial accessory receptor of TGF- β . Endoglin is a 180 kDa homodimeric transmembrane glycosylated protein that binds several members of the TGF- β

superfamily⁴⁰⁻⁴² and interacts with both RI and RII,⁴³ and in particular with the two different types of RI, ALK1 and ALK5,^{44,45} expressed by endothelial cells.⁴⁶

Balance Between TGF- β /ALK1 and TGF- β /ALK5 in Endothelial Cells

HHT is a vascular disease in which endothelial cells appear to be the primary cell target affected. The genes, *Smad4* and *BMPRII*, mutated in HHT are expressed in a broad range of cell types (including endothelial cells), whereas *ENG* and *ALK1* are mainly restricted to the endothelium. The endothelial TGF- β system is characterized by the coexistence of two types of RI, the ubiquitously expressed ALK5 and the endothelium specific ALK1. These two RIs signal through different R-Smads; while ALK1 signals by Smad1/Smad5, ALK5 prefers Smad2/Smad3.⁴⁷ The existence of the two types of RI pathways activated by the same ligand, TGF- β , poses the problem of the mechanism of tuning between both cascades. This problem has been addressed by several groups⁴⁴⁻⁴⁸ and has been recently reviewed.⁴⁹⁻⁵¹ Goumans et al^{46,47} observed that ALK5 deficient endothelial cells were defective in both TGF- β /ALK5 and TGF- β /ALK1 responses, demonstrating that the kinase activity of ALK5 was essential for an appropriate ALK1 activation. The coexistence of ALK1 and ALK5 is then necessary for a proper TGF- β signaling in

endothelial cells. However, ALK1 and ALK5 may induce opposite cellular responses: TGF- β /ALK1 induces endothelial cell migration and proliferation, while TGF- β /ALK5 inhibits these effects and promotes extracellular matrix deposition.⁵² These two counteracting effects correspond to the two distinct phases of the angiogenic process: quiescence (absence of proliferation, extracellular matrix deposition, recruitment of smooth muscle cells and stabilization of vessels) versus activation (proliferation and migration of endothelial cells to form new vessels) (figure 3). This antagonism is exerted at the molecular level via R-Smads, since ectopic overexpression of Smad5 potentiates the ALK1 inhibitory effect on ALK5 induced responses, while overexpression of Smad3 attenuates this effect. The opposite actions between ALK1 and ALK5 in endothelial cells are the basis for an intricate mechanism of equilibrium controlled by a fine TGF- β tuning. Thus, low doses of this cytokine stimulate endothelial cell proliferation and migration via the ALK1/Smad1/Smad5 route, while high doses of TGF- β inhibit these responses and favor the ALK5/Smad2/Smad3 pathway.⁴⁶⁻⁴⁸

The Haploinsufficiency Model in HHT

HHT disease is manifested in a heterozygous condition and no conclusive reports on living homozygous individuals are known. Some rare cases were reported in the past when the clinical diagnosis criteria and the responsible genes for HHT were not clearly established. Karabegovic et al⁵³ did not find any homozygous individuals in a large consanguineous Arab family. Therefore, the lethality of the homozygous condition is generally accepted. Moreover, the lethality of the homozygous *ENG* and *ALK1* knockout mice, which die in the embryonic stage at mid-gestation, supports this conclusion.⁵⁴⁻⁵⁷

Two hypothetical models have been considered in the literature to explain the manifestation of a disease in a heterozygous condition. One is the dominance of mutations in *ENG* or *ALK1* genes. The other one is the haploinsufficiency model, meaning that most mutations lead to unstable transcripts or unstable proteins that do not reach the membrane surface. Consequently, the population of functional endoglin or ALK1 molecules would be below the necessary threshold to meet the needs of the endothelial cells. Early on, McAllister et al⁵⁸ supported a dominant negative model for *ENG/HHT1* based on the clustering of the former *ENG* mutants in the extracellular domain between exons 4 and 11. They thought that the truncated or deleted proteins would be translated and could out-compete the wild type endoglin function. However, in the following years several authors reported mutations causing either the transcript or the protein to be unstable which supports the haploinsufficiency model.⁵⁹ Gallione et al⁶⁰ found an *ENG* null allele resulting from a missense mutation changing the translation start codon ATG to ACG. As no other consensus start exists for *ENG*, the mutant allele could not be translated. The existence of many different mutations spread throughout the extracellular domain of *ENG* (exons 1-12), and causing a

common clinical phenotype, favors the haploinsufficiency model particularly for *ENG/HHT1*. This model has also been extended to *ALK1/HHT2*.

Mutant expression patterns of endoglin and ALK1 have been studied in multiple models, including 1) human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), 2) site directed mutagenesis of the corresponding cDNAs and *in vitro* expression by transient transfection in COS cells, or 3) vaccinia virus infection of mammalian cells without endogenous expression of endoglin or ALK1.^{23,25,32,61-64} In general, studies performed in HUVECs derived from newborns carrying endoglin mutations showed a reduction in surface expression of endoglin compatible with the haploinsufficiency model. Similar endoglin levels were demonstrated in activated monocytes coming from *ENG/HHT1* patients, i.e. a reduction of endoglin compared to the control activated monocytes. Regardless of the type of mutation (either missense or nonsense leading to early truncation), HUVECs and monocytes from HHT1 patients showed much lower endoglin levels than healthy controls.^{23,30,60,61,64} When endoglin mutants were expressed *in vitro*, in most cases protein products were not detected. Most mutations either gave rise to unstable mRNA or translated proteins were not fully glycosylated and therefore were not expressed at the surface of the cells.^{61,62,65} In only one case, an endoglin mutant had a dominant negative effect *in vitro* by sequestering wild type endoglin forms.⁶⁵ However, these results have not been reproduced by endogenous expression in HHT monocytes or HUVECs.

In the case of *ALK1* and following conclusions drawn from *ENG*, the haploinsufficiency model has also been confirmed in several HHT2 mutants. However, most *ALK1* mutations lead to amino acid substitutions (about 60% are missense mutants), suggesting the possibility that these mutants could be translated. Investigation into the processing and traffic of these products in HUVECs or in transfected cells²³ has shown that at least three of them are able to reach the cell membrane. Among them, two of these missense mutations were identified as dominant-negative candidates. They are located in the GS domain (D179A) and in the NANDOR box (K487T) and were found in families with a risk of developing HHT-related pulmonary primary hypertension.^{17,18} According to the 3D prediction model for ALK1,³² substitutions affecting the kinase domain could destroy conserved motifs and key hydrogen bonds or destabilize amino acidic structures interfering with the catalytic activity.

Animal Models for HHT

ENG and *ALK1* knockout mice were obtained by several groups between 1999 and 2000 for *ENG*⁵⁴⁻⁵⁷ and for *ALK1*.^{48,66-68} Since neither *ENG* nor *ALK1* null mice showed problems in the formation of the early capillary plexus in the yolk sac or the embryo, it is believed that they are not involved in vasculogenesis. Nonetheless, these null embryos (*eng/eng*) were lethal, dying in the uterus at around 10.5 days of embryonic life due to improper mature

vascularization, heart valve formation, septation and angiogenesis from E9.0 leading to dilated vessels prone to rupture and hemorrhages. This phenotype is similar to that of the knockout mice for other TGF- β signaling network genes, i.e., ALK5, T β RII and TGF- β 1, although the latter shows, in addition, a failure in the early vasculogenesis. Unfortunately, the incomplete expression of the disease in most strains is a handicap for the murine model. In fact, Bourdeau et al⁵⁶ observed strain-dependent differences in the manifestation of the symptoms and actually HHT clinical symptoms similar to the human disease could only be developed in the strain Ola/129. The influence of epigenetic factors and other modifier genes is an added difficulty to the murine model.^{69,70} Furthermore, the pathogenicity of individual mutations cannot be studied in this model.

While a better animal model for HHT arises, successful vascular-specific gene delivery expression of human endoglin in normal mouse and rats has been accomplished.⁷¹ Thus, the promoter of the endothelial gene *ICAM-2* was used to generate transgenic animals which demonstrated endothelial expression of endoglin. Also, the promoters of the human endothelial genes, *ENG* and *ICAM-2*, were inserted upstream of the human *ENG* cDNA, and the resulting plasmid expression vectors were systemically or locally delivered, demonstrating endoglin expression in the vessel walls of liver, lung and skin.⁷¹ These gene transfer experiments represent a preliminary step in the treatment of HHT by gene therapy.

Cellular Models for HHT

HUVECs have been the main source of cells to study HHT disease at the molecular level. The main problem is the scarce availability of these cells from affected newborns and the fact that the symptoms of the disease are not yet present in most cases. Only in a few cases of HHT pregnancies have HUVECs been used as a tissue source for the direct study of *ENG*/ALK1 mRNA and protein levels.^{23,61,64} Since endothelial cells from adult HHT patients are currently very difficult to obtain, the use of activated monocytes from peripheral blood represents an alternative method to measure levels of endoglin in adult patients clinically diagnosed for HHT. Interestingly, endoglin is upregulated during the process of activation of monocytes.⁷² This property was used in early studies to quantify the relative endoglin levels in monocytes derived from HHT1 patients.^{61,64} More recent studies by Sanz-Rodriguez et al⁷³ have found that endoglin upregulation is impaired in the monocyte-macrophage transition in both HHT1 and HHT2 patients and that the degree of upregulation is age-dependent in those patients.

The downregulated expression of endoglin in activated monocytes derived from HHT2 patients contrasts with previous reports^{23,64} in which endoglin levels were unaffected in HHT2 patients. This apparent discrepancy is likely explained by the different experimental methods used to determine the levels of endoglin and the age factor. Accordingly, in HHT2, endoglin levels of the younger affected members (from 12 to 22 years old) are not different

from their age-matched controls and endoglin expression deficiencies become evident only in older family members (>45 years old).⁷³ Taking into account the age-dependence of endoglin expression, it is not surprising to find that in HHT2 HUVECs (newborns, age 0), the amount of endoglin is found to be close to normal levels.⁶⁴ The results with monocytes have been recently confirmed by our group in a large study encompassing 17 HHT Spanish families with approximately 100 patients.²⁹ An interesting conclusion of these studies is the endoglin deficient upregulation in either HHT1 or HHT2 activated monocytes. This fact opens new molecular insights in the study of HHT pathogenicity. Also, if there is an endoglin deficiency in activated monocytes of HHT2 as well as HHT1 patients, what would happen in HHT endothelial cells?

Circulating Endothelial Cells as a New Cellular Model for HHT

Adult endothelial cell cultures can be obtained following previously described methods^{66,67} that allow the isolation of blood outgrowth endothelial cells (BOECs). These are functionally mature endothelial cells^{74,75} able to be incorporated *in vivo* into the vascular endothelium and have been successfully used for gene therapy studies.⁷⁵ Fernández-L et al⁷⁶ have shown for the first time the characterization of pure cultures of HHT BOECs from Spanish patients with known clinical diagnosis and identified mutations in *endoglin* or *ALK1*. These cells have been used to investigate the molecular basis for the disease. Cells from HHT patients were characterized as mature endothelial cells by positive staining with endothelial specific antibodies against PECAM-1, endoglin, VE-cadherin, ALK1, von Willebrand factor (vWF) and Flk-1(VEGFR-2) (figure 4) and negative staining for the endothelial precursor marker CD133, for the monocyte marker CD14 and for the fibroblast surface antigen 1B10 (SIGMA). HHT cells showed different morphology compared to controls having a bigger size in many cases, especially in HHT1 cells. Flow cytometry and western blot analysis supported the decreased amounts of endoglin in HHT1 endothelial cells compared to controls, but endoglin was also significantly reduced in six different HHT2 endothelial cell cultures. Hence, endoglin deficiency seems a common characteristic for HHT1 and HHT2 cells and occurs both in activated monocytes and ECs.

Involvement of ALK1 in *ENG* Gene Expression of HHT2 BOECs

The downregulated expression of endoglin in HHT2 patients suggests the involvement of ALK1 in *ENG* gene expression. Since *ENG* expression is increased by TGF- β ^{77,78} and ALK1 is a TGF- β signaling RI, it is tempting to hypothesize the impact of ALK1 signaling on the *ENG* promoter. In fact, Fernández-L et al⁷⁶ have shown that mutations of *ALK1* lead to an improper endoglin upregulation in HHT2 BOECs. Endothelial cells from healthy donors were co-transfected with a reporter *ENG* promoter construct and expression vectors coding for different versions of the ALK1 kinase. A constitutively active kinase form of ALK1 (Q201D) doubled

the transcriptional activity of the *ENG* promoter and a dominant negative version (ALK1, K229R) decreased the activity of the endoglin promoter by one-half. Interestingly, ALK1 R374W harboring the mutation of an HHT2 family was able to inhibit approximately 50% of the activity of the *ENG* promoter. In summary, endoglin and ALK1 are tightly linked. ALK1 not only cooperates with endoglin in endothelial TGF- β signaling, but also transcriptionally regulates endoglin levels.

ALK1/TGF- β and ALK5/TGF- β Pathways are Reduced in HHT BOECs

Since endoglin cooperates with the TGF- β /ALK1 pathway, but interferes with the TGF- β /ALK-5 route,^{44,45} both TGF- β signaling pathways were examined in HHT BOECs using specific reporters.⁷⁶ Both ALK1/TGF- β and ALK5/TGF- β pathways are active in BOECs from normal donors, but both TGF- β pathways are seriously affected in HHT derived BOECs. As expected from the endoglin/ALK1 cooperation, the TGF- β response of the ALK1-dependent reporters was impaired in HHT cells. Surprisingly, the ALK5-dependent TGF- β pathway was significantly reduced in these cells, supporting the previous observation by Lebrin et al⁴⁴ in mouse endothelial cells from *eng*⁺/*eng*⁻ embryos. These

experiments show that responses of HHT endothelial cells to TGF- β are severely compromised and limited and, consequently, their regulated involvement in the angiogenic process must be affected (e.g., proliferation, migration, tube formation, extracellular matrix deposition and pericyte/smooth muscle cell recruitment). Intriguingly, in a recent paper,⁷⁹ it has been shown that null *eng*⁻/*eng*⁻ endothelial cells from 8.5 day old embryos are responsive to TGF- β and can proliferate faster in contrast to mouse *eng*⁺/*eng*⁻ endothelial cells.⁴⁴

ALK5 pathway is diminished in HHT BOECs and a previous report also showed a significant reduction in the levels of ALK5 in *eng*⁺/*eng*⁻ mouse embryonic cells.⁴⁴ To explain this phenomenon, Lebrin et al⁴⁴ postulated that ALK5 is downregulated as a cell adaptation response to compensate for a decreased endoglin/ALK1 expression in HHT cells. Supporting this view, the levels of ALK5 RNA transcripts are decreased by 80% in HHT1 and HHT2 compared to control endothelial cells.⁷⁶

The mechanism leading to *ALK5* downregulation in HHT endothelial cells is the consequence of a transcriptional modulation by *ALK1/ENG*. Thus, the *ALK5* promoter is

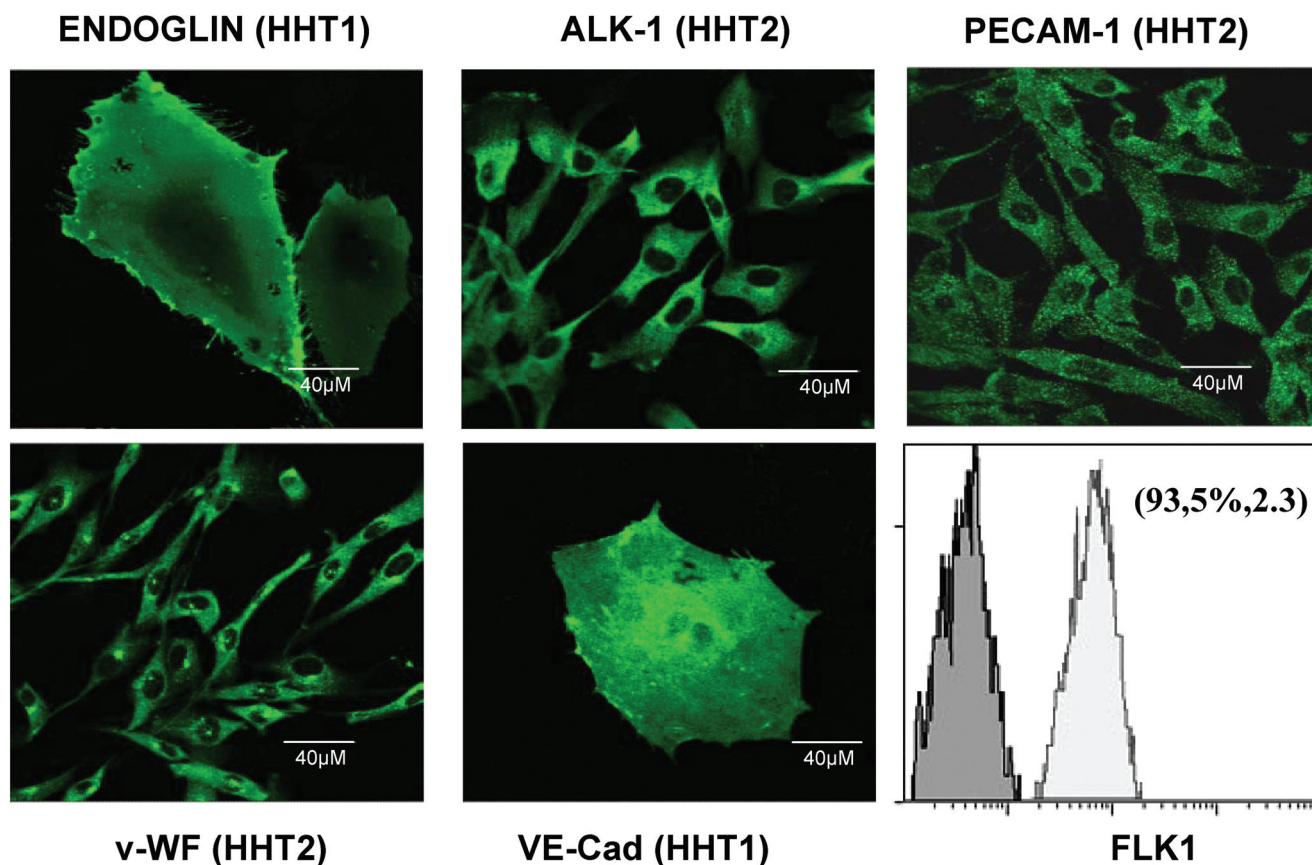


Figure 4. BOECs from HHT patients are characterized as endothelial by the expression of specific markers using confocal immunofluorescence microscopy (ALK1, PECAM-1, vWF and VE-Cad) and flow cytometry analyses (VEGFR-2 or Flk-1). The percentage of positive cells (93.5%) and the mean fluorescence intensity (2.3) are indicated in the VEGFR-2 histogram. For more detailed information, see Fernández-L et al.⁷⁵

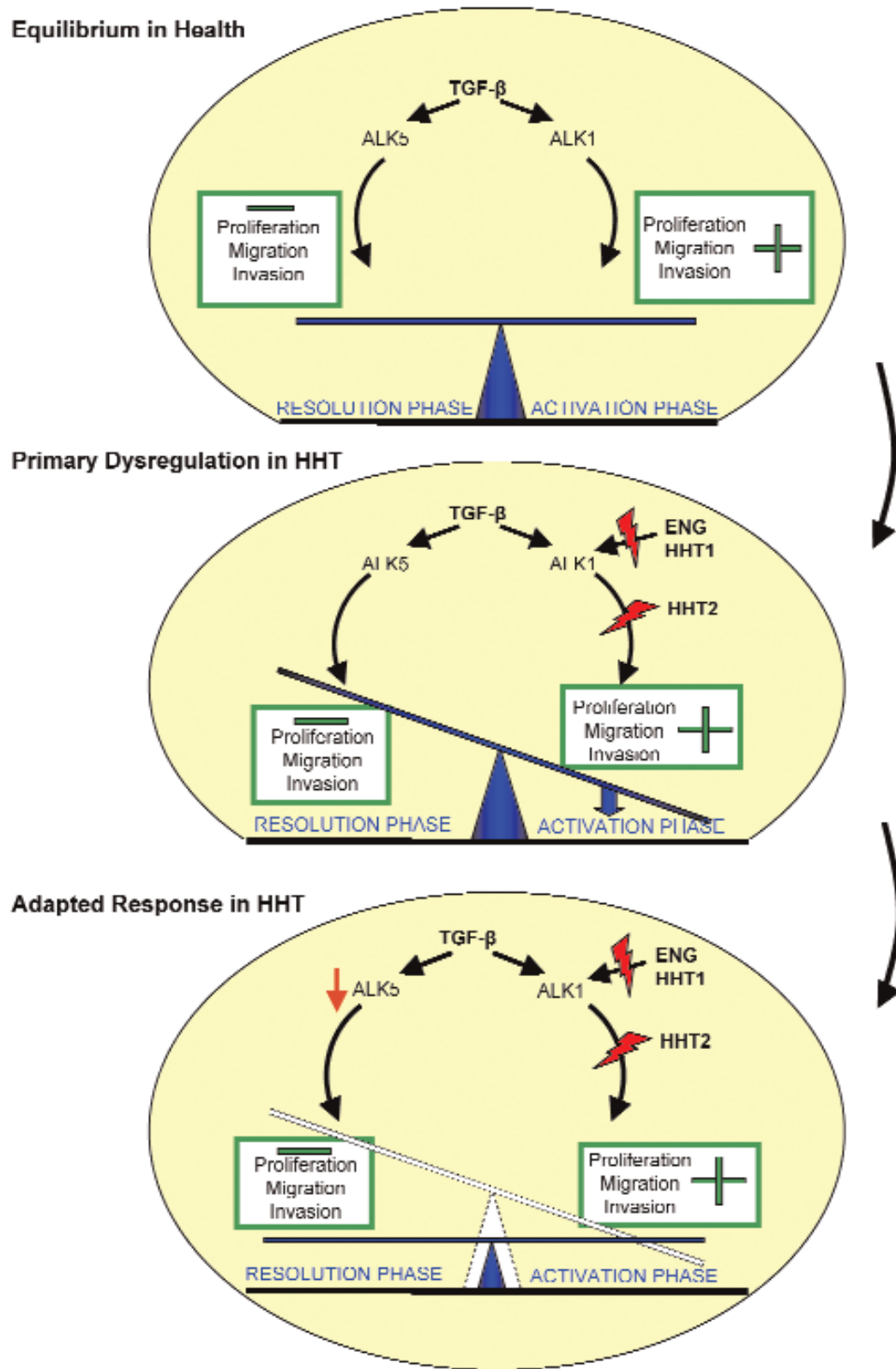


Figure 5. The balanced signaling through TGF- β /ALK1 and TGF- β /ALK5 in healthy endothelial cells is broken in HHT patients. In HHT1 patients (endoglin mutated), the positive cooperation between endoglin and ALK1 is impaired and the ALK1 signaling pathway is partially abolished. The same is true when ALK1 is mutated in HHT2 patients. Thus, in a primary dysregulation of HHT endothelial cells, proliferation and migration would decrease and, consequently, ALK5 signaling and quiescence would prevail, compromising the angiogenesis process. However, ALK5 levels are decreased in these HHT endothelial cells as part of an adaptive response mechanism. Based on results by Fernández-L et al.⁷⁵

stimulated by wild type versions of both *ENG* and *ALK1* and downregulated in HHT cells.⁷⁶ These results suggest that endothelial cells keep a fine balance between *ALK1/ENG* and *ALK5* levels, and that mutations in either *ENG* (HHT1) or *ALK1* (HHT2) downregulate *ALK5* gene expression to maintain a physiologically adaptive equilibrium between *ALK1* and *ALK5* routes (figure 5). Otherwise, *ALK1* and *endoglin* mutations would allow the increase of the endothelial cell competitor TGF- β /*ALK5* pathway, leading to a stop in cell division incompatible with angiogenesis.

Disruption of Angiogenesis: Abnormal Tube Formation in HHT Endothelial Cells

The TGF- β /*ALK1*/endoglin pathway induces proliferation, migration, and tube formation of endothelial cells. One of the predictions of a decreased TGF- β /*ALK1*/endoglin pathway in HHT endothelial cells, is the possible interference of building up cord-like structures during the angiogenic process. In fact, *in vitro* experiments have shown that while normal donor HUVECs and BOECs form robust cord-like structures, HHT BOECs display deficient tube formation. Poorly defined cord structures in HHT1, weak and thin tube-network in null HHT2 or forming cell clusters with abundant sprouting in some missense HHT2 BOECs has been observed (figure 6). As endoglin and *ALK1* collaborate in the TGF- β /*ALK1*/endoglin pathway leading to the formation of cord-like structures, it is inferred that levels of endoglin or *ALK1* below a critical threshold hamper the proper tube formation during the angiogenic process.

Altered F-Actin Cytoskeleton in HHT BOECs

In addition to the role of endoglin as an auxiliary TGF- β receptor, the cytoplasmic domain of endoglin has a role in the organization of the actin cytoskeleton via its binding activity to proteins of the zyxin family (ZRP-1 and zyxin) and associated adaptor proteins.^{80,81} Since HHT1 and HHT2 endothelial cells have a significant decrease in the amount of endoglin in common, one would expect deficiencies in the F-actin cytoskeleton of HHT endothelial cells. Normal endothelial cells are characterized by a highly organized cytoskeleton with stress fibers crossing the entire cell. By contrast, the abnormal shape of HHT BOECs is correlated to an abnormal organization of actin fibers. HHT1 BOECs show a disorganized and depolymerized cytoskeleton, giving rise to very intricate and curious patterns with different foci of actin polymerization. HHT2 BOECs also show a poor organization of the actin cytoskeleton with extensive areas of depolymerization (figure 7). The origin of the altered F-actin polymerization is dependent on endoglin levels since suppression by endoglin-specific small interference RNA in control BOECs leads to a disruption of the actin cytoskeleton. Conversely, overexpression of endoglin in HHT1 cells significantly restores the actin network.⁷⁶

Conclusions

A common feature of HHT mutations in either *ALK1* or *ENG* is an endoglin deficiency in endothelial cells.⁷⁶ This raises

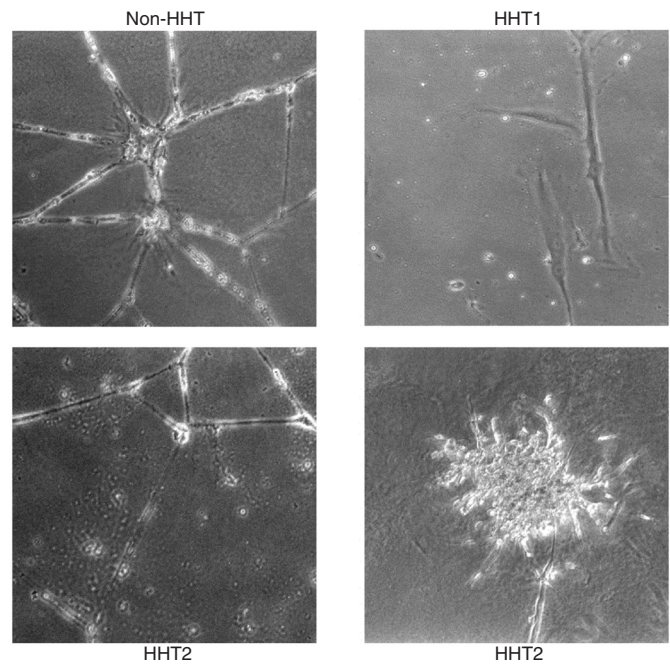


Figure 6. *In vitro* tube formation assay in BOECs from healthy donors (control) and HHT1 or HHT2 patients. Overall, the tube formation process is incomplete, abnormal or non-existent in HHT BOECs, as compared to control cells. For further details, see Fernández-L et al.⁷⁵

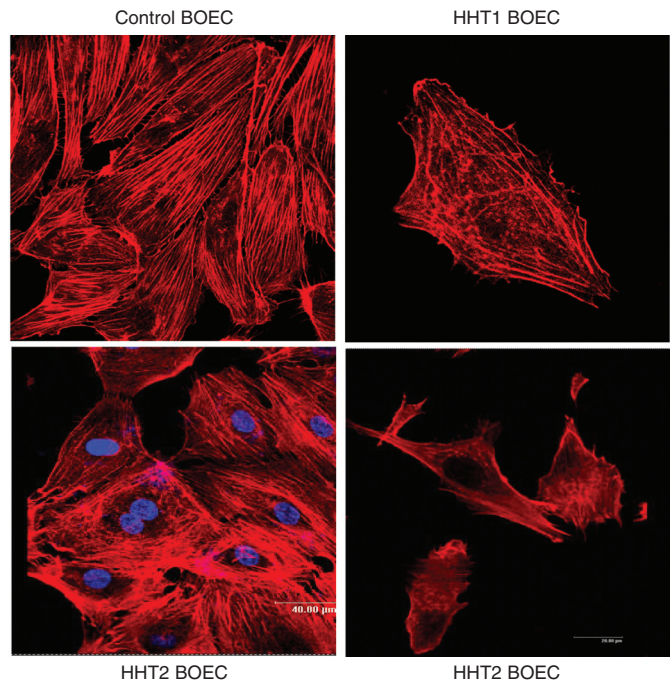


Figure 7. The actin cytoskeleton is disrupted in HHT BOECs. F-actin cytoskeletons were stained in BOECs from healthy donors (control) and HHT1 or HHT2 patients. While control cells display a perfectly arranged cytoskeleton consisting of stress fibers crossing the entire cell surface, HHT BOECs show actin fibers that do not cross the whole surface and are partially depolymerized or disorganized. For further details see Fernández-L et al.⁷⁵

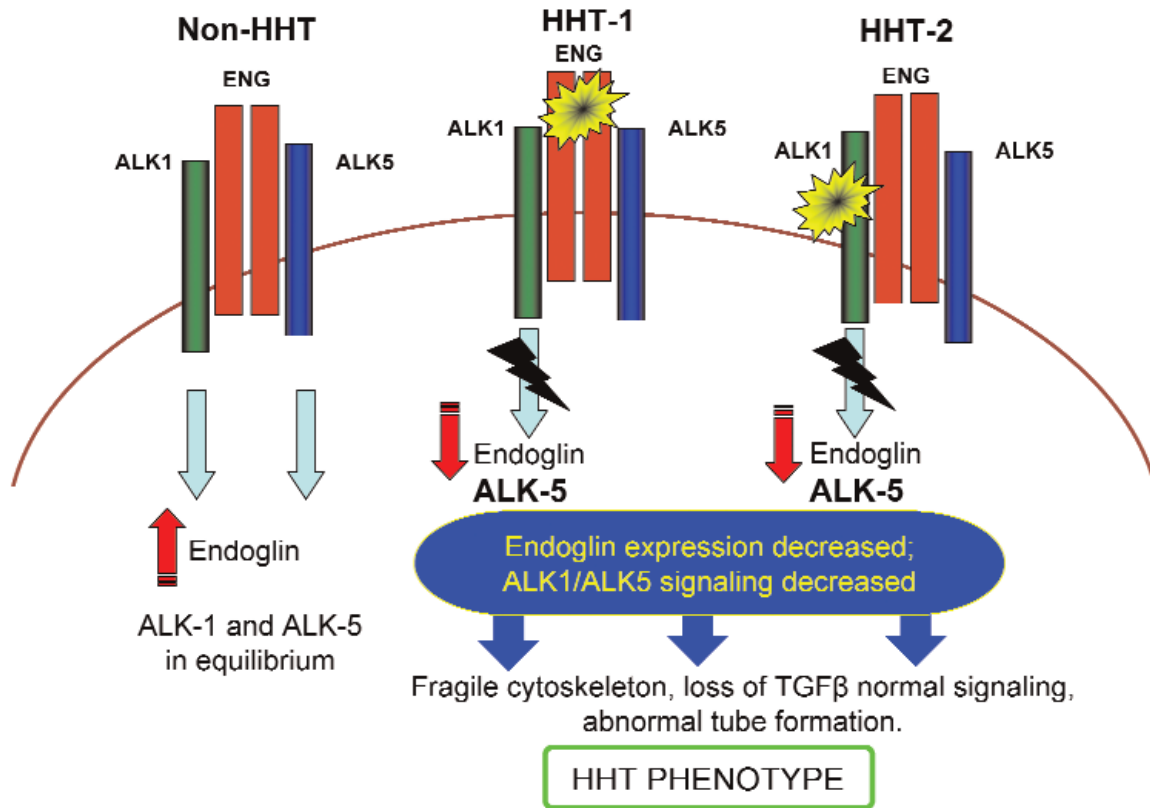


Figure 8. Hypothetical model for HHT. Model representing TGF- β receptor complex in healthy (non-HHT) endothelial cells as compared to HHT1 and HHT2 endothelial cells. In healthy endothelial cells (non-HHT), ALK1 and endoglin are cooperating in the TGF- β /Smad pathway, and endoglin levels are maintained to meet the physiological needs of the endothelial cell. However, in HHT1 and HHT2 cells, either endoglin or ALK1 fail in the cooperative signaling. As a result, endoglin expression decreases below a critical threshold leading to impaired TGF- β signaling, and abnormal cytoskeleton and tube formation in HHT endothelial cells. These altered endothelial cell functions may explain the HHT phenotype. Adapted from Fernández-L et al.⁷⁵

the interesting possibility that endoglin deficiency below a critical threshold is the ultimate pathogenic trigger, not only in HHT1, but also in HHT2 (figure 8). Supporting this view, both endoglin and ALK1 are components of the same TGF- β receptor complex, and despite being structurally and functionally different, they cooperate in the TGF- β /ALK1 endothelial pathway. As in endothelial cells, both ALK1- and ALK5-dependent TGF- β signaling pathways are active, but an adequate balance must be attained among them. Since ALK1 signaling promotes endothelial cell proliferation and migration, and ALK5 inhibits proliferation and migration and induces extracellular matrix synthesis, both pathways must be regulated within endothelial cells to coordinate the different types of responses that are adequate for each physiological situation. Since the ALK1 pathway is decreased in HHT endothelial cells, a mechanism to promote the concomitant decrease of ALK5 membrane levels is elicited to avoid the inhibition of cell proliferation via ALK5. This regulation is based on direct signals from ALK1 and endoglin to the ALK5 promoter. Further experiments in this line of investigation may help to elucidate the complicated network of regulatory interactions that ultimately lead to a fine tuning among the levels of the signaling components in the TGF- β pathway. This tuning requires a physiological adaptation of endothelial

cells, presumably reached during the period of differentiation from precursor to mature endothelial cells.

A direct consequence of ALK1/TGF- β deficient signaling in HHT cells is the decreased capacity for cell migration to form cord-like structures typical of the angiogenic process leading to dysregulation in the organization of the capillary network parallel to their degree of endoglin deficiency. In addition, the abnormal actin cytoskeleton of HHT BOECs may be connected also with decreased endoglin levels. In fact, the endoglin cytoplasmic domain interacts with the zyxin-related protein ZRP1, which is present at the points of actin polymerization.⁸⁰ Accordingly, the decrease in endoglin levels would disrupt the actin polymerization sites. A disorganized cytoskeleton is prone to cell breaking with changes in shear stress and blood pressure and might lead to vessel hemorrhages and eventually disappearance of the capillary network since cells are unable to form proper vessels, as characteristic of the HHT vascular disorder.

The present knowledge about the critical function of endoglin and ALK1 in endothelial cells and the current haploinsufficiency model suggest that the future therapeutic and/or prophylactic perspectives for HHT should necessarily

include an increased expression of either endoglin or ALK1. This may be accomplished by 1) cellulosic replacement therapies of endothelium based on the use of endoglin- or ALK1-transduced BOECs, 2) *in vivo* gene delivery of *ENG* or *ALK1* using endothelial specific viral or plasmid based expression vectors, or 3) the use of different stimuli, including soluble factors (like TGF- β) or drugs capable of inducing the expression/function of endoglin or ALK1.

References

- Shovlin CL, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* 1999;54:714-729.
- Plauchu H, Bideau A. Épidémiologie et constitution d'un registre de population à propos d'une concentration géographique d'une maladie héréditaire rare. *Population* 1984;4-5:765-786.
- Kjeldsen AD, Vase P, Green A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med* 1999;245:31-39.
- Jessurun GA, Kamphuis DJ, van der Zande FH, Nossent JC. Cerebral arteriovenous malformations in The Netherlands Antilles. High prevalence of hereditary hemorrhagic telangiectasia-related single and multiple cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg* 1993;95:193-198.
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD, Plauchu H. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 2000;91:66-67.
- Cohen JH, Faughnan ME, Letarte M, Vandezande K, Kennedy SJ, Krahn MD. Cost comparison of genetic and clinical screening in families with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med Genet A* 2005;137:153-160.
- Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 1989;32:291-297.
- Porteous ME, Curtis A, Williams O, Marchuk D, Bhattacharya SS, Burn J. Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 1994;31:925-926.
- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 1995;333:918-924.
- McDonald MT, Papenberg KA, Ghosh S, Glatfelter AA, Biesecker BB, Helmbold EA, Markel DS, Zolotor A, McKinnon WC, Vanderstoep JL, Jackson CE, Iannuzzi M, Collins FS, Boehnke M, Porteous ME, Guttmacher AE, Marchuk DA. A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet* 1994;6:197-204.
- Shovlin CL, Hughes JM, Tuddenham EG, Temperley I, Perembelon YF, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nat Genet* 1994;6:205-209.
- Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M, Bernabeu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34—>qter. *Cytogenet Cell Genet* 1993;64:204-207.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, McCormick MK, Pericak-Vance MA, Heutink P, Oostra BA, Haitjema T, Westerman CJ, Porteous ME, Guttmacher AE, Letarte M, Marchuk DA. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8:345-351.
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 1996;13:189-195.
- Buscarini E, Buscarini L, Danesino C, Piantanida M, Civardi G, Quaretti P, Rossi S, Di Stasi M, Silva M. Hepatic vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Doppler sonographic screening in a large family. *J Hepatol* 1997;26:111-118.
- Wallace GM, Shovlin CL. A hereditary haemorrhagic telangiectasia family with pulmonary involvement is unlinked to the known HHT genes, endoglin and ALK-1. *Thorax* 2000;55:685-690.
- Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, Nichols WC, Morrell NW, Berg J, Manes A, McGaughan J, Pauciulo M, Wheeler L. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001;345:325-334.
- Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, Elliott CG, Robbins IM, Olschewski H, McLaughlin V, Gruenig E, Kermeen F, Halme M, Raisanen-Sokolowski A, Laitinen T, Morrell NW, Trembath RC. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 2003;40:865-871.
- Abdalla SA, Gallione CJ, Barst RJ, Horn EM, Knowles JA, Marchuk DA, Letarte M, Morse JH. Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J* 2004;23:373-377.
- Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, Mitchell G, Drouin E, Westermann CJ, Marchuk DA. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* 2004;363:852-859.
- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 2005;42:577-582.
- Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* 1997;61:60-67.
- Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 2000;9:1227-1237.
- Olivieri C, Mira E, Delu G, Pagella F, Zambelli A, Malvezzi L, Buscarini E, Danesino C. Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 2002;39:E39.
- Abdalla SA, Geisthoff UW, Bonneau D, Plauchu H, McDonald J, Kennedy S, Faughnan ME, Letarte M. Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* 2003;40:494-502.

26. Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, Lindhout D, Hennekam FA, Westermann CJ, Ploos van Amstel JK. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet* 2005;116:8-16.
27. Lastella P, Sabba C, Lenato GM, Resta N, Lattanzi W, Gallitelli M, Cirulli A, Guanti G. Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* 2003;63:536-540.
28. Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, Riviere S, Leheup B, Goizet C, Carette MF, Cordier JF, Pinson S, Soubrier F, Calender A, Giraud S; French Rendu-Osler Network. Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat* 2004;23:289-299.
29. Fernández-L A, Sanz-Rodríguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Morales C, Restrepo CM, Ramirez JR, Coto E, Lenato GM, Bernabeu C, Botella LM. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* 2006;27:295.
30. Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 2006;43:97-110. Epub 2005 May 6.
31. Cymerman U, Vera S, Karabegovic A, Abdalla S, Letarte M. Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat* 2003;21:482-492.
32. Abdalla SA, Cymerman U, Johnson RM, Deber CM, Letarte M. Disease-associated mutations in conserved residues of ALK-1 kinase domain. *Eur J Hum Genet* 2003;11:279-287.
33. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004;29:265-273.
34. Yamashita H, ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K, Heldin CH. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1994;269:20172-20178.
35. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370:341-347.
36. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577-584.
37. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997;16:5353-5362.
38. Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 2002;277:39919-39925.
39. Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, Cao X. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol* 2004;164:291-300.
40. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:19027-19030.
41. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999;274:584-594.
42. Letamendia 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-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998;273:33011-33019.
43. Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 2002;277:29197-29209.
44. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 2004;23:4018-4028.
45. Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 2005;204:574-584.
46. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 2002;21:1743-1753.
47. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-beta receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:301-307.
48. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2626-2631.
49. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2005;65:599-608.
50. van den Driesche S, Mummery CL, Westermann CJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2003;58:20-31.
51. Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): a view from the 21st century. *Postgrad Med J* 2003;79:18-24.
52. Stefansson S, Pettiler E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA. Inhibition of angiogenesis *in vivo* by plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 2001;276:8135-8141.
53. Karabegovic A, Shinawi M, Cymerman U, Letarte M. No live individual homozygous for a novel endoglin mutation was found in a consanguineous Arab family with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 2004;41:e119.
54. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 1999;284:1534-1537.
55. Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 1999;104:1343-1351.
56. Bourdeau A, Faughnan ME, Letarte M. Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:279-285.
57. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGF beta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 2000;217:42-53.
58. McAllister KA, Baldwin MA, Thukkani AK, Gallione CJ, Berg JN, Porteous ME, Gutmacher AE, Marchuk DA. Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function. *Hum Mol Genet* 1995;4:1983-1985.
59. Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1997;61:68-79.

60. Gallione CJ, Klaus DJ, Yeh EY, Stenzel TT, Xue Y, Anthony KB, McAllister KA, Baldwin MA, Berg JN, Lux A, Smith JD, Vary CP, Craigen WJ, Westermann CJ, Warner ML, Miller YE, Jackson CE, Guttmacher AE, Marchuk DA. Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat* 1998;11:286-294.
61. Pece N, Vera S, Cymerman U, White RI Jr, Wrana JL, Letarte M. Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest* 1997;100:2568-2579.
62. Raab U, Velasco B, Lastres P, Letamendia A, Cales C, Langa C, Tapia E, Lopez-Bote JP, Paez E, Bernabeu C. Expression of normal and truncated forms of human endoglin. *Biochem J* 1999;339:579-588.
63. Paquet ME, Pece-Barbara N, Vera S, Cymerman U, Karabegovic A, Shovlin C, Letarte M. Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Hum Mol Genet* 2001;10:1347-1357.
64. Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI Jr, Dunn J, Letarte M. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* 2000;47:24-35.
65. Lux A, Attisano L, Marchuk DA. Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem* 1999;274:9984-9992.
66. Urness LD, Sorensen LK, Li DY. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* 2000;26:328-331.
67. Srinivasan S, Hanes MA, Dickens T, Porteous ME, Oh SP, Hale LP, Marchuk DA. A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet* 2003;12:473-482.
68. Carvalho RL, Jonker L, Goumans MJ, Larsson J, Bouwman P, Karlsson S, Dijke PT, Arthur HM, Mummery CL. Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development* 2004;131:6237-6247.
69. Bourdeau A, Faughnan ME, McDonald ML, Paterson AD, Wanless IR, Letarte M. Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Pathol* 2001;158:2011-2020.
70. Torsney E, Charlton R, Diamond AG, Burn J, Soames JV, Arthur HM. Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation* 2003;107:1653-1657.
71. Velasco B, Ramirez JR, Relloso M, Li C, Kumar S, Lopez-Bote JP, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM, Cowan PJ, d'Apice AJ, Bernabeu C. Vascular gene transfer driven by endoglin and ICAM-2 endothelial-specific promoters. *Gene Ther* 2001;8:897-904.
72. Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabeu C. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 1992;22:393-397.
73. Sanz-Rodriguez F, Fernandez-L A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, Bernabeu C, Botella LM. Mutation analysis in Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. *Clin Chem* 2004;50:2003-2011.
74. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;105:71-77.
75. Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood* 2002;99:457-462.
76. Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabeu C, Botella LM. Blood outgrowth endothelial cells from hereditary haemorrhagic telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* 2005;68:235-248.
77. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, Vary CP, Bernabeu C. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 1998;92:4677-4690.
78. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A, Bernabeu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* 2001;276:34486-34494.
79. Pece-Barbara N, Vera S, Kathirkamathamby K, Liebner S, Di Guglielmo GM, Dejana E, Wrana JL, Letarte M. Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem* 2005;280:27800-27808.
80. Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 2004;279:32858-32868.
81. Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem* 2004;279:27440-27449.

Author Affiliations

Africa Fernández-L, Predoctoral fellow; Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC); Ramiro de Maeztu, 9; Madrid 28040; Spain.

Francisco Sanz-Rodriguez, PhD; Departamento de Biología, Universidad Autónoma, Madrid, Spain.

Francisco J. Blanco, Predoctoral fellow; Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC); Ramiro de Maeztu, 9; Madrid 28040; Spain.

Carmelo Bernabéu, PhD; Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC); Ramiro de Maeztu, 9; Madrid 28040; Spain.

Luisa M. Botella, PhD; Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC); Ramiro de Maeztu, 9; Madrid 28040; Spain.



Therapeutic action of Tranexamic Acid on HHT Patients. Regulation of ALK-1/Endoglin Pathway In Endothelial Cells

Journal:	<i>Thrombosis and Haemostasis</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Basic/Clinical Studies: blood coagulation, fibrinolysis and cellular haemostasis
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	FERNANDEZ-L, AFRICA; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, CSIC., IMMUNOLOGY GARRIDO, EVA; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CSIC, IMMUNOLOGY Sanz-Rodríguez, Francisco; Universidad Autonoma Madrid, Biología Celular RAMIREZ, JOSE; HOSPITAL CENTRAL DE LA DEFENSA. GOMEZ ULLA, PATOLOGÍA ZARRABEITIA, ROBERTO; HOSPITAL SIERRALLANA, MEDICINA INTERNA PEREZ-MOLINO, ALFONSO; HOSPITAL SIERRALLANA, MEDICINA INTERNA MORALES-ANGULO, CARMELO; HOSPITAL SIERRALLANA,, OTORRINOLARYNGOLOGY BERNABEU, CARMELO; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS. CSIC, IMMUNOLOGY BOTELLA, LUISA; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS. CSIC, IMMUNOLOGY
Keywords:	Cerebrovascular disease, Signal transduction, Endothelial cells, Fibrinolysis inhibitors, Plasminogen activator inhibitors

Therapeutic action of Tranexamic Acid on HHT Patients. Regulation of ALK-1/Endoglin Pathway In Endothelial Cells

Running Title: Therapeutic action of Tranexamic Acid on HHT Patients

Africa Fernandez-L¹; Eva Garrido¹; Francisco Sanz-Rodriguez^{1,3}; J-R Ramirez⁴; Carmelo Morales-Angulo²; Roberto Zarrabeitia²; Alfonso Perez-Molino²; Carmelo Bernabéu¹, and Luisa-María Botella¹,

1. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. 28040. Madrid. SPAIN
2. Unidad de HHT. Hospital de Sierrallana, Torrelavega, Santander. SPAIN
3. Facultad de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.
4. Anatomía Patológica. Hospital Central de la Defensa. Gomez Ulla.

Key words: endothelial cells, HHT. Endoglin, ALK1, tranexamic acid, antifibrinolytic

Correspondent author:
Luisa-Maria Botella
CIB (CSIC)
e-mail: cibluisa@cib.csic.es

ABSTRACT

Recurrent epistaxis is the most frequent clinical manifestation of Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT). Its treatment is difficult. Our objective was to assess the use of Tranexamic Acid (TA), an antifibrinolytic drug, for the treatment of epistaxis in HHT patients and to investigate in vitro the effects of TA over endoglin and ALK1 expression and activity in endothelial cells. A prospective study was carried on patients with epistaxis treated with oral TA in the HHT Unit of Sierrallana Hospital (Cantabria, Spain). Primary cultures of endothelial cells were treated with TA to measure the levels of endoglin and ALK1 at the cell surface by flow cytometry. RNA levels were also measured by real time PCR, and the transcriptional effects of TA on reporters for endoglin, ALK1 and the endoglin/ALK1 TGF-beta pathway were assessed. The results showed that the fourteen HHT patients orally TA-treated improved and the frequency and severity of their epistaxis were decreased. Most of them were satisfied with the treatment and no complications derived from the treatment were observed. Cultured endothelial cells incubated with TA exhibited increased levels of endoglin and ALK1 at the protein and mRNA levels, and enhanced TGF-beta signaling.

In summary, oral administration of TA proved beneficial for epistaxis treatment in selected patients with HHT. In addition to its already reported antifibrinolytic effects, TA stimulates the expression of ALK1 and endoglin, as well as the activity of the ALK1/endoglin pathway.

INTRODUCTION

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler-Weber syndrome, is an autosomal dominant vascular disease with incomplete penetrance characterized by localized angiodysplasia. This is manifested as epistaxis, mucocutaneous and gastrointestinal telangiectases, and arteriovenous malformations in the pulmonary, cerebral or hepatic circulation (1). The prevalence is on average between 1 in 5,000 to 1 in 8,000, although it is higher in some regions, such as the Jura region in France, Funen island in Denmark and certain Caribbean islands in the Netherland Antilles (2); (3). Its prevalence in Cantabria (Northern Spain) was calculated of 1 in 12,000 in 1997 (4). However, according to more recent HHT Spanish population studies, in progress since 2003, the prevalence may be around 1 in 8,000 (Zarrabeitia et al., data not shown).

There are two main HHT types, type 1 and type 2 which are originated by mutations in endoglin and ALK1 genes respectively (5); (6). In a few cases of the total HHT patients, around 2%, the origin of the disease is a mutation in Smad4 gene leading to the combined syndrome of Juvenile Polyposis and HHT (7). Recently a third locus for an unknown HHT gene has been described in chromosome 5 (HHT3, (8)). All these genes are coding for proteins involved in the TGF- β signalling pathway, which is critical for the proper development of the blood vessels.

The most frequent clinical manifestations of HHT are epistaxis (nose bleeds), normally from light to moderate ((9); (10); (11)). However, some patients show severe epistaxis which notably interfere with their quality of life (12). The origin of these epistaxis is due to the existence of telangiectases on the nasal mucosa. These are focally dilated postcapilar venules, which in advanced phases show many layers of smooth muscle cells without elastic fibers, and very frequently directly connect with dilated arterioles (13).

As a consequence of these vascular alterations, telangiectases are very sensitive to slight traumatism and even to the friction with the air when breathing, which gives rise to nose bleeds.

There is no optimal treatment for the epistaxis in HHT patients. Many different therapies have been assayed, but none of them with conclusive results (14); (15); (16); (17) The use of antifibrinolytic agents, for the treatment of HHT patients, systemically administered (intravenously, intraparenteral, orally) was described for the first time by (18), using oral administration of aminocaproic acid to two patients. The result was

1
2
3 satisfactory with an improvement in epistaxis and the associated anemia. More recently,
4 other authors have also reported good results using TA, both orally and topically ((19);
5 (20); (21); (22)). TA may also be administered even endovenously in case of very acute
6 bleeding episodes (10). TA is a derivative of the amino acid lysine, 4 (aminomethyl
7 cyclohexanecarboxyl) (23). It binds reversibly to plasminogen, blocking its
8 transformation in the active protease plasmin, which degrades fibrin ((24); (25)). TA
9 enters in the extravascular space and is accumulated in the tissues (26)). The basis for
10 its efficiency relies on the inhibition of the fibrinolytic activity in the tissues that leads to
11 clot stabilization (23).

12 The aim of the present study was to assess the efficiency of TA orally administered in
13 HHT patients with moderate or severe epistaxis as well as to explore the effect of TA on
14 the amount of endoglin and ALK1, the two main proteins being deficient in HHT
15 patients.
16
17
18

19 **Material and Methods**

20 **Clinical study of HHT patients**

21 A prospective study of HHT patients attending the HHT unit of Sierrallana hospital
22 between 2001 and the first semester of 2006, was conducted. HHT patients were
23 diagnosed according to Curaçao criteria (27). Those patients with moderate or severe
24 epistaxis which interfered with their quality of life were treated with TA when they did not
25 show any contraindication. The treatment normally consisted of 500 mg oral TA
26 (Amchafibrin, Fides Ecopharma, Rota-Research group) every 8 hours, with corrections
27 according to renal function. Doses of TA in some cases may reach up to 1g every 8
28 hours. Before the study, all patients were subjected to blood tests including hemogram,
29 plasma biochemical studies, coagulation studies and genetic studies to look for the
30 mutation origin of the disease. Moreover, a complete screening of head and neck was
31 made by an ENT involved in the screening of HHT patients. The efficiency of the
32 treatment was evaluated according to the transfusion needs, and the frequency and
33 intensity of epistaxes following (28). To measure the degree of satisfaction a scale from
34 I (very satisfied) to IV (very unsatisfied) was used.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 **Cell culture.**

59 BOECs (Blood Outgrowth Endothelial Cells) and HUVECs (Human Umbilical Vein
60 Endothelial Cells) were obtained as described ((29); (30)). HMECs (Human

microvasculature endothelial cells) were incubated in the same endothelial enriched medium used for BOECs and HUVECs as described (30)). Cells were incubated in the presence or absence of 2 mM TA (Amchafibrin, Fides Ecopharma, Rotta-Research group) diluted directly into the culture medium.

Flow cytometry analysis

Endoglin, ALK1 and PECAM (CD31) levels on the cell surface was carried out by flow cytometry analysis from HUVECs and BOECs using monoclonal antibodies P4A4, anti-ALK1 (R&D Systems) and HC1/16, respectively, according to the procedure described by (29) and (30).

Real Time PCR

Endoglin and ALK1 oligonucleotides were purchased from Sigma and chosen according to Roche software for real time PCR. Total RNA was extracted from endothelial cells (HUVECs, BOECs, and HMECs) using the RNAeasy kit (Qiagen), retrotranscribed using the AMV RT kit from Roche company, and amplified in a real time PCR using the Universal Human Probe Roche library and the Real time PCR kit from Roche company. The assays were made by triplicates, compared with two different types of endogenous controls (18S RNA and GAPDH) and repeated at least twice. The oligonucleotide sequences for endoglin, ALK1, GAPDH and 18S RNA used in the PCR were:

Endoglin left oligo: 5' agcctcagccccacaagt 3'; right oligo: 5' gtcacctcgtccctctcg 3'

Human 41 Probe of Roche library for *Endoglin*

ALK1/ACVRL1 left oligo: 5' atctgagcagggcgacac 3'; right oligo 5' actccctgtggtgcagtca 3'

Human 79 probe of Roche library for *ALK1/ACVRL1*

GAPDH left oligo: 5' agccacatcgctcagacac 3'; right oligo: 5' gccaatagcaccacaaatcc 3'

Human 60 probe of Roche library for *GAPDH*

18SrRNA left oligo: 5' ctaacacgggaaacctcac 3'; right oligo: 5' cgctccaccaactaagaacg 3'

Human 77 probe of Roche library for 18SrRNA.

Cell Transfection and Reporter Assays.

Transient transfections of BOECs were made using Superfect (Qiagen) with reporters for *endoglin* promoter: pCD105(-450/+350) in pXP2 ((31); (32)); and ALK1 promoter: ALK1/pGL2, a construction encompassing the first exon and around 1.3-kb upstream of the ALK1 genomic DNA inserted in *Sac* I and *Xho* I sites of pGL2 polylinker. The TGF- β pathway reporters were 3TP-lux or ALK1 responsive p(BRE)₂ (33). Reporter vectors were cotransfected or not with expression vectors coding for a dominant negative mutant (ALK1-K229R), or a constitutively active mutant (ALK1-Q201D) of ALK1.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Relative luciferase units (RLU) were measured in a TD20/20 luminometer (Promega, Madison, WI).

Samples were cotransfected with the SV40- β galactosidase expression vector to correct for transfection efficiency. Measures of β -galactosidase activity were performed using Galacto-light (Tropix). The transfections were made in triplicates and repeated at least in three independent experiments. Representative experiments are shown in the figures.

Statistics

All data presented represent mean \pm SD. Differences in mean values were analyzed using Student's t-test. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

1. Clinical treatment with TA of a group of Spanish HHT patients

Previous reports on the successful use of TA for nose bleeds management are based on one or, at the most, 3 patients ((19); (20); (21); (22)). This encouraged us to start a clinical trial with a larger panel of patients and a research survey in parallel to study TA effects. The HHT unit of Sierrallana Hospital (Cantabria, Spain) has screened from 2003 up to now, more than 150 patients belonging to around 40 different families. Out of them, a total of 14 patients which had severe epistaxis interfering with their quality of life volunteered for a treatment with oral TA. In all these cases side effect risks of thrombosis were absent. The type of patient, mutation, sex, and management of the epistaxis before the treatment are recorded in Table I. The TA treatment and the severity of epistaxis before and after the treatment are shown in Table II. All patients showed a decrease in the intensity and frequency of nose bleeds since the first week of treatment and when the treatment was discontinued, the amount of hemorrhages increased immediately. At this moment, all of them continue with the TA treatment and none has presented adverse side effects derived from it.

As HHT1 and 2 are caused by endoglin and ALK1 haploinsufficiency, respectively, we explored the TA effects *in vitro* at the cellular level on these two genes whose mutations are responsible for the HHT disease.

2. Effect of TA on the amount of ALK1 and endoglin at the surface of endothelial cells

1
2
3 Since TA seems to be effective in controlling bleeding in HHT1 and HHT2 patients, we
4 decided to investigate if TA, incorporated at the culture medium in a range of
5 concentrations (from 0 to 10 mM) for 24 hours, was having any effect on the amount of
6 ALK1 and endoglin at the surface of endothelial cells (HUVECs) (Fig. 1A). The effect on
7 the endothelial marker PECAM was used as a control, and an irrelevant antibody was
8 taken as reference. Endoglin was clearly induced, from 3- to 4-fold increase, even at the
9 lowest dose assayed (0.5 mM). In another set of experiments, fixing the dose of TA at 2
10 mM (since it already yields the highest response, Fig. 1A) for 24 hours of treatment, the
11 amount of endoglin and ALK1 increased by 1.5- and 1.75-fold, respectively, at the cell
12 surface of HUVECs (Fig. 1B). In Fig. 1C, the effect 2 mM TA treatment on the amount
13 endoglin and ALK1 at the surface of blood outgrowth endothelial cells (BOECs) (30) is
14 shown. The TA-dependent increase of endoglin is higher than 2.5-fold.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Next, we wanted to investigate if in addition to this effect, at the protein levels, there
were also effects on the levels of RNA. To this end, endothelial cells were treated with
2mM TA, and after 24 h, total RNA was extracted, retro-transcribed to cDNA and the
RNA levels of endoglin and ALK1 were quantified by real time PCR. As shown in Fig.
2A, the levels of endoglin and ALK1 RNA are significantly induced, more than 3-fold
over the endogenous controls (18S RNA and GAPDH). Next we analyzed whether TA
was acting at the transcriptional level on the promoters of *endoglin* and *ALK1*. Fig. 2B
shows the results of transfecting endothelial cells (BOECs) with constructs
encompassing the *endoglin* or the *ALK1* promoters (Fig. 2B). In both cases the
treatment with 2 mM TA for 24 hours doubles the transcription rate of *endoglin/ALK1*
promoter constructs.

As published (30), ALK1 affects signalling of *endoglin* promoter. Accordingly, using a
dominant negative ALK1 form, the signal over *endoglin* promoter activity is blocked,
whereas a constitutively active ALK1 mutant increases *endoglin* promoter activity (Fig.
2B). However, the ALK1-dependent upregulation or down regulation of *endoglin*
promoter activity was not affected by TA, which reinforces the idea of a transcriptional
effect of TA at the promoter level.

3. Effect of TA on the ALK1/endoglin pathway

Given the enhancing effect of TA on endoglin and ALK1 expression, we analyzed the
possible consequence on the ALK1/endoglin pathway ((34); (33)). For this purpose, a
general TGF- β reporter derived from the PAI-1 promoter, (3TP-lux), and an
ALK1/endoglin specific endothelial reporter for (BRE-luc) were used. Both reporters

1
2
3 showed a significant increase of their activity after TA treatment of BOECs (Fig. 3).
4
5 However, while 3TP-lux activity slightly increased (~1.5-fold), the one of the BRE-luc
6
7 reporter, specific for the ALK1/endothelin pathway and affected in HHT patients, was
8
9 strongly stimulated (~4-fold).

10
11 In summary, TA seems to specifically stimulate the ALK1/endothelin pathway, though we
12
13 do not know the exact mechanism of this effect.

14 15 16 **DISCUSSION**

17
18
19 Epistaxis is the most common symptom in HHT patients, appearing in 90% of
20
21 them. Epistaxis shows up before the third decade of age, but patients normally worsen
22
23 with age and become very severe in 18% of the cases leading to anemia as well as to a
24
25 decrease in the patient's life quality (12). Different treatments have been assayed in the
26
27 past including cauterization, estrogen/progesterone treatment, the injection of sclerosing
28
29 agents, i.e. ethyblock, in the telangiectases, septodermoplastia, embolization or
30
31 radiotherapy, all of them with a limited and temporal efficiency ((22); (35); (36)), and
32
33 later (37) observed an increase in the fibrinolytic activity of the telangiectatic tissue,
34
35 which was mediated by an increase of the plasminogen activator.

36
37 From these observations, several authors began the use of antifibrinolytic drugs such as
38
39 aminocaproic acid initially, and TA later for the treatment of HHT patients (18); (19);
40
41 (20); (21). TA is an antifibrinolytic agent 10-fold more potent than aminocaproic acid
42
43 and with longer half life. Thus, it has been postulated that TA would act on HHT patients
44
45 by inhibiting the fibrinolysis on the wall of telangiectases, where there is an increase of
46
47 fibrinolytic activity, thus allowing fibrin to seal efficiently the bleeding points ((36); (37)).
48
49 The only contraindication would be in those patients prone to suffer thrombosis (23).

50
51 The reports of TA performance in HHT patients are not very abundant in literature and
52
53 the few known are dealing with very few patients, from 1 to 3. (20) reported the results
54
55 obtained in 3 HHT patients treated with 500mg-1g tranexamic every 6 hours. All of them
56
57 showed a significant decrease in the nose bleeds and the consequent increase in the
58
59 hemoglobin levels. None of them showed side effects derived from this treatment, nor
60
did they need any blood transfusion. (22) reported the control of a massive, life
threatening haemorrhage in an HHT patient, by oral administration of TA. (21) used
topic treatment with tranexamic in drops, 0.25 ml (100 mg/ml) after starting bleeding

1
2
3 episodes in a patient with severe epistaxis and anemia. The nose bleeds were
4 controlled and the levels of hemoglobin were normalized in this case.

5
6
7 The 14 patients included in the present study showed epistaxes interfering with their
8 quality of life. All of them improved significantly, decreasing the nose bleeds and
9 improving the levels of haemoglobin. The need for blood transfusions almost
10 disappeared in four patients depending on them before the treatment. None of the
11 patients showed side effects derived from the TA treatment. Therefore we can conclude
12 that at the doses applied, up to 1g/8h, TA is a safe treatment for HHT patients.

13
14
15
16
17 Given the good results obtained with the TA therapy, we have explored its mechanism
18 of action *in vitro*, namely, its effects on endoglin, ALK1 on the endothelial cells, since
19 little or nothing has been published so far, to the best of our knowledge. Since
20 haploinsufficiency is the general admitted origin for the HHT pathogenicity ((38); (39);
21 (40); (41)), we checked that TA can indeed increase the levels of endoglin and ALK1,
22 the affected proteins in HHT1 and HHT2, respectively.

23
24
25
26
27
28 Next, the TA effect was at the RNA level for endoglin and ALK1, as proven by real time
29 PCR in endothelial cells. Finally, the promoter/reporter experiments with ALK1 and
30 endoglin constructs showed that tranexamic is acting at transcriptional level, at least in
31 endothelial cells, observing in a two fold increase in the reporter constructs of both
32 promoters after TA stimulation.

33
34
35
36
37 In endothelial cells ALK1 cooperates with endoglin signalling through Smad 1/5 to the
38 nucleus (42). The use of a specific Smad1/5 reporter, BRE-luc, showed that TA was
39 stimulating preferentially the endothelial specific ALK1/endoglin pathway. Thus, the
40 conclusion is that TA, in addition to the described antifibrinolytic effects, may trigger an
41 increase in ALK1 and endoglin levels, and a consequent stimulation of the
42 ALK1/endoglin pathway, affected in HHT patients. The way how TA is able to stimulate
43 this pathway remains unknown.

44
45
46
47
48
49
50
51 **Conclusions:** TA is useful in the management of epistaxes in HHT patients, by
52 reducing the frequency and intensity of epistaxes. Pharmacologically, TA is an
53 antifibrinolytic drug, but we have shown here that it may have also other effects inside
54 the cells, via stimulation of the ALK1/endoglin pathway, leading to an increase of
55 endoglin and ALK1, two proteins decreased in HHT patients.

Acknowledgements: Authors are indebted to Dr. Calvin Vary and Jonathan Berg for kindly providing the pGL2 reporter encompassing ALK1 promoter. This work was supported by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Fondo de Investigación Sanitaria (PI020200) to CB and Ministerio de Educación y Ciencia (SAF05-01090 to LB and SAF2004-01390 to CB). Africa Fernandez-L is a predoctoral fellow of I3P CSIC. EG is a predoctoral fellow of Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

1. Shovlin CL, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* 1999;54:714-29.
2. Kjeldsen AD, Vase P, Green A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med* 1999;245:31-9.
3. Jessurun GA, Kamphuis DJ, van der Zande FH, Nossent JC. Cerebral arteriovenous malformations in The Netherlands Antilles. High prevalence of hereditary hemorrhagic telangiectasia-related single and multiple cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg* 1993;95:193-8.
4. Morales Angulo C, Megia Lopez R, del Valle Zapico A et al. [Rendu-Osler-Weber disease (hereditary hemorrhagic telangiectasia). Report of 30 cases]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997;48:625-9.
5. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8:345-51.
6. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 1996;13:189-95.
7. Gallione CJ, Pasyk KA, Boon LM, Lennon F, Johnson DW, Helmbold EA, et al. A gene for familial venous malformations maps to chromosome 9p in a second large kindred. *J Med Genet* 1995;32:197-9.
8. Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 2005;42:577-82.
9. Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 1989;32:291-7.
10. Perez del Molino A, Zarrabeitia R, Fernandez A. [Hereditary hemorrhagic telangiectasia]. *Med Clin (Barc)* 2005;124:583-7.
11. Morales-Angulo C, del Valle-Zapico A. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119:293.
12. OS AA, Friedman CM, White RI, Jr. The natural history of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 1991;101:977-80.
13. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI, Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 1995;333:918-24.
14. Morais D, Ramirez B, Santos J. [Local sclerosing treatment with etoxiesclerol in ORL disease: Rendu-Osler disease, granuloma, angioma...]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002;53:658-61.

15. Ramirez B, Morais D, Condado MA, Marcos M, Martin G, Poncela M. [A new sclerosant for the treatment of Rendu-Osler-Weber disease]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2000;51:36-9.
16. Escalante A, Pinzon A, Belloso E, Pozo A, Juan C. [Cobalt therapy in the treatment of Osler-Rendu disease. Apropos of two cases]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1988;39:57-9.
17. Urpegui AM, Abenia JM, Morandeira MJ, Alfonso JI, Dominguez LJ, Martinez J, et al. [Experimental microsurgery of the facial nerve: end-to-end suture versus approximated ends wrapped with masseter muscle aponeurosis]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1998;49:107-10.
18. Saba HI, Morelli GA, Logrono LA. Brief report: treatment of bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia with aminocaproic acid. *N Engl J Med* 1994;330:1789-90.
19. Annichino-Bizzacchi JM, Facchini RM, Torresan MZ, Arruda VR. Hereditary hemorrhagic telangiectasia response to aminocaproic acid treatment. *Thromb Res* 1999;96:73-6.
20. Sabba C, Gallitelli M, Palasciano G. Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001;345:926.
21. Klepfish A, Berrebi A, Schattner A. Intranasal tranexamic acid treatment for severe epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Intern Med* 2001;161:767.
22. Perez del Molino A, Zarrabeitia R, Fernandez A, Botella LM. [Efficacy of tranexamic acid in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia and massive epistaxis]. *Med Clin (Barc)* 2004;123:118-9.
23. Mannucci PM. Hemostatic drugs. *N Engl J Med* 1998;339:245-53.
24. Thorsen S. Differences in the binding to fibrin of native plasminogen and plasminogen modified by proteolytic degradation. Influence of omega-aminocarboxylic acids. *Biochim Biophys Acta* 1975;393:55-65.
25. Hoylaerts M, Lijnen HR, Collen D. Studies on the mechanism of the antifibrinolytic action of tranexamic acid. *Biochim Biophys Acta* 1981;673:75-85.
26. Verstraete M. Clinical application of inhibitors of fibrinolysis. *Drugs* 1985;29:236-61.
27. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 2000;91:66-7.
28. Sadick H, Naim R, Oulmi J, Hormann K, Bergler W. Plasma surgery and topical estriol: effects on the nasal mucosa and long-term results in patients with Osler's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:233-8.
29. Sanz-Rodriguez F, Fernandez-Lopez A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, et al. Mutation Analysis in Spanish Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Deficient Endoglin Up-regulation in Activated Monocytes. *Clin Chem* 2004.
30. Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, et al. Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* 2005;68:235-48.
31. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 1998;92:4677-90.
32. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A, Bernabeu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* 2001;276:34486-94.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
33. Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 2005;204:574-84.
34. Lebrin F GM, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, Dijke Pt P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO journal* 2004.
35. Byahatti SV, Rebeiz EE, Shapshay SM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: what the otolaryngologist should know. *Am J Rhinol* 1997;11:55-62.
36. Kwaan HC, Silverman S. Fibrinolytic activity in lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Dermatol* 1973;107:571-3.
37. Watanabe M, Hanawa S, Morishima T. [Fibrinolytic activity in cutaneous lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia]. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 1985;95:11-6.
38. Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1997;61:68-79.
39. Gallione CJ, Klaus DJ, Yeh EY, Stenzel TT, Xue Y, Anthony KB, et al. Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat* 1998;11:286-94.
40. Abdalla SA, Geisthoff UW, Bonneau D, Plauchu H, McDonald J, Kennedy S, et al. Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* 2003;40:494-502.
41. Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 2006;43:97-110.
42. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2005;65:599-608.

Figure Legends

Figure 1. Effect of tranexamic on expression of endoglin and ALK1 on the endothelial cell surface.

- A. Human Umbilical Endothelial Cells (HUVECs) were cultivated in the absence or presence of different amounts of TA from 0.5 mM to 10 mM for 24 h. Endoglin and PECAM were measured by flow cytometry.
- B. HUVECs were incubated in the absence or in the presence of 2 mM TA and the levels of endoglin, ALK1 and PECAM were measured after 24 h and compared with untreated cells. The results of the flow cytometry are expressed in fold induction levels. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.
- C. Blood Endothelial Outgrowth Cells (BOECs) were treated with 2 mM TA and the levels of endoglin, ALK1, and PECAM were measured after 24 h. The results of flow cytometry are expressed in fold induction with respect the untreated control.

Figure 2. Effect of TA on endoglin and ALK1 transcription

- A. Real time RT-PCR of endoglin and ALK1 in endothelial cells treated with TA. Endothelial Cells (HUVECs, BOECs, and HMECs) were treated with 2mM of TA for 24 h. Total RNA was extracted, retrotranscribed and amplified quantifying the number of ALK1 and Endoglin molecules of RNA compared to endogenous controls of 18S ribosomal RNA and GAPDH. The experiment was made in triplicates, and repeated for the three types of endothelial cells. The results shown are representative of all the tests performed.
- B. Effect of TA on endoglin and ALK1 promoter activity. BOECs were transiently transfected with a construction of endoglin promoter, pCD105(-450/+350), and a construct of ALK1 promoter in pGL2. Kinase dead ALK1 (ALK1-KR), constitutively active ALK1 (ALK1-QD) or empty expression vector (pcDNA3) were cotransfected, as indicated. Luciferase activity was measured in 2mM TA treated cells and expressed as fold induction with respect the untreated cells. In the cases

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

where TA leads to a significant induction, the fold number is shown above the bars.

Figure 3. Effect of TA on the TGF- β pathway in endothelial cells

BOECs were transiently transfected with two different reporters for the TGF- β pathway, the general TGF- β responsive 3TP-lux, and the ALK1/endoglin specific BRE-luc, in the presence or in the absence of 2mM TA. Reporter activity is expressed in relative luciferase units. All the experiments were made by triplicate and repeated at least 3 times. The results shown are a representative experiment. The figures on top of the bars represent fold induction over untreated cells.

For Peer Review

TABLE I Characteristics of the HHT patients

N°/Age/sex	Mutation	Previous treatments
1/47/M	Not found	None
2/80/M	ENG /HHT1	Cauterization, A/P package
3/69/M	ALK1/HHT2	Cauterization, A/P package
4/42/M	ALK1/HHT2	None
5/49/F	ALK1/HHT2	Cauterization, A/P package
6/47/F	ALK1/HHT2	None
7/59/M	ENG/HHT1	Cauterization, A/P package
8/45/F	ALK1/HHT2	None
9/78/F	ALK1/HHT2	None
10/41/F	ALK1/HHT2	None
11/49/V	ALK1/HHT2	None
12/48/V	END/HHT1	Cauterization, A/P package embolization
13/43/H	Not found	A/P package
14/50/V	ALK1/HHT2	None

M- male

F-female

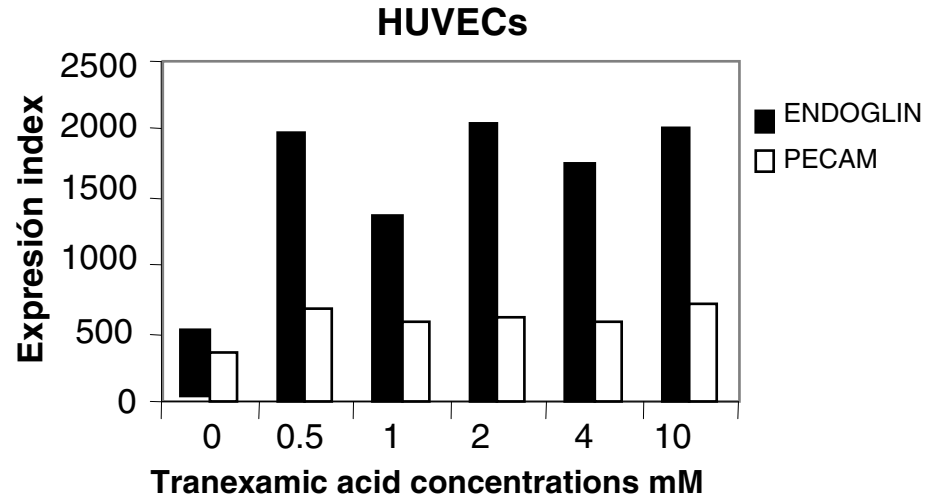
A/P Anterior/Posterior

TABLE II: Tranexamic acid treatment and its efficiency.

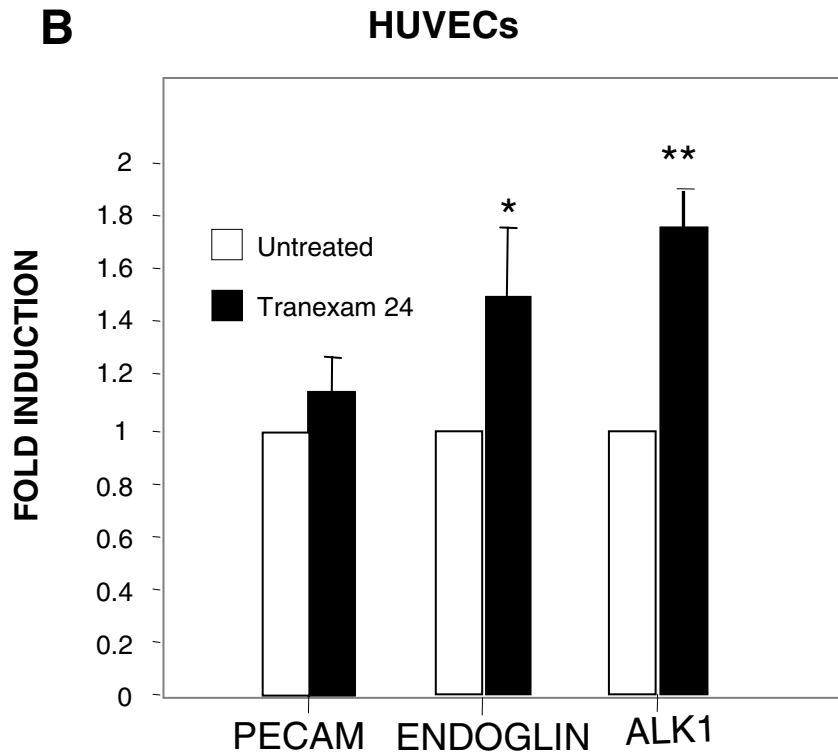
N°	Dose/type	Period of treatment	Previous transfusions	Posttreatment transfusions	Pretreatment epistaxis (I/F)*	Posttreatment epistaxis (I/F)*	Satisfaction
1	500mg/12h	2 m	NO	NO	III/II	I/I	II
2	500mg/8h	24 m	>5	<5	III/III	II/II	II
3	500mg/8h	25 m	<5	0	III/III	I/I	II
4	500/8h	2 m	NO	NO	II/II	I/I	II
5	1000mg/8h	16 m	<5	<5	III/II	II/II	III
6	500mg/8h	11m	<5	0	III/II	I/I	II
7	500mg/8h	12m	<5	<5	III/III	II/II	III
8	500mg/12h	4 m	NO	NO	II/II	I/I	I
9	500mg/12h	6 m	NO	NO	II/II	I/I	II
10	500mg/8h	4 m	NO	NO	II/II	I/I	II
11	500mg/8h	4m	NO	NO	II/II	I/I	II
12	500mg/8h	8m	NO	NO	III/III	II/II	II
13	1000/8H	5m	no	no	III/II	II/I	II
14	100/8H	12m	no	no	II/II	I/I	II

*I/F: Intensity/frequency, both according to Sadick et al. 2003

A



B



C

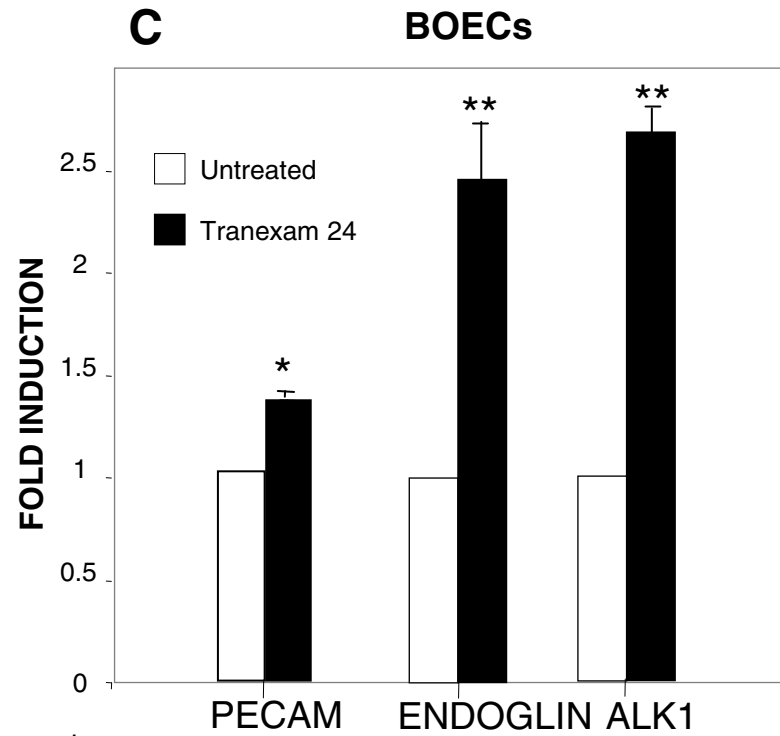
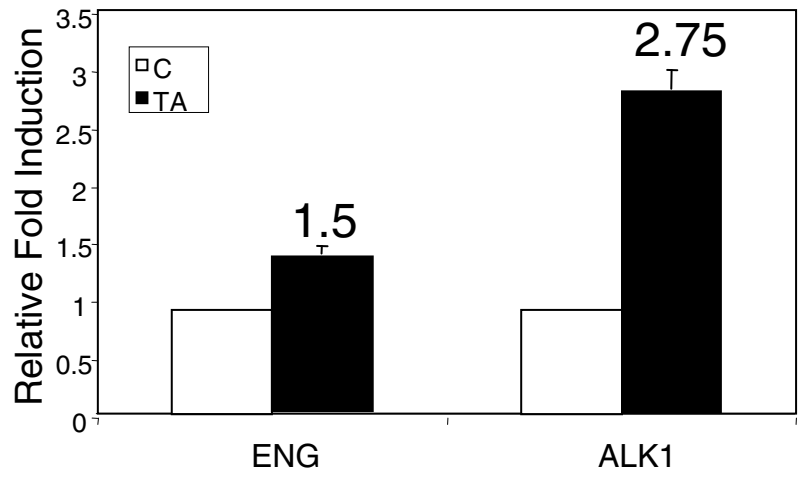


Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

A



B

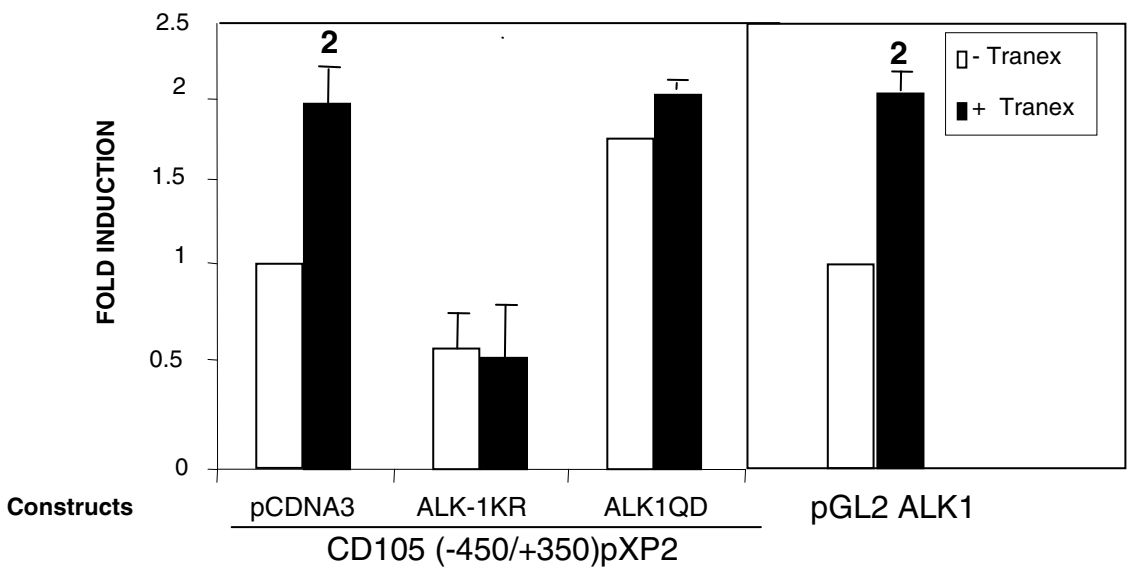


Figure 2

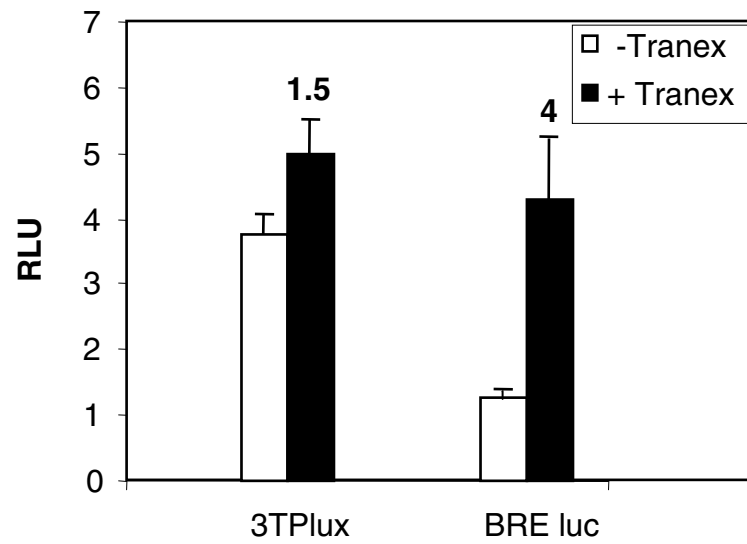


Figure 3



Muertes por golpe de calor en Cataluña

Sr. Editor: Nos gustaría mostrar nuestra conformidad con la carta al Editor recientemente publicada en su Revista por miembros del Servicio de Patología Forense del Instituto Vasco de Medicina Legal, en cuanto al valor epidemiológico y social de los datos recogidos en dicho servicio¹. De forma análoga, el Servicio de Patología Forense del Instituto de Medicina Legal de Cataluña (IMLC) se encarga de la práctica de las autopsias judiciales, es decir, de las autopsias ordenadas por la autoridad judicial en casos de muerte violenta o sospechosa de criminalidad, concepto este último que incluye las muertes de causa desconocida. También se realizan las autopsias de muerte presuntamente natural que no son certificadas por ningún médico. En dicho servicio se practican entre 4.500 a 5.000 autopsias anuales². Las conclusiones de dichas autopsias están fundamentadas en estudios *ante mortem*, la práctica de la autopsia propiamente dicha y estudios complementarios, que otorgan a las mencionadas conclusiones un alto grado de fiabilidad. Por otra parte, los datos obtenidos tienen un innegable valor epidemiológico, sanitario y social.

Durante el período estival del año 2003, fundamentalmente en Francia, se produjo una de las olas de calor con mayor mortalidad de los últimos años^{3,4}, que también afectó a España¹ y fue similar a la experimentada en otras épocas en algunos países⁵⁻⁷. Desde el 15 de julio al 21 de agosto de 2003 se confirmaron 5 fallecimientos por golpe de calor investigados en el IMLC. Para valorar adecuadamente este dato hay que tener en consideración 2 cuestiones: en primer lugar, que no se incluyen las muertes en cuyo mecanismo de producción el calor pudo tener una influencia indirecta, por ejemplo, agravando enfermedades de base, y en segundo lugar, que esta cifra corresponde exclusivamente a las autopsias practicadas por orden judicial y no incluye, por lo tanto, los fallecimientos que no requieren investigación médico-legal. Los 5 casos cumplían los criterios diagnósticos aceptados internacionalmente⁸ y, además de la autopsia, se realizaron estudios toxicológicos e histopatológicos para confirmar el diagnóstico y descartar otras causas de muerte. Se trataba de 3 varones mayores de 50 años y de 2 mujeres de 34 y 78 años. Un varón murió en Badalona, otro en Girona y el tercero en Lleida; la mujer más joven murió en Barcelona, y la anciana, en Tarragona. Dos varones eran obesos y una mujer seguía tratamiento con fármacos antidepresivos, como factores coadyuvantes al golpe de calor descritos en la bibliografía⁹.

En términos estrictamente médico-legales, entendemos que la cifra tiene indudable relevancia, en la medida en que confirma al IMLC como fuente fiable de datos con valor epidemiológico y estadístico en materia de causas de muerte. De hecho, son muchos los países en los que existe relación directa en el tratamiento de datos entre las autoridades sanitarias y los responsables de las instituciones equivalentes a nuestro IMLC. En esta línea, en la ciudad de Barcelona algunos datos son recogidos por el Servicio de Epidemiología de la Agencia de Salud Pública del Ayuntamiento, y

en nuestra comunidad autónoma los datos comunicados por el Departament de Sanitat i Seguretat Social en relación con la ola de calor del verano de 2003 partieron, entre otros, de las estadísticas del Servicio de Patología Forense del IMLC.

Por lo tanto, consideramos muy necesario que se arbitren mecanismos rápidos y eficaces de transferencia de información desde los institutos de medicina legal a las autoridades sanitarias locales, en cada comunidad autónoma y también en el conjunto del Estado. Son muchos los casos en el ámbito internacional en que esta transferencia de datos ha repercutido favorablemente en el control y en la prevención de enfermedades. De hecho, en muchos países, entre ellos EE.UU., los datos procedentes de los servicios médico-forenses adquieren máxima relevancia en materia diagnóstica y preventiva y existe canal directo de transmisión de información entre el sistema forense y el preventivo-asistencial¹⁰, situación, por otra parte, del todo lógica si tenemos en cuenta que determinados tipos de muerte se estudian exclusivamente en el ámbito médico-legal.

Josep Castellà, Amadeu Pujol y Josep Arimany

Servei de Patologia Forense. Institut de Medicina Legal de Catalunya. Departament de Justícia. Generalitat de Catalunya. Barcelona. España.

1. Morentín B, Alcaraz R. Mortalidad por golpe de calor en medicina forense. Implicaciones epidemiológicas. *Med Clin (Barc)* 2003;121:796-7.
2. Memòria de l'any 2002 de l'Institut de Medicina Legal de Catalunya. Barcelona: Departament de Justícia. Generalitat de Catalunya, 2003.
3. Belmin J. Les conséquences de la vague de chaleur d'août 2003 sur la mortalité des personnes âgées. Un premier bilan. *Presse Med* 2003;32:1591-4.
4. Mégarbane B, Résière D, Shabafrouz K, Duthoit G, Delahaye A, Delerme S, et al. Étude descriptive des patients admis en réanimation pour coup de chaleur au cours de la canicule d'août 2003. *Presse Med* 2003;32:1690-8.
5. Katsouyanni K, Trichopoulos D, Zavitsanos X, Touloumi G. The 1987 Athens heat wave. *Lancet* 1988;2:573.
6. Jiménez-Mejías ME, Montaña Díaz M, Villalonga J, Bollain Tienda E, López Pardo F, Pineda JA, et al. Golpe de calor clásico en España. Análisis de una serie de 78 casos. *Med Clin (Barc)* 1990;94:481-6.
7. Mirchandani HG, McDonald G, Hood IC, Fonseca C. Heat-related deaths in Philadelphia-1993. *Am J Forensic Med Pathol* 1996;17:106-8.
8. Donoghue ER, Graham MA, Jentzen JM, Lifschultz BD, Luke JL, Mirchandani HG. Criteria for the diagnosis of heat-related deaths: National Association of medical examiners. Position Paper. *Am J Forensic Med Pathol* 1997;18:11-4.
9. Gómez Huelgas R, San Román Terán CM. Golpe de calor. *Med Clin (Barc)* 1990;94:494-8.
10. Centers for Disease Control. Medical Examiner/Coroner information-sharing program. *Am J Forensic Med Pathol* 1989;10:88-9.



Eficacia del ácido tranexámico en un paciente con telangiectasia hemorrágica hereditaria y epistaxis masiva

Sr. Editor: La enfermedad de Rendu-Osler-Weber o telangiectasia hemorrágica hereditaria es un trastorno genético autosómico dominante que consiste en displasia vascular y cursa

con epistaxis, telangiectasias mucocutáneas y malformaciones arteriovenosas viscerales¹. Se han descrito mutaciones en 2 genes como responsables directas de la enfermedad, el gen de la endogлина y el gen de ALK-1, lo que ha permitido subdividir la enfermedad en telangiectasia hemorrágica hereditaria 1 y telangiectasia hemorrágica hereditaria 2, respectivamente. Las epistaxis son la manifestación más frecuente. Son recurrentes y ocasionan anemia, con frecuencia grave, que requiere en ciertos casos múltiples transfusiones². No existe acuerdo sobre el tratamiento más adecuado y se han utilizado la cirugía, laserterapia, escleroterapia, embolizaciones arteriales y fármacos por vía tópica y sistémica². Entre estos últimos se encuentran los fármacos antifibrinolíticos^{3,4}, de los cuales es el ácido tranexámico con el que más experiencia se cuenta. Su uso se basa en el aumento demostrado por Kwaan y Silverman⁵ de la concentración del activador tisular del plasminógeno en las paredes de los vasos telangiectásicos de los pacientes con telangiectasia hemorrágica hereditaria.

Comunicamos el caso de un paciente diagnosticado de telangiectasia hemorrágica hereditaria 1, que ingresó en nuestro centro por anemia aguda sintomática por epistaxis grave no controlada, con taponamientos nasales anteriores repetidos, la cual se resolvió con la administración oral de ácido tranexámico.

Varón de 81 años, con antecedentes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica grave, ingresado por primera vez en nuestro hospital a los 73 años y al que se le diagnosticó de telangiectasia hemorrágica hereditaria definitiva al cumplir los 4 criterios de Curaçao⁶: epistaxis frecuentes desde los 40 años, telangiectasias en labios, mucosa oral y nasal, telangiectasias gastrointestinales e historia familiar (padre y 2 hijos de 5 afectados). En marzo de 2003 se le realizó un estudio genético que puso de manifiesto una mutación en el exón 4 del gen de la endogлина (cromosoma 9), que lleva a un cambio del aminoácido normal arginina por un *stop-codón*, con terminación prematura de la proteína (endogлина).

Hasta abril de 2003 había ingresado en 10 ocasiones por problemas relacionados con su enfermedad, 9 de ellas por epistaxis, que requirió taponamientos anteriores y posteriores, con anemia grave, y un ingreso por un emiema subdural que se resolvió con tratamiento médico. Durante este tiempo precisó la transfusión de 51 unidades de concentrado de hematíes para mantener un hemoglobina de 100 g/l.

Ingresó en abril de 2003 por epistaxis que condicionó una anemia grave (hemoglobina de 38 g/l). A pesar de taponamiento anterior y posterior, ésta no se controló y fue precisa la transfusión de 8 unidades de concentrado de hematíes en 7 días, con lo que se consiguió que la hemoglobina sólo ascendiera a 50 g/l. Además, se produjo un deterioro de la función respiratoria y el paciente desarrolló insuficiencia renal moderada (creatinina en plasma: 3,5 mg/dl) por problemas de hidratación oral. Al séptimo día de ingreso se inició tratamiento con ácido tranexámico a dosis de 1 g cada 12 h por vía oral, con lo que se consiguió el cese de la epistaxis. Esto permitió retirar el taponamiento, con mejoría de la situación respiratoria y normalización de la creatinina plasmática. Se le dio de alta 7 días después con un valor de hemoglobina de 85 g/l tras transfundir 4 unidades de concentrado de hematíes más, y con una dosis de ácido tranexámico de 1 g cada 8 h por vía oral.

Posteriormente las epistaxis han disminuido y ha precisado 10 unidades de concentrado de hematíes durante el período comprendido entre abril de 2003 y febrero de 2004.

El interés del presente caso radica en que el ácido tranexámico por vía oral fue capaz de controlar una epistaxis grave, que no cedía con taponamientos anteriores y que puso en riesgo la vida del paciente. Destaca su rapidez de acción, hecho ya constatado por Saba et al³

con el ácido aminocaproico. Pero no todos los autores están de acuerdo en la eficacia de los antifibrinolíticos para el tratamiento de las epistaxis en los pacientes con telangiectasia hemorrágica hereditaria, y se han descrito fracasos con ácido ϵ -aminocaproico⁷. La razón puede ser que éste es 10 veces menos potente que el ácido tranexámico y tiene una vida media más corta. Klepfish et al⁸ han tratado con éxito epistaxis graves usando el ácido tranexámico por vía tópica. Son necesarios estudios más extensos que puedan definir qué tipo de pacientes con telangiectasia hemorrágica hereditaria pueden beneficiarse del uso del ácido tranexámico y cuál es su posición en el tratamiento de la hemorragia en estos pacientes.

En cualquier caso, creemos que el ácido tranexámico es una opción válida para el tratamiento de la hemorragia aguda que ponga en riesgo la vida de estos pacientes.

Alfonso Pérez del Molino^a, Roberto Zarrabietia^a,
África Fernández^a y Luisa María Botella^b

^aUnidad de HHT. Servicio de Medicina Interna. Hospital Sierrallana. Torrelavega. Cantabria. España. ^bCentro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid. España.

- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 1995;333:918-24.
- Begbie ME, Wallace GMF, Shovlin CC. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): a view from the 21st century. *Postgrad Med J* 2003;79:18-24.
- Saba HI, Morelli GA, Logrono LA. Treatment of bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia with aminocaproic acid. *N Engl J Med* 1994;330:1789-90.
- Sabbá C, Gallitelli M, Pascaliano G. Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001;345:926.
- Kwaan HC, Silverman S. Fibrinolytic activity in lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Dermatol* 1973;107:571-3.
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 2000;91:66-7.
- Korzenik JR, Topazian MD, White R. Treatment of bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia with aminocaproic acid. *N Engl J Med* 1994;331:1236.
- Klepfish A, Berrebi A, Schattner A. Intranasal tranexamic acid treatment for severe epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Intern Med* 2001;161:767.



Prevalencia de los anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos con patrón perinuclear (pANCA) en la enfermedad inflamatoria intestinal

Sr. Editor: En el estudio de Gisbert et al¹ sobre el valor de los anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos de patrón perinuclear (pANCA) en el diagnóstico de la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), publicado recientemente en *MEDICINA CLÍNICA*, llama la atención la baja prevalencia (8,3%) en que se presentan los pANCA en los pacientes con CU estudiados, mucho más baja que la descrita previamente por otros autores²⁻⁴, incluso en otras publicaciones sobre series españolas⁵⁻⁷.

A la vista de estos resultados, discordantes con otros previos, que muestran una prevalencia media de los pANCA del 55%⁸, planteamos calcular cuál es la prevalencia de este marcador en nuestros pacientes diagnosticados de enfermedad inflamatoria intestinal crónica. En la Fundación Hospital de Alorcón se atiende a una población de referencia de 220.000 habitantes. En nuestra consulta monográfica de enfermedad inflamatoria intestinal crónica se visita a 300 pacientes, diagnosticados de EC, CU o colitis indeterminada. Hemos determinado la positividad de pANCA en 72 pacientes: 38 pacientes con CU (un 40% varones), 32 con EC (un 36% varones) y 2 colitis indeterminadas (CI) (un varón y una mujer).

La prevalencia global fue del 8,3%. En los pacientes con CU la prevalencia fue del 10,5%, y en la EC, del 6,2%. Ninguno de los 2 pacientes con colitis indeterminada mostró positividad para dichos anticuerpos.

La sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de los pANCA para el diagnóstico de CU (frente a EC) fueron, respectivamente, del 10,5, el 93, el 66 y el 46%. Por otro lado, el cociente de probabilidades positivo de los pANCA para el diagnóstico de CU (frente a EC) fue 1,7.

Estos datos vienen a confirmar una baja prevalencia de estos marcadores en pacientes diagnosticados de CU en nuestra área geográfica y corroboran los resultados del estudio de Gisbert et al. La determinación de los pANCA parece por tanto de baja utilidad para la exclusión del diagnóstico de CU en pacientes con

sospecha clínica de esta enfermedad, ya que no posee un valor predictivo negativo suficientemente elevado. Tampoco es útil en el caso del diagnóstico diferencial con la EC.

Por lo tanto, en los pacientes con síntomas compatibles con enfermedad inflamatoria intestinal crónica, sólo la anamnesis, y no el resultado de estos anticuerpos, deberá servirnos de guía para la realización de exploraciones endoscópicas, radiológicas e histológicas que nos confirmen esta enfermedad.

Pilar López Serrano, Cecilio Santander
y Conrado Fernández Rodríguez

Servicio de Digestivo. Fundación Hospital de Alorcón.
Alorcón. Madrid. España.

- Gisbert JP, Luna M, Legido J, Herminda C, Matgé J, Pajares JM. Papel de los anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos en el diagnóstico de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. *Med Clin (Barc)* 2004;122:134-5.
- Castellino F, Rosina F, Bansi DS, Bauducci M, Touscoz GA, Giorda L, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease: do they recognize different subsets of a heterogeneous disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:859-64.
- Oudkerk Pool M, Bouma G, Meuwissen SG, Von Blomberg BM, Van de Merwe JP, Deville WL, et al. Serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Pathol* 1995;48:346-50.
- Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuisink ZM, Bakker-Jonges LE, Van de Merwe JP, Hooijkaas H, et al. Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1013-8.
- García Herola A, Nos Mateu P, Ponce García J. Anticuerpos frente al citoplasma de los neutrófilos (ANCA) en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 2000;23:16-23.
- García Herola A, Nos P, Hinjosa J, Hoyos M, Moles JR, Carmona E, et al. HLA antigens and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2003;95:760-4.
- Esteve M, Mallolas J, Klaassen J, Abad-Lacruz A, González-Huix F, Cabré E, et al. Factors related to the presence of IgA class antineutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:615-8.
- Gisbert JP, Gomollón F, Maté J, Pajares JM. Papel de los anticuerpos anti-citoplasma de los neutrófilos (ANCA) y anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:312-24.

Telangiectasia hemorrágica hereditaria

Alfonso Pérez del Molino^a, Roberto Zarrabeitia^a y África Fernández^b

^aUnidad de telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT). Servicio de Medicina Interna. Hospital Sierrallana. Torrelavega. Cantabria. España.

^bCentro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid. España.

La telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), o síndrome de Rendu-Osler-Weber, es una enfermedad genética con transmisión autosómica dominante. Su prevalencia se estima en un paciente por 5-8.000 habitantes. Se han descrito mutaciones en 2 genes (gen de la endoglin y de ALK-1), y pueden distinguirse 2 tipos según el gen mutado: HHT 1 y HHT 2, respectivamente. Se caracteriza por la aparición de episodios espontáneos y repetidos de epistaxis, telangiectasias y malformaciones arteriovenosas viscerales (principalmente en el pulmón, el hígado, el cerebro y el aparato digestivo), que son las responsables de sus manifestaciones clínicas y la base de los criterios de Curaçao, con los que se realiza el diagnóstico de la HHT.

En este artículo se revisan la patogenia y las manifestaciones clínicas de esta rara enfermedad, así como los protocolos de cribado de las lesiones viscerales y las opciones terapéuticas de las que disponemos en la actualidad.

Palabras clave: Telangiectasia hemorrágica hereditaria. Malformaciones arteriovenosas.

Hereditary hemorrhagic telangiectasia

Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) or Rendu-Osler-Weber disease is a genetic disorder with a dominant autosomic transmission. Its prevalence is estimated in one in 5-8,000 individuals. Two different mutations have been described involving endoglin and ALK-1 genes, resulting in HHT type 1 and 2 respectively. It is characterized by the occurrence of spontaneous and recurrent episodes of epistaxis, telangiectasias and the presence of visceral arteriovenous malformations (mainly affecting lungs, liver, brain and digestive tract) which are responsible for the clinical manifestations and constitute a basic point in the diagnostic criteria of Curaçao.

The aim of this article is to review the pathogenesis, clinical aspects, screening procedures to disclose the visceral involvement and the therapeutic options of this rare disease.

Key words: Hereditary hemorrhagic telangiectasia. Arteriovenous malformations.

La telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), o síndrome de Rendu-Osler-Weber, es una enfermedad genética con transmisión autosómica dominante, penetrancia relacionada con la edad y con una importante variabilidad en las manifestaciones clínicas entre los individuos afectados, incluso entre pacientes de la misma familia¹. Esta entidad está considerada como enfermedad rara. Su prevalencia varía según la región geográfica que se considere. Así, se encuentran prevalencias de 19,4 casos por 100.000 habitantes en las Antillas Holandesas², 15,6 por 100.000 en Fyn, Dinamarca³, 12,5 por 100.000 en la región de Ain, Francia⁴, 6,1 por 100.000 en Vermont, Estados Unidos⁴, y 2,5 por 100.000 en Newcastle, Inglaterra⁶. En nuestro país, Morales et al⁷ estiman una prevalencia de 8,2 por 100.000 en Cantabria. To-

dos los estudios se encuentran con la dificultad de la variabilidad clínica de esta enfermedad, por lo que las cifras reseñadas infravaloran la prevalencia verdadera.

Descrita por primera vez por Sutton en 1864, es Rendu⁸ en 1896 quien la reconoce como una enfermedad con entidad propia. Posteriormente, Osler⁹, en 1901, y Weber¹⁰, en 1907, publican las primeras series de casos. En 1909, Hanes¹¹ le da el nombre de HHT.

En un principio se la consideró una enfermedad benigna, que sólo cursaba con epistaxis y hemorragias gastrointestinales. Pero en la década de los cuarenta se comenzó a describir la presencia de malformaciones arteriovenosas en el pulmón, el cerebro y el hígado. En la actualidad, la aplicación de programas de cribado demuestra la presencia de estas malformaciones en un alto porcentaje de casos.

Estas malformaciones causan una morbimortalidad no desdeñable. En un estudio de Kjeldsen et al³, realizado en una población danesa, se demuestra que la mortalidad en los pacientes con HHT menores de 60 años es el doble de la esperada.

En el momento actual, ya están establecidas estrategias en el diagnóstico y al tratamiento de estos pacientes, y hay grupos de trabajo distribuidos por todo el mundo formados en el manejo de la HHT, uno de ellos recientemente creado en nuestro hospital (se puede obtener información en la página web www.HHT.org). Por ello, es importante que los clínicos reconozcan esta enfermedad y sus consecuencias, y sepan buscar la mejor solución para estos pacientes. Éste es el objetivo de esta revisión.

Hallazgos fisiopatológicos

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad están causadas por anomalías de la pared vascular. Podemos encontrar dos tipos de lesiones: telangiectasias y malformaciones arteriovenosas. Las primeras están distribuidas principalmente por la piel y las mucosas. En fases iniciales son dilataciones de las vénulas poscapilares, que muestran irregularidades en las capas de colágeno y elastina, con áreas adelgazadas de la pared. Además, se observa un infiltrado de células mononucleares, fundamentalmente linfocitos, en el espacio perivascular. En las telangiectasias desarrolladas, las vénulas están claramente dilatadas y a menudo se conectan directamente con las arteriolas, también dilatadas¹². Son estructuras muy frágiles, que se rompen con facilidad ante traumatismos leves, y se ha especulado sobre la posibilidad de que algún proceso inflamatorio desempeñe algún papel en estas roturas¹³.

Las malformaciones arteriovenosas se encuentran en distintos órganos, principalmente el pulmón, el cerebro y el hígado, y tienen unas características similares a las telangiectasias, pero de un tamaño mayor.

Genética y transmisión

La herencia no está ligada al sexo y es autosómica dominante, por lo que cada descendiente de una persona afectada tiene el 50% de posibilidades de padecer la enfermedad. Hasta el momento se han identificado dos genes implicados

África Fernández está becada por el proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) n.º PI020200.

Correspondencia: Dr. A. Pérez del Molino. Hospital Sierrallana. Barrio Ganzo, s/n. 39300 Torrelavega. Cantabria. España. Correo electrónico: ssetienb@meditex.es

Recibido el 30-7-2004; aceptado para su publicación el 21-10-2004.

en el desarrollo de la HHT, que permiten clasificarla en dos tipos: HHT 1 y HHT 2. En el primero el gen afectado se localiza en el cromosoma 9¹⁴ y codifica para una proteína transmembrana denominada endogлина. Esta se expresa especialmente en las células endoteliales, aunque también se encuentra en menor cantidad en los macrófagos y en las células de la musculatura lisa. La endogлина es capaz de unirse a los componentes del complejo receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), que modula multitud de respuestas celulares, entre ellas la angiogénesis y los procesos de diferenciación. En la HHT 2 la alteración se sitúa en el cromosoma 12¹⁵, que codifica para el receptor de actividad tipo cinasa 1 (ALK-1), y que forma parte del complejo receptor TGF-β. Están descritas 160 mutaciones en el gen de la endogлина y 105 en el de ALK-1, y su mecanismo de actuación es la haploinsuficiencia. Nuestro grupo ha estudiado 20 familias, y se han detectado 5 mutaciones para endogлина y 7 para ALK-1.

Se ha postulado la presencia de un tercer tipo de HHT (HHT 3) para explicar la existencia de pacientes con criterios clínicos de la enfermedad, en los cuales no se han detectado mutaciones en los genes mencionados, pero ello está en periodo de investigación¹⁶. En la mayoría de los laboratorios, el porcentaje de hallazgo de estas mutaciones en pacientes con HHT oscila entre el 80 y el 90%.

En cuanto a la correlación fenotipo-genotipo, las malformaciones arteriovenosas pulmonares son más frecuentes en la HHT 1 y presentan cuadros clínicos más graves que la HHT 2, pero todavía se cuestiona si esto puede tener implicaciones en la aplicación de los programas de cribado¹⁷.

Tanto el estudio de mutaciones como otras técnicas genéticas en ensayo (determinación de concentraciones de endogлина soluble, TGF-β, Smad 2 y Smad 3 en sangre periférica) no forman parte, por el momento, de los criterios diagnósticos de la enfermedad y deben ser considerados en el contexto de cuadros clínicos compatibles. En este último caso, la realización de pruebas genéticas favorecerá la detección de sujetos afectados en una familia y evitará la aplicación de programas de cribado indiscriminados a sus miembros, lo que justifica el coste-efectividad de dicha realización.

Manifestaciones clínicas y manejo

Criterios diagnósticos

Un comité de expertos se reunió en el año 1999 en la isla de Curaçao y definió los criterios diagnósticos de la HHT, actualmente vigentes (conocidos como criterios de Curaçao)¹⁸ (tabla 1).

TABLA 1

Criterios de Curaçao*

Criterios diagnósticos:

1. Epistaxis, que deben ser espontáneas y recurrentes
 2. Telangiectasias, múltiples y en sitios característicos: labios, cavidad oral, dedos, nariz
 3. Lesiones viscerales características en:
 - Telangiectasias gastrointestinales (con o sin sangrado)
 - Malformaciones arteriovenosas pulmonares
 - Malformaciones arteriovenosas hepáticas
 - Malformaciones arteriovenosas cerebrales
 - Malformaciones arteriovenosas espinales
 4. Historia familiar, con un descendente de primer grado diagnosticado de HHT de acuerdo con estos criterios
- El diagnóstico de HHT es:
- Definitivo, si se cumplen 3 o más criterios
 - Posible, si se cumplen 2 criterios
 - Poco probable, si se cumplen menos de 2 criterios

* Todos los descendientes de un individuo con HHT tienen riesgo de tener la enfermedad debido a que ésta puede no manifestarse hasta épocas tardías de la vida. Si hay alguna duda sobre la presencia de signos físicos de HHT, se debe consultar a un clínico experto. Deben descartarse alteraciones de la coagulación.
HHT: telangiectasia hemorrágica hereditaria.

Epistaxis

Es el síntoma más frecuente, ya que lo refiere más del 90% de los pacientes¹⁹. Se inicia en edades tempranas –el 46% a los 10 años, el 70% a los 20 y el 100% a los 40 años– y suele aumentar en frecuencia e intensidad con el incremento de la edad²⁰. Esta última es variable: hay pacientes con epistaxis esporádicas y de escasa cuantía y otros con epistaxis muy graves, que precisan transfusiones de sangre repetidas²¹. Esta variabilidad también la encontramos en distintas etapas de la vida de un paciente; se ha descrito su presencia en relación con la pubertad o el embarazo^{22,23}.

Se han usado distintos tratamientos, ninguno plenamente satisfactorio. Así, se ha utilizado la cirugía (dermoplastia septal a veces con turbinectomía), la ablación local de las telangiectasias con distintos tipos de láser, la escleroterapia, la embolización arterial y los tratamientos locales y sistémicos con estrógenos y antifibrinolíticos²³. En general, todos suelen obtener una mejoría transitoria, volviendo a aparecer las epistaxis con el tiempo. Shah et al²¹ proponen el uso de láser Nd:YAG para las epistaxis leves o moderadas, y es necesaria la dermoplastia septal en casos graves. Bergler et al²⁴ obtienen mejores resultados si la ablación con láser de argón en plasma se continúa con la administración local de una pomada de estrógenos. Por último, se han comunicado 2 casos aislados de buena respuesta con la administración sistémica de antifibrinolíticos (fundamentalmente ácido tranexámico)²⁵, que nosotros hemos comprobado en 2 pacientes²⁶.

Telangiectasias mucocutáneas

Suelen aparecer entre 5 y 20 años después de las epistaxis y tienden a aumentar en número con la edad. Los sitios más comunes de localización son las palmas de las manos, el lecho ungueal, los labios, la lengua y la cara²⁷. Se han demostrado alteraciones de los capilares del lecho ungueal mediante capilaroscopia. En un estudio de 54 pacientes con HHT mediante esta técnica se observaron capilares aberrantes en el 87%²⁸. Más interesante es el dato de que 9 casos sin telangiectasias cutáneas visibles presentaban anomalías en la capilaroscopia. Esto indica que puede ser una herramienta de ayuda en el diagnóstico de los casos, sobre todo en niños, que comiencen con epistaxis pero que todavía no han desarrollado las telangiectasias mucocutáneas. Estas lesiones pueden sangrar, habitualmente en escasa cuantía. Su tratamiento está indicado por motivos estéticos, y puede utilizarse la ablación local con láser²⁹.

Malformaciones arteriovenosas pulmonares

La frecuencia de estas lesiones varía entre el 15 y el 33%^{30,31} y, a su vez, el 70% de los pacientes con malformaciones arteriovenosas pulmonares (MAVp) están afectados de HHT³². Suelen ser múltiples y se localizan fundamentalmente en dos lóbulos inferiores. Pueden aparecer a cualquier edad de la vida –se han descrito casos en recién nacidos³³– y aumentar de tamaño con el paso del tiempo³⁴. Esto último es especialmente evidente en el embarazo, período en el que se han descrito hemorragias fatales. Las principales consecuencias clínicas son de tres tipos²³:

- Hipoxemia, como consecuencia del aumento del cortocircuito derecha-izquierda pulmonar, lo que produce la aparición de disnea, cianosis y policitemia.
- Embolias paradójicas sistémicas, sobre todo en la circulación cerebral, con la producción de abscesos y accidentes isquémicos cerebrales.
- Hemoptisis y hemotórax por rotura de las MAVp. Esto es poco frecuente.

Aproximadamente la mitad de los pacientes están sintomáticos y en el 25% las manifestaciones neurológicas son el primer síntoma¹. La mortalidad de las MAVp sintomáticas y no tratadas oscila entre el 4 y el 22%, y en casos graves en más del 40%¹. Por otro lado, ya disponemos de tratamientos eficaces para evitar que se conviertan en sintomáticas. Por ello, es importante realizar programas de cribado para diagnosticar y tratar estas lesiones.

Para ello, se emplean pruebas no invasivas que, en caso de ser positivas, se confirman con una arteriografía pulmonar. Estas pruebas deben realizarse a todos los pacientes con el diagnóstico probable o definitivo de HHT, ya que en el primer supuesto la demostración de las MAVp confirmarían el diagnóstico. Así ocurrió en 8 casos de una serie de 56 pacientes de una población italiana³⁰.

Entre las pruebas de cribado utilizamos la radiografía de tórax, la gasometría respirando aire ambiente en decúbito y tras 10 min en supino (al ser las MAVp más frecuentes en los lóbulos pulmonares inferiores, se puede observar una disminución de la pO₂, fenómeno conocido como ortodeoxia)³⁴, y la gasometría respirando O₂ al 100% durante 20 min. Esta última se considera patológica cuando la pO₂ es de menos de 500 mmHg o cuando obtenemos una diferencia alvéolo-arterial de O₂ menor de 175 mmHg. Las pruebas gasométricas se pueden sustituir por la pulsioximetría, sobre todo en niños, aunque su sensibilidad es menor³⁴.

Otra prueba de cribado que ha alcanzado gran preponderancia es el ecocardiograma transtorácico con contraste³⁴⁻³⁶. Se inyecta suero salino agitado en una vena periférica y la aparición de burbujas en las cavidades derechas de forma tardía indica la presencia de MAVp. Su sensibilidad está cercana al 100%^{34,36}. En ocasiones, los pacientes con un ecocardiograma positivo no presentan MAVp demostrables en la arteriografía pulmonar. Se cree que éstas sí existen, pero son demasiado pequeñas para ser observadas con esta última prueba^{2,36,37}. Esto también se ha comprobado en pacientes con MAVp tratadas con éxito con embolizaciones, y que a pesar de ello persiste el ecocardiograma positivo³⁶. Algunos autores opinan que esta prueba debe ser la primera que debe utilizarse en el programa de cribado.

El papel de la tomografía computarizada (TC) helicoidal no está claro. Puede ser útil en algunas situaciones antes de realizar la arteriografía pulmonar (v. algoritmo propuesto por Kjeldsen et al³⁴).

El tratamiento de elección es la embolización^{1,23}. Debe realizarse en todas las MAVp mayores de 3 mm³². Pueden utilizarse *coils* (espirales) o balones inflables, aunque los mejores resultados se han obtenido con los primeros¹. Esta técnica consigue oclusiones inmediatas en el 90-100% de los casos, y pueden volver a aparecer por recanalizarse con el paso del tiempo³⁷, persistiendo en un 85% de los casos al año de su realización³⁶. Las complicaciones son raras y poco importantes en manos expertas. Así, en una serie de 349 embolizaciones con *coils* realizadas a 134 pacientes, la más frecuente fue el dolor torácico en 14 pacientes, seguido de accidentes vasculares isquémicos en 3 pacientes, embolización sistémica del *coil* en dos y angor en un paciente³⁷.

Otra posibilidad terapéutica es la cirugía en caso de que fracase la embolización¹. Se ha utilizado el trasplante pulmonar en un caso de afección difusa, con buenos resultados³⁹. Por último, dado el riesgo aumentado de abscesos cerebrales en estos pacientes, debe realizarse una profilaxis antibiótica antes de las manipulaciones dentales o instrumentales^{1,23}. Nosotros utilizamos una pauta similar a la de las profilaxis para la endocarditis infecciosa. Ésta debe utilizarse incluso si el paciente ha sido tratado con éxito^{1,38}, por las consideraciones antes mencionadas.

Telangiectasia hemorrágica hereditaria e hipertensión pulmonar primaria

Se ha descrito la asociación de estas entidades, fundamentalmente en pacientes con mutaciones en ALK-1 (HHT 2)⁴⁰, habiéndose comunicado sólo 1 caso con mutación en endoglin (HHT 1) y uso concomitante de dexfenfluramina⁴¹. Por este motivo, es conveniente estimar la presión pulmonar cuando se realice el ecocardiograma en los pacientes con HHT como prueba de cribado para MAVp.

Malformaciones vasculares en el sistema nervioso central

Se estima una frecuencia entre el 9 y el 23% de estas malformaciones vasculares (MVsn) en pacientes con HHT^{30,31,42,43}. Pueden estar presentes desde el nacimiento⁴⁴. Se ha descrito distintos tipos de lesiones: malformaciones arteriovenosas, telangiectasias, malformaciones venosas y aneurismas. Con frecuencia son múltiples y puede haber distintos tipos en un mismo paciente^{42,43,45}. Las podemos encontrar tanto en el cerebro como en la médula espinal²⁰. Las manifestaciones clínicas que pueden producir son varias (cefalea, epilepsia y accidentes vasculares isquémicos o hemorrágicos), aunque la mayoría de los pacientes están asintomáticos. Así, Willemse et al⁴³ en su serie de 24 pacientes con HHT y MVsn encontró un 46% asintomáticos, un 26% con cefalea, un 17% con epilepsia y un 12% presentaron al inicio una hemorragia cerebral. Hay una cierta controversia sobre el riesgo de rotura de estas lesiones. Mientras algunos autores defienden un riesgo bajo^{43,45}, Easley et al⁴⁶ comunican un riesgo de hemorragia cerebral 20 veces mayor en los varones menores de 45 años con HHT y MVsn que la población general.

Esto enlaza con la necesidad de realizar programas de cribado para estas lesiones vasculares en pacientes con HHT, respecto a lo cual hay defensores^{42,43,46,47} y detractores⁴⁵. La exploración de elección como prueba de cribado es la angiografía nuclear magnética con contraste^{19,30,42} y, si ésta es positiva, debe realizarse una arteriografía cerebral para confirmar el diagnóstico. Dada la frecuencia de las MVsn, las devastadoras consecuencias que puede tener y la posibilidad de utilizar una prueba de detección no invasiva, estamos de acuerdo con los autores que abogan por realizar este cribado, aunque es un tema no resuelto.

Con respecto al tratamiento, el problema es que no se conoce la historia natural de la evolución de estas lesiones, por lo que no está claro si debemos tratar las MVsn asintomáticas^{1,43}. Por el momento, las indicaciones de tratamiento se consideran las mismas que en los pacientes no diagnosticados de HHT⁴⁵. En caso de decidir no tratarlas, se recomienda realizar un seguimiento con resonancia magnética cada 1-3 años, dada la posibilidad de crecimiento de las malformaciones, como se ha comprobado que ocurre en otros órganos (pulmón)⁴².

Las opciones terapéuticas son la microcirugía, la radiocirugía esteroide (para lesiones menores de 3 cm de diámetro) y la embolización, y puede elegirse una u otra o su combinación según las características de las lesiones, su localización, número, y otros factores^{29,43}.

Telangiectasias gastrointestinales

No se conoce bien su frecuencia, pero sí sus consecuencias. Aproximadamente de un 13 a un 33% de los pacientes con HHT presentan hemorragia digestiva^{27,31,48}, lo que permite suponer que su frecuencia es mayor. Sabbà et al³⁰ encontraron telangiectasias gástricas en 16 de 25 pacientes

estudiados (64%), aunque no aclaran si estaban sintomáticos. La hemorragia digestiva se manifiesta a la quinta o sexta décadas de la vida y acarrea una gran morbimortalidad. En un estudio de mortalidad de población danesa con esta enfermedad, de 13 pacientes en los que la HHT contribuyó a la causa de la muerte, en 11 la hemorragia digestiva estaba presente³.

Las telangiectasias se localizan en cualquier parte del tubo digestivo, con más frecuencia en el estómago y el duodeno, y suelen ser múltiples⁴⁹. También están descritas malformaciones arteriovenosas y aneurismas de forma ocasional²³. La hemorragia digestiva aguda es rara, y es más habitual la anemia ferropénica por sangrado crónico. La intensidad de ésta guarda relación con el número de telangiectasias presentes en el paciente⁴⁹. A veces es difícil distinguir si la anemia es consecuencia de las epistaxis o de las lesiones gastrointestinales, ya que con frecuencia la sangre de origen nasal es deglutida, lo que altera las características de las heces y positiviza las pruebas de sangre oculta. Por ello, es importante realizar una anamnesis minuciosa para aclarar la relación temporal de las epistaxis con la alteración de las heces^{48,49}.

El diagnóstico se realiza mediante estudio endoscópico del aparato digestivo. No está indicado realizar pruebas de cribado, ya que no disponemos de tratamientos curativos para las telangiectasias ni medios preventivos para evitar la hemorragia^{48,49}.

El tratamiento es sintomático, y hay que realizar ferroterapia y transfusiones de sangre cuando sea preciso. En caso de hemorragia aguda se ha utilizado escleroterapia o ablación local de las lesiones con distintos tipos de láser, y es necesaria la cirugía si estas técnicas no tienen éxito^{49,50}. Un estudio demostró una disminución de los requerimientos transfusionales en pacientes con HHT y telangiectasias gastrointestinales tratadas con láser Nd:YAG, pero fue necesario realizar una media de 6 tratamientos en 2 años por recurrencia de las lesiones, y estos pacientes respondieron peor que los no HHT⁵⁰.

Se han utilizado distintos fármacos por vía oral, como estrógenos-progesterona, danazol y ácido aminocaproico, con resultados dispares^{49,51}. Estaría indicado su uso en los casos que no se controlan con tratamiento sintomático, y debe elegirse uno u otro según las características del paciente.

Malformaciones vasculares hepáticas

La frecuencia de estas lesiones se consideraba del 8-31%⁵². Pero Stabile et al⁵³, en un artículo recientemente publicado, han demostrado una frecuencia del 74%, utilizando como prueba de cribado la TC helicoidal con contraste en una serie de 70 pacientes con HHT no seleccionados. Las lesiones que encuentran son de 4 tipos: cortocircuitos arteriovenosos (arterioportales y arteriosistémicos), telangiectasias, dilatación de vena porta y grandes masas vasculares.

Habitualmente, los pacientes están asintomáticos. Así, de 52 pacientes con estas malformaciones, sólo 2 tenían manifestaciones clínicas (uno presentaba una insuficiencia cardíaca y otro una hematemesis por varices esofágicas) y ninguno mostraba alteraciones de las pruebas de función hepática⁵³. García-Tsao et al⁵² han descrito 3 patrones clínicos sobre la base de 19 pacientes sintomáticos: insuficiencia cardíaca de alto gasto como consecuencia de cortocircuitos arteriovenosos (el más frecuente), síntomas por hipertensión portal y por afección biliar.

Hasta ahora se ha utilizado la ecografía abdominal con Doppler como prueba de cribado, pero su menor sensibilidad con

respecto a la TC helicoidal ha hecho que esta última la haya desplazado para este propósito³⁰. No está claro que sea necesario realizar estas pruebas, ya que sólo son subsidiarios de tratamiento los pacientes sintomáticos. Pero la alta frecuencia de las malformaciones vasculares hepáticas puede confirmar el diagnóstico en pacientes con HHT probable (que pasarían a ser considerados con HHT definitiva)⁵⁴. La arteriografía sólo estaría indicada cuando se quiera realizar un estudio hemodinámico o con vistas a un trasplante hepático⁵³.

Con respecto al tratamiento, se ha utilizado la embolización o la ligadura de la arteria hepática^{52,55}. Pero la necesidad de realizar varias sesiones de embolización, el hecho de que la mejoría clínica dura poco tiempo después de ésta y, sobre todo, la aparición de casos de muerte por fallo hepático agudo, han llevado a que estas técnicas sean desaconsejadas hasta demostrar su seguridad^{54,56,57}. Por ahora, el trasplante hepático es la única opción terapéutica para los pacientes sintomáticos, y se han llevado a cabo varios intentos con éxito^{57,58}.

Conclusiones

Con frecuencia, los médicos se inhiben ante enfermedades que no conocen bien. La HHT puede ser un buen ejemplo. El propósito de esta revisión era profundizar en el conocimiento de esta enfermedad «no tan rara» y en la que tenemos muchas cosas que ofrecer a los pacientes que la padecen, tanto desde el punto de vista diagnóstico como terapéutico. Por su carácter sistémico, es conveniente formar equipos multidisciplinares para su manejo, que es lo que nuestro grupo de trabajo está intentando crear. Dentro de este equipo, es necesaria la presencia de especialistas en genética que ayuden a avanzar en el diagnóstico preciso de la enfermedad y, probablemente, en su curación definitiva en un futuro más o menos lejano.


Agradecimientos

Queremos agradecer de forma especial la colaboración de los Dres. Carmelo Bernabeu, Luisa M. Botella y Francisco Sanz-Rodríguez, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) de Madrid, en la revisión del artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shovlin CL, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax*. 1999;54:714-29.
2. Jessurun GA, Kamphuis DJ, Van der Zande FH, Nossent JC. Cerebral arteriovenous malformations in The Netherlands Antilles. High prevalence of hereditary hemorrhagic telangiectasia-related single and multiple cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg*. 1993;95:193-8.
3. Kjeldsen AD, Vase P, Green A. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Medicine*. 1999;245:31-9.
4. Plauchu H, De Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet*. 1989;32:291-7.
5. Guttmacher AE, McKinnon WC, Upton MD. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a disorder in search of the genetics community. *Am J Med Genet*. 1994;52:252-3.
6. Porteous ME, Curtis A, Williams O, Marchuk D, Bhattacharya SS, Burn J. Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 1994;31:925-6.
7. Morales C, Megía R, Del Valle A, Mazón A, García Mantilla J, Rama J. La enfermedad de Rendu-Osler-Weber (telangiectasia hemorrágica hereditaria). Presentación de 30 casos. *Acta Otorrinolaring Esp*. 1997;48:625-9.
8. Rendu H. Epitaxis répétées chez un sujet porteur de petits angiomes cutanés et muqueux. *Gaz des Hôpitaux Civils et Militaires*. 1986;135:1322-3.
9. Osler W. On a family form of recurring epistaxis, associated with multiple telangiectases of the skin and mucous membranes. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1901;7:333-7.
10. Weber FP. Multiple hereditary developmental angiomas (telangiectases) of the skin and mucous membranes associated with recurring haemorrhages. *Lancet*. 1907;2:160-2.

11. Hanes FM. Multiple hereditary telangiectases causes hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1909;20:63-73.
12. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol.* 1990;95:422-7.
13. Torsney E, Charlton R, Diamond AG, Burn J, Soames JV, Arthur HM. Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation.* 2003;107:1653-7.
14. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature Genet.* 1994;8:345-51.
15. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nature Genet.* 1996;13:189-95.
16. Piantanida M, Buscarini E, Dellavechia C, Minelli A, Rossi A, Buscarini L, et al. Hereditary haemorrhagic Telangiectasia with extensive liver involvement is not caused by either HHT1 or HHT2. *J Med Genet.* 1996;33:441-3.
17. Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet.* 2003;40:585-90.
18. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet.* 2000;91:66-7.
19. Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet.* 2003;40:585-90.
20. McDonald JE, Miller FJ, Hallam SE, Nelson L, Marchuck DA, Ward KJ. Clinical manifestations in a large hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2 kindred. *Am J Med Genet.* 2000;93:320-7.
21. Shah RK, Dhingra JK, Shapshay SM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a review of 76 cases. *Laryngoscope.* 2002;112:767-73.
22. Shovlin CL, Winstock AR, Peters AM, Jackson JE, Hughes JMB. Medical complications of pregnancy in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Q J Med.* 1995;88:879-87.
23. Begbie ME, Wallace GMF, Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome). A view from the 21st century. *Postgrad Med J.* 2003;79:18-24.
24. Bergler W, Sadick H, Götte K, Riedel F, Hörmann K. Topical estrogens combined with argon plasma coagulation in the management of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111:222-8.
25. Sabbà C, Gallitelli M, Palasciano G. Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2001;345:926.
26. Pérez del Molino A, Zarrabeitia R, Fernandez A, Botella LM. Eficacia del ácido tranexámico en un paciente con telangiectasia hemorrágica hereditaria y epistaxis masiva. *Med Clin (Barc).* 2004;123:118-9.
27. Porteous MEM, Burn J, Proctor SJ. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet.* 1992;29:527-30.
28. Mager JJ, Westermann CJJ. Value of capillary microscopy in the diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Dermatol.* 2000;136:732-4.
29. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Current concepts: hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 1995;333:918-24.
30. Sabbà C, Pasculli G, Cirulli A, Gallitelli M, Virgilio G, Guastamacchia E, et al. Rendu-Osler-Weber disease: experience with 56 patients. *Ann Ital Med Int.* 2002;17:173-9.
31. Haitjema T, Disch F, Overtoom TTC, Westermann CJJ. Screening family members of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med.* 1995;99:519-24.
32. White RI Jr, Pollack JS. Pulmonary arteriovenous malformations: diagnosis with three-dimensional helical CT- a breakthrough without contrast media. *Radiology.* 1994;191:613-4.
33. Koppen S, Korver CR, Dalinghaus M, Westermann CJ. Neonatal pulmonary arteriovenous malformation in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;87:226F-7F.
34. Kjeldsen AD, Oxhøj H, Andersen PE, Elle B, Jacobsen JP, Vase P. Pulmonary arteriovenous malformations: screening procedures and pulmonary angiography in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Chest.* 1999;116:432-9.
35. Nanthakumar K, Graham AT, Robinson TI, Grande P, Pugash RA, Clarke JA, et al. Contrast echocardiography for detection of pulmonary arteriovenous malformations. *Am Heart.* 2001;141:243-6.
36. Lee WL, Graham AF, Pugash RA, Hutchison SJ, Grande P, Hyland RH. Contrast echocardiography remains positive after treatment of pulmonary arteriovenous malformations. *Chest.* 2003;123:351-8.
37. Mager JJ, Overtoom TTC, Blauw H, Lammers JWJ, Westermann CJJ. Embolotherapy of pulmonary arteriovenous malformations: long-term results in 112 patients. *J Vasc Interv Radiol.* 2004;15:451-6.
38. Sagara K, Miyazono N, Inoue H, Ueno K, Nishida H, Nakajo M. Recanalization after coil embolotherapy of pulmonary arteriovenous malformations: study of long-term outcome and mechanism for recanalization. *AJR.* 1998;170:727-30.
39. Svetliza G, De la Canal A, Beveraggi E, Giacoia A, Ruiz C, Caruso E, et al. Lung transplantation in a patient with arteriovenous malformations. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21:506-8.
40. Abdalla SA, Gallione CJ, Barst RJ, Horn EM, Knowles JA, Marchuk DA, et al. Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J.* 2004;23:373-7.
41. Chauat A, Coulet F, Simonneau G, Weitzenbaum E, Soubrier R, Humbert M. Endoglin germline mutation, hereditary hemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:842A.
42. Fulbright RK, Chaloupka JC, Putman CHM, Sze GK, Merriam MM, Lee GK, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: prevalence and spectrum of cerebrovascular malformations. *Am J Neuroradiol.* 1998;19:477-84.
43. Willemsse RB, Mager JJ, Westermann CJJ, Overtoom TTC, Mauser H, Wolbers JG. Bleeding risk of cerebrovascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Neurosurg.* 2000;92:779-84.
44. Morgan T, McDonald J, Anderson CH, Ismail M, Miller F, Mao R, et al. Intracranial hemorrhage in infants and children with hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome). *Pediatrics.* 2002;109:12E.
45. Maher CO, Piepgras DG, Brown RD, Friedman JA, Pollock BE. Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke.* 2001;32:877-82.
46. Easey AJ, Wallace GM, Hughes JM, Jackson JE, Taylor WL, Shovlin CL. Should asymptomatic patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT) be screened for cerebral vascular malformations? Data from 22,061 years of HHT patient life. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:743-8.
47. Mandzia J, Henderson K, Faughnan M, White R Jr. Compelling reasons to screen brain in HHT. *Stroke.* 2001;32:2957-8.
48. Kjeldsen AD, Kjeldsen J. Gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterology.* 2000;95:415-8.
49. Longacre AV, Gross CP, Gallitelli M, Henderson KJ, White RI Jr, Proctor DD. Diagnosis and management of gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:59-65.
50. Sargeant JR, Loizou LA, Rampton D, Tulloch M, Bown SG. Laser ablation of upper gastrointestinal vascular ectasias: long term results. *Gut.* 1993;34:470-5.
51. Van Cutsem E, Rutgeerts P, Vantrappen G. Treatment of bleeding gastrointestinal vascular malformations with oestrogen-progesterone. *Lancet.* 1990;335:953-5.
52. Garcia-Tsao G, Korzenik JR, Young L, Henderson KJ, Jain D, Ryrd B, et al. Liver disease in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2000;343:931-6.
53. Stabile Ianora AA, Meneo M, Sabbà, Cirulli A, Rotondo A, Angelelli G. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Multi-detector row helical CT assessment of hepatic involvement. *Radiology.* 2004;230:250-9.
54. Saluja S, White RI. Hereditary hemorrhagic telangiectasia of the liver: Hyperperfusion with relative ischemia- poverty amidst plenty. *Radiology.* 2004;230:25-7.
55. Chavan A, Galanski M, Wagner S, Caselitz M, Schlitt HJ, Gratz KF, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: effective protocol for embolization of hepatic vascular malformations-experience in five patients. *Radiology.* 1998;209:735-9.
56. Miller FJ, Jr, Whiting JH, Korzenik JR, White RI. Caution with use of hepatic embolization in the treatment of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Radiology.* 1999;213:928-30.
57. Pflitzmann R, Heise M, Langrehr JM, Jonas S, Steinmüller T, Podrabsky P, et al. Liver transplantation for treatment of intrahepatic Osler's disease: first experiences. *Transplantation.* 2001;72:237-41.
58. Boillot O, Bianco F, Viale JP, Mion F, Mechet I, Gille D, et al. Liver transplantation resolves the hyperdynamic circulation in hereditary hemorrhagic telangiectasia with hepatic involvement. *Gastroenterology.* 1999;116:187-92.



La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) es una enfermedad vascular autosómica dominante caracterizada por hemorragias espontáneas y recurrentes. Mutaciones en los genes que codifican para endoglina y ALK1 son responsables de la HHT1 y HHT2, respectivamente. Ambas proteínas son componentes del complejo receptor del TGF- β , expresadas fundamentalmente en células endoteliales. A partir de sangre periférica de pacientes de HHT, aislamos células endoteliales (BOECs) y estudiamos sus alteraciones funcionales en relación a células de individuos sanos. Las BOECs de pacientes de HHT, tanto HHT1 como HHT2, presentaban bajos niveles de Endoglina y ALK1, así como una señalización defectuosa de esta vía de TGF- β . A consecuencia, los niveles de ALK5 disminuyen dando lugar a un defecto general de la señalización de TGF- β . La señalización defectuosa de TGF- β conduce a alteraciones en la expresión de un gran número de genes diana, así como en las funciones en las que éstos se encuentran implicados. Así, las BOECs de pacientes presentan alteraciones a nivel de adhesión, migración, síntesis de matriz extracelular, organización del citoesqueleto, ciclo celular o fisiología vascular, dando lugar a un defecto general en angiogénesis y una fragilidad de los capilares que explican la aparición de malformaciones vasculares. En este trabajo nos acercamos a entender, con más detalle, los mecanismos moleculares y celulares que conducen a las manifestaciones de la HHT, más allá de las alteraciones producidas en las vías de señalización de TGF- β , y describimos un modelo fisiológico adecuado para el estudio de la enfermedad y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.